



HAL
open science

Evaluation de l'adhérence gingivale et du potentiel antibactérien de surfaces structurées par laser femtoseconde pour l'implantologie orale

Steve Papa

► **To cite this version:**

Steve Papa. Evaluation de l'adhérence gingivale et du potentiel antibactérien de surfaces structurées par laser femtoseconde pour l'implantologie orale. Biologie moléculaire. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2023. Français. NNT : 2023STET0063 . tel-04633673

HAL Id: tel-04633673

<https://theses.hal.science/tel-04633673v1>

Submitted on 3 Jul 2024

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.



N°d'ordre NNT : 2023STET063

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ JEAN MONNET SAINT-ÉTIENNE

Membre de l'Université de LYON

École Doctorale N°488
Sciences Ingénierie Santé – EDSIS 488

Spécialité : Biologie, Médecine, Santé
Discipline de doctorat : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Soutenue publiquement le 21.12.2023, par :
Steve Papa

Evaluation de l'adhérence gingivale et du potentiel antibactérien de surfaces structurées par laser femtoseconde pour l'implantologie orale

Devant le jury composé de :

Bardet, Claire
Steyer, Philippe
Grosogeat, Brigitte

Professeure
Professeur
Professeure

Université Paris Cité / URP 2496
INSA Lyon / Mateis
UCBL / LMI

Rapporteure
Rapporteur
Présidente

Guignandon, Alain
Dumas, Virginie
Hamzeh-Cognasse, Hind
Xxx, Sedao

Maitre de conférences
Ingénieure de recherche
Ingénieure de recherche
Ingénieur de recherche

UJM / U1059 – Sainbiose
Ecole Centrale de Lyon / LTDS
UJM / U1059 – Sainbiose
UJM / Laboratoire Hubert Curien

Directeur de thèse
Encadrante de thèse
Invitée
Invité

Résumé

Cette thèse traite des problèmes d'infections des implants dentaires, telles que la péri-implantite, causées par l'adhérence de bactéries parodontopathogènes. Elle explore l'utilisation de la texturation laser femtoseconde (fs-L) pour améliorer les propriétés des surfaces d'implants en alliage de titane (Ti6Al4V).

Le projet, financé par l'ANR et mené en collaboration avec divers laboratoires, a utilisé des techniques de caractérisation avancées pour analyser les surfaces texturées et évaluer leur efficacité en conditions biologiques. Les résultats montrent que la texturation par fs-L permet de créer des structures de surface périodiques (LIPSS) micro et nanométriques, modifiant la surface de contact et par conséquent l'adhérence cellulaire et bactérienne. Les surfaces ainsi texturées ont démontré une réduction significative de l'adhérence des bactéries parodontopathogènes, telles que *Porphyromonas gingivalis*, réduisant ainsi potentiellement les risques de péri-implantite.

Les études *in vitro* ont également confirmé une meilleure adhérence des fibroblastes gingivaux sur les surfaces texturées, ce qui pourrait réduire les risques d'infiltration bactérienne et ainsi améliorer la stabilité et l'intégration des implants.

En conclusion, la texturation laser femtoseconde des surfaces d'implants dentaires est prometteuse pour créer des implants plus durables et doublement fonctionnalisés, améliorant l'adhérence cellulaire et possédant des propriétés antibactériennes accrues. Ces avancées ouvrent la voie à des implants répondant mieux aux défis cliniques actuels tout en contribuant à la lutte contre l'antibiorésistance. Des études supplémentaires plus proches d'une situation clinique sont prévues pour valider ces résultats et explorer les interactions entre les topographies fs-L et les réponses biologiques des tissus environnants.

Mots-Clés

Implants dentaires ; Bactéries parodontopathogènes ; Laser femtoseconde ; Fonctionnalisation de surface ; Fibroblastes gingivaux ; Adhérence cellulaire ; Péri-implantite ; *Porphyromonas gingivalis*

Abstract

This thesis addresses issues related to infections of dental implants, such as peri-implantitis, caused by the adhesion of periodontopathogenic bacteria. It explores the use of femtosecond laser (fs-L) texturing to enhance the properties of titanium alloy (Ti6Al4V) implant surfaces.

The project, funded by the ANR and conducted in collaboration with various laboratories, employed advanced characterization techniques to analyze textured surfaces and evaluate their effectiveness under biological conditions. The results demonstrate that fs-L texturing can create micro and nanometric periodic surface structures (LIPSS), altering the contact surface and thus cellular and bacterial adhesion. Textured surfaces showed a significant reduction in the adhesion of periodontopathogen bacteria, such as *Porphyromonas gingivalis*, potentially reducing the risks of peri-implantitis.

In vitro studies also confirmed better adhesion of gingival fibroblasts to textured surfaces, which could reduce the risk of bacterial infiltration and thus improve implant stability and integration.

In conclusion, femtosecond laser texturing of dental implant surfaces holds promise for creating more durable and dual-functionalized implants, enhancing cellular adhesion, and possessing increased antibacterial properties. These advancements pave the way for implants better suited to current clinical challenges while contributing to the fight against antibiotic resistance. Further studies closer to clinical settings are planned to validate these results and explore the interactions between fs-L topographies and the biological responses of surrounding tissues.

Keywords

Dental implants; Periodontopathogen bacteria; Femtosecond laser; Surface functionalization; Gingival fibroblasts; Cell adhesion; Peri-implantitis; *Porphyromonas gingivalis*

Table des matières

Table des matières	v
Remerciements	xi
Glossaire	xv
Table des figures.....	xvii
I Introduction générale et objectifs du projet de thèse	1
II Etat de l'art.....	5
A. Implants dentaires.....	5
1. Définition d'un implant dentaire.....	5
2. Intégration de l'implant.....	5
3. Pathologies péri-implantaires	9
4. Propriétés et modifications de surface	10
B. Texturation par laser femtoseconde.....	13
1. Ablation laser.....	13
2. Laser-Induced Periodic Surface Structures	14
3. Paramètres du laser femtoseconde	15
C. Impact de la topographie sur la mouillabilité	18
D. Rôles de la topographie dans l'adhérence bactérienne	20
1. Contexte bactérien.....	20
2. Formation du biofilm bactérien	22
3. Solutions antibactériennes.....	23
a. Impact de la rugosité de surface sur l'adhérence bactérienne	24
b. Impact de la topographie de surface sur l'adhérence bactérienne.....	24
i. Caractérisation de la topographie.....	24
ii. Différents types de topographie	27
iii. Effets de la topographie	27
c. Impact de la mouillabilité sur l'adhérence bactérienne	29
d. Impact d'autres paramètres sur l'adhérence bactérienne	29
4. Méthodes d'analyse de l'adhérence bactérienne.....	30
a. Mesure de la force d'adhérence bactérienne.....	31
b. Analyse de l'énergie d'interaction.....	32

E.	Impacts de la topographie sur le comportement biologique de cellules eucaryotes ..	34
1.	Contexte	34
2.	Adhérence cellulaire.....	34
3.	Morphologie cellulaire	37
4.	Orientation cellulaire	37
5.	Migration cellulaire	38
6.	Prolifération cellulaire	38
7.	Différenciation cellulaire	39
8.	Approches techniques pour évaluer l'adhérence cellulaire/tissulaire	40
	Plan de travail.....	42
III	Résultats.....	43
A.	Evolution de la mouillabilité d'une surface de Ti6Al4V après usinage laser, stérilisation et vieillissement.....	43
1.	Impact de la texturation fs-L et de la stérilisation par autoclave sur la mouillabilité du Ti6Al4V	43
2.	Evolution de la mouillabilité du Ti6Al4V	51
a.	Matériels et méthodes	51
b.	Résultats et discussion	52
B.	Caractérisation des paramètres topographiques d'une surface texturée par fs-L et corrélation à l'adhérence bactérienne	54
C.	Fonctionnalisation de surface : améliorer l'adhérence cellulaire et limiter le biofilm bactérien.....	67
D.	Adhérence cellulaire en conditions pro-inflammatoires	79
1.	Matériels et Méthodes.....	79
2.	Résultats.....	79
3.	Discussion et perspectives	82
IV	Discussion et limites.....	84
V	Conclusion générale.....	88
VI	Collaborations et perspectives	89
VII	Bilan scientifique	91
A.	Publications scientifiques.....	91
1.	Publications dans un journal	91
2.	Publications de conférence	91

B.	Conférences.....	92
1.	Communications orales.....	92
2.	Communications affichées	93
C.	Vulgarisation scientifique.....	94
D.	Représentation étudiante	94
E.	Enseignement et encadrement.....	94
VIII	Références.....	96
IX	Annexes.....	120
A.	Article Nanomaterials: étude de la partie basse de l'implant pour améliorer l'ostéointégration et ainsi le support de l'implant et de la gencive.....	120

*Bâtir une théorie avant d'avoir des données est une erreur monumentale :
insensiblement on se met à torturer les faits pour qu'ils collent avec la théorie,
alors que ce sont les théories qui doivent coller avec les faits.*

« Un scandale en bohème »

Sir Arthur Ignatius Conan Doyle

Remerciements

Parce que sans financement ce projet n'aurait pas eu lieu, je remercie la Manutech-SLEIGHT Graduate School pour la bourse de thèse obtenue auprès de l'Agence Nationale de la Recherche ; mais également Cécile, Aurélie et Elise pour le travail qu'elles fournissent au sein du consortium et la visibilité qu'elles donnent aux étudiants.

Je souhaite bien évidemment remercier mon jury de thèse ; premièrement les rapporteur(e)s, le professeur Philippe Steyer pour avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse et en avoir fourni un rapport minutieux et détaillé ; et la professeure Claire Bardet, pour son rapport tant constructif que valorisant, mais également pour sa bienveillance et la motivation qu'elle a su me donner en fin de 2^{ème} année. Je remercie également la professeure Brigitte Grosgeat d'avoir accepté d'examiner mes travaux en qualité de présidente de jury lors de ma soutenance de thèse.

Pour sa présence dans le jury mais surtout pour tout ce qu'il m'a appris lors de ses années de thèse, merci à toi Sedao pour ta gentillesse, ton humour et pour l'intérêt que tu voues à ces projets multidisciplinaires.

De la même manière, je te remercie Hind pour ton sourire communicatif, ta bienveillance à toutes épreuves, ton expertise, mais par-dessus tout pour avoir su me remotiver dans des moments compliqués de cette thèse.

Mes remerciements les plus évidents vont à mes encadrants de thèse, auprès desquels j'ai fait un apprentissage autant scientifique qu'humain ; merci Alain pour toutes ses heures passées à échanger, pour ta spontanéité à transmettre ta passion de la recherche, tes conseils avisés ou encore les manip à double tranchant du vendredi, qui nous auront fourni autant de bonnes que de mauvaises nouvelles ; merci Virginie pour ta gentillesse, ton soutien, ton optimisme qui m'a souvent permis de relativiser, mais également pour les coup de boost que tu as su me donner dans les moments où c'était nécessaire, et qui ont permis d'aboutir à ces travaux dont je peux dire aujourd'hui que je suis fier. Je vous suis tous les deux reconnaissant de m'avoir fait confiance sur ce projet, ainsi que pour la qualité de l'encadrement et votre disponibilité dans les moments de rush.

L'unité SAINBIOSE et plus particulièrement l'équipe LBTO/BOOST m'a accueilli pendant trois années, j'en remercie bien évidemment les directeurs Laurence et Hubert de m'avoir permis de mener à terme ce projet de recherche au sein de leur équipe. Je remercie l'entièreté des permanents de l'équipe, Sylvie pour ta disponibilité et tous les services que tu m'auras rendu (finalement je serai parti avant que tu prennes ta retraite !) ; Mireille aka Mimi (ou l'éternelle doctorante du labo !) pour ton rire et tous les services que tu m'as rendus également ; Luc, Bernard et Marie-Hélène pour vos débats pendant les pauses café et vos nombreux conseils et anecdotes ; Maura et Guillaume pour votre bonne humeur et vos conseils scientifiques ;

Arnaud, Marité, Stéphanie, Norbert, Marthe, Ingrid et Christine pour votre accueil au sein de l'équipe.

Je remercie le GIE Manutech USD pour l'accès à leur plateforme de laser femtoseconde et leur expertise dans le domaine ; en particulier Yoan, pour tout ce que tu m'as appris sur cet outil, et pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes appels à l'aide quand je me perdais dans les aspects physiques de la biblio ; Alina pour ta bienveillance et la patience dont tu fais preuve pour transmettre tes connaissances ; Pierre pour le travail que l'on a pu faire ensemble sur un concours de circonstances.

J'adresse aussi mes remerciements au Laboratoire Hubert Curien pour les échanges et les collaborations que l'on a pu établir, notamment avec Anthony, cela a été un plaisir de te rencontrer et de collaborer avec toi.

Je remercie également le LMI pour les échanges constructifs qui ont contribué au bon déroulement de ce projet, en particulier avec Nina, merci pour ta disponibilité, tes conseils et ta gentillesse.

Merci au LTDS pour l'accès à leurs infrastructures ainsi qu'à leur expertise, et particulièrement à Maryane pour tout ce que tu m'auras appris sur la microscopie électronique.

Je remercie l'équipe du GIMAP pour l'accueil que j'y ai toujours reçu, notamment Marie-Ange et Charles-Antoine que j'ai sollicité à de nombreuses reprises.

Sans l'ombre d'un doute un énorme et sincère merci à tous les doctorant(e)s / ami(e)s que j'ai rencontré(e)s lors de ces années de thèse ; Mathieu aka Dr Mamalouf, merci pour beaucoup de choses, tes imitations, ton pipeau, tes ragots sur le labo avec un historique digne des archives de l'INA, ton soutien, ta compagnie dans le bureau... ; Elisa aka Dr Zazou, merci d'avoir été titulaire pour que je puisse être suppléant, et pour le soutien dans cette galère que l'on aura partagée du début à la fin ; Lauriane et Solène, aka Lolo et Soso, impossible de vous dissocier sinon on sait très bien laquelle sera jalouse, merci pour avoir été de fidèles collègues et amies de bureau, on aura pas beaucoup bronzé mais on aura bien rigolé ; Rehan aka l'informaticien du labo, merci pour le soutien mutuel que l'on s'est apporté surtout sur la fin de ce parcours ; Priyanka, Peter, Kim, Hao, Sarah, Asmaa, Guillaume, merci pour les moments qu'on aura pu passer ensemble ; Aurélien, parce que même s'il faut creuser longtemps je sais qu'au fond t'es une belle personne ; Pauline, merci pour les cafés aussi revigorant que ton sourire ; Jade, merci pour ton soutien et les discussions dans les couloirs ; Olfa et Hanielle, merci pour votre positivité, c'était toujours un plaisir de vous croiser entre nos deux labos.

Il me semble impossible de ne pas remercier les meilleures stagiaires que j'aurais pu espérer encadrer ; merci Anaïs pour ta bataille contre les organoïdes, mais surtout pour ton précieux soutien moral depuis la Suisse ; merci Samantha pour ta gentillesse pendant ces quelques mois de stage ; merci Amélie pour ton investissement et ta générosité, tant pendant ton stage que durant ces derniers mois ; merci à Sarah et Océane pour l'intérêt et la motivation que vous avez apportés à ce projet.

Pour m'avoir supporté malgré la distance et le peu de nouvelles, je remercie mes amis et amies de la fac ; les copains du Killberry ; la team tottote ; Gomar ; Pierre ; Doffé ; et bien évidemment Louis, le binôme de mon choix.

Pour m'avoir aidé à garder le cap pendant ces années de thèse, je remercie également mes amis et amies rencontré(e)s à Lyon ; Pola et Léa, pour les procédures habituelles qui m'ont bien souvent changé les idées ; Karl et Juju, sur qui j'ai toujours pu compter pour décompresser autour d'un pichet ; la Bieriteam pour les farigoulettes ; Lucas et Rémy avec qui je prends toujours plaisir à partager nos passions communes : les sciences et la bière !

Pour être fidèles au poste après toutes ces années, et ce même si vous n'avez aucune idée du sujet de ce manuscrit, merci Paul, merci Noé, merci Vincent ; merci RV.

J'adresse un sincère remerciement à ma famille. Merci à ma grand-mère, ma tante, ma sœur et mon père pour votre soutien au fil de ces années d'études. A mes grands-parents, merci pour la confiance que vous avez toujours eue en moi, et pour la force que vous me donnez encore, où que vous soyez. Et bien évidemment merci à toi maman, pour tout ce que tu m'as toujours apporté, pour la confiance que tu as en moi, pour m'avoir permis de suivre le parcours que je souhaitais et pour m'avoir soutenu et encouragé pendant toutes ces années d'école et d'études.

Enfin, même s'il est difficile d'exprimer un remerciement à la hauteur de la reconnaissance que j'ai à ton égard ; pour tout ce que tu m'as apporté pendant toutes ces années, pour ta générosité et ton soutien quotidiens, pour avoir partagé toutes mes galères et m'avoir permis d'aller jusqu'au bout, et surtout pour la confiance que tu m'as accordée en me suivant dans cette aventure, merci à toi Naomi.

Glossaire

A

AFM
microscope/microscopie à force atomique · 25, 30,
32, 41, 43, 67, 86

C

CAM
molécules d'adhérence cellulaire · 36

CSM
cellules souches mésenchymateuses · 8, 37, 38, 39,
40

D

DLVO
Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek · 22, 32, 33

E

EPI
épithélium péri-implantaire · 8

EPS
substances polymériques extracellulaires · 20, 22, 24,
29

F

fs-L
laser femtoseconde · 1, 2, 3, 12, 15, 16, 17, 19, 27,
38, 39, 42, 43, 44, 50, 51, 52, 53, 54, 66, 67, 68,
78, 79, 80, 83, 84, 85, 87, 88, 118

G

GR
vert (source de laser de longueur d'onde $\lambda = 515$ nm)
· 43, 44, 50, 67, 68, 78, 79, 80, 82, 83

H

HGnF
fibroblastes gingivaux humains primaires · 42, 67, 79,
82

HSFL
LIPSS à haute fréquence spatiale · 14, 88

I

IR
infrarouge · 43, 44, 50, 66, 67, 68, 78, 79, 80, 83

L

LIPSS
laser-induced periodic surface structures / structures
de surface périodiques générées par laser · 12, 14,
15, 16, 27, 38, 39, 42, 43, 44, 50, 51, 52, 53, 54,
66, 67, 68, 78, 79, 80, 82, 83, 88, 90, 92

LPS
lipopolysaccharides · 21, 22, 42, 79, 80, 81, 82, 83, 87

LSFL
LIPSS à basse fréquence spatiale · 14

M

MEC
matrice extracellulaire · 6, 34, 35, 38, 40, 82

R

Ra
hauteur moyenne arithmétique d'un profil · 24, 26,
54

Rq
rugosité quadratique moyenne · 26

S

- Sa
hauteur moyenne arithmétique d'une aire · 24, 26,
54, 67
- SCFS
spectroscopie de force unicellulaire · 30, 31
- Sdr
rapport de surface interfaciale développée · 26
- Sds
densité de sommets · 26
- SLA
sablage à gros grains et attaque acide · 11, 12
- Sq
hauteur moyenne quadratique · 26
- Ssk
asymétrie · 26
- Str
rapport d'aspect de texture · 26
- Sz
hauteur maximale · 26

T

- TNF- α
Facteur de Nécrose Tumorale alpha · 42, 79, 80, 81,
82, 87
- tp
taux de longueur portante · 26

U

- UV
ultraviolet / ultraviolette · 40, 43, 44, 50, 84, 88

X

- XDLVO
théorie DLVO étendue · 22, 32, 33

Table des figures

FIGURE 1 - RESUME GRAPHIQUE DES OBJECTIFS DU PROJET LASIMP ET DE L'ORGANISATION DU MANUSCRIT DE THESE.....	4
FIGURE 2 – CHRONOLOGIE DE LA MISE EN PLACE ET DE L'OSTEOINTEGRATION D'UN IMPLANT DENTAIRE ; ADAPTE D'APRES WANG ET AL., 2015 [7]......	7
FIGURE 3 – ATTACHEMENT DES TISSUS BIOLOGIQUE (A) A UNE DENT NATURELLE OU (B) A UN IMPLANT DENTAIRE; ROSE, 2004 [22]......	9
FIGURE 4 – (A) SCHEMA DU TRAITEMENT LIPSS DANS UNE APPROCHE DE BALAYAGE DE FAISCEAU ET (B) FACTEURS AFFECTANT ET CONTROLANT LA MOUILLABILITE (E.G. HYDROPHOBIE/PHILIE) ET LA STABILITE A LONG TERME DES SURFACES STRUCTUREES PAR LIPSS ; BONSE ET AL., 2021 [57].	14
FIGURE 5 – FORMATION DE LIPSS BASEE SUR LA GENERATION DE PLASMONS DE SURFACE PROPOSEE, A UNE FLUENCE (A) D'IMPULSION ELEVEE OU (B) D'IMPULSION FAIBLE ; ADAPTE D'APRES MESHAM ET AL., 2023 [58]......	15
FIGURE 6 – VARIATIONS DE LA DISTRIBUTION GAUSSIENNE EN INTENSITE EN $Z = 0$ ET Z ARBITRAIRE (GAUCHE) ; EVOLUTION DU RAYON D'UN FAISCEAU GAUSSIEN $\Omega(Z)$ AVEC LA DISTANCE Z (DROITE).	16
FIGURE 7 – SCHEMA SIMPLIFIE DE LA TEXTURATION D'UNE SURFACE PAR BALAYAGE D'UN FAISCEAU FS-L ; ΔX ET ΔY REPRESENTENT L'ESPACEMENT ENTRE LES DIFFERENTS SPOTS D'IMPACT DU FAISCEAU.	17
FIGURE 8 - (A) ANGLES DE CONTACT MESURES PAR LA METHODE DE LA GOUTTE SESSILE. (B) ETATS DE MOUILLAGE DE CASSIE-BAXTER ET DE WENZEL ; ADAPTE D'APRES LEE ET AL., 2021 [61].	18
FIGURE 9 - CYCLE DE FORMATION D'UN BIOFILM BACTERIEN ; ADAPTE D'APRES SAUER ET AL., 2022 [99].	23
FIGURE 10 – SCHEMA DE L'ATTACHEMENT DIFFERENTIEL DES BACTERIES AUX SURFACES MICRO-NANOSTRUCTUREES ; ADAPTE D'APRES LINKLATER ET AL., 2021 [107].	24
FIGURE 11 - VARIATION DES NIVEAUX DE TOPOGRAPHIE EN FONCTION DE L'ECHELLE D'ANALYSE ; ADAPTE D'APRES CRAWFORD ET AL., 2012 [128].	25
FIGURE 12 - REPRESENTATION DE LA MESURE DE RUGOSITE D'UNE SURFACE PAR METHODE DE PROFIL (RA) OU METHODE SURFACIQUE (SA) ; LES MESURES SONT EFFECTUEES SUR LES VALEUR ABSOLUES DU PROFIL (RA) OU DE LA REPRESENTATION 3D (SA).	26
FIGURE 13 - SCHEMA DE STRATEGIES POUR MESURER LA FORCE D'ADHERENCE DES BACTERIES A LA SURFACE ET CALCULER L'ENERGIE D'INTERACTION SUR UNE SURFACE MODIFIEE AVEC DES MOTIFS TOPOGRAPHIQUES ; ADAPTE D'APRES YANG 2022 [172].	31
FIGURE 14 – SCHEMA DES STRATEGIES DE MODELISATION DE L'ENERGIE D'INTERACTION ENTRE LES BACTERIES ET LES SURFACES MODIFIEES (CHIMIQUEMENT OU TOPOGRAPHIQUEMENT), BASEES SUR LES THEORIES DLVO OU XDLVO ; ADAPTE D'APRES YANG 2022 [172].	32
FIGURE 15 – REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ADHERENCES FOCALES. (A) CELLULE ADHERENTE. AU COURS DE L'ETALEMENT ET LA MIGRATION, LA CELLULE ADHERE A DES LIGANDS DE LA MEC PAR LE BIAIS D'ADHERENCES NAISSANTES QUI SE TRANSFORMENT EN COMPLEXES FOCALUX DANS LE LAMELLIPODE (LP), PUIS EN ADHERENCES FOCALUX DANS LA LAMELLE (LM). (B) VUE AGRANDIE D'UNE ADHERENCE FOCALUX AVEC LES PRINCIPAUX COMPOSANTS MOLECULAIRES. LA PROTEINE TRANSMEMBRANAIRE INTEGRINE SE LIE A LA FIBRONECTINE DE LA MEC. LA CONNEXION AUX FIBRES DE STRESS D'ACTINE, QUI PEUVENT SE CONTRACTER (MYOSINE II), EST ASSUREE PAR LA TALINE. CE LIEN MECANIQUE DE BASE EST RENFORCE PAR DES PROTEINES COMME LA VINCULINE, LA PAXILLINE OU L'A-ACTININE ; D'APRES HOFFMANN 2013 [204].	35
FIGURE 17 – RESUME GRAPHIQUE : EVALUATION PAR METHODE DE LA GOUTTE SESSILE DE LA MOUILLABILITE DE SURFACE DE Ti6Al4V POLI OU TEXTUREES PAR LIPSS IR, GR OU UV, AVANT ET APRES STERILISATION PAR AUTOCLAVE. LA TEXTURATION FS-L AUGMENTE L'HYDROPHILIE EN REDUISANT LES ANGLES DE	

CONTACT. PARMIS LES SURFACES TEXTUREES LES LIPSS GR ET UV PRESENTENT L'HYDROPHILIE AVEC LA PLUS GRANDE STABILITE FACE A LA STERILISATION PAR AUTOCLAVE.....	50
FIGURE 18 – EVALUATION DE L'EVOLUTION DE LA MOUILLABILITE PAR METHODE DE LA GOUTTE SESSILE SUR T16AL4V POLI (1 ; BLEU), TEXTURE PAR LIPSS SANS STERILISATION (2 ET 3 ; ROUGE ET ORANGE) OU APRES STERILISATION PAR AUTOCLAVE A J0 (4 ; VERT) OU J7 (5 ; VIOLET). CHAQUE MESURE REPRESENTE L'ANGLE DE CONTACT MOYEN ET LES BARRES D'ERREUR LES MINIMUM ET MAXIMUM ; N = 3 GOUTTES / ECHANTILLON ET 1 ECHANTILLON / CONDITION. (GIE MANUTECH USD).....	52
FIGURE 19 – RESUME GRAPHIQUE : LA VARIATION DE PARAMETRES FS-L A PERMIS DE GENERER DES LIPSS IR DE TOPOGRAPHIES VARIABLES SUR T16AL4V ; LA MESURE D'UNE SERIE DE PARAMETRES TOPOGRAPHIQUES MISE EN CORRELATIONS AVEC L'ADHERENCE DE <i>P. GINGIVALIS</i> A PERMIS D'IDENTIFIER LES PARAMETRES TOPOGRAPHIQUES DETERMINANT DANS L'ADHERENCE BACTERIENNE.	66
FIGURE 20 – RESUME GRAPHIQUE : UNE EVALUATION DE L'ADHERENCE CELLULAIRE ET BACTERIENNE SUR DES SURFACES TEXTUREES PAR FS-L A MONTRE UNE AUGMENTATION DE L'ADHERENCE D'UNE CULTURE DE FIBROBLASTES GINGIVAUX (LIPSS IR ET GR) AINSI QU'UNE DIMINUTION DE L'ADHERENCE DE <i>S. MUTANS</i> (LIPSS GR) ET DE <i>P. GINGIVALIS</i> (LIPSS IR ET GR).	78
FIGURE 21 – REPRESENTATION GRAPHIQUE DES TESTS D'ARRACHEMENT CELLULAIRE PAR SCLEROMETRE APRES 24H (A), 72H (B) ET 5 JOURS (C) DE TRAITEMENT TNF-A / LPS. LES BOX PLOT (MINIMUM A MAXIMUM) REPRESENTENT L'AIRE ARRACHEE (MM ²) MESUREE PAR IMAGERIE DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE ; LES BOX PLOT PRESENTS A DROITE CORRESPONDENT A UN AGRANDISSEMENT D'ECHELLE SUR UNE PORTION DES BOX PLOT DE GAUCHE ; N = 6 RAYURES/GROUPE ; MANN-WHITNEY U TEST ; * $P < 0.1$, ** $P < 0.01$	81
FIGURE 22 – REPRESENTATION GRAPHIQUE DES TESTS D'ARRACHEMENT DE LA MEC PAR SCLEROMETRE APRES 24H (A) ET 72H (B) DE TRAITEMENT TNF-A / LPS. LES BOX PLOT (MINIMUM A MAXIMUM) REPRESENTENT L'AIRE ARRACHEE (MM ²) MESUREE PAR IMAGERIE DE LA FIBRONECTINE ; LES BOX PLOT PRESENTS A DROITE CORRESPONDENT A UN AGRANDISSEMENT D'ECHELLE SUR UNE PORTION DES BOX PLOT DE GAUCHE ; N = 6 RAYURES/GROUPE ; MANN-WHITNEY U TEST ; * $P < 0.1$, ** $P < 0.01$	82

I Introduction générale et objectifs du projet de thèse

Les problèmes liés à la perte de dents préoccupent l'humanité depuis des siècles, tant pour des raisons fonctionnelles qu'esthétiques. L'utilisation traditionnelle de prothèses tend à être remplacée par la pose d'implants dentaires, dans le traitement d'un édentement unitaire, partiel ou complet. Au fil du temps, un large panel de matériaux a été utilisé en implantologie orale, tel que l'ivoire, l'os, les métaux ou encore les pierres précieuses. Les études cliniques et la recherche ont permis d'identifier les métaux comme des éléments de choix pour l'implantologie ; plus précisément, le titane et ses alliages sont à l'heure actuelle privilégiés pour la fabrication de divers types d'implants. Majoritairement utilisé en implantologie orale, le Ti6Al4V est un alliage qui a été sélectionné, tant pour sa biocompatibilité que pour ses capacités d'ostéointégration. L'apparition des implants dentaires a conduit à l'émergence de nouvelles pathologies, notamment la mucosite et la péri-implantite, résultant de l'adhérence et du développement de bactéries parodontopathogènes (bactéries de la sphère orale susceptible d'engendrer une maladie parodontale) sur une surface inerte non biologique. Ces nouveaux défis cliniques présentent un enjeu médical et sociétal plus grand qu'il n'y paraît, puisque des liens de comorbidité ont été mis en évidence avec des pathologie plus répandues telles que la maladie d'Alzheimer, la polyarthrite rhumatoïde, ou l'insulino-résistance.

Face à ses problématiques, les modifications de la surface de l'implant se sont présentées comme une solution pour augmenter la durabilité des implants dentaires. Ces modifications couramment basées sur un traitement chimique de la surface présentent cependant des complexités en termes de biocompatibilité et de stabilité. Des traitements antibiotiques préventifs permettent également de limiter l'apparition de ces pathologies ; néanmoins, le contexte actuel de lutte contre l'antibiorésistance ambitionne le développement de solutions alternatives à la prescription d'antibiotique à usages prophylactique et thérapeutique.

Dans la nature, des structures d'échelles micro à nanométriques sont connues pour leur activité mécano-topographique. En se basant sur le biomimétisme, les modifications topographiques à ces échelles ont donc été envisagées comme une solution efficace, pour fonctionnaliser une surface inerte de manière pérenne, sans altérer sa biocompatibilité. Différentes techniques permettent de modifier la topographie de surfaces métalliques, mais parmi elles, le traitement par laser femtoseconde (fs-L) offre une variabilité et une précision de texturation sans égales. Son application industrielle est évidente car il permet de répondre à un cahier des charges complexe, avec un gain de temps et une réduction de l'impact environnemental, par comparaison aux autres processus de modification topographique.

Des études antérieures ont déjà montré que les topographies générées par fs-L ont un impact sur le comportement et l'adhérence cellulaire, mais à l'échelle de cellules isolées. Dans le contexte d'implants dentaires, cela ne suffit pas ; il est primordial de pouvoir évaluer l'adhérence de cultures cellulaires ayant élaboré une interface avec un biomatériau. De même, les études sur les propriétés antibactériennes s'intéressent pour la plupart à des bactéries non représentatives de la flore orale et donc des cas de péri-implantite, une étude plus ciblée est donc nécessaire.

Le projet LASIMP dans lequel s'inscrit cette thèse a pour but de fournir des surfaces multifonctionnelles pour améliorer les implants dentaires actuellement sur le marché. Face aux enjeux cliniques et économiques de l'implantologie orale, il a été question dans ce projet d'utiliser un outil unique et polyvalent, le fs-L, pour générer des surfaces multifonctionnelles, qui pourront être transposées sur les implants dentaires actuels.

Ce projet financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) évolue au sein de la *Manutech Sleight Graduate School*, un consortium de 12 partenaires publics et privés, situés dans la région de Saint-Étienne et de Lyon. Ainsi, la majorité du projet s'est déroulée au sein de l'équipe INSERM U1059 SAINBIOSE. Les modifications de surface par fs-L ont été réalisées en collaboration avec le Laboratoire Hubert Curien (UMR 5516) et le GIE Manutech USD, première plateforme européenne de fs-L pour l'industrie. Enfin, le Laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes (LTDS ; UMR 5513) et le Laboratoire des Multimatériaux et des Interfaces (LMI ; UMR CNRS 5615) ont contribué à réaliser la caractérisation des surfaces (LTDS) et à apporter une expertise dans l'odontologie et l'interface tissu biologique-implant dentaire (LMI).

Une étroite collaboration avec un projet européen (LASERIMPLANT), financé par le programme Horizon 2020, a également permis de valoriser dans un contexte osseux les avancées réalisées au sein du projet LASIMP. Ces résultats seront présentés en Annexes de ce manuscrit.

Cette thèse, qui a pour ambition d'identifier une topographie ou un assemblage de topographies permettant de rendre multifonctionnelle une surface de Ti6Al4V, présente donc les objectifs suivants :

◆ **L'exploration des topographies réalisables par fs-L sur une surface de Ti6Al4V.**

La texturation de ce matériau par fs-L étant assez peu documentée, cela présente un intérêt majeur pour la connaissance de l'interface laser-matière ; d'autant plus que les alliages à base de titane sont couramment utilisés en implantologie, ce qui apporterait une application biomédicale à la texturation de surface par fs-L. Cet objectif vise également à descendre à des échelles de texturation de quelques centaines de nanomètres, ce qui à ce jour n'est pas ou très peu étudié.

◆ **L'évaluation des propriétés antibactériennes des topographies générées par fs-L.**

Dans le but de limiter le développement de pathologies péri-implantaires, liées aux infections bactériennes, il est essentiel de déterminer les paramètres topographiques corrélés à l'adhérence de souches bactériennes parodontopathogènes.

◆ **L'amélioration de l'adhérence du tissu gingival à la surface du col des implants dentaires.**

Dans un contexte préclinique *in vitro*, il est crucial de se rapprocher des situations cliniques et d'évaluer l'adhérence à l'échelle d'une culture cellulaire à long terme, ayant élaboré une interface. Il n'existe pas de technique simple et quantitative pour l'étude de l'adhérence d'un tapis cellulaire sur biomatériau ; un sous-objectif technique se consacre donc au développement de méthodes adéquates, en adaptant des outils comme le scléromètre ou le bain à ultrasons.

◆ **La validation des surfaces multifonctionnelles identifiées dans les objectifs précédents dans des conditions pro-inflammatoires/infectieuses.**

Dans un souci constant de transférer nos travaux vers des modèles précliniques réalistes, il est essentiel de confirmer le potentiel des surfaces fonctionnalisées par fs-L, dans des conditions *in vitro* mimant l'activation du système immunitaire et/ou la présence de *Porphyromonas gingivalis*.

Les objectifs et l'organisation du manuscrit sont résumés dans la Figure 1.

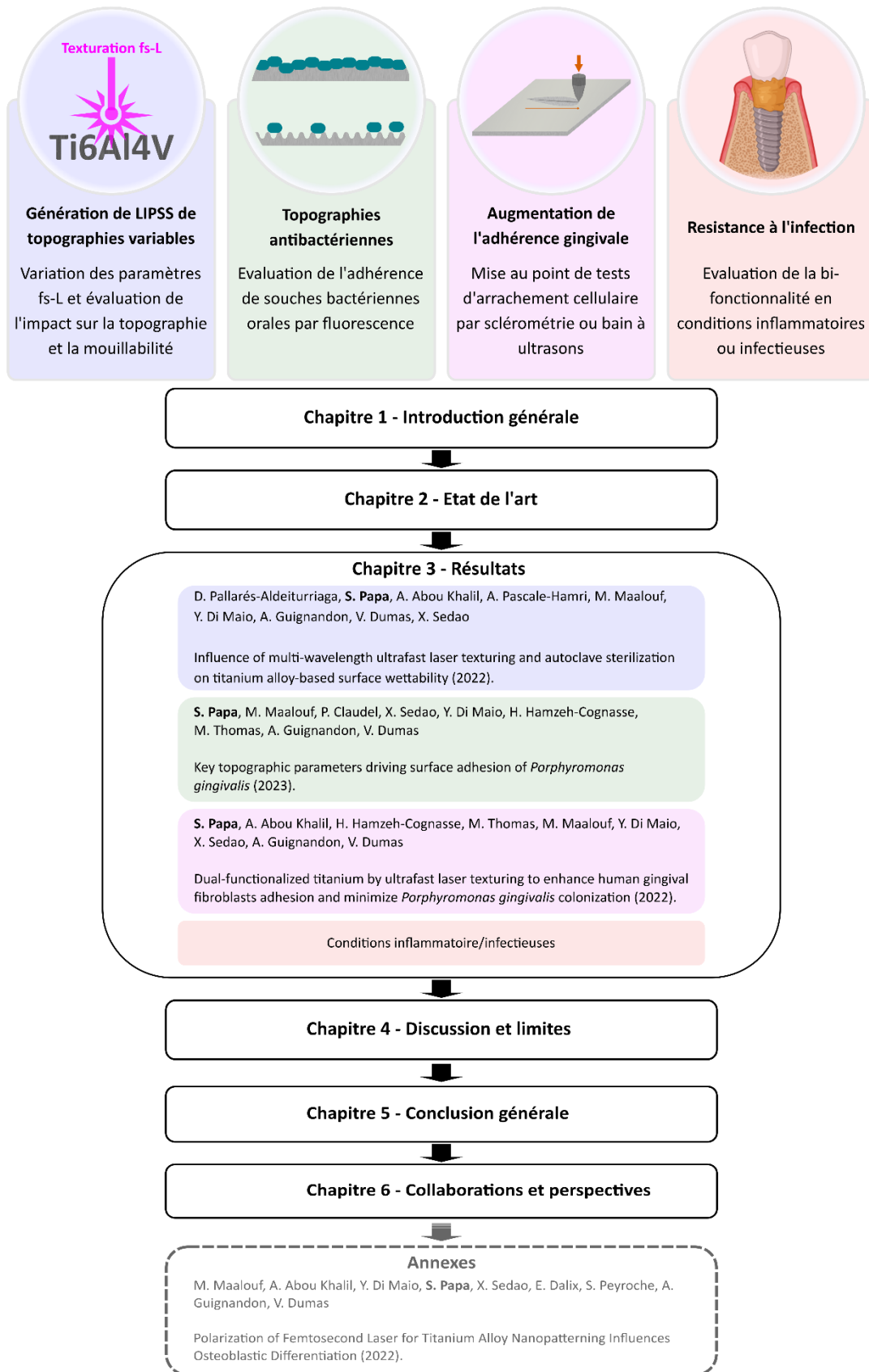


Figure 1 - Résumé graphique des objectifs du projet LASIMP et de l'organisation du manuscrit de thèse.

II

Etat de l'art

A. Implants dentaires

1. Définition d'un implant dentaire

Les problèmes de santé liés à la sphère orale représentent un défi mondial négligé à l'échelle internationale. Des études menées dans différents pays ont démontré que les taux de perte de dents varient entre 1,71% et 9,19%. Cette situation peut être causée par diverses maladies et a un impact significatif sur la qualité de vie, entraînant des difficultés à mâcher, des dégradations esthétiques et des problèmes d'élocution. Traditionnellement, des prothèses dentaires étaient utilisées pour résoudre ces problèmes, mais elles sont progressivement remplacées par des implants dentaires, devenus le traitement standard en réponse à la perte de dents. L'utilisation des implants dentaires dans la dentisterie moderne a connu une augmentation spectaculaire, atteignant des chiffres annuels de 0,8 million d'implants individuels aux États-Unis et de 1,8 million dans l'Union européenne [1]. Les implants dentaires, parfois appelés « racines dentaires artificielles », sont des tiges métalliques insérées chirurgicalement dans l'os de la mâchoire supérieure ou inférieure, sous la gencive, afin de soutenir la couronne ou la prothèse artificielle qui remplacera la dent manquante.

De nos jours, le titane et ses alliages sont largement utilisés dans les fixateurs, les articulations artificielles, les implants dentaires et autres biomatériaux. La biocompatibilité du titane avec les tissus durs est largement reconnue, autrement dit les biomatériaux à base de titane sont capables de remplir leurs fonctions en assurant une réponse appropriée de l'hôte. Dans le domaine dentaire, le titane présente une biocompatibilité supérieure et ne présente pas de toxicité par rapport à d'autres matériaux tels que l'acier inoxydable ou le cobalt-chrome (classé cancérigène, mutagène et reprotoxique depuis 2021 [2]). De plus, le titane réagit rapidement avec l'oxygène, ce qui lui confère une résistance à la corrosion en formant une couche d'oxyde de titane (TiO_2) en surface.

2. Intégration de l'implant

Le succès d'un implant dentaire dépend de la capacité de sa surface (par ses caractéristiques chimiques et topographiques) à moduler quatre éléments clés : l'intégration au niveau des tissus minéralisés, la formation d'attaches à l'interface entre les tissus conjonctifs mous et le col implantaire, les réponses immuno-inflammatoires et la résistance à l'infection.

Le terme « ostéointégration » a été introduit pour la première fois par le chercheur suédois Per-Ingvar Brånemark pour décrire les preuves histologiques montrant le succès d'implants dentaires après leur insertion dans l'os de la mâchoire [3]. Un implant dentaire dit

« ostéointégré » atteste d'une fixation biologique et mécanique dans l'os de la mâchoire, ce qui permet un fonctionnement clinique normal. Le processus d'ostéointégration de l'implant dans un contexte physiologique est complexe et nécessite plusieurs semaines de cicatrisation (Figure 2). Des problèmes de santé systémique, des traumatismes ou une accumulation de bactéries, qu'ils soient au stade initial ou avancé, peuvent entraîner un échec de l'implant, nécessitant son retrait. La santé et le mode de vie social des patients jouent par conséquent un rôle crucial dans le succès de l'implant ; le diabète, l'ostéoporose, la consommation de tabac, ainsi que les antécédents de parodontite, peuvent être des facteurs aggravants l'échec implantaire. De plus, certaines conditions médicales et certains dérèglements osseux, tels que l'ostéogenèse imparfaite ou l'ostéoporose, peuvent être des contre-indications à la pose d'un implant, car ils pourraient affecter la régénération de l'os alvéolaire.

Juste après l'implantation, des réactions inflammatoires cellulaires et osseuses se produisent à l'interface entre l'os et l'implant (Figure 2). Ces événements sont suivis du processus de régénération osseuse, régulé par plusieurs facteurs biologiques autour de l'implant [3]. La minéralisation osseuse se met en place par la suite ; c'est une étape déterminante pour la qualité du contact os-implant, qui assure la stabilité biomécanique à long terme des implants dentaires [3].

Ainsi, la dégradation de la qualité et/ou de la quantité osseuse peut être considérée comme un facteur de risque d'échec de l'implant, pouvant être lié à divers facteurs qui compromettent la capacité d'ostéogenèse de l'os autour des implants [3]. Il est évident que des efforts supplémentaires doivent être déployés pour développer des méthodes d'optimisation de l'ostéointégration implantaire ; notamment en facilitant la pose d'implants pour les patients âgés, ou avec un terrain médical à risque immunitaire ou hémorragique, grâce à des implants permettant des protocoles de pose sans lambeau, et un affranchissement des reconstructions osseuses pré-chirurgicales par comblement. Ainsi, l'optimisation de l'interface os-implant demeure un objectif fondamental de la recherche préclinique et clinique pour améliorer l'ostéointégration grâce aux avancées dans la conception des implants dentaires, la caractérisation de leur surface et les méthodes de pose d'implants.

Pour améliorer l'ostéointégration des implants dentaires, il est possible de réaliser des revêtements avec des facteurs ostéogéniques (*Bone Morphogenetic Proteins, Vascular Endothelial Growth Factor...*), des protéines de la MEC, de l'hydroxyapatite ou des métaux [4,5]. De plus, il est possible d'utiliser des traitements de prévention de l'ostéoporose dans ces revêtements, tels que des anticorps, des bi-phosphonates ou des modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes [5,6].

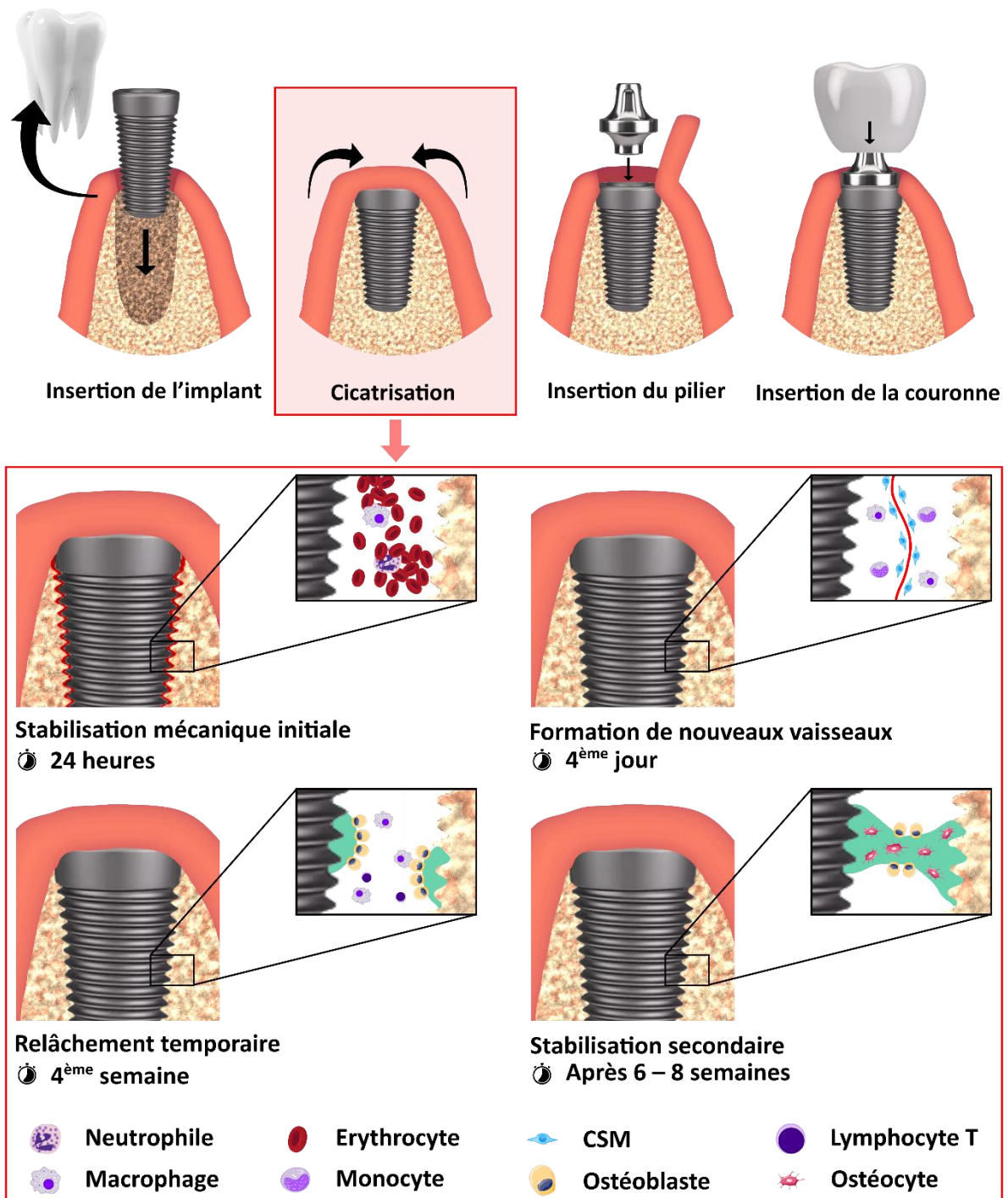


Figure 2 – Chronologie de la mise en place et de l'ostéointégration d'un implant dentaire ; adapté d'après Wang et al., 2015 [7].

L'ostéointégration dans les petites régions défectueuses, telles que les cavités d'extraction dentaire et les défauts osseux péri-implantaires, suit la cascade de cicatrisation [8]. Lors de la pose d'un implant dentaire, un caillot sanguin riche en fibrine se forme à la suite de la rupture des vaisseaux sanguins environnants (Figure 2). Le contact entre l'implant et la matrice de fibrine constitue la première étape de l'ostéointégration, favorisant la migration de diverses

cellules vers le site de l'implant [9,10]. Après la migration des cellules inflammatoires (neutrophiles) et des macrophages, la sécrétion de facteurs de croissance favorise l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins) et la migration des fibroblastes [11]. Ensuite, la formation d'un tissu de granulation, facilitée par les fibroblastes, favorise la création de vaisseaux sanguins/capillaires, permettant l'échange de métabolites ainsi que la migration et la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses (CSM) [12].

La formation et le maintien à long terme d'une barrière ou d'un joint des tissus mous dans la région transmuqueuse des implants dentaires est une étape cruciale, notamment pour la protection des structures de l'implant face à l'infiltration de microorganismes présents dans la sphère orale [10]. Les tissus mous impliqués sont le tissu conjonctif sous-jacent, qui forme les tissus d'attachement autour des implants, et l'épithélium péri-implantaire (EPI). Cependant, par rapport aux dents naturelles, où les fibres du tissu conjonctif s'insèrent dans la racine au niveau apical de l'épithélium de jonction (Figure 3.a), il n'y a pas d'insertion de fibres du tissu conjonctif dans la surface des implants (Figure 3.b) ; la résistance et les fonctions des tissus mous autour des implants sont donc considérablement réduites [13]. Les structures adhésives essentielles à l'étanchéité épithéliale, notamment les hémidesmosomes et la lame basale interne, ont pour rôle de faciliter l'attachement de l'EPI à la dent ou à l'implant [13,14]. La mauvaise intégration des tissus mous autour des implants dentaires repose en partie sur une réduction significative des hémidesmosomes et de la lame basale interne autour des surfaces implantaire situées dans la partie inférieure de l'interface EPI-implant [15,16]; ainsi qu'une affinité réduite de la dentine envers les protéines de la lame basale interne autour de la surface de titane inerte biologiquement [17]. De plus, l'intégration des tissus mous est également plus longue autour d'un implant, nécessitant 7 jours pour l'attachement initial et 2 à 4 semaines pour la maturation [15,18]. La plupart des fibres de collagène autour des implants sont parallèles à leur surface, formant une simple « manchette » physique sans intégration biologique, contrairement à ce qui se produit autour d'une dent naturelle, où les fibres de collagènes adhèrent de manière perpendiculaire à la dent, assurant un maintien solide [19]. D'autre part, les fibroblastes gingivaux, nécessaires à la cicatrisation et à la régénération des tissus conjonctifs, sont présents en faible proportion autour des implants (seulement 3 à 5% comparé à 15% dans les tissus gingivaux sains entourant les dents naturelles) [20]. Ce nombre limité de fibroblastes gingivaux induit une maturation plus longue du tissu conjonctif péri-implantaire (6 à 12 semaines), ce qui augmente le risque de pénétration de microorganismes oraux [20]. Enfin le diagnostic de sondage parodontal de routine, consistant à sonder le tissu gingival pour atteindre le tissu conjonctif sous-jacent, forme une brèche dans la partie inférieure de l'EPI autour des implants, ce qui risque de fragiliser ou de ralentir l'attachement et la cicatrisation des tissus mous au niveau du col implantaire [21].

En résumé, il résulte de cette cicatrisation un joint transmuqueux insuffisant, qui compromet le succès à long terme de l'implant et peut entraîner une progression rapide des maladies péri-

implantaires [13]. Il est donc essentiel d'améliorer la bioactivité de la surface afin de favoriser une intégration rapide des tissus mous autour des implants. Pour cela, une solution vise à se baser sur une fonctionnalisation de la surface des implants dentaires en modifiant leur topographie, leur chimie ou encore leur biologie [16].

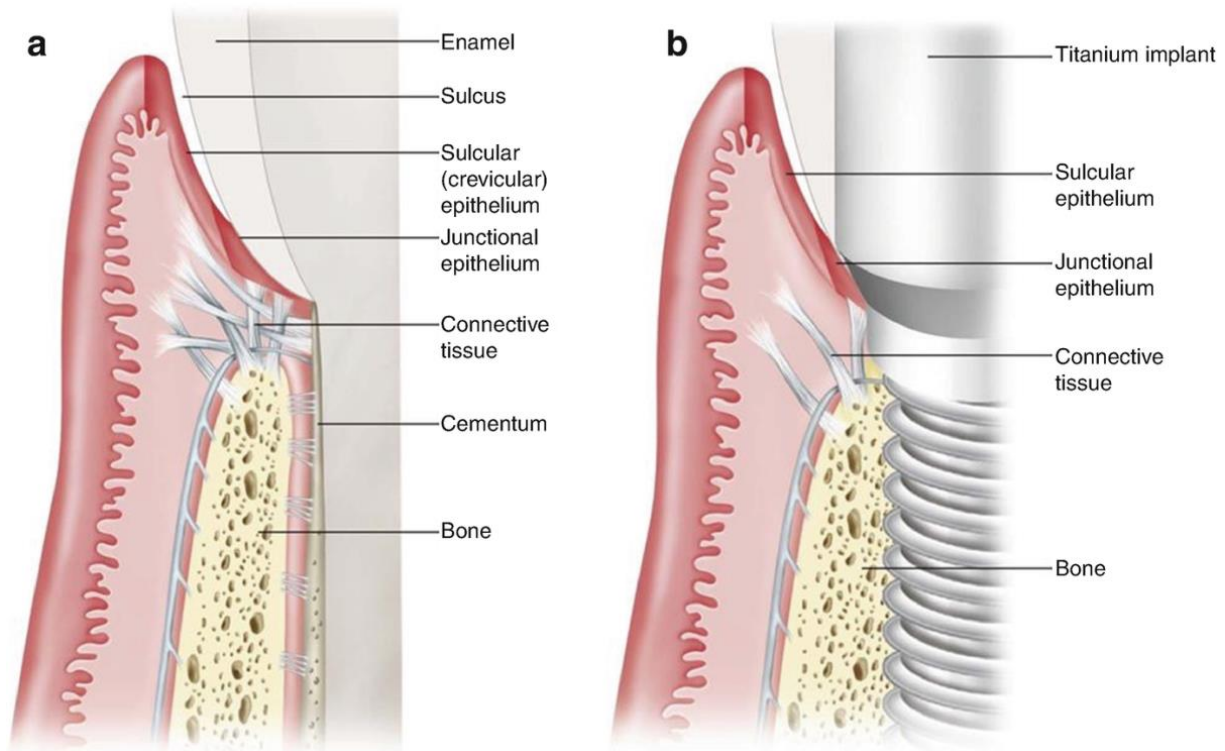


Figure 3 – Attachement des tissus biologique (a) à une dent naturelle ou (b) à un implant dentaire; Rose, 2004 [22].

3. Pathologies péri-implantaires

Le développement des implants dentaires a entraîné l'émergence de pathologies péri-implantaires, notamment la mucosite péri-implantaire et la péri-implantite, s'imposant comme de nouveaux défis cliniques. En effet, une fois exposés à l'environnement buccal, les implants présentent un risque de mucosite, un état inflammatoire réversible qui affecte les tissus mous entourant un implant dentaire, qui survient généralement quelques semaines ou quelques mois après la pose de l'implant [23,24]. Au cours de la phase initiale, le corps du patient reconnaît l'implant dentaire comme un objet étranger, ce qui entraîne une réaction inflammatoire naturelle. En l'absence d'une hygiène bucco-dentaire adéquate, la plaque dentaire et les bactéries peuvent s'accumuler autour de l'implant, provoquant une inflammation des tissus muqueux qui l'entourent [23,24]. À ce stade, la situation est encore réversible, et grâce à un traitement rapide ainsi qu'une meilleure hygiène bucco-dentaire, l'inflammation peut être contrôlée et résolue. En revanche si elle n'est pas traitée, la mucosite peut évoluer en péri-implantite, l'une des plus importantes complications biologiques non résolues en implantologie actuelle. La péri-implantite est une lésion inflammatoire destructrice d'origine infectieuse, qui affecte les tissus mous et durs environnants, avec une

perte de l'os de soutien [23,24]. C'est la cause principale des retraits d'implants dentaires, et jusqu'à 47% des échecs d'implants oraux en sont une conséquence [25]. Cette pathologie induit la destruction des tissus entourant l'implant fonctionnel. Lors des phases de cicatrisation dentaire (ou phase de bio-intégration) et de maintenance dentaire, des complications peuvent avoir lieu au niveau de la zone de jonction entre l'implant et les tissus mous (interface entre le col implantaire et le tissu gingival), qui est considérée comme la « zone à risque ». En effet, une perte ou une néoformation insuffisante de l'attache gingivale, peut entraîner une inflammation causée par une infiltration bactérienne au niveau du col implantaire. Ce processus inflammatoire se répand au niveau l'os alvéolaire entraînant progressivement la perte de l'implant. En parallèle de l'aspect infectieux évident, les parodontites (inflammation du parodonte d'origine infectieuse) et péri-implantites présentent un fort enjeux social et médical ; plusieurs études ont montré leur comorbidité avec des pathologies plus problématiques, telles que la maladie d'Alzheimer [26,27], la polyarthrite rhumatoïde [28,29] ou encore l'insulino-résistance [30].

Plusieurs facteurs influencent l'étiologie de la péri-implantite, tels que la conception de l'implant, la topographie et la rugosité de sa surface, l'état des tissus environnants, ainsi que le niveau d'expertise du chirurgien. Différentes approches chirurgicales ou non chirurgicales de décontamination des implants ont été développées, telles que la chirurgie reconstructive, la prescription d'antibiotiques ou d'antiseptiques, ainsi que l'utilisation de lasers ou de techniques mécaniques [31]. Des études visant à prévenir ou à traiter les péri-implantites se concentrent sur le revêtement ou la modification de surface par des substances bactéricides (par exemple, l'argent, le cuivre ou le zinc revêtus sur des implants à base de titane) [32]. Chez les individus ayant des antécédents de parodontite, la sélection d'éléments biomimétiques antibactériens pour les implants dentaires pourrait aider à prévenir les péri-implantites. Des implants capables de réduire l'adhérence bactérienne pourraient contribuer à améliorer les résultats des chirurgies dentaires, d'autant plus face à la constante augmentation du risque d'infection, induite par l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques.

4. Propriétés et modifications de surface

Différentes techniques sont envisageables pour fonctionnaliser la surface des implants dentaires. Certaines études se basent sur l'utilisation de peptides ou d'antibiotiques, agissant directement en surface ou bien par relargage différé à la suite d'un changement environnemental [33]. Ces approches ont une action qui va diminuer dans le temps avec une efficacité réduite ; amenant alors vers un problème plus global, puisque l'exposition à de faibles concentrations peut favoriser l'émergence de bactéries multirésistantes. Afin de fonctionnaliser la surface des implants de manière plus pérenne et moins risquée, nombreuses études se tournent vers des modifications de la topographie de surface [34].

Considérée comme la première approche de modification de surface appliquée aux implants dentaires, l'usinage se base sur l'utilisation de métaux plus durs que la surface traitée, à des vitesses de rotation élevées, afin de générer des reliefs d'échelle macro à microscopique [35].

Cette technique ne permet pas de descendre à des échelles de texturations sub-micrométriques et par conséquent ne permet pas une grande précision.

Le sablage repose sur le bombardement à grande vitesse de particules de Ti, Al, Al_2O_3 ou encore d'hydroxyapatite, à l'aide d'une sableuse à haute pression [36]. Il génère des indentations micro à nanométriques dont les caractéristiques dépendent de la taille et du type de particules employées.

Un processus tel que l'attaque acide, initialement utilisé pour éliminer les résidus de fabrication, peut également servir à former des surfaces rugueuses à des échelles micro à nanoscopiques [36]. Une normalisation serait toutefois nécessaire pour permettre un contrôle de la topographie générée.

Il est ainsi courant de voir dans les implants cliniques actuels une alliance que ces deux processus, où un sablage à gros grains sera suivi d'une gravure à l'acide (SLA). Des tests cliniques sur implants traités par SLA ont présenté une ostéointégration accélérée dans les deux mois suivant la pose [37,38]. Ce double processus physique et chimique est considéré comme la stratégie de modification de surface des implants dentaires la plus efficace à l'heure actuelle, avec un succès à long terme dans les études précliniques et cliniques [39]. La modification de surface par SLA offre de bon résultat concernant l'ostéointégration mais néanmoins ne permet pas un contrôle précis de la texturation et par conséquent sa reproductibilité est limitée. Ainsi, les implants traités par SLA varient d'une société d'implants à l'autre, rendant leur comparaison relativement compliquée. De plus, l'augmentation de la rugosité provoquée par une texturation pas SLA augmente bien souvent le risque de développement de biofilms bactériens.

La surface d'un implant peut également être modifiée par anodisation électrochimique ; l'implant sera alors immergé dans un électrolyte avec une contre électrode, et l'application d'un courant adapté entraînera l'auto-ordonnement des nanotubes/nanopores de métal-oxyde à la surface de l'implant [40]. Cette approche permet d'augmenter la bioactivité (vis-à-vis de l'os et des tissus mous) de l'implant mais également d'y incorporer des produits thérapeutiques dans l'objectif d'une libération locale immédiate ou différée [16,33]. Toutefois, une modification de la chimie de surface risque d'une part d'impliquer des réponses cellulaires non contrôlées, et peut également voir son efficacité diminuer avec le temps, si stabilité n'est pas assurée.

Il est également possible d'ajouter à une surface des couches d'un autre matériau, sélectionné pour une ou plusieurs de ses propriétés, par fusion et frittage *via* un traitement par plasma dans un environnement sous vide ou à basse pression [41]. La surface traitée sera alors recouverte de couches micro à nanométriques, avec cependant un risque de rupture ou de délamination. Ce type d'implants nécessite donc beaucoup de précision lors de la pose.

