

Université de Montréal

**Caractérisation de la surface d'implants de titane et de  
cobalt-chrome par la dimension fractale et l'influence de la  
topographie sur les interactions interfaciales.**

par  
Clara Pimienta

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en Sciences Pharmaceutiques

Mars, 1999

©Clara Pimienta, 1999



Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée:

**Caractérisation de la surface d'implants de titane et de cobalt-chrome par la dimension fractale et l'influence de la topographie sur les interactions interfaciales.**

Présentée par:

Clara Pimienta

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Albert Adam, Ph.D.	, président
Rashad Tawashi, Ph.D.	, membre et directeur de recherche
Patrice Hildgen, Ph.D.	, membre
J.D. Bobyn, Ph.D.	, membre et examinateur externe

Thèse acceptée le: 02 . 09 . 99

## SOMMAIRE

Les biomatériaux utilisés pour la fabrication des prothèses articulaires ont fait l'objet, ces dernières années, de progrès considérables. Ils ont atteint un degré de fiabilité incontestable en ce qui concerne leur composition et leurs propriétés physiques. Trois critères essentiels pour la chirurgie orthopédique, soient la résistance mécanique, la résistance à la corrosion et la biocompatibilité sont respectés dans la fabrication des produits implantés.

Cependant, depuis une quinzaine d'années, le taux d'échec du au descellement des prothèses articulaires ne fait qu'augmenter. La recherche s'est donc orientée vers l'amélioration de la stabilité des prothèses. Parmi les méthodes retenues, nous retrouvons l'augmentation de la rugosité par enrobage plasmatique ou sablage, par couplage d'éléments bioactifs ou de molécules susceptibles de fournir une attache soutenue entre l'implant et le tissu vivant.

Le titane, principal biomatériau utilisé dans ce domaine, est résistant, léger, ductile et provoque peu de réactions tissulaires. Ces propriétés expliquent sa vaste utilisation pour la fabrication de prothèses. Plusieurs critères influencent la qualité de l'interface implant-os. Parmi ces derniers, nous avons la rugosité de surface des biomatériaux vis-à-vis les réactions cellulaires. D'autres travaux soulignent la sensibilité des cellules à la microtopographie des surfaces. L'énergie de surface joue également un rôle au niveau du degré d'adhésion des cellules. Ainsi, un substrat hydrophile aura tendance à favoriser l'adhésion cellulaire par rapport à un plus hydrophobe.

Nous avons, principalement, porté notre attention sur la description de la rugosité de surface. Cette propriété est à l'origine des différents phénomènes physiques se produisant aux interfaces lors de la mise en place d'une prothèse,

Dans un premier temps, nous avons remarqué que la description quantitative de la topologie d'une surface n'est pas entièrement adéquate. L'inconvénient des méthodes conventionnelles (telle que la profilométrie tactile) se situe au niveau des données obtenues qui dépendent des limites physiques de l'appareillage. Parmi ces limites, nous retrouvons la résolution de l'instrument ou l'utilisation d'une échelle particulière selon l'étude ou l'échantillon.

Mandelbrot, en définissant la géométrie fractale, a étendu et généralisé une règle empirique trouvée par Richardson. La longueur des côtes géographiques,  $L_\varepsilon$ , est évaluée à l'aide d'un pas de longueur constante  $\varepsilon$ , et la relation suivante apparaît:

$$L_\varepsilon = \lambda \varepsilon^{1-D}$$

où  $D$  est un nombre non entier qui diffère suivant les côtes géographiques, qui dépend de l'irrégularité générale et qui à haute résolution tend vers l'infini. C'est ainsi qu'à partir de la définition théorique de la dimension, des algorithmes de calculs ont été développés. Pour toutes ces méthodes, la valeur limite est estimée par la pente de la droite de régression d'un diagramme log-log.

Il est donc intéressant d'aborder la description de la rugosité des surfaces par le biais du calcul de la dimension fractale. L'analyse fractale, de par ses caractéristiques d'invariance lors de transpositions d'échelles et de similitude, permet d'obtenir un index de complexité d'une surface et est intuitivement reliée à la notion de rugosité.

Dans cette optique, nous avons démontré l'efficacité d'une méthode d'analyse d'images tridimensionnelles par profilométrie optique avec laser. Les données obtenues ont permis une visualisation en perspective des surfaces des biomatériaux composés de titane ou de cobalt-chrome.

De plus, une comparaison avec d'autres méthodes conventionnelles d'analyse de surfaces fut entreprise (profilométrie tactile, microscopie confocale et analyse d'images). Cette deuxième étude a permis de corroborer les hypothèses de variabilité des différents standards rugosimétriques conventionnels. Ainsi, une meilleure intégration de la notion de dimension fractale au sein des mesures usuelles de rugosité peut s'avérer intéressante.

Une dernière étude a révélé la complexité des facteurs entrant en jeu lorsque l'on veut étudier les réactions interfaciales: soit l'attachement de macrophages et l'étude de l'angle de contact. Les données préliminaires démontrent, en partie, que la rugosité de surface ainsi que la composition chimique influencent le degré d'adhésion de macrophages.

La dimension fractale est un concept présentant de multiples avantages par rapport aux paramètres conventionnels de rugosité. Un potentiel intéressant pourrait résulter dans l'évaluation de surfaces finies lors des contrôles de qualité. L'approche fractale apporte en rugosimétrie une limitation stricte du nombre de paramètres nécessaires pour décrire une surface. Ceci peut s'avérer intéressant lorsque des surfaces rugueuses sont impliquées.

**MOTS-CLES:** Analyse fractale, rugosité de surface, biomatériaux, titane, cobalt-chrome.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>xi</b>
<b>TABLE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....</b>	<b>xvii</b>
<b>DÉDICACE.....</b>	<b>xix</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xx</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>PREMIÈRE PARTIE: REVUE GÉNÉRALE DE LA LITTÉRATURE</b>	
<b>1- LES BIOMATÉRIAUX.....</b>	<b>3</b>
1.1 Définition.....	3
1.2 Biocompatibilité.....	3
1.3 Utilisation des biomatériaux.....	6
1.3.1 Aciers inoxydables.....	6
1.3.2 Alliages à base de cobalt-chrome.....	7
1.3.3 Le titane et les alliages de titane.....	7
1.3.4 Les céramiques.....	9
1.3.5 Les polymères.....	11
1.4 Classification des biomatériaux implantés en site osseux.....	11
1.4.1 Matériaux biotolérants.....	11
1.4.2 Matériaux bio-inertes.....	11
1.4.3 Matériaux bioactifs.....	12
1.4.3.1 Matériaux résorbables.....	12
1.4.3.2 Matériaux à surface réactive.....	12
1.5 Réactions de l'organisme.....	14
1.5.1 Réactions locales.....	14
1.5.2 Réactions générales.....	15
1.5.3 Hypersensibilité et toxicité.....	15
1.6 Concept d'ostéo-intégration.....	16
1.7 Influence des propriétés de surface des biomatériaux.....	17
1.7.1 Procédé plasmatique.....	17
1.7.2 La composition chimique.....	21
1.7.3 L'énergie de surface.....	21
1.7.3.1 Méthode de l'angle de contact.....	23
1.7.3.2 Surface rugueuse.....	29
1.7.3.3 Surface hétérogène.....	30
1.7.4 La topographie et la rugosité de surface.....	31

<b>2-L'ADHÉSION CELLULAIRE.....</b>	<b>35</b>
2.1 Théories de l'adhésion.....	35
2.1.1 Les forces de van der Waals.....	37
2.1.2 Les forces électrostatiques.....	37
2.1.3 Les forces de liaisons spécifiques.....	40
2.2 Processus d'adhésion.....	40
2.2.1 Adsorption des protéines.....	41
2.2.2 Contact cellule-substrat.....	41
2.2.3 Attachement cellulaire.....	41
2.2.4 Étalement cellulaire.....	41
<b>3-CARACTÉRISATION DE SURFACE.....</b>	<b>43</b>
3.1 La notion de surface.....	43
3.2 La notion de rugosité.....	43
3.3 Paramètres conventionnels de mesure de la rugosité.....	44
3.4 Les méthodes d'analyses.....	49
3.4.1 Profilométrie tactile.....	51
3.4.2 Profilométrie optique.....	53
3.4.3 Microscopie confocale.....	56
3.4.4 Analyse d'images.....	59
<b>4-ANALYSE FRACTALE.....</b>	<b>62</b>
4.1 Définition de la géométrie fractale.....	62
4.2 Notion de la dimension fractale.....	63
4.3 Caractéristiques de la dimension fractale.....	65
4.4 Calcul de la dimension fractale.....	70
4.4.1 Méthode de Minkowski-Bouligand.....	70
4.4.2 Méthode des variations.....	72
4.4.3 Méthode du compas.....	75
4.4.4 Méthode des boîtes.....	77
<b>5-HYPOTHÈSE DE TRAVAIL.....</b>	<b>79</b>
<b>6-OBJECTIFS.....</b>	<b>80</b>
<b>6.1 Objectifs généraux.....</b>	<b>80</b>
<b>6.2 Objectifs spécifiques.....</b>	<b>80</b>

## DEUXIÈME PARTIE : PRÉSENTATION DES MANUSCRITS

### 7-SURFACE FRACTAL DIMENSION AND THE QUANTIFICATION OF ROUGHNESS OF TITANIUM IMPLANT MATERIAL.

Abstract.....	84
Introduction.....	84
Materials and Methods.....	85
Results and Discussion.....	88
Conclusion.....	89
Acknowledgements.....	89
References.....	89
Discussion with Reviewers.....	90

### 8-QUANTIFYING THE SURFACE GEOMETRY OF TITANIUM IMPLANT MATERIAL BY DIFFERENT METHODS OF ANALYSIS.

Abstract.....	93
Introduction.....	93
Materials and Methods.....	94
Results and Discussion.....	97
Conclusion.....	100
Acknowledgements.....	100
References.....	100
Discussion with Reviewers.....	102

### 9-MACROPHAGE RESPONSE AND CONTACT ANGLE MEASUREMENTS ON DIFFERENT TITANIUM AND COBALT-CHROME BIOMATERIAL SURFACES.

Abstract.....	106
Introduction.....	108
Materials and Methods.....	110
Results.....	113
Discussion.....	115
Conclusion.....	119
Acknowledgements.....	120
References.....	127

## TROISIÈME PARTIE: SYNTHÈSE ET CONCLUSION

10- Synthèse.....	131
Conclusion.....	136
Bibliographie.....	139



## LISTE DES TABLEAUX

### **Tableau 1.1:**

Exemples d'applications de biomatériaux dans divers domaines. Tiré de Loty et coll., 1998.....5

### **Tableau 3.1:**

Méthodes d'analyse de surface.....50

### **Table 7.1.**

Data analysis using the variation method. The letters (A, B or C) identify the surface while the numbers (1, 2 or 3) identify the sample. For this example, we set the scale at 1.2 mm in all cases. Note the consistency of the results within each sample yet they are significantly different within each surface.....88

### **Table 8.1:**

Surface fractal dimension data on titanium biomaterial surfaces obtained by laser-active 3D vision (described in Pimienta et al., 1994). Measurements were performed in triplicate and are significantly different ( $p \leq 0.05$ ).....94

### **Table 8. 2:**

Summary of results obtained by image analysis of boundary lines of coarse titanium and fine titanium materials. The data are expressed as means  $\pm$  S.D.....96

### **Table 8.3:**

Characterization of the surface roughness of different titanium implant surfaces by tactile profilometry and confocal analysis. The values obtained from uncoated surface (control) were equivalent to the standard used to calibrate the equipment.....97

### **Table 9.1:**

Contact angle measurement by the goniometer method within 120 secondes of the liquid dropped on titanium and cobalt-chrome biomaterial samples. Liquid tested: distilled water (surface tension 72.4 dynes/cm). Measurements were done 8 times on each sample. Results are expressed as mean  $\pm$  sd. Statistical significance done by student-t test ( $p \leq 0.05$ ).....121

**Table 9.2:**

Macrophage attachment experiments performed on titanium and cobalt-chrome samples and their respective controls under two different incubation time. Average number of macrophages per field  $\mu\text{m}^2 \pm \text{sd}$ . Statistical significance done by student-t test ( $p \leq 0.05$ ).....122

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1.1:**

Schéma des phénomènes de dissolution-reprécipitation *in vivo* à la surface de l'hydroxyapatite. Adapté de Loty et coll., 1998.....10

**Figure 1.2:**

Description des différentes interfaces possibles selon le biomatériau implanté. Adapté de Loty et coll., 1998.....13

**Figure 1.3:**

Torche à plasma. L'implant recouvert par une projection de titane, le gaz du plasma (argon et hydrogène) est modifié en une flamme à plasma rapide avec température élevée (plus de 15000°C), les particules de titane ( de 0.05 à 1 mm de diamètre) jetées en pluie devant la flamme sont portées à température de fusion et adhèrent à la surface du titane. La vitesse de projection du gaz est proche de 3000 m/s et celle des particules de titane en fusion de l'ordre de 600 m/s. Tiré de Nicholson.,1983.....18

**Figure 1.4:**

Implant de la hanche. Treillis pointillés formés de particules de titane déposées par la méthode des plasmas. L'utilisation de particules de titane, outre leur excellente biocompatibilité, permet à l'implant de mieux s'intégrer dans le corps. Cette intégration est due à l'augmentation de la rugosité de surface qui entraîne la formation de tissu fibreux plus rapidement qu'une surface lisse. Tiré de Dujovne et coll.,1999.....19

**Figure 1.5:**

Surface obtenue par procédé plasmatique. On observe souvent cet aspect globulaire. Surface où des particules de cobalt-chrome ont été déposées sur un substrat de cobalt-chrome. Microphotographie obtenue par microscopie électronique à balayage avec un grossissement 50X.....20

**Figure 1.6:**

Les composantes essentielles qui déterminent la réponse biologique des implants soient la rugosité, la composition, la topographie et l'énergie de surface.....22

**Figure 1.7:**

Mesure de l'angle de contact. Les composantes de la tension de surface sont en équilibre autour de la goutte liquide sur une surface plane.  $\gamma_{lv}$ ,  $\gamma_{sv}$  et  $\gamma_{sl}$  constituent respectivement les tensions interfaciales liquide-vapeur, solide-vapeur et solide-liquide. L'angle  $\theta$  est formé par les plans tangentiels aux interfaces liquide-vapeur et solide-liquide.....24

**Figure 1.8:**

Méthode du goniomètre, appareil qui permet la mesure de l'angle de contact. Une goutte de liquide est déposée sur le substrat à l'aide d'une microseringue. Le volume de la goutte peut varier entre 4  $\mu$ l à 10  $\mu$ l. Après un temps de stabilisation, l'angle que la goutte forme entre la phase solide et la phase vapeur est mesuré. L'observation de la goutte est schématisée à la Figure 1.7.....25

**Figure 1.9:**

Graphique de Kaelble des tensions de surface de liquides sur un substrat où  $\beta_s$  est la pente et  $\alpha_s$  est l'ordonnée à l'origine.....27

**Figure 1.10:**

Graphique de Zisman des tensions de surface d'une série de liquides.  $\gamma_l$  est la tension de surface du liquide et  $\gamma_c$  est la tension de surface critique.....28

**Figure 1.11**

L'adsorption des protéines du plasma lors de l'interaction entre le sang et le biomatériau est influencée par les propriétés physicochimiques de la surface. En plus de la possibilité de l'activation de la cascade de coagulation et du complément, l'adsorption de protéines telles que la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine sur la surface du matériau ont une importance pour les interactions cellules-matériau. Une fois inséré, le biomatériau est exposé aux bactéries, macrophages et cellules tissulaires. Adapté de Gristina et coll., 1994.....32

**Figure 1.12:**

L'alignement des cellules se fait selon la topographie de surface du substrat le long des sillons creusés. L'index d'orientation se calcule par la longueur (le long du segment cellulaire le plus long) divisée par la largeur. Adapté de den Braber et coll., 1996.....33

**Figure 2.1:**

Les forces de répulsion naturelles entre une bactérie chargée négativement et un substrat sont soumises aux forces de van der Waals à une certaine distance. Il existe également des interactions hydrophobes entre les molécules. La création d'un polymère polysaccharide facilite les liens entre les ligands et les récepteurs, facilite l'attachement et l'adhésion de bactéries au substrat. Adapté de Gristina, 1994.....38

- Figure 2.2:**  
Graphique des courbes d'énergie pour les interactions de particules en suspension. Adapté de Martin et coll, 1983.....39
- Figure 2.3:**  
Représentation schématique des différentes étapes dans le processus d'adhésion d'une cellule *in vitro*. Les étapes sont l'adsorption des protéines, le contact cellule-substrat, l'attachement cellulaire et l'étalement cellulaire. Adapté de Rajaraman et coll., 1974.. .....42
- Figure 3.1:**  
Paramètres conventionnels de mesure de la rugosité.  $R_a$ : moyenne arithmétique des valeurs des écarts par rapport à un plan moyen pris sur la surface de l'échantillon.  $R_q$ : racine carré moyenne des écarts le long du profil de surface. Tiré de Cielo., 1988.....46
- Figure 3.2:**  
Facteur skewness ou ondulation.  $Sk=0$  le profil est symétrique par rapport à la ligne moyenne.  $Sk>0$  le profil comporte plus de pics que de creux.  $Sk<0$ , le profil comporte plus de creux que de pics. Tiré de Blouet., 1988.....47
- Figure 3.3:**  
Facteur de kurtosis ou étalement de la distribution.  $Ek>3$ , la distribution est élargie.  $Ek<3$ , la distribution est resserrée.  $Ek=3$ , la distribution est gaussienne. Tiré de Blouet., 1988.....48
- Figure 3.4:**  
Profilométrie tactile. L'échantillon est placé sur la plate-forme. Le stylet se déplace à l'aide d'un bras qui peut fonctionner à une vitesse allant de 0.15 mm/s à 1 mm/s. Le stylet en diamant suit lentement la surface à inspecter et un signal est enregistré selon les variations d'altitude de l'échantillon.....52
- Figure 3.5:**  
Principe de la profilométrie optique. Un faisceau laser à diode effectue point par point, le balayage de la surface comme une pointe de lecture optique. La fonction de balayage est assurée par un ensemble porte-échantillons constitué de deux tables croisées actionnées pas à pas respectivement dans les directions x et y par deux moteurs.....54
- Figure 3.6:**  
Principe de triangulation. Un point A sur la surface inspectée est imagé sur les plans  $p_1$  et  $p_2$ . Si la position longitudinale du point imagé change de A vers A', son image sur  $p_2$  bouge de O à O'.....55