La lithographie peut également permettre d'ajouter une topographie à une surface, principalement sur polymères mais également sur certains métaux. Le processus de

lithographie colloïdale consiste à préparer et modifier des colloïdes pour fabriquer des structures de plusieurs micromètres à quelques dizaines de nanomètres [42]. La lithographie par faisceau d'électrons consiste à balayer une fine couche de film organique sur la surface à l'aide d'un faisceau d'électrons, puis à éliminer sélectivement certaines zones à l'aide d'un solvant, laissant ainsi des motifs de l'ordre du micromètre jusqu'à quelques nanomètres [43]. Le modelage par sonde ionique focalisée est similaire à la lithographie par faisceau d'électrons en termes d'avantages et de limites ; cependant, il utilise des ions de masse élevée et est donc généralement utilisé comme technique de fraisage, pour graver une surface avec des caractéristiques de taille submicrométrique [44,45]. Le principal désavantage de la lithographie est la nécessité d'avoir une surface plane, ce qui n'est pas le cas d'un implant dentaire.

Ces méthodes « classiques » produisent des irrégularités de surface aléatoires, mais ne permettent pas de produire des structures de formes et de tailles précisément définies, et peuvent également contribuer à des changements conséquents dans la chimie de la surface. L'ablation par fs-L est un procédé en plein essor pour la texturation de surfaces métalliques. De récentes études sont basées sur des structures de surface périodiques générées par laser (LIPSS) sur des surfaces d'alliages de titane ou d'acier entre autres [46–48]. La grande variété de paramètres modifiables garantit un contrôle précis de la topographie générée, avec une reproductibilité très élevée. D'un point de vue industrialisation, le fs-L permet également une texturation rapide avec des variations locales pouvant répondre à un cahier de charges précis. Contrairement au traitement SLA utilisé actuellement pour les implants dentaires, la texturation par fs-L requiert un processus unique. La topographie générée peut varier d'une échelle submicrométrique à nanométrique selon les paramètres appliqués. La texturation par fs-L permet d'agir sur l'ostéointégration de l'implant, mais peut également agir sur l'interface avec le tissu gingival et sur l'adhérence à l'échelle bactérienne.

B. Texturation par laser femtoseconde

La majorité des lasers commerciaux sont apparus entre les années 1960 et 1980, et ont trouvé leur place dans des domaines extrêmement variés, parmi lesquels deux axes se distinguent : les applications basses énergies, qui vont permettre la mesure, l'imagerie, le transport ou la lecture d'informations ; et les applications à hautes énergies, visant à interagir avec un matériau. C'est cette seconde interaction laser-matière à hautes énergies qui va permettre d'effectuer le traitement thermique de métaux, le revêtement ou le nettoyage de surfaces, le traitement de tissus biologiques, ou encore la création de textures de surface pour les matériaux industriels et les biomatériaux. L'utilisation des lasers pour le traitement des matériaux est répandue dans diverses applications technologiques en raison de leur polyvalence et de leur simplicité de mise en œuvre. Dans le domaine biomédical, la texturation de surface au laser permet la fabrication d'implants dont la surface a été fonctionnalisée. Les textures induites par le laser permettent en effet de réguler l'adsorption de protéines, l'adhérence bactérienne ou encore le comportement et l'adhérence cellulaire. Dans un contexte d'implantologie, une sélection précise des paramètres de traitement laser permettrait d'adapter la topographie et la chimie des surfaces à un cahier des charges précis.

1. Ablation laser

L'ablation laser, également appelée photoablation, correspond au processus d'élimination de matière d'une surface en l'irradiant avec un faisceau laser [49,50]. Dans les semi-conducteurs et les diélectriques, une concentration élevée d'électrons libres passant, par excitation laser, à travers la bande interdite, peut conduire à des transitions de phase non thermiques, induites par une modification transitoire de la liaison interatomique. En même temps, les électrons excités dans les semi-conducteurs et les diélectriques, ainsi que les électrons de la bande de conduction dans les métaux, sont capables d'absorber efficacement l'énergie laser, ce qui peut amener le matériau à l'état de plasma, ou même produire une explosion de Coulomb en raison de l'émission d'électrons et de la répulsion entre les ions formés à la surface du diélectrique [51]. À faible flux laser, la matière est chauffée par l'énergie absorbée du laser et s'évapore ou se sublime. À flux laser plus élevé, le matériau est généralement transformé en plasma. Le plus souvent, l'ablation laser se réfère à l'élimination de matière à l'aide d'un laser pulsé, mais il est également possible d'effectuer l'ablation de matière en utilisant un faisceau laser continu lorsque l'intensité du laser est suffisamment élevée. Ce phénomène est souvent caractérisé par un seuil de densité d'énergie, appelé « seuil d'ablation », au-delà duquel la modification du matériau se produit. Ce seuil dépend des propriétés du matériau ainsi que des paramètres de traitement laser qui seront détaillés par la suite [52]. Les impulsions laser relativement longues (comme les impulsions nanosecondes) peuvent chauffer, altérer ou endommager thermiquement le matériau traité ; en revanche, les impulsions laser ultracourtes (comme les impulsions femtosecondes) ne causent que de légers dommages au matériau pendant le traitement, en raison de l'interaction lumière-matière ultra courte. Les hautes intensités générées et transmises en premier lieu aux électrons permettent de chauffer

très rapidement le matériau, de sorte que la quantité de matière éjectée devient très importante et limite le transfert de la chaleur dans le matériau.

2. Laser-Induced Periodic Surface Structures

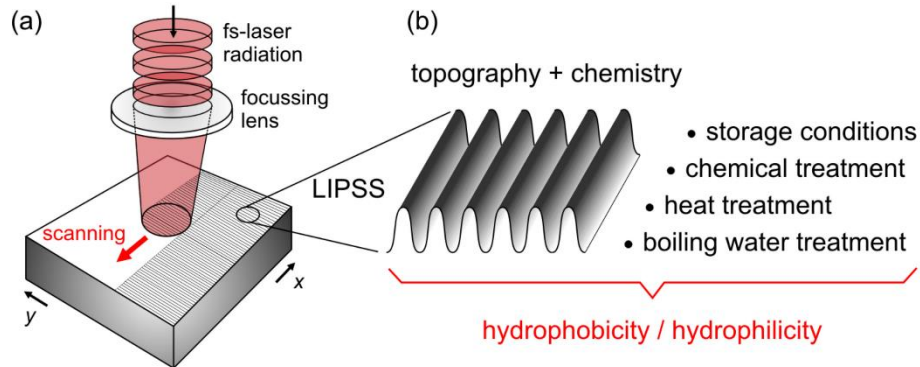


Figure 4 – (a) Schéma du traitement LIPSS dans une approche de balayage de faisceau et (b) facteurs affectant et contrôlant la mouillabilité (e.g. hydrophobie/philie) et la stabilité à long terme des surfaces structurées par LIPSS ; Bonse et al., 2021 [53].

Les LIPSS correspondent à un agencement de lignes topographiques générées par laser ultrabref, à périodicité quasi-régulière [54] (Figure 4). Elles sont catégorisées principalement en fonction de leur espacement spatial ou « période », de leur profondeur, de leur densité et de leur orientation [55]. Dans la littérature, diverses expressions sont employées pour désigner le phénomène de LIPSS : certains auteurs les décrivent comme des « ripples » ; néanmoins, d'autres formes de structures de surface d'échelle micro à nanométrique, comme des « grooves », des « spikes », des « wells » ou encore des « pillars », sont parfois également assimilées aux LIPSS [56]. Une longueur d'onde donnée permet d'obtenir des LIPSS qui peuvent être organisées en deux grandes catégories (Figure 5). La première, les LIPSS à basse fréquence spatiale (LSFL), qui ont des périodes supérieures à la moitié de la longueur d'onde d'irradiation du laser (Figure 5.a). En fonction de leur mécanisme de formation, elles peuvent être perpendiculaires ou parallèles à la polarisation du faisceau laser [55,57]. Dans la seconde catégorie, les LIPSS à haute fréquence spatiale (HSFL) présentent des périodes inférieures à la moitié de la longueur d'onde, et sont formées comme des réseaux de surface soit assez profonds, soit très peu profonds (Figure 5.b). Ces derniers sont liés uniquement à l'irradiation par laser ultrabref.

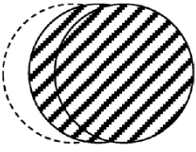
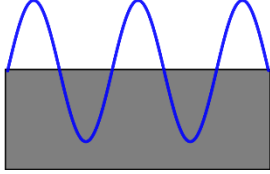

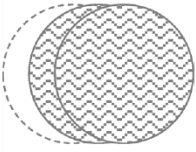
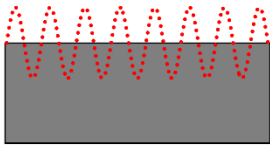
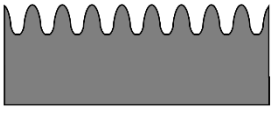
	Pulse fluence	SPP formation	LIPSS formation
(a)	<p>High pulse fluence</p>  <p>Intensity inside the spot is above LSFL forming threshold</p>	<p>$\lambda_{\text{SPP_LSFL}} \approx \lambda_{\text{Laser}}$</p>  <p>SPP with near laser wavelength is generated on the surface</p>	<p>LSFL formation</p>  <p>SPP interference with incoming laser results in selective ablation</p>
(b)	<p>Low pulse fluence</p>  <p>Peak intensity inside the laser spot is below LSFL forming threshold</p>	<p>$\lambda_{\text{SPP_HSFL}} \approx \lambda_{\text{SPP_LSFL}} / 3$</p>  <p>SPP with wavelength much smaller than laser wavelength is generated on the surface</p>	<p>HSFL formation</p>  <p>SPP interference with incoming laser results in selective ablation</p>

Figure 5 – Formation de LIPSS basée sur la génération de plasmons de surface proposée, à une fluence (a) d'impulsion élevée ou (b) d'impulsion faible ; adapté d'après Meshram et al., 2023 [58].

3. Paramètres du laser femtoseconde

La lumière est une onde électromagnétique dont le champ électrique oscille perpendiculairement à la direction de sa propagation. Lorsque la direction de ce champ électrique fluctue de manière aléatoire dans le temps, sa lumière est considérée comme non polarisée (lumière du soleil, éclairage halogène, projecteurs LED, ampoules à incandescence...). À l'inverse, lorsque la direction du champ électrique de la lumière est bien définie, elle est dite polarisée. La source laser est un faisceau de lumière polarisée monochromatique ; ce qui signifie qu'il est caractérisé par une longueur d'onde unique, qui va principalement influencer la période des LIPSS générés et leur profondeur. De base la polarisation du faisceau laser est linéaire. Son orientation peut être modifiée en plaçant une lame demi-onde ($\lambda/2$) sur le trajet optique, ce qui va introduire un retard de phase de lumière permettant de pivoter l'orientation des LIPSS générées, par modification de l'angle θ de la lame $\lambda/2$. Une lame à retard S également appelée S-waveplate ou convertisseur de polarisation radiale va permettre de convertir une polarisation linéaire en polarisation radiale ou azimutale. La combinaison d'une lame $\lambda/2$ à une S-waveplate va permettre le passage d'une polarisation radiale à azimutale, et inversement, par modification de l'angle θ de la lame $\lambda/2$.

Le fs-L est un type de laser spécifique qui génère des impulsions ultracourtes d'une durée allant de quelques femtosecondes à quelques centaines de femtosecondes (1 femtoseconde = 1 fs = 10^{-15} seconde). Cette durée est comparable à la période d'une onde électromagnétique dans la plage visible du spectre, et exerce une forte influence sur la qualité d'usinage [59]. La

durée de l'impulsion est ajustable, son optimisation étant primordiale pour la génération de LIPSS lors de l'interaction entre la lumière et la surface statique.

La puissance moyenne du laser P_{moy} exprimée en W et sa fréquence d'impulsion f_{imp} exprimée en Hz sont des paramètres modifiables qui vont permettre de calculer l'énergie E_{pulse} exprimée en joules délivrée par impulsion laser, avec la formule :

$$E_{pulse} = \frac{P_{moy}}{f_{imp}}$$

La fluence est définie comme la densité d'énergie par unité de surface, exprimée en J/cm². La valeur mesurée est souvent la fluence maximale $F_{crête}$ correspondant à la fluence au sommet de la courbe gaussienne telle que :

$$F_{crête} = \frac{2E_{pulse}}{\pi\omega_0^2}$$

avec ω_0 correspondant au rayon $\frac{1}{e^2}$ du faisceau gaussien.

La fluence se calcule facilement sur une courbe gaussienne, comme c'est le cas pour une polarisation linéaire (Figure 6). En revanche, si la répartition de l'énergie est non-gaussienne comme c'est le cas pour les polarisations radiale et azimutale, où la forme du faisceau laser est dite « donut/doughnut », le calcul de la fluence n'a pas été clairement normalisé, il est donc préférable de donner l'énergie E_{pulse} délivrée par impulsion, indépendamment de la forme et de la taille du faisceau.

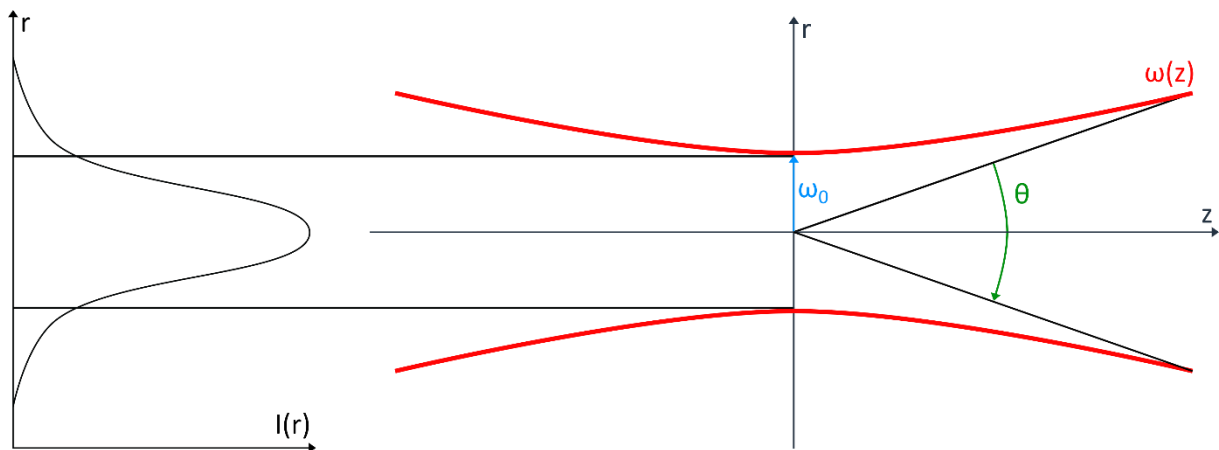


Figure 6 – Variations de la distribution gaussienne en intensité en $z = 0$ et z arbitraire (gauche) ; évolution du rayon d'un faisceau gaussien $\omega(z)$ avec la distance z (droite).

Informatiquement, il est possible de calibrer plusieurs paramètres du fs-L. Tout d'abord le nombre d'impulsions, correspondant au nombre de fois où une même énergie est délivrée avant déplacement du faisceau ; ainsi que le nombre de passages, correspondant au nombre de sessions de texturation d'un spot identique. Lorsque le fs-L est utilisé pour la texturation

d'une zone plus grande que celle recouverte par le faisceau, d'autres paramètres vont influencer la topographie finale, étant donné que certaines zones de la surface pourront interagir avec plus ou moins d'impulsions (principalement à cause d'une variation dans superposition entre deux zones d'interaction successives). Ces paramètres d'ordre spatial, sont premièrement l'espacement, selon les axes X et Y, entre deux zones d'interaction. Une variabilité dans la topographie peut également être observée en modifiant l'alignement des zones d'interaction, d'une ligne de passage du faisceau fs-L à une autre. La vitesse de déplacement du faisceau entre par conséquent également en compte, ayant un impact direct sur l'aire de superposition entre deux zones d'interaction laser-matière successives.

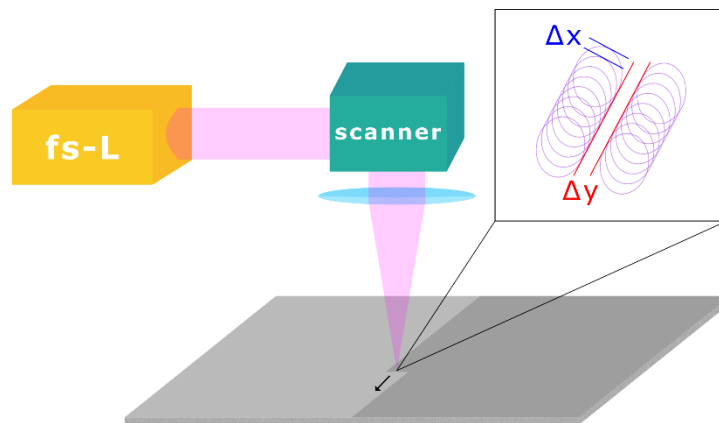


Figure 7 – Schéma simplifié de la texturation d'une surface par balayage d'un faisceau fs-L ; Δx et Δy représentent l'espacement entre les différents spots d'impact du faisceau.

La distance focale correspond à la distance entre la lentille de focalisation et le plan sur lequel se situe la surface. Hors de la distance focale, le faisceau ne permettra pas l'ablation du matériau. Cette distance est surtout une conséquence des autres paramètres, cependant elle peut être un facteur limitant : si elle est trop importante cela sera problématique d'un point de vue technique ; les autres paramètres devront alors être adaptés pour ajuster la distance focale. Une fois la distance focale établie, il est essentiel de mesurer le diamètre du faisceau sur le plan focal (ω_0), ce qui permettra, entre autres, le calcul de la fluence maximale (Figure 6 ; Figure 7).

C. Impact de la topographie sur la mouillabilité

Les définitions les plus connues en science des surfaces sont l'hydrophobie et l'hydrophilie, souvent résumées par le terme « mouillabilité ». Cet aspect est couramment étudié par des mesures statiques et dynamiques de l'angle de contact avec la surface. Conformément à la littérature, Law et al., proposent qu'une surface soit hydrophile lorsque l'angle de contact θ_R pour l'eau est $< 90^\circ$, hydrophobe lorsque θ_R est $> 90^\circ$ et superhydrophobe lorsque θ_A est $\geq 145^\circ$ [60] (Figure 8.a). Ils supposent que la tension superficielle élevée de l'eau est la force motrice du passage de l'hydrophilie à l'hydrophobie.

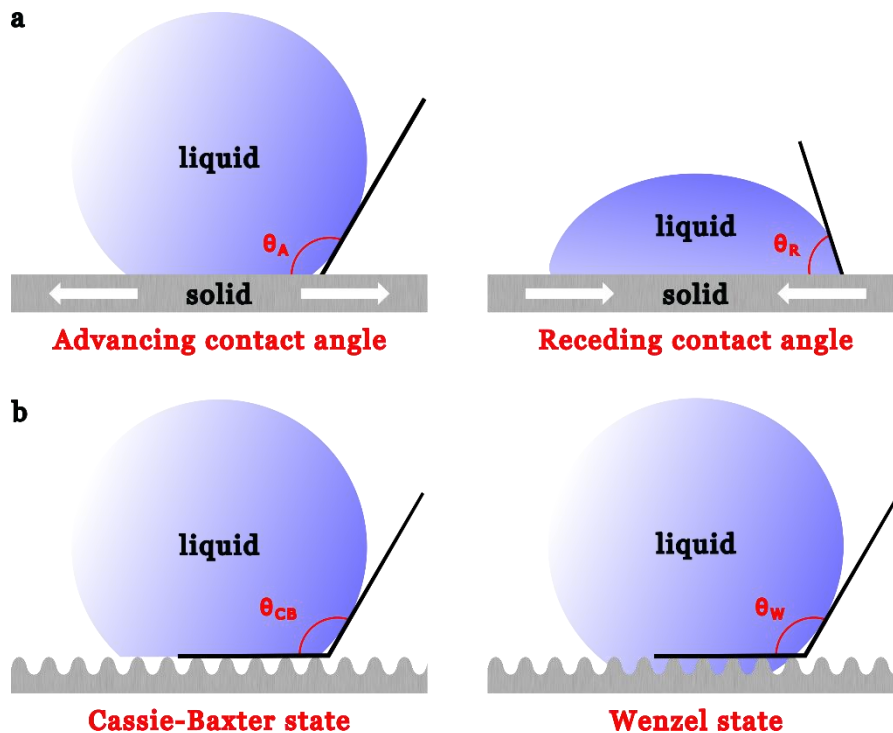


Figure 8 - (a) Angles de contact mesurés par la méthode de la goutte sessile. (b) Etats de mouillage de Cassie-Baxter et de Wenzel ; adapté d'après Lee et al., 2021 [61].

Cependant, en présence de topographie de surface, la mesure de l'angle de contact peut varier, en comparaison à une surface plane de chimie identique. Sur une surface rugueuse, il peut y avoir deux états de mouillage différents : l'état de mouillage de Cassie-Baxter, où l'espace entre les saillies est rempli d'air et non de liquide ; et l'état de mouillage de Wenzel, où ce même espace est rempli de liquide (Figure 8.b). Les caractéristiques de la topographie de surface jouent un rôle crucial dans l'état de mouillage ; notamment le rapport entre le diamètre des pores et l'espace entre les pores, ainsi que le rapport entre le diamètre des pores et la profondeur des pores [62,63]. Ces facteurs influencent la manière dont les liquides interagissent avec la surface ; ainsi lorsque la surface est micro- ou nano-texturée, la mesure des angles de contact peut ne pas fournir des calculs précis de l'énergie de surface.

Kietzig et al., suggèrent que la topographie n'est pas le seul facteur influençant la mouillabilité. En effet, les structures de surfaces générées par irradiation laser sont fixes d'un point de vue topographique ; cependant des échantillons hydrophiles directement après le traitement laser deviennent hydrophobes avec le temps [64]. Une maturation chimique de la surface semble jouer également un rôle dans la mouillabilité, car l'analyse XPS de la surface montre une augmentation de la présence de carbone sur la surface texturée entre les mesures d'angles de contact initiale et terminale. Il a également été démontré que l'ablation laser augmente l'épaisseur de la couche d'oxyde naturel des surfaces de titane traitées au laser [65,66].

Cunha et al., sont en accord avec l'impact simultané de la topographie et de la chimie de surface sur la mouillabilité ; néanmoins ils mettent en avant une stabilité chimique lors d'une texturation au fs-L d'une surface de Ti6Al4V [67]. En effet, après analyse par spectrométrie photoélectronique X, ils montrent la présence d'une couche d'oxydes de TiO_2 et d' Al_2O_3 à la surface des échantillons texturés au fs-L mais également à la surface des échantillons polis, avant texturation par fs-L. En plus de cela, ils mettent en avant le rôle de l'anisotropie de la topographie de surface, qui augmente la mouillabilité de l'échantillon avec un effet plus important que la rugosité de surface. L'exactitude des mesures d'angles de contact est garantie par contrôle de la fluence du fs-L et du temps entre la texturation et la mesure de mouillabilité, en se basant sur l'étude de Kietzig et al. [64,67].

Il reste difficile d'analyser les effets indépendants de la topographie et de la chimie de la surface sur la mouillabilité. De plus, il est bien connu que la mouillabilité des surfaces nanotexturées par laser change avec le temps [68,69], et peut être modifiée par les conditions de stockage après le traitement au laser [64]. Klos et al., suggèrent que le processus de stérilisation est une étape critique pour une prédiction plus stable et plus fiable des propriétés de surface des échantillons nanotexturées par laser [70]. Les tests de mouillabilité réalisés avec de l'eau sont discutables dans un contexte d'implantologie, car les liquides en contact avec l'implant (sang, salive...) auront des tensions de surface différentes de celles de l'eau. De rares études évaluent la mouillabilité des surfaces avec d'autres liquides, tels que du milieu de culture cellulaire, pour se rapprocher des conditions cliniques [70]. Cependant cela rend impossible la comparaison relative à des études plus classiques réalisées avec de l'eau, seules les tendances sont à prendre en compte. D'autre part, les mesures de mouillabilité dans l'air sont peu réalistes, car *in vivo* la surface de l'implant sera très rapidement submergée et non en contact avec l'air. Une étude de mouillabilité sous l'eau ou en milieu liquide serait plus probante mais reste compliquée à mettre en place car elle requiert deux liquides non miscibles tels que l'eau et l'huile ce qui éloigne les mesures des conditions cliniques [71].

D. Rôles de la topographie dans l'adhérence bactérienne

1. Contexte bactérien

L'encrassement biologique ou 'biofouling' est l'accumulation indésirable et la prolifération de microorganismes, plantes ou animaux sur des surfaces artificielles : diminuant par conséquent leur durée de service fonctionnel [72]. Dans le cadre des implants médicaux, il se manifeste par l'adhérence bactérienne et la formation de biofilms, qui conduisent à l'inflammation des tissus biologiques péri-implantaires. Concrètement un biofilm est une communauté bactérienne organisée, fermement attachée à un substrat, au sein de laquelle les bactéries peuvent produire de grandes quantités de substance polymérique extracellulaire (EPS) favorisant leur survie dans des conditions environnementales défavorables [73,74]. Au sein d'un biofilm, les bactéries périphériques vont agir pour protéger les bactéries internes au contre les agents antimicrobiens [75] ; il est donc essentiel de limiter l'adhérence bactérienne initiale, car c'est la première étape de la formation de biofilm (Figure 9). Ce phénomène d'adhérence dépend de différents facteurs liés à la surface (rugosité, mouillabilité, porosité, topographie, énergie de surface...), aux conditions environnementales locales (pH, température, protéines hôtes...), mais également au pathogène impliqué (souche, forme, gram positif/négatif, présence de flagelles/pili...) [76,77]. De plus, dans le cas des infections sur implants dentaires, différentes souches bactériennes s'accumulent, ce qui rend difficile la mise en place d'une stratégie antibactérienne qui puisse correspondre à chacune de ces souches. De base un microbiote oral sain contient des souches telles que des streptocoques, des lactobacilles, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Rothia*, *Fusobacterium* *Neisseria*, etc. [78]; mais cette répartition peut évoluer selon l'hygiène buccale, l'alimentation ou encore certains facteurs systémiques de l'hôte. *Streptococcus mutans* est une bactérie de type coque gram-positive, qui se niche dans la région supra-gingivale, et joue un rôle central dans la genèse précoce des biofilms. La formation et la progression du biofilm bactérien de *S. mutans* peuvent être assimilées à la propagation du biofilm sur des surfaces solides dans la cavité buccale. Ensuite, le microbiote progresse vers une phase de colonisation plus avancée, en marge des tissus gingivaux et de l'os parodontal, entraînant une inflammation de ces tissus qui peut aboutir à une parodontite ou à une péri-implantite (infection de la gencive et de l'os en contact respectivement d'une dent ou d'un implant) [79]. De plus, des études récentes ont montré la présence de *S. mutans* dans le biofilm sous-gingival prélevé chez des patients présentant des gencives saines et des maladies parodontales [80]. Par ailleurs, Kumar et al., ont signalé des taux plus élevés de *S. mutans* dans les échantillons péri-implantaires, par comparaison avec les échantillons provenant de patients souffrant de parodontite [81]. Parmi les bactéries considérées comme colonisateurs tardifs, impliquées dans les cas de péri-implantite et de parodontite, un ensemble particulièrement présent appelé complexe rouge a été identifié. Il est composé de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* et *Treponema denticola*, des bactéries gram-négatives proliférant dans des niches anaérobies au sein du biofilm. En outre, *P. gingivalis* est au cœur de nombreuses études en raison de son association avec l'inflammation chronique des tissus gingivaux [82,83]. Bien que *P. gingivalis* ne suffise pas à

elle seule à provoquer une gingivite ou une perte osseuse [84,85], elle semble être le composant essentiel de la communauté microbienne à l'origine des maladies bucco-dentaires [86]. Il est suggéré que *P. gingivalis* prépare le terrain en altérant le microenvironnement immunitaire local, notamment par action des LPS [86,87]. Des données montrent également que *P. gingivalis* peut agir directement sur le système du complément, par l'intermédiaire de ses « gingipains » (famille de protéases spécifiques de l'arginine sécrétées par *P. gingivalis*), qui lui permettent de bloquer la réponse antimicrobienne en dégradant les cytokines, réduisant ainsi la réponse inflammatoire de l'hôte [86,87].

Les dents, dentier et implants, contrairement aux tissus épithéliaux, ne présentent pas de phénomène de « mue régulière », visant entre autre à prévenir de la formation de biofilm bactérien [88]. La plupart des microorganismes ne survivent que s'ils parviennent à adhérer solidement à une surface, il existe ainsi un équilibre dynamique entre leur capacité d'adhérence et les forces d'élimination telles que la déglutition, la friction des aliments et de la langue, ou encore l'hygiène buccodentaire [88].

Une étude par microscopie confocale a confirmé que la plaque dentaire présente une architecture ouverte avec des canaux et des vides [89]. Au sein du biofilm, les bactéries du microbiote oral n'existent pas de manière indépendante, mais sous forme de communauté microbienne coordonnée, organisée dans l'espace, et totalement intégrée sur le plan métabolique, présentant ainsi des propriétés plus avantageuses que l'ensemble de celles des espèces qui la composent [89]. Les colonisateurs primaires vont par ailleurs faciliter la fixation des souches bactériennes ultérieures du biofilm, améliorer les phénomènes métaboliques (catabolisme de molécules), et même stimuler la résistance au stress environnemental, aux agents antimicrobiens, ainsi qu'aux défenses de l'hôte.

Quand les microorganismes et la surface du substrat sont dans un environnement aqueux contenant du matériel organique tel que la salive ou le sang, ils sont recouverts en quelques secondes d'une couche de molécules organiques absorbées, communément appelée « film conditionné », et constitué de nombreux composants (glycoprotéines, protéines riches en proline ou en histidine, phosphoprotéines, enzymes...) qui deviennent des sites d'adhérence pour les bactéries. Un film conditionné va ainsi recouvrir à la fois la bactérie et la surface qui interagissent. Les mécanismes impliqués dans la formation des films conditionnés comprennent les forces électrostatiques, les forces de van der Waals et les forces hydrophobes. Les propriétés physicochimiques du film conditionné, notamment sa composition, sa densité et sa configuration, dépendent largement de la nature physique et chimique de la surface solide sous-jacente [90]. La plupart des bactéries possèdent plusieurs mécanismes spécifiques d'adhérence [91].

2. Formation du biofilm bactérien

La formation d'un biofilm peut être décomposée en quatre étapes principales (Figure 9 ; Figure 10). La première étape est l'accès à la surface, qui peut se faire en suivant des mouvements Browniens, le flux des liquides, les forces de van der Waals, la sédimentation ou un déplacement actif pour les bactéries mobiles [92–94]. La seconde phase va se manifester par une adhérence faible et réversible à la surface, appelée « attachement initial », qui intervient par le biais de forces à longue et courte portée. Les organismes seront attirés ou repoussés par la surface, en fonction de la résultante des différentes forces d'interaction non spécifiques. En condition de culture statique (sans écoulement turbulent ou laminaire), les interactions d'adhérence microbienne sont décrites par la théorie Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) qui inclut uniquement les interactions de Lifshitz-van der Waals et les interactions électrostatiques [95]. Ces interactions varient en fonction de la distance de séparation entre les bactéries et la surface du substrat ; si les bactéries atteignent la distance de séparation de l'énergie minimale secondaire, l'attachement initial se met en place [96,97]. Une fois qu'un contact (direct ou *via* des *fimbriae*) est établi entre la bactérie et la surface, un ancrage solide est élaboré ; il s'agit de la troisième étape, « l'attachement irréversible », qui fait intervenir des interactions acide-base décrites dans la théorie DLVO étendue (XDLVO). À la suite de cela, la plupart des organismes vont sécréter du glycocalyx, un facteur de virulence polysaccharidique qui va jouer un rôle de protection contre les composants immunitaires humoraux et cellulaires. La transition des stades réversible à irréversible de l'adhérence, fait intervenir des interactions plus fortes entre les bactéries et la surface, dépendant principalement des appendices de la paroi bactérienne (EPS, lipopolysaccharides [LPS], *fimbriae*). La quatrième et dernière phase est un processus de maturation du biofilm qui va alors pouvoir se développer, avec certaines variabilités selon la souche bactérienne et le substrat impliqués, mais également sous l'influence des conditions environnementales. Après cette dernière étape, des phénomènes tels que le *quorum sensing* vont contribuer au développement du biofilm bactérien. Par convention, une surface à rugosité élevée facilitera le développement du biofilm en protégeant les bactéries des forces de cisaillement [98] ; bien que la rugosité ne soit pas un facteur suffisamment déterminant pour que cela soit généralisé, comme cela sera abordé par la suite. Au cours de ces étapes, les propriétés de la surface jouent un rôle primordial, si bien que leur corrélation est élément majeur pour le développement de surfaces antibactériennes.

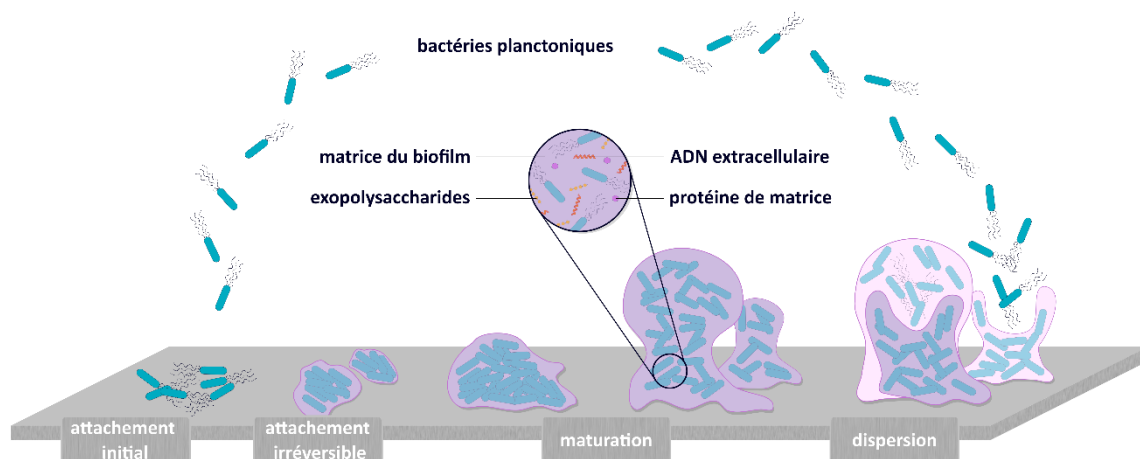


Figure 9 - Cycle de formation d'un biofilm bactérien ; adapté d'après Sauer et al., 2022 [99].

3. Solutions antibactériennes

Afin de prévenir la formation de biofilms, l'approche majoritaire des études actuelles est d'empêcher l'adhérence bactérienne initiale, soit par une action bactéricide (agents antibactériens par exemple), soit en modifiant la surface de contact pour entraver le processus d'attachement initial. Le développement d'implants capables de libérer des agents antibactériens, tels que les antibiotiques, permet de prévenir l'adhérence des bactéries planctoniques à la surface de l'implant ; mais leur système d'administration est crucial pour la longévité de l'action [100]. En fonctionnalisant la surface de l'implant avec une chimie dégradable à libération rapide, l'implant peut libérer une quantité significative d'agents antimicrobiens dans les premiers stades suivant l'implantation, offrant ainsi une protection contre les infections du site chirurgical. Cependant, il est essentiel de noter que la péri-implantite est souvent associée à des défaillances tardives, ce qui signifie que la concentration d'agents antibactériens sera fortement réduite à ce stade en raison de son épuisement précoce, exposant alors l'implant à une croissance non entravée du biofilm [101]. Une approche plus judicieuse consisterait à fonctionnaliser la surface de l'implant avec une chimie de libération reliée à des signaux environnementaux, tels que les variations de température [102] ou de pH [103]. Cela permettrait de relarguer une quantité significative d'agent antibactérien lorsque cela est nécessaire, préservant ainsi les propriétés antibactériennes de la surface jusqu'à ce qu'elles soient requises. Néanmoins, cette approche pourrait exposer les bactéries à de faibles concentrations d'agents antibactériens, ce qui ne permettrait pas un traitement efficace, mais risque également de contribuer à l'émergence de bactéries multirésistantes [104]. Pour répondre à la demande d'augmentation de la durée de vie des implants, tout en maintenant une action antibactérienne stable, il serait alors préférable de se tourner vers des mécanismes mécano-topographiques à la surface de l'implant, qui apporteraient une fonctionnalisation antibactérienne plus stable et pérenne. Cette catégorie de modifications de surface s'inspire de propriétés mécaniques biomimétiques, en s'inspirant

par exemple de feuilles de lotus bactériostatiques, ou bien d'ailes de cigales ou de libellules bactéricides [105,106]. Ces modifications vont jouer sur la modélisation, la rugosité, la mouillabilité, la dureté ou encore la charge des surfaces pour réduire l'adhérence bactérienne.

a. Impact de la rugosité de surface sur l'adhérence bactérienne

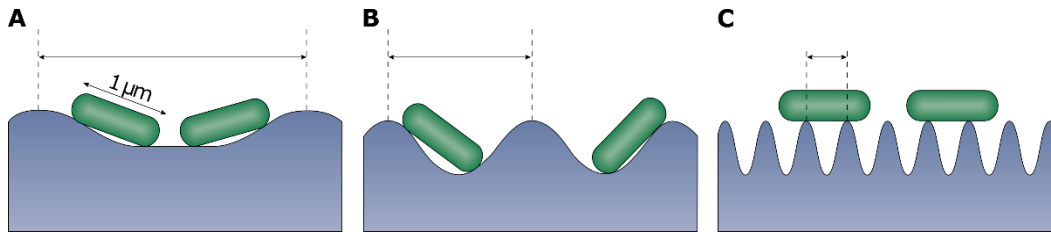


Figure 10 – Schéma de l'attachement différentiel des bactéries aux surfaces micro-nanostructurées ; adapté d'après Linklater et al., 2021 [107].

Dans le contexte d'adhérence bactérienne, la rugosité (hauteur moyenne arithmétique d'un profil [Ra] ou d'une aire [Sa]) est le paramètre le plus couramment utilisé pour décrire la topographie de surface. Une relation existe entre la taille des bactéries et les caractéristiques topographiques de la surface. Les bactéries ont tendance à coloniser de préférence les régions en retrait dont les dimensions sont plus grandes que les leurs, afin de maximiser leur surface de contact [107] (Figure 10). Lorsque la rugosité est faible (Ra : 0,2-6 nm), les bactéries préfèrent adhérer à une surface plus lisse, surtout en conditions de culture statique [108–110]. Ce phénomène est lié à l'activité métabolique cellulaire, avec une augmentation de la taille des bactéries et une production accrue d'EPS sur des surfaces plus lisses [108,109]. En revanche, lorsque la rugosité est relativement importante (Ra : 6-30 nm), les bactéries ont tendance à préférer les surfaces plus rugueuses [111–113]. La force d'adhérence entre les bactéries et les surfaces dont la rugosité est inférieure à un micron augmente à mesure que la rugosité augmente, jusqu'à une échelle de rugosité critique [114–116]. La rugosité à l'échelle nanométrique présente les meilleures propriétés anti-adhérence, tandis que la rugosité à l'échelle microscopique favorise l'adhérence bactérienne. L'adhérence aux surfaces lisses dépend principalement d'autres propriétés du matériau [117].

b. Impact de la topographie de surface sur l'adhérence bactérienne

i. Caractérisation de la topographie

L'aspect topographique d'une surface ainsi que sa classification structurale dépendent de l'échelle à laquelle elle est examinée [118–122]. Un objet solide quelconque vu à l'œil nu aura une forme définie (Figure 11) ; toutefois, si ce même objet est observé de plus près, via microscopie optique à faible grossissement par exemple, différentes caractéristiques vont devenir visibles et la surface peut apparaître considérablement différente. A cette échelle, la topographie est généralement qualifiée en termes « d'ondulations de la surface » (Figure 11).

Si le mode d'observation est une technique à plus haute résolution, tel que la microscopie à force atomique (AFM) ou la microscopie électronique, la surface examinée différera à nouveau, et sera alors décrite par sa « rugosité de surface » (Figure 11) [121,123–127]. Le seuil entre ces différents niveaux d'observation est assez arbitraire et relatif à la surface observée ; pour autant, il est essentiel de déterminer le ou les niveaux d'observations adaptés à l'objectif recherché. Afin d'étudier les interactions entre des cellules/bactéries et la surface matérielle d'un substrat, la caractérisation de la rugosité se fera majoritairement à des niveaux micro à nanométriques. Ces différences de résolution en termes de caractérisation topographique expliquent en partie les résultats parfois contradictoires ; des travaux différents ne peuvent en réalité être comparés que si les mêmes résolutions (verticale et horizontale) ont été utilisées pour décrire la surface.

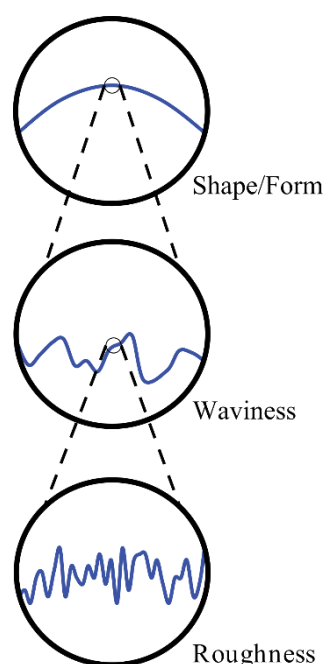


Figure 11 - Variation des niveaux de topographie en fonction de l'échelle d'analyse ; adapté d'après Crawford et al., 2012 [128].

D'autre part, la majorité des études sur l'adhérence bactérienne ne réalisent pas de caractérisation topographique complète, et se concentrent sur des paramètres de rugosité qui ne décrivent qu'un seul aspect de la topographie de surface. Cependant, la rugosité d'une même surface peut varier en fonction des paramètres pris en compte et/ou de la zone de mesure, ce qui rend complexe la comparaison entre différentes études et peut expliquer des résultats contradictoires d'une étude à l'autre. Ces différences de résultats peuvent être attribuées à la variance dans l'évaluation de la rugosité, aux propriétés physiologiques spécifiques des bactéries étudiées, ou encore à d'autres propriétés physico-chimiques de la surface qui pourraient influencer le comportement bactérien, telles que la mouillabilité. Il est important de noter que des surfaces ayant des topographies très différentes peuvent présenter des paramètres de rugosité similaires, car la rugosité décrit simplement les variations de hauteur sans tenir compte de la configuration spatiale 3D complète d'une

surface. Les paramètres d'amplitude (dont fait partie la rugosité) ne prennent pas en compte les informations spatiales comme les détails géométriques, la densité, la périodicité, la symétrie ou l'arrangement hiérarchique des éléments de surface, qui sont pourtant connus pour avoir un impact sur l'adhérence bactérienne [128]. Ainsi, pour mieux caractériser une surface, il est essentiel de compléter les paramètres de rugosité avec des paramètres spatiaux et hybrides (qui prennent en compte à la fois les caractéristiques d'amplitude et spatiales).

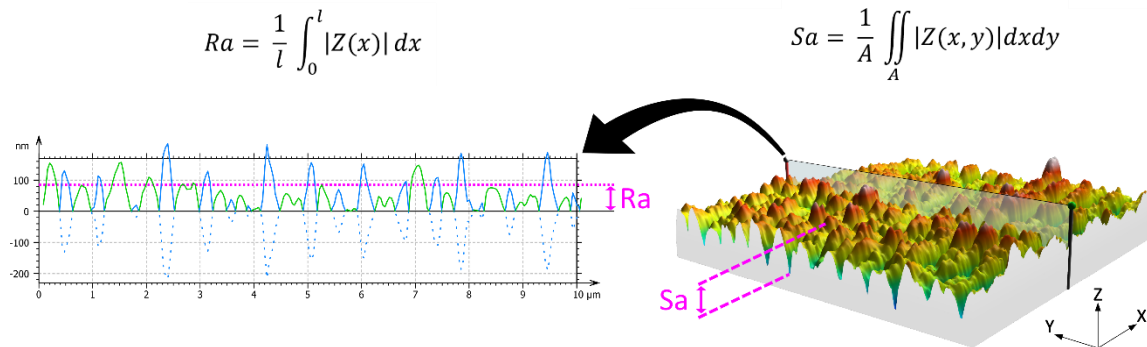


Figure 12 - Représentation de la mesure de rugosité d'une surface par méthode de profil (Ra) ou méthode surfacique (Sa) ; les mesures sont effectuées sur les valeurs absolues du profil (Ra) ou de la représentation 3D (Sa).

Les paramètres de rugosité les plus couramment rapportés sont la hauteur moyenne arithmétique (Ra ou Sa) et la hauteur moyenne quadratique (Rq ou Sq), qui mesurent la variation typique de la hauteur de la surface sur un profil issu qui en est issu. Cependant, ils ne fournissent pas d'indications sur la distribution spatiale ou la forme des caractéristiques de la surface. Un ensemble de 14 paramètres de rugosité, connu sous le nom de « Birmingham 14 », a été proposé par Stout et al., pour permettre une analyse plus approfondie de la surface et de ses propriétés topographiques [129]. Par définition, les paramètres R sont dérivés de données 2D et les paramètres S sont calculés sur un ensemble de données surfaciques (3D). Ainsi, la Ra est toujours un paramètre 2D mesuré sur un profil (onde sinusoïdale) qui ne possède par défaut que deux propriétés (sa longueur d'onde et son amplitude), et ne prenant en compte qu'une seule direction du plan ; alors que la Sa est toujours calculée sur une aire et prend en compte toutes les directions du plan [129] (Figure 12).

Bien évidemment les exigences de caractérisation de la rugosité sont spécifiques à l'application recherchée. Dans le contexte de la microbiologie, il est recommandé d'utiliser la Sq, la densité des sommets (Sds) et le rapport de surface interfaciale développée (Sdr) comme norme minimale. La Sq et la Sds fournissent des informations sur les propriétés spatiales et d'amplitude de la surface, tandis que Sdr donne des indications sur le rapport de la surface développée, qui est important pour l'adhérence cellulaire et l'hydrophobicité de la surface. Il est également encouragé de rapporter la hauteur maximale (Sz), l'asymétrie (Ssk), le rapport d'aspect de texture (Str) et le taux de longueur portante (tp), ainsi que tout autre paramètre pertinent vis-à-vis de l'application recherchée. L'utilisation de cet ensemble de paramètres

comme norme pour la caractérisation de la rugosité à l'échelle nanométrique permettrait une meilleure prédiction du comportement d'adhérence bactérienne et faciliterait la comparaison d'études. Cela aurait un impact significatif sur les applications industrielles, en particulier dans la conception et la fabrication d'implants biomédicaux, où la capacité d'empêcher l'adhérence bactérienne est essentielle pour réduire les infections associées aux dispositifs médicaux.

ii. Différents types de topographie

A partir d'une base de titane pure ou d'un alliage, il est possible de générer des nanostructures à rapport d'aspect élevé par diverses méthodes telles que le traitement hydrothermique, l'ablation laser, l'anodisation ou le traitement par gravure ionique réactive. Inspirées des ailes d'insectes, ces nanostructures aux excellentes capacités bactéricides peuvent prendre la forme de pillars, de spikes, de wires... En général, lorsqu'une cellule bactérienne rencontre ces nanostructures un attachement initial s'établit, puis sa membrane cellulaire est étirée et suspendue entre les nanostructures jusqu'à ce qu'elle se rompe. Ce mécanisme provoque la destruction de la membrane cellulaire, entraînant la mort de la bactérie.

Comme décrit précédemment, un traitement par fs-L peut permettre la génération de LIPSS (ripples, grooves, wells, pillars...) par interférence et ablation. Concernant les (nano)ripples, la densité des pics (c'est-à-dire le nombre de pics par unité de surface) peut refléter la zone de contact et leurs propriétés inhibitrices [107]. L'interaction bactérie-surface sur les structures à micro grooves dépend de la largeur et de la profondeur du sillon : lorsque la largeur de la rainure diminue, l'adhérence bactérienne est entravée [130]. Pour les microwells, l'interaction entre les bactéries et la surface dépend de plusieurs facteurs, notamment le diamètre des microwells, leur espacement et leur profondeur [131]. Ils peuvent piéger les bactéries, les isolant pour inhiber leur croissance et leur colonisation. L'efficacité antibactérienne des microwells augmente à mesure que l'espacement entre eux diminue. Les sub-micro pillars, de courte longueur, ont montré d'excellentes capacités antibactériennes envers différentes espèces. La densité élevée de ces pillars submicroniques peut réduire la surface de contact réelle, inhibant ainsi l'adhérence bactérienne [132]. En revanche, les réseaux de micro pillars ont montré une efficacité antibactérienne qui diminue à mesure que leur diamètre augmente [133]. La caractéristique importante des micro pillars est l'augmentation de la surface totale associée à la diminution de la surface disponible pour l'attachement bactérien.

iii. Effets de la topographie

La topographie joue un rôle dans l'expression des adhésines bactériennes produites par certaines souches, ce qui favorise l'adhérence cellule-cellule et conduit à la formation de biofilms microbiens symbiotiques. Les bactéries sont capables de détecter activement la topographie et de réagir en conséquence, ce qui affecte leur capacité d'adhérence. Par ailleurs, des études récentes ont montré que des nanopillars peuvent avoir une action bactéricide en agissant mécaniquement sur la rupture ou la déformation de la membrane cellulaire des bactéries [134–136]. En revanche, une topographie à l'échelle microscopique,

avec une plus grande surface de contact entre la bactérie et la surface matérielle, entraîne une pression de contact insuffisante pour provoquer une déformation significative de la membrane.

Les macromolécules qui se lient à une surface peuvent provoquer des modifications significatives de ses propriétés physicochimiques et topographiques, entraînant ainsi des interactions bactéries-surface imprévisibles. Les films conditionnés peuvent agir en masquant ou en modifiant les propriétés de la surface initiales, en altérant la topographie, ou en fournissant des sites d'interaction spécifiques pour les bactéries (par exemple, les revêtements protéiques sur des surfaces abiotiques peuvent offrir des sites de liaison aux bactéries avec des interactions ligand-récepteur hautement spécifiques) [90]. L'effet de masquage de la topographie est particulièrement notable pour les motifs à l'échelle nanométrique, car les macromolécules impliquées sont du même ordre de grandeur [137].

Les topographies d'échelle micrométrique modifient considérablement l'environnement microfluidique à proximité de la surface. L'impact de la topographie sur le shear stress (contrainte de cisaillement) ou le shear rate (taux de cisaillement) peut diminuer avec la taille des éléments de topographie. Cependant, il n'existe pas d'étude mécanistique disponible sur l'effet d'une topographie à échelle nanométrique sur l'environnement microfluidique proche de la surface. Il a été constaté que la quantité de biomasse nécessaire pour induire complètement le *quorum sensing* d'une population bactérienne augmente avec le débit (flow rate) de l'environnement [90]. Cela signifie qu'un débit plus élevé peut induire le besoin d'un plus grand nombre de bactéries adhérentes pour déclencher le mécanisme de *quorum sensing*. Il a également été observé que l'attachement bactérien peut être renforcé par un mécanisme appelé « catch-bond » sous un débit faible. Cependant, ce mécanisme peut échouer sous un débit élevé, entraînant une diminution de l'adhérence bactérienne [138].

L'orientation et l'attachement des microorganismes semblent être déterminés de manière à maximiser la surface de contact entre les bactéries et la surface. Ainsi, les bactéries ont tendance à préférer se lier aux récessions de taille similaire à la leur [139]. L'espace interstitiel entre les éléments topographiques tout comme la profondeur de ces espaces se sont révélés être des paramètres critiques pour l'arrangement des bactéries [140,141]. Une densité plus élevée des éléments de topographie entraîne un étirement accru de la membrane bactérienne. Cependant, si les piliers rigides sont trop denses, il n'y a pas assez d'espace entre eux pour que la membrane cellulaire puisse s'y loger, ce qui entraînera l'effet « fakir ». En revanche, si les piliers sont trop courts et trop peu nombreux, l'étirement de la paroi cellulaire s'arrêtera lorsque celle-ci atteindra le substrat entre les piliers, ce qui limitera le potentiel effet bactéricide du modèle [107]. L'organisation et la répartition des bactéries primaires sur une surface peuvent interférer avec le développement et l'organisation naturels du biofilm, car certaines bactéries dépendent de signaux de contact spécifiques pour entrer en fonctionnement coopératif [142,143]. Dans le cas de la formation du biofilm dentaire par exemple, *S. gordonii* est l'un des premiers colonisateurs qui crée un environnement propice à

la formation ultérieure de biofilms en permettant à d'autres espèces de s'installer [90]. En tant que pionnier, il offre des conditions plus favorables pour la formation du biofilm.

Lorsque les dimensions de la topographie de surface sont beaucoup plus grandes que celles des bactéries, le comportement d'adhérence semble être indépendant de la topographie, car la surface locale avec laquelle les bactéries interagissent est principalement plane. Ainsi, la topographie joue un rôle essentiel dans l'arrangement des cellules et la ségrégation des colonies si elle est d'une taille comparable ou inférieure à celle d'une bactérie unique.

Bien que des designs topographiques aient été développés pour limiter le bio-encrassement, assurer leur efficacité à long terme est un défi complexe en raison des facteurs environnementaux (salissure, accumulation d'un film conditionnant...) et biologiques (production d'EPS, interactions cellules-cellules...) qui peuvent progressivement masquer leurs effets. Des topographies dynamiques, inspirées de la nature, ont été proposées comme solution, mais elles n'ont pas encore montré de résultats significativement supérieurs aux substrats statiques dans les conditions d'étude *in vitro* [144,145]. La diversité des souches bactériennes et des mécanismes d'adhérence (variations de géométrie cellulaire et du type de flagellation) rendent également difficile la généralisation des résultats [146].

c. Impact de la mouillabilité sur l'adhérence bactérienne

En général, des interactions hydrophobes se produisent entre les bactéries hydrophobes et les surfaces non polaires, tandis que les bactéries hydrophiles ont tendance à adhérer aux surfaces hydrophiles. La mouillabilité, souvent mesurée par l'angle de contact d'un liquide avec une surface, dépend à la fois de la chimie et de la topographie de cette surface. Des études antérieures ont conclu que d'autres propriétés de surfaces, telles que la topographie, jouaient un rôle plus prépondérant que la mouillabilité dans l'adhérence bactérienne [147,148]. Cela s'explique en partie par le fait qu'une mesure macroscopique de l'angle de contact ne reflète pas précisément les propriétés des éléments micro- et nano-topographiques avec lesquels les bactéries interagissent directement.

d. Impact d'autres paramètres sur l'adhérence bactérienne

Il existe d'autres paramètres de surface qui pourraient jouer un rôle dans l'adhérence bactérienne, tels que la rigidité ou la charge d'une surface. Concernant la rigidité de surface, il a été mis en évidence que la force d'adhérence bactérienne est plus faible sur les surfaces souples que sur les surface rigide [149]; ce qui peut s'expliquer par une stimulation du déplacement des bactéries sur les surfaces rigides dans les stades initiaux de mise ne place du biofilm [150]. A l'inverse, d'autres études ont démontré une augmentation de la formation de biofilm sur les surfaces souples [151–153]. De manière générale, Arias et al., suggèrent que l'impact de la rigidité d'une surface dans l'adhérence bactérienne est négligeable en comparaison à l'effet de la topographie de surface [154].

Majoritairement, les bactéries sont chargées négativement ; la charge de surface va quant à elle dépendre du pH et de la force ionique de l'environnement, mais peut cependant être modifiée par revêtement avec des polyélectrolytes [155]. L'adhérence bactérienne sur ces revêtements fabriqués par addition successive de couches va dépendre principalement de la charge de la couche supérieure. Par force de répulsion électrostatique, la présence d'un polyélectrolyte terminal anionique va limiter l'adhérence bactérienne [156–158]. Toutefois, bien qu'à l'inverse une attraction électrostatique soit observée avec une charge terminale positive, celle-ci n'augmente pas systématiquement l'adhérence bactérienne. En effet, si le contact avec une surface bactéricide est favorisé, cela peut mener à une perte de l'intégrité de la membrane bactérienne voire une mort cellulaire [159–161]. De même, une force d'adhérence suffisamment élevée entre une surface chargée positivement et une bactérie gram-négative (possédant une paroi moins résistante) pourrait également conduire à une rupture de la membrane de cette dernière [162]. Toutefois, l'effet de répulsion de la charge de surface négative agit également sur les cellules eucaryotes et le sérum [163], il est donc préférable en implantologie de favoriser une charge de surface positive combinée à une surface mécaniquement ou chimiquement antibactérienne.

4. Méthodes d'analyse de l'adhérence bactérienne

Le phénomène complexe d'interaction bactérie-surface est principalement régi par l'espèce bactérienne, les propriétés physico-chimiques et topographiques du substrat, et les conditions environnementales. Afin d'évaluer l'impact de ces différents facteurs dans l'adhérence bactérienne, des techniques ont été mises au point telles que les systèmes de suivi des cellules ou l'AFM [164,165]. Ces approches permettent un suivi du processus et de la force de l'adhérence à l'échelle d'une bactérie unique. Les techniques basées sur l'AFM, telles que la spectroscopie de force unicellulaire (SCFS), la microscopie de force latérale unicellulaire ou encore la microscopie de force fluide, sont favorisées pour leur universalité ainsi que leur polyvalence environnementale (air ou liquide) [166]. Dans la SCFS, la pointe AFM classique est substituée par une bactérie vivante constituant la sonde bactérienne, qui va venir au contact de la surface avant de subir une force de traction (Figure 13.A) ou de déplacement latérale (Figure 13.B) dite « force d'adhérence » [114,166,167]. La courbe de force ainsi mesurée permet alors d'obtenir une valeur minimale correspondant à la force de l'adhérence bactérienne à la surface. Concernant la microscopie à force latérale unicellulaire, une pointe AFM standard va appliquer des forces latérales différentes sur des bactéries individuelles déjà adhérentes ; la force la plus faible permettant leur déplacement sera alors considérée comme « force d'adhérence latérale » [168] (Figure 13.C). Il s'agit d'une méthode invasive risquant de détériorer voire tuer la bactérie testée. Une évaluation par microscopie à force fluide permettra des mesures non invasives de la force d'adhérence, cependant elle requiert un équipement plus spécifique (Figure 13.D).

Les évolutions en termes d'imagerie ont vu émerger de nouvelles techniques telles que la microscopie à fluorescence, qui est étroitement liée à la microscopie à transmission mais avec

des avantages bien distincts. Grâce à une sensibilité élevée, elle permet en effet de détecter et de quantifier de faibles concentrations de substances fluorescentes ou de petites particules, tout en étant adaptée à l'observation d'objets opaques [169]. Cela présente un réel avantage pour l'observation et la quantification de bactéries adhérentes sur les surfaces métalliques utilisées en implantologie. La fluorescence implique l'utilisation de deux bandes de longueur d'onde, l'excitation et l'émission, ce qui permet d'améliorer considérablement la spécificité optique en choisissant soigneusement les combinaisons de filtres pour favoriser des fluorophores spécifiques. De plus, les avancées récentes permettent la résolution temporelle de la durée de vie de la fluorescence, ce qui permet d'envisager une étude de l'adhérence bactérienne sur une période donnée.

a. Mesure de la force d'adhérence bactérienne

De manière générale, la mesure de la force d'adhérence bactérienne est révélatrice du degré d'interaction bactérie-surface, cependant plusieurs techniques de mesures sont sensibles aux propriétés physico-mécaniques de la surface. L'aire de contact bactérie-substrat va dépendre fortement des motifs topographiques ainsi que de la rugosité de la surface, et influencer fortement l'adhérence bactérienne. Une mesure de la force d'adhérence par SCFS ou par microscopie de force latérale unicellulaire permettra de suivre l'adhérence d'une bactérie unique au sein de dispositifs micro-fluidiques facilitant l'étude du mouvement de bactérie attachées à des surfaces à motifs topographiques ou à rugosité variable, reflétant ainsi les variations d'aire de contact [170]. La sonde bactérienne permet la mesure d'une force de friction entre les bactéries attachées et la surface, révélant la force nécessaire à l'élimination des bactéries adhérentes.

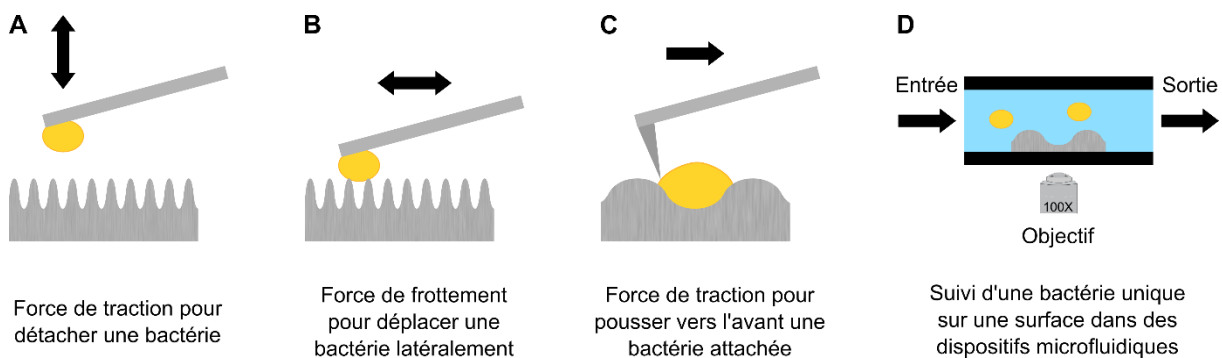


Figure 13 - Schéma de stratégies pour mesurer la force d'adhérence des bactéries à la surface et calculer l'énergie d'interaction sur une surface modifiée avec des motifs topographiques ; adapté d'après Yang 2022 [171].

Il existe également une distinction, rarement mise en évidence dans les études, entre l'adhérence et la rétention bactérienne. La première correspond uniquement à l'attachement initial des bactéries ; en revanche la rétention se réfère à la fois aux bactéries initialement attachées à la surface, et à celles qui demeurent adhérentes malgré les contraintes externes (comme les contraintes de cisaillement dues au flux) [172]. Cette différenciation soulève des doutes quant à savoir si le biofilm mesuré est le résultat de l'attachement initial des bactéries,

ou s'il repose sur un détachement inefficace induit par la rugosité de la surface. En effet, cette rugosité peut parfois jouer un rôle négligeable dans l'adhérence initiale, mais en revanche faciliter la rétention des bactéries à long terme [172].

b. Analyse de l'énergie d'interaction

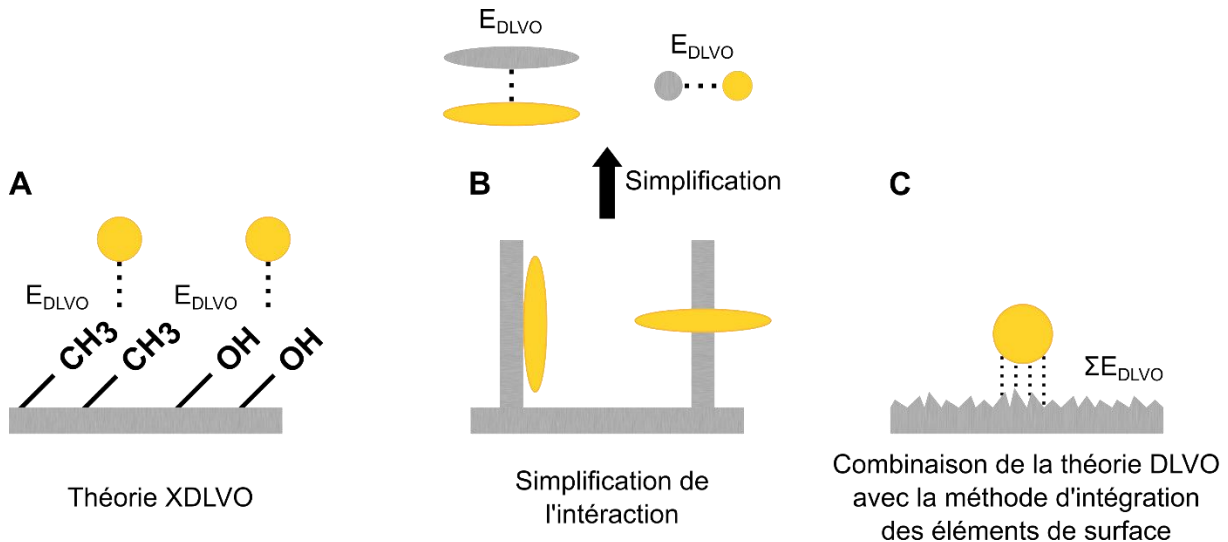


Figure 14 – Schéma des stratégies de modélisation de l'énergie d'interaction entre les bactéries et les surfaces modifiées (chimiquement ou topographiquement), basées sur les théories DLVO ou XDLVO ; adapté d'après Yang 2022 [171].

La force d'interaction entre les bactéries et la surface, incluant la force d'adhérence bactérienne, est un concept qui découle de la théorie DLVO, qui permet de comprendre comment les propriétés de la surface affectent l'adhérence des bactéries [173,174]. Lorsque la barrière énergétique pour l'adhérence des bactéries à un substrat est réduite, une interaction plus solide peut s'établir. Certains travaux se basent également sur les théories XDLVO pour expliquer l'impact de la mouillabilité sur la force d'adhérence bactérienne [175] (Figure 14.A). Néanmoins, les théories DLVO et XDLVO ne parviennent pas à expliquer de manière satisfaisante l'effet des surfaces irrégulières sur l'adhérence bactérienne, car ces théories traditionnelles ne prennent pas en compte l'influence de la topographie de la surface. Pour pallier cette lacune, des stratégies sont employées. La première consiste à simplifier le système ; lorsque des bactéries en forme de bâtonnets adhèrent à des structures topographiques dans une orientation perpendiculaire, l'interaction dans peut être simplifiée comme l'interaction de deux sphères (Figure 14.B). De même, lorsque des bactéries en forme de bâtonnets adhèrent le long de ces structures, l'interaction peut être simplifiée comme l'interaction de deux ellipses [176]. Cette méthode de simplification nous aide à mieux comprendre l'interaction entre les bactéries et les surfaces à motifs. La deuxième stratégie combine la théorie DLVO ou XDLVO avec la méthode d'intégration des éléments de surface, qui vise à remplacer les surfaces bactériennes et rugueuses du substrat par de nombreuses petites surfaces (Figure 14.C). En additionnant les énergies d'interaction individuelles de ces

petites surfaces de manière informatique, l'énergie d'interaction totale peut être calculée [177]. Cette approche fournit une méthode générale pour étudier l'interaction bactérie-surface, la topographie de la surface pouvant être mesurée à l'aide d'outils tels qu'un profileur ou un AFM. En employant ces deux stratégies en supplément de la théorie DLVO ou XDLVO, les chercheurs peuvent simuler et expliquer les propriétés anti adhérentes de diverses surfaces présentant des motifs topographiques ou des irrégularités.

En résumé, la topographie de surface joue un rôle crucial dans l'attachement bactérien, mais mène souvent à des conclusions contradictoires, principalement en raison de la variabilité dans les modèles d'étude (type de topographie et mode de fabrication), dans les souches bactériennes étudiées ou encore dans la caractérisation de la surface (paramètres topographiques pris en compte, sensibilité de la méthode de mesure/d'analyse).

E. Impacts de la topographie sur le comportement biologique de cellules eucaryotes

1. Contexte

En 1912, Harrison a marqué un jalon, en démontrant pour la première fois l'influence des matériaux de support solides sur le mouvement et la morphogenèse des cellules, grâce à une toile d'araignée comme substrat de référence [178]. Ses recherches ont révélé que la forme et la migration des cellules étaient corrélées à l'organisation ainsi qu'à la topographie du substrat. Plus tard, en 1947, Paul Weiss a établi que les cellules se déplacent et migrent en suivant des signaux de contact [179]. C'est à partir de ces découvertes que pour la première fois, Curtis et Varde ont utilisé des éléments topographiques pour contrôler le comportement des cellules [180].

La topographie du substrat engendre des contraintes mécaniques qui modifient considérablement la morphologie cellulaire, la dynamique du cytosquelette, et par conséquent les signaux contrôlant l'adhérence, la croissance et la différenciation des cellules [181]. Grâce aux progrès des techniques de micro et de nanofabrication, de nombreuses études ont montré, sur différents types de cellules, des réactions significatives vis-à-vis de la microtopographie [182–184]. Plus récemment, il a été mis en évidence que la nanotopographie peut également avoir un impact significatif sur le comportement cellulaire. Dans plusieurs travaux, une diminution de l'attachement cellulaire (fibroblastes) et des complexes d'adhérence focale a été observée au contact des nanostructures [185,186]. Des variations de morphologie, de prolifération et d'étalement cellulaire (fibroblastes et cellules épithéliales) ont également été mises en évidence sur des surfaces nanotexturées [187–189]. De manière générale, les fonctions cellulaires sont influencées par les substrats qui imitent la topographie de la MEC, ce qui remet en question l'idée que les substrats ne jouent qu'un rôle de support, et suggère plutôt qu'ils agissent comme des surfaces intelligentes, capables de fournir des signaux mécaniques, transformés en signaux chimiques par les cellules. Dans un contexte d'implantologie orale, une modification de la surface de l'implant, à la fois topographique et chimique, peut favoriser une ostéogenèse accélérée *in vivo* et augmenter considérablement le contact à l'interface os-implant et la force d'adhérence [184,190]. Cependant, il subsiste un besoin de recherches systématiques et de revues plus complètes synthétisant ces effets.

2. Adhérence cellulaire

L'adhérence cellulaire est un processus essentiel dans la formation des tissus. Elle implique la liaison des cellules à la matrice extracellulaire, à d'autres cellules ou à une surface grâce à des protéines de surface spécifiques [191]. Cette interaction génère des forces sur le cytosquelette qui se propagent dans la cellule jusqu'au noyau, et entraînent l'activation de voies de signalisation [192]. Lorsqu'une cellule se lie à une surface par le biais de molécules

d'adhérence et que cette liaison entraîne la transmission d'un signal au cytosquelette, il s'agit d'un processus appelé « adhérence focale ». Les points d'adhérence focale sont des points d'intersection, où les signaux mécaniques de l'environnement sont convertis en forces intracellulaires et en signaux chimiques, grâce aux connexions cytosquelettiques et aux protéines de signalisation [193]. Les couches de protéines formées dans les premières minutes de contact avec le milieu de culture sont presque exclusivement constituées d'albumine [194]. L'adsorption initiale des protéines qui affecte entre autres l'adhérence de la fibronectine pourrait ensuite réguler l'adhérence cellulaire par le biais de contacts focaux [195,196]. Une fois que des forces de traction sont générées sur le cytosquelette, elles sont transmises aux différentes structures de la cellule, avec notamment un impact important sur le noyau [197]. En effet, des événements cellulaires tels que la différenciation, l'apoptose ou les modifications de profils d'expression génétique, sont indirectement influencés par les forces exercées sur le noyau [197,198].

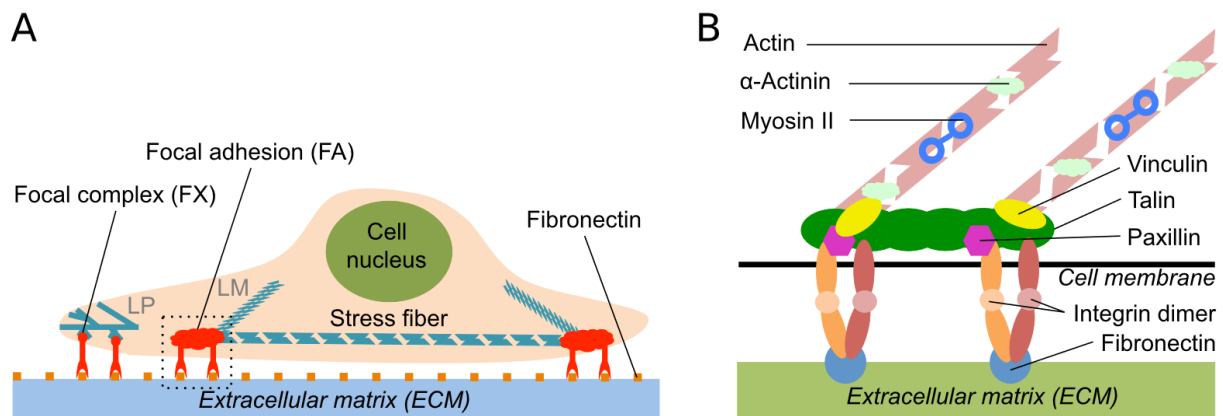


Figure 15 – Représentation schématique des adhérences focales. (A) Cellule adhérente. Au cours de l'étalement et la migration, la cellule adhère à des ligands de la MEC par le biais d'adhérences naissantes qui se transforment en complexes focaux dans le lamellipode (LP), puis en adhérences focales dans la lamelle (LM). (B) Vue agrandie d'une adhérence focale avec les principaux composants moléculaires. La protéine transmembranaire intégrine se lie à la fibronectine de la MEC. La connexion aux fibres de stress d'actine, qui peuvent se contracter (myosine II), est assurée par la taline. Ce lien mécanique de base est renforcé par des protéines comme la vinculine, la paxilline ou l' α -actinine ; d'après Hoffmann 2013 [199].

La mise en place de l'adhérence cellulaire s'effectue par l'établissement de jonctions telles que les jonctions serrées (zonula occludens), les jonctions intermédiaires (zonula adherens) ou les desmosomes (macula adherens). Les jonctions serrées résultent de la fusion des membranes cellulaires adjacentes, tandis que les jonctions intermédiaires sont des espaces intercellulaires remplis d'un matériau amorphe homogène. Les desmosomes sont également des espaces intercellulaires de taille plus importante et remplis d'un matériau plus dense [200]. La première étude de l'adhérence des cellules aux substrats, effectuée par microscopie à réflexion interférentielle, a montré que les interactions cellule-substrat se produisent au

niveau des points d'adhérence [201]. Il a été prouvé que pour que les cellules adhèrent à une surface, il doit y avoir des groupements chimiques spécifiques disponibles sur le substrat [202]. Ces groupements chimiques sont associés à des protéines de surface cellulaire spécifiques, appelées molécules d'adhérence cellulaire (CAM). Les CAM appartiennent à différentes familles (intégrines, immunoglobulines, sélectines, cadhérines), et jouent un rôle crucial dans les interactions cellulaires. Les intégrines, par exemple, sont responsables des interactions cellule-cellule et cellule-matrice. Les points d'adhérence cellulaire peuvent être classés en deux structures distinctes : les contacts étroits et les contacts focaux [203]. Récemment, ces contacts ont été classés en complexes focaux, adhérences focales et adhérences fibrillaires [204]. Les complexes focaux se trouvent au bord d'un lamellipode et sont composés de paxilline, de vinculine et de protéines phosphorylées à la tyrosine (Figure 15). Les adhérences focales sont situées en périphérie de la cellule et contiennent de l'intégrine $\alpha 5$, de la paxilline, de la vinculine, de l'actine α , de la taline, de la kinase d'adhérence focale et de protéines phosphorylées à la tyrosine (Figure 15). Les points d'adhérence fibrillaire se trouvent au centre des cellules et sont composés de l'intégrine $\alpha 5$ et de tensine [204]. Contrôler la topographie du substrat est une méthode non invasive de régulation de la fonction cellulaire, car les surfaces texturées agissent comme contrainte physique extracellulaire, sans impliquer de biomolécules. La topographie pourrait permettre une stimulation cellulaire biomimétique, car les cellules *in vivo* entrent en contact avec des interfaces texturées et non lisses.

Dans un contexte d'interaction cellules-surface, ce sont tout d'abord les protéines présentes dans le milieu de culture qui vont être adsorbées à la surface du substrat, pour permettre ensuite l'adhérence des cellules. De nombreuses protéines, telles que les immunoglobulines, la vitronectine, la fibronectine et le fibrinogène, peuvent être adsorbées à la surface. Les ions présents sur la surface peuvent améliorer la biocompatibilité et l'affinité des cellules pour le substrat, ainsi que leur différenciation. Une fois l'adhérence initiale établie, les cellules libèrent des composés qui sont impliqués dans la signalisation cellulaire, le dépôt de la matrice extracellulaire, la prolifération et la différenciation cellulaire. Chacun de ces processus dépend de l'interaction chimique entre les cellules et le substrat, en outre la composition chimique de la surface est une des propriétés élémentaires dans l'interaction cellule-substrat. Elle regroupe différents paramètres tels que les charges de surface, la mouillabilité et la capacité à adsorber des protéines.

Concernant les cellules au contact des implants dentaires (ostéoblastes et fibroblastes gingivaux majoritairement), une capacité d'adhérence plus élevée et un meilleur étalement ont été observés sur des surfaces chargées positivement par rapport à des surfaces neutres ou négatives [205]. De plus, une hydrophilie modérée (angle $\theta \approx 60^\circ$) semble être favorable pour l'adhérence cellulaire [206].

In vitro, les propriétés de surface sont connues pour influencer le comportement cellulaire, une rugosité de surface modérée permet par exemple d'augmenter l'adhérence et la prolifération de cellules MG-63 (ostéoblastes issus d'un ostéosarcome humain) [207]. De

manière plus générale, la topographie de surface de biomatériaux joue un rôle majeur dans l'adhérence, la propagation et l'organisation du cytosquelette des ostéoblastes, ce qui pourrait influencer de nombreuses fonctions [208–210].

Une autre approche pour favoriser l'adhérence cellulaire consiste à utiliser des motifs de protéines (fibronectine par exemple), sous forme géométriques variables pour guider les cellules sur la surface [211]. De même, l'utilisation de micro et nanopillars ainsi que de motifs multicouches de protéines de la matrice extracellulaire peut permettre de contrôler l'adhérence et la différenciation cellulaire de manière structurée [212].

3. Morphologie cellulaire

La morphologie cellulaire est fortement influencée par la structure et l'organisation du cytosquelette. Les forces mécaniques externes induites par la topographie de surface sont responsables de la réorganisation du cytosquelette, et par conséquent de la contractilité cellulaire. Ces changements sont détectés par les voies intrinsèques de mécanotransduction nucléaire. De ce stimulus mécanique externe découlent donc des modifications dans l'état de la chromatine, ce qui se traduit par des changements dans l'expression génique [213,214].

La topographie nano à micrométrique a un impact sur l'élongation et la polarisation nucléaire ; avec une variabilité selon la rigidité et la déformabilité du noyau cellulaire. Cela s'explique par une mécanotransduction induite par la topographie, qui va provoquer un réarrangement des composants de la membrane cellulaire basale, tels que les complexes d'intégrines, déterminant ainsi la morphologie cellulaire. De récentes études montrent que la sensibilité aux déformations nucléaires est dépendante du type cellulaire [215]. Cela ouvre la porte à des méthodes de sélection cellulaire par substrat fonctionnalisé, présentant des topographies prédéterminées. Buch-Manson et al., ont utilisé des réseaux de nano piliers à différentes densités pour étudier le remodelage du cytosquelette des fibroblastes [216]. Ils ont montré que l'interface entre les régions de topographies différentes avait une importance cruciale pour étudier le remodelage de l'actine et la prolifération. Des études ont rapporté que la profondeur des microtopographies peut influencer les réponses cellulaires. Par exemple, sur des substrats polymères, Seo et al., ont montré qu'en augmentant la profondeur de 1 μm (de 1 μm à 2 μm), la localisation de la vinculine passait de la zone supérieure à la zone inférieure de la topographie (CSM) [217]. Sur les surfaces métalliques, il n'est pas facile de contrôler la profondeur du motif créé par les méthodes classiques. En revanche, l'ablation laser permet de moduler la profondeur des topographies générées par simple ajustement de paramètres.

4. Orientation cellulaire

L'alignement des cellules sur la surface de l'implant est également important pour prédire et diriger l'architecture tissulaire. Des motifs topographiques micro et nanométriques ainsi que des rainures ont été utilisés pour aligner divers types de cellules. Par exemple, des kératinocytes cornéens et des cellules épithéliales pigmentées de la rétine ont été alignés pour imiter l'architecture de la cornée [218]. Peterbauer et al., sont parvenus à aligner différents

types cellulaires grâce à des substrats nano-rainurés [219]. Ces approches offrent un contrôle précis de l'adhérence et de l'alignement cellulaire, ce qui est essentiel pour des applications d'ingénierie tissulaire et de recherche biomédicale. Initialement, c'est l'orientation des filaments d'actine et des microtubules qui a été associée à l'alignement cellulaire guidé par contact avec la surface [220]. Cependant, même lorsque les filaments d'actine ou les microtubules sont détruits par des perturbateurs pharmaceutiques, les cellules présentent un guidage par contact, suggérant un lien entre la localisation des protéines d'adhérence focale telles que la vinculine, et l'alignement cellulaire [221,222]. L'orientation des cellules est régulée par l'échelle de la topographie ; l'alignement est généralement plus important avec l'augmentation de la profondeur des rainures mais diminue avec l'augmentation de la largeur des rainures ou du pas [223,224]. Des études récentes cherchent à savoir si les cellules s'alignent sur des crêtes et des rainures d'échelle sub micrométriques et jusqu'à quelle échelle la topographie peut être réduite tout en préservant la fonctionnalité de guidage par contact. Dumas et al., ont montré que des LIPSS de 600 nm de période, présents au sein de microsillons, sont capables d'orienter des CSM ainsi que l'organisation de la MEC [225]. Loesberg et al., ont déterminé le seuil de 100 nm à partir duquel les nanogrooves présents sur un substrat peuvent influencer l'alignement des fibroblastes [226].

5. Migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes et qui revêt une importance cruciale dans le développement embryonnaire, la cicatrisation, l'ossification, l'immunité... [227]. Les substrats à motifs micrométriques, prometteurs pour imiter l'architecture tissulaire dans cette optique, sont largement étudiés. Kim et al., ont montré sur des polymères microtexturés que des changements graduels de la densité locale et de l'anisotropie du motif topographique peuvent induire une migration cellulaire (fibroblastes) organisée à grande échelle ce qui permet d'amener les cellules à migrer vers une localisation prédéfinie [228]. Jiang et al., se sont basés sur des microtopographies pour contraindre des fibroblastes à des géométries asymétriques et ainsi contrôler la direction de migration des cellules grâce à la polarisation de leur morphologie [229]. Klos et al., ont montré qu'un contrôle de l'adhérence et de la migration de CSM sur Ti6Al4V est possible en créant des motifs composés de zones texturées ou non par fs-L [70].

6. Prolifération cellulaire

Les effets des micro et nanostructures sur la prolifération cellulaire sont très variables et dépendent majoritairement du type de cellule et des structures concernées [230–232]. La difficulté à établir des tendances générales pourrait s'expliquer par l'absence d'études systématiques sur cette question, car la plupart des travaux s'intéressant à la culture cellulaire sur des structures d'échelle micro à nanométrique ne donnent pas d'informations sur la prolifération cellulaire. D'autre part, les études sont souvent réalisées sur des lignées cellulaires immortalisées, très robustes et prolifératives (fibroblastes, ostéoblastes, lignées de carcinome...), ce qui ne permet pas une généralisation des résultats rapportés. Des

changements dans l'expression génique sont parfois observés [189,223,233,234], mais aucune étude systématique n'a été réalisée jusqu'à présent.

7. Différenciation cellulaire

La topographie d'une surface aux échelles nano et micrométrique influence le devenir des cellules. C'est le cas notamment pour les CSM qui peuvent se différencier en une grande diversité de types cellulaires (ostéoblastes, adipocytes, chondrocytes, myoblastes...) ce qui en fait un modèle idéal pour la biointégration d'implants [235]. Hatano et al., ont montré que l'activité de la phosphatase alcaline, la prolifération et le nombre de cellules ostéoblastiques étaient plus élevés sur des surfaces de rugosité moyenne pouvant atteindre 0,8 mm que sur des surfaces lisses [236]. Toutefois, la rugosité d'une surface peut être associée à des topographies variables, ce qui influence différemment l'engagement cellulaire. Des études antérieures ont montré qu'une rugosité sub-micrométrique générée par texturation au laser peut améliorer la différenciation ostéoblastique de CSM [237,238] et l'ostéointégration *in vivo* [239,240]. Dalby et al., suggèrent que des nanostructures circulaires aléatoires favorisent et dirigent la différenciation ostéoblastique des CSM, sans nécessiter l'ajout de facteurs pro-ostéogéniques [241]. Popat et al., ont signalé une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline et de la production de matrice des cellules stromales de la moelle lorsqu'elles sont cultivées sur des substrats d'alumine nanoporeuse [241–243]. McBeath et al., ont montré que la taille de la zone de confinement des CSM est le facteur critique pour la détermination de leur destin [181]. En supplémentant des CSM avec une combinaison de milieu d'ostéo et d'adipo différenciation et en les confinant dans des motifs plus ou moins grands, les cellules se sont différenciées en adipocytes dans les plus petits motifs et ont montré des tendances ostéogéniques dans les plus grands. Peng et al., ont fait une observation similaire sur des CSM contraintes dans des formes spécifiques avec des périmètres variables [244]. Watari et al., montrent que des CSM présentent une augmentation de l'expression des gènes ostéogéniques lorsqu'elles sont cultivées sur des surfaces de polyuréthane avec des rainures d'un pas de 400 nm, par comparaison à des rainures de pas plus importants (1400 – 4000 nm) [245]. Plus récemment, Dumas et al., ont montré l'amélioration de l'ostéogénèse dirigée par des surfaces de Ti6Al4V texturées au fs-L (LIPSS de période 600 nm) pouvant être liée à des modifications de la forme des CSM, des contacts focaux et de l'organisation du cytosquelette initiées dans les minutes ou les heures suivant l'adhérence au substrat [237]. La période des LIPSS étudiées ici est cohérente avec les conclusions de Watari et al., [245] et s'approche de la dimension des fibres de collagènes (environ 500 nm de diamètre). Ces différents travaux sont en accord avec d'autres études qui ont montré que pour les CSM, la forme circulaire induit l'adipogenèse [246,247], tandis que les formes moins circulaires, ou en étoile, favorisent l'ostéogénèse [248,249].

8. Approches techniques pour évaluer l'adhérence cellulaire/tissulaire

L'adhérence est une fonction essentielle pour le développement d'une cellule, il a donc été nécessaire de développer des méthodes de mesure et d'étude adaptées, basées sur l'attachement cellulaire initial, ou sur le détachement une fois que l'adhérence est établie [250].

L'attachement de cellules individuelles peut être évalué en mesurant les forces d'interaction entre la cellule et son substrat (changements morphologiques, migration cellulaire) ou les forces de traction cellulaire (microscopie de force de traction, micropatterning...). A l'échelle d'une population cellulaire, cela implique l'analyse des événements d'attachement pour un groupe de cellules au moyen d'un test de lavage, de techniques de microfluidique ou d'une méthode de fréquence de résonance.

Les études sur le détachement de cellules déjà adhérentes requièrent l'application d'une charge sur les cellules. La force appliquée qui produit le détachement des cellules est quantifiée comme la force d'adhérence cellulaire. Pour l'approche par cellule unique, la force d'adhérence correspond à la valeur mesurée en utilisant des techniques de cytodétachement, d'aspiration par micropipette ou de spectroscopie de force par cellule unique. Dans le cas d'une population cellulaire, les méthodes de mesure de l'adhérence peuvent se baser sur des techniques de centrifugation, de disque rotatif, de chambre à flux ou de microfluidique.

L'imagerie à fluorescence est également un moyen d'évaluer l'adhérence d'une cellule à une surface. Xu et al., ont par exemple imagé l'adhérence de fibroblastes gingivaux humains sur des nanotubes en titane anodisés électro chimiquement avec une observation au microscope à fluorescence [251]. Ces chercheurs ont également réalisé une qRT-PCR de l'intégrine $\beta 1$, la fibronectine, la vinculine puis du collagène de type I qui jouent un rôle important dans la cohésion cellulaire. Klos et al., ont évalué l'adhérence de CSM sur Ti6Al4V en localisant et en évaluant les contacts focaux [70]. Cependant ces approches ne permettent qu'une analyse qualitative et non quantitative de l'adhérence des cellules ; de plus cela n'est pas représentatif de la qualité et de la force d'adhérence d'un tapis cellulaire, incluant la présence de MEC.

Boyd et al., ont utilisé la technique de spallation laser pour quantifier la force d'adhérence d'une monocouche cellulaire (ostéoblastes) sur la surface d'un implant dentaire [252]. Des ondes de contraintes à courte durée et à haute amplitude sont générées par une absorption d'impulsion laser provoquant le détachement de toutes structures présentes à la surface du biomatériau, ce qui permet de quantifier l'adhérence cellulaire mais requiert une surface particulière et n'est donc pas adaptable à tous les modèles.

Des tests de détachement mécanique ou chimique peuvent aussi être réalisés. Ikeda et al., ont traité à la lumière ultraviolette (UV) des disques de titane, qui ont été mis en contact de tissus kératinisés, avant d'évaluer leur adhérence par contraintes mécaniques [253].

Néanmoins, cette technique réalisée sur des tissus *ex vivo* est difficilement transposable à un tapis cellulaire cultivé *in vitro*.

L'AFM permet de quantifier l'adhérence cellulaire à des matériaux ou à d'autres tissus dans des conditions physiologiques. C'est un instrument puissant mais qui ne permet cependant que des approches cellule par cellule ; il mesure surtout les propriétés mécaniques des cellules et peu celles du tissu [254,255].

Concernant les implants dentaires actuels, la bio intégration osseuse n'est pas un problème ; il est cependant plus compliqué de maintenir dans le temps l'adhérence entre le tissu mou et le col implantaire, notamment face aux pathologies inflammatoires. Une évaluation de l'adhérence cellulaire par quantification du détachement cellulaire serait donc plus réaliste. L'adhérence initiale, l'alignement, la migration ou encore la différenciation cellulaire ne permettent pas de juger de la qualité de l'interface tissu-implant à long terme.

En résumé, la topographie micro et nanométrique des substrats agit directement sur l'orientation, la morphologie et l'organisation du cytosquelette cellulaire. Les mécanismes de base utilisés par la cellule pour détecter et répondre à la topographie, nécessite des investigations plus fondamentales et normalisées. Les cellules peuvent réagir de manière similaire à des surface de topographie identique, bien qu'elles soient chimiquement différentes ; cependant, il est plus judicieux d'évaluer l'effet topographique sur des surfaces de chimie identique, pour éviter des changements dans l'adsorption des protéines, qui compliqueraient l'interprétation des résultats [256]. Les effets de la topographie du substrat sur la prolifération et la différenciation des cellules sont difficiles à établir, car les études sont peu nombreuses et leurs résultats parfois contradictoires. Des publications récentes suggèrent que l'impact de la topographie de surface sur le comportement cellulaire n'est pas seulement une conséquence de la quantité de protéines adsorbées, mais également une réponse aux forces mécaniques appliquées par les nanotexturations sur la membrane cellulaire basale, qui pourraient entraîner une réorganisation des composants cellulaires, ou encore ouvrir des canaux ioniques, modifiant ainsi le comportement cellulaire [184]. Les méthodes actuelles d'évaluation de l'adhérence cellule-surface permettent une compréhension des mécanismes ou une évaluation de la qualité de l'adhérence à l'échelle d'une cellule unique ; cependant il y a un manque de techniques permettant d'évaluer quantitativement l'adhérence du tapis matriciel, ce qui est nécessaire dans des modèles *in vitro* d'implantologie.

Plan de travail

En prenant en compte le contexte de ce projet, ainsi que les éléments mis en évidence dans l'état de l'art, un plan expérimental a pu être défini. Les expérimentations ont donc été menées sur des échantillons de Ti6Al4V, et les modifications de topographie de ces surfaces ont été réalisées par irradiation au fs-L. Un contrôle rigoureux des paramètres du fs-L a permis de générer différentes LIPSS ; ces paramètres ainsi que la caractérisation des structures obtenues seront décrits dans les sections matériels et méthodes respectives à chaque étude.

L'impact des LIPSS formées, sur la mouillabilité du Ti6Al4V, ainsi que l'évolution de ce paramètre au fil du temps et des traitements de stérilisation, fera l'objet des premiers résultats de ce manuscrit (partie III.A).

Au regard du contexte de péri-implantite, la bactérie *P. gingivalis* a été sélectionnée, pour mettre en évidence des paramètres topographiques cruciaux dans l'adhérence de bactéries parodontopathogènes sur une surface de Ti6Al4V. Ces corrélations seront présentées dans une seconde étude (partie III.B).

Pour évaluer la capacité d'adhérence du tissu gingival sur des LIPSS de périodes différentes, l'étude suivante a pour modèle cellulaire des HGnF. Afin d'évaluer l'adhérence de cultures cellulaires ayant établi une interface avec les biomatériaux, des méthodes novatrices ont été mises au point en adaptant deux outils existant : le scléromètre et le bain à US. L'adhérence de deux bactéries parodontopathogènes (*S. mutans* et *P. gingivalis*) a également été évaluée sur ces mêmes LIPSS (partie III.C).

Enfin, une étude préliminaire présentera la validation des surfaces multifonctionnelles dotées de LIPSS, dans un modèle se rapprochant d'une situation clinique de péri-implantite. L'adhérence de cultures de HGnF a été évaluée, dans des conditions mimant l'activation du système immunitaire (TNF- α) et l'infection bactérienne (LPS de *P. gingivalis*) (partie III.D).

III

Résultats

Ce chapitre sera présenté sous forme d'articles publiés (parties A.1 ; B et C), introduits et synthétisés en français en amont, et résumés graphiquement par la suite. Ces articles seront complétés par des résultats non publiés au moment de la rédaction de ce manuscrit (parties A.2 ; D et E).

A. Evolution de la mouillabilité d'une surface de Ti6Al4V après usinage laser, stérilisation et vieillissement

1. Impact de la texturation fs-L et de la stérilisation par autoclave sur la mouillabilité du Ti6Al4V

D. Pallarés-Aldeiturriaga, **S. Papa**, A. Abou Khalil, A. Pascale-Hamri, M. Maalouf, Y. Di Maio, A. Guignandon, V. Dumas, X. Sedao, Influence of multi-wavelength ultrafast laser texturing and autoclave sterilization on titanium alloy-based surface wettability (2022).

L'utilisation du titane et de ses alliages est commune dans le domaine des biomatériaux. Dans le domaine de l'implantologie orale, le Ti6Al4V est très présent car il offre une forte biocompatibilité osseuse, avec une résistance suffisante aux contraintes mécaniques impliquées notamment lors de la mastication. D'autre part, le processus d'irradiation par fs-L est couramment sollicité pour la fonctionnalisation de surfaces et son application à un marché comme celui de l'implant dentaire est industriellement prometteuse. Parmi les nombreux paramètres reliés au faisceau laser, la longueur d'onde est essentielle car elle dépend de la source d'émission initiale et influe considérablement sur la topographie générée. Dans cette étude, des LIPSS ont été générées à trois longueurs d'onde différentes : 1030 nm (IR LIPSS) ; 515 nm (Green ou GR LIPSS) et 257 nm (UV LIPSS). Une caractérisation topographique des LIPSS par AFM a mis en évidence une diminution de leur périodicité (760 nm / 400 nm / 180 nm respectivement pour les LIPSS IR / GR / UV) en corrélation avec la diminution de la longueur d'onde. Il en va de même pour les profondeurs moyennes des saillies générées qui sont approximativement de 300 nm (IR LIPSS), 200 nm (GR LIPSS) et 100 nm (UV LIPSS). La mouillabilité des différentes surfaces a par la suite été évaluée en mesurant les angles de contact lors de l'application de la méthode de la goutte sessile. Ces mesures de mouillabilité ont été réalisées avant et après le processus de stérilisation par autoclave, similaire à celui utilisé avant une chirurgie implantaire. Cela a permis d'attester d'une part, de l'impact de la l'irradiation au fs-L sur la mouillabilité du Ti6Al4V, en fonction des LIPSS générées ; et d'autre part, de l'évolution de cette même mouillabilité à la suite du processus de stérilisation par autoclave. Les échantillons de Ti6Al4V contrôles sont considérés hydrophiles de base (angles de contact < 90°) mais l'irradiation augmente fortement cette propriété avec une diminution

de plus de 60° des angles de contacts mesurés. Après stérilisation par autoclave des échantillons de Ti6Al4V, une stabilité des angles de contact est observée pour les échantillons polis ; une augmentation de 30° des angles de contacts est observée sur les IR LIPSS ; une augmentation d'environ 3° des angles de contacts est observées sur les GR LIPSS et UV LIPSS. La génération de LIPSS par fs-L sur une surface de Ti6Al4V augmente donc fortement son caractère hydrophile. Parmi les textures générées, le caractère hydrophile des LIPSS GR et UV est le plus stable face au processus de stérilisation par autoclave.



Influence of multi-wavelength ultrafast laser texturing and autoclave sterilization on titanium alloy-based surface wettability

David Pallarés-Aldeiturriaga¹ · Steve Papa² · Alain Abou Khalil¹ · Alina Pascale-Hamri³ · Mathieu Maalouf² · Yoan Di Maio³ · Alain Guignandon² · Virginie Dumas⁴ · Xxx Sedao^{1,3}

Received: 2 June 2022 / Accepted: 24 August 2022 / Published online: 17 September 2022
 © The Author(s) 2022

Abstract

Titanium alloys are widely used in bio-medical applications for their excellent bio-compatibility and superior mechanical strength. On the other hand, femtosecond laser processing is a robust versatile and industrial method widely used for surface functionalization. In this work, laser-induced periodic surface structures (LIPSS) on titanium alloy (Ti6Al4V) using different laser wavelengths of 1030 nm (IR), 515 nm (Green) and 257 nm (UV) were created and their surface wettability (physical parameter correlated with cell adhesion) was studied, in relation to sterilization process. The contact angle over LIPSS was smaller than over polished samples, with Green and UV LIPSS presenting contact angles inferior to 20° and a superior stability to sterilization process.

Keywords Ultrafast laser · Laser wavelength · Laser-induced periodic surface structures · Surface wetting · Sterilization · Bio-compatibility

1 Introduction

Femtosecond laser processing is a robust and industrial method widely used for surface functionalization allowing to enhance some properties of the materials [1–4]. Titanium and its alloys on the other hand are of great interest for processing. They exhibit excellent bio-compatibility and superior mechanical strength. Among the alloys, Ti6Al4V is of special interest as it is currently used for biological/ biomedical applications, such as dental implants. This makes of high interest the laser texturing of such alloy; particularly, for aforementioned implants, where gingival fibroblasts

adhesion is essential not only for implant support but also for its role as a physical barrier against bacterial infiltration, main reason of dental implant failure [5]. The inscription of laser-induced periodic structures (LIPSS) on metals increases surface functionalization [3, 6–9] which can enhance osseointegration of these titanium dental implants [10–13]. This is achieved thanks to the sensitivity of biological cells to nanoscale texturing, which makes them sensitive to LIPSS, as shown in the literature [4, 14]. There are other techniques, such as sandblasting or chemical treatment; however, they are not precisely controllable and require more complex and longer steps than in laser processing.

Wettability on the other hand is crucial to the cell adhesion properties, as cells are mostly known to prefer hydrophilic surfaces for a higher adhesion [15, 16]. In this work, the effect of ultrafast laser texturing and sterilization by autoclave over titanium based surface wettability is studied. Three different wavelengths of 1030, 515 and 257 nm were employed for LIPSS formation on Ti6Al4V surfaces, generating LIPSS periodicities of 760, 400 and 180 nm, respectively. Then, wettability tests were performed prior and post wet sterilization of the samples.

✉ David Pallarés-Aldeiturriaga
 david.pallares.aldeiturriaga@univ-st-etienne.fr

¹ Hubert-Curien Laboratory, University of Lyon, Jean-Monnet University, UMR 5516 CNRS, 42000 Saint-Etienne, France

² Sainbiose Laboratory INSERM U1509, University of Lyon, Jean Monnet University, 42270 Saint Priest en Jarez, France

³ GIE Manutech-USD, 20 rue Benoît Lauras, 42000 Saint-Etienne, France

⁴ University of Lyon, Ecole Centrale de Lyon, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Saint Etienne, Laboratory of Tribology and Systems Dynamics, UMR 5513 CNRS, 42100 Saint-Etienne, France

2 Setup

To inscribe LIPSS patterns with different periodicity, a classic processing setup composed of a femtosecond laser and a galvometric scanner was employed. A schematic of the setup is depicted in Fig. 1. The employed laser source for LIPSS at laser wavelength $\lambda = 1030$ nm was a “Tangor HP” from Amplitude lasers with $\tau = 400$ fs. The 515 nm wavelength was obtained with the same laser and a nonlinear crystal to produce second harmonic generation. Finally, for 257 nm wavelength, a PHAROS and an HIRO Harmonic generation from light conversion were employed. The pulse duration was $\tau = 150$ fs. A $f - \theta$ lens was attached to the galvo scanner (intelliScan 14 from Scanlab for 1030 and 515 nm, and Thorlabs Dual-Axis Scanning Galvo Systems for 257 nm) to get homogeneous focal distance. The scan direction is also depicted in Fig. 1, where pulses were delivered with a separation Λ_x and a hatching distance Λ_y . The entire sample surface (10×10 mm) was texturized in this way. To achieve high quality and homogeneous LIPSS, a parametric optimization was performed. Table 1 summarizes the optimal parameters obtained that were employed for LIPSS inscription at each different wavelength. Within the scope of the current study, laser process parameters far apart from the ones listed above were observed to produce LIPSS with undesired effects or incomplete coverage.

Titanium alloy (Ti6Al4V) samples were purchased from Goodfellow. For surface roughness evaluation, both confocal microscope (Stil, from Altimet) and Atomic Force Microscope (AFM, from Bruker) were used, for large (10×10 mm) and localized (0.1×0.1 mm) surface topography

measurements. The initial arithmetical mean height (S_a , the value of which varies in dependence of the surface area being considered) measured with the confocal microscope was $0.052 \mu\text{m}$ on the large surface area, and was 8.8 nm with AFM on the smaller and localized area.

One month after samples texturing, they were cleaned with an ultrasonic bath before wettability measurements were conducted. Wettability measurements were carried out with a laboratory-developed system within the MANUTECH-USD consortium. They were performed in a controlled atmosphere (temperature (T) = 22.95 ± 0.45 °C, relative humidity (RH) = $40 \pm 8\%$). A $3 \mu\text{L}$ droplet of demineralized water was deposited on the surface, and the evolution of the droplet shape was visualized with a camera and a sample rotation stage enabling 360° inspection and contact angle measurements. The platform moved at a speed of 0.1 rad s^{-1} . The droplet profile and especially the contact angle (CA) were extracted from the complete droplet 360° rotation leading to approximately 80 measurements per droplet. The first CA measurements were carried out 1 month after laser processing and after an ultrasonic bath cleaning (demineralized water for 15 min). The second step of CA measurements was performed on the same samples, 24 h after a sterilization procedure in which the samples received an ultrasonic bath cleaning (demineralized water for 15 min), and an autoclave treatment at 134 °C for 19 min in specific bags, in accordance with dental implant industrial standards. The data represent the measurements from 4 consecutive, individuals and contact-less droplets on each surface.

Scanning electron microscopy (SEM) was used to visualize and characterize the different laser-induced patterns. A Tescan VEGA3 SB, Brno Czech Republic electron

Fig. 1 Inscription setup and the scanning direction employed for texturization

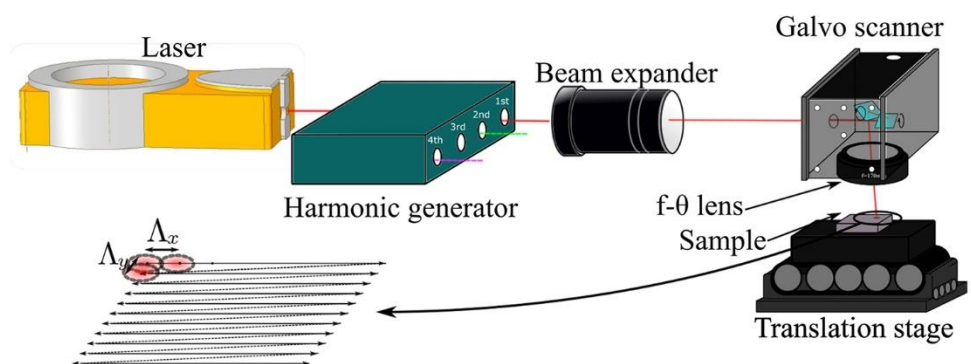


Table 1 Optimized parameters for each wavelength

λ	F (J/cm^2)	PRR (kHz)	Λ_x (μm)	Λ_y (μm)	f (mm)	$2\omega_0$ (μm)
1030 nm	0.47	50	4	4	170	33
515 nm	0.45	50	4	4	88	28
257 nm	0.07	50	0.2	5	100	25

microscope was used operating at 20 kV and using the secondary electron detector.

3 Results and discussion

SEM micrographs of both control (polished) and laser processed (LIPSS) surfaces are shown in Fig. 2. An almost featureless morphology is observed from the polished sample surface. Traces of low contrast scratches are present due to the supplier polishing process. On the other hand, the LIPSS-covered surfaces show marked contrast due to the presence of surface topography variation of the periodic surface nanostructures. Since the scale is identical for all the 4 SEM micrographs in Fig. 2, the difference in periodicity of the LIPSS linked to the wavelength of the laser used is clearly observable: more precisely, the periodicity is 760 nm when the laser wavelength is 1030, 400 nm when the laser wavelength is 515, and 180 nm for a laser wavelength of 257 nm. For the sake of simplicity, the laser wavelengths shall be referred to as IR (1030 nm), Green (515 nm) or GR, and UV (257 nm) in the following text.

All laser-treated surfaces are relatively smooth (measured using the confocal microscope, the surface roughness Sa being 0.082, 0.058 and 0.158 μm for IR, Green and UV, respectively). The slightly raised value of Sa for the surface

with UV LIPSS is attributed to the presence of a micro-scale undulation on the surface, which is presumably due to a large hatching distance Λ_y between successive laser scan tracks (that can be further optimized in the near future). To compare the polished, IR LIPSS and GR LIPSS surfaces (the Sa values of these surfaces are of tiny difference, revealed by confocal measurements) in further details, smaller areas of these surfaces are measured using an AFM. The 2D surface profiles obtained from AFM assessment are also presented in Fig. 2. One can see from these AFM measurements that surface Sa values derived from smaller areas (0.1 \times 0.1 mm) are slightly different from those of the larger surface area measurement (10 \times 10 mm) made by confocal microscope. It is also meaningful to mention that the amplitude of the LIPSS varies, depending on the laser wavelength (approximately 300 nm for IR LIPSS, 200 nm for GR LIPSS, and 100 nm for polished surface).

Once wettability evaluation protocol was performed, polished sample showed a high contact angle, as depicted in Fig. 3, resistant to sterilization process. It almost qualifies the polished Ti6Al4V as a hydrophobic (CA close to 90°) surface [17]. On the other hand, laser processing substantially reduces this angle by more than 60° presenting CAs inferior to 20°, especially with the lowest periodicity LIPSS (UV) showing the high hydrophilicity acquired by the surface due to femtosecond laser texturing process. There is

Fig. 2 SEM images and AFM surface profile of polished Ti6Al4V surface (left) and LIPSS induced at different wavelengths (right). Their ripple periodicity Λ and arithmetical mean height (Sa) measured by confocal microscope and AFM are shown above and below the images respectively

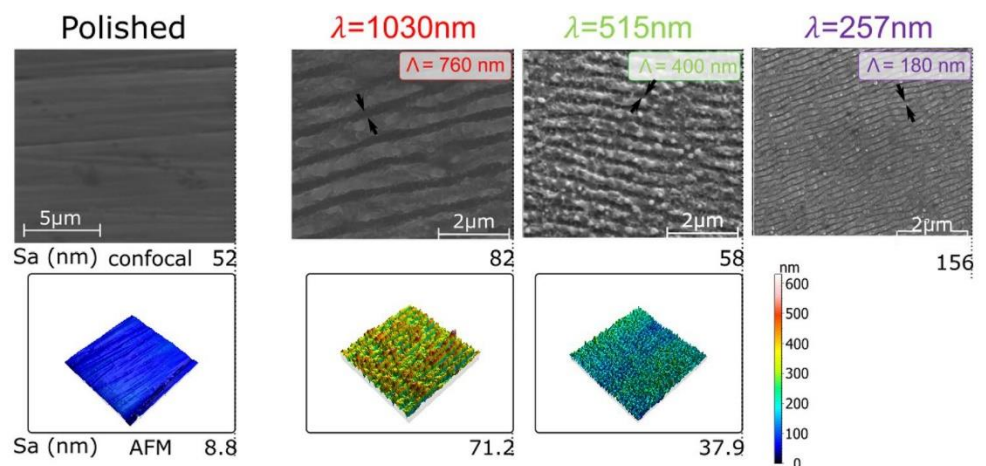
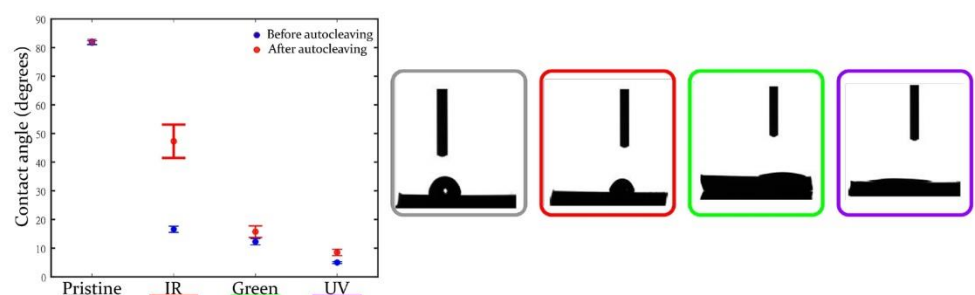


Fig. 3 Contact angle for polished and different LIPSS textured surfaces before and after sterilization process (left). Droplet images of Ti6Al4V surfaces after autoclave process (right)



a seeming tendency that lower CA values are achieved at LIPSS surface produced at shorter wavelength.

After sterilization process, CA of IR LIPSS was drastically increased by 30° reducing the wettability of the surface. By comparison, after same sterilization process, Green and UV LIPSS CAs were only increased by ≈ 3° each, showing the wetting stability of those two surfaces. It is worthwhile to mention that the water droplets do not appear to elongate along the LIPSS directions in all cases. Given the small periodicity and peak-to-valley amplitude of the LIPSS (compared to the mm-scale dimension of the droplets), the drops measured do not spread anisotropically.

In the current study, aside from the apparent surface morphology change induced by ultrafast laser irradiation at various laser configurations, the surface chemistry is also expected to be modified at the very same time, probably in different manners depending on laser conditions applied [18]. Superficial oxidation, thin amorphous layer formation Ti_xO_y , and microstructural defects formation in the underlying area are expected to occur [19, 20]. The formation and distribution of such phases are probably quite variable, depending on the wavelength deployed to form the LIPSS. Apart from surface microstructure modification itself, the surface reactivity after femtosecond laser irradiation may also play a role in the wettability modification process. Especially, the surfaces irradiated by ultrafast laser pulses at different wavelengths may have different affinity to surface adsorption of polar, non-polar C–O bonds containing species in the air, and hence great potential of behaving differently in surface wettability [21]. Dedicated surface chemistry analysis has not been pursued to de-correlate possible interplay between surface morphology change, surface chemistry change and resulting surface wettability, but this is definitely one of the key elements to investigate in the near future.

Despite the correlation between wettability and cell adhesion, biological experiments must be realised to confirm this behavior and to evaluate the impact of LIPSS periodicity on cell adhesion. As the most hydrophilic surfaces (Green and UV LIPSS) are not necessarily the best in terms of cell adhesion, an intermediate in terms of CA (IR LIPSS) may be a better compromise [22].

4 Conclusions

Laser-induced periodic surface structures were generated with three different laser wavelengths, namely, 1030 nm (IR), 515 nm (Green) and 257 nm (UV), presenting periodicity variation ranging from 760 to 180 nm. Wettability studies before and after clinical sterilization showed an enhanced wettability of Ti6Al4V samples after laser processing, for all LIPSS periodicity tested. Post-sterilization wettability tests also showed a stability of those hydrophilic properties for

both Green and UV LIPSS which exhibited a minimal CA and negligible hysteresis for autoclave process. According to known preference of hydrophilic surfaces for cellular adhesion, ultrafast laser LIPSS texturing is of special interest for dental implant application.

Acknowledgements This project was co-funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme LaserImplant, under Grant Agreement Number: 951730; and a public Grant from the French National Research Agency (ANR) under the Investments for the Future Program (PIA): EUR MANUTECH SLEIGHT - ANR-17-EURE-0026.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. E. Skoulas, A. Manousaki, C. Fotakis, E. Stratakis, Biomimetic surface structuring using cylindrical vector femtosecond laser beams. *Sci. Rep.* (2017). <https://doi.org/10.1038/srep45114>
2. E.K. Koussi, H.J. Jung, N. Faure, C. Donnet, C. Mauclair, X. Sedao, Comparative study of ultraviolet and infrared femtosecond laser irradiation on textile polymers PET and PA66. *J. Laser Micro/Nanoeng.* (2020). <https://doi.org/10.2961/jlmn.2020.03.2015>
3. X. Sedao, M. Lenci, A. Rudenko, N. Faure, A. Pascale-Hamri, J.P. Colombier, C. Mauclair, Influence of pulse repetition rate on morphology and material removal rate of ultrafast laser ablated metallic surfaces. *Opt. Lasers Eng.* **116**, 68–74 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2018.12.009>
4. A. Klos, X. Sedao, T.E. Itina, C. Helfenstein-Didier, C. Donnet, S. Peyroche, L. Vico, A. Guignandon, V. Dumas, Ultrafast laser processing of nanostructured patterns for the control of cell adhesion and migration on titanium alloy. *Nanomaterials* **10**(5), 864 (2020). <https://doi.org/10.3390/nano10050864>
5. S. Ferraris, F.T. Giachet, M. Miola, E. Bertone, A. Varesano, C. Vineis, A. Cochis, R. Sorrentino, L. Rimondini, S. Spriano, Nanogrooves and keratin nanofibers on titanium surfaces aimed at driving gingival fibroblasts alignment and proliferation without increasing bacterial adhesion. *Mater. Sci. Eng. C* **76**, 1–12 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.152>
6. J. Eichstädt, G.R.B.E. Römer, A.J.H. in 'tVeld, Determination of irradiation parameters for laser-induced periodic surface structures. *Appl. Surf. Sci.* **264**, 79–87 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.09.120>

7. A. San-Blas, M. Martínez-Calderon, J. Buencuerpo, L.M. Sanchez-Brea, J. del Hoyo, M. Gómez-Aranzadi, A. Rodríguez, S.M. Olaizola, Femtosecond laser fabrication of LIPSS-based waveplates on metallic surfaces. *Appl. Surf. Sci.* **520**, 146328 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.146328>
8. M. Martínez-Calderon, A. Rodríguez, A. Dias-Ponte, M.C. Morant-Miñana, M. Gómez-Aranzadi, S.M. Olaizola, Femtosecond laser fabrication of highly hydrophobic stainless steel surface with hierarchical structures fabricated by combining ordered microstructures and LIPSS. *Appl. Surf. Sci.* **374**, 81–89 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.09.261>
9. J. Bonse, Quo vadis lipss?—recent and future trends on laser-induced periodic surface structures. *Nanomaterials* (2020). <https://doi.org/10.3390/nano10101950>
10. M. Maalouf, A. Abou Khalil, Y. Di Maio, S. Papa, X. Sedao, E. Dalix, S. Peyroche, A. Guignandon, V. Dumas, Polarization of femtosecond laser for titanium alloy nanopatterning influences osteoblastic differentiation. *Nanomaterials* (2022). <https://doi.org/10.3390/nano12101619>
11. M. Muck, B. Wolfsjäger, K. Seibert, C. Maier, S.A. Lone, A.W. Hassel, W. Baumgartner, J. Heitz, Femtosecond laser-processing of pre-anodized Ti-based bone implants for cell-repellent functionalization. *Nanomaterials* (2021). <https://doi.org/10.3390/nano11051342>
12. E. Filipov, L. Angelova, D. Aceti, V. Marinova, D. Karashanova, A. Trifonov, I. Buchvarov, A. Daskalova, Altering the surface morphology and wettability of chitosan/graphene coatings by femtosecond and nanosecond laser processing. *J. Phys. Conf. Ser.* **2240**(1), 012041 (2022). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2240/1/012041>
13. A. Cunha, A.P. Serro, V. Oliveira, A. Almeida, R. Vilar, M.-C. Durrieu, Wetting behaviour of femtosecond laser textured Ti-6Al-4V surfaces. *Appl. Surf. Sci.* **265**, 688–696 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.11.085>
14. R.Y. Siddiquie, A. Gaddam, A. Agrawal, S.S. Dimov, S.S. Joshi, Anti-biofouling properties of femtosecond laser-induced submicron topographies on elastomeric surfaces. *Langmuir* **36**(19), 5349–5358 (2020). <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00753>
15. W. Song, J.F. Mano, Interactions between cells or proteins and surfaces exhibiting extreme wettabilities. *Soft Matter* **9**(11), 2985 (2013). <https://doi.org/10.1039/c3sm27739a>
16. L. Elena Sima, A. Bonciu, M. Baciú, I. Anghel, L.N. Dumitrescu, L. Rusen, V. Dinca, Bioinstructive micro-nanotextured zirconia ceramic interfaces for guiding and stimulating an osteogenic response in vitro. *Nanomaterials* (2020). <https://doi.org/10.3390/nano10122465>
17. K.-Y. Law, Definitions for hydrophilicity, hydrophobicity, and superhydrophobicity: getting the basics right. *J. Phys. Chem. Lett.* **5**(4), 686–688 (2014). <https://doi.org/10.1021/jz402762h>
18. J. Bonse, S. Gräf, Ten open questions about laser-induced periodic surface structures. *Nanomaterials* (2021). <https://doi.org/10.3390/nano11123326>
19. S.V. Kirner, T. Wirth, H. Sturm, J. Krüger, J. Bonse, Nanometer-resolved chemical analyses of femtosecond laser-induced periodic surface structures on titanium. *J. Appl. Phys.* **122**(10), 104901 (2017). <https://doi.org/10.1063/1.4993128>
20. X. Sedao, C. Maurice, F. Garrelie, J.-P. Colombier, S. Reynaud, R. Quey, G. Blanc, F. Pigeon, Electron backscatter diffraction characterization of laser-induced periodic surface structures on nickel surface. *Appl. Surf. Sci.* **302**, 114–117 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.10.152>. E-MRS 2013 Symposium V: “Laser Material Interactions for Micro- and Nano-Applications” 27–31 May 2013, Strasbourg (France)
21. A.-M. Kietzig, S.G. Hatzikiriakos, P. Englezos, Patterned superhydrophobic metallic surfaces. *Langmuir* **25**(8), 4821–4827 (2009). <https://doi.org/10.1021/la8037582>
22. D.P. Dowling, I.S. Miller, M. Ardhaoui, W.M. Gallagher, Effect of surface wettability and topography on the adhesion of osteosarcoma cells on plasma-modified polystyrene. *J. Biomater. Appl.* **26**(3), 327–347 (2010). <https://doi.org/10.1177/0885328210372148>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

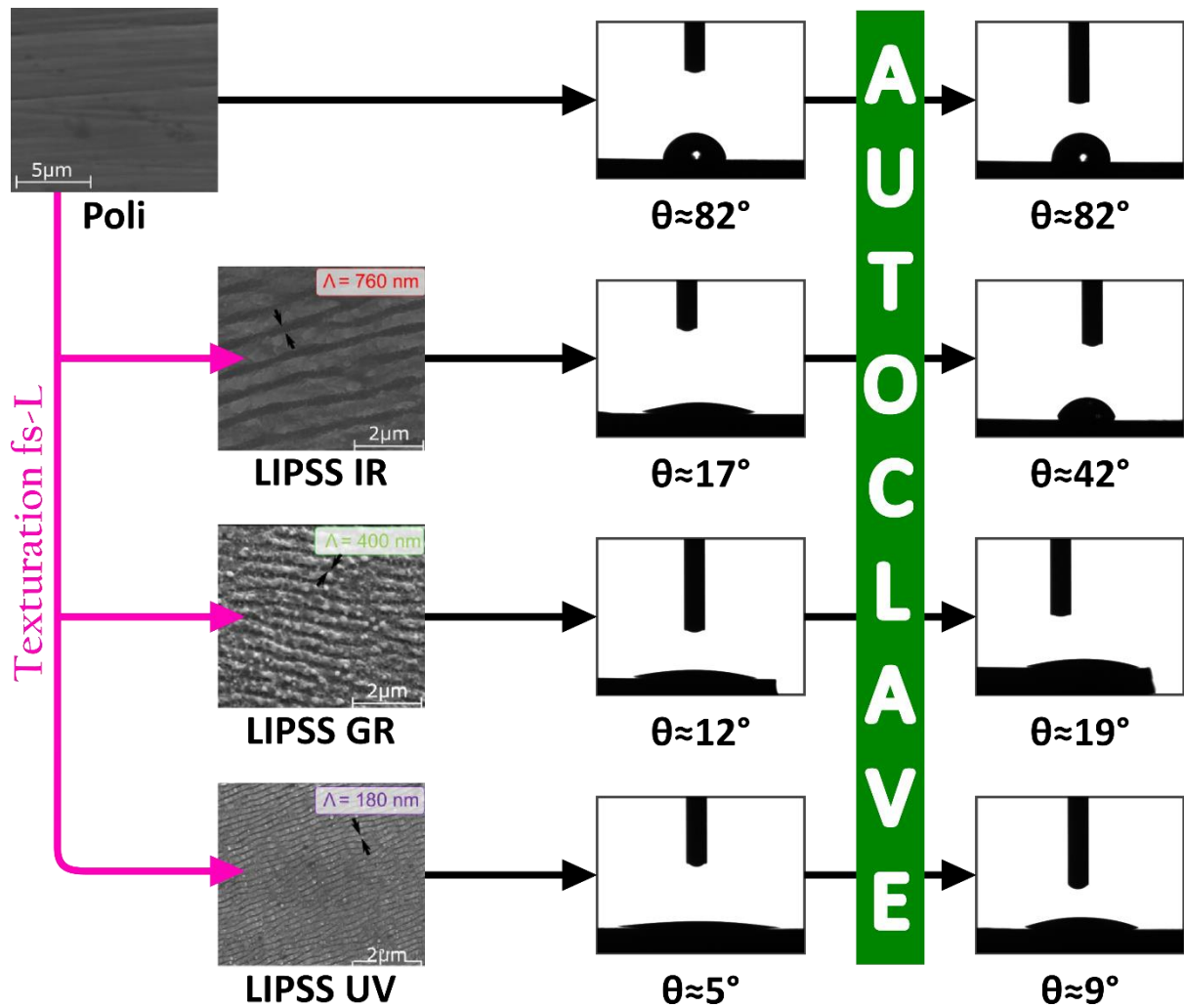


Figure 16 – Résumé graphique : Evaluation par méthode de la goutte sessile de la mouillabilité de surface de Ti6Al4V poli ou texturées par LIPSS IR, GR ou UV, avant et après stérilisation par autoclave. La texturation fs-L augmente l'hydrophilie en réduisant les angles de contact. Parmi les surfaces texturées les LIPSS GR et UV présentent l'hydrophilie avec la plus grande stabilité face à la stérilisation par autoclave.

2. Evolution de la mouillabilité du Ti6Al4V

En complément de l'étude précédente, une évaluation à long terme de l'évolution de la mouillabilité du Ti6Al4V irradié ou non par fs-L a été menée par le GIE Manutech USD, avec la participation du laboratoire SAINBIOSE notamment pour la stérilisation des échantillons. Une partie de cette étude est présentée ici.

a. Matériels et méthodes

Les échantillons de Ti6Al4V ont été texturés à l'aide d'un fs-L (Amplitude Systems) et d'un scanner galvo (Scanlab) au sein de la plateforme du GIE Manutech-USD (Saint-Etienne, France). La source laser utilisée est un Tangerine fs-L, fonctionnant à une longueur d'onde centrale de 1030 nm, avec une durée d'impulsion d'environ 400 fs et un état de polarisation linéaire. Tous les échantillons ont été placés sur des plateaux de translation XYZ d'Aerotech afin de trouver le meilleur plan de focalisation. Les scanners intelliSCAN 14 de Scanlab GmbH ont finalement été associés à une lentille f-theta de 56 mm (diamètre de faisceau $1/e^2$ de 11 μm). Une s-waveplate a été mise en place dans le trajet du faisceau du laser pour créer un faisceau en forme de donut, qui a converti la polarisation linéaire entrante en polarisation azimutale. Une énergie d'impulsion laser E de 0,7 μJ a été appliquée. Les positions d'impacts ont été définies de manière à conserver l'effet isotrope fourni par les nanostructures générées.

Les protocoles de stérilisation par autoclave et d'évaluation de la mouillabilité par méthode de la goutte sessile sont ceux décrits dans l'article présenté dans la partie III.A.1 de ce manuscrit [257].