- Figure 3.7:**  
Principe du microscope confocal. L'échantillon est balayé par un faisceau laser en mode de réflexion. La lumière émanant de la source laser est focalisée sur un point de l'échantillon. Ce point est alors imagé grâce au détecteur. Cette technique se nomme confocale puisque deux images de l'échantillon sont enregistrées soient l'image illuminée et celle dans le détecteur. ....57
- Figure 3.8:**  
La microscopie confocale possède l'avantage de découper l'image en plusieurs couches et permet d'analyser chaque section.....58
- Figure 3.9:**  
Structure tridimensionnelle d'une surface rugueuse (a). L'utilisation de filtres (b) 3X3, (c) 5X5 et (d) 7X7 donnent des images plus adoucies des surfaces analysées (200 X 200  $\mu\text{m}^2$ ).....60
- Figure 4.1:**  
Différentes dimensions fractales peuvent être observées selon l'échelle d'observation de la structure (Avnir., 1990).....64
- Figure 4.2:**  
Structure observée à différents grossissements. Tiré de Peitgen et coll., 1992.....67
- Figure 4.3:**  
Brocoli Romanesco. Structures similaires observées à différentes échelles. Tiré de Peitgen et coll., 1992.....68
- Figure 4.4:**  
Courbe de Von Koch. Tiré de Peitgen et coll.,1992.....69
- Figure 4.5:**  
Méthode de Minkowski-Bouligand. Tiré de Tricot et Salem.,1994.....71
- Figure 4.6:**  
Méthode des variations. Tiré de Dubuc et coll.,1987.....74
- Figure 4.7:**  
Méthode du compas. Tiré de Wright et Karlsson.,1982.....76
- Figure 4.8:**  
Méthode des boîtes (box-counting) Tiré de Tricot et Salem.,1994.....78

**Figure 7.1:**

Data acquisition with the MVS Laser Vision camera. The MVS5 camera projects a plane of laser light on the sample, producing a line on the surface. The profile is extracted from the two-dimensional image of the laser reflection on the surface using a MVS LaserVision dedicated board. Profile geometry is then sampled, digitized (we call this the  $x$  or horizontal axis), and displayed on the monitor. Moving the camera in a perpendicular direction permits scanning of a given region on the surface (the moving direction is defined as the  $y$  or longitudinal axis). Spatial sampling resolution is illustrated in the bottom right corner (0.020 mm in  $x$ , 0.067 mm in  $y$ ).....85

**Figure 7.2:**

Three-dimensional plots of regions of the selected samples: (a) coarse, (b) fine and (c) uncoated. Each plot was generated by selecting a 120 x 120 pixels region on each image, applying a median filter (with a 5x5 pixels spatial extent), and then displaying with sub-sampling at every 3 points.....86

**Figure 7.3:**

Fractal dimension over a range of scales for two samples. The legend in the top right corner indicates which patch was analyzed. The letters (A, B or C) identify the surface while the numbers (1, 2 or 3) identify the sample. The fractal dimension is obtained here by fitting a straight line to the  $\log(1/\epsilon)$ ,  $\log\{|S(\epsilon)|_3\}$  data.....87

**Figure 7.4:**

Tilting to improve the data. Correction of a profile is illustrated here. An hypothetical depth profile is pictured on the left. The middle section shows the correcting linear function (tilt with angle  $\theta$ ), while the result of correction (the sum of the two) is seen on the right.....88

**Figure 7.5:**

Fractal dimension over a range of scales for various samples. The legend in the top right corner indicates which patch was analyzed. The letters (A, B or C) identify the surface while the numbers (1, 2 or 3) identify the sample. The surface data were tilted to allow better performance of the variation method. This figure clearly shows segregation of the three types of surfaces, suggesting a robust estimator of the roughness of surfaces.....89

**Figure 8.1:**

Scanning electron microphotographs of (a) coarse, (b) fine and (c) uncoated titanium samples compared with their respective 3D reconstruction depth maps.....95

**Figure 8.2:**

Scanning electron microphotographs of cross sectional textured samples of (a) coarse and (b) fine titanium surfaces.....96

**Figure 8.3:**

Image analysis method. The scanning electron microphotograph of the sample is (a) scanned and binarized. The image is then (b) cleaned of all small details and pores. The contact surface (c) is put into contrast. Then, (d) the grooves are closed and (e) groove depth is measured. The surface is (f) smoothed and (g) peak heights are measured.....98

**Figure 8.4:**

Three-dimensional reconstructed surfaces of (a) coarse and (b) fine titanium samples by confocal microscopy.....99

**Figure 9.1:**

Surface characterization was determined by scanning electron microscopy on titanium samples (a) coarse titanium, (b) fine titanium, (c) cobalt-chrome, and (d) uncoated surface (control).....123

**Figure 9.2:**

Schematic illustration of the cellular culture experiment.....124

**Figure 9.3:**

Scanning electron micrographs of macrophage attachment at 1.5h and 3.5h of incubation time onto (a) coarse (b) fine titanium surface and (c) uncoated control surface at X500.....125

**Figure 9.4:**

Scanning electron micrographs of macrophage attachment at 1.5h and 3.5h of incubation time onto (a) cobalt-chrome surface and (b) uncoated control surface at X500.....126



## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

**Al:** aluminium

**Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:** oxyde d'aluminium

**Ca:** calcium

**Co-Cr:** cobalt-chrome

**d:** dimension fractale

**L<sub>0</sub>:** longueur d'évaluation

**ε:** pas de mesure

**E<sub>k</sub>:** facteur de kurtosis ou étalement de la distribution de Gauss

**ΔE:** ensemble de cercles pour la méthode de Minkowski-Bouligand

**f:** la plus petite valeur de ε pour les données logarithmiques

**fs:** surface fractionnelle composée de sections solides

**fa:** surface fractionnelle composée de section d'air

**ΔF<sub>adh</sub>:** force d'adhésion

**HA:** hydroxyapatite

**L:** longueur d'échantillonnage

**L(λ):** longueur d'un profil en fonction de λ

**λ:** étalon de mesure

**Mg<sup>2+</sup> :** magnésium

**P:** phosphore

**r:** rapport de l'aire réelle de la surface rugueuse sur l'aire de la surface plane

$R_a$ : moyenne arithmétique des valeurs des écarts par rapport à un plan moyen sur la surface de l'échantillon

$R_q$ : valeur de la racine carrée moyenne des écarts à l'intérieur de la surface de l'échantillon

$R_{max}$ : valeur exprimant la distance entre le pic le plus élevé et le creux le plus profond sur la surface.

SCA: sessile contact angle

S: soufre

S: surface

$S(\epsilon)$ : surface mesurée à l'échelle  $\epsilon$

$S_k$ : facteur de skewness ou ondulation du profil

Ti: titane

$TiO_2$ : oxyde de titane

V: vanadium

$V(S\epsilon)$ : volume en fonction des profils de surface obtenus par la méthode des variations

$W_\epsilon(E)$ : mailles du réseau de l'ensemble E pour la méthode des boîtes

$\theta$ : angle formé entre les tensions de surface liquide-vapeur et solide-liquide

$\theta_{lisse}$ : angle formé entre les liquides et la surface idéalement plane du solide

$\theta_{rugueux}$ : angle de contact mesuré sur une surface rugueuse

$\theta_m$ : angle de contact mesuré entre fs et fa

$\gamma_{lv}$  ou  $\gamma_{12}$ : tension de surface entre les phases liquide-vapeur (dynes/cm)

$\gamma_{sl}$  ou  $\gamma_{s2}$ : tension de surface entre les phases solide-liquide (dynes/cm)

$\gamma_{sv}$  ou  $\gamma_{s1}$ : tension de surface entre les phases solide-vapeur (dynes/cm)

$\gamma_d$ : tension de surface entre les phases cellules-liquide (dynes/cm)

*A mes parents. Je tiens à vous exprimer ma plus profonde gratitude pour la patience, l'aide, la persévérance et les encouragements fournis tout le long de ce projet. Un grand merci avec beaucoup d'amour.*

*A mon mari Gad Cohen,  
A mes enfants,  
Merci.*

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier, en premier lieu, le Dr. Rashad Tawashi pour m'avoir donné la possibilité de travailler au sein de son équipe de recherche. Je le remercie de son aide, sa disponibilité, ses encouragements et sa collaboration tout le long de ce projet d'envergure. Qu'il trouve ici le témoignage de ma plus profonde reconnaissance.

Je remercie également le Dr. Nigel Phillips pour sa collaboration lors des expériences d'adhésion cellulaire. Mr. Dujovne, de l'hôpital Général de Montréal pour son aide lors de la recherche d'échantillons de biomatériaux. Le Dr. Roch Thibert pour ses expériences de mesure de l'angle de contact. Le Dr. David Avnir, de l'Université de Jérusalem, pour ses conseils judicieux dans le domaine des fractales.

Je remercie mes collègues de laboratoire Chau Sockat et Hasheem Hyati. Benoît Dubuc pour son aide lors de la mesure de la dimension fractale tridimensionnelle. Monsieur Gilles DeGagné pour son aide technique constante. Le Dr. Edouard Sacher de l'école Polytechnique, pour m'avoir fourni la possibilité de travailler avec le goniomètre permettant la mesure de l'angle de contact. Mme Josiane Chalse, de Paprican, pour sa généreuse collaboration et sa compétence en microscopie confocale. Mr Michel Lefevre, de Noranda, pour son aide avec la profilométrie tactile.

Enfin, je voudrais remercier l'organisme des Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche ainsi que la Faculté des Etudes Supérieures de l'Université de Montréal pour leur support financier tout au long de ce projet.

## INTRODUCTION

Nous nous intéressons, dans le cadre de cette thèse, à l'application du concept fractal comme indice de complexité d'une surface. Cet indice permet de décrire la rugosité de surface d'implants en titane ou en cobalt-chrome. Notre étude porte également sur l'influence de la topographie sur certaines réactions interfaciales entre le biomatériau et le tissu vivant.

Cette thèse est constituée de trois parties. La première partie consiste en une revue générale de la littérature et est divisée en quatre chapitres. Nous passons en revue, au chapitre 1, les biomatériaux, leurs caractéristiques et leurs implications dans différents domaines. Une revue de l'adhésion cellulaire et ses mécanismes d'actions est présentée au chapitre 2. Ensuite, au chapitre 3, nous retrouvons la description des méthodes conventionnelles d'analyse de surface ainsi que leurs paramètres. Finalement, le chapitre 4 discute du concept fractal et énumère les algorithmes usuels d'estimation de la dimension fractale.

Dans la deuxième partie, subdivisée en trois chapitres, nous retrouvons une présentation des manuscrits concernant le domaine étudié. Le chapitre 8 présente la méthode de profilométrie optique au laser à mesure tridimensionnelle (3D) reliée à l'algorithme des variations d'analyse fractale. Cette partie s'ajoute à l'étude d'autres méthodes d'analyse de surface soient la profilométrie tactile, la microscopie confocale et l'analyse d'images retrouvées au chapitre 9. Finalement, le chapitre 10 évalue l'effet de la rugosité sur certaines réactions interfaciales telles que l'énergie de surface et l'adhésion de macrophages.

Enfin dans la troisième partie, une synthèse générale résume les résultats obtenus, leurs interprétations et les applications qui peuvent en découler. De nouveaux champs d'intérêts sont également considérés.

**PREMIÈRE PARTIE**

***REVUE DE LA LITTÉRATURE***

# 1-LES BIOMATÉRIAUX

## 1.1 Définition

La science des biomatériaux a connu un essor important au cours des dernières années. Cet essor c'est surtout fait sentir dans le domaine des prothèses pour le traitement des affections de l'appareil locomoteur. Les biomatériaux les plus utilisés sont surtout les matériaux pour les implants. Leur domaine d'utilisation comprend l'orthopédie, la cardiologie, la neurochirurgie, la médecine dentaire et l'ophtalmologie (Williams, 1981a,b). La caractérisation essentielle d'un biomatériau est son habilité à réagir avec le tissu vivant et à former une interface physique. Cette interface est à l'origine de plusieurs défis biotechnologiques. Le tissu osseux est le siège d'un remodelage permanent qui lui permet d'adapter son architecture aux variations des contraintes mécaniques des prothèses. Il est donc évident que la qualité de surface d'un implant serait importante dans la biocompatibilité de ce dernier vis-à-vis les cellules osseuses.

## 1.2 Biocompatibilité

La biocompatibilité est une notion intimement liée à celle des biomatériaux. Elle se définit comme la capacité que possède un matériau à s'adapter à son hôte (Williams, 1981a). En pratique, cela signifie que le biomatériau ne doit pas entraîner de réactions inflammatoires, ne doit pas être toxique, ni immunogène, ni carcinogène. Généralement, le phénomène de biocompatibilité des biomatériaux est relié aux réactions chimiques (par exemple, libération d'ions ou de produits de dégradation) qui se produisent entre le matériau et les fluides physiologiques (Boyan et coll., 1996).

Les implants font souvent l'objet de contraintes mécaniques qui ont une influence sur leur adaptation physique. Ainsi, tout mouvement qui se produit à l'interface de l'implant entraîne une réponse cellulaire de la part de l'organisme caractérisée par une



fibrogenèse et/ou une ostéogenèse au site opératoire (Ratner, 1988). La forme physique de l'implant est également un facteur important lorsqu'on parle de biocompatibilité. Dans le contexte de la carcinogenèse, il a été démontré qu'un matériau sous forme de poudre produit une réponse différente de celui sous forme solide (Pedley et coll., 1981).

L'influence de la rugosité de surface d'un matériau sur le site d'implantation est un facteur à considérer. Ainsi, l'implantation d'un matériau rugueux dans les tissus durs (tels que les os ou les dents) permet de distribuer le stress de l'implant sur une grande surface. Par contre, lorsque l'implant est exposé au flux sanguin (valve cardiaque) la rugosité provoque une turbulence du flux et est parmi un des éléments impliqués dans la formation de thrombus (Albrektsson et coll., 1983).

Les propriétés de surface des biomatériaux doivent donc être l'objet d'une considération importante. Cependant, toutes sont reliées aux événements initiaux qui se produisent au niveau moléculaire et à l'interface biomatériau-tissu vivant. Dans le cas des métaux, la nature du film d'oxyde contrôle le processus de corrosion (Quinquis et coll., 1993). De la même manière, la nature et l'adsorption des protéines sur la surface des biomatériaux dépendent de l'énergie de surface et des propriétés hydrophilliques ou hydrophobiques du matériau (Andrade et Hlady. , 1986).

Implants	Applications
Implants cardiovasculaires	valves cardiaques pacemaker
Implants plastiques et reconstruction	reconstruction ou augmentation du sein reconstruction maxillofaciale
Prothèses orthopédiques	genou hanche
Ophthalmique	lentille de contact lentille intraoculaire
Implants dentaires	
Implant neural	implant cochléaire
Application extracorporelle	dialyse
Catheters	
Chirurgie	points de sutures, agrafes, adhésifs
Libération contrôlée de médicaments	enrobage de comprimés ou capsules système transdermique microcapsules

**Tableau 1.1:** Exemples d'applications de biomatériaux dans divers domaines. Tiré de Loty et coll., 1998.

### **1.3 Utilisation des biomatériaux**

Dans la section suivante nous présenterons un aperçu des principaux matériaux utilisés de nos jours. Ils recouvrent en grande partie la gamme des matériaux existants soient les métaux, les céramiques et les polymères.

Les métaux, la plupart du temps utilisés sous forme d'alliage, sont les constituants principaux des prothèses articulaires. Il existe trois grandes catégories d'alliages utilisés en orthopédie : les aciers inoxydables, les alliages cobalt-chrome et les alliages à base de titane (Williams, 1981b).

#### **1.3.1 Aciers inoxydables**

Les aciers inoxydables sont des alliages dont l'élément principal est le fer. Seuls, sont utilisés les aciers austéniques résistants à la corrosion. Ils ont une composition déterminée de 16 à 19% de chrome, métal qui confère au fer, par création d'un film de passivation d'oxyde de chrome, une excellente résistance à la corrosion. Le nickel (12 à 16%), renforce la résistance à la corrosion en stabilisant le chrome et en diminuant la dureté de l'alliage. Le molybdène (2 à 4 %) évite la formation de ferrite à l'état libre. Lorsque l'acier contient 0.08% de carbone (acier dit 316 variété A), il possède de bonnes propriétés mécaniques, mais sa résistance à la corrosion est médiocre, car des précipités de carbone peuvent se créer entre les grains. Cet acier peut convenir pour la fabrication d'implants temporaires. En outre, l'acier dit 316 L, de teneur égale à 0.03% de carbone, possède de bonnes propriétés. Il est résistant mécaniquement et chimiquement et sa faible teneur en carbone élimine les facteurs de contamination des dérivés de carbone (Williams, 1981b).

### 1.3.2 Alliages à base de cobalt-chrome

Leur utilisation en orthopédie fait suite aux résultats obtenus par les odontologues dans la fabrication des prothèses dentaires. Ils sont bien tolérés, très durs et peu déformables. Ils peuvent être coulés ou forgés (Cook et coll., 1985; Brune et coll., 1984). Les alliages coulés sont caractérisés par une forte proportion de cobalt, de chrome et de carbone. Tandis que les alliages forgés comprennent du cobalt, du chrome, du tungstène, du molybdène et du nickel.