N.B. Les LIPSS étudiées dans cette étude sont obtenues par un faisceau de polarisation azimutale, conduisant à la génération de LIPSS orientées de manière radiale ; elles diffèrent donc de celles présentées dans l'étude précédente.

b. Résultats et discussion

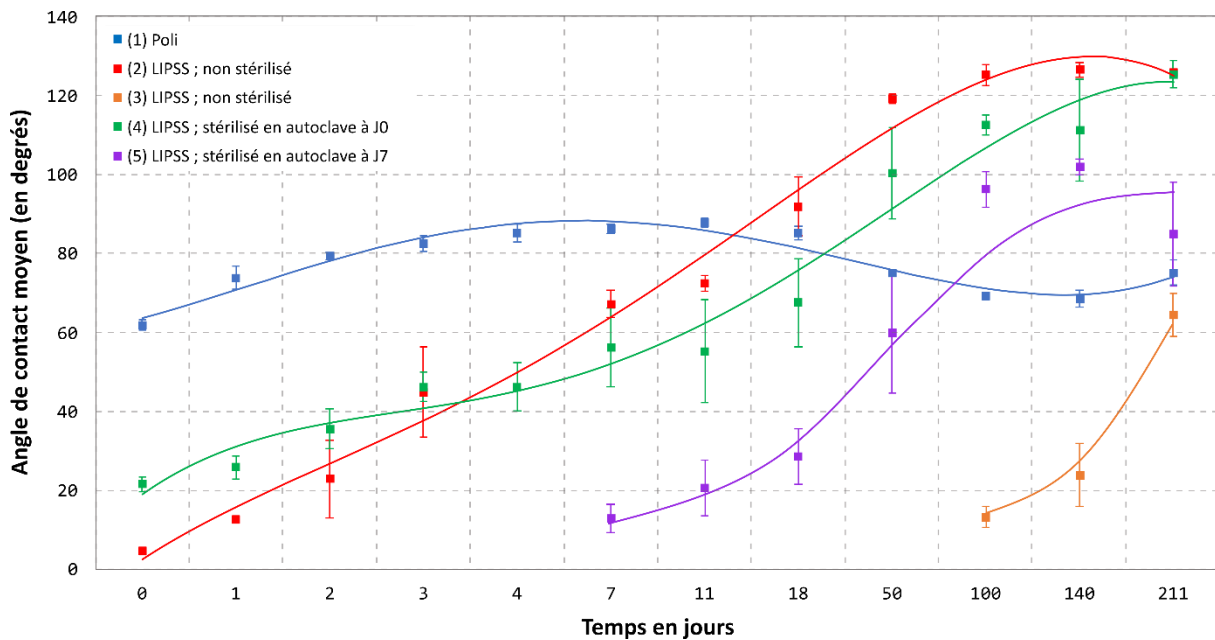


Figure 17 – Evaluation de l'évolution de la mouillabilité par méthode de la goutte sessile sur Ti6Al4V poli (1 ; bleu), texturé par LIPSS sans stérilisation (2 et 3 ; rouge et orange) ou après stérilisation par autoclave à J0 (4 ; vert) ou J7 (5 ; violet). Chaque mesure représente l'angle de contact moyen et les barres d'erreur les minimum et maximum ; $n = 3$ gouttes / échantillon et 1 échantillon / condition. (GIE Manutech USD)

L'évaluation de la mouillabilité a été réalisée à plusieurs temps par mesure des angles de contact, sur une période de 221 jours. Initialement, la surface de Ti6Al4V (1) est considérée comme hydrophile (angle $\theta < 90^\circ$) ; malgré quelques évolutions, cette surface reste hydrophile jusqu'à la dernière mesure (angle $\theta = 75 \pm 15^\circ$). Cette hydrophilie est fortement augmentée par la génération de LIPSS radiaux (2) (angle $\theta = 5^\circ$). La stérilisation par autoclave des LIPSS (3) entraîne une légère augmentation des angles de contact, mais l'hydrophilie de l'échantillon reste très élevée (angle $\theta \approx 22^\circ$). Indépendamment de la stérilisation, ces deux échantillons ([2] et [3]), suivent une tendance similaire : les angles de contact augmentent progressivement jusqu'à atteindre un stade hydrophobe à J221 (angle $\theta = 126^\circ$). L'échantillon (4) est également texturé avec des LIPSS radiaux à J0, mais n'est stérilisé par autoclave qu'à J7, et sa mouillabilité est évaluée à partir de ce même temps. Initialement (à J7) il présente une forte hydrophilie (angle $\theta = 13^\circ$) et tend progressivement vers une hydrophobie (à J221 ; angle $\theta = 85^\circ$). L'échantillon (5) est identique à l'échantillon (2) (LIPSS radiaux ; pas de stérilisation par autoclave), en revanche il est conservé pendant 100 jours avant de débiter les tests de mouillabilité. Initialement (à J100) il est très hydrophile (angle $\theta = 13^\circ$) et présente progressivement une augmentation des angles de contact jusqu'à J221 (angle $\theta = 65^\circ$).

Cette étude démontre dans un premier temps la stabilité de la mouillabilité d'une surface de Ti6Al4V. De plus, la texturation fs-L ($\lambda = 1030$ nm) peut augmenter l'hydrophilie d'une surface

de Ti6Al4V, comme cela a été montré précédemment [257], et cela de manière indépendante de l'orientation des LIPSS. En accord avec la littérature, une surface de LIPSS hydrophile (avec ou sans stérilisation par autoclave) tend à devenir progressivement hydrophobe [64,67]. Cependant, des LIPSS qui ne sont pas exposés à des tests de mouillabilité resteront hydrophile jusqu'au début des tests ; il semble que les tests de mouillabilité effectués viennent conditionner la surface pour les tests à venir. Cela pose des questions quant à la fiabilité de l'évolution de la mouillabilité des échantillons.

Il est peu probable que les tests de mouillage puissent modifier la topographie des échantillons de Ti6Al4V, étant donné que les tests sont réalisés avec de l'eau distillée. L'explication la plus cohérente serait donc une modification au niveau de la chimie de surface, et notamment des oxydes de titane, induite par la texturation fs-L [64,67]. Il est prévu que cet aspect chimique soit évalué dans la suite de l'étude.

Dans le cadre des études réalisées *in vitro* sur des LIPSS, les échantillons sont bien souvent placés dans un environnement liquide (milieu de culture, bouillon...) ce qui risque donc de modifier la mouillabilité de la surface mesurée initialement. Si ces observations sont ramenées à un contexte d'implant dentaire, cela pourrait signifier que la mouillabilité initiale de l'implant n'est pas révélatrice de sa mouillabilité à long terme, puisque dès la pose, la surface sera exposée à un environnement liquide (sang, salive, lymphe...), son caractère hydrophile/hydrophobe sera alors immédiatement conditionné. Cependant, nos travaux montrent que les surfaces texturées par fs-L sont stables en environnement sec, l'instabilité mise en évidence dans la littérature provient donc probablement d'un conditionnement de la surface induit par les tests initiaux de mouillabilité [64,70].

B. Caractérisation des paramètres topographiques d'une surface texturée par fs-L et corrélation à l'adhérence bactérienne

S. Papa, M. Maalouf, P. Claudel, X. Sedao, Y. Di Maio, H. Hamzeh-Cognasse, M. Thomas, A. Guignandon, V. Dumas, Key topographic parameters driving surface adhesion of *Porphyromonas gingivalis* (2023).

La péri-implantite résulte de l'adhérence de bactéries à la surface d'un implant dentaire, ce qui est fortement influencé par la topographie de surface aux échelles micro- et nanométrique. La texturation de surfaces par fs-L permet un contrôle précis de la topographie générée et requiert donc également une description minutieuse des caractéristiques de surface. A l'heure actuelle, la description des paramètres de rugosité de surface se limite souvent à des paramètres d'amplitude (Ra ou Sa), laissant de côté les informations spatiales pourtant essentielles. Cette étude vise donc à identifier des paramètres d'amplitude, spatiaux et hybrides, déterminant dans la description de la topographie d'une surface à visée antibactérienne. Dans un premier temps, un panel de LIPSS de topographies variables a été généré avec un fs-L de longueur d'onde 1030 nm. Pour varier les topographies, trois paramètres du fs-L ont été modifiés : la polarisation du laser (linéaire, radiale, azimutale), par utilisation d'une s-waveplate ; le nombre d'impacts laser réalisés par zone ; l'organisation spatiale des différentes zones d'impact laser.

Les différentes topographies ainsi générées (L LIPSS ; A1 à A5 LIPSS ; R1 à R5 LIPSS) ont ensuite été caractérisés selon divers paramètres de rugosité de surface, grâce à un microscope à variation de focalisation et une analyse par le logiciel Mountains Map®.

Afin d'évaluer l'adhérence bactérienne sur les différentes topographies de cette étude, la bactérie *P. gingivalis* a été sélectionnée pour son intérêt dans la péri-implantite. Après contact, une quantification des bactéries présentes sur chaque surface (par imagerie à fluorescence) a permis, par comparaison avec un contrôle local, d'évaluer l'impact des topographies sur l'adhérence de *P. gingivalis*. Des courbes de corrélation ont été établies entre l'adhérence de *P. gingivalis* et les différents paramètres de rugosité de surface mesurés précédemment. Seuls les paramètres S_{ku} , la profondeur moyenne des plis et la densité de plis ont montré une corrélation significative avec l'adhérence bactérienne. Le paramètre de rugosité Sa, couramment utilisé pour décrire la topographie d'une surface, n'a finalement présenté qu'une tendance de corrélation avec la quantité de bactérie adhérente, ce qui montre qu'il n'est pas suffisant pour décrire des surfaces à visée antibactérienne.



OPEN

Key topographic parameters driving surface adhesion of *Porphyromonas gingivalis*

Steve Papa^{1✉}, Mathieu Maalouf¹, Pierre Claudel², Xxx Sedao^{2,3}, Yoan Di Maio², Hind Hamzeh-Cognasse¹, Mireille Thomas¹, Alain Guignandon^{1,5} & Virginie Dumas^{4,5}

Dental implant failure is primarily due to peri-implantitis, a consequence of bacterial biofilm formation. Bacterial adhesion is strongly linked to micro-/nano-topographies of a surface; thus an assessment of surface texture parameters is essential to understand bacterial adhesion. In this study, mirror polished titanium samples (Ti6Al4V) were irradiated with a femtosecond laser (fs-L) at a wavelength of 1030 nm (infrared) with variable laser parameters (laser beam polarization, number, spacing and organization of the impacts). Images of 3-D topographies were obtained by focal variation microscopy and analyzed with MountainsMap software to measure surface parameters. From bacteria associated with peri-implantitis, we selected *Porphyromonas gingivalis* to evaluate its adhesion on Ti6Al4V surfaces in an in vitro study. Correlations between various surface parameters and *P. gingivalis* adhesion were investigated. We discovered that Sa value, a common measure of surface roughness, was not sufficient in describing the complexity of these fs-L treated surfaces and their bacterial interaction. We found that Sku, density and mean depths of the furrows, were the most accurate parameters for this purpose. These results provide important information that could help anticipate the bacterial adhesive properties of a surface based on its topographic parameters, thus the development of promising laser designed biofunctional implants.

Titanium-6aluminum-4vanadium (Ti6Al4V) is mainly used as a biomaterial for dental implant devices due to its excellent physicochemical properties and high biocompatibility with host tissues^{1,2}. Osseointegrated dental implants are safe with high survival rates at about 90% and minimal marginal bone resorption in the 10 years following implantation³. However, once exposed to the oral environment, implants are subject to mucositis, which is a reversible inflammatory condition that affects the soft tissues surrounding a dental implant. It typically occurs within a few weeks to months after the implant placement. During the initial phase, the body recognizes the dental implant as a foreign object, leading to a natural inflammatory response. If proper oral hygiene is not maintained, plaque and bacteria can accumulate around the implant, causing inflammation of the mucosal tissue surrounding it. At this stage, the condition is still reversible, and with prompt treatment and improved oral hygiene, the inflammation can be controlled and resolved. If left untreated, mucositis can progress to peri-implantitis, one of the most important unsolved biological complications in recent implantology^{4,5}. Peri-implantitis is a destructive inflammatory lesion that affects the surrounding soft and hard tissues with a loss of supporting bone³ and is responsible for up to 47% of failed oral implants⁶. Implants that can reduce bacterial adhesion would help to improve the outcomes of dental surgeries, especially considering an ever increasing risk of infection as bacteria gain resistance to antibiotics⁷. Currently, there is no strong evidence to suggest an effective implant surface treatment to develop efficient and reliable antibiofilm solutions and avoid infections such as peri-implantitis⁸.

Surface topographic characteristics of implants can significantly impact the attachment of oral bacteria, implying that surface nano- and microroughness are strongly and positively correlated with bacterial adhesion^{9–11}. In this regard, many innovative surfaces have been developed with the idea of reducing adhesion strength between bacterial strains and a substrate by tailoring surface nanostructures^{12–14}. It is crucial for future studies to follow a standardized approach when evaluating the topography-based antibacterial activity of different surfaces. This will allow for direct comparison of results between different research groups. To achieve this, the methods

¹INSERM, SAINBIOSE U1059, Mines Saint-Etienne, Université Jean Monnet Saint-Étienne, 42023 Saint-Étienne, France. ²GIE Manutech-USD, 20 Rue Benoît Lauras, 42000 Saint-Étienne, France. ³Laboratory Hubert Curien, UMR 5516 CNRS, Jean Monnet University, University of Lyon, 42000 Saint-Étienne, France. ⁴Ecole Centrale de Lyon, CNRS, ENTPE, LTDS, UMR5513, ENISE, Univ Lyon, 42023 Saint-Étienne, France. ⁵These authors jointly supervised this work: Alain Guignandon and Virginie Dumas. ✉email: steve.papa@univ-st-etienne.fr

used for surface physicochemical characterization and antibacterial assay should be consistent and well defined to ensure accurate and quantitative comparisons¹¹. Since bacterial cell walls typically have similar mechanical properties, understanding the underlying antibacterial mechanism based on surface topography can lead to the development of a universal measure of antibacterial efficacy based on surface topography. This measure could be applied to surfaces of various shapes and dimensions, from rigid to flexible structures. Developing a systematic theory that considers all influencing factors of the mechanism will enable the classification of surfaces according to their antibacterial efficiency. Therefore, the aim of the present study was to identify topographic parameters directly linked to bacterial adhesion and evaluate their degree of relevance for industrial texturing of biomaterials such as dental implants.

Among several surface treatments, ultrafast laser texturing has emerged as a powerful and versatile surface engineering process for dental implant applications, presenting higher biomineralization activity and stimulated osseointegration^{15–17}, while also inhibiting bacterial adhesion on implant surfaces^{18,19}. Surface features may significantly modify the properties of surfaces that either allow or limit bacterial adhesion^{20–22}. Femtosecond laser (fs-L) enables the development of different types of laser-induced nanostructures, such as laser-induced periodic surface structures (LIPSS) with linear, radial, or azimuthal organization^{23,24}. The fs-L is a very valuable innovative approach due to its simplicity, the lack of clean room facility requirements, and the ability to perform processing in airborne environments. Therefore, the fs-L texturing process is a good candidate for implementation in an industrial setting for dental implant treatment.

To assess surface topography, many studies use only the roughness parameter (Ra or Sa) to provide a surface description^{10,25–27}. However, the real surface geometry is more complicated and many other parameters could be used to provide a more accurate description²⁸. This paper investigates three groups of surface roughness parameters defined as amplitude, hybrid, and spacing parameters.

The oral microbiome is particularly complex and relies on polymicrobial synergies of multiple spatially constrained microbial communities that interact by providing attachment sites, crossfeeding and maintaining synergistic/antagonistic growth relationships²⁹. An alteration of this balance, related either to host or bacterial community factors, results in dysbiosis. The latter favors the emergence of periodontopathogens with virulence factors that affect other species and initiate inflammation. The resulting inflammation reinforces dysbiosis by exerting selective pressure on microbial communities and providing inflammophilic periodontopathogens with nutrients derived from altered tissue. In turn, dysbiosis fuels inflammation, creating a vicious cycle that promotes periodontal disease. In the context of peri-implantitis, the biofilm formation process plays a crucial role in the development of this inflammatory condition around dental implants. The beginning of biofilm formation is characterized by the adsorption of proteins and molecules from the oral environment onto the implant surface, forming an initial conditioning film, and providing a favorable environment for bacterial attachment. Subsequently, early colonizing bacteria, known as pioneer species, take advantage of this conditioning film to adhere and establish themselves on the implant surface. These pioneer bacteria play a significant role in shaping the biofilm community. Their presence and interactions with the implant surface create a foundation for further bacterial colonization and biofilm growth. The most effective periodontal pathogens, members of the red complex (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*), are widely responsible for implant failure^{30,31}. For its clinical interest within pathologies such as rheumatoid arthritis, we focused our study on *P. gingivalis*. When we consider the upper part of a dental implant, we can assume that perfectly flat medical titanium is offering a fair defense against infection. Surface engineering based approaches are considered as a highly competitive alternative to obtain comparable performance for delivering repellent factors more safely and efficiently. Nevertheless, surface characterization should be more precise since bacterial adhesion relies not only on Sa, which is mostly described in the literature as a determining parameter. Therefore, we have correlated *P. gingivalis* adhesion with amplitude (areal arithmetic mean height (Sa), maximal height of the pits (Sp), maximal height of the valleys (Sv), skewness values (Ssk), kurtosis value (Sku)), hybrid (root mean square of slopes (Sdq), developed interfacial area ratio (Sdr)) and spacing parameters (density of furrows, mean furrows depth) in an in vitro study.

Material and methods

Mirror polished titanium alloy samples of Ti6Al4V were purchased from Goodfellow (Huntingdon, UK). These Ti6Al4V samples were dimensioned in squares with a surface area measuring 1 cm², and a thickness of 1 mm by the supplier prior to shipment.

fs-L irradiation

Titanium alloy samples were textured at the GIE Manutech-USD platform (France). Two workstations composed of a 1030 nm fs-L from Amplitude Systems (France) coupled with a galvo scanner from Scanlab (Germany) and 3D-XYZ translation stages from Aerotech (Germany) were employed to produce linear LIPSS, azimuthal LIPSS, and radial LIPSS.

Linear LIPSS were generated on titanium surfaces using a Tangor HP fs-L linearly polarized with a pulse duration of 500 fs. The repetition rate was defined at 100 kHz and focused thanks to a 100-mm f-theta lens. A line with an interspot distance of 5 µm in X direction was obtained with a constant translation speed of 0.5 m/s, repeated in Y direction with the same distance of 5 µm resulting in a recovering rate of around 84% in both directions and an estimated local accumulation of 32 pulses.

The azimuthal and radial LIPSS were produced using a Satsuma HP fs-L linearly polarized with a pulse duration of 300 fs (pulse duration slightly shorter but not sufficiently relevant to disturb the LIPSS formation compared to the previous setup). The repetition rate was defined at 500 kHz and focused with a f-theta lens of 50 mm. Respectively, radial and azimuthal polarizations were used for azimuthal and radial LIPSS using a

dedicated s-wave plate from Workshop of Photonics (Lithuania). For these patterns, a pixel-by-pixel texturing strategy was chosen, where pixels were arranged in X and Y so as to generate different lattices of different sizes following two different patterns with square and hexagonal shapes. The detailed laser process parameters are summarized in Table 1.

For bacterial adhesion tests, laser textures were distributed in $4000 \times 100 \mu\text{m}$ bands alternating with $100 \mu\text{m}$ of untextured titanium for a local control.

Surface morphology

Scanning electron microscopy (SEM) was used to visualize and characterize the different laser induced patterns. A Tescan VEGA3 SB (Brno Czech Republic) electron microscope was used, operating at 15 kV and using the secondary electron detector.

Surface topography

Surface parameters were measured on images taken with an optical 3-D microcoordinate system by InfiniteFocusIF G4, ALICONA (Graz, Austria), which uses the focus variation microscopy technique. The measurements were made with a $1000\times$ magnification, 400-nm lateral resolution and 10-nm vertical resolution. Data topographies were analyzed with Mountains Map[®] 8.2 software to measure surface roughness parameters focusing on the following: Sa, Sp, Sv, Ssk, Sku, Sdq, Sdr, density of furrows, and mean furrows depth. Definitions of surface parameters are stated by ISO 25178 standards.

Bacterial strains and culture conditions

Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 strain was isolated on Brucella Blood Agar under anaerobic conditions using the Genbox system (Biomerieux); then cultured 4 d in Schaedler broth with mineral oil (Sigma M5904) at a ratio of 1:20 (mineral oil:medium) at 37°C . 1 mL of broth was incubated over titanium samples for 48 h at 37°C under anaerobic conditions.

Fluorescent bacteria labeling

After 48 h of incubation, medium was removed; bacteria were stained with calcein AM (Invitrogen; C3099) at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ for 20 min at 37°C ; then washed with PBS and fixed with 10% formalin (Sigma HT501128) for 40 min at room temperature; washed with PBS; and kept in PBS at 4°C until observation.

Image acquisition and analysis

Fluorescent microscopy (Zeiss LSM 800 Airyscan, Oberkochen, Germany) was used to image stained bacterial samples. Image analysis was performed with ImageJ by measuring mean fluorescence in 30 areas (7.53 mm^2) per condition and making a percent ratio with local polished control. Fixed bacteria were dehydrated in graded ethanol solutions (70, 80, 90 and 100%), air dried at room temperature and analyzed with SEM at 5 kV with a secondary electron detector.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8 software. Bacterial data are presented as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using *t*-test. Graphical representation of the different correlations shows Spearman's rank-order correlation and associated corrected *p*-value; correlation is considered as significant if corrected *p*-value < 0.05 .

LIPSS	Pulse energy (μJ)	Beam polarization	Impacts		Distance between pulses		F-theta (mm)
			Number per cavity	Alignment	Δx (μm)	Δy (μm)	
L	1.07	Linear	32	Straight	5	5	100
A1	0.78	Radial	25	Square	14	14	50
R1	0.78	Azimuthal	25	Square	14	14	50
A2	0.78	Radial	25	Square	13	13	50
R2	0.78	Azimuthal	25	Square	13	13	50
A3	0.78	Radial	25	Hexagonal	6	10	50
R3	0.78	Azimuthal	25	Hexagonal	6	10	50
A4	0.78	Radial	25	Hexagonal	8	13	50
R4	0.78	Azimuthal	25	Hexagonal	8	13	50
A5	0.78	Radial	5	Hexagonal	6	11	50
R5	0.78	Azimuthal	5	Hexagonal	6	11	50

Table 1. Laser parameters used to create linear, azimuthal and radial LIPSS.

Results

IR fs-L irradiation of Ti6Al4V creates highly ordered/periodic texturing called IR LIPSS, as presented on SEM images (Fig. 1). With LIPSS direction being perpendicular to the laser beam polarization, linear LIPSS (L LIPSS) were obtained with linear polarization, azimuthal LIPSS were obtained with radial polarization (A1 to A5 LIPSS), and radial LIPSS with azimuthal polarization (R1 to R5 LIPSS), as observed in SEM images.

Imaging of stained *P. gingivalis* after 48 h of culture on partially textured samples (Fig. 2a) allowed the quantification of bacterial adhesion over LIPSS with a ratio compared to the adjacent control (internal reference) on bordering polished surfaces (Fig. 2b). Results show a decrease in *P. gingivalis* adhesion by 30% on linear LIPSS compared to the polished control; whereas all fluorescence quantifications on azimuthal and radial LIPSS demonstrated an increase in *P. gingivalis* adhesion from 70% up to 324%. Adherent *P. gingivalis* are presented over textured/polished surfaces in SEM images (Fig. 2c).

Correlations between surface parameters and bacterial adhesion, presented in Fig. 3, revealed the importance of some amplitude parameters such as Sa (Fig. 3a), Sp (Fig. 3b), Sv (Fig. 3c), Ssk (Fig. 3d) and Sku (Fig. 3e) in the bacterial adhesion of *P. gingivalis*. Representations of the textured surfaces presented in Fig. 3f allow the visualization of 3-D surface topographies. Bacterial adhesion of *P. gingivalis* was significantly correlated only with Sku ($p = 0.0468$); whereas the correlation with Sa, the roughness parameter commonly selected to evaluate bacterial adhesion, was only a tendency ($p = 0.0702$).

The following analysis is focused on hybrid parameters, presented in correlation with *P. gingivalis* adhesion in Fig. 4. Surface level evolution was evaluated with Sdq and developed surface was measured with Sdr. The polished controls as well as textured surfaces with the lowest laser irradiation (linear; S8; S17) showed a Sdq close to 0.1 (± 0.025) and a Sdr close to 0.5 (± 0.19) due to the low complexity of these surfaces compared to the other

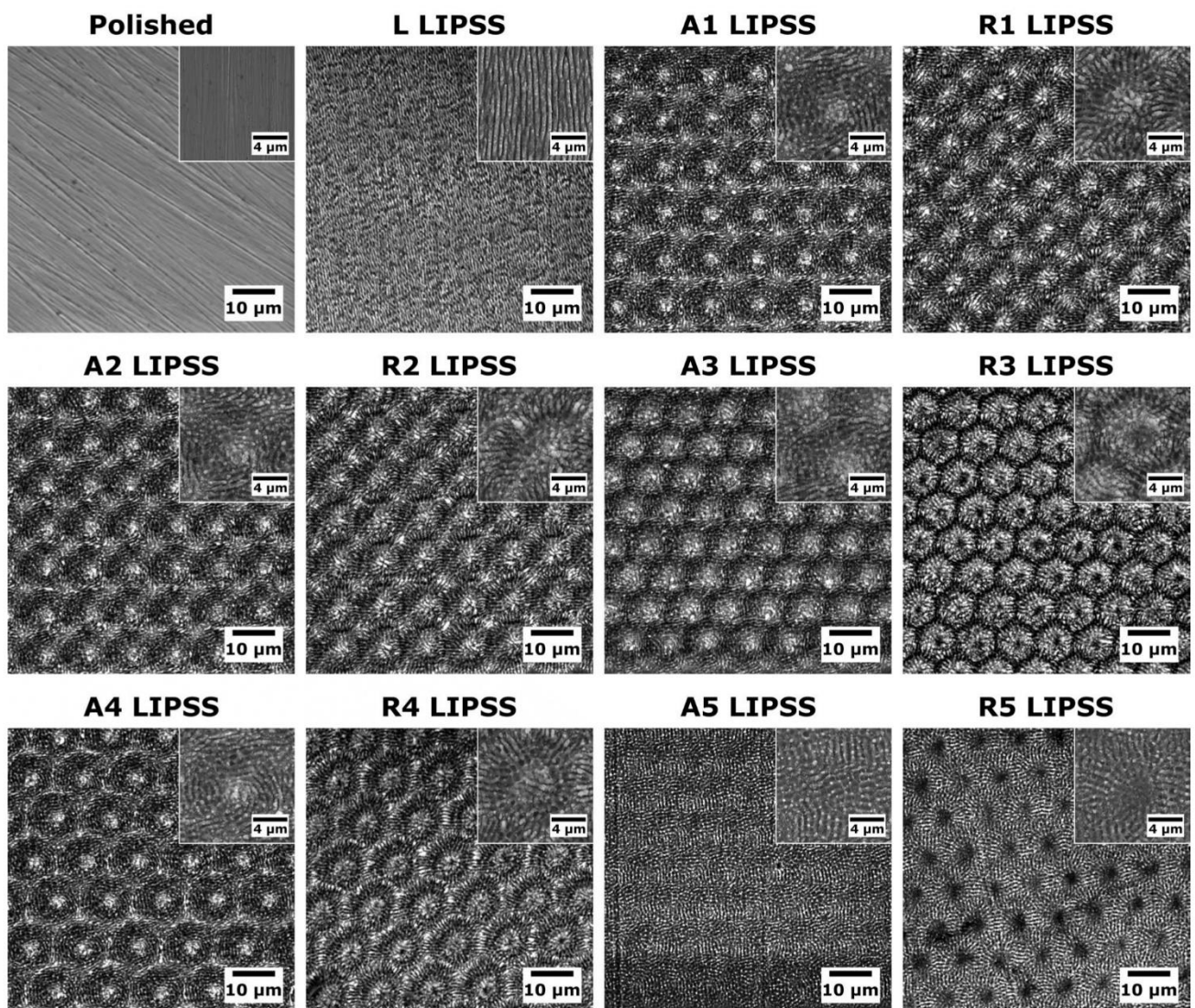


Figure 1. Surfaces visualization and associated laser parameters. SEM images of polished and LIPSS-textured Ti6Al4V surfaces.

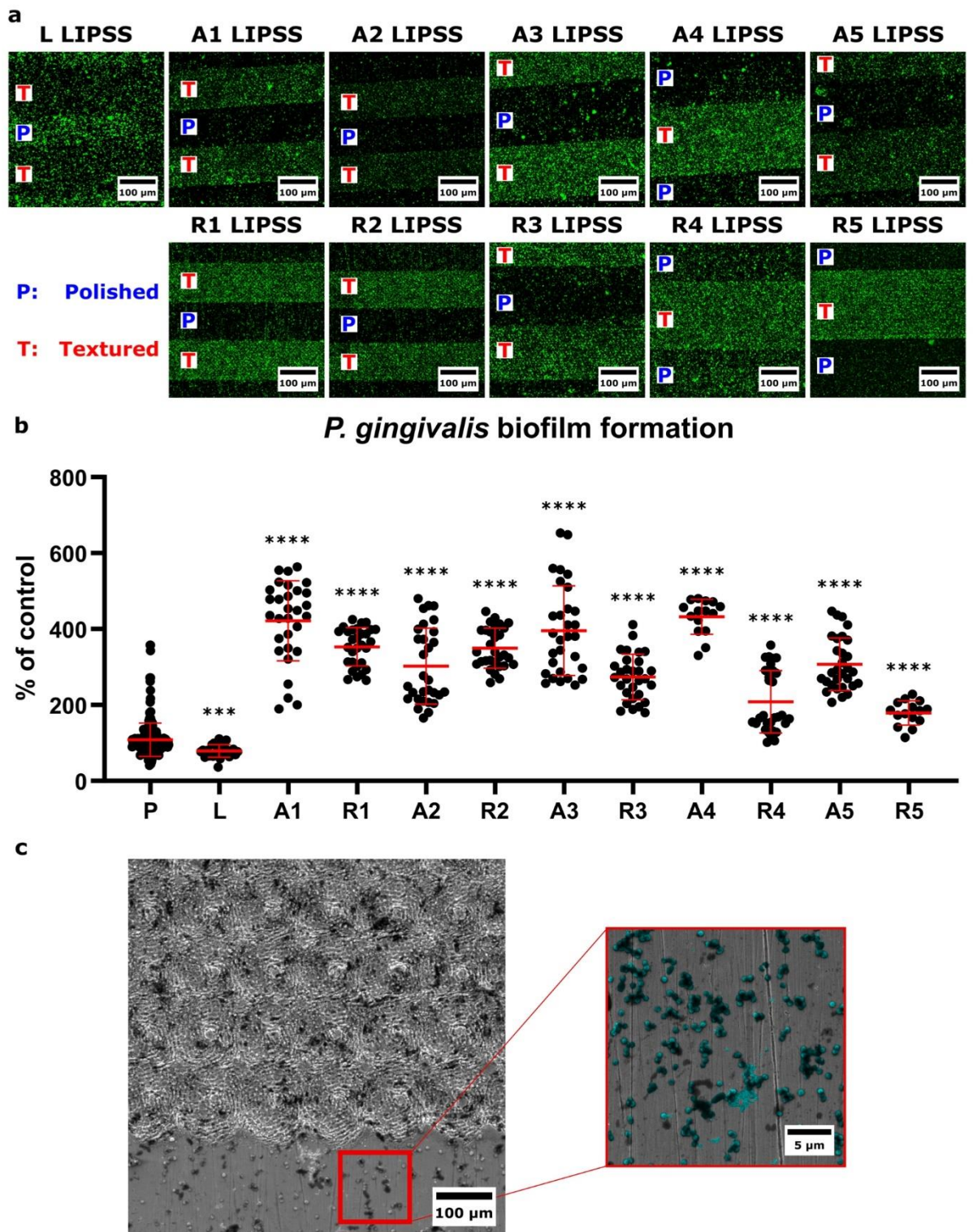


Figure 2. Evaluation of *P. gingivalis* adhesion on the different surfaces. (a) Representative fluorescence images of calcein stained *P. gingivalis* 48 h postseeding on partially textured samples. (b) Graph presenting the fluorescence quantification as mean \pm SEM. $n = 30$ area/group; t -test compared to polished control; *** $p = 0.0003$; **** $p < 0.0001$. (c) SEM images of *P. gingivalis* on partially textured surfaces.

textured surfaces, which showed 2–6 times higher Sdq and 4–25 times higher Sdr than the polished controls. Nevertheless, *P. gingivalis* adhesion was not significantly related to any of these hybrid parameters.

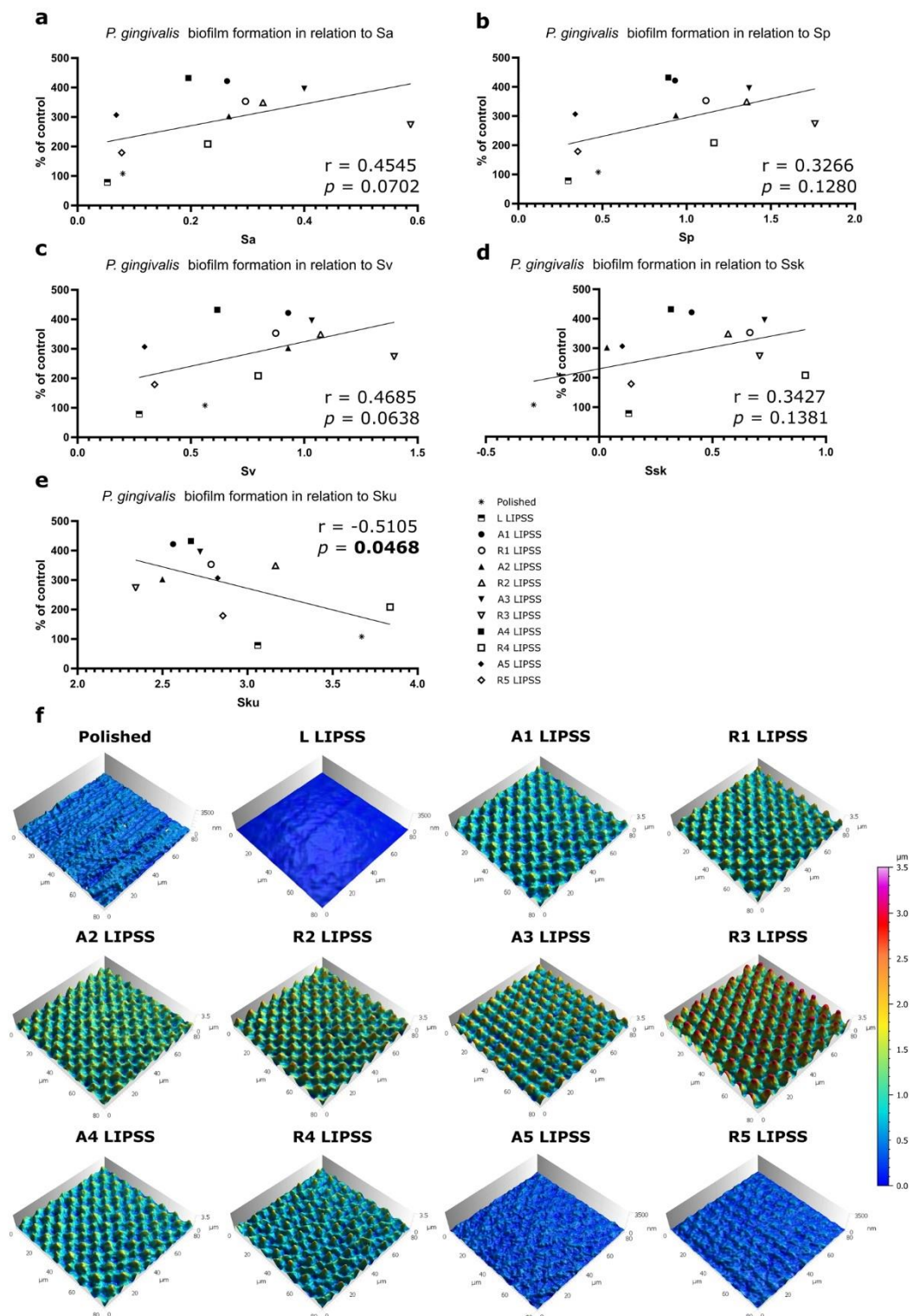


Figure 3. Surface topographies and associated parameters. Graphical representation of the correlation between *P. gingivalis* biofilm formation and Sa (a), Sp (b), Sv (c), Ssk (d) or Sku (e) with the Spearman's rank-order correlation and associated p-value. (f) 3-D representation of surface topographies.

MountainsMap software provided qualitative renderings that were also obtained from Fourier transforms to the profile height function (Fig. 5A). These renderings simulated furrows and arranged contour lines along the surface that represent qualitative aspects of the surface texture. Graphical representations of *P. gingivalis*

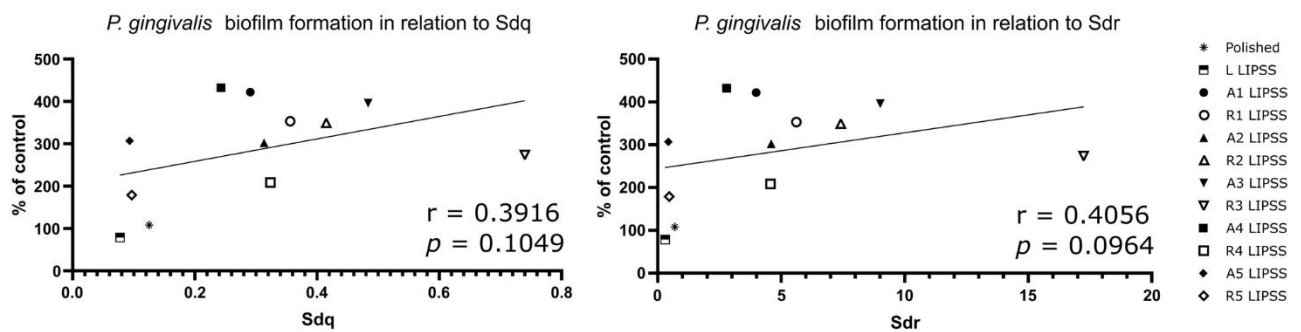


Figure 4. Hybrid parameters. Graphical representation of the correlation between *P. gingivalis* adhesion and Sdq or Sdr with the Spearman's rank-order correlation and associated p -value.

adhesion (Fig. 5B) show a negative correlation with the density of furrows but a positive correlation with the mean furrows depth.

Discussion

In terms of tissue engineering, dental implants require different properties from top to bottom; as the upper part needs to be textured to increase gingival tissue adhesion³², while the largest part being implanted in the jaw must present pro-osteogenic textures²². As a versatile tool, fs-L is perfectly suited for this purpose by offering an alternative of multiple texturing along the entire implant surface. However, special attention must be paid to the surface texture parameters to avoid increased bacterial adhesion.

Both 2-D and 3-D forms can be used to calculate surface texture parameters. Not long ago, 2-D profile analysis was prevalent; but in recent decades, 3-D surface analysis is more relevant for science and engineering applications²⁸. 3-D roughness parameters are more suitable for surface analysis since they are evaluated for a complete area instead of a single profile.

Regarding bacterial adhesion evaluation, we can confirm the antiadhesive properties of IR LIPSS towards *P. gingivalis*, as demonstrated in a previous study³². Concerning every azimuthal and radial LIPSS evaluated, we can only assume that these texturings increased *P. gingivalis* surface adhesion; nevertheless, it is not possible to determine the precise impact of each texture. However, the increase in bacterial adhesion is not as important on all those textured surfaces. The characterization of fs-L textured surfaces is more complicated than just LIPSS orientation; therefore, correlations between bacterial adhesion and individual roughness parameters are of special interest.

Concerning amplitude parameters, roughness (Ra or Sa) is the commonly studied surface characteristic^{8,33}. Here, Sa is correlated with *P. gingivalis* adhesion in a nonsignificant manner. This trend ($p=0.0702$) is in agreement with previous studies concerning this correlation^{25,34}. Moreover, the Sv value, which represents the maximal height of the valleys, also showed a tendency ($p=0.0638$) in correlation with bacterial adhesion. SEM analysis of bacteria adherent to the texturing revealed that deep valleys that are larger than a single bacterium diameter may retain bacteria, resulting in increased bacterial adhesion (data not shown). The absence of correlation with Sp is coherent as the height of pits is not a determinant factor for the amount of bacteria retained by the texture.

The Ssk values represent the degree of bias of the roughness shape, meaning the height distribution (peaks and pits) around the mean plane. This does not rely on the maximal level of peaks, pits, or the spatial distribution of LIPSS; therefore, the absence of correlation with bacterial adhesion seems coherent.

Sku is a way to describe the global relief of a surface; more precisely, it symbolizes the shape of the distribution of profile points²⁸. A value of $Sku < 3$ characterizes a surface presenting relatively few high peaks and low valleys; whereas a value of $Sku > 3$ illustrates a topography with many high peaks and low valleys. Herein, Sku is significantly correlated with *P. gingivalis* adhesion; meaning that an increased number of deep furrows leads to enhanced bacterial adhesion to the surface.

Concerning hybrid parameters, indicators of the slopes of the surface for both Sdq and Sdr show that no determinant correlation has been identified with bacterial adhesion.

There is a strong correlation between spatial topography parameters and bacterial adhesion. The critical factor is the surface of contact between a single bacterium and the substrate^{8,11}. A rise in mean furrows depth as well as a decrease in the mean density of furrows result in an increase in the contact surface, which explains a higher bacterial adhesion as the bacteria will fit easier in the furrows. A special focus must be done on both reducing the depth and increasing the amount of furrows on fs-L textured surfaces to reduce contact surface and thus bacterial adhesion, as suggested in the literature^{11,35,36}.

Even if different works evaluate the correlation between bacterial adhesion and roughness parameters, it is quite hard to make a comparison of different studies, given that topographic characterization differs depending on the resolution of the measuring device used. Atomic force microscopy describes nanoscaled topographies; here with multifocus microscopy, we describe it on a microscale. In terms of bacterial adhesion, nanorugosity will directly impact single bacterium compartment in a positive or negative way; however, a microroughness will increase mature biofilm formation³⁵. Therefore, there is a real interest in developing multiscale measuring tools³⁷.

We could not rule out the possibility that modifying surface chemistry might impact bacterial adhesion to surfaces with different topographies. According to Florian et al., the polished sample surface is expected to

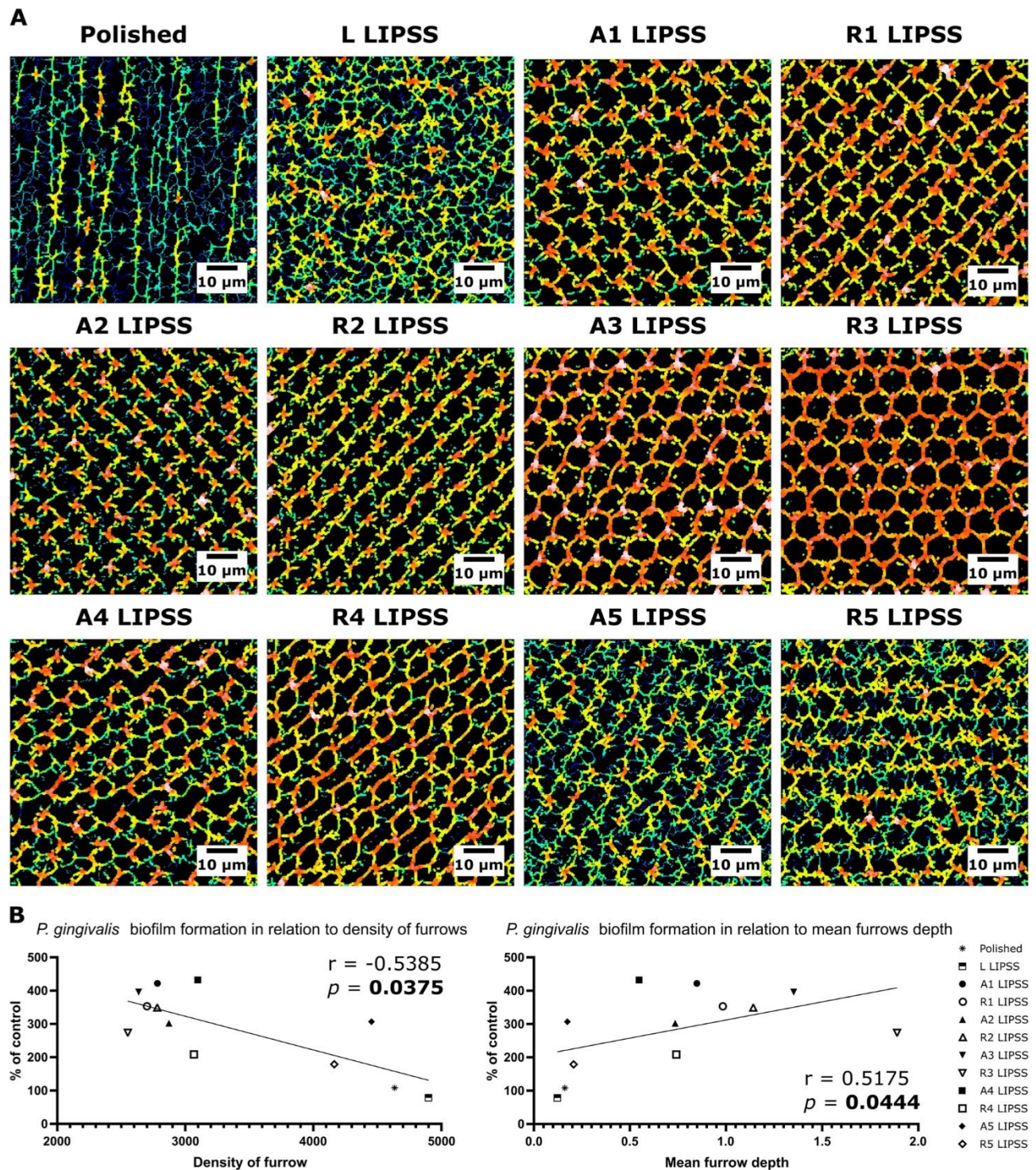


Figure 5. Furrows characterization. (A) Qualitative rendering of the furrows. (B) Graphical representation of the correlation between *P. gingivalis* adhesion and density of furrows or mean furrows depth with the Spearman's rank-order correlation and associated p -value.

have a naturally occurring oxidation layer of about 10 nm, while the linear LIPSS covered surface would have an oxidized layer of about 50 nm³⁸. Concerning radial and azimuthal LIPSS, the oxidation layer thicknesses are assumed to be slightly above or below 50 nm, depending on the number of laser pulses per cavity. Since our study is centered on low spatial frequency LIPSS, it is reasonable to assume that the different textures in our study have oxide layers of similar thickness³⁸. The variation in thickness should be minimal, and thus its role in bacterial adhesion is deemed to be insignificant.

Results showed correlations between *P. gingivalis* adhesion and some surface parameters, which is of major interest for dental implants. Otherwise, many bacterial strains are involved in peri-implantitis; it would be really interesting to confirm these studies with other bacteria of the red complex or primary colonizers such as *Streptococcus mutans*^{6,39,40}. An application to other biomaterials could be envisaged and would necessitate evaluation of the adhesion of nosocomial bacterial strains such as *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli*. Nevertheless, according to certain literature^{11,32} and this present study, there is a crucial importance of generating a texturing of a smaller size than a single bacterium; meaning that results with *P. gingivalis*, which is approximately 600 nm in diameter, could be valid for every bacterium of a larger size. Also, as suggested by Linklater et al., the mechanical properties of bacterial cell walls are similar between strains; therefore, an understanding of all influencing factors of the topography based bactericidal mechanism could lead to a precise description of mechanobactericidal surface patterns¹¹. A recent study has shown that differences in surface topography not only impact bacterial adhesion, but also modify decontamination with powders and ultrasounds, as well as subsequent fibroblast growth⁴¹. A similar study could be carried out on LIPSS from the present study. Previous study from our team showed that radial LIPSS have an interest regarding the osteogenesis surrounding dental implants²²; nevertheless, regarding bacterial adhesion, the linearity of the LIPSS should be prioritized. As shown in a previous study, it is more important to focus on reducing the spatial period of the LIPSS in order to reduce bacterial adhesion³². With the aim of reducing bacterial adhesion to dental implants surfaces, particular interest should be given to the minimization of spatial spacing in the axis perpendicular to the linear orientation of the texturing and which should be prioritized. To go further in the evaluation of the impact of such parameters in bacterial adhesion, a study focused on surfaces presenting similar Sa with various spacing parameters should be led. However, it is obvious that Sa parameter evaluation is definitely not sufficient for bacterial attachment assessment and probably also cell tissue adhesion. A more global and more precise description of surface topographies would be promising for the design of future biomaterials such as dental implants.

Conclusions

Laser processing enables the creation of reproducible micro- and nanotextures (LIPSS) on titanium-based surfaces in a one-step process. By fine tuning the fs-L parameters, precise control of both micro- and nanotopographies can be achieved. This study shows that for dental implant applications, it is recommended to focus on linear LIPSS as the sole antiadhesive texturing approach. In assessing bacterial adhesion, relying solely on Sa (a common parameter used to anticipate adhesion) may not be sufficient. Additional attention should be given to spatial parameters, such as the density and mean depth of furrows, as well as the Sku of the surface, as they are strongly associated with *P. gingivalis* adhesion. While this study demonstrates promising results, further research is needed to investigate the effect of different bacteria on ultrafast laser surface texturing and its potential implications for bacterial adhesion anticipation.

Fi-index tool

This manuscript has been checked with the Fi-index tool and obtained a score of 1.5 for the first author and respectively 0.30 and 0.65 for the last authors (value on the date 21/08/2023 according to Web of Science)^{42,43}. The Fi-index tool aims to ensure the quality of the reference list and limit any autocitations.

Data availability

Raw datasets may be available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 17 May 2023; Accepted: 9 September 2023

Published online: 23 September 2023

References

1. Spriano, S., Yamaguchi, S., Bairo, F. & Ferraris, S. A critical review of multifunctional titanium surfaces: New frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination. *Acta Biomater.* **79**, 1–22 (2018).
2. Ferraris, S. et al. Cytocompatible and anti-bacterial adhesion nanotextured titanium oxide layer on titanium surfaces for dental and orthopedic implants. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, 103 (2019).
3. Moraschini, V., Poubel, L. A. D. C., Ferreira, V. F. & Barboza, E. D. S. P. Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: A systematic review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **44**, 377–388 (2015).
4. Schwarz, F., Derks, J., Monje, A. & Wang, H.-L. Peri-implantitis. *J. Periodontol.* **89**, S267–S290 (2018).
5. Arciola, C. R., Campoccia, D. & Montanaro, L. Implant infections: Adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 397–409 (2018).
6. Shatta, A., Anil, S., Shatta, A. & Anil, S. *Peri-Implantitis Revisited Current Concepts in Dental Implantology—From Science to Clinical Research* (IntechOpen, 2021). <https://doi.org/10.5772/intechopen.100293>.
7. Aslam, B. et al. Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. *Infect. Drug Resist.* **11**, 1645–1658 (2018).
8. Zheng, S. et al. Implication of surface properties, bacterial motility, and hydrodynamic conditions on bacterial surface sensing and their initial adhesion. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 643722 (2021).
9. Ardhani, R., Diana, R. & Pidhatika, B. How *Porphyromonas gingivalis* navigate the map: The effect of surface topography on the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* on biomaterials. *Materials* **15**, 4988 (2022).
10. EslimezTopcu, E., Şahin, O., Köroğlu, A., Cömert, F. & Yılmaz, B. Surface roughness and *Streptococcus mutans* adhesion on surface sealant agent coupled interim crown materials after dynamic loading. *BMC Oral Health* **22**, 299 (2022).
11. Linklater, D. P. et al. Mechano-bactericidal actions of nanostructured surfaces. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 8–22 (2021).
12. Teughels, W., Van Assche, N., Sliopen, I. & Quirynen, M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin. Oral Implants Res.* **17**(Suppl 2), 68–81 (2006).
13. Epperlein, N. et al. Influence of femtosecond laser produced nanostructures on biofilm growth on steel. *Appl. Surf. Sci.* **418**, 420–424 (2017).

14. Luo, X. *et al.* Biocompatible nano-ripples structured surfaces induced by femtosecond laser to rebel bacterial colonization and biofilm formation. *Opt. Laser Technol.* **124**, 105973 (2020).
15. Liu, Y. *et al.* Characterization and evaluation of a femtosecond laser-induced osseointegration and an anti-inflammatory structure generated on a titanium alloy. *Regen. Biomater.* **8**, rbab006 (2021).
16. Wang, S. *et al.* Femtosecond laser treatment promotes the surface bioactivity and bone ingrowth of Ti6Al4V bone scaffolds. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **10**, 962483 (2022).
17. Lackington, W. A. *et al.* Femtosecond laser-texturing the surface of Ti-based implants to improve their osseointegration capacity. *Adv. Mater. Interfaces* **9**, 2201164 (2022).
18. Doll, K. *et al.* Development of laser-structured liquid-infused titanium with strong biofilm-repellent properties. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 9359–9368 (2017).
19. Lutey, A. H. A. *et al.* Towards laser-textured antibacterial surfaces. *Sci. Rep.* **8**, 10112 (2018).
20. Dumas, V. *et al.* Multiscale grooved titanium processed with femtosecond laser influences mesenchymal stem cell morphology, adhesion, and matrix organization. *J. Biomed. Mater. Res. A* **100A**, 3108–3116 (2012).
21. Cunha, A. *et al.* Human mesenchymal stem cell behavior on femtosecond laser-textured Ti-6Al-4V surfaces. *Nanomedicine* **10**, 725–739 (2015).
22. Maalouf, M. *et al.* Polarization of femtosecond laser for titanium alloy nanopatterning influences osteoblastic differentiation. *Nanomaterials* **12**, 1619 (2022).
23. Florian, C., Kirner, S. V., Krüger, J. & Bonse, J. Surface functionalization by laser-induced periodic surface structures. *J. Laser Appl.* **32**, 022063 (2020).
24. San-Blas, A. *et al.* Femtosecond laser fabrication of LIPSS-based waveplates on metallic surfaces. *Appl. Surf. Sci.* **520**, 146328 (2020).
25. Yoda, I. *et al.* Effect of surface roughness of biomaterials on Staphylococcus epidermidis adhesion. *BMC Microbiol.* **14**, 234 (2014).
26. Dantas, L. C. D. M. *et al.* Bacterial adhesion and surface roughness for different clinical techniques for acrylic polymethyl methacrylate. *Int. J. Dent.* **2016**, 8685796 (2016).
27. Duarte, P. M., Reis, A. F., de Freitas, P. M. & Ota-Tsuzuki, C. Bacterial adhesion on smooth and rough titanium surfaces after treatment with different instruments. *J. Periodontol.* **80**, 1824–1832 (2009).
28. Gadelmawla, E. S., Koura, M. M., Maksoud, T. M. A., Elewa, I. M. & Soliman, H. H. Roughness parameters. *J. Mater. Process. Technol.* **123**, 133–145 (2002).
29. Hajishengallis, G., Lamont, R. J. & Koo, H. Oral polymicrobial communities: Assembly, function, and impact on diseases. *Cell Host Microbe* <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.02.009> (2023).
30. Hao, Y. *et al.* Influence of dental prosthesis and restorative materials interface on oral biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3157 (2018).
31. Mountcastle, S. E. *et al.* A review of co-culture models to study the oral microenvironment and disease. *J. Oral Microbiol.* **12**, 1773122 (2020).
32. Papa, S. *et al.* Dual-functionalized titanium by ultrafast laser texturing to enhance human gingival fibroblasts adhesion and minimize Porphyromonas gingivalis colonization. *Appl. Surf. Sci.* **606**, 154784 (2022).
33. Wu, S., Zhang, B., Liu, Y., Suo, X. & Li, H. Influence of surface topography on bacterial adhesion: A review (review). *Biointerphases* **13**, 060801 (2018).
34. Yu, P. *et al.* Influence of surface properties on adhesion forces and attachment of *Streptococcus mutans* to zirconia in vitro. *BioMed. Res. Int.* **2016**, e8901253 (2016).
35. Lee, S. W., Phillips, K. S., Gu, H., Kazemzadeh-Narbat, M. & Ren, D. How microbes read the map: Effects of implant topography on bacterial adhesion and biofilm formation. *Biomaterials* **268**, 120595 (2021).
36. Helbig, R. *et al.* The impact of structure dimensions on initial bacterial adhesion. *Biomater. Sci.* **4**, 1074–1078 (2016).
37. Brown, C. A. *et al.* Multiscale analyses and characterizations of surface topographies. *CIRP Ann.* **67**, 839–862 (2018).
38. Florian, C. *et al.* Chemical effects during the formation of various types of femtosecond laser-generated surface structures on titanium alloy. *Appl. Phys. A* **126**, 266 (2020).
39. Butera, A. *et al.* Oral microbiota in patients with peri-implant disease: A narrative review. *Appl. Sci.* **12**, 3250 (2022).
40. Mordini, L. *et al.* Peri-implantitis regenerative therapy: A review. *Biology* **10**, 773 (2021).
41. Gianfreda, F. *et al.* The effects of ultrasonic scaling and air-abrasive powders on the decontamination of 9 implant-abutment surfaces: Scanning electron analysis and in vitro study. *Dent. J.* **10**, 36 (2022).
42. Fiorillo, L. & Cicciù, M. The use of Fi-Index tool to assess per-manuscript self-citations. *Publ. Res. Q.* **38**, 684–692 (2022).
43. Fiorillo, L. Fi-Index: A new method to evaluate authors Hirsch-index reliability. *Publ. Res. Q.* **38**, 465–474 (2022).

Acknowledgements

The authors thank Maryane Jacquier (SEM) and Marie-Ange Eyraud (bacterial culture) for their technical support. Also thanks to Ashlyn Hicks for the Alicona and MountainsMap analysis; and to Myriam Normand for help with the statistical analysis. Thanks to Priyanka Garg for the proofreading. We finally kindly acknowledge Claire Bardet for precious advice and scientific discussion.

Author contributions

S.P. contributed to conception, design, data acquisition, analysis and interpretation, drafted and critically revised the manuscript; M.M. contributed to data analysis and interpretation, drafted and critically revised the manuscript; P.C. contributed to conception, design, critically revised the manuscript; X.S., Y.D.M., H.H. contributed to data analysis and interpretation, critically revised the manuscript; M.T. contributed to design, data acquisition, critically revised the manuscript; A.G., V.D. contributed to conception, design, data acquisition, analysis and interpretation, drafted and critically revised the manuscript. All authors gave final approval and agree to be accountable for all aspects of the work.

Funding

This project was funded by a public grant from the French National Research Agency (ANR) under the “France 2030” investment plan, which has the reference EUR MANUTECH SLEIGHT-ANR-17-EURE-0026; and partially funded by the European Commission LaserImplant project, grant agreement number: 951730.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.P.

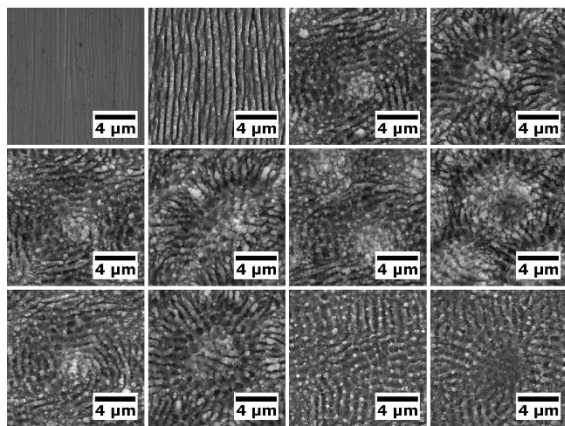
Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023



irradiation fs-L avec
variations des
paramètres laser



évaluation de l'adhérence de *Porphyromonas gingivalis*

↗ coefficient d'asymétrie Sku



↗ densité de ripples



↗ profondeur moyenne des ripples

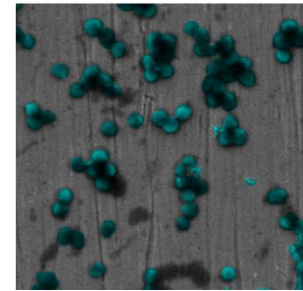


Figure 18 – Résumé graphique : La variation de paramètres fs-L a permis de générer des LIPSS IR de topographies variables sur Ti6Al4V ; la mesure d'une série de paramètres topographiques mise en corrélations avec l'adhérence de *P. gingivalis* a permis d'identifier les paramètres topographiques déterminant dans l'adhérence bactérienne.

C. Fonctionnalisation de surface : améliorer l'adhérence cellulaire et limiter le biofilm bactérien

S. Papa, A. Abou Khalil, H. Hamzeh-Cognasse, M. Thomas, M. Maalouf, Y. Di Maio, X. Sedao, A. Guignandon, V. Dumas, Dual-functionalized titanium by ultrafast laser texturing to enhance human gingival fibroblasts adhesion and minimize *Porphyromonas gingivalis* colonization (2022).

Un élément clé pour la longévité d'un implant dentaire est l'adhérence du tissu gingival, qui va permettre le maintien de l'implant, mais également agir comme barrière physique face à l'infiltration de bactéries de la sphère orale. Cette étude vise à étudier l'impact de modifications topographiques d'une surface de Ti6Al4V par fs-L, à deux longueurs d'onde différentes, 1030 nm (LIPSS IR) et 515 nm (LIPSS GR), sur l'adhérence gingivale et bactérienne. Les surfaces résultant de cette irradiation par fs-L ont été caractérisées par AFM et une analyse avec le logiciel Mountains Map® a permis la mesure de paramètres topographiques. Pour compléter l'analyse des différentes surfaces, une mesure des angles de contact lors de l'application de la méthode de la goutte sessile a permis une évaluation de la mouillabilité.

Afin de se rapprocher *in vitro* d'une situation de contact implant-tissu gingival, une culture cellulaire de fibroblastes gingivaux primaires humains (HGnF) a été maintenue pendant 21 jours. Etant donné que la majorité des mesures d'adhérence cellulaire *in vitro* sont réalisées à l'échelle de cellules isolées, il a été nécessaire de mettre en place un protocole de mesure d'adhérence d'une culture cellulaire long terme. Pour cela, un scléromètre a permis d'appliquer une force calibrée et ainsi déstabiliser le tapis cellulaire par indentation, de manière locale et reproductible. Les tapis cellulaires indentés ont été imagés par microscopie à fluorescence. Une mesure informatique de la surface du tapis cellulaire arraché a permis d'évaluer l'adhérence de la culture fibroblastique selon le type de topographie de surface.

Sur les surfaces présentant des LIPSS (LIPSS IR ou GR), l'aire du tapis cellulaire arraché est minimale, en comparaison à la surface contrôle non traitées par fs-L. Ceci atteste d'une meilleure adhérence du tapis cellulaire gingival sur les surfaces traitées par fs-L.

Ces résultats ont été complétés par la mise au point d'un second protocole de mesure d'adhérence de culture cellulaire long terme basé sur l'utilisation d'un système de bain à ultrasons, pour déstabiliser de manière homogène l'entière du tapis cellulaire. À la suite de cela, le temps nécessaire au détachement de 50 % du tapis cellulaire est déterminé graphiquement pour chaque surface. Pour détacher la moitié de la culture fibroblastique sur les surfaces traitées par fs-L (LIPSS IR ou GR) en appliquant la technique de détachement par bain à ultrasons, un temps au minimum deux fois plus long est nécessaire, par comparaison à la surface polie. Ce qui confirme que la génération de LIPSS (LIPSS IR ou GR) sur la surface de Ti6Al4V augmente l'adhérence globale du tapis fibroblastique gingival.

La génération de LIPSS sur le Ti6Al4V augmente la Sa, et donc la rugosité globale de la surface ; il est donc crucial d'évaluer l'impact de cette nouvelle rugosité sur l'adhérence bactérienne.

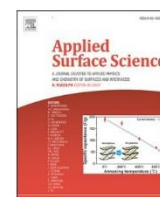
Les différentes topographies ont donc été mises en contact indépendamment avec une souche colonisatrice primaire (*S. mutans*) ou secondaire (*P. gingivalis*) de la péri-implantite (48 h de contact). L'imagerie à fluorescence a permis de quantifier les bactéries adhérentes sur chaque surface texturée par fs-L, avec comparaison à un contrôle local. Les LIPSS IR présentent un impact neutre sur l'adhérence de *S. mutans* et réduisent l'adhérence de *P. gingivalis* au Ti6Al4V. Concernant les Green LIPSS, elles diminuent l'adhérence des deux souches bactériennes à la surface de Ti6Al4V. La différence de comportement des deux souches testées face à une même topographie de surface peut s'expliquer par une différence dans leur taille, mais également dans l'organisation de leur biofilm.

Dans un objectif d'amélioration des implants dentaires actuels, les LIPSS GR offrent une double fonctionnalisation prometteuse, améliorant l'adhérence du tissu gingival tout en réduisant la capacité d'adhérence de bactéries associées à la péri-implantite. Toutefois, il serait intéressant d'exploiter cette double fonctionnalisation dans un contexte pro-inflammatoire proche de celui induit par la pathologie.



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Surface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apsusc

Full Length Article

Dual-functionalized titanium by ultrafast laser texturing to enhance human gingival fibroblasts adhesion and minimize *Porphyromonas gingivalis* colonization

Steve Papa^{a,*}, Alain Abou Khalil^b, Hind Hamzeh-Cognasse^a, Mireille Thomas^a,
Mathieu Maalouf^a, Yoan Di Maio^c, Xxx Sedao^{b,c}, Alain Guignandon^{a,1}, Virginie Dumas^{d,1}

^a INSERM, U1059-SAINBIOSE, University of Lyon, Jean Monnet University, F-42270 Saint Priest en Jarez, France

^b Laboratory Hubert Curien, UMR 5516 CNRS, Jean Monnet University, University of Lyon, F-42000 Saint-Etienne, France

^c GIE Manutech-USD, 20 rue Benoît Lauras, F-42000 Saint-Etienne, France

^d Laboratory of Tribology and Systems Dynamics, UMR 5513 CNRS, University of Lyon, National School of Engineers of Saint-Etienne, Lyon Central School, F-42100 Saint-Etienne, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Laser-Induced Periodic Surface Structures
Femtosecond laser
Cell adhesion
Antibacterial surfaces
Gingival fibroblasts

ABSTRACT

Dental implant failure is primarily due to peri-implantitis, a consequence of bacterial penetration causing implant loosening. Beyond supporting the implant, the adhesion of gingival tissues to the surface is essential for its role as a physical barrier to bacteria. Surface nanotextures are widely known to affect wettability, protein adsorption, and cellular and/or bacterial adhesion. In this report, a femtosecond laser (fs-L) was used to design Laser-Induced Periodic Surface Structures (LIPSS) with Infra-Red (IR) or Green lasers on Ti6Al4V. Surface morphology, topography and wettability were characterized. Gingival fibroblasts adhesion was evaluated with sclerometer scratch tests and confirmed by ultrasonic bath cell detachment method. The fs-L texturing increases human gingival cells adhesion compared to polished surface. The adhesion of peri-implantitis associated bacteria was quantified. After 48 h of contact, IR LIPSS show antiadhesive properties for *Porphyromonas gingivalis*, whereas Green LIPSS, thanks to its smaller spatial period, have limited both *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis* adhesion. Thus, LIPSS generated on Ti6Al4V surfaces, especially Green LIPSS, are identified as having double biological functionality: repellent for bacteria and adhesive for gingival tissues. This study proves that fs-L processing is an innovative tool with potential to enhance implant success paving the way towards dual functionality.

1. Introduction

Titanium and its alloys, such as *Titanium-6Aluminum-4Vanadium* (Ti6Al4V), have been used as the main biomaterial for dental implant devices due to its excellent physico-chemical properties and high biocompatibility with host tissues [1,2]. Osseointegrated dental implants are safe and present high survival rates at about 90% and minimal marginal bone resorption in the 10 years following implantation [3]. Nevertheless, once exposed to the oral environment implants are subject to oral microbial adhesion and biofilm formation, resulting in peri-implantitis: one of the most important biological complications in recent implantology, that remains unsolved [4,5]. Peri-implantitis is a

destructive inflammatory lesion that affects the surrounding soft and hard tissues with loss of supporting bone [3]. A recent review reports that peri-implantitis affects up to 47% of failed oral implants [6].

In transmucosal implants, bacterial infection leading to biofilm formation is due to bacterial penetration through the soft tissues coming in contact with the implant surface. Indeed, the weak point of dental implants is the passage of bacteria from the oral cavity into the bone tissues [7]. If there is an imperfect gingival adhesion to the implant surface, rapid infiltration of oral microbes is possible and may lead to gingival inflammation and recession, causing bone resorption and finally implant failure. Thus, the creation of a biological barrier with adhesive peri-implant soft tissues is a crucial point to avoid peri-implantitis and

* Corresponding author at: INSERM, U1059-SAINBIOSE, University of Lyon, Jean Monnet University, F-42270 Saint Priest en Jarez, France
E-mail address: steve.papa@univ-st-etienne.fr (S. Papa).

¹ These authors share senior authorship.

<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.154784>

Received 28 June 2022; Received in revised form 31 August 2022; Accepted 2 September 2022

Available online 7 September 2022

0169-4332/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

preserve dental implants. Implants that can perform dual functions, appropriately named “*duel*” surfaces recently by Damiani [8], such as enhancing cell adhesion and activity, and reducing bacterial adhesion, would help to improve the outcomes of dental surgeries. These implants are of particular importance considering an ever increasing risk of infection as bacteria gain resistance to antibiotics [9].

Innovative surfaces have been developed based on the idea of modifying adhesion strength between bacterial or mammalian cells and a substrate, achieved by tailoring the surface nanostructures [10–12]. Amongst several surface treatments, ultrashort pulse lasers texturing has emerged as a powerful and versatile surface engineering process to limit biofilm formation on implant surfaces [13,14]. Surface topographic features may significantly modify the properties of surfaces that allow or limit cell and/or bacteria adhesion [15–17]. Femtosecond laser (fs-L) allows for the creation of diverse types of laser-induced surface nanostructures, such as laser-induced periodic surface structures (LIPSS) with different periodicities [18,19]. The fs-L treatment is a highly valid innovative approach due to its simplicity which does not require clean room facilities and is possible to perform in air environments. Therefore, it is a suitable candidate for implementation in an industrial context of dental implants processing.

Following surgery, gingival fibroblasts, the major cellular component in the peri-implant connective tissue layer, start to proliferate, repopulate, and generate an extracellular matrix (fibronectin, collagen) at the transmucosal region that adheres on the implant surfaces. Thus, in this study, we evaluated the adhesion of a 3-week culture of human gingival fibroblasts with a large amount of extracellular matrix on nanotextured titanium. Two mechanical detachment evaluation devices were used: a sclerometer and an ultrasonic bath.

The pathogenesis of periodontal inflammation begins with the colonization by pathogenic bacteria. According to Socransky [20], specific bacteria have niche locations of colonization within the oral cavity, and their characteristics are subdivided into primary and secondary colonizers. We have included *Streptococcus mutans* in our study because *Streptococci* are the dominating bacteria at peri-implant tissue interface within the first 48 h following implantation [21]; and *Porphyromonas gingivalis*, a secondary colonizer, for its strong association with peri-implantation pathologies, as a member of the red complex, responsible of implant failure [22,23].

Surface engineering-based approaches are being considered as a highly competitive alternative to obtain comparable performance for delivering adhesive and repellent factors more safely and efficiently. When we consider the upper part of a dental implant, we can assume that perfectly flat medical titanium is offering a fair defense to infection. Mirror polished titanium is known to offer a good resistance to bacterial biofilm formation and development, nevertheless this flat surface is not able to sustain 3D tissue adhesion. The adhesion of the gingival tissues to the implant surface is essential for its role as a physical barrier to bacteria. However, this seal is often obtained only by the physical adaptation of the mucosa, rather than a biological attachment onto the implant surface [24,25]. One solution is to increase the roughness of the implant surface to increase surface area for cell adhesion. However, this roughness might also promote the adhesion of other cells such as microbial pathogens. Just like for eukaryotic cells, bacteria adhesion is enhanced on rough surfaces as opposed to polished ones. Therefore, a compromise must be found by increasing surface roughness to promote fibroblasts adhesion, but at a nanometer scale in order to limit bacterial attachment by reducing its contact area to the surface [26].

So, the aim of the present study is to evaluate the adhesion strength of a fibroblast cell layer on two different laser textured surfaces and investigate the initial bacterial adherence. Two types of LIPSS are presented in this study, nanostructures made with infra-red Laser (IR LIPSS) and nanostructures made with green Laser (Green LIPSS); both characterized for topography (Sa; Sdr; Str; ripples density, period and depth) and wettability parameters. The novelty of this study is the evaluation of both human gingival fibroblast and peri-implantitis associated bacteria

(*S. mutans* and *P. gingivalis*) on fs-L textured titanium surface. Moreover, this work allowed to identify dual-functionalized titanium by ultrafast laser texturing, to enhance human gingival fibroblasts adhesion and minimize bacterial colonization, which is of primary interest for dental implant applications.

2. Material and methods

Mirror polished titanium alloy samples of Ti6Al4V were purchased from Goodfellow (Huntingdon, UK). The Ti6Al4V samples were dimensioned in squares with a surface area measuring 1 cm^2 , and a thickness of 1 mm by the supplier prior to the shipment.

2.1. Femtosecond laser irradiation

Titanium samples were textured using a Tangor HP fs-L from Amplitude Systems (France) and a Galvo scanner (Scanlab, Germany) at GIE Manutech-USD platform. The fs-L used emits at a central wavelength of 1030 nm and a pulse duration of around ~ 400 fs. The laser beam was linearly polarized. All the samples were placed on 3D-XYZ translation stages from Aerotech (Bavaria, Germany). Scanlab GmbH's intelliSCAN 14 scanner was finally associated with 2 different f-theta lenses of 88 mm and 100 mm depending on the wavelength used. IR LIPSS were generated on titanium alloy surfaces at 1030 nm wavelength using a 100 mm f-theta lens. The second harmonic generation of the Tangor laser, i.e. 515 nm green wavelength, was achieved through a set of non-linear crystals and used to create Green LIPSS on titanium surface samples with a 88 mm f-theta to focus the beam on the sample. Laser parameters used are detailed in Table 1.

The peak fluence is defined as: $F_{\text{peak}} = 2E/(\pi\omega_0^2)$, where E is the pulse energy and ω_0 is the radius of the focused beam. The full surface of the titanium samples was covered by IR or Green LIPSS for wettability and cell adhesion tests. For bacterial adhesion tests, laser textures were distributed in $4000 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ bands alternating with $100 \mu\text{m}$ of untextured mirror-polished titanium to get a local control.

2.2. Surface morphology

Scanning Electron Microscopy (SEM) was used to visualize and characterize the different laser induced patterns. A Tescan VEGA3 SB, Brno Czech Republic electron microscope was used operating at 20 kV and using the secondary electron detector.

2.3. Surface topography

Atomic Force Microscopy (AFM, JPK Instruments, Berlin, Germany) was used to characterize the different nanostructures in tapping mode in air with an adapted probe (NanoWorld Arrow-NCR) to avoid impact over surface topography representation. Measurements were realized in a perpendicular way to the LIPSS to give the best surface topography visualization. Data topographies were analyzed with Mountains Map® 8.2 software. Surface roughness parameters are computed on the treated surfaces and this study focuses on:

- Ripples (LIPSS) density calculated as cm/cm^2 ;

Table 1

Laser parameters used to create IR and Green LIPSS.

LIPSS	Pulse Energy	Peak Fluence	Distance between pulses (Δx)	Hatching (Δy)	F-theta
IR	1.07 μJ	$F_{\text{peak}} = 0.26 \text{ J}/\text{cm}^2$	5 μm	5 μm	100 mm
Green	0.55 μJ	$F_{\text{peak}} = 0.18 \text{ J}/\text{cm}^2$	5 μm	5 μm	88 mm

- Areal arithmetic mean height Sa (nm) which expresses the difference in height of each point compared to the arithmetical mean of the surface. This parameter is used to evaluate surface roughness.
- Sdr (Developed interfacial area ratio) which expresses the ratio between the area of the “real” developed surface and the area of the “projected” surface
- Average spatial period and depth of the ripples.
- Texture aspect ratio Str which expresses the isotropy and anisotropy of the topography. Str is a value from 0 to 1. A value close to 0 indicates directionality (anisotropy) while a value close to 1 indicates that the surface does not exhibit preferred directions (isotropy).

Definitions of surface parameters are stated by ISO 25178 standards.

2.4. Wettability

Wettability measurements were carried out with a laboratory-developed multiscale and multifunctional system within the MANUTECH-USD consortium. They were performed in a controlled atmosphere (Temperature (T) = 23.1 ± 0.85 °C, Relative humidity (RH) = 44 ± 6.5 %), 24 h after a sterilization procedure, in which the samples received an ultrasonication cleaning (Triton 3% in demineralized water for 15 min then only demineralized water for 15 min) and an autoclaving treatment at 134 °C for 19 min. The data represents the measurements from 4 consecutive, independent and contact-less droplets on each surface. 3 μ L droplets of water were deposited on the surfaces, and the evolution of the droplet shape was visualized with a camera and a sample rotation stage enabling 360° contact angle measurements. The platform moved at a speed of 0.1 rad.s⁻¹. The droplet profile and especially the contact angle (CA) were extracted from the complete droplet 360° rotation leading to approximately 80 measurements per droplet.

2.5. Cell culture

Human Gingival Fibroblasts (HGnF) from Cliniscience at passage 6 were maintained in a T75-flask until 70% confluency in culture medium (ScienCell I2301-SC). Cells were then seeded on Ti6Al4V samples at 15,000 cells/cm² in 24-well plates with culture medium. At 24 h post-seeding, samples were moved to another well with fresh medium. Thereafter, the culture medium was renewed every 4 days for 3 weeks; the last medium being renewed 7 days before adhesion tests at 3 weeks, to avoid the risk of cell layer detachment during medium change, especially on polished samples.

2.6. Cell adhesion tests

Fresh living 3 weeks fibroblasts cultures were used in both adhesion tests.

Scratch test: a sclerometer (Multi Function Tribometer MFT-5000 RTEC instruments) with an indenter (angle 120°, radius 200 μ m) was used to scratch the 3 weeks cell layer with a 0.2 N load over 5 mm at a speed of 0.167 mm/s. Two scratches were realized on each sample and after samples were immersed in 10% Formalin (Sigma HT501128) for 15 min RT right after the scratch process to fix the tissue-like, then conserved in phosphate-buffered saline (PBS) 4 °C until staining and observation.

Ultrasonic (US) bath test: 3 weeks cell layer was stained with methylene blue for 30 s RT to facilitate tissue-like detachment observation. Then samples were rinsed in PBS and put in PBS in a beaker, placed in the US bath (Velleman VTUSC2) with a power of 70 W and a frequency of 50 Hz. Cycle lasting 15 s were realized successively until full tissue-like detachment.

2.7. Bacterial strains and culture conditions

Streptococcus mutans ATCC 25175 strain was isolated on brain–heart infusion (BHI) agar plates and grown in a BHI broth. 2 mL of 4 h broth (obtained from a 24 h broth) diluted to 1. 10e8 UFC/mL were incubated over titanium samples for 48 h at 37 °C under agitation (160–180 rpm).

Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 strain was isolated on Columbia agar with 5% of sheep blood under anaerobic conditions using the Genbox system (Biomérieux); then cultured 4 days in Schaedler broth with 650 μ L of mineral oil (Sigma M5904) at a ratio of 1:20 (mineral oil: medium). 1 mL of broth was incubated over titanium samples for 48 h at 37 °C under anaerobic conditions.

For both bacteria, after 48 h of incubation, media were removed; bacteria were fixed with formalin 10% (Sigma HT501128) for 40 min at RT; washed with PBS and kept in PBS at 4 °C until staining.

2.8. Fluorescent cell and bacteria labeling

Scratched and fixed samples were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 3 min RT. Samples were incubated with rhodamine-conjugated phalloidin diluted at 1:50 in PBS at 37 °C for 1.5 h for f-actin labeling. Nuclei labeling was performed with 1 μ g/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) diluted at 1:100 in PBS at 37 °C for 20 min. Cells were incubated with primary fibronectin antibodies (Sigma; F3648), diluted at 1:100 in PBS, at 37 °C for 2 h. Then, the samples were incubated with secondary 488 conjugated fluoprobes diluted at 1:250 in PBS, for 1h30 at room temperature. Washes were performed using PBS between each step. Fixed bacteria were stained with calcein AM (Invitrogen; C3099) at 10 μ g.mL⁻¹ for 20 min at 37 °C.

2.9. Image acquisition and analysis

Fixed bacteria were dehydrated in graded ethanol solutions (70, 80, 90 and 100%) air-dried at RT and analyzed with SEM at 5 kV with a secondary electron detector. Fluorescent microscopy (ZEISS LSM 800 Airyscan, Oberkochen, Germany) was used to image stained bacterial samples (10x10 mm tiles); and stained cells scratched areas (6x3 mm tiles). Smartphone (Xiaomi mi11) was used to image US bath cycles (every 15 s from T0s to full detachment). Cell adhesion images analysis was performed with GIMP (2.10.30) to increase torn off (scratch test) or attached (ultrasonic bath) areas contrast; and ImageJ to threshold and measure those areas. Bacterial images analysis was performed with ImageJ by measuring mean fluorescence in 45 areas (51 mm²) per condition and making a percent ratio with local polished control.

2.10. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8 software. Wettability and scratch tests box plots represent mean, quartiles and min/max value; statistical analyses were performed using Mann-Whitney *U* test. Bacterial data are presented as mean \pm SEM, statistical analyses were performed using *t*-test.

3. Results

The fs-L irradiation of Ti6Al4V at two wavelengths with linear polarization creates highly ordered/periodic texturing called IR LIPSS and Green LIPSS as presented on SEM images in Fig. 1A. The AFM measurement enables a 3D-view reconstruction of the surface topography presented in Fig. 1B and the calculation of different surface parameters using MountainsMap® software compiled in Fig. 1C. As seen in the SEM images, it is confirmed that the furrows created on textured surfaces have a density twice more important on Green LIPSS (44 239 cm/cm²) than on IR LIPSS (22 309 cm/cm²). This important density of furrows increases surface complexity (Sdr) of IR LIPSS (33.11 %) and Green LIPSS (29.81 %), in comparison with polished surfaces (0.11 %).

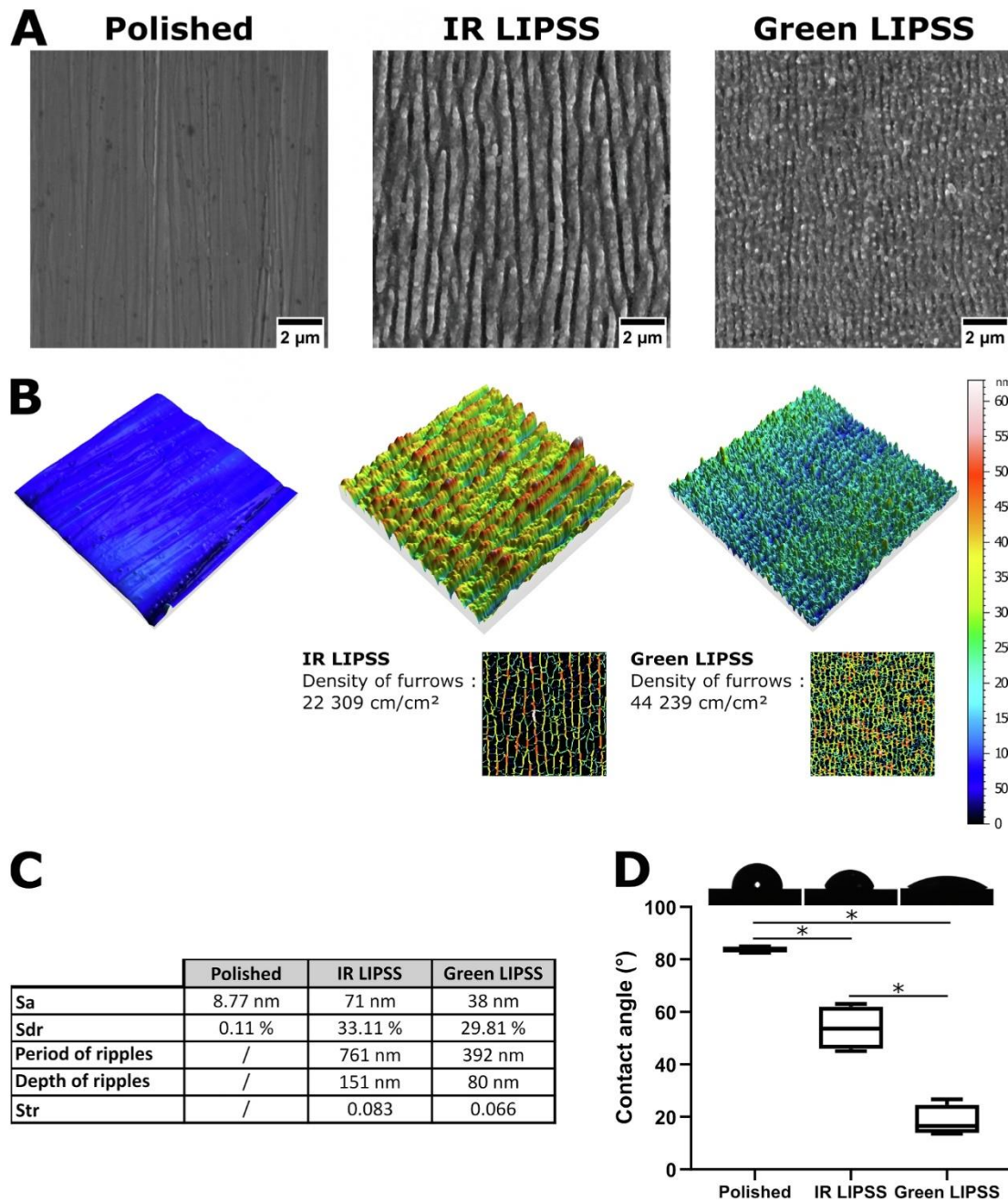


Fig. 1. Surfaces characterization. **A.** SEM images of polished, IR LIPSS and Green LIPSS surface. **B.** 3D images and representative images of ripples density from AFM measurements of polished, IR LIPSS and Green LIPSS surfaces. **C.** Surface parameters table including areal arithmetic mean height (Sa), developed interfacial area ratio (Sdr) and texture aspect ratio (Str). **D.** Sessile drop contact angle over sterilized polished, IR LIPSS and Green LIPSS surfaces. Contact angles of the drops are measured on a 360° rotation and presented as a box plot. Bottom and top bars stand for minimum and maximum concentrations. $n = 4$; Mann-Whitney U test; * $p = 0.0286$.

Rugosity (Sa) on IR LIPSS (71 nm) is approximately 2 times higher than on Green LIPSS (38 nm). For spatial period and depth of both LIPSS, there is an almost 2 times factor between IR LIPSS (761 nm / 151 nm) and Green LIPSS (392 nm / 80 nm) knowing that the laser wavelength is divided by 2. The Str that is near 0 in both IR and Green LIPSS (0.083 / 0.066) indicates the anisotropy of those two surfaces. Finally, the results of contact angle measurements on sterilized surfaces presented in Fig. 1D, show the significant decrease of contact angle due to the presence of ripples on surfaces correlated to an increase in the wettability which is significantly higher with the presence of Green LIPSS compared to IR LIPSS.

Fig. 2A presents the sclerometer process used for scratch tests over

the 3 weeks cultivated living fibroblasts layer, used to obtain scratches presented in Fig. 2B and quantified in Fig. 2C. Torn off area of the cell layer is visually and quantitatively higher on control polished surfaces (up to 5.8 mm²) compared to textured ones (close to 0 mm², limited to indenter passage), with no significant difference between IR and Green LIPSS. This result confirms an increase of fibroblasts adhesion allowed by the presence of LIPSS on Ti6Al4V surfaces.

Fig. 3A presents the process used for ultrasonic bath tests over the 3 weeks cultivated living fibroblasts layer, stained with methylene blue to facilitate the visualization of cell layer detachment. Fig. 3B shows the images of gingival tissue-like on every surface at two time points (0 s and 30 s) of the US bath test. The evolution of the percent of covered area is

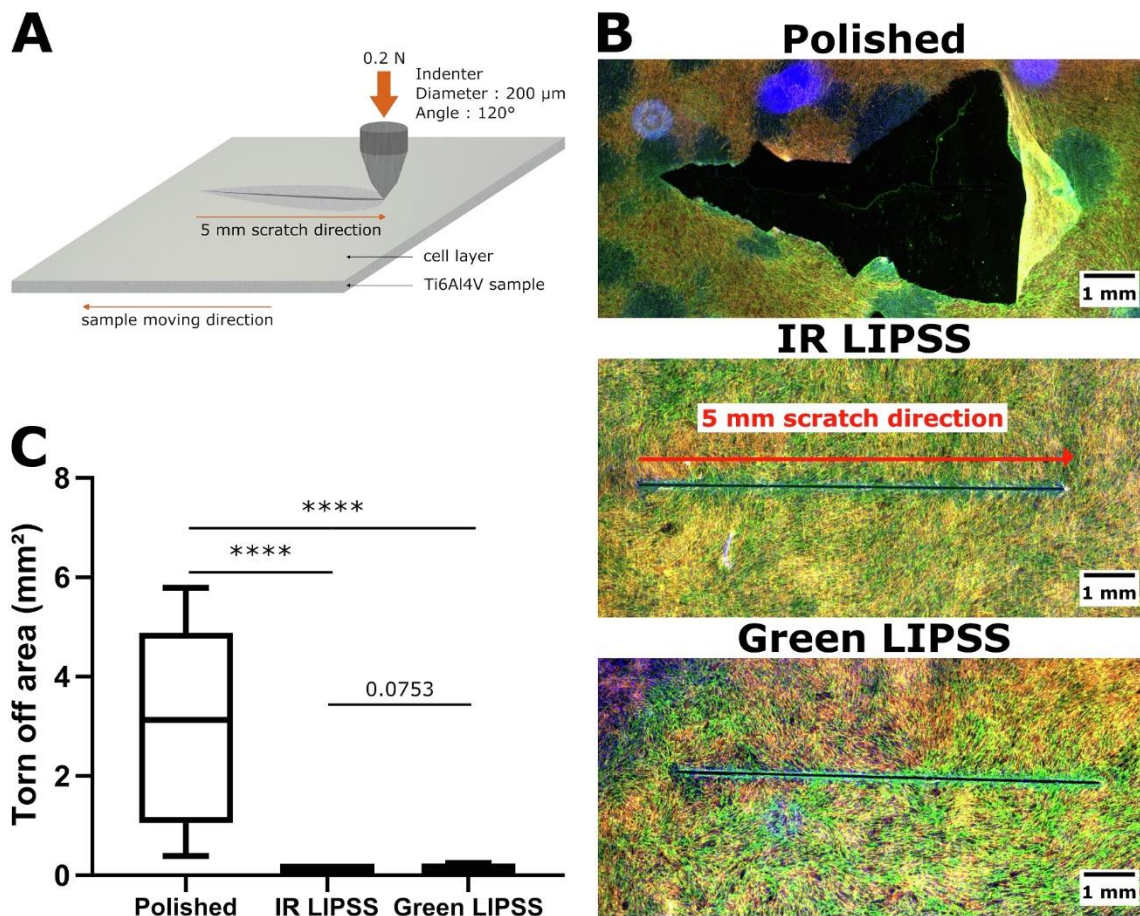


Fig. 2. Scratch tests to evaluate fibroblasts adhesion on the different surfaces. **A.** Schematic of scratch test realized with a sclerometer on living fibroblasts culture. **B.** Representative merged fluorescence images (red: cytoskeleton; blue: nucleus; green: fibronectin) of torn off fibroblastic layer after sclerometer scratch 3 weeks post seeding on polished, IR LIPSS or Green LIPSS samples. **C.** Graph represents the torn off area (mm^2) as a box plot. Bottom and top bars stand for minimum and maximum concentrations. $n = 19$ scratches/group; Mann-Whitney U test; **** $p < 0.0001$.

shown over time for every surface in Fig. 3C. The time for mean detachment of 50% of the cell layer is presented as well. It takes at least twice the amount of time to remove half of the cell layer on Green LIPSS (40.2 s) and IR LIPSS (52 s) compared to control polished surface (19.7 s).

Both tested bacterial strains are presented over textured surfaces through SEM images in Fig. 4A; showing that IR LIPSS spatial period exhibit roughly the same dimensions of *S. mutans* whereas Green LIPSS are smaller than the size of this bacterium; and that both IR and Green LIPSS are smaller than *P. gingivalis* size. Imaging of stained bacteria after 48 h of cultured on partially textured samples (Fig. 4B), allowed for the quantification of bacterial adhesion over LIPSS with a ratio compared to adjacent control on bordering polished surfaces. Results presented in Fig. 4C showing a decrease of *S. mutans* adhesion on Green LIPSS by 4% compared to polished-control surfaces, and 7% compared to IR LIPSS. Whereas *P. gingivalis* adhesion is decreased respectively by 21% and 30% over IR and Green LIPSS compared to the polished-control.

4. Discussion

In the present study, we show that nanostructures produced by fs-L, also called LIPSS, are able to significantly improve gingival tissue-like adhesion, while limiting the adhesion of two oral bacteria involved in peri-implantitis.

Within minutes of implant surgery, proteins from saliva start to adhere on the implant surface and it is known that hydrophilic surfaces improve protein adsorption and therefore cell adhesion. Contact angle

testing can approximate how well a cell could adhere to a surface [27–29].

The LIPSS of our study generated with an IR or Green Laser are more hydrophilic than polished titanium-based surfaces. The link between fs-L induced topography and Ti6Al4V surface wettability agrees with previous studies, showing that surface texturing can increase hydrophilicity [29]. However, according to Kietzig [30], wettability change of metallic surfaces, induced by ultrafast laser texturing is not only due to topographic changes, but is also related to surface chemistry changes. To complete the characterization of the impact of LIPSS on cell adhesion, it would be interesting in the future to study the surface chemistry of Ti6Al4V samples to identify oxides known to form during fs-L texturing [31]. To this end, a combination of FIB-STEM [32], TOF-SIMS [33], RAMAN and XPS may be pursued to evaluate the oxide layer thickness, oxides composition and the adsorption at the oxidized surface. Nevertheless, the increased wettability is of interest for the adhesion of fibroblasts, as cells that properly adhere to a surface cover a wider area (by spreading or migration) and typically with considerable strength. Adhesion strength assays quantify how cells stay attached when a detachment force is added. These assays can range from analyzing the forces on a single cell to a population of cells. In the literature the methods generally used, tend to observe cell adhesion at the individual scale, such as staining focal contacts [34,35], a method more qualitative than quantitative, or micromanipulation with AFM [36] measuring the forces acting on a single cell. Few methods are available at the tissue or cell layer scale. Only new methods are being created combining AFM and other tools and techniques, but it requires specific and expensive

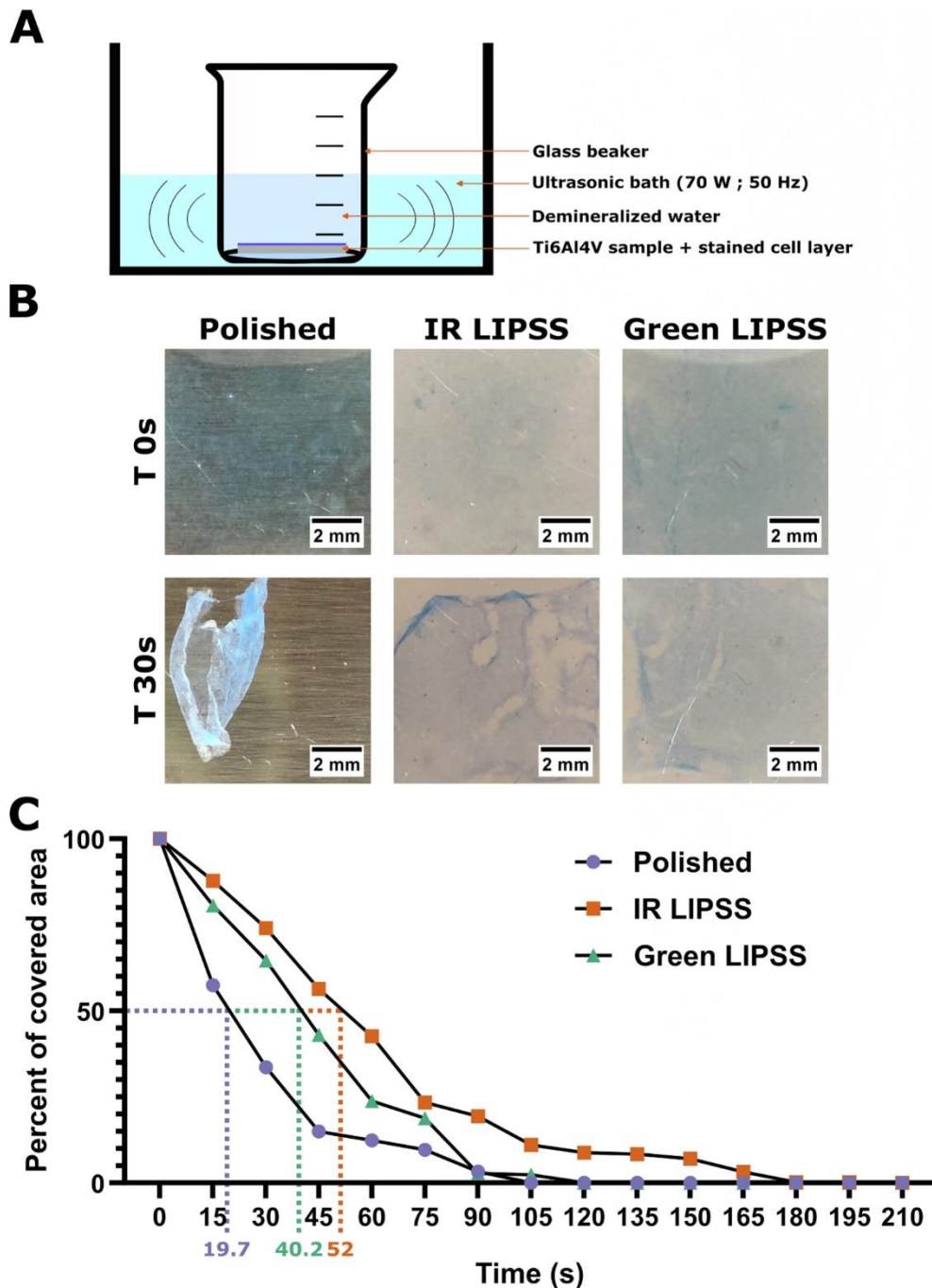


Fig. 3. Ultrasonic bath to evaluate fibroblasts adhesion on the different surfaces. **A.** Schematic of ultrasonic bath test realized on methylene blue stained living fibroblasts culture. **B.** Representative images of fibroblasts layers on polished, IR LIPSS and Green LIPSS samples before (T 0 s) and after 2 cycles (T 30 s) of ultrasonic bath. **C.** Graph presents the percentage of covered area over time as mean ($n = 5$); time for mean 50% of detachment is represented over x axis.

equipment [37]. There are other techniques, simpler to implement, but not fully accurate, such as the flow technique or the use of a centrifuge. Hydrodynamic shear assays and rotating disks are other methods but require specific cells and/or conditions (short term adhesion) [38,39]. In our study, a mechanical strategy using a sclerometer was developed to measure tissue-like adhesion on polished or nanotextured titanium surfaces, during a dynamic scratch test. The sclerometer method starts from the principle conventionally used in the industry to measure the adhesion of coatings. In an innovative way, we have diverted this method to apply it to the measurement of a cell layer adhesion. The results of this new method were confirmed by the ultrasonic bath cell detachment, generally used for cleaning surfaces, but the imaging over

time of tissue detachment proved to be very accurate to measure the adhesion of the tissue-like (time to detach 50% of the tissue). The use of fs-L texturing to improve cell adhesion on a surface have been studied on surfaces such as PET with imaging approach [40]. Here it is confirmed on titanium with methods closer to physiological and clinical context (scratch and ultrasonic bath tests); which is promising for dental implant applications. Sclerometer scratch tests presented in this study could be proposed as a new pre-clinical test to evaluate the performance of the surfaces of future dental implants. Indeed, in the context where lifespan of the implants is compromised by poor adhesion of gingival tissue to the Ti6Al4V surface, new tests are needed for the industrial level to quantitatively assess gingival tissue adhesion.

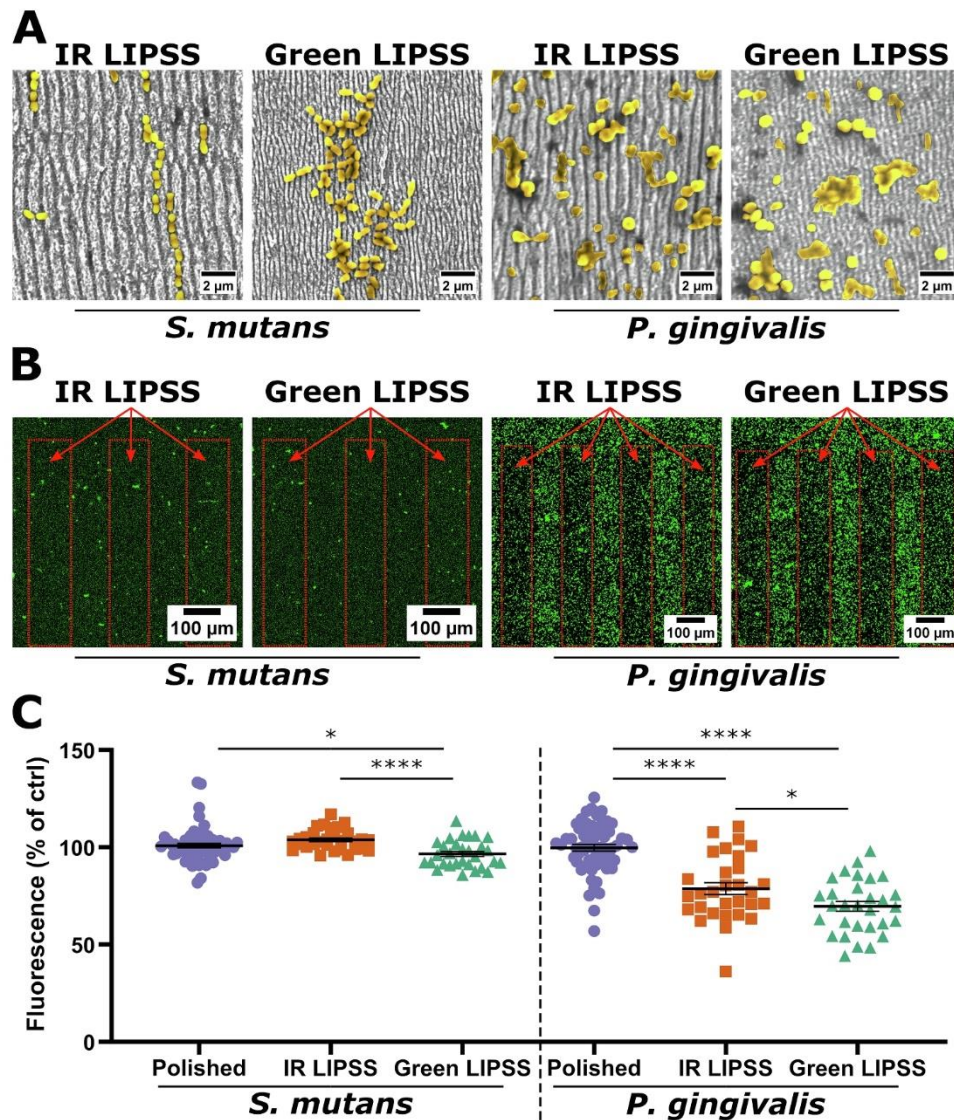


Fig. 4. Evaluation of *S. mutans* and *P. gingivalis* adhesion on the different surfaces. **A.** SEM images of *S. mutans* and *P. gingivalis* on IR LIPSS or Green LIPSS surfaces, bordered with adjacent polished surfaces. **B.** Representative fluorescence images of calcein-stained *S. mutans* and *P. gingivalis* 48 h post seeding on samples. **C.** Graph presenting the fluorescence quantification as mean \pm SEM. $n = 45$ area/group; t -test; * $p = 0.024$; **** $p < 0.0001$.

LIPSS attract lots of attention for implant surface improvement because it is a nanoscale topography, which can be simply generated on titanium alloys by a single-pass laser beam irradiation [18]. The presented results show that laser processing increased surface roughness and, in turn, the area available for fibroblast layer adhesion. On the other hand, the periodicity of ripples can be controlled and reduced by changing the laser wavelength in order to minimize the contact area between the surface and bacteria [41]. Laser processing is able to generate regular and precise nanostructures which lead to antibacterial properties [11,12]. Roughness is a measure of amplitude with no spatial information, so it needs to be paired with other surface parameters [42]. Therefore, it is important to identify nanostructures that can be repellent to bacteria. If we consider bacteria repellence by mechanical inhibition, it is clear that the contact surface between bacteria and the topography must be reduced. The correlation between biofilm organization and surface topography is consistent with a study from Epperlein [11] showing the antibacterial properties of IR LIPSS against bacteria larger than the topography spatial period. This point is definitely of major interest to avoid bacterial adhesion on a surface. So, it seems it is better to obtain a pattern with a spatial period lower than the bacteria diameter. The IR LIPSS spatial period is 760 nm while the Green LIPSS is 390

nm whereas the diameters of the two bacteria studied are about 500 nm to 1 μ m. From the SEM images, it is clearly seen that some *streptococci* can be mechanically retained in the valleys of IR LIPSS with the larger periodicity, due to their “double cocci” shape and their organization in chains. This retention in the valleys should be avoided as it could lead to the rapid development of a biofilm and difficulties in the implant cleaning. Bacterial adhesion evaluations of both strains, added to the size ratio between LIPSS and bacteria, underline the importance of reducing the area of contact between a single bacterium and the surface to reduce bacterial adhesion on surfaces such as Ti6Al4V. Our results confirm the findings of Linklater concerning the manufacturing of a “mechano-bactericidal surface pattern” [43]. One of our perspectives would be to use a fs-L with a lower wavelength, in particular at UV wavelength, in order to obtain LIPSS with smaller periodicity (around 200 nm) [44]. To go further than limiting bacterial adhesion, it is known that some bioinspired nanopillar structures can have a bactericidal effect. Density, spatial period and depth of ripples could be correlated with the “fakir effect” on the bacterium (like the bacterium is laying on a bed of nails) that disrupts membrane and thus proliferation [45]. For instance, nanopillars with a size of 60–215 nm and spaced out 100–380 nm, create a “mechanical bactericidal mechanism” that ruptures or

deforms bacterial cell membranes [18,43]. An important note is that this was achieved on a polymer surface, not a titanium-based one. In the present study, IR LIPSS decrease *P. gingivalis* adhesion (21% decrease) whereas Green LIPSS, thanks to its smaller spatial period, have shown antiadhesive properties for both *S. mutans* (4% decrease) and *P. gingivalis* (30% decrease); compared to polished surfaces. So, future works will assess different laser processing parameters in order to generate surface morphologies able to increase the efficiency of the anti-bacterial effect, or even better, obtain a bactericidal effect with nanospikes with a high height/width ratio. Even if this remains a challenge for fs-L texturing on titanium, this application of fs-L is really promising in terms of surface functionalization [46]. Regarding our results, Green LIPSS is probably the better candidate, presenting a rugosity that increases gingival tissue-like adhesion with an antiadhesive functionalization regarding both of our peri-implantitis associated bacteria.

5. Conclusions

Laser processing is able to generate reproducible nano-textures (LIPSS) on a titanium-based surface in a single-step process. The results presented show that the LIPSS according to their morphologies can render a dual functionality to the titanium-based surface of dental implants. The two types of LIPSS, IR and Green, allow better adhesion of human gingival fibroblasts on a long-term culture. Moreover, the LIPSS can also reduce the adhesion of *P. gingivalis* with better efficiency for Green LIPSS over IR LIPSS. Considering the results of this study, LIPSS might feature considerable potential for transgingival parts of dental implants, facilitating the attachment of soft tissue and inhibiting the adhesion of bacteria. Further investigations are needed to explore the *in vivo* and clinical implications.

Funding

This project was funded by the European Commission LaserImplant project, grant agreement number: 951730. This work has been funded by a public grant from the French National Research Agency (ANR) under the Investments for the Future Program (PIA), which has the reference EUR MANUTECH SLEIGHT - ANR-17-EURE-0026.

CRediT authorship contribution statement

Steve Papa: Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **Alain Abou Khalil:** Validation, Resources, Writing – review & editing. **Hind Hamzeh-Cognasse:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Mireille Thomas:** Investigation, Resources, Writing – review & editing. **Mathieu Maalouf:** Writing – original draft, Writing – review & editing. **Yvan Di Maio:** Resources, Writing – review & editing. **Xxx Sedao:** Methodology, Validation, Resources, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Funding acquisition. **Alain Guignandon:** Conceptualization, Methodology, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Virginie Dumas:** Conceptualization, Methodology, Writing – original draft, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Steve PAPA reports financial support was provided by French National Research Agency (ANR) - EUR MANUTECH SLEIGHT - ANR-17-EURE-0026. Xxx Sedao reports financial support was provided by European Commission LaserImplant project, grant agreement number 951730.

Acknowledgement

The authors thank Marie-Ange Eyraud for help with bacterial tests and Sylvie Peyroche for help with cell culture. Also thanks to Maryane

Jacquier (SEM) and Claudie Petit (AFM) for help with microscopy acquisitions; finally thanks to Alina Hamri for help with wettability measurements and Ashlyn Hicks for the proofreading.

References

- [1] S. Spriano, S. Yamaguchi, F. Bairo, S. Ferraris, A critical review of multifunctional titanium surfaces: New frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination, *Acta Biomater.* 79 (2018) 1–22, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.013>.
- [2] S. Ferraris, A. Cochis, M. Cazzola, M. Tortello, A. Scalia, S. Spriano, L. Rimondini, Cytocompatible and Anti-bacterial Adhesion Nanotextured Titanium Oxide Layer on Titanium Surfaces for Dental and Orthopedic Implants, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7 (2019) 103, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00103>.
- [3] V. Moraschini, L.A.d.C. Poubel, V.F. Ferreira, E.D.S.P. Barboza, Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: a systematic review, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 44 (3) (2015) 377–388, <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2014.10.023>.
- [4] F. Schwarz, J. Derks, A. Monje, H.-L. Wang, Peri-implantitis, *J. Periodontol.* 89 (2018) S267–S290, <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0350>.
- [5] C.R. Arciola, D. Canipocchia, L. Montanaro, Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion, *Nat. Rev. Microbiol.* 16 (7) (2018) 397–409, <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0019-y>.
- [6] A. Shatta, S. Anil, Peri-Implantitis Revisited, *IntechOpen* (2021), <https://doi.org/10.5772/intechopen.100293>.
- [7] P. Simonis, T. Dufour, H. Tenenbaum, Long-term implant survival and success: a 10–16-year follow-up of non-submerged dental implants: Long-term implant survival and success, *Clin. Oral Implants Res.* 21 (2010) 772–777, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2010.01912.x>.
- [8] L.A. Damiati, M.P. Tsimbouri, V.-L. Hernandez, V. Jayawarna, M. Ginty, P. Childs, Y. Xiao, K. Burgess, J. Wells, M.R. Sprott, R.M.D. Meek, P. Li, R.O.C. Oreffo, A. Nobbs, G. Ramage, B.o. Su, M. Salmeron Sanchez, M.J. Dalby, Materials driven fibronectin assembly on nanoscale topography enhances mesenchymal stem cell adhesion, protecting cells from bacterial virulence factors and preventing biofilm formation, *Biomaterials* 280 (2022) 121263, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121263>.
- [9] B. Aslam, W. Wang, M.I. Arshad, M. Khurshid, S. Muzammil, M.H. Rasool, M. A. Nisar, R.F. Alvi, M.A. Aslam, M.U. Qamar, M.K.F. Salamat, Z. Baloch, Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis, *Infect. Drug Resist.* 11 (2018) 1645–1658, <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>.
- [10] W. Teughels, N. Van Assche, I. Sliepen, M. Quirynen, Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development, *Clin. Oral Implants Res.* 17 (S2) (2006) 68–81, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x>.
- [11] N. Epperlein, F. Menzel, K. Schwibbert, R. Koter, J. Bonse, J. Sameith, J. Krüger, J. Toepele, Influence of femtosecond laser produced nanostructures on biofilm growth on steel, *Appl. Surf. Sci.* 418 (2017) 420–424, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.02.174>.
- [12] X. Luo, S. Yao, H. Zhang, M. Cai, W. Liu, R. Pan, C. Chen, X. Wang, L. Wang, M. Zhong, Biocompatible nano-ripples structured surfaces induced by femtosecond laser to rebel bacterial colonization and biofilm formation, *Opt. Laser Technol.* 124 (2020) 105973, <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2019.105973>.
- [13] K. Doll, E. Fadeeva, J. Schaeske, T. Ehmke, A. Winkel, A. Heisterkamp, B. N. Chichkov, M. Stiesch, N.S. Stumpff, Development of Laser-Structured Liquid-Infused Titanium with Strong Biofilm-Repellent Properties, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 9 (11) (2017) 9359–9368, <https://doi.org/10.1021/acsami.6b16159>.
- [14] A.H.A. Lutey, L. Gemini, L. Romoli, G. Lazzini, F. Fusco, M. Faucon, R. Kling, Towards Laser-Textured Antibacterial Surfaces, *Sci. Rep.* 8 (2018) 10112, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28454-2>.
- [15] V. Dumas, A. Rattner, L. Vico, E. Audouard, J.C. Dumas, P. Naisson, P. Bertrand, Multiscale grooved titanium processed with femtosecond laser influences mesenchymal stem cell morphology, adhesion, and matrix organization, *J. Biomed. Mater. Res. A* 100A (11) (2012) 3108–3116, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34239>.
- [16] A. Cunha, O.F. Zouani, L. Plawinski, A.M. Botelho do Rego, A. Almeida, R. Vilar, M. C. Durrieu, Human mesenchymal stem cell behavior on femtosecond laser-textured Ti-6Al-4V surfaces, *Nanomater.* 10 (5) (2015) 725–739, <https://doi.org/10.2217/nmm.15.19>.
- [17] M. Maalouf, A. Abou Khalil, Y. Di Maio, S. Papa, X. Sedao, E. Dalix, S. Peyroche, A. Guignandon, V. Dumas, Polarization of Femtosecond Laser for Titanium Alloy Nanopatterning Influences Osteoblastic Differentiation, *Nanomaterials.* 12 (2022) 1619, <https://doi.org/10.3390/nano12101619>.
- [18] C. Florian, S.V. Kirner, J. Krüger, J. Bonse, Surface functionalization by laser-induced periodic surface structures, *J. Laser Appl.* 32 (2) (2020) 022063, <https://doi.org/10.2351/7.0000103>.
- [19] A. San-Blas, M. Martinez-Calderon, J. Buencuerpo, L.M. Sanchez-Brea, J. del Hoyo, M. Gómez-Aranzadi, A. Rodriguez, S.M. Olaizola, Femtosecond laser fabrication of LIPSS-based waveplates on metallic surfaces, *Appl. Surf. Sci.* 520 (2020) 146328, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.146328>.
- [20] S.S. Socransky, Microbiology of periodontal disease – present status and future considerations, *J. Periodontol.* 48 (9) (1977) 497–504, <https://doi.org/10.1902/jop.1977.48.9.497>.

- [21] A. Butera, M. Pascadopoli, M. Pellegrini, S. Gallo, P. Zampetti, A. Scribante, Oral Microbiota in Patients with Peri-Implant Disease: A Narrative Review, *Appl. Sci.* 12 (2022) 3250, <https://doi.org/10.3390/app12073250>.
- [22] Y. Hao, X. Huang, X. Zhou, M. Li, B. Ren, X. Peng, L. Cheng, Influence of Dental Prosthesis and Restorative Materials Interface on Oral Biofilms, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 3157, <https://doi.org/10.3390/ijms19103157>.
- [23] S.E. Mountcastle, S.C. Cox, R.L. Sammons, S. Jabbari, R.M. Shelton, S.A. Kuehne, A review of co-culture models to study the oral microenvironment and disease, *J. Oral Microbiol.* 12 (1) (2020) 1773122, <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1773122>.
- [24] S. Ivanovski, R. Lee, Comparison of peri-implant and periodontal marginal soft tissues in health and disease, *Periodontol.* 2000 (76) (2018) 116–130, <https://doi.org/10.1111/prd.12150>.
- [25] T. Guo, K. Gulati, H. Arora, P. Han, B. Fournier, S. Ivanovski, Race to invade: Understanding soft tissue integration at the transmucosal region of titanium dental implants, *Dent. Mater. Off. Publ. Acad. Dent. Mater.* 37 (5) (2021) 816–831, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2021.02.005>.
- [26] M.Á. Pacha-Olivera, R. Tejero, M.C. Fernández-Calderón, E. Anitua, M. Troya, M. L. González-Martín, Relevance of Topographic Parameters on the Adhesion and Proliferation of Human Gingival Fibroblasts and Oral Bacterial Strains, *BioMed Res. Int.* 2019 (2019) 1–13, <https://doi.org/10.1155/2019/8456342>.
- [27] H. Noh, E.A. Vogler, Volumetric Interpretation of Protein Adsorption: Competition from Mixtures and the Vroman Effect, *Biomaterials* 28 (3) (2007) 405–422, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.006>.
- [28] S.M. Oliveira, N.M. Alves, J.F. Mano, Cell interactions with superhydrophilic and superhydrophobic surfaces, *J. Adhes. Sci. Technol.* 28 (8–9) (2014) 843–863, <https://doi.org/10.1080/01694243.2012.697776>.
- [29] O. Raimbault, S. Benayoun, K. Anselme, C. Maclair, T. Bourgade, A.-M. Kietzig, P.-L. Girard-Lauriault, S. Valette, C. Donnet, The effects of femtosecond laser-textured Ti-6Al-4V on wettability and cell response, *Mater. Sci. Eng. C* 69 (2016) 311–320, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.06.072>.
- [30] A.-M. Kietzig, S.G. Hatzikiriakos, P. Englezos, Patterned Superhydrophobic Metallic Surfaces, *Langmuir* 25 (8) (2009) 4821–4827, <https://doi.org/10.1021/la8037582>.
- [31] P. Segovia, A. Wong, R. Santillan, M. Camacho-Lopez, S. Camacho-Lopez, Multi-phase titanium oxide LIPSS formation under fs laser irradiation on titanium thin films in ambient air, *Opt. Mater. Express.* 11 (9) (2021) 2892, <https://doi.org/10.1364/OME.431210>.
- [32] M. Prudent, D. Iabbaden, F. Bourquard, S. Reynaud, Y. Lefkir, A. Borroto, J.-F. Pierson, F. Garrelie, J.-P. Colombier, High-Density Nanowells Formation in Ultrafast Laser-Irradiated Thin Film Metallic Glass, *Nano-Micro Lett.* 14 (2022) 103, <https://doi.org/10.1007/s40820-022-00850-4>.
- [33] C. Florian, D. Fischer, K. Freiberg, M. Duwe, M. Sahre, S. Schneider, A. Hertwig, J. Krüger, M. Rettenmayr, U. Beck, A. Undisz, J. Bonse, Single Femtosecond Laser-Pulse-Induced Superficial Amorphization and Re-Crystallization of Silicon, *Materials* 14 (2021) 1651, <https://doi.org/10.3390/ma14071651>.
- [34] V. Dumas, A. Guignandon, L. Vico, C. Maclair, X. Zapata, M.T. Linossier, W. Boulefour, J. Granier, S. Peyroche, J.-C. Dumas, H. Zahouani, A. Rattner, Femtosecond laser nano/micro patterning of titanium influences mesenchymal stem cell adhesion and commitment, *Biomater. Mater.* 10 (5) (2015) 055002, <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/5/055002>.
- [35] A. Klos, X. Sedao, T.E. Itina, C. Helfenstein-Didier, C. Donnet, S. Peyroche, L. Vico, A. Guignandon, V. Dumas, Ultrafast Laser Processing of Nanostructured Patterns for the Control of Cell Adhesion and Migration on Titanium Alloy, *Nanomaterials* 10 (2020) 864, <https://doi.org/10.3390/nano10050864>.
- [36] S. Hsiao, A. Crow, W. Lam, C. Bertozzi, D. Fletcher, M. Francis, DNA-coated AFM cantilevers for the investigation of cell adhesion and the patterning of live cells, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 47 (44) (2008) 8473–8477, <https://doi.org/10.1002/anie.200802525>.
- [37] A. Sancho, I. Vandersmissen, S. Craps, A. Luttun, J. Groll, A new strategy to measure intercellular adhesion forces in mature cell-cell contacts, *Sci. Rep.* 7 (2017) 46152, <https://doi.org/10.1038/srep46152>.
- [38] A. Ahmad Khalili, M.R. Ahmad, A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 18149–18184, <https://doi.org/10.3390/ijms160818149>.
- [39] D.W. Zhou, A.J. García, Measurement Systems for Cell Adhesive Forces, *J. Biomech. Eng.* 137 (2015) 0209081–0209088, <https://doi.org/10.1115/1.4029210>.
- [40] E. Babaliari, P. Kavatzikidou, D. Angelaki, L. Chaniotaki, A. Manousaki, A. Siakouli-Galanopoulou, A. Ranella, E. Stratakis, Engineering Cell Adhesion and Orientation via Ultrafast Laser Fabricated Microstructured Substrates, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 2053, <https://doi.org/10.3390/ijms19072053>.
- [41] S.W. Lee, K.S. Phillips, H. Gu, M. Kazenzadeh-Narbat, D. Ren, How microbes read the map: Effects of implant topography on bacterial adhesion and biofilm formation, *Biomaterials* 268 (2021) 120595, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120595>.
- [42] Y. Cheng, G. Feng, C.I. Moraru, Micro- and Nanotopography Sensitive Bacterial Attachment Mechanisms: A Review, *Front. Microbiol.* 10 (2019). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00191> (accessed June 22, 2022).
- [43] D.P. Linklater, V.A. Baulin, S. Juodkakis, R.J. Crawford, P. Stoodley, E.P. Ivanova, Mechano-bactericidal actions of nanostructured surfaces, *Nat. Rev. Microbiol.* 19 (1) (2021) 8–22, <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0414-z>.
- [44] N.A. Yahaya, N. Yamada, Y. Kotaki, T. Nakayama, Characterization of light absorption in thin-film silicon with periodic nanohole arrays, *Opt. Express.* 21 (2013) 5924–5930, <https://doi.org/10.1364/OE.21.005924>.
- [45] G. Lazzini, L. Romoli, A.H.A. Lutey, F. Fuso, Modelling the interaction between bacterial cells and laser-textured surfaces, *Surf. Coat. Technol.* 375 (2019) 8–14, <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.06.078>.
- [46] A. Nakhoul, C. Maurice, M. Agoyan, A. Rudenko, F. Garrelie, F. Pigeon, J.-P. Colombier, Self Organization Regimes Induced by Ultrafast Laser on Surfaces in the Tens of Nanometer Scales, *Nanomater. Basel Switz.* 11 (2021) 1020, <https://doi.org/10.3390/nano11041020>.

Impact des LIPSS sur l'adhérence de :

-  fibroblastes gingivaux
-  *S. mutans*
-  *P. gingivalis*

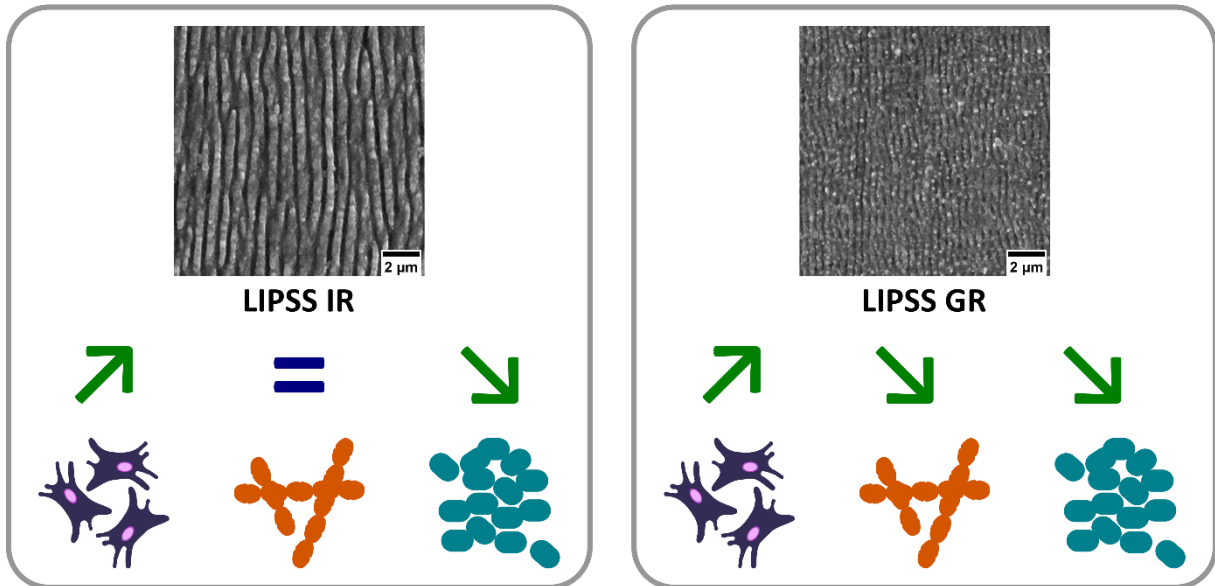


Figure 19 – Résumé graphique : Une évaluation de l'adhérence cellulaire et bactérienne sur des surfaces texturées par fs-L a montré une augmentation de l'adhérence d'une culture de fibroblastes gingivaux (LIPSS IR et GR) ainsi qu'une diminution de l'adhérence de *S. mutans* (LIPSS GR) et de *P. gingivalis* (LIPSS IR et GR).