### 1.3.3 Le titane et les alliages au titane

Le titane est un matériau de premier choix grâce à ses propriétés biologiques acceptables pour l'os, sa forte résistance à la corrosion, l'absence d'hypersensibilité marquée, d'allergie ou de réactions immunologiques importantes. Sa biocompatibilité est particulièrement adaptée à la réalisation de pièces hautement performantes. Son utilisation s'est portée vers la chirurgie orthopédique, la chirurgie endovasculaire, et le domaine odontologique. Le titane peut exister sous deux formes qui se différencient par la nature du réseau cristallin. Il peut cristalliser dans le système hexagonal, c'est la forme la plus stable à température ambiante. Il peut également cristalliser dans le système cubique centré, c'est la forme qui existe aux températures élevées (Quinquis et coll., 1993).

Les alliages de titane dont l'alliage normalisé contenant 6% d'Aluminium et 4% de Vanadium ( $Ti_6 Al_4 V$ ) sont généralement employés (Williams, 1981b). Les propriétés de surface sont déterminées par la couche d'oxydes (formée principalement de  $TiO_2$ ) qui se crée spontanément à la surface au contact de l'air (1nm en moins d'une milliseconde) (Kasemo, 1983). L'épaisseur de cette couche d'oxyde peut varier de 5 à 10 nm (Sutherland et coll., 1993; Sundgren et coll., 1986) et peut augmenter, une fois le matériau inséré dans le corps, jusqu'à 40 nm tout en incorporant des substances organiques et inorganiques (P, Ca, S) (Larsson et coll., 1994; Hanawa et Ota, 1991). Le

taux de croissance de ce film lorsqu'exposé à une solution aqueuse, est de l'ordre de 2 à 4 nm/V sous un courant de corrosion constant de  $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (courant qui permet une mesure électrique directe du jeu ionique qui s'établit depuis la surface de l'échantillon métallique vers la solution) (Hurlen et Hornkjol, 1991). Le titane possède une constante diélectrique élevée de 50 à 120 (Toth et coll., 1985) qui permet la formation de liens électrostatiques (Tengvall et Lundstrom, 1992). Les oxydes dont la constante diélectrique est élevée sont dits plus biocompatibles que ceux avec une constante diélectrique basse. Ce phénomène se base sur l'hypothèse que des oxydes à constante diélectrique élevée ont la possibilité de pouvoir retarder les mouvements des cellules vers la surface des implants et qu'ils causent moins de dénaturation des protéines (Anderson et coll., 1990).

Il n'existe pas de matériaux complètement inertes, tous provoquent une réponse aussi minime soit-elle. Le titane n'est pas à l'abri d'une certaine corrosion (Tengvall et coll., 1989). Cela a pour conséquence de voir s'altérer, à plus ou moins longue échéance, la couche de passivation naturelle qui perd ses propriétés protectrices ne s'opposant plus, dès lors, au relargage de produits de dégradation dans l'environnement tissulaire. Selon Brune et coll., (1982), les oxydes à la surface du titane sont sous forme d'aiguilles microscopiques qui peuvent se briser et passer en solution *in vivo*. Tout facteur mécanique tel que frottements, abrasions, contraintes pouvant arracher cette pellicule protectrice, favorise les phénomènes de corrosion du titane.

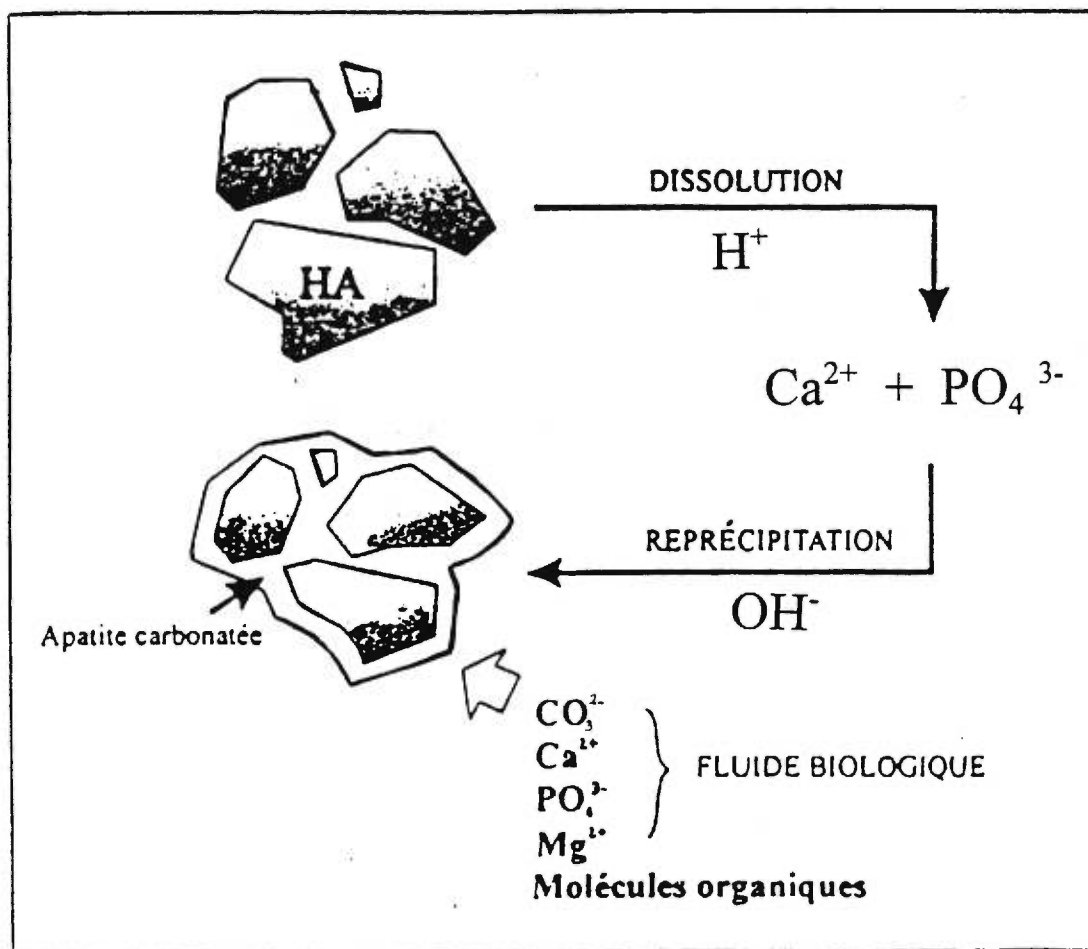
Les traitements de surface subis par les implants, leur mode de stérilisation et de conservation influencent notablement la quantité de composés polluants ainsi que l'épaisseur de la couche d'oxyde de titane (Baier et coll., 1984).

#### **1.3.4 Les céramiques**

Les céramiques sont des matériaux inorganiques obtenus par frittage (Hench, 1981). Le frittage est un procédé qui transforme une poudre à de très hautes températures et à une forte pression, en un composé solide par coalescence des grains. Certaines

céramiques sont mécaniquement et chimiquement stables *in vivo*, elles sont dites bio-inertes. D'autres, sont dites bioactives car elles induisent ou modulent les activités biologiques et peuvent être dégradées par les tissus biologiques, ce sont les céramiques en phosphate de calcium. Elles peuvent se présenter sous forme massive ou poreuse. Des pores interconnectés de quelques centaines de microns de diamètre, offrent au tissu osseux une architecture à l'intérieure de laquelle la colonisation osseuse peut avoir lieu (de Groot, 1988). Les matériaux qui servent ainsi d'initiateur à l'ostéogenèse, sont dits ostéoconducteurs. Les céramiques en phosphate de calcium ont pour chef de file le phosphate tricalcique et l'hydroxyapatite (HA). Elles sont des candidates idéales comme matériaux substitutifs.

Lorsque l'hydroxyapatite se trouve placée dans un fluide biologique ou dans un site opératoire d'implantation, donc inflammatoire et plus acide, une attaque en surface du matériau par des protons  $H^+$  provoque une dissolution partielle des macrocristaux du matériau (De Lange et coll., 1990). Cette réaction se traduit par une augmentation des concentrations en ions calcium et phosphate dans le milieu environnant. Cette sursaturation en calcium et phosphate produit par la suite, à la surface du matériau, une reprécipitation de microcristaux d'apatite qui incorporent, entre autres, des ions de calcium  $Ca^{2+}$ , magnésium  $Mg^{2+}$ , carbonate  $CO_3^{2-}$ , phosphates  $HPO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$  ainsi que des molécules organiques du fluide environnant. Ces phénomènes de dissolution-reprécipitation aboutissent à la formation, en périphérie du matériau, d'une couche d'apatite carbonatée très proche du minéral osseux de par sa composition chimique et sa structure (De Bruijn et coll., 1992) (Figure 1.1).



**Figure 1.1** : Schéma des phénomènes de dissolution-reprécipitation *in vivo* à la surface de l'hydroxyapatite. Adapté de Loty et coll., 1998.

### **1.3.5 Les polymères**

Les polymères synthétiques comprennent de très nombreux composés. La gamme d'utilisation potentielle est très large et recouvre des objectifs aussi divers que des matrices pour la libération de médicaments, du matériel d'ostéosynthèse résorbable, des revêtements d'implants, ... (Pulapura et Kohn, 1992).

## **1.4 Classification des biomatériaux implantés en site osseux**

Les biomatériaux implantés peuvent être biotolérants, bio-inertes ou bioactifs selon leur comportement dans le tissu osseux (Figure 1.2) (Neo et coll., 1992a,b).

### **1.4.1 Matériaux biotolérants**

Les matériaux biotolérants sont incorporés dans l'os, mais à distance du tissu osseux, avec la formation d'un tissu fibreux s'interposant entre le matériau et le tissu osseux néoformé (exemples: le polyméthylméthacrylate) (Pulapura et Kohn., 1992).

### **1.4.2 Matériaux bio-inertes**

Les matériaux bio-inertes n'induisent aucune réaction sur les tissus environnants et inversement, ne subissent aucune dégradation de la part de ces tissus. De tels matériaux ne provoquent pas la formation de tissu fibreux interfacial, mais permettent un contact osseux sans liaison chimique directe avec le tissu néoformé (exemple : l'alumine ou le titane) (Nanci et coll., 1994).



### **1.4.3 Matériaux bioactifs**

Un matériau bioactif est un matériau destiné à une fonction biologique spécifique. Il comprend essentiellement des biomatériaux destinés à être implantés dans le tissu osseux en implantologie orale ou en orthopédie. La bioactivité d'un matériau se définit par sa propriété à réaliser une liaison chimique avec les tissus environnants, sans interposition d'une couche fibreuse. Les matériaux bioactifs implantés en site osseux peuvent être résorbables ou à surface réactive (Wilson et Low., 1992).

#### **1.4.3.1 Matériaux résorbables**

Après implantation dans le tissu osseux, le matériau résorbable disparaît progressivement par phagocytose, par dissolution chimique ou par l'action d'ostéoclastes et est remplacé par du tissu osseux. La vitesse de résorption doit être similaire à la vitesse de formation du tissu osseux afin d'obtenir une stabilité entre l'interface du biomatériau résorbé et le tissu hôte. Les éléments libérés au cours de la résorption du matériau doivent être biocompatibles et pouvoir être assimilés par l'organisme. C'est pourquoi les céramiques résorbables contiennent essentiellement des phosphates et du calcium. Exemples: le phosphate tricalcique  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , le carbonate de calcium  $\text{CaCO}_3$  (sous la forme de corail), le sulfate de calcium, ou les revêtements de phosphate de calcium sur du titane (Klein et coll., 1983).

#### **1.4.3.2 Matériaux à surface réactive**

Les matériaux à surface réactive permettent la formation d'une liaison chimique directe entre la surface du matériau et le tissu osseux par l'intermédiaire d'une couche d'apatite, le coeur du matériau restant intact. Ce sont donc des matériaux non résorbables, destinés à rester au site osseux. C'est la raison pour laquelle les qualités biologiques

chimiques et mécaniques de la liaison obtenue à l'interface os-implant sont primordiales pour assurer la pérennité de l'implant. Exemple, l'hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , ou les matériaux composites (céramique-métal et polymère-céramique) (Kokubo et coll., 1990 ; Van Blitterswijk et coll., 1985 ; Sautier et coll., 1991).

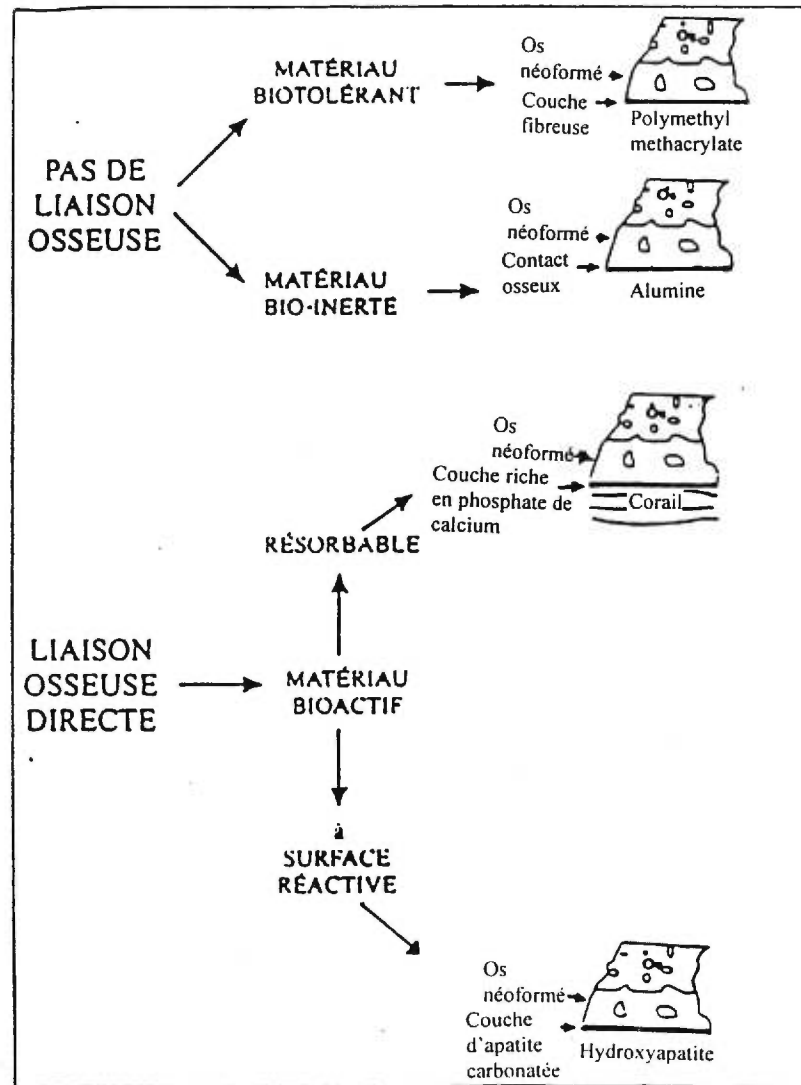


Figure 1.2: Description des différentes interfaces possibles suivant le biomatériau implanté utilisé. Adapté de Loty et coll., 1998.

## 1.5 Réactions de l'organisme

### 1.5.1 Réactions locales

Différentes réactions tissulaires se produisent au site d'implantation. Parmi les plus importantes nous retrouvons la réponse inflammatoire. Cette dernière permet de débarrasser les tissus endommagés des débris cellulaires ou de l'agent responsable de l'agression. La réponse inflammatoire locale regroupe les changements vasculaires ainsi que l'apparition des médiateurs de l'inflammation et l'activation des cellules phagocytaires (Williams, 1981b).

Parmi les cellules impliquées dans la réponse inflammatoire nous retrouvons les macrophages (Tang et Eaton, 1994; Wataha et coll., 1995). Ils phagocytent les débris cellulaires et moléculaires et séquestrent ou détoxifient les matériaux toxiques (Chambers, 1981). Si la taille d'un corps étranger est inférieure à celle d'une cellule, les macrophages agissent par phagocytose. Par contre, si elle est supérieure, ils adhèrent à la surface de l'élément agresseur (Ikada, 1994).

Dans un nombre appréciable de cas d'implants (Goodman et coll., 1990; Williams, 1981a,b), on note un tissu réactionnel. Ce dernier est d'autant plus épais que l'implant est mobile. La présence dans le tissu de cellules aplaties dans le cas favorable ou de cellules arrondies (de type macrophagique), voire nécrotique en cas d'intolérance nous renseigne sur la biocompatibilité du matériau (Meachim et Pedley, 1981; Peppas et Buri, 1985). Cette réaction tissulaire est également fonction de l'état de surface de l'implant. Une surface polie induit la formation d'une couche de tissu fibreux d'interposition. Par contre, ce tissu est pratiquement absent en présence d'implants rugueux ou poreux (Albrektsson et coll., 1983; Cochran et coll., 1994; de Bruin, 1981).

### 1.5.2 Réactions générales

Elles sont rares et se résument aux réactions allergiques. Elles sont provoquées surtout par le chrome, le nickel et le cobalt. Le titane ne provoque qu'exceptionnellement une réaction de ce type (Quinquis et coll., 1993). La manifestation la plus classique est l'eczéma (Swanson et coll., 1973). Par précaution, il est donc conseillé d'utiliser les alliages non allergisants tels que les aciers inoxydables ou le titane.

### 1.5.3 Hypersensibilité et toxicité

On se rappelle que les phénomènes immuno-allergiques concernent l'immunité humorale et l'immunité cellulaire. L'immunité humorale donne naissance à des réactions aiguës, avec la médiation de lymphocytes B. L'immunité cellulaire est à l'origine de rejets chroniques et nécessite la présence de lymphocytes T (Remes et Williams, 1992). L'hypersensibilité des biomatériaux a été évoquée par Molvig et coll., (1988), car ils ont observé des lésions ischémiques entourées d'un tissu dense autour de prothèses orthopédiques (Hanawa et coll., 1992; Merritt et Rodrigo, 1996; Wooley et coll., 1996).