D. Adhérence cellulaire en conditions pro-inflammatoires

Les résultats présentés dans la partie précédente ont montré une multifonctionnalité des surfaces présentant des LIPSS IR ou des LIPSS GR, en augmentant l'adhérence des HGnF tout en limitant l'adhérence de souches bactériennes orales. Cependant, ces deux aspects ont été démontrés de manières indépendantes. Les travaux suivants visent donc à valider ces surfaces en évaluant l'adhérence des HGnF dans des conditions pro-inflammatoires se rapprochant d'une situation clinique de péri-implantite.

1. Matériels et Méthodes

Irradiation fs-L

Des échantillons d'alliage de titane Ti6Al4V poli miroir ont été achetés auprès de Goodfellow (Huntingdon, Royaume-Uni). Les échantillons de Ti6Al4V ont été dimensionnés en carrés d'une surface de 1 cm² et d'une épaisseur de 1 mm par le fournisseur avant l'expédition.

La génération des LIPSS IR et GR par fs-L suit le même protocole que celui décrit dans l'article présenté dans la partie III.C de ce manuscrit [258].

Culture cellulaire

Des HGnF fournis par Clinisciences sont maintenus en culture en flasque T75 jusqu'à 70% confluence dans le milieu de culture (ScienCell I2301-SC). Les cellules sontensemencées à P6 sur des échantillons de Ti6Al4V poli (1cm²) à une densité de 50 000 cellules/cm² en plaques de 24 puits dans le milieu de culture. A 24h post-ensemencement les échantillons sont déplacés dans un nouveau puits avec du milieu de culture propre. Le milieu de culture est renouvelé tous les 4 jours. A J13, à J15 ou à J17 le milieu est remplacé par un milieu contenant du Facteur de Nécrose Tumorale alpha (TNF- α) à 50 ng/mL et des LPS de *P. gingivalis* (InvivoGen ; tlrI-pglps) à 1 μ g/mL.

Tests d'adhérence cellulaire

L'adhérence cellulaire est évaluée à J18 sur des cultures vivantes. Les protocoles suivis pour le test d'arrachement par scléromètre, le marquage fluorescent (noyaux, actine, fibronectine), l'acquisition et le traitement des images sont ceux décrits dans l'article présenté dans la partie III.C de ce manuscrit [258].

2. Résultats

Les graphiques de la Figure 20 représentent la quantification de l'aire d'actine arrachée par scléromètre sur des échantillons de Ti6Al4V. Cette aire est significativement plus importante sur les surfaces polies de référence que sur les surfaces texturées par fs-L (LIPSS IR et GR), indépendamment du traitement TNF- α / LPS (box plots de gauche). Aucune différence significative n'est observée sur les échantillons polis traités au TNF- α / LPS par rapport à leurs contrôles respectifs, quel que soit le temps de traitement. Une diminution de l'aire arrachée

est observée sur les LIPSS IR traité au TNF- α / LPS pendant 24h (Figure 20.A). L'aire arraché est significativement plus importante sur les LIPSS GR après 72h (Figure 20.B) et après 5 jours (Figure 20.C) de traitement TNF- α / LPS, par rapport à leurs contrôles respectifs et par rapport au LIPSS IR.

Au regard de ces résultats, le même procédé de quantification de l'aire arrachée a été réalisé pour la fibronectine, après 24h (Figure 21.A) et 72h (Figure 21.B) de traitement TNF- α / LPS. Comme pour l'actine, l'aire de fibronectine arrachée est significativement plus importante sur les surfaces polies de référence que sur les surfaces texturées par fs-L (LIPSS IR et GR), indépendamment du traitement TNF- α / LPS (box plots de gauche). Après 24h de traitement TNF- α / LPS (Figure 21.A), aucune différence significative n'est observée par rapport aux contrôles. Après 72h de traitement TNF- α / LPS l'aire de fibronectine arrachée sur les LIPSS IR et GR est plus importante que sur leurs contrôles respectifs (Figure 21.B).

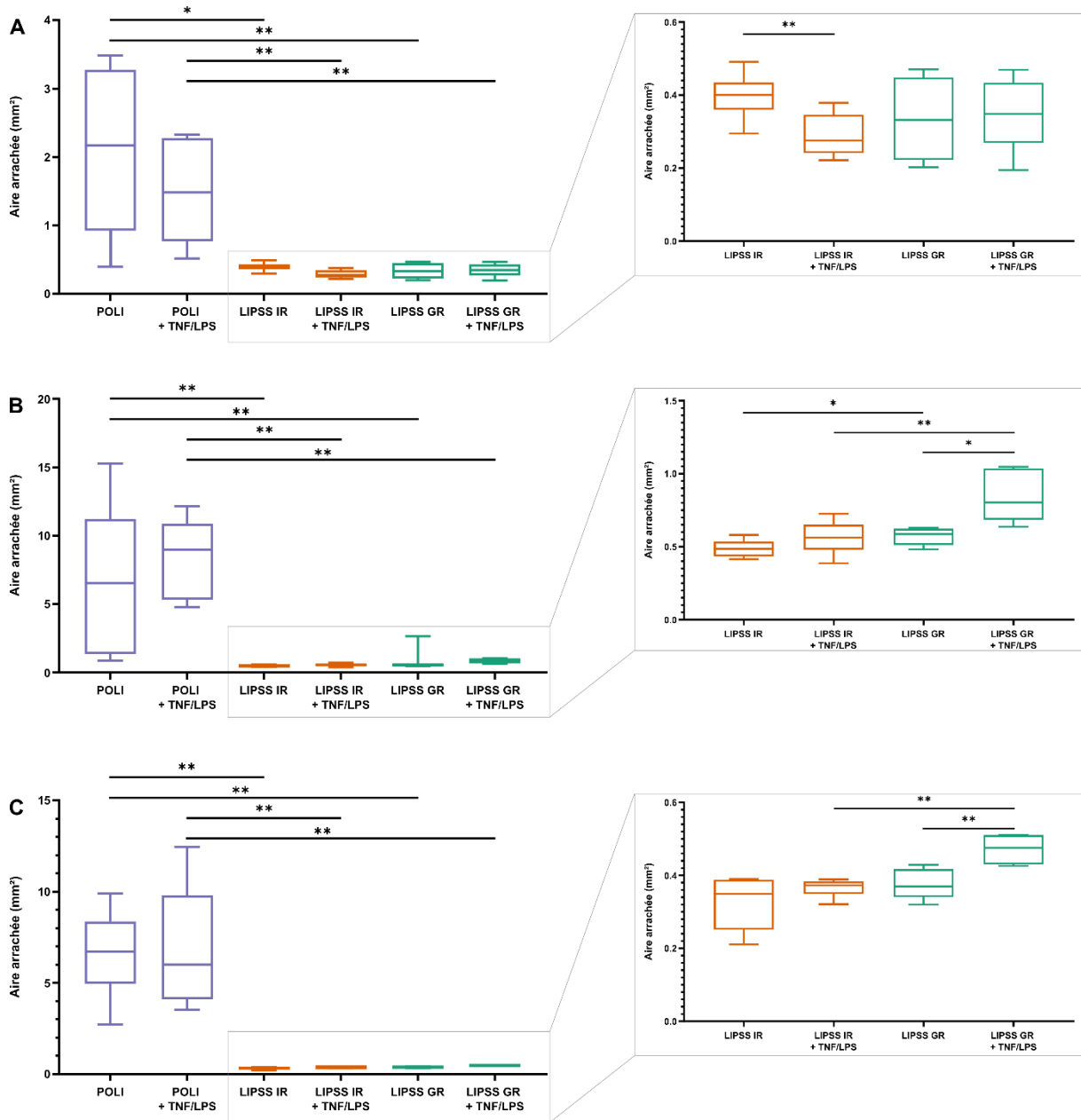


Figure 20 – Représentation graphique des tests d'arrachement cellulaire par scléromètre après 24h (A), 72h (B) et 5 jours (C) de traitement TNF- α / LPS. Les box plot (minimum à maximum) représentent l'aire arrachée (mm²) mesurée par imagerie du cytosquelette d'actine ; les box plot présents à droite correspondent à un agrandissement d'échelle sur une portion des box plot de gauche ; n = 6 rayures/groupe ; Mann-Whitney U test ; * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$.

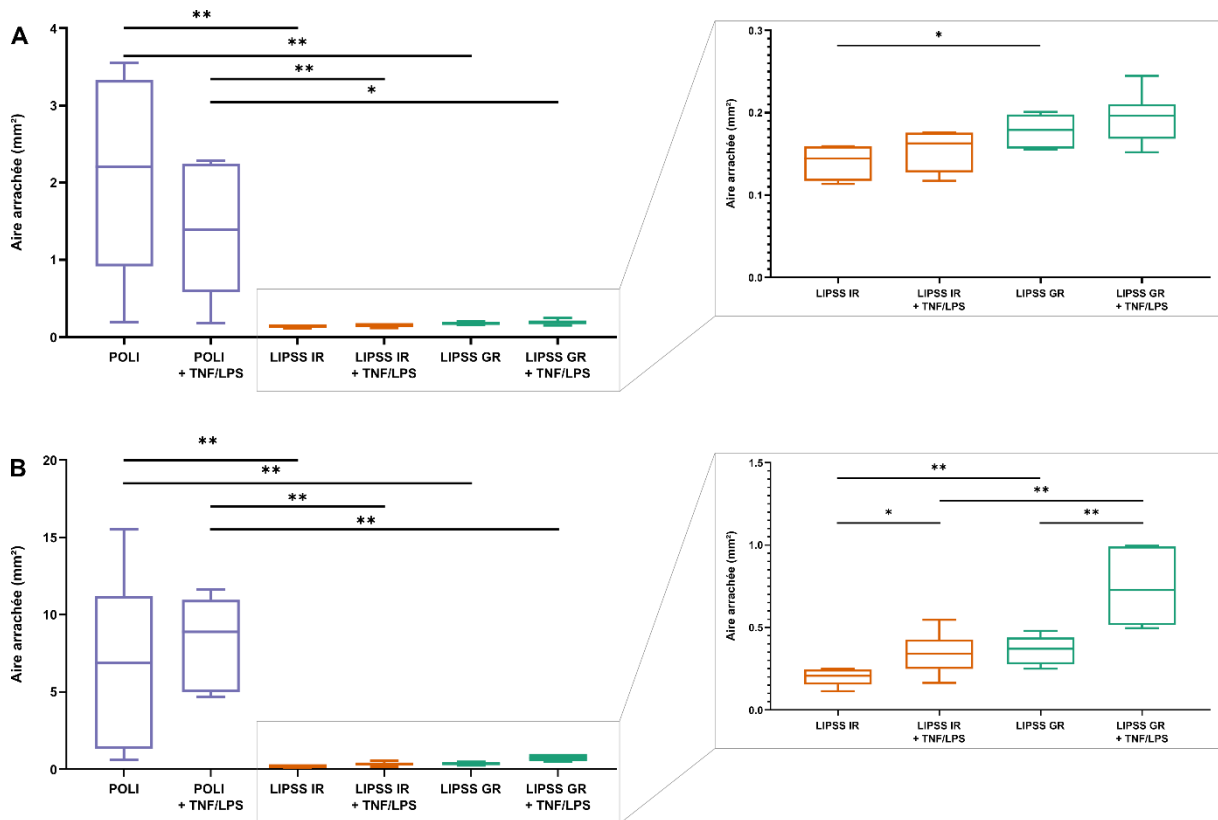


Figure 21 – Représentation graphique des tests d'arrachement de la MEC par scléromètre après 24h (A) et 72h (B) de traitement TNF- α / LPS. Les box plot (minimum à maximum) représentent l'aire arrachée (mm²) mesurée par imagerie de la fibronectine ; les box plot présents à droite correspondent à un agrandissement d'échelle sur une portion des box plot de gauche ; n = 6 rayures/groupe ; Mann-Whitney *U* test ; * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$.

3. Discussion et perspectives

La situation de péri-implantite peut se résumer à une réaction inflammatoire induite par une infection bactérienne. Les conditions pro-inflammatoires présentées dans cette partie visent donc à simuler une situation simplifiée de péri-implantite, en ajoutant à la culture de HGnF des LPS issus de la membrane de *P. gingivalis* combiné à la cytokine pro-inflammatoire TNF- α .

L'adhérence des cultures de HGnF traitées par TNF- α / LPS a été évaluée par test de détachement par bain à US (données non présentées) selon le protocole décrit dans l'étude précédente [258]. Malheureusement cette approche s'est révélée insuffisamment précise pour évaluer des différences d'adhérence induite par la condition pro-inflammatoire, contrairement à ceux induits par modification de la surface de culture. En conséquence, seule l'évaluation de l'adhérence cellulaire avec le test d'arrachement par scléromètre est présentée pour cette étude.

L'effet du traitement TNF- α / LPS est observable à partir de 72h de traitement, induisant une diminution de l'adhérence des HGnF (actine) sur les LIPSS GR et une diminution de l'adhérence

de la matrice (fibronectine) sur les LIPSS IR et les LIPSS GR. Toutefois, malgré la situation pro-inflammatoire, les surfaces texturées par fs-L présentent une meilleure adhérence cellulaire et matricielle que les surfaces de Ti6Al4V polies.

Bien évidemment ce modèle simplifié de péri-implantite est très éloigné des conditions cliniques où les cellules sont en contact direct avec une ensemble de souches bactériennes et stimulées par un ensemble de facteurs inflammatoires [259–261]. L'utilisation seule des LPS permet une approche sûre en termes de culture cellulaire, mais semble trop souple au vu de sa faible influence sur l'adhérence du tissu fibroblastique. De même, une condition pro-inflammatoire implique également d'autres cytokines comme l'interleukine-1, l'interleukine-6 ou encore des chimiokines... [262]. Un modèle plus réaliste nécessite donc la présence de souches bactériennes complètes, ainsi qu'un mélange de protéines pro-inflammatoire variées.

IV

Discussion et limites

L'ambition principale de ce projet était d'identifier une topographie ou un assemblage de topographies, permettant de fonctionnaliser les implants dentaires à base de titane avec des surfaces duelles (pro-adhésives pour les cellules eucaryotes et antibactériennes). Dans un premier temps une exploration des topographies réalisables sur Ti6Al4V et leur caractérisation a été entreprise ; par la suite les travaux devaient évaluer l'impact de ces topographies sur l'adhérence bactérienne et cellulaire dans des conditions physiologiques, puis dans des conditions se rapprochant d'un cas clinique de péri-implantite (situation pro-inflammatoire et/ou infectieuse).

Le fs-L a été choisi comme procédé pour sa variabilité de paramètres, ce qui s'est assez rapidement révélé être autant un avantage qu'un inconvénient. Les paramètres de texturation étant nombreux (paramètres laser mais également organisation spatiale des zones d'interface laser-matière), l'exploration initiale des texturations réalisables était assez fastidieuse. Les premières expérimentations bactériologiques ont permis d'identifier les problématiques principales. L'absence d'homogénéité dans la répartition des bactéries, au cours des tests d'adhérence, nous a amené à repenser l'organisation des texturations fs-L sous forme de bandes texturées espacées par des surfaces polies pour obtenir des contrôles locaux, réalistes par rapport à la densité bactérienne hétérogène. La modification de certains paramètres lasers, notamment la puissance, peut rapidement amener à la génération de topographies moins régulières et parfois plus micrométriques par endroit, créant des points d'accroche importants pour les bactéries. Il en va de même pour la texturation par laser UV qui a dû être en partie mise de côté car les connaissances techniques de cette source de laser sont encore à des stades précoces d'optimisation, ce qui ne permet que difficilement une texturation régulière sur une surface suffisamment significative pour une évaluation de ses propriétés biologiques. Ces observations ont mené à une étude pour identifier les paramètres topographiques reliés à l'adhérence bactérienne. Par variation de la polarisation et de la puissance du faisceau, des surfaces pro-bactériennes, à différents degrés, ont été générées, permettant ainsi d'identifier des paramètres clés corrélés à l'adhérence bactérienne. Cette avancée permet notamment de cibler de manière plus restreinte une gamme de topographies d'intérêt, ce qui facilite la partie usinage par fs-L, en éliminant d'office certaines catégories de topographies de surface probactériennes. Cette étude rejoint un point mis en évidence dans l'état de l'art [72,128,129] qui suggère la nécessité de décrire plus précisément les topographies de surface, contrairement à l'évaluation classique se limitant à un ou deux paramètres de rugosité généraux. Il est essentiel d'adapter l'échelle de caractérisation topographique à la problématique étudiée [128], et plus généralement il y a un réel intérêt à développer des outils de caractérisation multi échelles [263].

Pour des raisons techniques (réalisation des texturations fs-L) et économiques (coût des matériaux), la réutilisation des échantillons de Ti6Al4V s'est présentée comme une solution viable. Cependant, les travaux sur l'évolution de la mouillabilité nous montrent que dans le cas d'échantillons texturés par fs-L, les tests initiaux conditionnent les propriétés à venir de la surface, en accord avec la littérature [64,70]. Cela questionne sur la possibilité de réutiliser les matériaux sur plusieurs sessions d'expérimentation. Cette limite ne s'applique toutefois qu'aux tests *in vitro*, car cliniquement il est inenvisageable de réutiliser plusieurs fois un même implant, cet aspect technique est non négligeable et reste à prendre en compte pour les projets *in vitro* à venir.

Les tests d'adhérence cellulaire classiques permettent d'étudier l'adhérence d'une cellule à une surface, une matrice ou une autre cellule [250] ; cependant dans notre contexte il est essentiel d'évaluer l'adhérence d'un tapis cellulaire à une surface pour se rapprocher d'une situation d'interface tissu-implant. Il a donc fallu optimiser de nouvelles approches, à savoir le test d'arrachement par scléromètre et le test de détachement par bain à US.

Le test d'arrachement se base sur une déstabilisation locale du tapis cellulaire, et présente un avantage majeur de reproductibilité, puisque que la force appliquée, la distance et la vitesse de l'arrachement, sont contrôlés informatiquement. Initialement le système de mesure était supposé permettre une quantification des forces d'arrachement ; cependant, même en appliquant la force la plus faible, le tapis cellulaire monocouche n'oppose pas une résistance mécanique suffisante, l'indenteur vient donc rayer la surface de l'échantillon et les forces mesurées sont équivalentes à la résistance à la rayure du Ti6Al4V. Le scléromètre reste un outil pertinent pour la reproductibilité des rayures effectuées. Une méthode alternative d'évaluation de l'adhérence d'un tissu cellulaire monocouche a donc été de quantifier l'aire d'arrachement. Une autre solution a été envisagée, celle d'évaluer l'adhérence d'un tissu 3D (données non présentées dans ce manuscrit). La première approche se basait sur la réalisation d'un tissu cellulaire multicouche, en réalisant plusieurs ensemencements successifs ; cependant la résistance mécanique opposée par le tapis généré n'était toujours pas suffisante face à la charge appliquée par le scléromètre. La seconde approche visait à réaliser des sphéroïdes de Matrigel contenant des cellules, en variant les conditions de conception (composition et volume des sphéroïdes, conditionnement de la surface, temps de culture avant contact sphéroïde-surface...) puis évaluer leur résistance à l'arrachement. Cependant, si la culture d'organoïdes non adhérents est accessible avec une très bonne auto-organisation, l'interface avec une surface de Ti6Al4V offrant une bonne adhérence, une auto-organisation cellulaire correcte, tout en générant une forme exploitable pour le test d'arrachement par scléromètre, est un verrou technique important. Finalement les sphéroïdes, tout comme les cultures cellulaires évoquées précédemment, n'ont pas opposé une résistance mécanique suffisante pour empêcher l'indenteur d'aller au contact de la surface de Ti6Al4V ; de plus les sphéroïdes étant très peu adhérents à la surface, ils se sont immédiatement détachés sous la force appliquée par le scléromètre. Cet outil présente l'avantage évoqué précédemment de permettre un test d'arrachement reproductible, cependant, c'est un outil conçu pour des

surfaces opposant une résistance mécanique nettement supérieure à celle d'une culture cellulaire ou d'un tissu mou. L'AFM permettrait une nano indentation également reproductible, cependant cette technique utilisée pour évaluer l'adhérence de cellules isolées n'est pas applicable à une culture cellulaire plus élaborée [254,255]. Il serait intéressant de développer un outil de mesure de l'adhérence à une échelle intermédiaire, permettant une mesure de la résistance à l'arrachement reproductible tout en appliquant une force adaptée à la résistance mécanique d'un tapis cellulaire. Le scléromètre permet donc d'évaluer l'adhérence cellulaire, par mesure de l'aire d'arrachement, dans le cas de modifications de surfaces ayant un impact important sur cette interface cellules-matériau ; cependant, lorsque l'objectif est de déstabiliser cette interface par simulation de conditions pro-inflammatoires, la différence en termes de surface d'arrachement est beaucoup moins marquée. Cela confirme l'absence de sensibilité du scléromètre et la nécessité de développer ou d'adapter un outil similaire avec une force d'arrachement adapté à notre modèle [264]. La déstabilisation locale du tapis cellulaire permet certes d'évaluer l'adhérence cellulaire, mais peut également être influencée par la cohésion de la culture, ce qui nécessitait donc la confirmation des résultats par une approche complémentaire.

Le test de détachement par US se base sur une déstabilisation globale du tapis cellulaire (par choc mécanique, mouvement de fluides...), ce qui permet de s'affranchir de l'influence de la cohésion, étant donné que chaque cellule est déstabilisée à son échelle de la même manière. C'est un test fiable de mesure de l'adhérence, mais ses freins sont également majoritairement techniques. L'observation n'est pas évidente car elle nécessite une mesure à des temps réguliers assez courts ce qui implique un certain nombre de manipulations des échantillons. De plus, l'interprétation/quantification des images est par la suite difficile, car le détachement du tapis cellulaire est observé macroscopiquement. Les quantifications devant rester entièrement objectives, pour des raisons évidentes d'éthique scientifique, les mesures sont assez limitées et basiques. De la même manière que pour le scléromètre, l'absence de sensibilité de la technique et des quantifications qui en découlent ne pose pas de problèmes lorsque l'adhérence est évaluée sur des surfaces topographiquement différentes, cependant lorsque l'objectif est de déstabiliser l'adhérence par un traitement pro-inflammatoire, les variations sont trop subtiles pour être évaluées avec une approche de détachement par US.

Ces travaux ont permis d'identifier des texturations fs-L permettant de bifonctionnaliser une surface de Ti6Al4V en améliorant l'adhérence cellulaire tout en limitant l'adhérence bactérienne de manière indépendante. L'étape suivante visait donc à valider la favorisation de l'adhérence cellulaire dans des conditions de culture non optimale, se rapprochant d'une situation clinique de péri-implantite [265]. La mise en place de ces conditions déstabilisantes a nécessité un travail préliminaire important pour identifier les concentrations d'agent infectieux (LPS ou bactéries) [260], de facteur pro inflammatoire (TNF- α)[261] ainsi que le temps de traitement. Ces différents paramètres sont essentiels car ils influencent directement l'interprétation des résultats, il faut s'assurer de déstabiliser la culture cellulaire pour pouvoir valider l'impact de la topographie de surface. C'est le cas des résultats présentés après 72h de

traitement TNF/LPS ; toutefois cette condition reste assez éloignée et peut être trop simplifiée en comparaison à une situation pathologique de péri-implantite. Une condition de coculture cellules-bactéries a été envisagée (non présentée dans ce manuscrit), mais de manière assez logique, à court terme les cellules ne sont pas déstabilisées par la présence des bactéries, et à plus long terme la contamination bactérienne est trop importante pour permettre une évaluation de l'adhérence cellulaire. Une solution intermédiaire (en cours d'exploration au moment de la rédaction de ce manuscrit) est donc d'inactiver la souche bactérienne (température élevée puis choc thermique) afin de créer une condition plus complexe qu'avec les LPS, puisque les cellules sont mises en contact de la bactérie dans son entièreté, sans pour autant risquer la contamination. Afin d'améliorer également l'aspect pro-inflammatoire de ces simulations de péri-implantite, une perspective serait d'élaborer un traitement incluant du TNF- α mais également d'autres facteurs tels que l'interleukine-1, l'interleukine-6... [262]. Cela implique cependant d'autres tests préliminaires pour déterminer les concentrations adaptées au modèle, ainsi qu'une méthode d'évaluation de l'adhérence plus sensible comme discuté précédemment.

V

Conclusion générale

Ce travail de thèse visait à améliorer les implants dentaires à base de titane, en fonctionnalisant leur surface par modification topographique. Son cahier des charges était diversifié et ambitieux, avec notamment la volonté de générer des surfaces multifonctionnelles par un procédé unique, le fs-L, dans un but d'optimisation industrielle.

Une étude de l'état de l'art autour des implants dentaires a permis de contextualiser le projet dans la problématique de la péri-implantite, qui est la cause principale d'échec implantaire dans les premières années suivant la pose d'implants [23,24,76]. Une présentation détaillée du fs-L a contribué à l'identifier comme le candidat idéal en termes de texturation de surface biocompatible et pérenne, notamment par sa capacité à générer des topographies répondant à un cahier des charges complexes (topographies différentes selon la partie de l'implant concerné, surface cylindrique, objectif de multi fonctionnalisation de la surface...) [54,56,56]. L'intérêt pour la micro/nano topographie se base sur une large littérature qui démontre l'impact qu'elle peut avoir tant sur l'adhérence bactérienne que sur le comportement cellulaire et tissulaire (gencive et os) [171,207,225,237,240,256]. La veille bibliographique menée pour ces travaux de thèse a conduit à envisager des topographies de surface présentant une dualité, favorisant l'adhérence fibroblastique tout en limitant le développement bactérien. L'importance de la standardisation de la caractérisation topographique a également été soulevée en s'appuyant sur la littérature. Il a de plus été mis en avant une nécessité technique de développer une approche simple et reproductible d'évaluation de l'adhérence d'un tapis cellulaire.

Au cours de ce projet, l'impact de la topographie sur l'adhérence bactérienne a été évalué en détails, permettant d'identifier des paramètres clés à prendre en considération lors de la texturation par fs-L, ce qui présente un avantage considérable pour la mise en place de futurs projets.

Concernant l'adhérence cellulaire, malgré certaines limites qui nécessiteraient le développement d'outils plus sensibles, notamment pour mesurer directement les forces d'adhérence et de cohésion du tapis cellulaire sur implant, la mise au point de notre test d'arrachement par rayure s'est révélée fiable et reproductible. Ce test a entre autres permis de valider la dualité des surfaces obtenues par irradiation fs-L dans des conditions inflammatoires préliminaires.

L'ensemble de ce projet a permis de mettre en évidence des topographies de surface (LIPSS IR et LIPSS GR), dont la dualité présente un intérêt pour une application en implantologie orale ; ce qui offre des perspectives d'application de la texturation de surface par fs-L, dans le domaine biomédical.

VI Collaborations et perspectives

Pour aller plus loin dans les tests *in vitro*, une culture cellulaire plus complexe pourrait être élaborée, incluant notamment des kératinocytes et des cellules de ligament parodontal, afin de se rapprocher de l'environnement tissulaire d'une dent naturelle [261]. De même, la condition infectieuse qui permet de valider notre modèle pourrait être complexifiée, avec une coculture de différentes souches bactériennes associées à la péri-implantite, ou encore en utilisant directement des échantillons de salive humaine [266]. Toutefois, bien que l'approche *in vitro* soit évidemment à prioriser au maximum, car elle permet de lever le voile sur de nombreux verrous techniques, l'expérimentation *in vivo* est une approche qui ne pourra être évitée à long terme, car même les modèles les plus élaborés ne permettraient probablement pas de modéliser les forces *in situ* de l'adhérence d'un tissu, ni d'avoir une résistance identique de celle qui existe pour supporter des forces de pression telles que la mastication.

L'implantologie orale représente un marché important parmi les biomatériaux, et possède donc, au-delà des enjeux cliniques et sociétaux, un intérêt industriel majeur. Le projet LASIMP a permis un travail collaboratif avec des acteurs tels que la plateforme Manutech USD, qui a entre autres une mission d'optimisation du processus d'industrialisation. Des travaux en cours visent notamment à évaluer le pourcentage de texturation nécessaire pour générer des surfaces multifonctionnelles, dans le but de réduire le temps de traitement par fs-L (expérimentations en cours lors de la rédaction de ce manuscrit). Une étude parallèle a également été menée en collaboration avec le projet européen LASERIMPLANT (Horizon 2020) dans un objectif d'upscaling, c'est-à-dire en passant d'une étude sur des échantillons de Ti6Al4V plans, à des implants dentaires complets, texturés par fs-L pour une étude biologique *in vitro* (en cours de publication). La texturation d'implants dentaires par fs-L offrirait un gain de temps substantiel lors de l'usinage, mais également une réduction de l'impact écologique en comparaison des techniques de texturation actuellement utilisées pour l'implantologie orale.

Cette thèse a également permis de mettre en évidence un besoin d'explorer le potentiel du fs-L pour la création de textures d'échelle nanométrique. Le déroulement du projet au sein de la *Manutech Graduate School* a permis l'interaction avec d'autres partenaires du consortium, notamment le laboratoire Hubert Curien (UMR 5516), qui dirige actuellement une partie de ses recherches à la génération de LIPSS d'échelles toujours plus petites (s-waveplate pour la longueur d'onde 515 nm ; source de laser UV). Une contrainte apparaît alors, puisque cela implique de travailler sur des surfaces avec une rugosité initiale quasiment nulle. Cependant, des travaux préliminaires, réalisés en partenariat avec un autre projet de la *Manutech*

Graduate School (MORPHOSURF), ont montré des résultats prometteurs concernant la génération de HSFL sur des surfaces de Ti6Al4V, ainsi que sur leur potentiel antibactérien [267].

Ces différentes explorations, ainsi que les informations recueillies au cours du projet LASIMP, ont fortement contribué à la mise en place d'un nouveau projet d'application biologique pour les texturations générées par fs-L (NANOTRAP), qui a conduit à la récente obtention d'un financement de thèse par l'EUR Manutech-Sleight (recrutement en cours pour 2024). Ce projet novateur a pour ambition d'étudier et d'optimiser les interactions entre des surfaces nanotexturées par fs-L et des vésicules extracellulaires, ce qui présente un intérêt clinique et industriel considérable pour l'ingénierie tissulaire et l'implantologie. Un projet ANR a également été déposé, par le même consortium, pour poursuivre les recherches sur les surfaces antibactériennes (BLAST).

L'intégration du projet LASIMP à l'interface entre plusieurs domaines de compétences scientifiques, mais également à un stade intermédiaire entre la recherche fondamentale, clinique, et industrielle, pousse chacun des partenaires impliqués à développer ses connaissances et son savoir-faire actuels. La création de sujets exploratoires de la sorte entraîne la mise en évidence de divers verrous techniques et scientifiques, ce qui paradoxalement présente une importance majeure pour permettre des avancées dans les différents secteurs qui y sont liés, et ainsi permettre un élargissement de leurs domaines de compétences respectifs.

VII

Bilan scientifique

A. Publications scientifiques

1. Publications dans un journal

[1] M. Maalouf, A. Abou Khalil, Y. Di Maio, **S. Papa**, X. Sedao, E. Dalix, S. Peyroche, A. Guignandon, V. Dumas, Polarization of Femtosecond Laser for Titanium Alloy Nanopatterning Influences Osteoblastic Differentiation, *Nanomaterials*. 12 (2022) 1619. <https://doi.org/10.3390/nano12101619>. **IF : 5.3**

[2] **S. Papa**, A. Abou Khalil, H. Hamzeh-Cognasse, M. Thomas, M. Maalouf, Y. Di Maio, X. Sedao, A. Guignandon, V. Dumas, Dual-functionalized titanium by ultrafast laser texturing to enhance human gingival fibroblasts adhesion and minimize *Porphyromonas gingivalis* colonization, *Appl. Surf. Sci.* 606 (2022) 154784. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.154784>. **IF : 6.7**

[3] D. Pallarés-Aldeiturriaga, **S. Papa**, A. Abou Khalil, A. Pascale-Hamri, M. Maalouf, Y. Di Maio, A. Guignandon, V. Dumas, X. Sedao, Influence of multi-wavelength ultrafast laser texturing and autoclave sterilization on titanium alloy-based surface wettability, *Appl. Phys. A*. 128 (2022) 894. <https://doi.org/10.1007/s00339-022-06015-9>. **IF : 2.7**

[4] **S. Papa**, M. Maalouf, P. Claudel, X. Sedao, Y. Di Maio, H. Hamzeh-Cognasse, M. Thomas, A. Guignandon, V. Dumas, Key topographic parameters driving surface adhesion of *Porphyromonas gingivalis*, *Sci. Rep.* 13 (2023) 15893. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42387-5>. **IF : 4.6**

2. Publications de conférence

[1] A.A. Khalil, X. Sedao, **S. Papa**, P. Claudel, A. Klos, T. Itina, N. Attik, A. Guignandon, V. Dumas, Ultrafast laser processing of nanostructured patterns for the control of cell adhesion and migration on titanium alloy, in: 2021 Conference on Lasers and Electro-Optics Europe & European Quantum Electronics Conference (CLEO/Europe-EQEC), 2021: pp. 1–1. <https://doi.org/10.1109/CLEO/Europe-EQEC52157.2021.9541931>.

[2] A. Abou Khalil, **S. Papa**, N. Compère, A.P. Hamri, A. Guignandon, V. Dumas, X. Sedao, Multi-wavelength femtosecond laser LIPSS generation on titanium alloy and comparative study of their effect on cell adhesions, in: P.R. Herman, R. Osellame, A. Ben-Yakar (Eds.), *Frontiers in Ultrafast Optics: Biomedical, Scientific, and Industrial Applications XXII*, SPIE, San Francisco, United States, 2022: p. 7. <https://doi.org/10.1117/12.2605735>.

- [3] **S. Papa**, M. Maalouf, A.A. Khalil, X. Sedao, P. Claudel, N. Compère, A. Guignandon, V. Dumas, Femtosecond lasers structured titanium implant in regulating bacteria and bone stem cell adhesion, in: *Lasers in Dentistry XXVIII*, SPIE, 2022: p. PC1194205. <https://doi.org/10.1117/12.2606622>.
- [4] X. Sedao, **S. Papa**, S. Reynaud, N. Compère, A. Guignandon, V. Dumas, F. Sandra, H. Reveron, J. Chevalier, F. Garrelie, Y. Di Maio, Ultrafast laser micro and nanoprocessing for biomedical applications, in: R. Kling, A. Watanabe (Eds.), *Laser-Based Micro- and Nanoprocessing XVI*, SPIE, San Francisco, United States, 2022: p. 51. <https://doi.org/10.1117/12.2606207>.
- [5] S. Xxx, **S. Papa**, M. Maalouf, Y.D. Maio, A.A. Khalil, H. Hamzeh-Cognasse, M. Thomas, A. Guignandon, V. Dumas, Ultrafast laser functionalization of dental implants: influence of wavelength and polarization on tissues adhesion and bacterial repellency, in: *Frontiers in Ultrafast Optics: Biomedical, Scientific, and Industrial Applications XXIII*, SPIE, 2023: p. PC1241105. <https://doi.org/10.1117/12.2646395>.

B. Conférences

1. Communications orales

- [EN] **S. Papa***, M. Thomas, MA. Eyraud, H. Hamzeh-Cognasse, X. Sedao, A. Guignandon, V. Dumas, Multifunctional texturations of titanium based dental implants with femtosecond laser. SLEIGHT Science Event ; SSE#5, 11-14 janvier 2021
- [EN] A.A. Khalil*, X. Sedao, **S. Papa**, P. Claudel, A. Klos, T. Itina, N. Attik, A. Guignandon, V. Dumas, Ultrafast laser processing of nanostructured patterns for the control of cell adhesion and migration on titanium alloy, in: *2021 Conf. Lasers Electro-Opt. Eur. Eur. Quantum Electron. Conf. CLEO Europe-EQEC*, 2021: pp. 1–1. <https://doi.org/10.1109/CLEO/Europe-EQEC52157.2021.9541931>.
- [EN] **S. Papa***, M. Thomas, H. Hamzeh-Cognasse, X. Sedao, A. Guignandon, V. Dumas, LASIMP: Femtoseconde laser for dental implants multifonctionnal texturing. Advisory Board #1 EUR MANUTECH SLEIGHT, mars 2021
- [EN] **S. Papa***, M. Thomas, MA. Eyraud, H. Hamzeh-Cognasse, P. Claudel, A. Abou-Khalil, X. Sedao, A. Guignandon, V. Dumas, *Femtosecond lasers structured titanium dental implants in regulating bacterial adhesion*. Congrès BIOMAT 2021: 19-22 octobre 2021 Bourg Saint Maurice
- [EN] **S. Papa***, M. Thomas, MA. Eyraud, H. Hamzeh-Cognasse, P. Claudel, A. Abou-Khalil, X. Sedao, A. Guignandon, V. Dumas, Femtosecond laser for antibacterial texturing of titanium-based dental implants. SLEIGHT Science Event ; SSE#6, 5-9 juillet 2021
- [EN] **S. Papa**, M. Maalouf*, A.A. Khalil, X. Sedao, P. Claudel, N. Compère, A. Guignandon, V. Dumas, Femtosecond lasers structured titanium implant in regulating bacteria and bone

stem cell adhesion, in: Lasers Dent. XXVIII, SPIE, 2022: p. PC1194205. <https://doi.org/10.1117/12.2606622>.

[EN] X. Sedao*, **S. Papa**, S. Reynaud, N. Compère, A. Guignandon, V. Dumas, F. Sandra, H. Reveron, J. Chevalier, F. Garrelie, Y. Di Maio, Ultrafast laser micro and nanoprocessing for biomedical applications, in: R. Kling, A. Watanabe (Eds.), Laser-Based Micro- Nanoprocessing XVI, SPIE, San Francisco, United States, 2022: p. 51. <https://doi.org/10.1117/12.2606207>.

[EN] A.A. Khalil*, **S. Papa**, N. Compère, A.P. Hamri, A. Guignandon, V. Dumas, X. Sedao, Multi-wavelength femtosecond laser LIPSS generation on titanium alloy and comparative study of their effect on cell adhesions, in: Front. Ultrafast Opt. Biomed. Sci. Ind. Appl. XXII, SPIE, 2022: p. PC1199108. <https://doi.org/10.1117/12.2605735>.

[EN] **S. Papa***, A. Abou Khalil, H. Hamzeh-Cognasse, M. Thomas, M. Maalouf, Y. Di Maio, X. Sedao, A. Guignandon, V. Dumas, Dual Functionalization of Dental Implants by Ultrafast Laser Texturing: Increase Gingival Fibroblast Adhesion and Limit Bacterial Biofilm Formation. Salon professionnel Orthomanufacture, 11-12 mai 2022

[EN] **S. Papa***, X. Sedao, A. Abou-Khalil, Y. Di Maio, M. Maalouf, A. Guignandon, V. Dumas, Dual Functionalized Titanium by Ultrafast Laser Texturing: Enhance Gingival Fibroblast Adhesion and Minimize Bacterial Colonization SLEIGHT Science Event. SSE#8, 4-8 juillet 2022

[EN] X. Sedao*, **S. Papa**, M. Maalouf, Y. Di Maio, A. Abou Khalil, H. Hamzeh-Cognasse, M. Thomas, A. Guignandon, V. Dumas, Ultrafast laser functionalization of dental implants: influence of wavelength and polarization on tissues adhesion and bacterial repellency, SPIE, San Francisco, United States, 2023

[EN] Y.D. Maio*, G. Aubert, A. Pascale-Hamri, X. Sedao, M. Maalouf, M. Muck, D.P. Aldeiturriaga, J. Granier, **S. Papa**, V. Dumas, A. Guignandon, J. Heitz, N. Compère, From research to industry: transferring bioactive laser treated surfaces to the production of biomedical screws, in: Front. Ultrafast Opt. Biomed. Sci. Ind. Appl. XXIII, SPIE, 2023: p. PC1241103. <https://doi.org/10.1117/12.2655697>.

[FR] **S. Papa***, X. Sedao, A. Abou-Khalil, Y. Di Maio, M. Maalouf, A. Guignandon, V. Dumas, Dual functionalization of dental implants by ultrafast laser texturing: How to increase gingival fibroblast adhesion and limit bacterial biofilm formation. Congrès Matériaux 2022, 24-28 octobre 2022

[FR] **S. Papa**, M. Maalouf, X. Sedao, Y. Di Maio, H. Hamzeh-Cognasse, M. Thomas, A. Guignandon, V. Dumas, Dans un contexte pro-inflammatoire, quelle place pour la nanotexturations des implants ? Journées annuelles du Club REM, 9-10 juin 2023

2. Communications affichées

[EN-FR] **S. Papa***, X. Sedao, A. Abou-Khalil, Y. Di Maio, M. Maalouf, A. Guignandon, V. Dumas, SLEIGHT Science Event ; SSE#8, 4-8 juillet 2023 ; **Best Poster Award**

[EN] **S. Papa***, X. Sedao, A. Abou-Khalil, Y. Di Maio, M. Maalouf, A. Guignandon, V. Dumas, *Femtosecond lasers Functionalised titanium surfaces For dental implants application*. 32nd Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB) Bordeaux, Septembre 2022

[EN-FR] **S. Papa***, X. Sedao, A. Abou-Khalil, Y. Di Maio, M. Maalouf, A. Guignandon, V. Dumas, *Femtosecond lasers Functionalised titanium surfaces For dental implants application*. SLEIGHT Science Event ; SSE#9, 9-13 janvier 2023

[EN-FR] **S. Papa***, X. Sedao, A. Abou-Khalil, Y. Di Maio, M. Maalouf, A. Guignandon, V. Dumas, *Femtosecond lasers Functionalised titanium surfaces For dental implants application*. Advisory Board #2 EUR MANUTECH SLEIGHT, 8 juin 2023

* Personne qui a présenté la communication

C. Vulgarisation scientifique

Concours « Ma thèse en 180 secondes » – finaliste local Université de Lyon ; mars 2022

Membre de l'équipe organisatrice « Pint of Science 2023 » de Saint-Etienne ; mai 2023

D. Représentation étudiante

Représentant au sein du conseil de l'unité 1059 Sainbiose ; mai 2021 – mai 2023

Représentant au sein du conseil de l'école doctorale SIS 488 ; janvier 2022 – janvier 2024

E. Enseignement et encadrement

Enseignements dispensés :

- Licence sciences pour la santé 2^{ème} année : 16 heures
- Master ingénierie de la santé 1^{ère} année : 13 heures
- Master ingénierie cellulaire et tissulaire 2^{ème} année : 4 heures

Encadrements en 1^{ère} année de thèse :

- Stage de 3^{ème} année d'école d'ingénieur (ENISE) : 2 mois
- Stage de Master ingénierie cellulaire et tissulaire 2^{ème} année : 6 mois
- Stage de 4^{ème} année d'école d'ingénieur (ENISE) : 6 mois

Encadrements en 2^{ème} année de thèse :

- Stage de Master ingénierie de la santé 1^{ère} année : 2 mois
- Stage Texas A&M University 4^{ème} année : 2 mois

Encadrements en 3^{ème} année de thèse :

- Stage de Master ingénierie de la santé 1^{ère} année : 2 mois
- Stage de Licence Sciences de la Vie 3^{ème} année : 5 semaines

VIII

Références

- [1] Dental Implants Market to 2027 - Global Analysis & Forecasts by Product; Material; End User and Geography - ResearchAndMarkets.com, (2019). <https://www.businesswire.com/news/home/20190411005716/en/Dental-Implants-Market-to-2027---Global-Analysis-Forecasts-by-Product-Material-End-User-and-Geography---ResearchAndMarkets.com> (accessed September 24, 2023).
- [2] B. Scharf, C.C. Clement, V. Zolla, G. Perino, B. Yan, S.G. Elci, E. Purdue, S. Goldring, F. Macaluso, N. Cobelli, R.W. Vachet, L. Santambrogio, Molecular analysis of chromium and cobalt-related toxicity, *Sci Rep.* 4 (2014) 5729. <https://doi.org/10.1038/srep05729>.
- [3] H.S. Alghamdi, J.A. Jansen, The development and future of dental implants, *Dent. Mater. J.* 39 (2020) 167–172. <https://doi.org/10.4012/dmj.2019-140>.
- [4] S.M. Al-Zubaidi, A.A. Madfa, A.A. Mufadhal, M.A. Aldawla, O.S. Hameed, X.-G. Yue, Improvements in Clinical Durability From Functional Biomimetic Metallic Dental Implants, *Frontiers in Materials.* 7 (2020). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmats.2020.00106> (accessed October 30, 2023).
- [5] C. Zhang, T. Zhang, T. Geng, X. Wang, K. Lin, P. Wang, Dental Implants Loaded With Bioactive Agents Promote Osseointegration in Osteoporosis: A Review, *Front Bioeng Biotechnol.* 9 (2021) 591796. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.591796>.
- [6] K. Wermelin, P. Tengvall, P. Aspenberg, Surface-bound bisphosphonates enhance screw fixation in rats--increasing effect up to 8 weeks after insertion, *Acta Orthop.* 78 (2007) 385–392. <https://doi.org/10.1080/17453670710013979>.
- [7] Y. Wang, Y. Zhang, R.J. Miron, Health, Maintenance, and Recovery of Soft Tissues around Implants: Soft Tissues around Implants, *Clinical Implant Dentistry and Related Research.* 18 (2016) 618–634. <https://doi.org/10.1111/cid.12343>.
- [8] L. Trombelli, R. Farina, A. Marzola, L. Bozzi, B. Liljenberg, J. Lindhe, Modeling and remodeling of human extraction sockets, *J Clin Periodontol.* 35 (2008) 630–639. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01246.x>.
- [9] R.A.F. Clark, Fibrin and Wound Healing, *Annals of the New York Academy of Sciences.* 936 (2001) 355–367. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03522.x>.
- [10] T. Guo, K. Gulati, H. Arora, P. Han, B. Fournier, S. Ivanovski, Race to invade: Understanding soft tissue integration at the transmucosal region of titanium dental implants, *Dental Materials.* 37 (2021) 816–831. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2021.02.005>.

- [11] S.K. Brancato, J.E. Albina, Wound Macrophages as Key Regulators of Repair, *The American Journal of Pathology*. 178 (2011) 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.08.003>.
- [12] T. Albrektsson, C. Johansson, Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration, (n.d.).
- [13] S. Ivanovski, R. Lee, Comparison of peri-implant and periodontal marginal soft tissues in health and disease, *Periodontol* 2000. 76 (2018) 116–130. <https://doi.org/10.1111/prd.12150>.
- [14] X. Ren, H.C. Van Der Mei, Y. Ren, H.J. Busscher, Keratinocytes protect soft-tissue integration of dental implant materials against bacterial challenges in a 3D-tissue infection model, *Acta Biomaterialia*. 96 (2019) 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.07.015>.
- [15] I. Atsuta, Y. Ayukawa, R. Kondo, W. Oshiro, Y. Matsuura, A. Furuhashi, Y. Tsukiyama, K. Koyano, Soft tissue sealing around dental implants based on histological interpretation, *Journal of Prosthodontic Research*. 60 (2016) 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.jprior.2015.07.001>.
- [16] T. Guo, K. Gulati, H. Arora, P. Han, B. Fournier, S. Ivanovski, Orchestrating soft tissue integration at the transmucosal region of titanium implants, *Acta Biomaterialia*. 124 (2021) 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.01.001>.
- [17] M.-N. Abdallah, G. Abughanam, S.D. Tran, Z. Sheikh, M.A. Mezour, T. Basiri, Y. Xiao, M. Cerruti, W.L. Siqueira, F. Tamimi, Comparative adsorption profiles of basal lamina proteome and gingival cells onto dental and titanium surfaces, *Acta Biomaterialia*. 73 (2018) 547–558. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.017>.
- [18] C. Tomasi, F. Tassarolo, I. Caola, J. Wennström, G. Nollo, T. Berglundh, Morphogenesis of peri-implant mucosa revisited: an experimental study in humans, *Clin. Oral Impl. Res.* 25 (2014) 997–1003. <https://doi.org/10.1111/clr.12223>.
- [19] N. Fujii, H. Kusakari, T. Maeda, A Histological Study on Tissue Responses to Titanium Implantation in Rat Maxilla: The Process of Epithelial Regeneration and Bone Reaction, *Journal of Periodontology*. 69 (1998) 485–495. <https://doi.org/10.1902/jop.1998.69.4.485>.
- [20] F. Al Rezk, G. Trimpou, H.-C. Lauer, P. Weigl, N. Krockow, Response of soft tissue to different abutment materials with different surface topographies: a review of the literature, *Gen Dent*. 66 (2018) 18–25.
- [21] I. Abrahamsson, C. Soldini, Probe penetration in periodontal and peri-implant tissues: An experimental study in the beagle dog, *Clin Oral Implants Res.* 17 (2006) 601–605. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01235.x>.
- [22] L.F. Rose, PERIODONTICS MEDICINE, SURGERY, and IMPLANTS, (n.d.).

- [23] F. Schwarz, J. Derks, A. Monje, H.-L. Wang, Peri-implantitis, *J Periodontol.* 89 (2018) S267–S290. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0350>.
- [24] K. Kordbacheh Changi, J. Finkelstein, P.N. Papapanou, Peri-implantitis prevalence, incidence rate, and risk factors: A study of electronic health records at a U.S. dental school, *Clin Oral Impl Res.* 30 (2019) 306–314. <https://doi.org/10.1111/clar.13416>.
- [25] J. Derks, C. Tomasi, Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology, *J Clin Periodontol.* 42 Suppl 16 (2015) S158-171. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12334>.
- [26] I. Olsen, M.A. Taubman, S.K. Singhrao, *Porphyromonas gingivalis* suppresses adaptive immunity in periodontitis, atherosclerosis, and Alzheimer's disease, *Journal of Oral Microbiology.* 8 (2016) 33029. <https://doi.org/10.3402/jom.v8.33029>.
- [27] M.I. Ryder, *Porphyromonas gingivalis* and Alzheimer disease: Recent findings and potential therapies, *J Periodontol.* 91 (2020). <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0104>.
- [28] Y. Li, R. Guo, P.K. Oduro, T. Sun, H. Chen, Y. Yi, W. Zeng, Q. Wang, L. Leng, L. Yang, J. Zhang, The Relationship Between *Porphyromonas Gingivalis* and Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis, *Front Cell Infect Microbiol.* 12 (2022) 956417. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.956417>.
- [29] C. Perricone, F. Ceccarelli, M. Saccucci, G. Di Carlo, D.P. Bogdanos, R. Lucchetti, A. Pilloni, G. Valesini, A. Polimeni, F. Conti, *Porphyromonas gingivalis* and rheumatoid arthritis, *Curr Opin Rheumatol.* 31 (2019) 517–524. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000638>.
- [30] V. Blasco-Baque, L. Garidou, C. Pomié, Q. Escoula, P. Loubieres, S. Le Gall-David, M. Lemaitre, S. Nicolas, P. Klopp, A. Waget, V. Azalbert, A. Colom, M. Bonneure-Mallet, P. Kemoun, M. Serino, R. Burcelin, Periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response, *Gut.* 66 (2017) 872–885. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309897>.
- [31] M. Bayrak, N.A. Kocak-Oztug, K. Gulati, S. Cintan, E. Cifcibasi, Influence of Clinical Decontamination Techniques on the Surface Characteristics of SLA Titanium Implant, *Nanomaterials.* 12 (2022) 4481. <https://doi.org/10.3390/nano12244481>.
- [32] Z. Xu, S. Krajewski, T. Weindl, R. Loeffler, P. Li, X. Han, J. Geis-Gerstorfer, H.-P. Wendel, L. Scheideler, F. Rupp, Application of totarol as natural antibacterial coating on dental implants for prevention of peri-implantitis, *Materials Science and Engineering: C.* 110 (2020) 110701. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110701>.
- [33] D. Chopra, K. Gulati, S. Ivanovski, Understanding and optimizing the antibacterial functions of anodized nano-engineered titanium implants, *Acta Biomaterialia.* 127 (2021) 80–101. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.03.027>.

- [34] H. Arora, Titanium: The Ideal Dental Implant Material Choice, in: K. Gulati (Ed.), *Surface Modification of Titanium Dental Implants*, Springer International Publishing, Cham, 2023: pp. 1–21. https://doi.org/10.1007/978-3-031-21565-0_1.
- [35] R. Adell, U. Lekholm, B. Rockler, A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw, (n.d.).
- [36] K. Gulati, D. Chopra, N.A. Kocak-Oztug, E. Verron, Fit and forget: The future of dental implant therapy via nanotechnology, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 199 (2023) 114900. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114900>.
- [37] R. Rasouli, A. Barhoum, H. Uludag, A review of nanostructured surfaces and materials for dental implants: surface coating, patterning and functionalization for improved performance, *Biomater. Sci.* 6 (2018) 1312–1338. <https://doi.org/10.1039/C8BM00021B>.
- [38] D.L. Cochran, Early results from clinical trials on ITIA SLA implants, (n.d.).
- [39] M. Rong, H. Lu, L. Wan, X. Zhang, X. Lin, S. Li, L. Zhou, Y. Lv, Y. Su, Comparison of early osseointegration between laser-treated/acid-etched and sandblasted/acid-etched titanium implant surfaces, *J Mater Sci: Mater Med.* 29 (2018) 43. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6049-1>.
- [40] D. Chopra, T. Guo, S. Ivanovski, K. Gulati, Single-step nano-engineering of multiple micro-rough metals via anodization, *Nano Res.* 16 (2023) 1320–1329. <https://doi.org/10.1007/s12274-022-4847-8>.
- [41] C. Serrano, L. García-Fernández, J.P. Fernández-Blázquez, M. Barbeck, S. Ghanaati, R. Unger, J. Kirkpatrick, E. Arzt, L. Funk, P. Turón, A. Del Campo, Nanostructured medical sutures with antibacterial properties, *Biomaterials.* 52 (2015) 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.039>.
- [42] W. Liu, X. Liu, J. Fangteng, S. Wang, L. Fang, H. Shen, S. Xiang, H. Sun, B. Yang, Bioinspired polyethylene terephthalate nanocone arrays with underwater superoleophobicity and anti-bioadhesion properties, *Nanoscale.* 6 (2014) 13845–13853. <https://doi.org/10.1039/C4NR04471A>.
- [43] Z. Jahed, P. Lin, B.B. Seo, M.S. Verma, F.X. Gu, T.Y. Tsui, M.R.K. Mofrad, Responses of *Staphylococcus aureus* bacterial cells to nanocrystalline nickel nanostructures, *Biomaterials.* 35 (2014) 4249–4254. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.080>.
- [44] S.-E. Wu, Y.-W. Huang, T.-H. Hsueh, C.-P. Liu, Fabrication of Nanopillars Comprised of InGaN/GaN Multiple Quantum Wells by Focused Ion Beam Milling, *Jpn. J. Appl. Phys.* 47 (2008) 4906. <https://doi.org/10.1143/JJAP.47.4906>.
- [45] P.K. Yadav, P. Lemoine, G. Dale, J.W.J. Hamilton, P.S.M. Dunlop, J.A. Byrne, P. Mailley, C. Boxall, Hierarchical titania nanostructures prepared with focused ion beam-assisted

anodisation of titanium in an aqueous electrolyte, *Appl. Phys. A.* 119 (2015) 107–113. <https://doi.org/10.1007/s00339-014-8967-1>.

[46] A. Cunha, A.-M. Elie, L. Plawinski, A.P. Serro, A.M. Botelho Do Rego, A. Almeida, M.C. Urdaci, M.-C. Durrieu, R. Vilar, Femtosecond laser surface texturing of titanium as a method to reduce the adhesion of *Staphylococcus aureus* and biofilm formation, *Applied Surface Science*. 360 (2016) 485–493. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.10.102>.

[47] N. Epperlein, F. Menzel, K. Schwibbert, R. Koter, J. Bonse, J. Sameith, J. Krüger, J. Toepel, Influence of femtosecond laser produced nanostructures on biofilm growth on steel, *Applied Surface Science*. 418 (2017) 420–424. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.02.174>.

[48] E. Fadeeva, V.K. Truong, M. Stiesch, B.N. Chichkov, R.J. Crawford, J. Wang, E.P. Ivanova, Bacterial Retention on Superhydrophobic Titanium Surfaces Fabricated by Femtosecond Laser Ablation, *Langmuir*. 27 (2011) 3012–3019. <https://doi.org/10.1021/la104607g>.

[49] M. Mendes, R. Vilar, Influence of the processing parameters on the formation and deposition of particles in UV pulsed laser ablation of Al₂O₃–TiC ceramics, *Applied Surface Science*. 217 (2003) 149–162. [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(03\)00530-0](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(03)00530-0).

[50] J.C. Miller, 1. Introduction to Laser Desorption and Ablation, in: J.C. Miller, R.F. Haglund (Eds.), *Experimental Methods in the Physical Sciences*, Academic Press, 1997: pp. 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0076-695X\(08\)60393-2](https://doi.org/10.1016/S0076-695X(08)60393-2).

[51] X. Sedao, A. Abou Khalil, Fonctionnalisation de surface par laser ultrarapide - Applications et voies vers l'industrialisation, *Traitements des métaux*. (2022). <https://doi.org/10.51257/a-v1-re297>.

[52] E.G. Gamaly, A.V. Rode, Physics of ultra-short laser interaction with matter: From phonon excitation to ultimate transformations, *Progress in Quantum Electronics*. 37 (2013) 215–323. <https://doi.org/10.1016/j.pquantelec.2013.05.001>.

[53] J. Bonse, S. Gräf, Ten Open Questions about Laser-Induced Periodic Surface Structures, *Nanomaterials*. 11 (2021) 3326. <https://doi.org/10.3390/nano11123326>.

[54] A. San-Blas, M. Martinez-Calderon, J. Buencuerpo, L.M. Sanchez-Brea, J. del Hoyo, M. Gómez-Aranzadi, A. Rodríguez, S.M. Olaizola, Femtosecond laser fabrication of LIPSS-based waveplates on metallic surfaces, *Applied Surface Science*. 520 (2020) 146328. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.146328>.

[55] J. Bonse, S. Hohm, S.V. Kirner, A. Rosenfeld, J. Kruger, Laser-Induced Periodic Surface Structures— A Scientific Evergreen, *IEEE J. Select. Topics Quantum Electron.* 23 (2017) 7581030. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.2614183>.

[56] K. Ahmmed, C. Grambow, A.-M. Kietzig, Fabrication of Micro/Nano Structures on Metals by Femtosecond Laser Micromachining, *Micromachines*. 5 (2014) 1219–1253. <https://doi.org/10.3390/mi5041219>.

- [57] A. Rudenko, J.-P. Colombier, S. Höhm, A. Rosenfeld, J. Krüger, J. Bonse, T.E. Itina, Spontaneous periodic ordering on the surface and in the bulk of dielectrics irradiated by ultrafast laser: a shared electromagnetic origin, *Sci Rep.* 7 (2017) 12306. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12502-4>.
- [58] T. Meshram, J. Yan, Formation of Laser-Induced Periodic Surface Structures on Reaction-Bonded Silicon Carbide by Femtosecond Pulsed Laser Irradiation, *Nanomanuf Metrol.* 6 (2023) 4. <https://doi.org/10.1007/s41871-023-00184-8>.
- [59] P.V. Petkov, S.S. Dimov, R.M. Minev, D.T. Pham, Laser milling: Pulse duration effects on surface integrity, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part B: Journal of Engineering Manufacture.* 222 (2008) 35–45. <https://doi.org/10.1243/09544054JEM840>.
- [60] K.-Y. Law, Definitions for Hydrophilicity, Hydrophobicity, and Superhydrophobicity: Getting the Basics Right, *J. Phys. Chem. Lett.* 5 (2014) 686–688. <https://doi.org/10.1021/jz402762h>.
- [61] S.W. Lee, K.S. Phillips, H. Gu, M. Kazemzadeh-Narbat, D. Ren, How microbes read the map: Effects of implant topography on bacterial adhesion and biofilm formation, *Biomaterials.* 268 (2021) 120595. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120595>.
- [62] C. Ran, G. Ding, W. Liu, Y. Deng, W. Hou, Wetting on Nanoporous Alumina Surface: Transition between Wenzel and Cassie States Controlled by Surface Structure, *Langmuir.* 24 (2008) 9952–9955. <https://doi.org/10.1021/la801461j>.
- [63] G. Feng, Y. Cheng, S.-Y. Wang, D.A. Borca-Tasciuc, R.W. Worobo, C.I. Moraru, Bacterial attachment and biofilm formation on surfaces are reduced by small-diameter nanoscale pores: how small is small enough?, *Npj Biofilms Microbiomes.* 1 (2015) 1–9. <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2015.22>.
- [64] A.-M. Kietzig, S.G. Hatzikiriakos, P. Englezos, Patterned Superhydrophobic Metallic Surfaces, *Langmuir.* 25 (2009) 4821–4827. <https://doi.org/10.1021/la8037582>.
- [65] D. Huerta-Murillo, A. García-Girón, J.M. Romano, J.T. Cardoso, F. Cordovilla, M. Walker, S.S. Dimov, J.L. Ocaña, Wettability modification of laser-fabricated hierarchical surface structures in Ti-6Al-4V titanium alloy, *Applied Surface Science.* 463 (2019) 838–846. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.09.012>.
- [66] Z. Yang, C. Zhu, N. Zheng, D. Le, J. Zhou, Superhydrophobic Surface Preparation and Wettability Transition of Titanium Alloy with Micro/Nano Hierarchical Texture, *Materials.* 11 (2018) 2210. <https://doi.org/10.3390/ma11112210>.
- [67] A. Cunha, A.P. Serro, V. Oliveira, A. Almeida, R. Vilar, M.-C. Durrieu, Wetting behaviour of femtosecond laser textured Ti-6Al-4V surfaces, *Applied Surface Science.* 265 (2013) 688–696. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.11.085>.

- [68] P. Bizi-bandoki, S. Valette, E. Audouard, S. Benayoun, Time dependency of the hydrophilicity and hydrophobicity of metallic alloys subjected to femtosecond laser irradiations, *Applied Surface Science*. 273 (2013) 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.02.054>.
- [69] Y. Zhang, G. Zou, L. Liu, Y. Zhao, Q. Liang, A. Wu, Y.N. Zhou, Time-dependent wettability of nano-patterned surfaces fabricated by femtosecond laser with high efficiency, *Applied Surface Science*. 389 (2016) 554–559. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.07.089>.
- [70] A. Klos, X. Sedao, T.E. Itina, C. Helfenstein-Didier, C. Donnet, S. Peyroche, L. Vico, A. Guignandon, V. Dumas, Ultrafast Laser Processing of Nanostructured Patterns for the Control of Cell Adhesion and Migration on Titanium Alloy, *Nanomaterials*. 10 (2020) 864. <https://doi.org/10.3390/nano10050864>.
- [71] D. Parbat, S. Gaffar, A.M. Rather, A. Gupta, U. Manna, A general and facile chemical avenue for the controlled and extreme regulation of water wettability in air and oil wettability under water, *Chem. Sci*. 8 (2017) 6542–6554. <https://doi.org/10.1039/C7SC02296D>.
- [72] S. Wu, B. Zhang, Y. Liu, X. Suo, H. Li, Influence of surface topography on bacterial adhesion: A review (Review), *Biointerphases*. 13 (2018) 060801. <https://doi.org/10.1116/1.5054057>.
- [73] B.H. Liu, L.-C. Yu, In-situ, time-lapse study of extracellular polymeric substance discharge in *Streptococcus mutans* biofilm, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 150 (2017) 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.031>.
- [74] M.A. Orman, M.P. Brynildsen, Inhibition of stationary phase respiration impairs persister formation in *E. coli*, *Nat Commun*. 6 (2015) 7983. <https://doi.org/10.1038/ncomms8983>.
- [75] J. Liu, A. Prindle, J. Humphries, M. Gabalda-Sagarra, M. Asally, D.D. Lee, S. Ly, J. Garcia-Ojalvo, G.M. Süel, Metabolic co-dependence gives rise to collective oscillations within biofilms, *Nature*. 523 (2015) 550–554. <https://doi.org/10.1038/nature14660>.
- [76] I. Fragkioudakis, G. Tseleki, A.-E. Doufexi, D. Sakellari, Current Concepts on the Pathogenesis of Peri-implantitis: A Narrative Review, *Eur J Dent*. 15 (2021) 379–387. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1721903>.
- [77] D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces, *Biomaterials*. 34 (2013) 8533–8554. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.089>.
- [78] P.N. Deo, R. Deshmukh, Oral microbiome: Unveiling the fundamentals, *J Oral Maxillofac Pathol*. 23 (2019) 122–128. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_304_18.
- [79] A.B. Berezow, R.P. Darveau, Microbial Shift and Periodontitis, *Periodontol 2000*. 55 (2011) 36–47. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00350.x>.

- [80] K. Laosuwan, D.J. Epasinghe, Z. Wu, W.K. Leung, D.W. Green, H.S. Jung, Comparison of biofilm formation and migration of *Streptococcus mutans* on tooth roots and titanium miniscrews, *Clin Exp Dent Res.* 4 (2018) 40–47. <https://doi.org/10.1002/cre2.101>.
- [81] P.S. Kumar, M.R. Mason, M.R. Brooker, K. O'Brien, Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants, *J Clin Periodontol.* 39 (2012) 425–433. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01856.x>.
- [82] P.I. Eke, B.A. Dye, L. Wei, G.O. Thornton-Evans, R.J. Genco, Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: 2009 and 2010, *J Dent Res.* 91 (2012) 914–920. <https://doi.org/10.1177/0022034512457373>.
- [83] R.J. Lamont, H.F. Jenkinson, Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*, *Microbiol Mol Biol Rev.* 62 (1998) 1244–1263. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.4.1244-1263.1998>.
- [84] A. Kassem, P. Henning, P. Lundberg, P.P.C. Souza, C. Lindholm, U.H. Lerner, *Porphyromonas gingivalis* Stimulates Bone Resorption by Enhancing RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) through Activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts, *J Biol Chem.* 290 (2015) 20147–20158. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.655787>.
- [85] M.A. Stokman, A.J. van Winkelhoff, A. Vissink, F.K.L. Spijkervet, G.M. Raghoobar, Bacterial colonization of the peri-implant sulcus in dentate patients: a prospective observational study, *Clin Oral Investig.* 21 (2017) 717–724. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1941-x>.
- [86] G. Hajishengallis, S. Liang, M.A. Payne, A. Hashim, R. Jotwani, M.A. Eskan, M.L. McIntosh, A. Alsam, K.L. Kirkwood, J.D. Lambris, R.P. Darveau, M.A. Curtis, Low-Abundance Biofilm Species Orchestrates Inflammatory Periodontal Disease through the Commensal Microbiota and Complement, *Cell Host & Microbe.* 10 (2011) 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.006>.
- [87] K. Abdi, T. Chen, B.A. Klein, A.K. Tai, J. Coursen, X. Liu, J. Skinner, S. Periasamy, Y. Choi, B.M. Kessler, R.J. Palmer, A. Gittis, P. Matzinger, M.J. Duncan, N.J. Singh, Mechanisms by which *Porphyromonas gingivalis* evades innate immunity, *PLOS ONE.* 12 (2017) e0182164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182164>.
- [88] W. Teughels, N. Van Assche, I. Sliepen, M. Quirynen, Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development, *Clin Oral Implants Res.* 17 (2006) 68–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x>.
- [89] P.D. Marsh, Dental plaque as a microbial biofilm, *Caries Res.* 38 (2004) 204–211. <https://doi.org/10.1159/000077756>.

- [90] Y. Cheng, G. Feng, C.I. Moraru, Micro- and Nanotopography Sensitive Bacterial Attachment Mechanisms: A Review, *Frontiers in Microbiology*. 10 (2019). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00191> (accessed June 19, 2023).
- [91] C.J. Whittaker, C.M. Klier, P.E. Kolenbrander, Mechanisms of adhesion by oral bacteria, *Annu Rev Microbiol*. 50 (1996) 513–552. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.513>.
- [92] A.S. Utada, R.R. Bennett, J.C.N. Fong, M.L. Gibiansky, F.H. Yildiz, R. Golestanian, G.C.L. Wong, *Vibrio cholerae* use pili and flagella synergistically to effect motility switching and conditional surface attachment, *Nat Commun*. 5 (2014) 4913. <https://doi.org/10.1038/ncomms5913>.
- [93] P.D. Frymier, R.M. Ford, H.C. Berg, P.T. Cummings, Three-dimensional tracking of motile bacteria near a solid planar surface., *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92 (1995) 6195–6199. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.6195>.
- [94] G. Li, L.-K. Tam, J.X. Tang, Amplified effect of Brownian motion in bacterial near-surface swimming, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 18355–18359. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807305105>.
- [95] S. Perni, E.C. Preedy, P. Prokopovich, Success and failure of colloidal approaches in adhesion of microorganisms to surfaces, *Advances in Colloid and Interface Science*. 206 (2014) 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.11.008>.
- [96] H. Wang, M. Sodagari, Y. Chen, X. He, B.Z. Newby, L.-K. Ju, Initial bacterial attachment in slow flowing systems: effects of cell and substrate surface properties, *Colloids Surf B Biointerfaces*. 87 (2011) 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.05.053>.
- [97] N. Tufenkji, M. Elimelech, Deviation from the Classical Colloid Filtration Theory in the Presence of Repulsive DLVO Interactions, *Langmuir*. 20 (2004) 10818–10828. <https://doi.org/10.1021/la0486638>.
- [98] M.P. Ortega, T. Hagiwara, H. Watanabe, T. Sakiyama, Adhesion behavior and removability of *Escherichia coli* on stainless steel surface, *Food Control*. 21 (2010) 573–578. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.08.010>.
- [99] K. Sauer, P. Stoodley, D.M. Goeres, L. Hall-Stoodley, M. Burmølle, P.S. Stewart, T. Bjarnsholt, The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation, *Nat Rev Microbiol*. 20 (2022) 608–620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>.
- [100] J.J. Vernon, E.M. Raif, J. Aw, E. Attenborough, A. Jha, T. Do, Dental implant surfaces and their interaction with the oral microbiome, *Dentistry Review*. 2 (2022) 100060. <https://doi.org/10.1016/j.dentre.2022.100060>.
- [101] L. Zhang, J. Guo, T. Yan, Y. Han, Fibroblast responses and antibacterial activity of Cu and Zn co-doped TiO₂ for percutaneous implants, *Applied Surface Science*. 434 (2018) 633–642. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.10.169>.

- [102] B. Li, L. Zhang, D. Wang, F. Peng, X. Zhao, C. Liang, H. Li, H. Wang, Thermosensitive - hydrogel-coated titania nanotubes with controlled drug release and immunoregulatory characteristics for orthopedic applications, *Materials Science and Engineering: C*. 122 (2021) 111878. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111878>.
- [103] Y. Dong, H. Ye, Y. Liu, L. Xu, Z. Wu, X. Hu, J. Ma, J.L. Pathak, J. Liu, G. Wu, pH dependent silver nanoparticles releasing titanium implant: A novel therapeutic approach to control peri-implant infection, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 158 (2017) 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.034>.
- [104] P.S. Stewart, J. William Costerton, Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *The Lancet*. 358 (2001) 135–138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1).
- [105] N. Lin, P. Berton, C. Moraes, R.D. Rogers, N. Tufenkji, Nanodarts, nanoblades, and nanospikes: Mechano-bactericidal nanostructures and where to find them, *Adv Colloid Interface Sci*. 252 (2018) 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.12.007>.
- [106] A. Elbourne, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Nano-structured antimicrobial surfaces: From nature to synthetic analogues, *J Colloid Interface Sci*. 508 (2017) 603–616. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.07.021>.
- [107] D.P. Linklater, V.A. Baulin, S. Juodkazis, R.J. Crawford, P. Stoodley, E.P. Ivanova, Mechano-bactericidal actions of nanostructured surfaces, *Nat Rev Microbiol*. 19 (2021) 8–22. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0414-z>.
- [108] N. Mitik-Dineva, J. Wang, R.C. Mocanasu, P.R. Stoddart, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Impact of nano-topography on bacterial attachment, *Biotechnol J*. 3 (2008) 536–544. <https://doi.org/10.1002/biot.200700244>.
- [109] N. Mitik-Dineva, J. Wang, V.K. Truong, P. Stoddart, F. Malherbe, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* Attachment Patterns on Glass Surfaces with Nanoscale Roughness, *Curr Microbiol*. 58 (2009) 268–273. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9320-8>.
- [110] C. Lüdecke, J. Bossert, M. Roth, K.D. Jandt, Physical vapor deposited titanium thin films for biomedical applications: Reproducibility of nanoscale surface roughness and microbial adhesion properties, *Applied Surface Science*. 280 (2013) 578–589. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.05.030>.
- [111] I. Yoda, H. Koseki, M. Tomita, T. Shida, H. Horiuchi, H. Sakoda, M. Osaki, Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion, *BMC Microbiol*. 14 (2014) 234. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0234-2>.
- [112] K. Azelmad, F. Hamadi, R. Mimouni, K. Amzil, H. Latrache, M. Mabrouki, A. El Boulani, Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus xylosus* to materials commonly found

in catering and domestic kitchens, *Food Control*. 73 (2017) 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.044>.

[113] G.S. Kaliaraj, M. Bavanilathamuthiah, K. Kirubaharan, D. Ramachandran, T. Dharini, K. Viswanathan, V. Vishwakarma, Bio-inspired YSZ coated titanium by EB-PVD for biomedical applications, *Surface and Coatings Technology*. 307 (2016) 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.08.039>.

[114] F. Alam, K. Balani, Adhesion force of staphylococcus aureus on various biomaterial surfaces, *J Mech Behav Biomed Mater*. 65 (2017) 872–880. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.10.009>.

[115] L. Mei, H.J. Busscher, H.C. van der Mei, Y. Ren, Influence of surface roughness on streptococcal adhesion forces to composite resins, *Dent Mater*. 27 (2011) 770–778. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.03.017>.

[116] C. Wang, Y. Zhao, S. Zheng, J. Xue, J. Zhou, Y. Tang, L. Jiang, W. Li, Effect of enamel morphology on nanoscale adhesion forces of streptococcal bacteria : An AFM study, *Scanning*. 37 (2015) 313–321. <https://doi.org/10.1002/sca.21218>.

[117] S.Y. Choi, O. Habimana, P. Flood, E.G. Reynaud, B.J. Rodriguez, N. Zhang, E. Casey, M.D. Gilchrist, Material- and feature-dependent effects on cell adhesion to micro injection moulded medical polymers, *Colloids Surf B Biointerfaces*. 145 (2016) 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.04.032>.

[118] S.S. Babu, H. Möhwald, T. Nakanishi, Recent progress in morphology control of supramolecular fullerene assemblies and its applications, *Chem. Soc. Rev*. 39 (2010) 4021–4035. <https://doi.org/10.1039/C000680G>.

[119] D.Y.C. Chan, M.H. Uddin, K.L. Cho, I.I. Liaw, R.N. Lamb, G.W. Stevens, F. Grieser, R.R. Dagastine, Silica nano-particle super-hydrophobic surfaces: the effects of surface morphology and trapped air pockets on hydrodynamic drainage forces, *Faraday Discuss*. 143 (2009) 151–168. <https://doi.org/10.1039/B901134J>.

[120] I.U. Vakarelski, J.W. Kwek, X. Tang, S.J. O’Shea, D.Y.C. Chan, Particulate templates and ordered liquid bridge networks in evaporative lithography, *Langmuir*. 25 (2009) 13311–13314. <https://doi.org/10.1021/la9033723>.

[121] J. Rodríguez-Fernández, A.M. Funston, J. Pérez-Juste, R.A. Álvarez-Puebla, L.M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, The effect of surface roughness on the plasmonic response of individual sub-micron gold spheres, *Phys. Chem. Chem. Phys*. 11 (2009) 5909–5914. <https://doi.org/10.1039/B905200N>.

[122] A.P.R. Johnston, C. Cortez, A.S. Angelatos, F. Caruso, Layer-by-layer engineered capsules and their applications, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 11 (2006) 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2006.05.001>.

- [123] B.D. Fleming, E.J. Wanless, Soft-contact Atomic Force Microscopy Imaging of Adsorbed Surfactant and Polymer Layers, *Microscopy and Microanalysis*. 6 (2000) 104–112. <https://doi.org/10.1007/s100059910009>.
- [124] D.Y.C. Chan, O. Manor, J.N. Connor, R.G. Horn, Soft matter: from shapes to forces on the nanoscale, *Soft Matter*. 4 (2008) 471–474. <https://doi.org/10.1039/B712924F>.
- [125] M.A. Cole, N.H. Voelcker, H. Thissen, R.G. Horn, H.J. Griesser, Colloid probe AFM study of thermal collapse and protein interactions of poly(N-isopropylacrylamide) coatings, *Soft Matter*. 6 (2010) 2657–2667. <https://doi.org/10.1039/B926441H>.
- [126] H.K. Webb, V.K. Truong, J. Hasan, C. Fluke, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Roughness parameters for standard description of surface nanoarchitecture, *Scanning*. 34 (2012) 257–263. <https://doi.org/10.1002/sca.21002>.
- [127] S. Liu, Y. Wang, Application of AFM in microbiology: a review, *Scanning*. 32 (2010) 61–73. <https://doi.org/10.1002/sca.20173>.
- [128] R.J. Crawford, H.K. Webb, V.K. Truong, J. Hasan, E.P. Ivanova, Surface topographical factors influencing bacterial attachment, *Advances in Colloid and Interface Science*. 179–182 (2012) 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.06.015>.
- [129] K.J. Stout, K. Stout, *Development of Methods for Characterisation of Roughness in Three Dimensions*, Elsevier Science, 2000.
- [130] R. Helbig, D. Günther, J. Friedrichs, F. Rößler, A. Lasagni, C. Werner, The impact of structure dimensions on initial bacterial adhesion, *Biomater. Sci.* 4 (2016) 1074–1078. <https://doi.org/10.1039/C6BM00078A>.
- [131] M.V. Graham, A.P. Mosier, T.R. Kiehl, A.E. Kaloyeros, N.C. Cady, Development of antifouling surfaces to reduce bacterial attachment, *Soft Matter*. 9 (2013) 6235–6244. <https://doi.org/10.1039/C3SM50584G>.
- [132] A.H.A. Lutey, L. Gemini, L. Romoli, G. Lazzini, F. Fuso, M. Faucon, R. Kling, Towards Laser-Textured Antibacterial Surfaces, *Sci Rep.* 8 (2018) 10112. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28454-2>.
- [133] V. Vadillo-Rodríguez, A.I. Guerra-García-Mora, D. Perera-Costa, M.L. González-Martín, M.C. Fernández-Calderón, Bacterial response to spatially organized microtopographic surface patterns with nanometer scale roughness, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 169 (2018) 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.05.038>.
- [134] E.P. Ivanova, J. Hasan, H.K. Webb, V.K. Truong, G.S. Watson, J.A. Watson, V.A. Baulin, S. Pogodin, J.Y. Wang, M.J. Tobin, C. Löbbe, R.J. Crawford, Natural Bactericidal Surfaces: Mechanical Rupture of *Pseudomonas aeruginosa* Cells by Cicada Wings, *Small*. 8 (2012) 2489–2494. <https://doi.org/10.1002/smll.201200528>.

- [135] M.N. Dickson, E.I. Liang, L.A. Rodriguez, N. Vollereaux, A.F. Yee, Nanopatterned polymer surfaces with bactericidal properties, *Biointerphases*. 10 (2015) 021010. <https://doi.org/10.1116/1.4922157>.
- [136] J. Hasan, S. Raj, L. Yadav, K. Chatterjee, Engineering a nanostructured “super surface” with superhydrophobic and superkilling properties, *RSC Adv*. 5 (2015) 44953–44959. <https://doi.org/10.1039/C5RA05206H>.
- [137] K. Anselme, P. Davidson, A.M. Popa, M. Giazzon, M. Liley, L. Ploux, The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale, *Acta Biomaterialia*. 6 (2010) 3824–3846. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.04.001>.
- [138] L.M. Nilsson, W.E. Thomas, E. Trintchina, V. Vogel, E.V. Sokurenko, Catch bond-mediated adhesion without a shear threshold: trimannose versus monomannose interactions with the FimH adhesin of *Escherichia coli*, *J Biol Chem*. 281 (2006) 16656–16663. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511496200>.
- [139] E. Medilanski, K. Kaufmann, L.Y. Wick, O. Wanner, H. Harms, Influence of the Surface Topography of Stainless Steel on Bacterial Adhesion, *Biofouling*. 18 (2002) 193–203. <https://doi.org/10.1080/08927010290011370>.
- [140] A.K. Epstein, A.I. Hochbaum, P. Kim, J. Aizenberg, Control of bacterial biofilm growth on surfaces by nanostructural mechanics and geometry, *Nanotechnology*. 22 (2011) 494007. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/49/494007>.
- [141] C.Q. Lai, Bacterial Attachment, Aggregation, and Alignment on Subcellular Nanogratings, *Langmuir*. 34 (2018) 4059–4070. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00350>.
- [142] A.I. Hochbaum, J. Aizenberg, Bacteria Pattern Spontaneously on Periodic Nanostructure Arrays, *Nano Lett*. 10 (2010) 3717–3721. <https://doi.org/10.1021/nl102290k>.
- [143] M.G. Blango, M.A. Mulvey, Bacterial landlines: contact-dependent signaling in bacterial populations, *Curr Opin Microbiol*. 12 (2009) 177–181. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.011>.
- [144] P. Shivapooja, Q. Wang, B. Orihuela, D. Rittschof, G.P. López, X. Zhao, Bioinspired Surfaces with Dynamic Topography for Active Control of Biofouling, *Advanced Materials*. 25 (2013) 1430–1434. <https://doi.org/10.1002/adma.201203374>.
- [145] H. Gu, S.W. Lee, S.L. Buffington, J.H. Henderson, D. Ren, On-Demand Removal of Bacterial Biofilms via Shape Memory Activation, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 8 (2016) 21140–21144. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b06900>.
- [146] A.K. Epstein, D. Hong, P. Kim, J. Aizenberg, Biofilm attachment reduction on bioinspired, dynamic, micro-wrinkling surfaces, *New J. Phys*. 15 (2013) 095018. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/15/9/095018>.

- [147] B. Li, B.E. Logan, Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 36 (2004) 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.05.006>.
- [148] K. Schwibbert, F. Menzel, N. Epperlein, J. Bonse, J. Krüger, Bacterial Adhesion on Femtosecond Laser-Modified Polyethylene, *Materials*. 12 (2019) 3107. <https://doi.org/10.3390/ma12193107>.
- [149] Q. Peng, X. Zhou, Z. Wang, Q. Xie, C. Ma, G. Zhang, X. Gong, Three-Dimensional Bacterial Motions near a Surface Investigated by Digital Holographic Microscopy: Effect of Surface Stiffness, *Langmuir*. 35 (2019) 12257–12263. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b02103>.
- [150] F. Song, M.E. Brasch, H. Wang, J.H. Henderson, K. Sauer, D. Ren, How Bacteria Respond to Material Stiffness during Attachment: A Role of Escherichia coli Flagellar Motility, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 9 (2017) 22176–22184. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b04757>.
- [151] L. Cai, D. Wu, J. Xia, H. Shi, H. Kim, Influence of physicochemical surface properties on the adhesion of bacteria onto four types of plastics, *Science of The Total Environment*. 671 (2019) 1101–1107. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.434>.
- [152] F. Song, D. Ren, Stiffness of Cross-Linked Poly(Dimethylsiloxane) Affects Bacterial Adhesion and Antibiotic Susceptibility of Attached Cells, *Langmuir*. 30 (2014) 10354–10362. <https://doi.org/10.1021/la502029f>.
- [153] N. Saha, C. Monge, V. Dulong, C. Picart, K. Glinel, Influence of Polyelectrolyte Film Stiffness on Bacterial Growth, *Biomacromolecules*. 14 (2013) 520–528. <https://doi.org/10.1021/bm301774a>.
- [154] S.L. Arias, J. Devorkin, A. Civantos, J.P. Allain, Escherichia coli Adhesion and Biofilm Formation on Polydimethylsiloxane are Independent of Substrate Stiffness, *Langmuir*. 37 (2021) 16–25. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00130>.
- [155] G. Decher, Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites, *Science*. 277 (1997) 1232–1237. <https://doi.org/10.1126/science.277.5330.1232>.
- [156] X. Zhu, D. Jańczewski, S. Guo, S.S.C. Lee, F.J. Parra Velandia, S.L.-M. Teo, T. He, S.R. Puniredd, G.J. Vancso, Polyion Multilayers with Precise Surface Charge Control for Antifouling, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 7 (2015) 852–861. <https://doi.org/10.1021/am507371a>.
- [157] R.J. Smith, M.G. Moule, P. Sule, T. Smith, J.D. Cirillo, J.C. Grunlan, Polyelectrolyte Multilayer Nanocoating Dramatically Reduces Bacterial Adhesion to Polyester Fabric, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 3 (2017) 1845–1852. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00250>.
- [158] D. Kovačević, R. Pratnekar, K. Godič Torkar, J. Salopek, G. Dražić, A. Abram, K. Bohinc, Influence of Polyelectrolyte Multilayer Properties on Bacterial Adhesion Capacity, *Polymers*. 8 (2016) 345. <https://doi.org/10.3390/polym8100345>.

- [159] B. Asadishad, S. Ghoshal, N. Tufenkji, Method for the Direct Observation and Quantification of Survival of Bacteria Attached to Negatively or Positively Charged Surfaces in an Aqueous Medium, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 8345–8351. <https://doi.org/10.1021/es201496q>.
- [160] J. Hoque, S. Ghosh, K. Paramanandham, J. Haldar, Charge-Switchable Polymeric Coating Kills Bacteria and Prevents Biofilm Formation in Vivo, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 11 (2019) 39150–39162. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b11453>.
- [161] L. Liu, W. Peng, X. Zhang, J. Peng, P. Liu, J. Shen, Rational design of phosphonate/quaternary amine block polymer as an high-efficiency antibacterial coating for metallic substrates, *Journal of Materials Science & Technology.* 62 (2021) 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2020.05.060>.
- [162] Influence of Cellulose Charge on Bacteria Adhesion and Viability to PVAm/CNF/PVAm-Modified Cellulose Model Surfaces, *Biomacromolecules.* 20 (2019) 2075–2083. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00297>.
- [163] X. Zhu, S. Guo, T. He, S. Jiang, D. Jańczewski, G.J. Vancso, Engineered, Robust Polyelectrolyte Multilayers by Precise Control of Surface Potential for Designer Protein, Cell, and Bacteria Adsorption, *Langmuir.* 32 (2016) 1338–1346. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04118>.
- [164] C.N. Dominick, X.-L. Wu, Rotating Bacteria on Solid Surfaces without Tethering, *Biophysical Journal.* 115 (2018) 588–594. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.06.020>.
- [165] Z. Ye, H. Liu, F. Wang, X. Wang, L. Wei, L. Xiao, Single-particle tracking discloses binding-mediated rocking diffusion of rod-shaped biological particles on lipid membranes, *Chem. Sci.* 10 (2019) 1351–1359. <https://doi.org/10.1039/C8SC04033H>.
- [166] Y.F. Dufrêne, Sticky microbes: forces in microbial cell adhesion, *Trends in Microbiology.* 23 (2015) 376–382. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.01.011>.
- [167] A. Beaussart, S. El-Kirat-Chatel, P. Herman, D. Alsteens, J. Mahillon, P. Hols, Y.F. Dufrêne, Single-Cell Force Spectroscopy of Probiotic Bacteria, *Biophys J.* 104 (2013) 1886–1892. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.03.046>.
- [168] K. Huttenlochner, N. Davoudi, C. Schlegel, M. Bohley, C. Müller-Renno, J.C. Aurich, R. Ulber, C. Ziegler, *Paracoccus seriniphilus* adhered on surfaces: Resistance of a seawater bacterium against shear forces under the influence of roughness, surface energy, and zeta potential of the surfaces, *Biointerphases.* 13 (2018) 051003. <https://doi.org/10.1116/1.5049226>.
- [169] F. Rost, Fluorescence Microscopy, Applications, in: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Elsevier, 2017: pp. 627–631. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00147-3>.

- [170] S. Sharma, Y.A. Jaimes-Lizcano, R.B. McLay, P.C. Cirino, J.C. Conrad, Subnanometric Roughness Affects the Deposition and Mobile Adhesion of *Escherichia coli* on Silanized Glass Surfaces, *Langmuir*. 32 (2016) 5422–5433. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00883>.
- [171] K. Yang, J. Shi, L. Wang, Y. Chen, C. Liang, L. Yang, L.-N. Wang, Bacterial anti-adhesion surface design: Surface patterning, roughness and wettability: A review, *Journal of Materials Science & Technology*. 99 (2022) 82–100. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2021.05.028>.
- [172] Y. Liu, C.-H. Yang, J. Li, Adhesion and Retention of a Bacterial Phytopathogen *Erwinia chrysanthemi* in Biofilm-Coated Porous Media, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 159–165. <https://doi.org/10.1021/es071698k>.
- [173] H. Wei, G. Yang, B. Wang, R. Li, G. Chen, Z. Li, *E. coli* interactions, adhesion and transport in alumino-silica clays, *Colloids Surf B Biointerfaces*. 154 (2017) 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.012>.
- [174] J.M. Thwala, M. Li, M.C.Y. Wong, S. Kang, E.M.V. Hoek, B.B. Mamba, Bacteria–Polymeric Membrane Interactions: Atomic Force Microscopy and XDLVO Predictions, *Langmuir*. 29 (2013) 13773–13782. <https://doi.org/10.1021/la402749y>.
- [175] N.P. Boks, W. Norde, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, Forces involved in bacterial adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces, *Microbiology (Reading)*. 154 (2008) 3122–3133. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/018622-0>.
- [176] K.K. Sakimoto, C. Liu, J. Lim, P. Yang, Salt-induced self-assembly of bacteria on nanowire arrays, *Nano Lett.* 14 (2014) 5471–5476. <https://doi.org/10.1021/nl502946j>.
- [177] D. Siegismund, A. Undisz, S. Germerodt, S. Schuster, M. Rettenmayr, Quantification of the interaction between biomaterial surfaces and bacteria by 3-D modeling, *Acta Biomaterialia*. 10 (2014) 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.016>.
- [178] R.G. Harrison, The cultivation of tissues in extraneous media as a method of morphogenetic study, *The Anatomical Record*. 6 (1912) 181–193. <https://doi.org/10.1002/ar.1090060404>.
- [179] P. Weiss, The problem of specificity in growth and development, *Yale J Biol Med*. 19 (1947) 235–278.
- [180] A.S. Curtis, M. Varde, CONTROL OF CELL BEHAVIOR: TOPOLOGICAL FACTORS, *J Natl Cancer Inst*. 33 (1964) 15–26.
- [181] R. McBeath, D.M. Pirone, C.M. Nelson, K. Bhadriraju, C.S. Chen, Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment, *Dev Cell*. 6 (2004) 483–495. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(04\)00075-9](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(04)00075-9).

- [182] V. Hasirci, H. Kenar, Novel surface patterning approaches for tissue engineering and their effect on cell behavior, *Nanomedicine (Lond)*. 1 (2006) 73–90. <https://doi.org/10.2217/17435889.1.1.73>.
- [183] R.G. Flemming, C.J. Murphy, G.A. Abrams, S.L. Goodman, P.F. Nealey, Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior, *Biomaterials*. 20 (1999) 573–588. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(98\)00209-9](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(98)00209-9).
- [184] A.S.G. Curtis, M. Dalby, N. Gadegaard, Cell signaling arising from nanotopography: implications for nanomedical devices, *Nanomedicine (Lond)*. 1 (2006) 67–72. <https://doi.org/10.2217/17435889.1.1.67>.
- [185] M.J. Dalby, N. Gadegaard, M.O. Riehle, C.D.W. Wilkinson, A.S.G. Curtis, Investigating filopodia sensing using arrays of defined nano-pits down to 35 nm diameter in size, *Int J Biochem Cell Biol*. 36 (2004) 2005–2015. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.03.001>.
- [186] A.S.G. Curtis, N. Gadegaard, M.J. Dalby, M.O. Riehle, C.D.W. Wilkinson, G. Aitchison, Cells react to nanoscale order and symmetry in their surroundings, *IEEE Trans Nanobioscience*. 3 (2004) 61–65. <https://doi.org/10.1109/tnb.2004.824276>.
- [187] J.O. Gallagher, K.F. McGhee, C.D.W. Wilkinson, M.O. Riehle, Interaction of animal cells with ordered nanotopography, *IEEE Trans Nanobioscience*. 1 (2002) 24–28. <https://doi.org/10.1109/tnb.2002.806918>.
- [188] M.J. Dalby, M.O. Riehle, D.S. Sutherland, H. Agheli, A.S.G. Curtis, Changes in fibroblast morphology in response to nano-columns produced by colloidal lithography, *Biomaterials*. 25 (2004) 5415–5422. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.12.049>.
- [189] A.-S. Andersson, F. Bäckhed, A. von Euler, A. Richter-Dahlfors, D. Sutherland, B. Kasemo, Nanoscale features influence epithelial cell morphology and cytokine production, *Biomaterials*. 24 (2003) 3427–3436. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00208-4](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00208-4).
- [190] C.D.W. Wilkinson, M. Riehle, M. Wood, J. Gallagher, A.S.G. Curtis, The use of materials patterned on a nano- and micro-metric scale in cellular engineering, *Materials Science and Engineering: C*. 19 (2002) 263–269. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(01\)00396-4](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(01)00396-4).
- [191] E. Ruoslahti, M.D. Pierschbacher, New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins, *Science*. 238 (1987) 491–497. <https://doi.org/10.1126/science.2821619>.
- [192] S.K. Mitra, D.A. Hanson, D.D. Schlaepfer, Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6 (2005) 56–68. <https://doi.org/10.1038/nrm1549>.
- [193] N. Wang, J.D. Tytell, D.E. Ingber, Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10 (2009) 75–82. <https://doi.org/10.1038/nrm2594>.

- [194] A. Wargenau, N. Fekete, A.V. Beland, G. Sabbatier, O.M. Bowden, M.D. Boulanger, C.A. Hoesli, Protein film formation on cell culture surfaces investigated by quartz crystal microbalance with dissipation monitoring and atomic force microscopy, *Colloids Surf B Biointerfaces*. 183 (2019) 110447. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110447>.
- [195] M. Hindié, E. Camand, R. Agniel, F. Carreiras, E. Pauthe, P. Van Tassel, Effects of human fibronectin and human serum albumin sequential adsorption on preosteoblastic cell adhesion, *Biointerphases*. 9 (2014) 029008. <https://doi.org/10.1116/1.4867598>.
- [196] Q. Zhou, J. Chen, Y. Luan, P.A. Vainikka, S. Thallmair, S.J. Marrink, B.L. Feringa, P. van Rijn, Unidirectional rotating molecular motors dynamically interact with adsorbed proteins to direct the fate of mesenchymal stem cells, *Sci Adv*. 6 (2020) eaay2756. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay2756>.
- [197] C.J. Hutchison, Lamins: building blocks or regulators of gene expression?, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3 (2002) 848–858. <https://doi.org/10.1038/nrm950>.
- [198] C.J. Hutchison, H.J. Worman, A-type lamins: Guardians of the soma?, *Nat Cell Biol*. 6 (2004) 1062–1067. <https://doi.org/10.1038/ncb1104-1062>.
- [199] M. Hoffmann, U.S. Schwarz, A kinetic model for RNA-interference of focal adhesions, *BMC Syst Biol*. 7 (2013) 2. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-2>.
- [200] M.G. Farquhar, G.E. Palade, Junctional complexes in various epithelia, *J Cell Biol*. 17 (1963) 375–412. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.2.375>.
- [201] A.S.G. Curtis, THE MECHANISM OF ADHESION OF CELLS TO GLASS: A Study by Interference Reflection Microscopy, *Journal of Cell Biology*. 20 (1964) 199–215. <https://doi.org/10.1083/jcb.20.2.199>.
- [202] A.S. Curtis, J.V. Forrester, C. McInnes, F. Lawrie, Adhesion of cells to polystyrene surfaces, *J Cell Biol*. 97 (1983) 1500–1506. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.5.1500>.
- [203] C.S. Izzard, L.R. Lochner, Formation of cell-to-substrate contacts during fibroblast motility: An interference-reflexion study, *Journal of Cell Science*. 42 (1980) 81–116. <https://doi.org/10.1242/jcs.42.1.81>.
- [204] B. Geiger, A. Bershadsky, R. Pankov, K.M. Yamada, Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2 (2001) 793–805. <https://doi.org/10.1038/35099066>.
- [205] J. Ishikawa, H. Tsuji, H. Sato, Y. Gotoh, Ion implantation of negative ions for cell growth manipulation and nervous system repair, *Surface and Coatings Technology*. 201 (2007) 8083–8090. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2006.01.073>.

- [206] D.P. Dowling, I.S. Miller, M. Ardhaoui, W.M. Gallagher, Effect of Surface Wettability and Topography on the Adhesion of Osteosarcoma Cells on Plasma-modified Polystyrene, *J Biomater Appl.* 26 (2011) 327–347. <https://doi.org/10.1177/0885328210372148>.
- [207] N. Attik, M. Phantarasmy, H. Abouelleil, C. Chevalier, A. Barraco, B. Grosogeat, A. Lafon, Comparison of the Biological Behavior and Topographical Surface Assessment of a Minimally Invasive Dental Implant and a Standard Implant: An In Vitro Study, *Materials.* 15 (2022) 7540. <https://doi.org/10.3390/ma15217540>.
- [208] K. Anselme, Osteoblast adhesion on biomaterials, *Biomaterials.* 21 (2000) 667–681. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00242-2).
- [209] N. Iwata, K. Nozaki, N. Horiuchi, K. Yamashita, Y. Tsutsumi, H. Miura, A. Nagai, Effects of controlled micro-/nanosurfaces on osteoblast proliferation, *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 105 (2017) 2589–2596. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36118>.
- [210] J.C. Chen, C.R. Jacobs, Mechanically induced osteogenic lineage commitment of stem cells, *Stem Cell Research & Therapy.* 4 (2013) 107. <https://doi.org/10.1186/scrt318>.
- [211] J.L. Eisenberg, K.G. Beaumont, D. Takawira, S.B. Hopkinson, M. Mrksich, G.R.S. Budinger, J.C.R. Jones, Plectin-containing, centrally localized focal adhesions exert traction forces in primary lung epithelial cells, *Journal of Cell Science.* 126 (2013) 3746–3755. <https://doi.org/10.1242/jcs.128975>.
- [212] H. Özçelik, C. Padeste, V. Hasirci, Systematically organized nanopillar arrays reveal differences in adhesion and alignment properties of BMSC and Saos-2 cells, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 119 (2014) 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.03.019>.
- [213] K. Anselme, N.T. Wakhloo, P. Rougerie, L. Pieuchot, Role of the Nucleus as a Sensor of Cell Environment Topography, *Adv Healthc Mater.* 7 (2018) e1701154. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701154>.
- [214] T.J. Kirby, J. Lammerding, Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor, *Nat Cell Biol.* 20 (2018) 373–381. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0038-y>.
- [215] M. Ermis, D. Akkaynak, P. Chen, U. Demirci, V. Hasirci, A high throughput approach for analysis of cell nuclear deformability at single cell level, *Sci Rep.* 6 (2016) 36917. <https://doi.org/10.1038/srep36917>.
- [216] N. Buch-Månson, A. Spangenberg, L.P.C. Gomez, J.-P. Malval, O. Soppera, K.L. Martinez, Rapid Prototyping of Polymeric Nanopillars by 3D Direct Laser Writing for Controlling Cell Behavior, *Sci Rep.* 7 (2017) 9247. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09208-y>.
- [217] C.H. Seo, H. Jeong, Y. Feng, K. Montagne, T. Ushida, Y. Suzuki, K.S. Furukawa, Micropit surfaces designed for accelerating osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem

cells via enhancing focal adhesion and actin polymerization, *Biomaterials*. 35 (2014) 2245–2252. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.089>.

[218] N.E. Vrana, A. Elsheikh, N. Builles, O. Damour, V. Hasirci, Effect of human corneal keratocytes and retinal pigment epithelial cells on the mechanical properties of micropatterned collagen films, *Biomaterials*. 28 (2007) 4303–4310. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.06.013>.

[219] T. Peterbauer, S. Yakunin, J. Siegel, S. Hering, M. Fahrner, C. Romanin, J. Heitz, Dynamics of Spreading and Alignment of Cells Cultured *In Vitro* on a Grooved Polymer Surface, *Journal of Nanomaterials*. 2011 (2010) e413079. <https://doi.org/10.1155/2011/413079>.

[220] C. Oakley, D.M. Brunette, The sequence of alignment of microtubules, focal contacts and actin filaments in fibroblasts spreading on smooth and grooved titanium substrata, *J Cell Sci*. 106 (Pt 1) (1993) 343–354. <https://doi.org/10.1242/jcs.106.1.343>.

[221] X.F. Walboomers, L.A. Ginsel, J.A. Jansen, Early spreading events of fibroblasts on microgrooved substrates, *J Biomed Mater Res*. 51 (2000) 529–534. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20000905\)51:3<529::aid-jbm30>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20000905)51:3<529::aid-jbm30>3.0.co;2-r).

[222] E.T. den Braber, J.E. de Ruijter, L.A. Ginsel, A.F. von Recum, J.A. Jansen, Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces, *J Biomed Mater Res*. 40 (1998) 291–300. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199805\)40:2<291::aid-jbm14>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199805)40:2<291::aid-jbm14>3.0.co;2-p).

[223] B. Wójciak-Stothard, A. Curtis, W. Monaghan, K. MacDonald, C. Wilkinson, Guidance and activation of murine macrophages by nanometric scale topography, *Exp Cell Res*. 223 (1996) 426–435. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0098>.

[224] X.F. Walboomers, W. Monaghan, A.S. Curtis, J.A. Jansen, Attachment of fibroblasts on smooth and microgrooved polystyrene, *J Biomed Mater Res*. 46 (1999) 212–220. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199908\)46:2<212::aid-jbm10>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199908)46:2<212::aid-jbm10>3.0.co;2-y).

[225] V. Dumas, A. Rattner, L. Vico, E. Audouard, J.C. Dumas, P. Naisson, P. Bertrand, Multiscale grooved titanium processed with femtosecond laser influences mesenchymal stem cell morphology, adhesion, and matrix organization, *J. Biomed. Mater. Res*. 100A (2012) 3108–3116. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34239>.

[226] W.A. Loesberg, J. te Riet, F.C.M.J.M. van Delft, P. Schön, C.G. Figdor, S. Speller, J.J.W.A. van Loon, X.F. Walboomers, J.A. Jansen, The threshold at which substrate nanogroove dimensions may influence fibroblast alignment and adhesion, *Biomaterials*. 28 (2007) 3944–3951. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.05.030>.

[227] A.J. Ridley, M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, A.R. Horwitz, Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back, *Science*. 302 (2003) 1704–1709. <https://doi.org/10.1126/science.1092053>.

- [228] D.-H. Kim, C.-H. Seo, K. Han, K.W. Kwon, A. Levchenko, K.-Y. Suh, Guided Cell Migration on Microtextured Substrates with Variable Local Density and Anisotropy, *Adv Funct Mater.* 19 (2009) 1579–1586. <https://doi.org/10.1002/adfm.200990041>.
- [229] X. Jiang, D.A. Bruzewicz, A.P. Wong, M. Piel, G.M. Whitesides, Directing cell migration with asymmetric micropatterns, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 975–978. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408954102>.
- [230] M.J. Dalby, M.O. Riehle, D.S. Sutherland, H. Agheli, A.S.G. Curtis, Fibroblast response to a controlled nanoenvironment produced by colloidal lithography, *J Biomed Mater Res A.* 69 (2004) 314–322. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.20138>.
- [231] D.C. Miller, A. Thapa, K.M. Haberstroh, T.J. Webster, Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly(lactic-co-glycolic acid) with nano-structured surface features, *Biomaterials.* 25 (2004) 53–61. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00471-x](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00471-x).
- [232] A.M. Green, J.A. Jansen, J.P. van der Waerden, A.F. von Recum, Fibroblast response to microtextured silicone surfaces: texture orientation into or out of the surface, *J Biomed Mater Res.* 28 (1994) 647–653. <https://doi.org/10.1002/jbm.820280515>.
- [233] M.J. Dalby, M.O. Riehle, S.J. Yarwood, C.D.W. Wilkinson, A.S.G. Curtis, Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: response to a micro-grooved topography, *Exp Cell Res.* 284 (2003) 274–282. [https://doi.org/10.1016/s0014-4827\(02\)00053-8](https://doi.org/10.1016/s0014-4827(02)00053-8).
- [234] K. Matsuzaka, X.F. Walboomers, J.E. de Ruijter, J.A. Jansen, The effect of poly-L-lactic acid with parallel surface micro groove on osteoblast-like cells in vitro, *Biomaterials.* 20 (1999) 1293–1301. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00029-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00029-0).
- [235] K.A. Kilian, B. Bugarija, B.T. Lahn, M. Mrksich, Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107 (2010) 4872–4877. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903269107>.
- [236] K. Hatano, H. Inoue, T. Kojo, T. Matsunaga, T. Tsujisawa, C. Uchiyama, Y. Uchida, Effect of surface roughness on proliferation and alkaline phosphatase expression of rat calvarial cells cultured on polystyrene, *Bone.* 25 (1999) 439–445. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(99\)00192-1](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(99)00192-1).
- [237] V. Dumas, A. Guignandon, L. Vico, C. Mauclair, X. Zapata, M.T. Linossier, W. Boulefour, J. Granier, S. Peyroche, J.-C. Dumas, H. Zahouani, A. Rattner, Femtosecond laser nano/micro patterning of titanium influences mesenchymal stem cell adhesion and commitment, *Biomed. Mater.* 10 (2015) 055002. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/5/055002>.
- [238] P. Chen, T. Aso, R. Sasaki, M. Ashida, Y. Tsutsumi, H. Doi, T. Hanawa, Adhesion and differentiation behaviors of mesenchymal stem cells on titanium with micrometer and nanometer-scale grid patterns produced by femtosecond laser irradiation, *J. Biomed. Mater. Res.* 106 (2018) 2735–2743. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36503>.

- [239] H.E. Götz, M. Müller, A. Emmel, U. Holzwarth, R.G. Erben, R. Stangl, Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants, *Biomaterials*. 25 (2004) 4057–4064. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.11.002>.
- [240] B.E.J. Lee, H. Exir, A. Weck, K. Grandfield, Characterization and evaluation of femtosecond laser-induced sub-micron periodic structures generated on titanium to improve osseointegration of implants, *Applied Surface Science*. 441 (2018) 1034–1042. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.02.119>.
- [241] M.J. Dalby, D. McCloy, M. Robertson, H. Agheli, D. Sutherland, S. Affrossman, R.O.C. Oreffo, Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies, *Biomaterials*. 27 (2006) 2980–2987. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.010>.
- [242] M.J. Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M.O. Riehle, P. Herzyk, C.D.W. Wilkinson, R.O.C. Oreffo, The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder, *Nat Mater*. 6 (2007) 997–1003. <https://doi.org/10.1038/nmat2013>.
- [243] K.C. Popat, K.-I. Chatvanichkul, G.L. Barnes, T.J. Latempa, C.A. Grimes, T.A. Desai, Osteogenic differentiation of marrow stromal cells cultured on nanoporous alumina surfaces, *J Biomed Mater Res A*. 80 (2007) 955–964. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31028>.
- [244] R. Peng, X. Yao, J. Ding, Effect of cell anisotropy on differentiation of stem cells on micropatterned surfaces through the controlled single cell adhesion, *Biomaterials*. 32 (2011) 8048–8057. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.035>.
- [245] S. Watari, K. Hayashi, J.A. Wood, P. Russell, P.F. Nealey, C.J. Murphy, D.C. Genetos, Modulation of osteogenic differentiation in hMSCs cells by submicron topographically-patterned ridges and grooves, *Biomaterials*. 33 (2012) 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.058>.
- [246] W. Song, H. Lu, N. Kawazoe, G. Chen, Adipogenic differentiation of individual mesenchymal stem cell on different geometric micropatterns, *Langmuir*. 27 (2011) 6155–6162. <https://doi.org/10.1021/la200487w>.
- [247] X. Wang, W. Song, N. Kawazoe, G. Chen, Influence of cell protrusion and spreading on adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells on micropatterned surfaces, *Soft Matter*. 9 (2013) 4160–4166. <https://doi.org/10.1039/C3SM27818B>.
- [248] N.M. Alves, I. Pashkuleva, R.L. Reis, J.F. Mano, Controlling cell behavior through the design of polymer surfaces, *Small*. 6 (2010) 2208–2220. <https://doi.org/10.1002/smll.201000233>.
- [249] R. Fu, Q. Liu, G. Song, A. Baik, M. Hu, S. Sun, X.E. Guo, M. Long, B. Huo, Spreading area and shape regulate apoptosis and differentiation of osteoblasts, *Biomed Mater*. 8 (2013) 055005. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/8/5/055005>.

- [250] A. Ahmad Khalili, M.R. Ahmad, A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications, *Int J Mol Sci.* 16 (2015) 18149–18184. <https://doi.org/10.3390/ijms160818149>.
- [251] Z. Xu, Y. He, X. Zeng, X. Zeng, J. Huang, X. Lin, J. Chen, Enhanced Human Gingival Fibroblast Response and Reduced *Porphyromonas gingivalis* Adhesion with Titania Nanotubes, *BioMed Research International.* 2020 (2020) 1–10. <https://doi.org/10.1155/2020/5651780>.
- [252] J.D. Boyd, A.J. Stromberg, C.S. Miller, M.E. Grady, Biofilm and Cell Adhesion Strength on Dental Implant Surfaces via the Laser Spallation Technique, (2021).
- [253] T. Ikeda, T. Ueno, J. Saruta, M. Hirota, W. Park, T. Ogawa, Ultraviolet Treatment of Titanium to Enhance Adhesion and Retention of Oral Mucosa Connective Tissue and Fibroblasts, *IJMS.* 22 (2021) 12396. <https://doi.org/10.3390/ijms222212396>.
- [254] J. Helenius, C.-P. Heisenberg, H.E. Gaub, D.J. Muller, Single-cell force spectroscopy, *Journal of Cell Science.* 121 (2008) 1785–1791. <https://doi.org/10.1242/jcs.030999>.
- [255] A.V. Taubenberger, D.W. Hutmacher, D.J. Muller, Single-Cell Force Spectroscopy, an Emerging Tool to Quantify Cell Adhesion to Biomaterials, *Tissue Engineering Part B: Reviews.* 20 (2014) 40–55. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2013.0125>.
- [256] J.Y. Lim, H.J. Donahue, Cell Sensing and Response to Micro- and Nanostructured Surfaces Produced by Chemical and Topographic Patterning, *Tissue Engineering.* 13 (2007) 1879–1891. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0154>.
- [257] D. Pallarés-Aldeiturriaga, S. Papa, A. Abou Khalil, A. Pascale-Hamri, M. Maalouf, Y. Di Maio, A. Guignandon, V. Dumas, X. Sedao, Influence of multi-wavelength ultrafast laser texturing and autoclave sterilization on titanium alloy-based surface wettability, *Appl. Phys. A.* 128 (2022) 894. <https://doi.org/10.1007/s00339-022-06015-9>.
- [258] S. Papa, A. Abou Khalil, H. Hamzeh-Cognasse, M. Thomas, M. Maalouf, Y. Di Maio, X. Sedao, A. Guignandon, V. Dumas, Dual-functionalized titanium by ultrafast laser texturing to enhance human gingival fibroblasts adhesion and minimize *Porphyromonas gingivalis* colonization, *Applied Surface Science.* 606 (2022) 154784. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.154784>.
- [259] C.H. Alves, K.L. Russi, N.C. Rocha, F. Bastos, M. Darrieux, T.M. Parisotto, R. Girardello, Host-microbiome interactions regarding peri-implantitis and dental implant loss, *J Transl Med.* 20 (2022) 425. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03636-9>.
- [260] R.P. Darveau, T.-T.T. Pham, K. Lemley, R.A. Reife, B.W. Bainbridge, S.R. Coats, W.N. Howald, S.S. Way, A.M. Hajjar, *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide Contains Multiple Lipid A Species That Functionally Interact with Both Toll-Like Receptors 2 and 4, *Infect Immun.* 72 (2004) 5041–5051. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5041-5051.2004>.

- [261] E. Barker, L. AlQobaly, Z. Shaikh, K. Franklin, K. Moharamzadeh, Implant Soft-Tissue Attachment Using 3D Oral Mucosal Models—A Pilot Study, *Dentistry Journal*. 8 (2020) 72. <https://doi.org/10.3390/dj8030072>.
- [262] J.-M. Zhang, J. An, Cytokines, Inflammation and Pain, *Int Anesthesiol Clin*. 45 (2007) 27–37. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>.
- [263] C.A. Brown, H.N. Hansen, X.J. Jiang, F. Blateyron, J. Berglund, N. Senin, T. Bartkowiak, B. Dixon, G. Le Goïc, Y. Quinsat, W.J. Stemp, M.K. Thompson, P.S. Ungar, E.H. Zahouani, Multiscale analyses and characterizations of surface topographies, *CIRP Annals*. 67 (2018) 839–862. <https://doi.org/10.1016/j.cirp.2018.06.001>.
- [264] Nano-scratch testeur : NST³, Anton Paar. (n.d.). <https://www.anton-paar.com/fr-fr/produits/details/nano-scratch-testeur-nst3/> (accessed November 1, 2023).
- [265] S.E. Mountcastle, S.C. Cox, R.L. Sammons, S. Jabbari, R.M. Shelton, S.A. Kuehne, A review of co-culture models to study the oral microenvironment and disease, *Journal of Oral Microbiology*. 12 (2020) 1773122. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1773122>.
- [266] C. Wang, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, Y. Ren, Streptococcus mutans adhesion force sensing in multi-species oral biofilms, *Npj Biofilms Microbiomes*. 6 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0135-0>.
- [267] A. Nakhoul, Surface morphology control at the nanoscale by temporal and polarization control of ultrafast laser pulses, phdthesis, Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2022. <https://theses.hal.science/tel-04197622> (accessed November 1, 2023).

A. Article Nanomaterials: étude de la partie basse de l'implant pour améliorer l'ostéointégration et ainsi le support de l'implant et de la gencive

M. Maalouf, A. Abou Khalil, Y. Di Maio, **S. Papa**, X. Sedao, E. Dalix, S. Peyroche, A. Guignandon, V. Dumas, Polarization of Femtosecond Laser for Titanium Alloy Nanopatterning Influences Osteoblastic Differentiation (2022).

Comme expliqué en introduction, ces travaux sont le résultat d'une étroite collaboration avec le projet européen LASERIMPLANT, financé par le programme Horizon 2020. Les connaissances établies dans les premières phases du projet LASIMP ont ainsi permis de mener au mieux cette étude sur la différenciation ostéoblastique induite par la topographie générée au fs-L.



Article

Polarization of Femtosecond Laser for Titanium Alloy Nanopatterning Influences Osteoblastic Differentiation

Mathieu Maalouf ^{1,*}, Alain Abou Khalil ², Yoan Di Maio ³, Steve Papa ¹, Xxx Sedao ^{2,3}, Elisa Dalix ¹, Sylvie Peyroche ¹, Alain Guignandon ^{1,†} and Virginie Dumas ^{4,†}

- ¹ SAINBIOSE Laboratory INSERM U1509, Jean Monnet University, University of Lyon, F-42270 Saint Priest en Jarez, France; steve.papa@univ-st-etienne.fr (S.P.); elisa.dalix@univ-st-etienne.fr (E.D.); sylvie.peyroche@univ-st-etienne.fr (S.P.); alain.guignandon@univ-st-etienne.fr (A.G.)
- ² Hubert-Curien Laboratory, Jean Monnet University, University of Lyon, UMR 5516 CNRS, F-42000 Saint-Etienne, France; alain.abou.khalil@univ-st-etienne.fr (A.A.K.); xxx.sedao@univ-st-etienne.fr (X.S.)
- ³ GIE Manutech-USD, F-42000 Saint-Etienne, France; yoan.di-maio@manutech-usd.fr
- ⁴ Laboratory of Tribology and Systems Dynamics, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Saint Etienne, Ecole Centrale de Lyon, University of Lyon, UMR 5513 CNRS, F-42100 Saint-Etienne, France; virginie.dumas@enise.fr
- * Correspondence: mathieu.maalouf@univ-st-etienne.fr
- † These authors share senior authorship.

Abstract: Ultrashort pulse lasers have significant advantages over conventional continuous wave and long pulse lasers for the texturing of metallic surfaces, especially for nanoscale surface structure patterning. Furthermore, ultrafast laser beam polarization allows for the precise control of the spatial alignment of nanotextures imprinted on titanium-based implant surfaces. In this article, we report the biological effect of beam polarization on human mesenchymal stem cell differentiation. We created, on polished titanium-6aluminum-4vanadium (Ti-6Al-4V) plates, a laser-induced periodic surface structure (LIPSS) using linear or azimuthal polarization of infrared beams to generate linear or radial LIPSS, respectively. The main difference between the two surfaces was the microstructural anisotropy of the linear LIPSS and the isotropy of the radial LIPSS. At 7 d post seeding, cells on the radial LIPSS surface showed the highest extracellular fibronectin production. At 14 days, qRT-PCR showed on the same surface an increase in osteogenesis-related genes, such as alkaline phosphatase and osterix. At 21 d, mineralization clusters indicative of final osteoinduction were more abundant on the radial LIPSS. Taken together, we identified that creating more isotropic than linear surfaces enhances cell differentiation, resulting in an improved osseointegration. Thus, the fine tuning of ultrashort pulse lasers may be a promising new route for the functionalization of medical implants.

Keywords: femtosecond laser processing; multiscale patterning; human mesenchymal stem cell; cell adhesion; radial LIPSS



Citation: Maalouf, M.; Abou Khalil, A.; Di Maio, Y.; Papa, S.; Sedao, X.; Dalix, E.; Peyroche, S.; Guignandon, A.; Dumas, V. Polarization of Femtosecond Laser for Titanium Alloy Nanopatterning Influences Osteoblastic Differentiation.

Nanomaterials **2022**, *12*, 1619. <https://doi.org/10.3390/nano12101619>

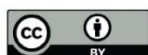
Academic Editor: Johannes Heitz

Received: 31 March 2022

Accepted: 6 May 2022

Published: 10 May 2022

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



Copyright: © 2022 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/>).

1. Introduction

Titanium and related alloys, such as titanium-6aluminum-4vanadium (Ti-6Al-4V), have been used as the main biomaterial for dental and orthopedic implant devices, which can be attributed to their resistance to corrosion, mechanical strength and high biocompatibility with host tissues [1,2]. However, patients still face the risk of implant failure because of insufficient bone integration due to fibrous tissue production and/or the occurrence of infection [3]. It remains a challenge to improve osseointegration with good mineralization at the bone-implant interface. The initial cellular response to the implant surface is a key factor for successful and stable long-term integration [4]. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) are attracted to the implant site and start interacting with the implant surface. This step is followed by cell proliferation and differentiation toward an osteoblastic lineage. Mature osteoblasts deposit an extracellular matrix, rich in collagen type I and fibronectin,

and then produce a new calcified and mineralized matrix in contact with the implant surface [5]. The filled bone–implant interface of successfully integrated implants have a similar composition to natural mineralized bone.

Several attempts to optimize the osseointegration capacity of implant materials have been reported [6]. In particular, it has been shown to be possible to modify surface biofunctionalities, such as accelerated osteogenic differentiation, through surface roughening [7,8]. Surface roughness (Sa) in the microscale range (Sa = 1–2 μm) has been shown to increase bone generation with implant contact and has been described to improve cell osteogenic differentiation compared to smooth surfaces [9,10]. However, a surface with high micro-roughness can also enable bacterial infiltration, with the development of biofilm on the surface of the implant, leading to infection [11,12]. On the other hand, at smaller scales, nanostructures can help limit bacterial adhesion to the surface [13,14]. Hence, even more attention should be paid not only to microscale modifications, but also to the nanoscale patterning of implants (Sa < 100 nm) for accelerated osseointegration and limited biofilm. Nanostructuring of titanium surfaces via laser texturing is a very attractive and expanding area that should be explored further in great detail, as it has emerged as a powerful and versatile surface engineering process without additional coatings [15–20].

The femtosecond laser (FSL) offers the possibility to texture titanium at nanometric scales with controlled nanopatterns [15,21]. Particularly, periodic nanostructures such as laser-induced periodic surface structures (LIPSS) are formed during a complex interplay between incoming laser light and surface waves [22]. The periodicity of the LIPSS is closely linked to laser wavelength [23], and the direction of the LIPSS is determined by laser polarization [24]. As a consequence, LIPSS with desired periodicity and linear or radial organization can be produced by applying FSL light with a well-defined laser wavelength and polarization [21]. In the process of developing next-generation implants, it is of great importance to evaluate biological responses triggered by FSL-induced nanopatterns, which are dependent on surface parameters, including surface isotropy modification.

Here, our goal was to use two different laser polarization states, linear or azimuthal, to create two differently designed patterns with nanometric dimensions on a Ti-6Al-4V surface. It is of interest to evaluate the influence of laser polarization on engineered surface patterns. The two nanopatterns were conceived in order to obtain a similar LIPSS density and similar nanoroughness; only the isotropy of the surface was modified. A linear laser beam polarization created an anisotropic surface (linear LIPSS), whereas an azimuthal polarization produced an isotropic surface (radial LIPSS). The idea of azimuthal and/or radial polarization for anisotropy breaking has been investigated previously [24], but the structures produced were in the μm scale. As mentioned earlier, μm -scale topography may favor bacterial infiltration; therefore, we aimed at isotropic patterning on a nanoscale. Furthermore, a direct comparison of isotropic nanostructures and anisotropic structures with identical roughness has not been studied thus far.

Human MSCs are multipotential bone-marrow-derived stem cells that can differentiate into a wide diversity of cell types, such as osteoblasts, and they represent a model of choice in the field of cell–material interaction [25]. It is known that hMSC osteoblastic differentiation can be directed by the complex interrelationship among surface properties of the material and the state of intracellular tension [25–29]. The isotropy of nanoroughness can be an important parameter to drive cellular responses. In order to engineer titanium surfaces with optimal properties for improved osteogenesis, it is essential to understand if cellular responses are modified by isotropic or anisotropic surface nanoroughness.

In this *in vitro* study, we assessed several stages of the osseointegration process. By providing aligned or disordered textures to hMSCs, we hypothesized that cells differentially organize their focal adhesions and, more importantly, their fibrillar adhesion (increased cell contractility), thus accelerating their differentiation toward osteoblasts [30]. Moreover, alterations in extracellular matrix mechanosensing are known to be potent regulators of osteogenesis, bone formation and implant maintenance. RGD-containing ligands (such as fibronectin and osteopontin) present in remnant bones support the adhesion, spreading

and conversion of marrow-derived stem cells into osteoblasts [31,32]. These processes are associated with the overexpression of several genes involved in osteogenesis, such as osterix, bone sialoprotein and alkaline phosphatase. Finally, the ultimate step is initiation and mineralization. Based on the importance of all these different events, we first investigated the influence of linear or radial LIPSS on cell adhesion and contractility 24 h post seeding by assessing focal adhesion characteristics. Then, fibronectin production was quantified at day 7, followed by the expression of osteogenic-related genes at day 14 and mineralization surfaces at day 21, compared to conventional polished titanium alloys. Our results clearly indicate that isotropic texturing improved the induction of osteogenesis on titanium surfaces at all investigated time points.

2. Materials and Methods

2.1. Titanium Alloy Samples

Mirror-polished titanium alloy samples of Ti6Al4V from Goodfellow (Huntingdon, UK) were used in these experiments. The samples exhibited square dimensions of 1 cm² and a thickness of 1 mm with a roughness of Ra = 0.5 μm.