Les métaux libèrent dans l'organisme des ions métalliques qui en s'y dissolvant forment des complexes métallo-protéiques. Ces complexes se fixent aux cellules des tissus en contact et perturbent leur métabolisme enzymatique (Salthouse et Matlaga, 1981; McNamara et Williams, 1984). La libération d'hydrolases lytiques atteint les cellules environnantes et entraîne une dissolution de la matière extracellulaire. Les ions métalliques libérés au contact de l'implant, passent dans la circulation générale et sont retrouvés dans d'autres organes. La rate tend à accumuler le chrome, le cobalt, le titane, le nickel, le fer et l'aluminium; le poumon et le rein, le cobalt et le nickel (Williams, 1981b).

## 1.6 Concept d'ostéo-intégration

Le terme d'ostéo-intégration (en anglais osseointegration) est utilisé pour décrire un phénomène de biocompatibilité propre au titane (Branemark et coll., 1983; Albrektsson et coll., 1983). Ce phénomène se caractérise, en microscopie optique, par un état de contact direct avec absence de tissus mous à l'interface implant-os vivant (Albrektsson et Jacobsson, 1987). Le but de l'ostéo-intégration des implants orthopédiques est l'atteinte rapide et sûre d'une stabilité mécanique, à long terme, entre l'os vivant et la surface de l'implant.

Il est à noter, en outre, qu'une surface microporeuse réceptive au dépôt osseux permet l'ostéo-intégration. Elle alimente la régénération osseuse dans la première phase de cicatrisation, augmente le taux de contact entre l'os et l'implant et améliore l'ancrage de l'implant (Buser et coll., 1991; Wilke et coll., 1990). Les tests de résistance au cisaillement à l'interface implant-os mettent en évidence le degré d'ostéo-intégration. L'étude de Carlsson et coll., (1988) porte sur la résistance de l'interface selon la rugosité de surface des implants en titane. Celle de Gerner et coll., (1988) porte sur des implants recouverts de phosphate tricalcique. Cook et coll., (1987), de Groot et coll., (1987) et Thomas et coll., (1987) mesurent la résistance des interfaces des implants recouverts d'hydroxyapatite à des intervalles réguliers après cicatrisation. Ces nombreuses études permettent de conclure que le contact direct à l'interface implant-os peut être obtenu si le choix de l'implant est judicieux et la chirurgie adéquate.

Le succès d'un biomatériau dépend en effet des caractéristiques de l'implant, des conditions d'implantation, mais aussi des qualités du tissu récepteur. L'implant est souvent mis en place sur un os non pathologique, mais il induit également, par lui-même, des modifications du remodelage et des adaptations mécaniques.

## 1.7 Influence des propriétés de surface des biomatériaux

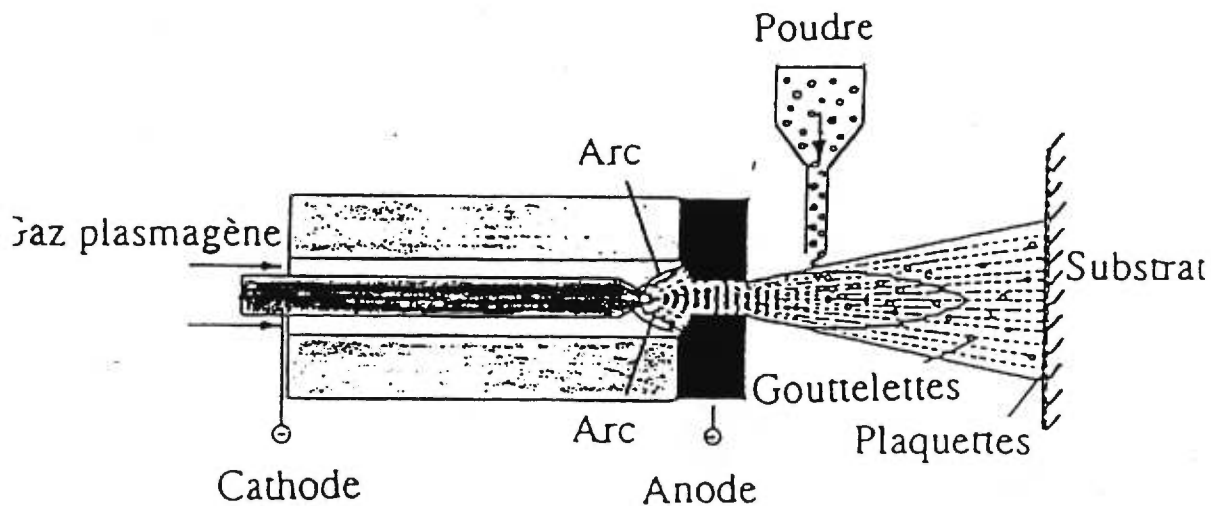
Les propriétés de surface des biomatériaux sont importantes. Ainsi, plusieurs études *in vivo* (Thomas et Cook., 1985; Bowers et coll., 1992; Buser et coll., 1991; Carlsson et coll., 1988) ont démontré que les surfaces rugueuses induisent la formation d'os tandis que les surfaces lisses tendent vers la formation d'une surface fibreuse. Ceci est probablement dû, en partie, à la différence de surface de contact (Gray et coll., 1996).

De nombreuses recherches ont été menées pour l'obtention d'une apposition plus rapide et plus résistante des implants à l'os (Wennerberg et coll., 1995; 1996a; Ong et coll., 1996). Plusieurs méthodes ont été proposées pour augmenter la rugosité des matériaux tels le sablage ou le revêtement avec diverses substances (Ko et coll., 1993). Wennerberg et coll., (1996b) ont obtenu une meilleure adhésion du tissu osseux sur des implants en titane pur sablés (avec des particules de 25 et 75 $\mu\text{m}$  d' $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) par rapport à des implants plus lisses vissés 12 semaines dans le tibia du lapin.

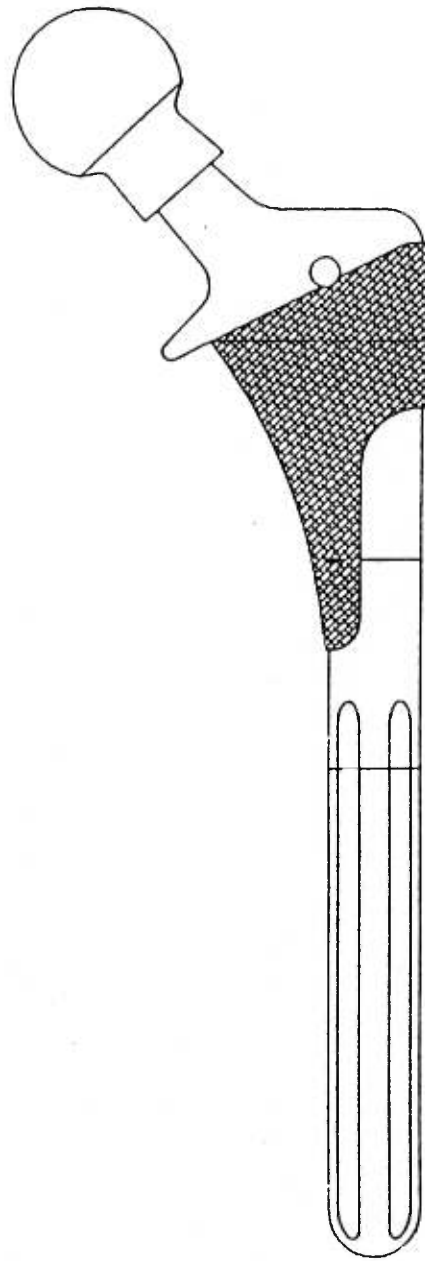
### 1.7.1 Procédé plasmatique

Parmi les méthodes employées pour augmenter la rugosité d'une surface, nous retrouvons celle du procédé plasmatique (Figure 1.3). Cette méthode permet d'altérer la surface physique et les propriétés chimiques sans toutefois changer les propriétés de masse du matériau (Johnson et coll., 1992). C'est une méthode rapide, efficace, économique et versatile répondant aux problèmes de chimie et d'adhésion de la surface. Le plasma est un gaz ionisé par décharge électrique et composé d'ions, d'électrons, de radicaux libres et d'espèces neutres. Il rend les particules très réactives chimiquement ce qui leur permet de se déposer en couches minces sur divers supports de plastique, de papier ou de métal (Figure 1.4). La structure observée en microscopie à balayage montre une surface globulaire (Figure 1.5). Cet état peut être créé par diverses techniques telles

que la flamme, des décharges électriques, un faisceau d'électrons, ou des lasers (Figure 1.3). Les plasmas sont considérés comme un quatrième état de la matière après les états solide, liquide et gazeux (Nicholson, 1983). La méthode plasmatique est largement utilisée dans l'industrie des polymères afin d'altérer l'hydrophobicité et la charge des surfaces. Le traitement au plasma effectué par Sipehia (1989) a permis de greffer des groupements aminés sur du polystyrène provoquant l'augmentation de la tension superficielle de la surface mais aussi la charge positive du substrat. Cette modification a entraîné une augmentation des forces d'adhésion entre le matériau et les cellules en culture. D'autres expériences ont permis d'augmenter l'énergie de surface de matériau avec l'incorporation de molécules d'oxygène dans le gaz utilisé (Haque et Ratner., 1986).

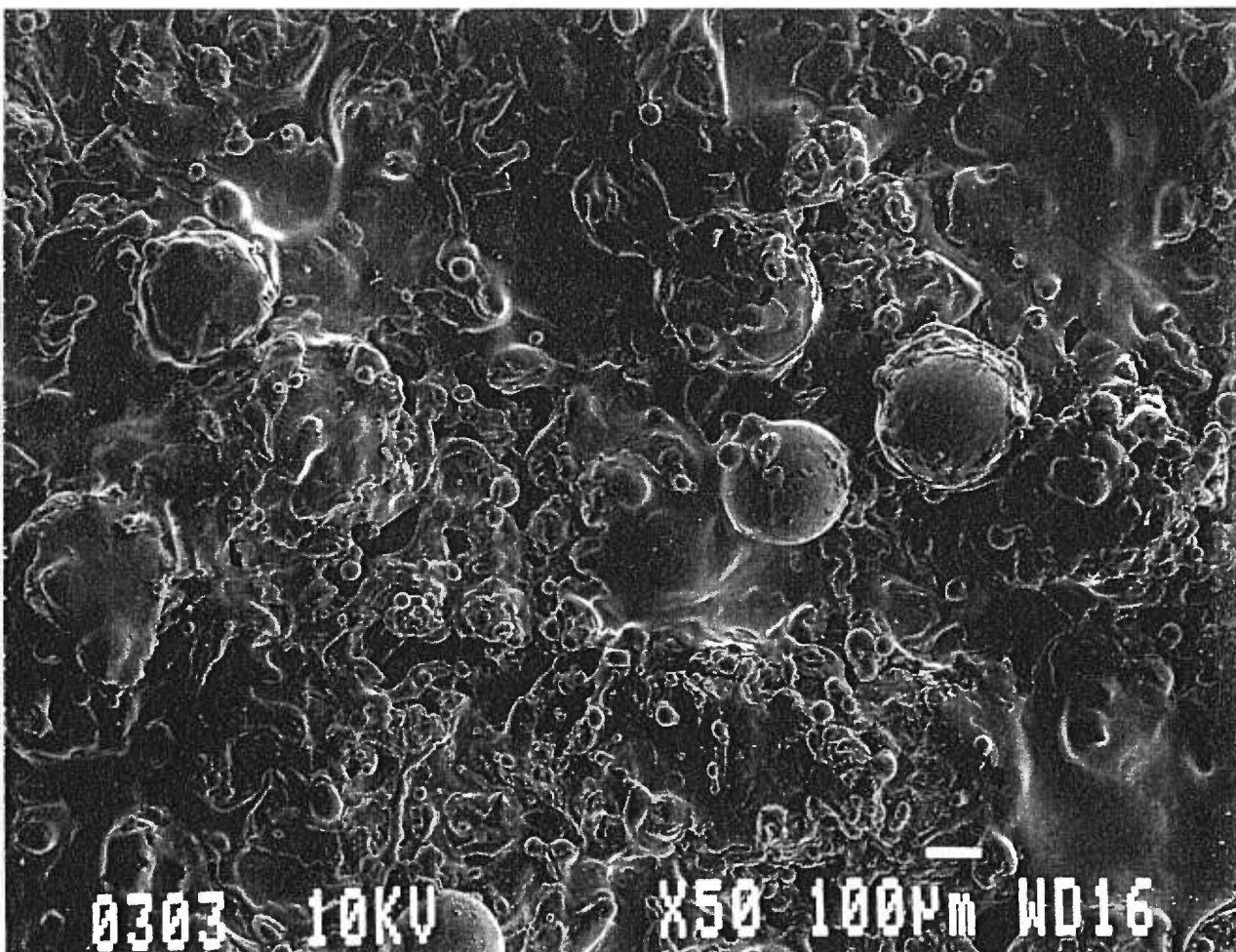


**Figure 1.3:** Torche à plasma. L'implant recouvert par une projection de titane, le gaz du plasma (argon et hydrogène) est modifié en une flamme à plasma rapide avec température élevée (plus de 15000 °C), les particules de titane (de 0.05 à 1 mm de diamètre) jetées en pluie devant la flamme sont portées à température de fusion et adhèrent à la surface du titane. La vitesse de projection du gaz est proche de 3000 m/s et celle des particules de titane en fusion de l'ordre de 600 m/s. Tiré de Nicholson, 1983.



**Figure 1.4:** Implant de la hanche. Treillis pointillés formés de particules de titane déposées par la méthode des plasmas. L'utilisation de particules de titane, outre leur excellente biocompatibilité, permet à l'implant de mieux s'intégrer dans le corps. Cette intégration est due à l'augmentation de la rugosité de surface qui entraîne la formation de tissu fibreux plus rapidement qu'une surface lisse. Tiré de Dujovne et coll., 1993.





**Figure 1.5:** Surface obtenue par le procédé plasmatique. On observe souvent cet aspect globulaire. Surface où des particules de cobalt-chrome ont été déposées sur un substrat de cobalt-chrome. Microphotographie obtenue par microscopie électronique à balayage (SEM-JEOL JSM-820 GW-Electronics Inc, Norcross GA) avec un grossissement 50X.

La composition chimique, l'énergie de surface, la rugosité et la topographie sont les facteurs qui déterminent principalement la réponse biologique (Figure 1.6).

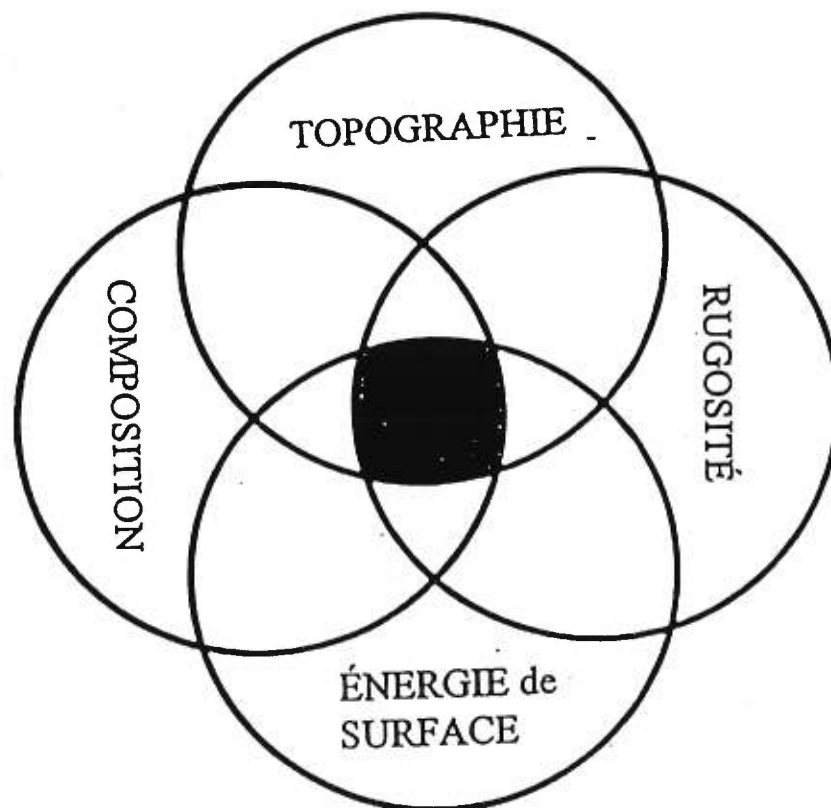
### **1.7.2 La composition chimique**

Le processus chimique peut affecter directement l'adsorption des composés du sérum dont la fibronectine. La liaison de cette protéine est quasi-instantanée, elle permet l'attachement et l'étalement cellulaire sur des substrats artificiels par interaction avec des glycosaminoglycans et le cytosquelette (Collis et Embery, 1992). Ce conditionnement de la surface implique aussi l'adsorption d'ions métalliques qui eux peuvent altérer les capacités liantes des protéines sériques (McNamara et Williams, 1984).

### **1.7.3 L'énergie de surface**

L'énergie libre de surface est le résultat des forces d'attractions inter-atomiques rencontrées entre les atomes d'un solide. Le phénomène de mouillabilité de surface est un des principaux mécanismes de l'interaction cellule-substrat responsable de l'adsorption de protéines (Yanagisawa et coll., 1989). La mouillabilité d'une surface est largement dépendante de l'énergie de surface et influence le degré de contact avec l'environnement physiologique (van Kooten et coll., 1992; van Wachem et coll., 1987). Une augmentation de la mouillabilité permet une meilleure incorporation de l'implant dans le milieu biologique. Ces propriétés sont donc capables d'influencer l'habilité et le degré d'adhésion des cellules (Dexter, 1979; Baier et coll., 1968; Schrader, 1982; Baier et coll., 1984). L'étude de Grinnel (1973) démontre une adsorption plus élevée de fibroblastes sur des surfaces hydrophiles. Les protéines adhésives telles que la fibronectine et la vitronectine sont influencées par la nature des surfaces des matériaux et peuvent augmenter l'adsorption de cellules sur ces mêmes surfaces (Pettit et coll., 1994).