2.2. Laser Surface Texturing

Titanium samples were textured using FSLs from Amplitude Systems and galvo scanners from Scanlab within the GIE Manutech-USD platform (Saint-Etienne, France). The following laser sources were used: a Tangor HP and a Tangerine FSL (both from Amplitude Laser Groupe, Pessac, France), operating at 1030 nm central wavelength and a pulse duration of around 400 fs. Both lasers exhibited linear polarization states. All samples were placed on XYZ translation stages from Aerotech in order to find the best focusing plane. Scanlab GmbH's intelliSCAN 14 scanners were finally associated with two different f-theta lenses of 56 mm and 100 mm depending on the targeted texturing.

Different types of structures were realized using such lasers (Table 1):

- IR linear LIPSS: They were generated on titanium alloy surfaces using the Tangor and Tangerine lasers and the 100-mm f-theta lens with a fluence of between 0.3–0.47 J/cm². The fluence peak is defined as: $F_{peak} = \frac{2E}{\pi \omega_0^2}$. Spacing between pulses and a hatch distance of 4–5 μm were chosen with a 16-μm measured 1/e² beam diameter. This configuration makes a number of effective pulses per spot diameter of Neff_1D = 4 and a line separation distance of Δ = 4–5 μm.
- IR radial LIPSS: A 56-mm f-theta lens was deployed, leading to a 11-μm measured 1/e² beam diameter. In order to create an exotic LIPSS with ripples pointing to the outside of the center of the beam, an s-wave plate was implemented in the beam path of the laser to create a donut-shaped beam that converted the entering linear polarization into an azimuthal polarization. This decision was based on previous experiments on the behavior of cell adhesion with this type of structure. A laser pulse energy E of 0.7 μJ was applied to obtain the radial LIPSS. Impact positions were defined in order to keep the isotropic effect provided by such nanostructures. As a consequence, a 13-μm spacing between pulses led to tangency with a slight overlay on the edges of the impacts. An accumulation of 5 pulses per impact was chosen to compensate for a lack of energy accumulation due to this low recovery rate. It is worth mentioning that the work field of this f-theta lens is about 50 × 50 mm² in area. In the current study, we produced our radially aligned LIPSS by using azimuthal polarization in a relatively small area of 10 × 10 mm². No marked influence of mirror positions upon LIPSS quality was witnessed in such a case. The same nominated laser conditions proceeded similar impacts at the extremity.

Table 1. Laser parameters used to create the different titanium alloy textured surfaces.

Topographies	Laser Pulse Condition	Distance between Pulses	Hatching Distance	F-Theta
Linear LIPSS	$F_{\text{peak}} = 0.3\text{--}0.47 \text{ J/cm}^2$	4–5 μm	4–5 μm	100 mm
Radial LIPSS	E = 0.7 $\mu\text{J/pulse}$ 5 pulses/impact	13 μm	13 μm	56 mm

2.3. Surface Morphology

Knowing that the scale of the nanostructures created by the laser is near the resolution limit of an optical microscope (~550 nm), scanning electron microscopy (SEM) was used to visualize and characterize the different laser-induced patterns. A Tescan VEGA3 SB, Brno Czech Republic electron microscope was used, operating at 20 kV and with a secondary electron detector.

2.4. Surface Topography

Atomic force microscopy (AFM, JPK Instruments, Berlin, Germany) was used to characterize the different nanostructures. Data topographies were analyzed with Mountains Map[®] 8.2 software. Surface roughness parameters were computed on the treated surfaces, and this study focused on the following:

- Areal arithmetic mean height S_a (nm), which expresses the difference in height of each point compared to the arithmetical mean of the surface. This parameter is used to evaluate surface roughness.
- Texture aspect ratio Str , which expresses the isotropy and anisotropy of the topography. Str is a value ranging from 0 to 1. A value close to 0 indicates directionality (anisotropy), whereas a value close to 1 indicates that the surface does not exhibit preferred directions (isotropy).
- Polar spectrum, which shows the privileged texture directions.
- Average period and depth of the ripples.
- Ripple density per cm^2 .

The definitions of the surface parameters are stated in ISO 25178 standards [33].

2.5. Cell Culture

Prior to the cell culture, we applied the sterilization procedure of industrial standard to the laser-irradiated samples. In summary, titanium samples were autoclaved at 134 °C for 19 min. Human MSCs from PromoCell (hMSC-BM-c, C-12974) at passage 4 were maintained in a T75-flask for 3 d in a growth medium (MSCGM, C-28009, PromoCell). Cells were then seeded on titanium samples at 7000 cells/ cm^2 in 24-well plates with a growth medium. At 24 h post seeding, the growth medium was replaced with an osteogenic medium (MSCODM, C-28013, PromoCell). Thereafter, the osteogenic medium was renewed every 4 d.

2.6. Fluorescent Cell Labeling at 24 h and 7 d Post Seeding

At 24 h post seeding, some samples of each type were fixed in 10% formalin for 30 min at room temperature and then permeabilized with 0.1% Triton X-100 in phosphate-buffered saline (PBS) for 3 min. Samples were incubated with rhodamine-conjugated phalloidin diluted at 1:300 in PBS at 37 °C for 1.5 h for actin labeling (cytoskeleton). Then, focal adhesion labeling was performed using a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated vinculin antibody (Prod. No. F7053, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted at 1:50 in PBS at 4 °C overnight. Afterwards, nuclei labeling was performed with 1 $\mu\text{g/mL}$ 40, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) diluted at 1:200 in PBS at room temperature for 20 min. Washes were performed using PBS between each step of the experiment.

At 7 d post seeding, other samples of each type were fixed and permeabilized in 10% formalin and 0.1% Triton X-100, respectively, as described above. Samples were incubated with rhodamine-conjugated phalloidin diluted at 1:300 in PBS at 37 °C for 1.5 h for actin labeling. Cells were then incubated with fibronectin (extracellular glycoprotein for cell adhesion) antibody, diluted at 1:100 in PBS at 37 °C for 2 h. Then, the samples were incubated with 488 fluoprobes diluted at 1:250 in PBS for 1.5 h at room temperature. Finally, nuclei labeling was performed with DAPI, as explained above. Washes were performed using PBS between each step.

2.7. Quantitative Real Time PCR (qRT-qPCR) at 14 d Post Seeding

For qRT-PCR, the cells were harvested on the laser-patterned and reference-polished titanium surfaces with Tri-Reagent (Sigma-Aldrich). RNA amounts were assessed with the Ribogreen kit (Invitrogen, Life Technologies, Eugene, OR, USA), and their quality checked with the Experion-automated electrophoresis station (Bio Rad, Hercules, CA, USA). Messenger RNA was reverse transcribed (iScript cDNA synthesis Kit, Biorad) according to the manufacturer's instructions, and then 300 ng of cDNA was amplified through qRT-PCR using the SYBR Green I dye (Lightcycler faststart DNA masterSYBR green I, Roche, Germany). Primer sequences for the osteogenic genes of interest are given in Table 2. The expression of the housekeeping gene (GAPDH) did not vary significantly within or between groups in either experimental setting (data not shown).

Table 2. PCR primer sequences of genes implicated in different osteogenic pathways.

Protein	Forward	Reverse	Gene Bank ID
ALP	tgtaaggacatcgctacca	gaagctctccagggtgtaa	NM_000478.5
BSP	gaagactctgaggctgagaa	cctctgtgctgttgactg	NM_004967.3
COL1A1	tccggctctgctcctcta	gttgctgcagacgagatcc	NM_000088
FN1	ggctggatgatgtagattg	tgctctcacactccactc	NM_212482.4
GAPDH	catcaccatttccaggagcga	gtggtcatgagtcctccacga	NM_001289745.1
OCN	agcgggtcagagtcagcaa	agcggatgtggtcagccaac	NM_199173.5
OPN	tgatggcggaggtagatg	atcagaaggcgcgttcagg	NM_001251830.1
OSX	ctggctcggcaagggtat	ccagctcatccgaacgagtg	NM_001300837.1
RUNX2	ccttgaccataaccgtcttc	aaggacttggtcagagttc	NM_001024630.3

Abbreviations: ALP: alkaline phosphatase; BSP: bone sialoprotein; COL1A1: collagen type 1 α 1 chain; FN1: fibronectin 1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (housekeeping gene); OCN: osteocalcin; OPN: osteopontin; OSX: osterix; RUNX2: runt-related transcription factor 2.

2.8. Assessment of Mineralization at 21 d Post Seeding

At 21 d post seeding, the cells on the different surfaces were fixed with formalin for 30 min and then were washed with demineralized water. A 3×10^{-3} M solution of calcein blue (M1255-10G, Sigma) was deposited on the cells and left for 5 min at room temperature. The samples were then rinsed with demineralized water and dried.

2.9. Image Acquisition and Analysis

At 24 h, 7 d and 21 d, 8 fields of 0.7 mm^2 were acquired for each surface using a confocal laser microscope (Zeiss LSM 800 Airyscan, Oberkochen, Germany) equipped with Zen software. DAPI labeling (at 24 h and 7 d) and calcein blue labeling (at 21 d) were visualized with a 405-nm-wavelength laser. Vinculin (at 24 h) and fibronectin (at 7 d) labelings were visualized with a 488-nm laser. Actin labeling (at 24 h and 7 d) was visualized with a 561-nm laser. All images were analyzed with imageJ software to obtain cell density and contractility (cell area/vinculin area) at 24 h post seeding, fibronectin area at 7 d, and relative mineralized area as well as the number of mineralized spots and average mineralized area at 21 d.

2.10. Statistics

The data were compared between each surface by performing a Wilcoxon–Mann–Whitney U -test. Significance was set at $p = 0.05$. The comparison between the polished surface and the two textured ones aimed at evaluating the effect of each texture compared to a standard reference. The comparison between linear LIPSS and radial LIPSS was performed to assess the effect of the laser beam polarization change.

3. Results

3.1. Directionality of LIPSS Was the Main Difference between the Two Designed Textures

The two surface structures manufactured in the present work were LIPSS, produced by a radiation wavelength of $\lambda 1$. SEM images in Figure 1A showed that linear laser polarization produced linear periodic LIPSS, whereas azimuthal polarization produced LIPSS with a radial direction. The directions of the structures of LIPSS were perpendicular to the polarization direction of the laser beam.

AFM measurements enabled a 3D-view reconstruction of the surface topography and the calculation of different surface parameters with Mountains Map[®] software (Figure 1B). The linear LIPSS texture has a surface roughness equivalent to the radial LIPSS texture, with S_a of 71 nm and 77 nm, respectively. The average roughness was, however, not sufficient to uniquely describe a surface in relation to cellular behavior. The depth of ripples (151 nm vs. 130 nm) and density of ripples (22309/cm² vs. 21381/cm²) were also very similar between the two laser-textured structure types. However, large differences in texture direction could be observed. The texture aspect ratio Str was close to 0 for the linear LIPSS (0.083), indicating an anisotropic surface with directionality. This was confirmed by the polar spectrum, which showed a privileged direction of 90°. In contrast, the radial LIPSS had a Str value close to 1 (0.682), underlining the isotropy of the surface, and the polar spectrum did not indicate a privileged direction. All these data on surface parameters indicated that the main difference between the linear LIPSS and radial LIPSS lay in the directionality of the overall texture.

3.2. Radial LIPSS Increased Cell Contractility in the Early Stages

Immunostaining performed 24 h post seeding showed that cell density was similar among the three surfaces, indicating that hMSCs have the same probability of attachment on all three textures (Figure 2). Vinculin, a major protein present at focal adhesion complexes, showed a different pattern between the three surfaces. The cells on polished and linear LIPSS surfaces presented a higher number of focal adhesions (indicated by the white arrows and the zoom squares in Figure 2) compared to the radial LIPSS surface. In addition, the polished surface showed the most prominent focal adhesions. As we know that vinculin contacts may undergo rapid turnover, we compared the measurements of mean cell area/mean vinculin area ratio as an indirect evaluation of focal adhesion dynamic or turnover. The ability of a cell to maintain its shape with small contacts relies on increased cell tension or contractility. We found significantly higher cell contractility on the radial LIPSS surface compared to the two other surfaces (+467% vs. polished; +391% vs. linear LIPSS; $p = 0.00078$ for both).

3.3. Radial LIPSS Improved Fibronectin Matrix Production

At 7 d post seeding, fibronectin production was assessed by immunolabeling to observe the advancement of extracellular matrix production. Fibronectin is a protein secreted in the extracellular matrix that serves as an attachment of the cells to several components, such as collagen fibers. Moreover, fibronectin is required for osteoblast mineralization. Image analysis at 7 d showed that the radial LIPSS surface displayed a higher amount of extracellular fibronectin proteins compared to polished (+16%, $p = 0.045$) and linear LIPSS (+31%, $p = 0.016$) surfaces (Figure 3).

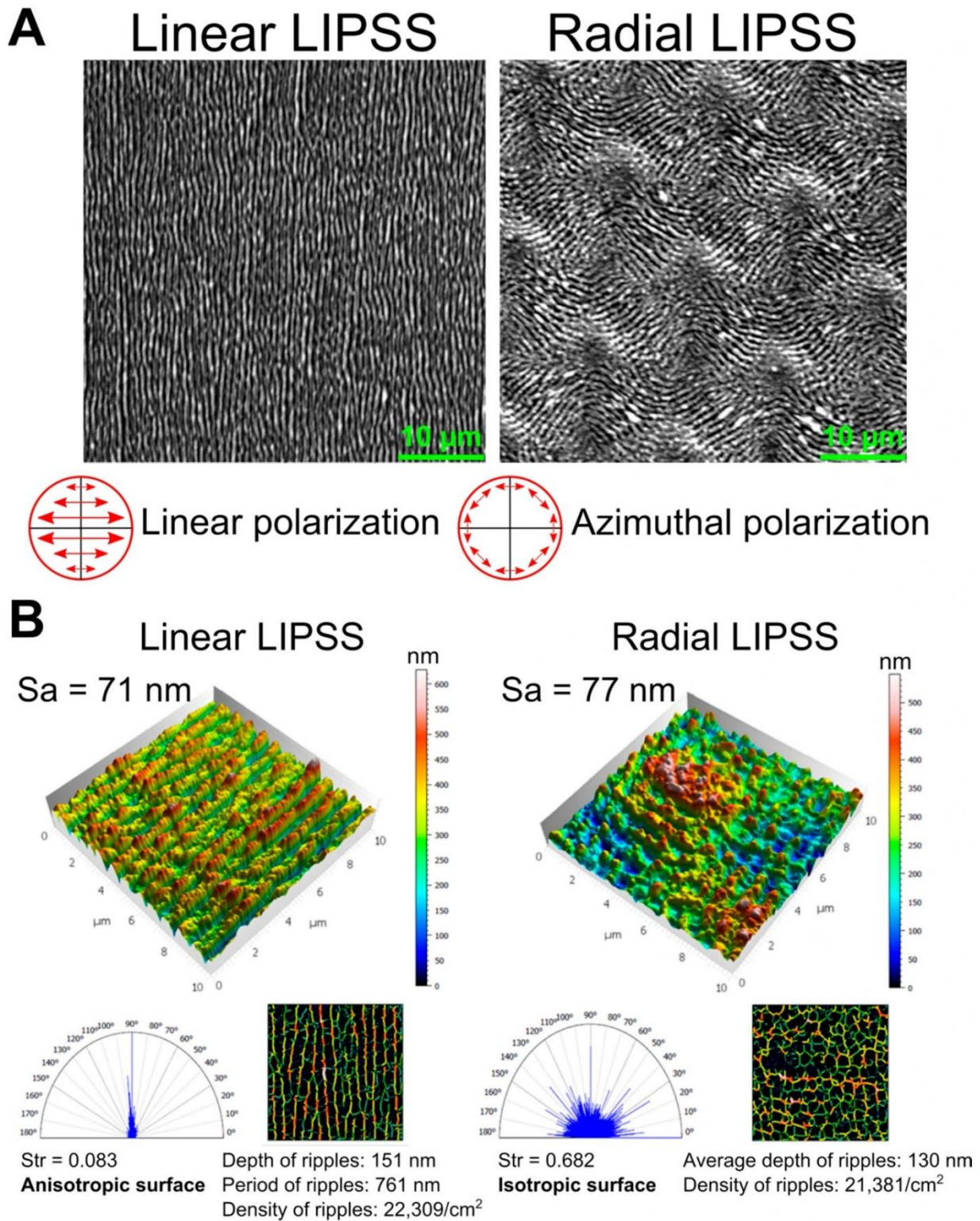


Figure 1. (A) SEM images of the two surface textures with linear or radial LIPSS (magnification 3000×). (B) 3D image reconstruction of the nanometer-scale surface texture with linear or radial LIPSS (data from atomic force microscopy images 10 μm × 10 μm) and surface analysis by Mountain Map[®] software.

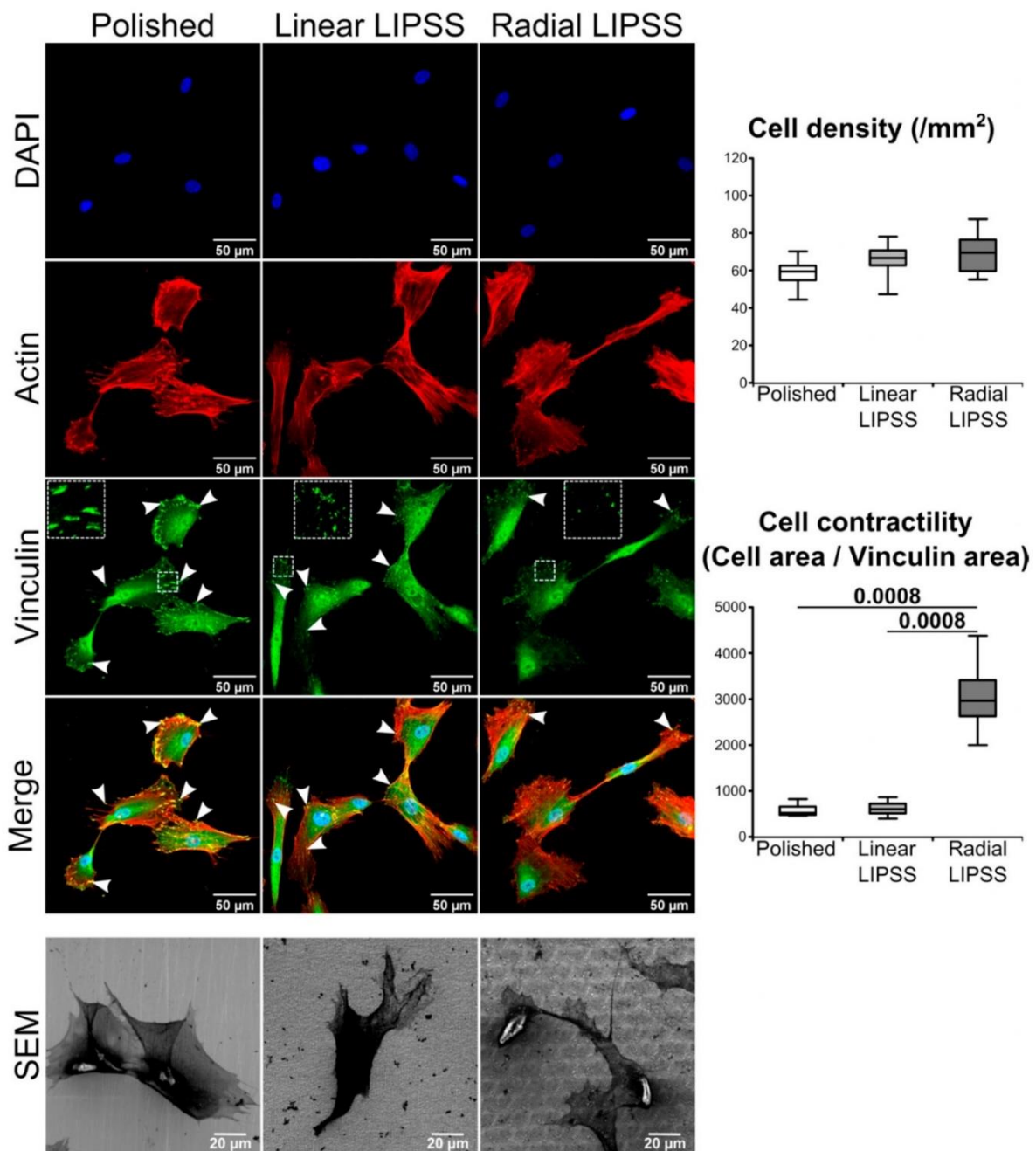


Figure 2. DAPI nuclear staining (blue), rhodamine-conjugated phalloidin-labeled actin (red), FITC-conjugated vinculin antibody (green), overlaid fluorescent image of immunostained cellular component (merged) for the cells cultured on polished, linear LIPSS and radial LIPSS surfaces 24 h post seeding. SEM images show other cells present on the three surfaces. White arrows indicate focal adhesions recognized by prominent vinculin labeling. The squares show a zoom of some focal adhesions for each surface. On the right side of the image are the results of cell density and contractility for the three surfaces. The graphs show the p -values between each group, Mann–Whitney U test, $n = 8$ fields/group.

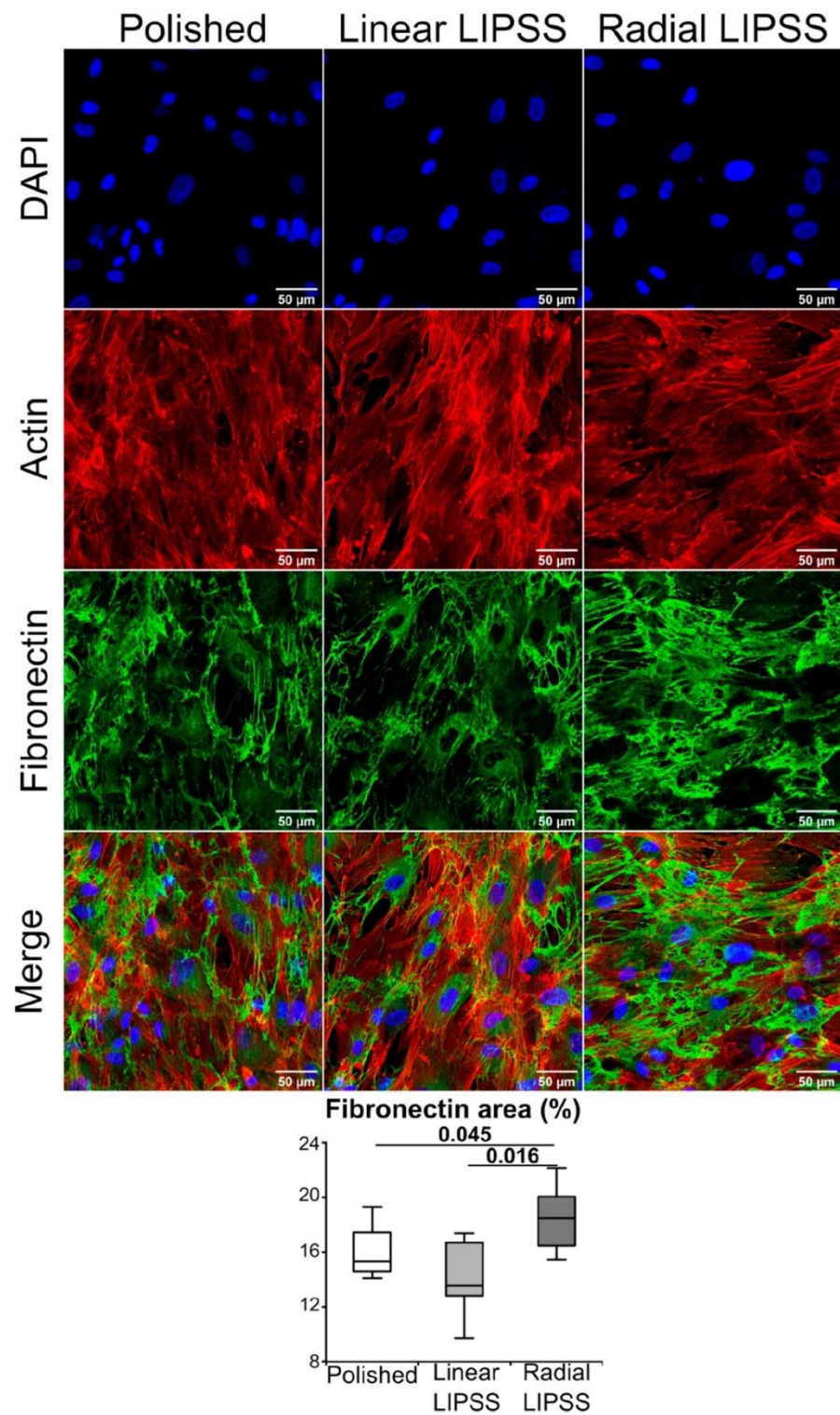


Figure 3. DAPI nuclear staining (blue), rhodamine-conjugated phalloidin labeled actin (red), fibronectin antibody coupled with a 488 fluorophore (green) and overlaid fluorescent image of immunostained cellular component (merged) for the cells cultured on polished linear LIPSS and radial LIPSS surfaces 7 d post seeding. On the bottom of the image is the result of the fibronectin area for the three surfaces. The graph gives the p -values between each group, Mann–Whitney U test, $n = 8$ fields/group.

3.4. Radial LIPSS Induced Overexpression of Osteogenic Related Genes

At 14 d post seeding, qRT-PCR analysis showed that the radial LIPSS surface induced an increase in the osteoblastic differentiation genes OSX (+465% vs. polished, $p = 0.009$ and +252% vs. linear LIPSS, $p = 0.045$) and BSP (+91% vs. polished, $p = 0.047$) (Figure 4). In addition, matrix production genes were also increased on the radial LIPSS surface, such as fibronectin (+23% vs. polished, $p = 0.027$), which is in line with the observations made at 7 d, and COL1A1 (increased in trend compared to the polished surface). Furthermore, mineralization genes such as ALP and OPN were increased on the radial LIPSS surface compared to the polished surface (Figure 4). OCN, a major gene for mineralization processes, was not different among the three surfaces, potentially related to the early timing of qRT-PCR assessment (14 d) in relation to the expression of this gene. There was no increase in osteogenic genes for the linear LIPSS surface compared to the polished surface.

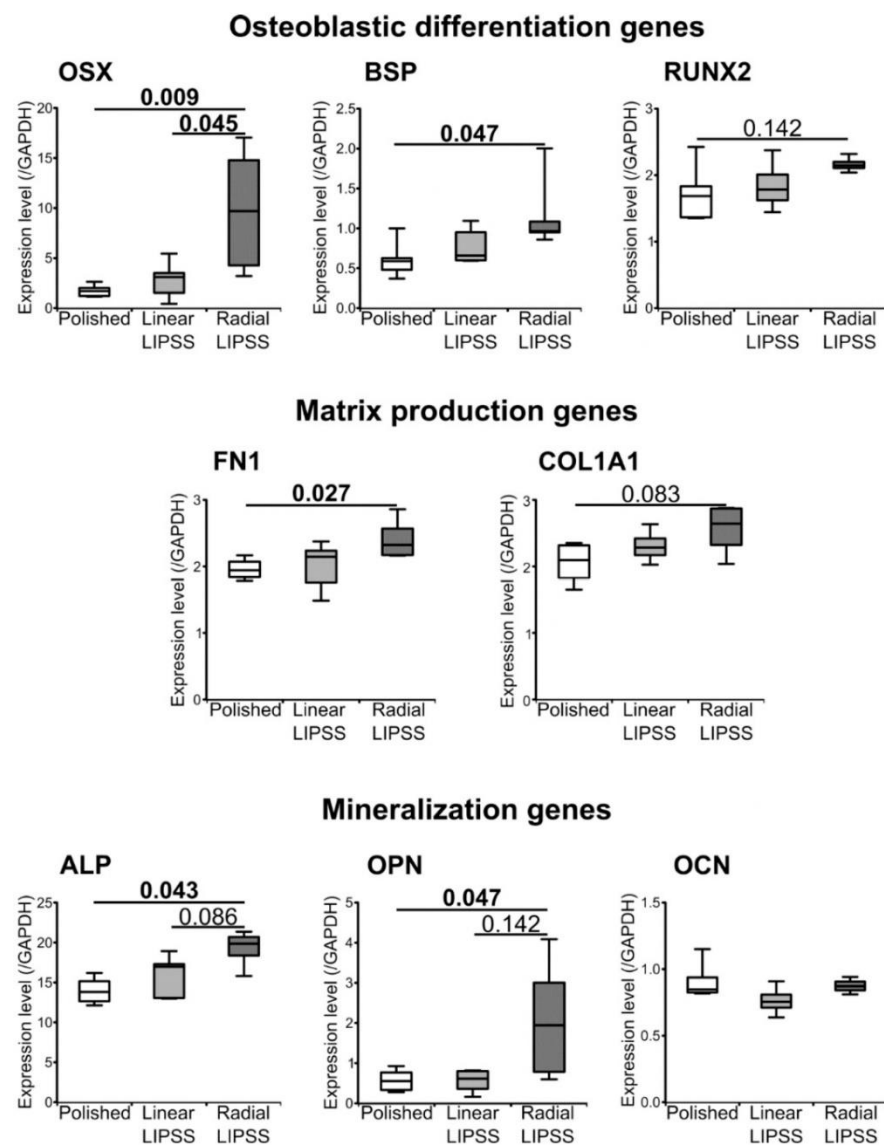


Figure 4. Osteogenic-related genes analyzed by RT-qPCR for cells present on polished, linear LIPSS and radial LIPSS surfaces at 14 d post seeding. Genes are classified by biological function. Values are given as ratios to GAPDH. The graphs give p -values between each group, in **bold** when <0.05 , Mann–Whitney U test, $n = 4–6$ samples/group.

3.5. Radial LIPSS Increased the Mineralized Surfaces

At 21 d post seeding, mineralization was assessed by calcein blue labeling. Image analysis revealed that hMSCs on the radial LIPSS surface had increased mineralization activity compared to the other two surfaces (Figure 5). This was highlighted by a larger mineralized area (+99% vs. polished, $p = 0.016$; +132% vs. linear LIPSS, $p = 0.002$) and a higher number of mineralized spots (+83% vs. polished, $p = 0.046$; +128% vs. linear LIPSS, $p = 0.006$) on the radial LIPSS surface. The average size of the mineralization spots was not different between the three surfaces.

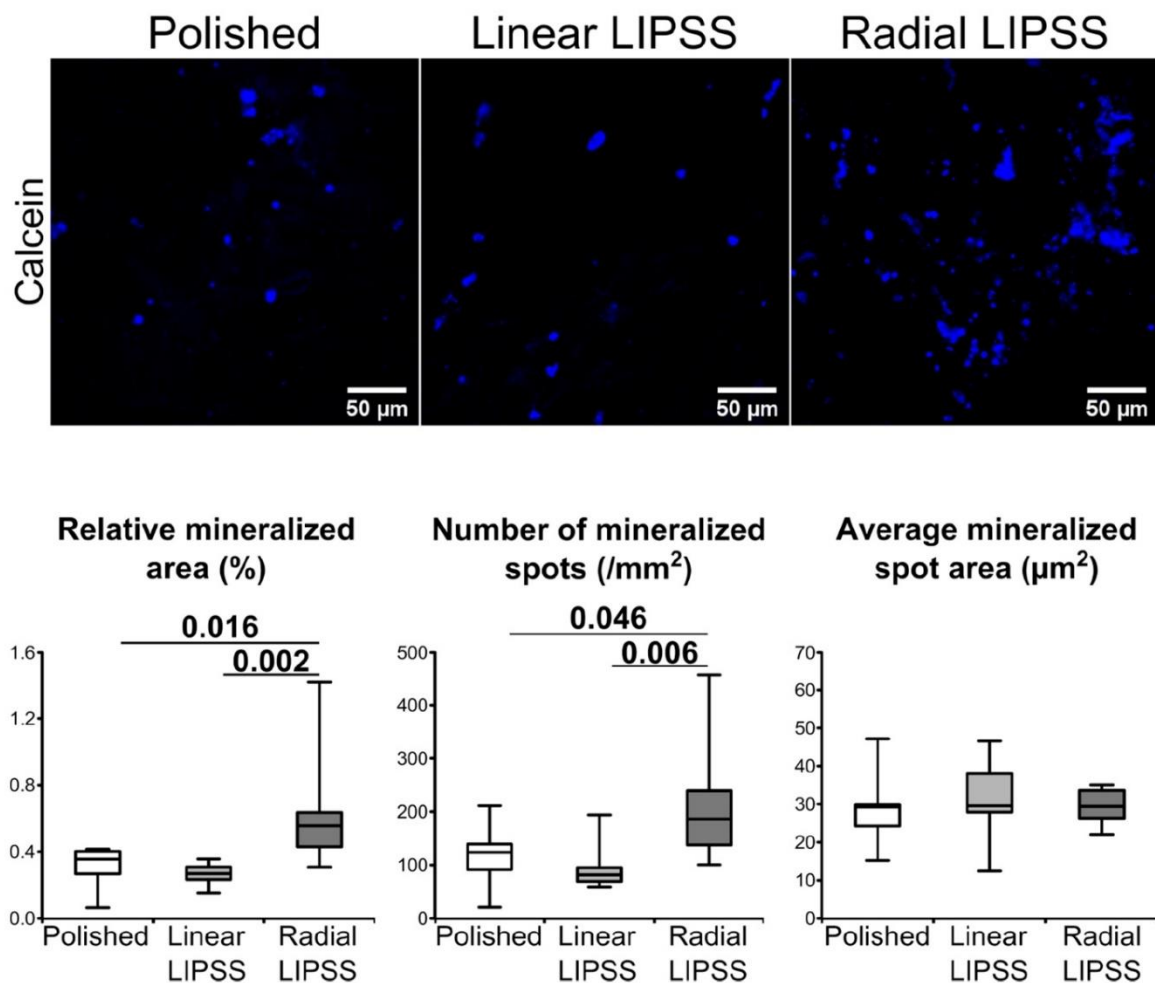


Figure 5. Mineralization clusters labeled by calcein blue (blue) on the polished linear LIPSS and radial LIPSS surfaces at 21 d post seeding. On the bottom of the image are the results of the different quantifications made for the three surfaces. The graphs show the p -values between each group, Mann–Whitney U test, $n = 8$ fields/group.

4. Discussion

The topography of titanium is one of the key features for the acceleration of osteogenic cell differentiation on medical implant devices. Stem cells interact with underlying surface patterns, which lead to modulating the cell's fate [34,35]. In this study, we focused our work on two different nanostructures obtained by FSL texturing. The nanoroughness of the two textures was similar, but one texture was anisotropic (linear LIPSS), whereas the other could be considered as isotropic (radial LIPSS). We have demonstrated that isotropic texturing improves osteoblastic differentiation compared to anisotropic and polished surfaces. This was conducted by a cross-time investigation and by various operational techniques.

Our data demonstrate that a concerted assembly of fibronectin networks and a commitment toward osteoblastogenesis occurs earlier on irregular nanopatterned surfaces (isotropic) as compared to regular or untextured ones. As nicely demonstrated by Han et al., polished and anisotropic surfaces lead to more abundant focal adhesion with longer lifetimes, suggestive of higher recruitment and activation of FAK and Src as a response to increased integrin binding and clustering, and with enhanced osteogenesis [30]. We were surprised to find that initial smaller contacts (vinculin positive) were formed on the most osteoinductive surface. Our data showing significantly higher accumulations of fibronectin on the texture presenting the smallest contacts are somewhat expected, given that smaller vinculin contacts are not associated with cell adhesion defects or reduced contractility. On the other hand, cells on isotropic surface (radial LIPSS) presented numerous actin fibers as well as increased ratios of cell area/vinculin area and thus increased contractility. We can speculate that maintaining efficient cell spreading on isotropic surfaces necessitates highly dynamic focal contacts (increased turnover), leading to higher maturation in fibrillar contacts, potentially explaining increased fibronectin fibrillogenesis [36]. This may explain sustained integrin signaling; enhanced mechanotransduction and osteogenesis, as evidenced by gene expression levels of OSX, OPN and ALP; and the deposition of mineral clusters. It is possible that on isotropic surfaces, cells adapt to increased cell contractility by accumulation and force transmission into the actin cytoskeleton, leading to increases in YAP/TAZ nuclear accumulation, which coactivates with RUNX2 (and TEAD) and leads to improved osteogenic commitment [37].

In many studies, one of the most investigated aspects related to topography is surface roughness (Ra (2D parameter) or Sa (3D parameter)), which quantifies the protrusions or depressions on the surface [38]. Sa can be considered an extension of Ra (arithmetical mean height of a line). It expresses, as an absolute value, the difference in height of each point compared to the arithmetical mean of the surface. Concerning implant surfaces, roughness can be divided into different levels: macroroughness (Ra scale around 10 μm), microroughness (Ra scale around 1 μm) and nanoroughness (Ra scale < 200 nm). In general, macroroughness is described to improve bone–implant interactions, but it is well known that the optimal surface roughness should be about 1 μm to promote the osteogenic differentiation of MSCs [39,40]. Unfortunately, increasing surface roughness can promote the microbial colonization of the implant surface, as initial bacterial adhesion begins at sites that offer shelter [41,42]. Several studies have shown that, in order to reduce bacterial adhesion, a nanoscale surface with a roughness of <200 nm is the most effective, since the depth and period of the nanostructures are smaller than most bacteria [12,42,43]. Moreover, a nanoscale surface roughness can also influence stem cell fate. Although the optimal scale of nanoroughness for osteogenic differentiation is challenging to define, it has generally been shown that nanoroughness can also enhance osteogenic differentiation [44–46]. Previous studies have reported osteogenic performance depending on nanofeature morphologies or organization, such as anisotropic or isotropic nanotextures [47].

In our study, in order to link osteogenic differentiation to surface nanoroughness, we used a classification based on the orientation of topography (isotropic or anisotropic). An anisotropic surface is a surface with a specific orientation, such as a linear LIPSS. In contrast, an isotropic surface is a surface with no preferred orientation, such as a radial LIPSS. Anisotropic surfaces have often been studied in terms of a tool to direct cell alignment, which can influence stem cell fate. On substrate surfaces with groove scales < 500 nm, studies have reported that MSCs are committed to adipogenic and myogenic lineages [48,49]. On the other hand, osteogenic differentiation can be decreased by anisotropic textures, since as microscale periodicity becomes lower, osteogenesis also lowers [50]. An isotropic surface is not described as influencing cell alignments, but it is proved to control cell functions. Isotropic topographies such as nanopillar or nano-island usually enhance osteogenic differentiation, but there is a lack of clear data to establish which precise size or density of nanopattern is more efficient [51–53]. Cell osteogenic responses to isotropic patterns are often inconsistent because dimensions, organization or density of nanopatterns vary

from one study to another. Only one study from Dalby et al. verified how the distribution of topographical features influences cell differentiation [39]. They reported that surfaces composed of nanopits with controlled disorder resulted in increased osteogenic markers compared to highly ordered surfaces or randomly displaced nanopits.

Very strict surface chemistry analysis and cytotoxicity tests are to be made. Nonetheless, as these are considerably time consuming, they are to be pursued and performed on surface textures that already exhibit a promising osteogenesis property after bioassessment. If necessary, anodization of our laser-treated samples can be considered for shielding out surface chemistry changes, if any, induced by laser irradiation. These topics deserve separate and dedicated studies. They are, naturally, beyond the scope of this report, but they are not to be left uninvestigated in future developments. We are well aware that the chemistry of extreme surfaces is inevitably altered after laser irradiation in air, such as observations made in other studies [24,54–56]. Even though our irradiation condition applied in this study is even milder than the mildest one mentioned in the literature, there is no means of knowing if we are not producing surface chemistry modification to some extent.

Finally, in terms of surface nanotexturing, the most common techniques on titanium, such as acid etching, cluster deposition, sandblasting and anodizing, yield to the limited control and adjustability of surface features [57–60]. Thus, it can be difficult to obtain repeatable cell behavior due to batch-to-batch fluctuations. More accurate monitoring of nanopatterns typically requires lithographic techniques, but these are challenging to apply on materials such as titanium [51,61]. Otherwise, FSLs allow for the creation of reproducible features. With a precise tuning of laser parameters, such surfaces can be used to produce well-controlled cell effects, paving the way to unravel the complex interplay between cells and topography. Ultrashort pulsed laser texturing has emerged as a powerful and versatile surface engineering process. It is a highly valid and innovative approach and is more eco-friendly due to its simplicity and its flexibility, with no consumables except light itself. Such a solution can also be performed in air environments, which further makes it a good candidate for implementation in an industrial context for functionalizing orthopedic and/or dental implants. As mentioned before, the possible variation of surface chemistry after laser irradiation is to be investigated, and/or surface anodization (such as the method described in [62]) for shielding away any possible surface chemistry changes is to be performed.

5. Conclusions

This study provides insights into how small changes in laser polarization can modulate hMSC fate choice and extracellular matrix deposition. Nanoscale radial LIPSS generated on titanium alloys by FSLs with azimuthal polarizations exhibited an isotropic distribution that seemed to promote osteoblastic differentiation. Cell contractility and density, fibronectin production, gene overexpression and improved mineralization helped to ensure the consistency of cell evolution analysis over a time period of several weeks. Such dynamic hMSC sensitivity appears very important during implant osteogenesis, as these cells are primarily recruited to the implantation site. As a perspective, texturing titanium surfaces with such small features opens the possibility to couple-enhanced osseointegration with potential antibacterial properties, which are known to be more sensitive at the nanoscale than the microscale.

Author Contributions: M.M. wrote the manuscript, performed surface characterizations and carried out cell experiments and analysis. A.A.K. wrote the manuscript and planned and performed laser structuring of the samples. X.S. consulted the laser experiment. Y.D.M. secured laser platforms with which the laser patterning was realized. S.P. (Steve Papa), E.D. and S.P. (Sylvie Peyroche) helped in the preparation of cell experiments. M.M., V.D., A.G., Y.D.M. and X.S. contributed to the different stages of the design of the experiments and writing. V.D., A.G. and X.S. directed the research. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project was funded by the European Commission LaserImplant project, grant agreement number: 951730. The authors thank the EUR MANUTECH SLEIGHT (N° ANR-16-IDEX-0005) for financial support.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank Mireille Thomas for help with the qRT-PCR experiments, Claudie Petit for her precious help concerning the AFM measurements, Nicolas Compère for the management of the FSL platform and Florence Garrelie and Laurence Vico for their fruitful discussion. The authors also appreciate the support from Jean-Philippe Colombier, Razvan Stoian and Tatiana Itina for their advice and suggestions on the laser texturization experiments.

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

References

- Ottria, L.; Lauritano, D.; Andreasi Bassi, M.; Palmieri, A.; Candotto, V.; Tagliabue, A.; Tettamanti, L. Mechanical, chemical and biological aspects of titanium and titanium alloys in implant dentistry. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **2018**, *32* (Suppl. S1), 81–90. [\[PubMed\]](#)
- Shah, F.A.; Trobos, M.; Thomsen, P.; Palmquist, A. Commercially pure titanium (cp-Ti) versus titanium alloy (Ti6Al4V) materials as bone anchored implants—Is one truly better than the other? *Mater. Sci. Eng. C Biol. Appl.* **2016**, *62*, 960–966. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Arciola, C.R.; Campoccia, D.; Montanaro, L. Implant infections: Adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 397–409. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ermis, M.; Antmen, E.; Hasirci, V. Micro and Nanofabrication methods to control cell-substrate interactions and cell behavior: A review from the tissue engineering perspective. *Bioact. Mater.* **2018**, *3*, 355–369. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Stich, T.; Alagboso, F.; Křenek, T.; Kovářik, T.; Alt, V.; Docheva, D. Implant-bone-interface: Reviewing the impact of titanium surface modifications on osteogenic processes in vitro and in vivo. *Bioeng. Transl. Med.* **2022**, *7*, e10239. [\[CrossRef\]](#)
- Liu, X.; Chu, P.K.; Ding, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2004**, *47*, 49–121. [\[CrossRef\]](#)
- Brunette, D.M.; Tengvall, P.; Textor, M.; Thomsen, P. *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*; Softcover Reprint of the Original 1st ed. 2001 Édition; Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013.
- Zwahr, C.; Welle, A.; Weingärtner, T.; Heinemann, C.; Kruppke, B.; Gulow, N.; Holthaus, M.G.; Lasagni, A.F. Ultrashort Pulsed Laser Surface Patterning of Titanium to Improve Osseointegration of Dental Implants. *Adv. Eng. Mater.* **2019**, *21*, 1900639. [\[CrossRef\]](#)
- Martinez, M.A.F.; Balderrama, D.F.; Karam, P.S.B.H.; De Oliveira, R.C.; De Oliveira, F.A.; Grandini, C.R.; Vicente, F.B.; Stavropoulos, A.; Zangrando, M.S.R.; Sant’Ana, A.C.P. Surface roughness of titanium disks influences the adhesion, proliferation and differentiation of osteogenic properties derived from human. *Int. J. Implant Dent.* **2020**, *6*, 46. [\[CrossRef\]](#)
- Lüthen, F.; Lange, R.; Becker, P.; Rychly, J.; Beck, U.; Nebe, J.G.B. The influence of surface roughness of titanium on beta1- and beta3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells. *Biomaterials* **2005**, *26*, 2423–2440. [\[CrossRef\]](#)
- Spriano, S.; Yamaguchi, S.; Bains, F.; Ferraris, S. A critical review of multifunctional titanium surfaces: New frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination. *Acta Biomater.* **2018**, *79*, 1–22. [\[CrossRef\]](#)
- Lee, S.W.; Phillips, K.S.; Gu, H.; Kazemzadeh-Narbat, M.; Ren, D. How microbes read the map: Effects of implant topography on bacterial adhesion and biofilm formation. *Biomaterials* **2021**, *268*, 120595. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Linklater, D.P.; Baulin, V.A.; Juodkakis, S.; Crawford, R.J.; Stoodley, P.; Ivanova, E.P. Mechano-bactericidal actions of nanostructured surfaces. *Nat. Rev. Genet.* **2021**, *19*, 8–22. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Richter, A.M.; Buchberger, G.; Stifter, D.; Duchoslav, J.; Hertwig, A.; Bonse, J.; Heitz, J.; Schwibbert, K. Spatial Period of Laser-Induced Surface Nanoripples on PET Determines Escherichia coli Repellence. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 3000. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Klos, A.; Sedao, X.; Itina, T.E.; Helfenstein-Didier, C.; Donnet, C.; Peyroche, S.; Vico, L.; Guignandon, A.; Dumas, V. Ultrafast Laser Processing of Nanostructured Patterns for the Control of Cell Adhesion and Migration on Titanium Alloy. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 864. [\[CrossRef\]](#)
- Dumas, V.; Rattner, A.; Vico, L.; Audouard, E.; Dumas, J.C.; Naisson, P.; Bertrand, P. Multiscale grooved titanium processed with femtosecond laser influences mesenchymal stem cell morphology, adhesion, and matrix organization. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2012**, *100*, 3108–3116. [\[CrossRef\]](#)
- Dumas, V.; Guignandon, A.; Vico, L.; Mauclair, C.; Zapata, X.; Linossier, M.T.; Boulefour, W.; Granier, J.; Peyroche, S.; Dumas, J.-C.; et al. Femtosecond laser nano/micro patterning of titanium influences mesenchymal stem cell adhesion and commitment. *Biomed. Mater.* **2015**, *10*, 055002. [\[CrossRef\]](#)

18. Epperlein, N.; Menzel, F.; Schwibbert, K.; Koter, R.; Bonse, J.; Sameith, J.; Krüger, J.; Toepel, J. Influence of femtosecond laser produced nanostructures on biofilm growth on steel. *Appl. Surf. Sci.* **2017**, *418*, 420–424. [CrossRef]
19. Luo, X.; Yao, S.; Zhang, H.; Cai, M.; Liu, W.; Pan, R.; Chen, C.; Wang, X.; Wang, L.; Zhong, M. Biocompatible nano-ripples structured surfaces induced by femtosecond laser to rebel bacterial colonization and biofilm formation. *Opt. Laser Technol.* **2020**, *124*, 105973. [CrossRef]
20. Cunha, A.; Zouani, O.F.; Plawinski, L.; Rego, A.M.B.D.; Almeida, A.; Vilar, R.; Durrieu, M.-C. Human mesenchymal stem cell behavior on femtosecond laser-textured Ti-6Al-4V surfaces. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 725–739. [CrossRef]
21. San-Blas, A.; Calderon, M.M.; Buencuerpo, J.; Sanchez-Brea, L.; del Hoyo, J.; Gomez-Aranzadi, M.; Rodríguez, A.; Olaizola, S. Femtosecond laser fabrication of LIPSS-based waveplates on metallic surfaces. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, *520*, 146328. [CrossRef]
22. Garrelie, F.; Colombier, J.-P.; Pigeon, F.; Tonchev, S.; Faure, N.; Bounhalli, M.; Reynaud, S.; Parriaux, O. Evidence of surface plasmon resonance in ultrafast laser-induced ripples. *Opt. Express* **2011**, *19*, 9035–9043. [CrossRef] [PubMed]
23. Bonse, J.; Hohm, S.; Kirner, S.V.; Rosenfeld, A.; Kruger, J. Laser-Induced Periodic Surface Structures—A Scientific Evergreen. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **2016**, *23*. [CrossRef]
24. Skoulas, E.; Manousaki, A.; Fotakis, C.; Stratakis, E. Biomimetic surface structuring using cylindrical vector femtosecond laser beams. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 45114. [CrossRef] [PubMed]
25. Anselme, K.; Bigerelle, M. Role of materials surface topography on mammalian cell response. *Int. Mater. Rev.* **2011**, *56*, 243–266. [CrossRef]
26. Théry, M.; Pépin, A.; Dressaire, E.; Chen, Y.; Bornens, M. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motil. Cytoskelet.* **2006**, *63*, 341–355. [CrossRef]
27. Kilian, K.A.; Bugarija, B.; Lahn, B.T.; Mrksich, M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 4872–4877. [CrossRef]
28. Peng, R.; Yao, X.; Ding, J. Effect of cell anisotropy on differentiation of stem cells on micropatterned surfaces through the controlled single cell adhesion. *Biomaterials* **2011**, *32*, 8048–8057. [CrossRef]
29. Yao, X.; Peng, R.; Ding, J. Effects of aspect ratios of stem cells on lineage commitments with and without induction media. *Biomaterials* **2013**, *34*, 930–939. [CrossRef]
30. Han, P.; Frith, J.E.; Gomez, G.A.; Yap, A.S.; O'Neill, G.M.; Cooper-White, J.J. Five Piconewtons: The Difference between Osteogenic and Adipogenic Fate Choice in Human Mesenchymal Stem Cells. *ACS Nano* **2019**, *13*, 11129–11143. [CrossRef]
31. Linsley, C.; Wu, B.; Tawil, B. The Effect of Fibrinogen, Collagen Type I, and Fibronectin on Mesenchymal Stem Cell Growth and Differentiation into Osteoblasts. *Tissue Eng. Part A* **2013**, *19*, 1416–1423. [CrossRef]
32. Li, B.; Moshfegh, C.; Lin, Z.; Albuschies, J.; Vogel, V. Mesenchymal Stem Cells Exploit Extracellular Matrix as Mechanotransducer. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2425. [CrossRef] [PubMed]
33. ISO. ISO 25178-2:2021. Available online: <https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/07/45/74591.html> (accessed on 30 March 2022).
34. Anderson, H.J.; Sahoo, J.K.; Ulijn, R.V.; Dalby, M.J. Mesenchymal Stem Cell Fate: Applying Biomaterials for Control of Stem Cell Behavior. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2016**, *4*, 38. Available online: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2016.00038> (accessed on 3 May 2022). [CrossRef] [PubMed]
35. Krishna, L.; Dharmodaran, K.; Jayadev, C.; Chatterjee, K.; Shetty, R.; Khora, S.S.; Das, D. Nanostructured scaffold as a determinant of stem cell fate. *Stem Cell Res. Ther.* **2016**, *7*, 188. [CrossRef] [PubMed]
36. Zamir, E.; Katz, M.; Posen, Y.; Erez, N.; Yamada, K.; Katz, B.-Z.; Lin, S.; Lin, D.C.; Bershadsky, A.; Kam, Z.; et al. Dynamics and segregation of cell–matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 191–196. [CrossRef]
37. Yuan, H.; Zhou, Y.; Lee, M.-S.; Zhang, Y.; Li, W.-J. A newly identified mechanism involved in regulation of human mesenchymal stem cells by fibrous substrate stiffness. *Acta Biomater.* **2016**, *42*, 247–257. [CrossRef]
38. Wennerberg, A.; Albrektsson, T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2000**, *15*, 331–344.
39. Faia-Torres, A.B.; Charnley, M.; Goren, T.; Guimond-Lischer, S.; Rottmar, M.; Maniura, K.; Spencer, N.D.; Reis, R.L.; Textor, M.; Neves, N.M. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in the absence of osteogenic supplements: A surface-roughness gradient study. *Acta Biomater.* **2015**, *28*, 64–75. [CrossRef]
40. Wennerberg, A.; Albrektsson, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: A systematic review. *Clin. Oral Implant. Res.* **2009**, *20* (Suppl. S4), 172–184. [CrossRef]
41. Melo, M.A. Bacterial Interactions with Dental and Medical Materials. *J. Funct. Biomater.* **2020**, *11*, 83. [CrossRef]
42. Bollenl, C.M.; 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. [CrossRef]
43. Diaz, C.; Cortizo, M.C.; Schilardi, P.L.; De Saravia, S.G.G.; De Mele, M.A.F.L. Influence of the nano-micro structure of the surface on bacterial adhesion. *Mater. Res.* **2007**, *10*, 11–14. [CrossRef]
44. Fiedler, J.; Özdemir, B.; Bartholomä, J.; Plettl, A.; Brenner, R.E.; Ziemann, P. The effect of substrate surface nanotopography on the behavior of multipotent mesenchymal stromal cells and osteoblasts. *Biomaterials* **2013**, *34*, 8851–8859. [CrossRef] [PubMed]
45. You, M.-H.; Kwak, M.K.; Kim, D.-H.; Kim, K.; Levchenko, A.; Kim, D.-Y.; Suh, K.-Y. Synergistically Enhanced Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Culture on Nanostructured Surfaces with Induction Media. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1856–1862. [CrossRef] [PubMed]

46. Dalby, M.J.; Gadegaard, N.; Tare, R.; Andar, A.; Riehle, M.O.; Herzyk, P.; Wilkinson, C.D.W.; Oreffo, R.O.C. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 997–1003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Metavarayuth, K.; Sitasuwan, P.; Zhao, X.; Lin, Y.; Wang, Q. Influence of surface topographical cues on the differentiation of mesenchymal stem cells in vitro. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2*, 142–151. [[CrossRef](#)]
48. Wang, Z.-Y.; Lim, J.; Ho, Y.S.; Zhang, Q.-Y.; Chong, M.S.K.; Tang, M.; Hong, M.-H.; Chan, J.K.Y.; Teoh, S.H.; Thian, E.S. Biomimetic three-dimensional anisotropic geometries by uniaxial stretching of poly(ϵ -caprolactone) films: Degradation and mesenchymal stem cell responses. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2014**, *102*, 2197–2207. [[CrossRef](#)]
49. Wang, P.-Y.; Li, W.-T.; Yu, J.; Tsai, W.-B. Modulation of osteogenic, adipogenic and myogenic differentiation of mesenchymal stem cells by submicron grooved topography. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23*, 3015–3028. [[CrossRef](#)]
50. Biggs, M.J.P.; Richards, R.G.; McFarlane, S.; Wilkinson, C.D.W.; Oreffo, R.O.C.; Dalby, M. Adhesion formation of primary human osteoblasts and the functional response of mesenchymal stem cells to 330 nm deep microgrooves. *J. R. Soc. Interface* **2008**, *5*, 1231–1242. [[CrossRef](#)]
51. Sjöström, T.; Dalby, M.J.; Hart, A.; Tare, R.; Oreffo, R.O.C.; Su, B. Fabrication of pillar-like titania nanostructures on titanium and their interactions with human skeletal stem cells. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 1433–1441. [[CrossRef](#)]
52. McNamara, L.E.; Sjöström, T.; Burgess, K.E.; Kim, J.J.; Liu, E.; Gordonov, S.; Moghe, P.V.; Meek, R.D.; Oreffo, R.O.; Su, B.; et al. Skeletal stem cell physiology on functionally distinct titania nanotopographies. *Biomaterials* **2011**, *32*, 7403–7410. [[CrossRef](#)]
53. Sjöström, T.; McNamara, L.E.; Meek, R.M.D.; Dalby, M.J.; Su, B. 2D and 3D Nanopatterning of Titanium for Enhancing Osteoinduction of Stem Cells at Implant Surfaces. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2*, 1285–1293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Florian, C.; Skoulas, E.; Puerto, D.; Mimidis, A.; Stratakis, E.; Solis, J.; Siegel, J. Controlling the Wettability of Steel Surfaces Processed with Femtosecond Laser Pulses. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 36564–36571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Florian, C.; Wonneberger, R.; Undisz, A.; Kirner, S.V.; Wasmuth, K.; Spaltmann, D.; Krüger, J.; Bonse, J. Chemical effects during the formation of various types of femtosecond laser-generated surface structures on titanium alloy. *Appl. Phys. A* **2020**, *126*, 266. [[CrossRef](#)]
56. Kirner, S.V.; Wirth, T.; Sturm, H.; Krüger, J.; Bonse, J. Nanometer-resolved chemical analyses of femtosecond laser-induced periodic surface structures on titanium. *J. Appl. Phys.* **2017**, *122*, 104901. [[CrossRef](#)]
57. Yang, G.-L.; He, F.-M.; Yang, X.-F.; Wang, X.-X.; Zhao, S.-F. Bone responses to titanium implants surface-roughened by sandblasted and double etched treatments in a rabbit model. *Oral Sur. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontol.* **2008**, *106*, 516–524. [[CrossRef](#)]
58. de Oliveira, P.T.; Zalzal, S.F.; Beloti, M.M.; Rosa, A.L.; Nanci, A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2007**, *80*, 554–564. [[CrossRef](#)]
59. Carbone, R.; Marangi, I.; Zanardi, A.; Giorgetti, L.; Chierici, E.; Berlanda, G.; Podestà, A.; Fiorentini, F.; Bongiorno, G.; Piseri, P. Biocompatibility of cluster-assembled nanostructured TiO₂ with primary and cancer cells. *Biomaterials* **2006**, *27*, 3221–3229. [[CrossRef](#)]
60. Huang, H.-H.; Pan, S.-J.; Lai, Y.-L.; Lee, T.-H.; Chen, C.-C.; Lu, F.-H. Osteoblast-like cell initial adhesion onto a network-structured titanium oxide layer. *Scr. Mater.* **2004**, *51*, 1017–1021. [[CrossRef](#)]
61. Dalby, M.J.; Gadegaard, N.; Oreffo, R.O.C. Harnessing nanotopography and integrin–matrix interactions to influence stem cell fate. *Nat. Mater.* **2014**, *13*, 558–569. [[CrossRef](#)]
62. Heitz, J.; Plamadeala, C.; Muck, M.; Armbruster, O.; Baumgartner, W.; Weth, A.; Steinwender, C.; Blessberger, H.; Kellermaier, J.; Kirner, S.V.; et al. Femtosecond laser-induced microstructures on Ti substrates for reduced cell adhesion. *Appl. Phys. A* **2017**, *123*, 734. [[CrossRef](#)]

Résumé

Cette thèse traite des problèmes d'infections des implants dentaires, telles que la péri-implantite, causées par l'adhérence de bactéries parodontopathogènes. Elle explore l'utilisation de la texturation laser femtoseconde (fs-L) pour améliorer les propriétés des surfaces d'implants en alliage de titane (Ti6Al4V).

Le projet, financé par l'ANR et mené en collaboration avec divers laboratoires, a utilisé des techniques de caractérisation avancées pour analyser les surfaces texturées et évaluer leur efficacité en conditions biologiques. Les résultats montrent que la texturation par fs-L permet de créer des structures de surface périodiques (LIPSS) micro et nanométriques, modifiant la surface de contact et par conséquent l'adhérence cellulaire et bactérienne. Les surfaces ainsi texturées ont démontré une réduction significative de l'adhérence des bactéries parodontopathogènes, telles que *Porphyromonas gingivalis*, réduisant ainsi potentiellement les risques de péri-implantite.

Les études *in vitro* ont également confirmé une meilleure adhérence des fibroblastes gingivaux sur les surfaces texturées, ce qui pourrait réduire les risques d'infiltration bactérienne et ainsi améliorer la stabilité et l'intégration des implants.

En conclusion, la texturation laser femtoseconde des surfaces d'implants dentaires est prometteuse pour créer des implants plus durables et doublement fonctionnalisés, améliorant l'adhérence cellulaire et possédant des propriétés antibactériennes accrues. Ces avancées ouvrent la voie à des implants répondant mieux aux défis cliniques actuels tout en contribuant à la lutte contre l'antibiorésistance. Des études supplémentaires plus proches d'une situation clinique sont prévues pour valider ces résultats et explorer les interactions entre les topographies fs-L et les réponses biologiques des tissus environnants.

Mots-Clés

Implants dentaires ; Bactéries parodontopathogènes ; Laser femtoseconde ; Fonctionnalisation de surface ; Fibroblastes gingivaux ; Adhérence cellulaire ; Péri-implantite ; *Porphyromonas gingivalis*

Abstract

This thesis addresses issues related to infections of dental implants, such as peri-implantitis, caused by the adhesion of periodontopathogenic bacteria. It explores the use of femtosecond laser (fs-L) texturing to enhance the properties of titanium alloy (Ti6Al4V) implant surfaces.

The project, funded by the ANR and conducted in collaboration with various laboratories, employed advanced characterization techniques to analyze textured surfaces and evaluate their effectiveness under biological conditions. The results demonstrate that fs-L texturing can create micro and nanometric periodic surface structures (LIPSS), altering the contact surface and thus cellular and bacterial adhesion. Textured surfaces showed a significant reduction in the adhesion of periodontopathogen bacteria, such as *Porphyromonas gingivalis*, potentially reducing the risks of peri-implantitis.

In vitro studies also confirmed better adhesion of gingival fibroblasts to textured surfaces, which could reduce the risk of bacterial infiltration and thus improve implant stability and integration.

In conclusion, femtosecond laser texturing of dental implant surfaces holds promise for creating more durable and dual-functionalized implants, enhancing cellular adhesion, and possessing increased antibacterial properties. These advancements pave the way for implants better suited to current clinical challenges while contributing to the fight against antibiotic resistance. Further studies closer to clinical settings are planned to validate these results and explore the interactions between fs-L topographies and the biological responses of surrounding tissues.

Keywords

Dental implants; Periodontopathogen bacteria; Femtosecond laser; Surface functionalization; Gingival fibroblasts; Cell adhesion; Peri-implantitis; *Porphyromonas gingivalis*