L'étalement des cellules sur des biomatériaux dépend également de l'énergie libre de surface du substrat. Cet étalement est supérieur sur des surfaces à haute énergie libre (Uyen et coll., 1990). Ce phénomène peut s'expliquer soit par les changements de conformation des protéines adsorbées, soit par adsorption sélective de protéines spécifiques du liquide biologique, soit par agglutination ou par tous ces facteurs réunis (Healy et coll., 1996; Andrade et Hlady., 1986). Par exemple, l'albumine adsorbée sur le téflon, le polystyrène et le polycarbonate démontre une structure de surface en réseau tandis qu'un film continu apparaît sur du carbone ou du mica (Uyen et coll., 1990).



**Figure 1.6:** Les composantes essentielles qui déterminent la réponse biologique des implants sont la composition chimique, l'énergie de surface, la rugosité et la topographie.

### 1.7.3.1 Méthode de l'angle de contact

En 1805, Thomas Young a fait une observation qualitative illustrée à la figure 1.7. Si l'on considère une goutte d'un liquide en contact avec une surface plane et solide, trois phases sont alors observées: la phase solide, la phase liquide et la phase vapeur. Il y a trois interfaces: l'interface solide-liquide, l'interface liquide-vapeur et l'interface solide-vapeur. L'angle de contact  $\theta$ , est l'angle formé par les plans tangentiels aux interfaces liquide-vapeur et solide-liquide. Cet angle peut s'observer à l'aide d'un goniomètre (Figure 1.8) (Adamson, 1990; Israelachvili, 1992).

La relation entre les trois tensions interfaciales et l'angle de contact est connue sous le nom de relation de Young et fut établie par Dupré en 1869:

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cos\theta \quad (\text{équation 1.1})$$

où  $\gamma_{sv}$  est la tension interfaciale solide-vapeur,  $\gamma_{sl}$  est la tension interfaciale solide-liquide et  $\gamma_{lv}$  est la tension interfaciale liquide-vapeur.

Subséquemment, Dupré définit le travail d'adhésion réversible par unité de surface entre deux matériaux,  $W_a$ , comme étant la perte en énergie totale du système à l'interface.

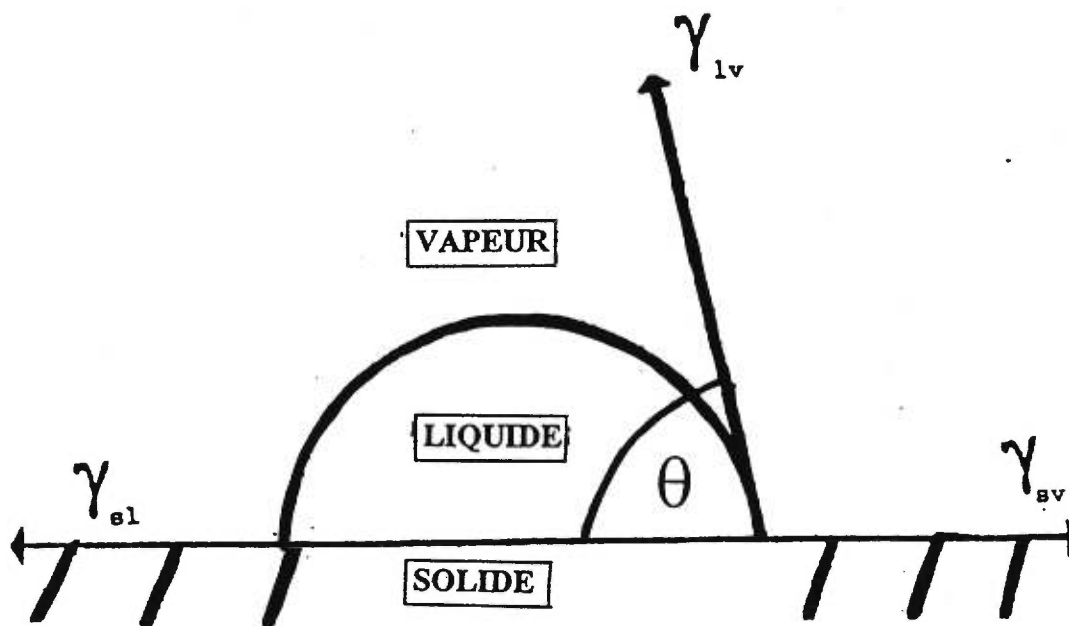
$$W_a = \gamma_s + \gamma_l - \gamma_{sl} \quad (\text{équation 1.2})$$

où  $\gamma_l$  est la tension interfaciale du liquide,  $\gamma_s$  est la tension interfaciale du solide et  $\gamma_{sl}$  est la tension interfaciale solide-liquide.

En combinant les équations 1.1. et 1.2 on peut écrire :

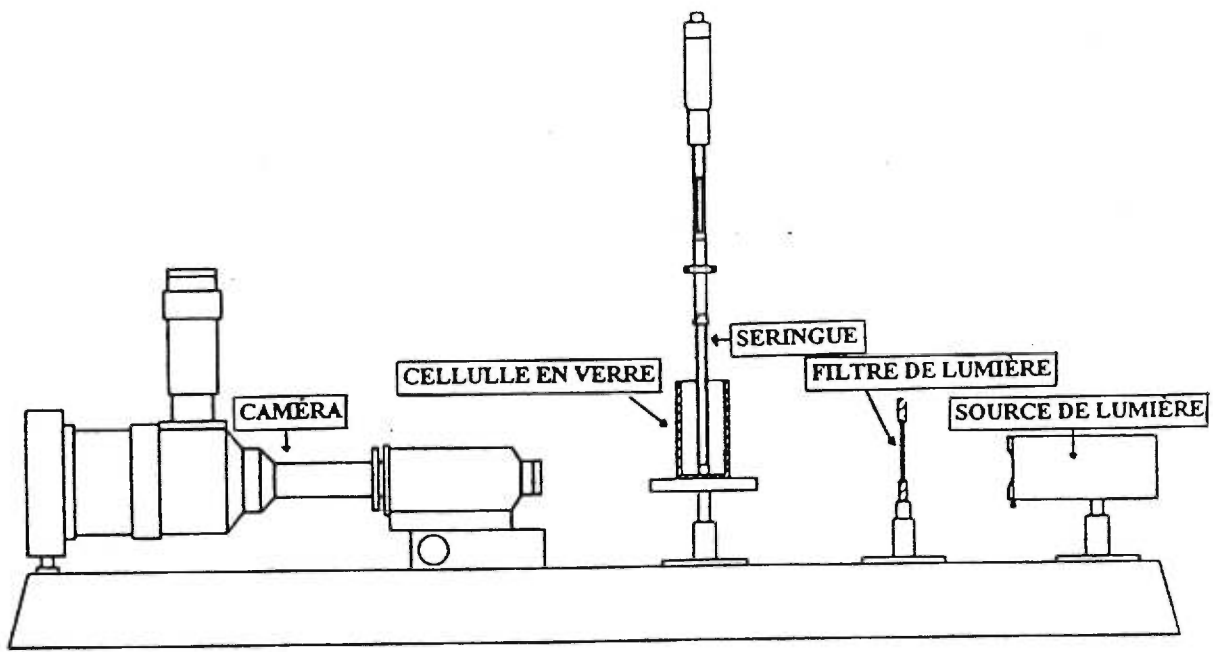
$$W_a = \gamma_l (1 + \cos\theta) \quad (\text{équation 1.3})$$

Cette relation est connue sous le nom de l'équation de Young-Dupré.



$$\gamma_{sv} - \gamma_{sl} = \gamma_{lv} \cos \theta$$

**Figure 1.7:** Mesure de l'angle de contact. Les composantes de la tension de surface sont en équilibre autour de la goutte liquide sur une surface plane.  $\gamma_{lv}$ ,  $\gamma_{sv}$  et  $\gamma_{sl}$  constituent respectivement la tension interfaciale liquide-vapeur, solide-vapeur et solide-liquide. L'angle  $\theta$  est formé par les plans tangentiels aux interfaces liquide-vapeur et solide-liquide.



**Figure 1.8:** Méthode du goniomètre, appareil permettant la mesure de l'angle de contact. Une goutte de liquide est déposée sur le substrat à l'aide d'une microsiringue. Le volume de la goutte peut varier entre  $4 \mu\text{l}$  à  $10 \mu\text{l}$ . Après un temps de stabilisation, l'angle que la goutte forme entre la phase solide et la phase vapeur est mesuré. L'observation de la goutte est schématisée à la figure 1.7.

Le terme  $\gamma_{lv}$  indique que  $\gamma$  est déterminée quand le liquide est en équilibre avec sa vapeur. Étant donné que l'adsorption de sa propre vapeur ne modifie pas l'énergie de la surface du liquide,  $\gamma_{lv}$  est égale à  $\gamma_l$ , la tension de surface d'un liquide en équilibre avec le vide (ou l'air). De plus, on fait l'approximation que  $\gamma_{sv} = \gamma_s$ . La tension superficielle du liquide  $\gamma_l$ , est identifiable expérimentalement avec un tensiomètre avec anneau de Nouy. Cette méthode utilise la force nécessaire pour retirer un anneau très mince de platine d'un liquide afin de pouvoir déterminer la tension de surface du liquide. Par contre, pour le calcul de  $\gamma_s$ , on a besoin de la valeur de  $\gamma_{sl}$  dans l'équation 1.2. Plusieurs approximations ont été proposées pour évaluer ce terme (Neumann et coll., 1974; Kaelble et coll., 1974) la meilleure étant :

$$\gamma_{sl} = \gamma_s + \gamma_l - 2(\gamma_s^d \gamma_l^d)^{1/2} - 2(\gamma_s^p \gamma_l^p)^{1/2} \quad (\text{équation 1.4})$$

où l'indice  $d$ , indique la composante dispersive (non polaire) et l'indice  $p$ , la composante polaire de la tension superficielle et (Adamson., 1990):

$$\gamma = \gamma^p + \gamma^d \quad (\text{équation 1.5})$$

L'utilisation de l'équation 1.4 dans l'équation 1.2 conduit à:

$$W_a = 2(\gamma_s^d \gamma_l^d)^{1/2} + 2(\gamma_s^p \gamma_l^p)^{1/2} \quad (\text{équation 1.6})$$

Posons que  $\gamma^d = \alpha$  et  $\gamma^p = \beta$ . L'équation 1.6 s'écrit comme suit:

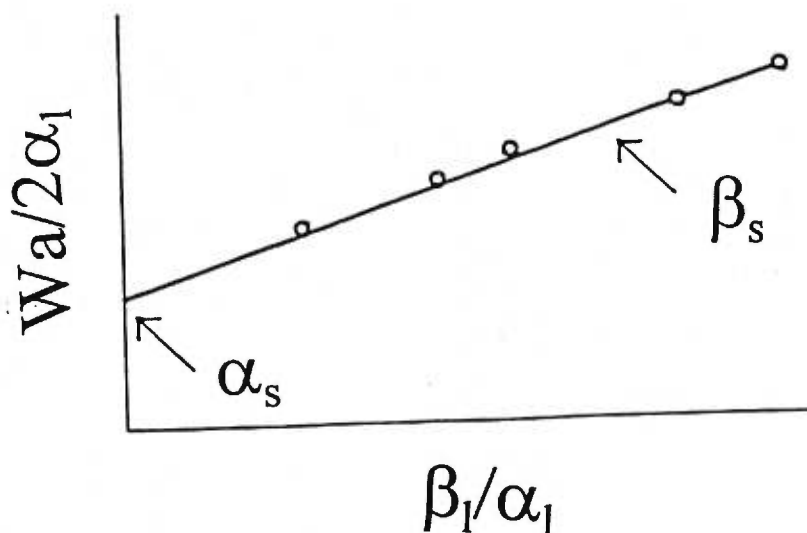
$$W_a = 2(\alpha_s \alpha_l)^{1/2} + 2(\beta_s \beta_l)^{1/2} \quad (\text{équation 1.7})$$

Pour déterminer  $\gamma_s$ , il faut avoir une série de liquides dont les valeurs de  $\alpha_l$  et  $\beta_l$  sont bien connues. Pour chaque liquide, une goutte sur la surface du substrat permet la

détermination de  $W_a$  à partir de l'équation 1.3. Si on écrit l'équation 1.7 sous la forme suivante:

$$W_a / 2\alpha_1 = \alpha_s + \beta_s (\beta_1 / \alpha_1) \quad (\text{équation 1.8})$$

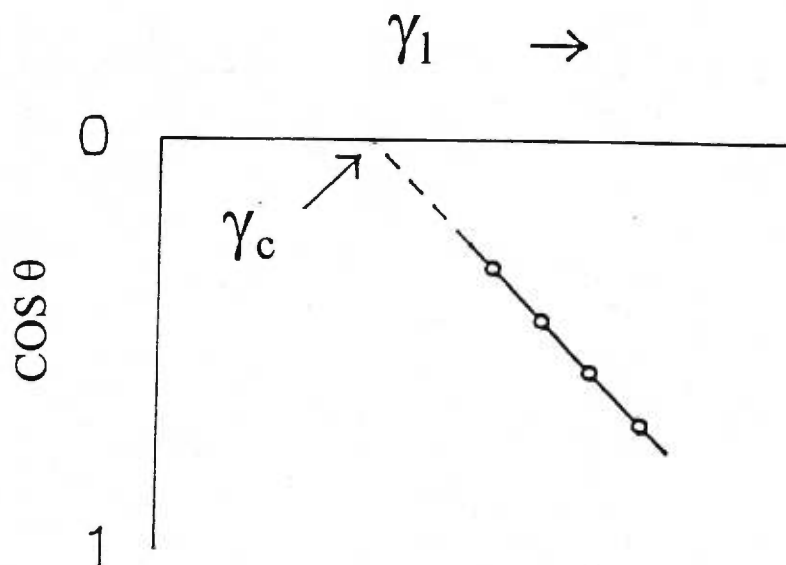
Il est clair alors qu'en traçant  $W_a/2\alpha_1$  en fonction de  $\beta_1/\alpha_1$  on devrait obtenir une ligne droite dont la pente donne  $\beta_s$  et l'ordonnée à l'origine donne  $\alpha_s$  (Figure 1.9). Leurs carrés respectifs sont  $\gamma_s^p$  et  $\gamma_s^d$ , dont la somme donne  $\gamma_s$ . Cette méthode proposée par Kaelble (1974) permet de caractériser  $\gamma_s$  ainsi que les deux composantes polaires et dispersives.



**Figure 1.9:** Graphique de Kaelble des tensions de surface de liquides sur un substrat où  $\beta_s$  est la pente et  $\alpha_s$  est l'ordonnée à l'origine.



Parmi les autres méthodes disponibles, la plus connue est celle de Zisman (1964), où on trace  $\cos \theta$  en fonction de  $\gamma_l$  pour une série de liquides. Une extrapolation à l'abscisse à l'origine donne une valeur de la tension critique de surface,  $\gamma_{crit}$ . Malgré le fait que Zisman montre toujours une ligne droite, on trouve plutôt une ligne courbée ou segmentée. Cette différence est due au fait que Zisman a utilisé une série homologue de liquides, où on garde la même molécule sauf pour un changement continu de substituant (Figure 1.10).



**Figure 1.10:** Graphique de Zisman des tensions de surface d'une série de liquides.  $\gamma_l$  est la tension de surface du liquide et  $\gamma_c$  est la tension de surface critique.

### 1.7.3.2 Surface rugueuse

Lorsqu'il est question de surfaces rugueuses (Eick et coll., 1975), l'angle de contact peut prendre différentes valeurs. Le problème doit alors être approché en terme d'énergie de surface. Wenzel (1936) a décrit l'influence des irrégularités d'une surface solide sur les valeurs de l'angle de contact. Il a exprimé ces résultats dans l'équation suivante, en incorporant le facteur de rugosité,  $r$ .

$$\cos \theta_{\text{rugueux}} = r \cos \theta_{\text{lisse}} \quad (\text{équation 1.10})$$

$r$ : rapport de l'aire réelle de la surface rugueuse sur l'aire de la surface plane idéale. Ce rapport est égal à 1 si la surface est parfaitement lisse. Il est d'autant plus élevé que la surface est rugueuse.

$\theta_{\text{lisse}}$  : angle entre les liquides et la surface idéalement plane du solide.

$\theta_{\text{rugueux}}$ : angle de contact mesuré.

Sur une surface lisse, si l'angle  $\theta$  est inférieur à  $90^\circ$ , une augmentation de la rugosité de surface entraîne une diminution de cet angle et par conséquent une augmentation de l'énergie libre de surface ainsi que de la mouillabilité. Mais si l'angle  $\theta$  est supérieur à  $90^\circ$  alors l'augmentation de rugosité d'une surface lisse, augmente cet angle et le degré de mouillabilité diminue (Zisman, 1964). Ceci a donné lieu à une correction de l'équation de Young et Dupré:

$$r(\gamma_{s1} - \gamma_{s2}) + \gamma_{12} \cos \theta = 0. \quad (\text{équation 1.11})$$

où  $\gamma_{s1}$  est la tension interfaciale solide-liquide,  $\gamma_{s2}$  est la tension interfaciale solide-vapeur et  $\gamma_{12}$  est la tension interfaciale liquide-vapeur.

### 1.7.3.3 Surface hétérogène

Une surface hétérogène se caractérise par une rugosité élevée. Cette rugosité produit une surface poreuse composée de parties solides et de parties d'air ayant des surfaces fractionnaires  $f_s$  et  $f_a$ , respectivement. Dans de tels cas, l'angle de contact observé  $\theta_m$  peut être estimé par l'équation de Cassie-Baxter (Zografi et Johnson, 1984):

$$\cos \theta_m = f_s \cos \theta - f_a \quad (\text{équation 1.12})$$

Des expériences récentes ont démontré que l'étalement d'un liquide sur une surface rugueuse dépend également de l'orientation et de la texture de la rugosité (Zografi et Johnson, 1984). Huh et Mason (1977) ont prouvé, théoriquement, que lorsqu'un front de liquide rencontre un bord pointu, il se colle à ce bord et aucun angle de contact à l'équilibre ne peut être observé. Ceci donne lieu au phénomène décrit par un mouvement discontinue d'une goutte.

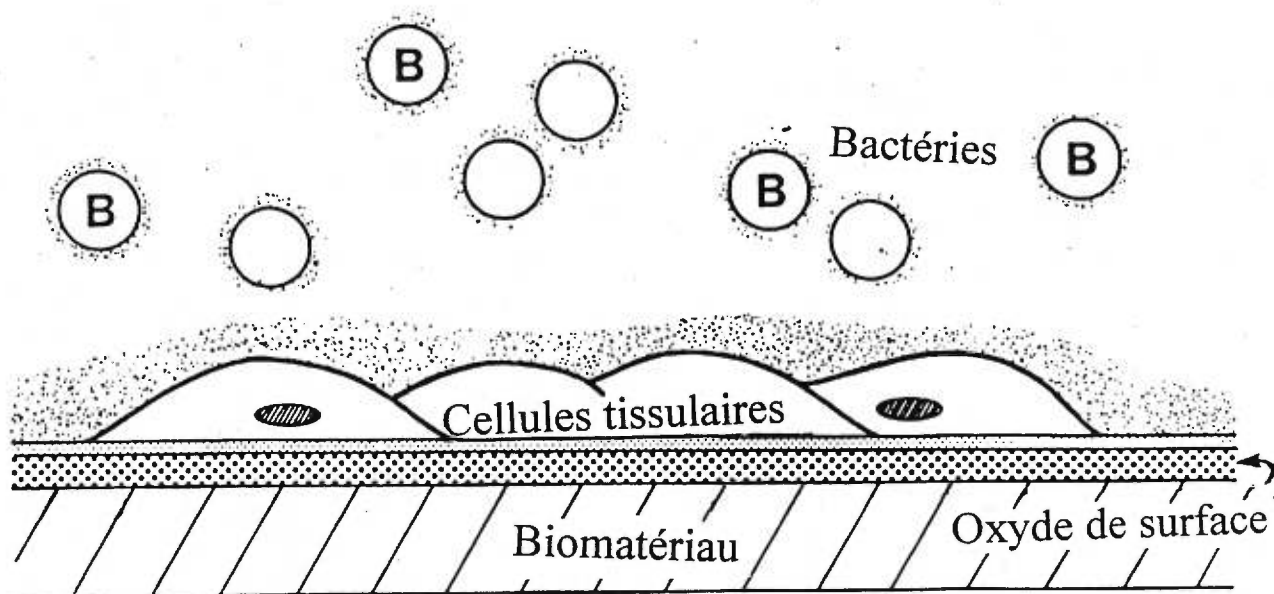
La topographie de surface du substrat peut influencer la cinétique du phénomène de mouillage. Ainsi un liquide formant un angle de contact de moins de  $90^\circ$  avec la surface solide peut s'étaler le long des pores fins, égratignures et autres défauts par action capillaire, même si ce liquide est non mouillable sur une surface plane (Quirynen et Bollen, 1995). La force capillaire permet à un liquide de monter à l'intérieur d'un tube capillaire. Ce phénomène s'observe lorsque les forces d'adhésion entre les molécules du liquide et le mur du capillaire sont supérieures aux forces de cohésion entre les molécules du liquide. On dit alors que le liquide mouille le mur du capillaire et monte. En mesurant la hauteur de montée du liquide on peut déterminer la tension de surface de ce dernier (Adamson, 1990).

#### 1.7.4 La topographie et la rugosité de surface

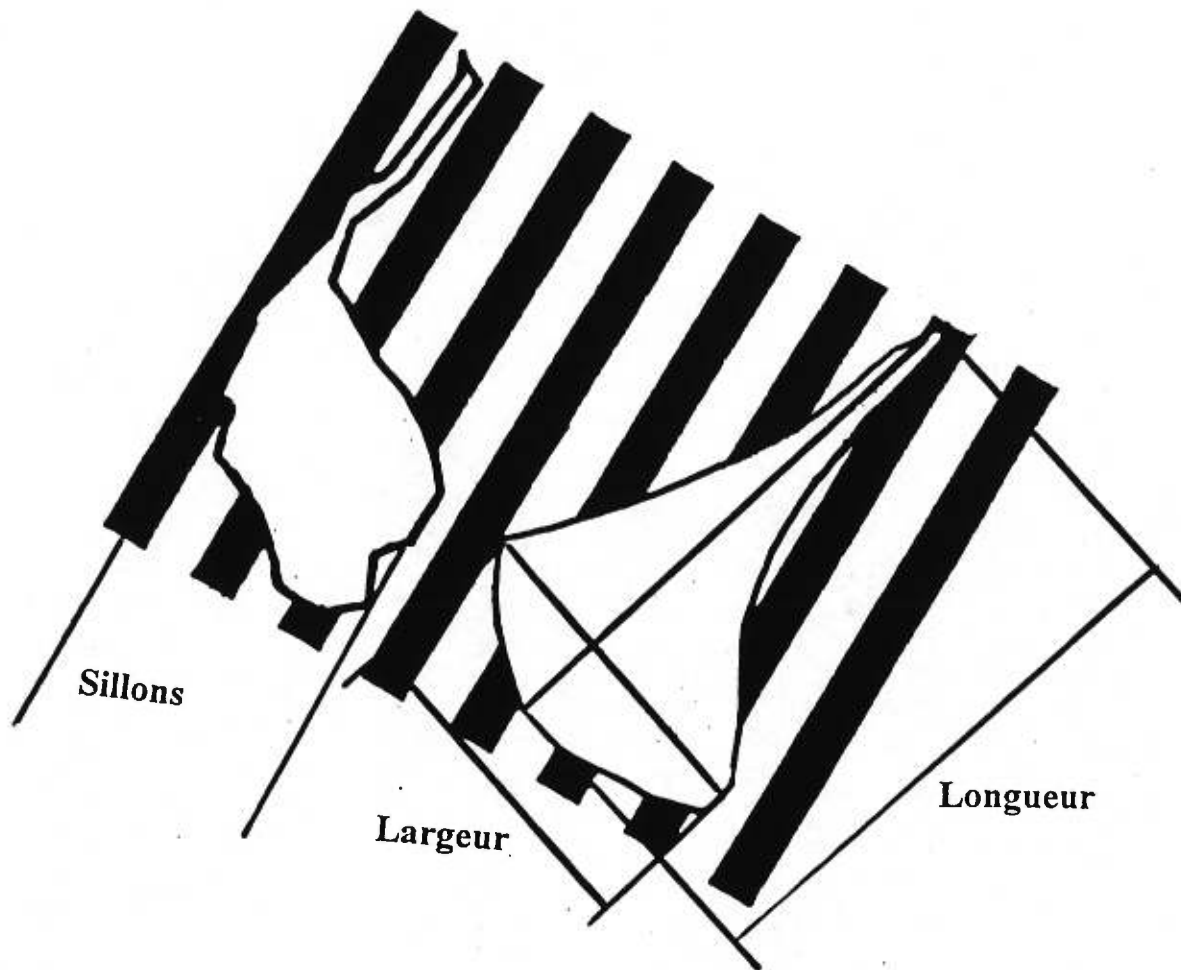
La topographie de surface influence différents aspects de l'interaction implant-tissu (Brunette, 1988). Au niveau macroscopique (échelle supérieure à 10  $\mu\text{m}$ ), la rugosité et la porosité influencent les propriétés mécaniques, la transmission et distribution du stress à l'interface (Albrechtsson, 1983). Tandis que sur une échelle de 10 nm à 10  $\mu\text{m}$ , la topographie est essentiellement impliquée dans les interactions primaires chimiques entre la surface de l'implant et le tissu de l'hôte (Kasemo, 1983; Ratner, 1987). La plupart des métaux sont caractérisés par une mosaïque formée de microcristaux orientés aléatoirement. Ces défauts sont très réactifs et représentent des sites susceptibles d'altérer les protéines ainsi que les réactions cellulaires. Plusieurs études démontrent que les cellules sont capables de réagir à la topographie du substrat. Ces propriétés géométriques de surface imposent des restrictions mécaniques sur les composantes du cytosquelette impliquées dans l'étalement de la cellule et dans sa locomotion (Dunn et Brown, 1986; Keller et coll., 1989; Campbell et van Recum, 1989; Martin et coll., 1995) (Figure 1.11)

Le procédé connu sous le nom de contact guidé décrit des cellules qui utilisent la morphologie du substrat pour s'orienter ou migrer. Les cellules épithéliales et les fibroblastes s'alignent d'elles-mêmes le long des lignes incrustées sur des surfaces en culture (Figure 1.12). Il a été démontré que l'alignement cellulaire est influencé directement par la profondeur des sillons et inversement par l'espacement entre les sillons (Meyle et coll., 1993; 1995). Ces études donnent un aperçu des mécanismes auxquelles les cellules ont recours pour s'adapter aux surfaces. Elles confirment l'hypothèse émise que les propriétés mécaniques du cytosquelette influencent l'alignement cellulaire. L'étude de Meyle et coll., (1995) démontre un alignement par contact cellulaire sur une surface composée de creux de 2 et 5  $\mu\text{m}$ . Ce phénomène d'orientation se décrit par les mouvements des cellules pour atteindre un équilibre biomécanique (Boyan et coll., 1996).

Les cellules osseuses ont également une sensibilité à la morphologie du matériau. Par exemple, les ostéoblastes préfèrent une taille de pore (200-400  $\mu\text{m}$  diamètre) pour favoriser la migration, l'attachement et la prolifération. Ils semblent être plus sensibles à une surface rugueuse et démontrent un attachement initial plus élevé sur ces surfaces (Bowers et coll., 1992).



**Figure 1.11** : L'adsorption des protéines du plasma lors de l'interaction entre le sang et le biomatériau est influencée par les propriétés physico-chimiques de la surface. En plus de la possibilité de l'activation de la cascade de coagulation et du complément, l'adsorption de protéines telles que la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine sur la surface du matériau ont une importance pour les interactions cellules-matériau. Une fois inséré, le biomatériau est exposé aux bactéries, macrophages et cellules tissulaires. Adapté de Gristina et coll., 1994.



**Figure 1.12** : L'alignement des cellules se fait selon la topographie de surface du substrat le long des sillons creusés. L'index d'orientation se calcule par la longueur (le long du segment cellulaire le plus long) divisée par la largeur. Adapté de den Braber et coll., 1996.

La rugosité ne peut être adéquatement définie sans parler de topologie. La même rugosité sous la forme de creux parallèles diffère de celle caractérisée par des puits (Adamson, 1990). Une étude de Wong (1995) démontre qu'une valeur de rugosité élevée n'est pas le seul critère pour une ostéo-intégration optimale, mais l'implication de la distribution de taille et l'aire des pics influencent également le mécanisme d'ancrage.

Plusieurs auteurs rapportent l'importance de la taille des pores pour la croissance osseuse. Ainsi, Sandborn et coll., (1988) notent qu'un espace de 500  $\mu\text{m}$  ou moins entre l'implant poreux et l'os entraîne la formation de l'os *in vivo*. Ces résultats ont été confirmés par Dalton et coll., (1995) qui ont observé qu'à l'interface implant-os vivant des trous de 1 mm ou moins augmentent la croissance osseuse de façon significative. Shimazaki et Mouney (1985) ont trouvé que des implants avec des pores de 260-600  $\mu\text{m}$  présentaient rapidement de l'os nouveau. Tandis que d'autres auteurs parlent de 450  $\mu\text{m}$  ou 259  $\mu\text{m}$  favorablement (Schliephake et coll., 1991). La plupart des études s'accordent à dire qu'un pore trop petit restreint ou prévient la croissance osseuse dans l'implant.

Les études *in vivo* sur l'apposition de l'os aux implants ont démontré de façon constante que les surfaces rugueuses induisent la formation de l'os, tandis que les surfaces lisses tendent à promouvoir une interface fibreuse (Thomas et Cook., 1985; Buser et coll., 1991; Meyle et coll., 1993). La création d'une surface rugueuse offre la possibilité d'augmenter la croissance osseuse afin d'assurer une meilleure adaptation et meilleure fonction de l'implant. Ces modifications structurales des surfaces font en sorte qu'une certaine porosité est créée et qui par la suite mène vers une stimulation de la migration des ostéoblastes ainsi que leur différenciation.

## 2- L'ADHÉSION CELLULAIRE

L'adhésion cellulaire est un phénomène complexe. Cette étape est critique dans plusieurs processus physiologiques ou pathologiques. L'adhésion cellulaire n'est pas une simple réaction de liaison mais elle englobe tout un processus actif incluant une signalisation cellulaire où un grand nombre de protéines de surfaces nommées *molécules d'adhésion cellulaire* sont impliquées.

Dans la plupart des tissus du corps, les cellules résident dans un réseau complexe de glycoprotéines nommées matrices extracellulaires. Les protéines de la matrice possèdent une séquence d'acides aminés, Arginine-Glycine-Acide Aspartique, auxquels les cellules peuvent se lier en utilisant des récepteurs de surface spécifiques (Glass et coll., 1996; Ruoslahto et Pierschbacher, 1986). Ceci mène à l'identification d'une famille de récepteurs adhésifs cellulaires de surface appelés "*intégrines*". Cette famille d'intégrines jouent un rôle prédominant dans les mécanismes d'adhésion et de migration cellulaire. Ces dernières reconnaissent de façon spécifique la séquence d'acides aminés qui se trouve sur les protéines. Le sérum contient deux de ces protéines: soient la fibronectine et la vitronectine qui influencent l'attachement de cellules à la surface d'un substrat (Grinnell et Feld, 1981; 1982; Howlett et coll., 1994; Steele et coll., 1991).

### 2.1 Théories de l'adhésion

Selon Busscher et Weerkamp (1987) les théories d'adhésion peuvent se subdiviser en trois concepts, celui des récepteurs spécifiques impliquant des interactions moléculaires stéréochimiques entre les composantes de la surface cellulaire et le substrat, celui dérivé de la théorie de la stabilité des colloïdes impliquant les propriétés de surface ou celui du concept thermodynamique basé sur l'énergie libre interfaciale (Kinloch, 1980).



Nous nous attarderons principalement sur l'approche thermodynamique. Selon ce modèle, l'adhésion,  $\Delta F_{adh}$ , est favorisée quand elle permet une diminution de l'énergie libre du système en fonction des tensions interfaciales dues aux forces de van der Waals (Israelachvili, 1992):

$$\Delta F_{adh} = \gamma_{cs} - \gamma_{sl} - \gamma_{cl} \quad (\text{équation 2.1})$$

où  $\gamma_{cs}$  est la tension interfaciale entre le substrat et la cellule,  $\gamma_{sl}$  est la tension interfaciale solide-liquide et  $\gamma_{cl}$  la tension interfaciale cellule-liquide.

D'une part, la tension superficielle d'un liquide,  $\gamma_l$ , peut être identifiée expérimentalement à l'aide d'un tensiomètre avec anneau de Nouy tel que dit précédemment (Adamson, 1990). D'autre part, la mesure de la tension superficielle d'un solide et les tensions interfaciales nécessitent des méthodes indirectes telles que celle de l'angle de contact et la relation  $\gamma_{sl} = f(\gamma_l, \gamma_s)$  qui permet le calcul de la tension interfaciale (Neumann et coll., 1974). La méthode de Kaelble et coll., (1974) utilise la mesure de l'angle de contact avec des liquides de différentes polarités. Les cosinus des angles de contact,  $\cos \theta$ , sont alors placés en fonction de la tension de surface des liquides correspondants. La droite de régression est extrapolée à  $\cos \theta = 1$  qui représente une mouillabilité complète (Figure 1.10).

D'une façon générale l'adhésion dépendra de trois types de forces (Israelachvili, 1992; Kinloch, 1980), les forces de van der Waals (qui déterminent la nature hydrophobe-hydrophile des surfaces et du milieu), les forces électrostatiques créées par la charge des surfaces et les forces de liaisons spécifiques. Fletcher et Pringle (1985) ont montré, dans le cas de l'adhésion cellulaire, qu'il faudrait aussi tenir compte de la structure et la composition de la surface cellulaire. En plus des différences considérables dans les propriétés inhérentes de la surface de la cellule, l'adhésion peut changer en fonction des conditions environnementales.

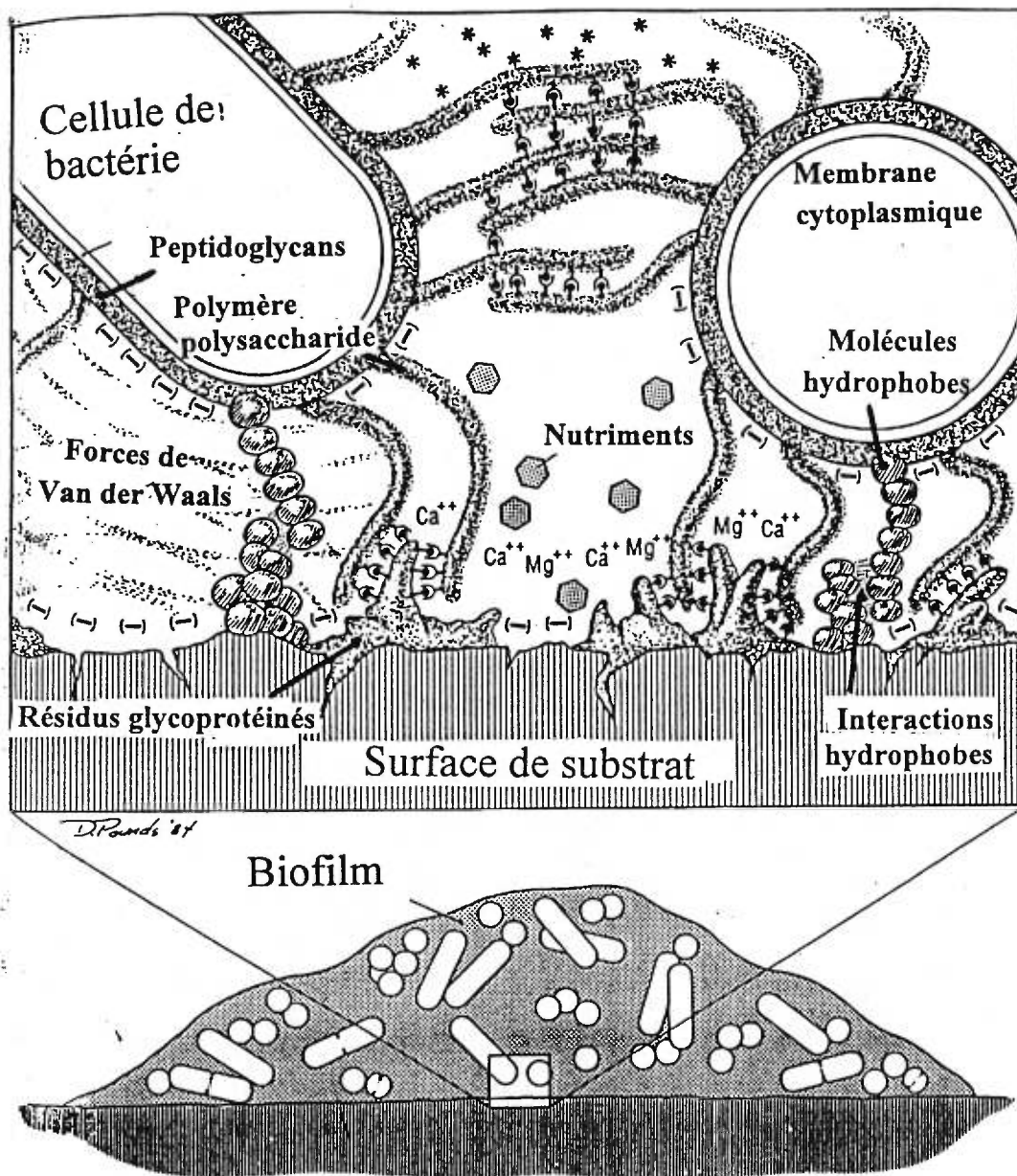
### 2.1.1 Les forces de van der Waals

La croissance et l'ancrage de cellules sont inhibés sur des matériaux non-mouillables (von Wachem et coll., 1987; van Kooten et coll., 1992; von Oss et coll., 1986). Ce fait est attribué aux changements de conformations possibles des protéines adsorbées (Andrade et Hlady, 1986). Les cellules interagissent dans leur milieu naturel avec les protéines de la matrice extracellulaire incluant la fibronectine et la vitronectine.

Ces dernières sont adsorbées à partir du plasma ou du sérum sur le substrat comme prérequis à une adhésion cellulaire et étalement réussi (Grinnell et Feld, 1981; Jonsson et coll., 1982; van Wachem et coll., 1985; Horbett et Schway, 1988; Underwood et Bennett, 1989; van Kooten et coll., 1992; Iuliano et coll., 1993; Pettit et coll., 1994). La fibronectine semble être, en particulier, sensible aux changements conformationnels lors de l'adsorption sur des substrats hydrophobiques tels que démontré par infra-rouge, spectroscopie à fluorescence et liaison avec anticorps monoclonaux et polyclonaux (Groth et Altankov, 1996).

### 2.1.2 Forces électrostatiques

La surface des cellules animales possède généralement une charge négative (Figure 2.1) ainsi que la plupart des substrats (le verre et le plastique) (Sherbet et coll., 1972; Hlady, 1986). Dans ce cas nous sommes en présence de forces électrostatiques dites répulsives (Barngrover, 1986) (Figure 2.2). Ces forces de répulsions seront diminuées, en présence d'ions positifs, et l'adhésion sera favorisée (Oseas et coll., 1981; Mozes et coll., 1987). Borysenko et Woods (1979) pensent qu'au niveau de la membrane biologique, les charges ne sont pas uniformément distribuées. On omet souvent le fait que la plupart des cultures de cellules et des études d'adhésion sont exécutées en présence de protéines provenant du sérum. Ces protéines sont rapidement adsorbées à la surface du substrat, formant une couche de 2 à 5 nm d'épaisseur (Barngrover, 1986). Le substrat épouse alors la plupart des propriétés de la couche protéique adsorbée (Andrade et Hlady, 1986).



**Figure 2.1:** Les forces de répulsion naturelles entre une bactérie chargée négativement et un substrat sont soumises aux forces de van der Waals à une certaine distance. Il existe également des interactions hydrophobes entre les molécules. La création d'un polymère polysaccharide facilite les liens entre les ligands et les récepteurs, ainsi que l'attachement et l'adhésion de bactéries au substrat. Adapté de Gristina, 1994.

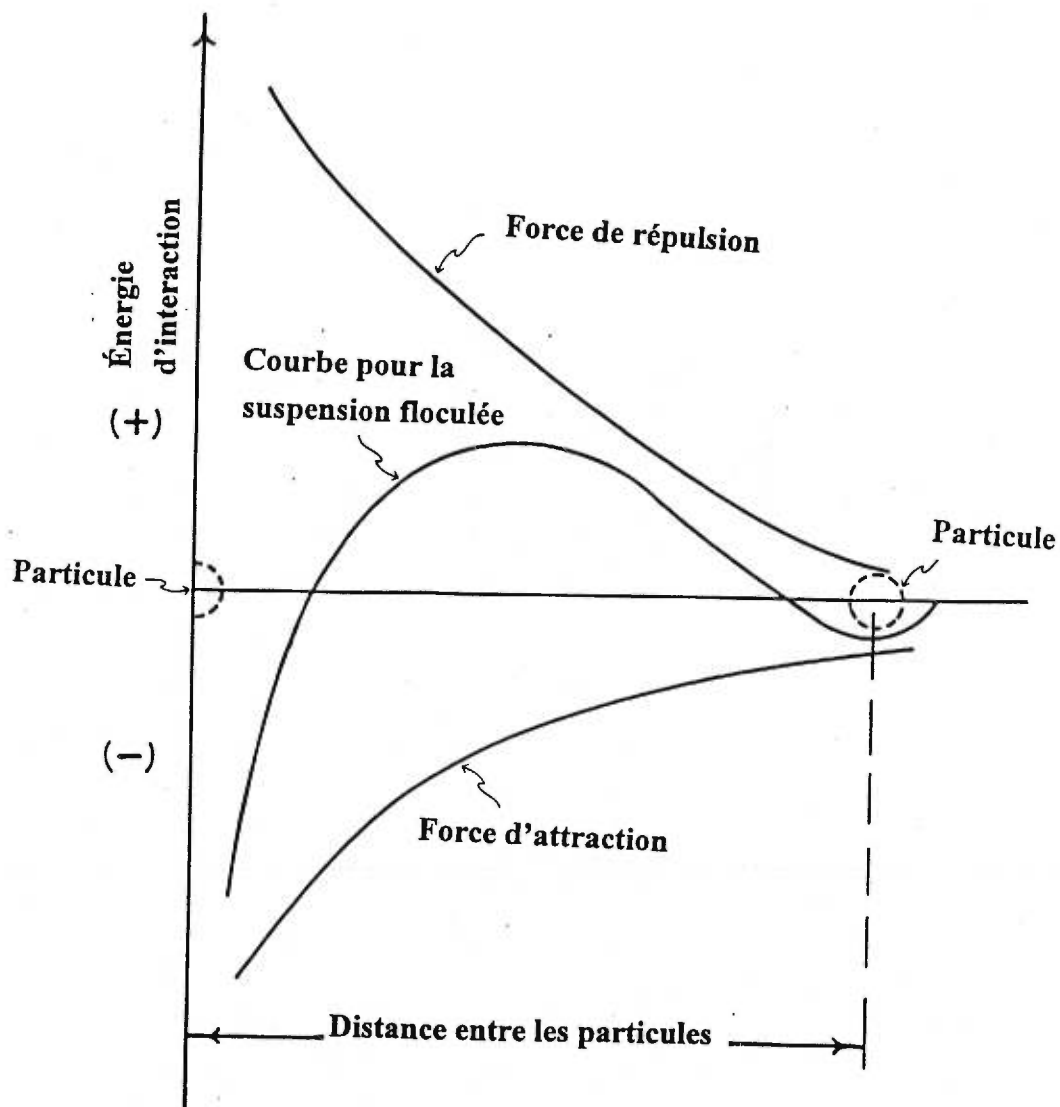


Figure 2.2: Graphique des courbes d'énergie pour les interactions de particules en suspension. Adapté de Martin et coll, 1983.

### 2.1.3 Les forces de liaisons chimiques spécifiques

Ces forces impliquent une reconnaissance spécifique des réactions de liaison (antigène-anticorps, hormone-récepteurs...) et exigent la présence de molécules qui peuvent être considérées par les récepteurs de la surface cellulaire. On cite, comme exemple, le cas de la fibronectine (Kleinman et coll., 1981), des lectines de cellules de plantes (Hughes et coll., 1979), de la laminine (Terranova et coll., 1980), du collagène (Grinell et Hays, 1978), et d'autres protéines et peptides provenant du sérum (Steinberg et coll., 1989; Ito et coll., 1991) qui une fois adsorbés au substrat en favoriseraient l'adhésion cellulaire.

L'adhésion des cellules animales est un phénomène complexe. Tout d'abord le milieu de culture des cellules vivantes est très riche, composé de sels, d'acides aminés, de protéines, d'hormones et de vitamines. C'est un milieu d'où découle une multitude d'interactions qui ont lieu entre les composantes du milieu, la cellule et le substrat. Le processus d'adhésion cellulaire est un phénomène évolutif, lié au temps et à l'état physiologique des cellules (Barngrover, 1986; van Loosdrech, 1990; Truskey et Pirone, 1990).

## 2.2 Processus d'adhésion

Le processus d'adhésion est un phénomène complexe qui peut se définir en quatre étapes principales soient l'adsorption des protéines, le contact cellule-substrat, l'attachement cellulaire, et l'étalement cellulaire (Figure 2.3).

### **2.2.1 Adsorption des protéines**

Cette réaction a lieu dès que le milieu est mis en présence du substrat. La cinétique de cette adsorption est rapide (Barngrover, 1986; Grinnell, 1976) et ne contrôle probablement pas l'ensemble du processus d'adhésion cellulaire.

### **2.2.2 Contact cellule-substrat**

Selon Vogler et Bussian (1987) ou Barngrover (1986), la cellule se rapproche du substrat de 5 à 8 nm ou de 10 à 20 nm respectivement. Une distance à laquelle les forces d'attractions cellule-substrat sont relativement faibles et le moindre mouvement du fluide interrompt le contact. Mais une fois le contact établi, des forces de nature physico-chimique entrent en jeu : van der Waals, polaires et électrostatiques (van Oss et coll., 1988 ; van Loosdrecht et coll., 1990). Ces forces peuvent rapprocher la cellule et le substrat et consolider la liaison en cours. Cette étape est connue sous le nom *d'adhésion initiale* et peut être sensible à des contraintes hydrodynamiques moyennes, lesquelles causent le détachement de la cellule du substrat. En plus, l'adsorption physico-chimique est plus lente que le contact et contribue au processus d'adhésion cellulaire.

### **2.2.3 Attachement cellulaire**

Cette étape met en évidence la capacité des cellules à sécréter des molécules qui renforcent le lien adhésif entre la cellule et le substrat (Facchini et coll., 1988; Busscher et coll., 1987). La cellule pourra alors créer un microenvironnement favorable à sa croissance tout en étant moins sensible aux contraintes hydrodynamiques du milieu. Cette étape paraît la plus longue du processus global d'adhésion des cellules et sera déterminante pour la suite de l'étude.

### **2.2.4 Étalement cellulaire**

Cette étape relie la fin du processus d'adhésion, à la fin de la période de latence et au début de la croissance cellulaire. C'est un phénomène séparé où la cellule, de forme sphérique, s'aplatit. Cette transformation s'accompagne d'une modification du

cytosquelette et probablement de la membrane. La cellule est beaucoup moins vulnérable aux forces de cisaillement. Truskey et Pirone (1990) pensent que l'étalement cellulaire est un événement critique dans le processus de croissance et de différenciation. Cette étape est favorisée généralement par des protéines telles que la fibronectine et la vitronectine lesquelles, une fois adsorbées à la surface, se lient subséquemment aux récepteurs de la surface cellulaire.

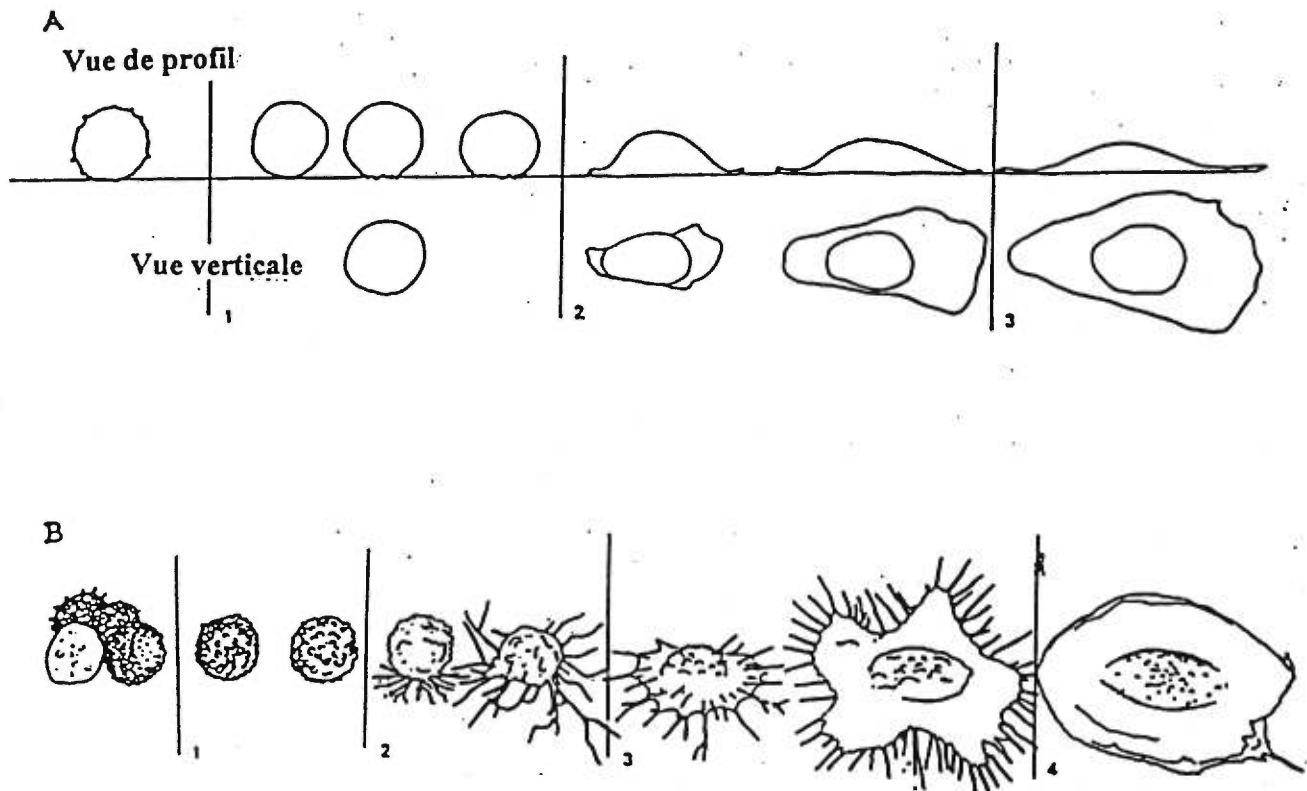


Figure 2.3 : Représentation schématique des différentes étapes dans le processus d'adhésion d'une cellule *in vitro*. Les étapes sont l'adsorption des protéines, le contact cellule-substrat, l'attachement cellulaire et l'étalement cellulaire. Adapté de Rajaraman et coll., 1974.

### **3- CARACTÉRISATION DE SURFACE**

La surface des matériaux influence fortement la nature et la possibilité de réactions biologiques entre le matériau et le tissu. Les corrélations biologiques qui découlent de l'analyse de surface d'un biomatériau permettent, par exemple, de déterminer toute contamination ou modification de l'uniformité d'une surface.

#### **3.1 La notion de surface**

Une surface peut se définir comme la partie extérieure d'un solide. Mais, puisqu'un solide est toujours placé dans un environnement donné, ou en contact avec un autre milieu, cette surface est considérée comme une interface. Par exemple, nous retrouvons l'interface solide-gaz, l'interface solide-liquide ou encore l'interface solide-solide (Adamson, 1990).

Les écarts topographiques de surface d'un matériau (par rapport à une surface idéalement plane) et la nature physico-chimique de sa couche superficielle dépendent de l'histoire métallurgique et mécanique de ce même matériau (Blouet, 1988). La connaissance de ces données est nécessaire pour la compréhension d'un grand nombre de processus technologiques impliquant en particulier le frottement, la fatigue, l'usure et la corrosion (Béranger, 1988).

#### **3.2 La notion de rugosité**

La notion de rugosité est un concept inné chez l'homme car elle fait intervenir deux sens : la vue et le toucher. La rugosimétrie a de loin dépassé le stade descriptif où les surfaces étaient définies comme rugueuses, fines, lisses, ou granuleuses. De plus, cette notion joue, de nos jours, un rôle important dans tout processus où la surface est impliquée en tant qu'interface, tel qu'en médecine dentaire, en orthopédie, en chirurgie cardiaque (Williams, 1981b).



### 3.3 Paramètres conventionnels de mesure de la rugosité

De nombreux paramètres et fonctions statistiques ont été développés afin de quantifier les propriétés topographiques moyennes d'une surface (Cielo, 1988). Ces fonctions caractérisent deux aspects de base de la topographie, soient la hauteur des aspérités (amplitude) et l'écart longitudinal entre ces dernières (période spatiale) (Cielo, 1988). Les données sont normalement prises le long d'une ligne et sont définies en terme de profil de surface bidimensionnelle  $y(x)$ . De plus, la caractérisation microgéométrique d'une surface rugueuse passe par un certain nombre d'étapes obligatoires qui sont l'acquisition des données  $z(x,y)$  (sans les perturber) puis par le traitement des informations (redressement des profils, filtrage divers, calculs de paramètres de forme d'une courbe : degré d'arrondissement, degré d'élongation...). Le plus souvent, ces données sont importantes car le comportement superficiel des métaux en dépend. Ainsi, pendant la corrosion les régions en pointes d'une surface sont généralement plus actives que les régions planes. De plus, les irrégularités augmentent la surface réelle du métal au contact du milieu réactionnel (Blouet, 1988)

Cependant, aucune liste de standards de rugosité ne peut se prétendre exhaustive et les approches rugosimétriques actuelles restent empiriques (Dubuc et Dubuc, 1997). Les paramètres ou critères descriptifs requis sont trop nombreux, souvent redondants et surtout dépendants de la longueur de l'évaluation sélectionnée.

L'état géométrique d'une surface est défini (Cielo, 1988 ; Blouet, 1988) par  $R_a$  (évaluée en  $\mu\text{m}$ ), le paramètre le plus utilisé, qui est la moyenne arithmétique des valeurs des écarts par rapport à un plan moyen pris sur la surface de l'échantillon (Figure 3.1).

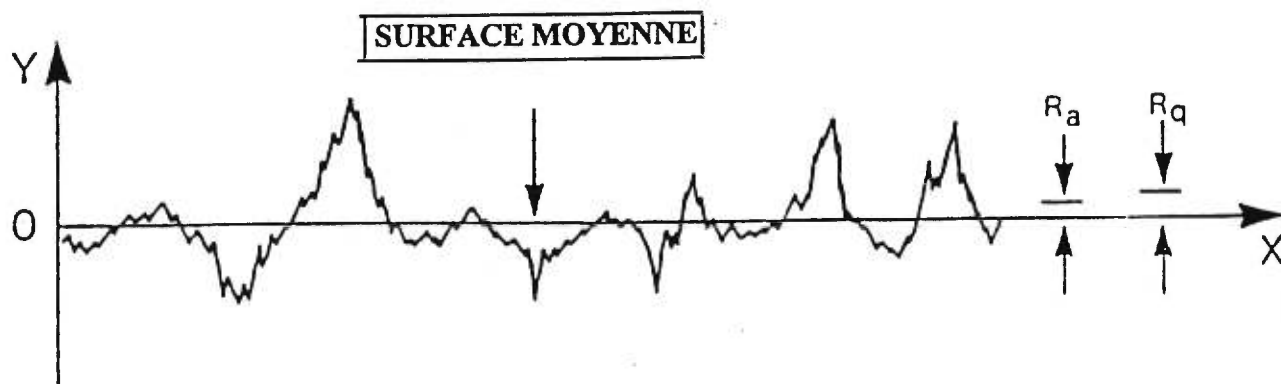
$$R_a = L_o^{-1} \int (y(x)) dx \quad (\text{équation 3.1})$$

où  $L_0$  est la longueur d'évaluation et  $y(x)$  l'amplitude du tracé par rapport à la ligne moyenne. Celle-ci est une ligne idéale où l'aire des espaces pleins au-dessus d'elle est égale à l'aire des espaces vides en dessous-d'elle. Cependant cette valeur ne donne aucune idée de la forme des aspérités par exemple, aiguës ou émoussées.

Un deuxième paramètre,  $R_q$  (ou rms-root mean square) est la valeur de la racine carrée de la moyenne des carrés des écarts le long du profil de surface de la ligne échantillonnée. Mesuré en  $\mu\text{m}$ , ce paramètre est plus sensible aux valeurs extrêmes que ne l'est le  $R_a$ , en raison de l'utilisation de la racine carrée (Figure 3.1).

$$R_q = (L_0^{-1} \int (y^2(x)dx))^{1/2} \quad (\text{équation 3.2})$$

Un troisième paramètre est le  $R_{\text{max}}$ , qui est une valeur extrême (mesurée en  $\mu\text{m}$ ), exprimant la distance entre le pic le plus élevé et le creux le plus profond sur la surface de l'échantillon.



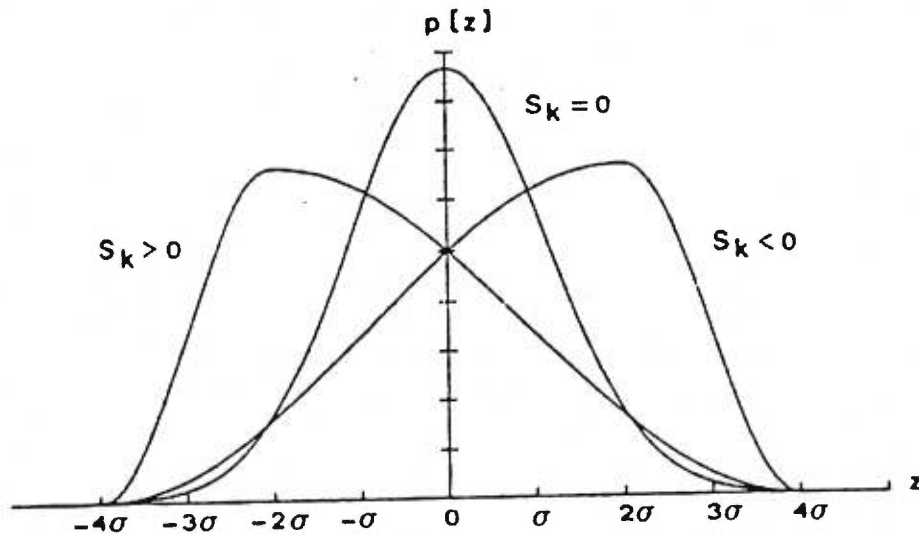
**Figure 3.1:** Paramètres conventionnels de mesure de la rugosité.  $R_a$ : moyenne arithmétique des valeurs des écarts par rapport à un plan moyen pris sur la surface de l'échantillon.  $R_q$ : racine carré de la moyenne des carrés des écarts le long du profil de surface. Tiré de Cielo., 1988.

Il y a de plus le facteur  $S_k$ , skewness ou ondulation correspondant à la symétrie du profil. Par exemple, une surface à ondulation négative présente plus de creux que de pics. Pour une répartition de Gauss, l'ondulation est nulle. Trois cas sont possibles (Figure 3.2) :

$S_k=0$  : le profil est symétrique par rapport à la ligne moyenne.

$S_k>0$  : le profil comporte plus de pics que de creux.

$S_k<0$  : le profil comporte plus de creux que de pics.



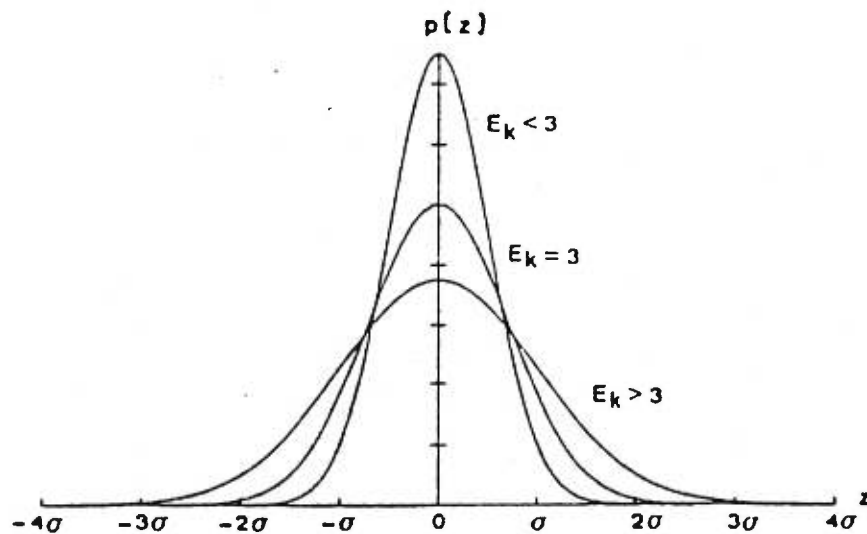
**Figure 3.2:** Facteur skewness ou ondulation.  $S_k=0$ , le profil est symétrique par rapport à la ligne moyenne.  $S_k>0$  le profil comporte plus de pics que de creux.  $S_k<0$ , le profil comporte plus de creux que de pics. Tiré de Blouet, 1988.

Le facteur  $E_k$ , ou kurtosis, est l'étalement de la distribution. Cette mesure permet de caractériser la surface par rapport à une distribution gaussienne (Figure 3.3). Une répartition de Gauss parfaite a un kurtosis de trois. Une valeur moindre indique relativement moins de pics et des creux peu profonds. Si la surface présente de nombreux pics et des creux moins profonds, le kurtosis est supérieur à 3.

$E_k > 3$ : la distribution est élargie.

$E_k < 3$ : la distribution est resserrée.

$E_k = 3$  : la distribution est gaussienne.



**Figure 3.3:** Facteur de kurtosis ou étalement de la distribution.  $E_k > 3$ , la distribution est élargie.  $E_k < 3$ , la distribution est resserrée.  $E_k = 3$ , la distribution est gaussienne. Tiré de Blouet, 1988.

Une nouvelle approche originale est apparue avec le concept fractal (Mandelbrot, 1982). En effet, il a été démontré qu'une surface pouvait être modélisée à l'aide de deux paramètres soient  $d$  et  $L$ . La dimension fractale,  $d$ , est un nombre décimal qui décrit la capacité d'une courbe à remplir son voisinage. La longueur,  $L$ , est une distance qui définit la limite de l'espace considéré comme le voisinage (Wehbi, 1986 ; Roques-Carmes et Wehbi, 1988). L'intérêt de ce concept réside donc, dans le fait que l'on remplace un certain nombre de critères ou paramètres classiques par une notion unitaire qui est celle de dimension. Cette notion sera plus amplement développée dans le quatrième chapitre.

### **3.4 Les méthodes d'analyses**

La caractérisation des surfaces est un élément essentiel qui permet une meilleure compréhension des réactions qui ont lieu au niveau de l'interface des biomatériaux. L'analyse de surface demande donc l'utilisation de techniques spécialisées telles que décrites dans le Tableau 3.1 et le lecteur est convié à consulter les différentes revues sur ce sujet (Muster et coll., 1990; Behm, 1987; Thorne et coll., 1986; Hafsteinsson et Rizvi, 1984; Park et coll., 1987; Levi-Setti et coll., 1993; Wehbi et Roques-Carmes, 1985; Gomer et Gong, 1987; Robinson et coll., 1991).

Ces dernières années, les méthodes d'analyse des surfaces ont connu un essor extraordinaire avec la venue d'appareils de plus en plus sophistiqués et performants. Plusieurs méthodes permettent notamment une exploration approfondie des couches de surface. La profondeur analysée pouvant aller de quelques couches atomiques à quelques nanomètres. Il existe de nombreux moyens de mesurer la rugosité d'une surface. Le choix de l'un d'entre eux dépend essentiellement de la nature de l'information recherchée.

<b>Spectroscopie électronique</b> ESCA (spectroscopie électronique pour analyse chimique) Spectroscopie Auger électronique
<b>Spectroscopie ionique</b> Spectroscopie à balayage d'ions Spectroscopie ionique de masse secondaire
<b>Thermodynamique</b> Mouillabilité (angle de contact) Adsorption-désorption
<b>Visuelle ou morphologique</b> Microscopie optique Microscopie électronique à balayage (SEM) à transmission (TEM) Profilométrie (tactile et/ou optique) Microscopie à balayage à effet tunnel Microscopie à force atomique (AFM) Microscopie confocale

**Tableau 3.1:** Méthodes conventionnelles d'analyse de surface

### 3.4.1 Profilométrie tactile (Capteurs à stylet)

Les instruments capteurs à stylets sont les plus utilisées lors de l'évaluation de la rugosité d'une surface. L'étendue de mesure d'une surface peut atteindre 1 mm et la résolution peut descendre jusqu'à 0.01  $\mu\text{m}$ . A ce niveau, les perturbations extérieures sont difficiles à éliminer (effets thermiques, vibrations, bruit de fond...). En outre, ces instruments possèdent quelques inconvénients: complexité, fragilité, coût, étude d'une portion limitée de la surface, mise en oeuvre délicate.

Les stylets sont fabriqués à partir d'un cône ou d'une pyramide tronquée en diamant, d'angle au sommet égal à 90° et de rayon de courbure allant de 1 à 10  $\mu\text{m}$ . Le palpeur est déplacé à l'aide d'un bras fonctionnant à une vitesse allant de 0.15 mm/s à 1 mm/s. Le stylet en diamant suit lentement la surface à inspecter et un signal est enregistré selon les variations d'altitudes de l'échantillon. Cependant, la résolution latérale est limitée par le rayon et la forme géométrique de la pointe du stylet. De plus, cette méthode est destructrice car de faibles marques sont laissées le long de la ligne enregistrée provoquant ainsi une perte de détails à petite échelle. Au niveau industriel, les profilomètres mécaniques ont certaines limites dues à leur faible vitesse et le besoin de contact avec la surface à inspecter (Cielo, 1988; Adamson, 1990) (Figure 3.4).



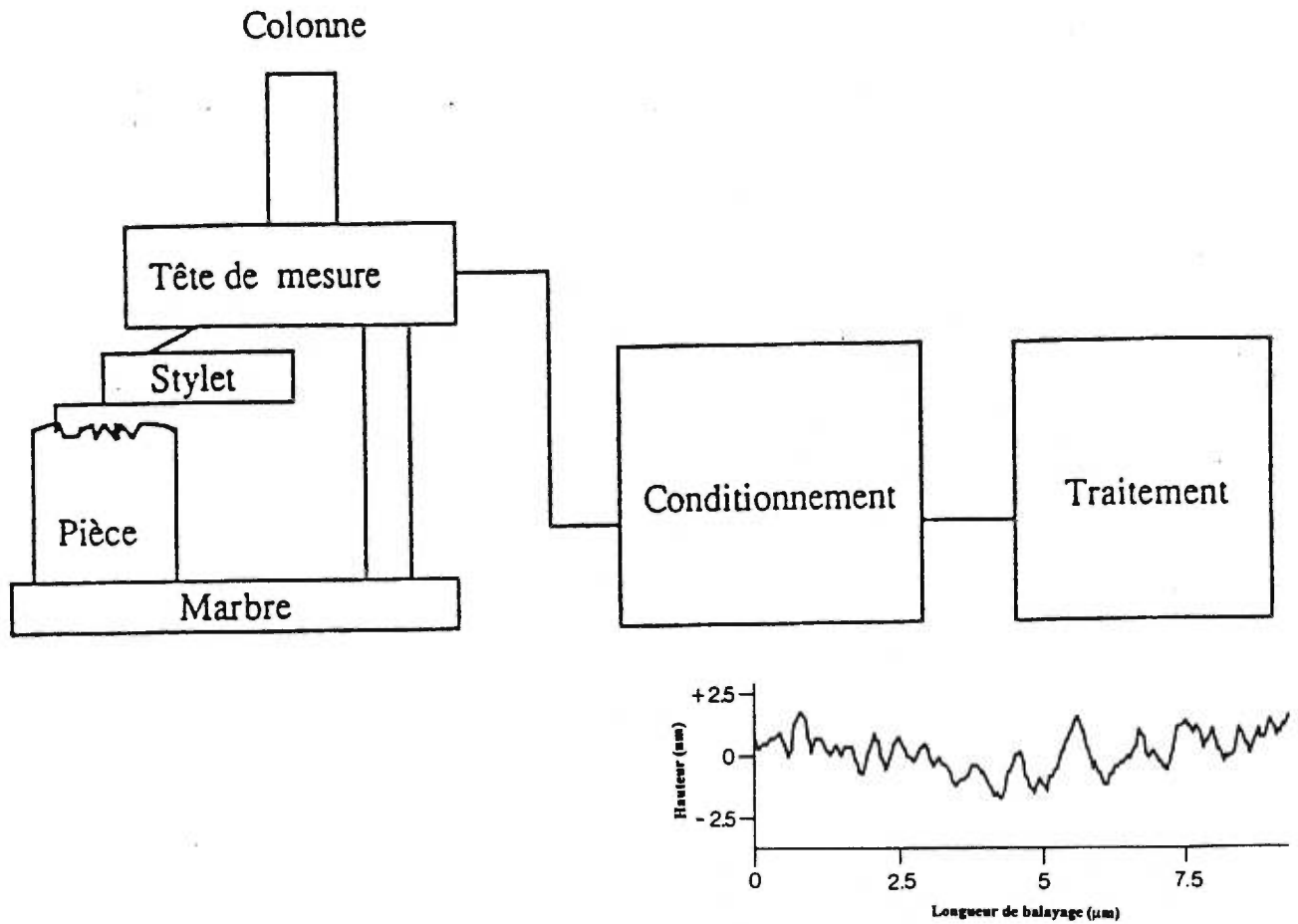


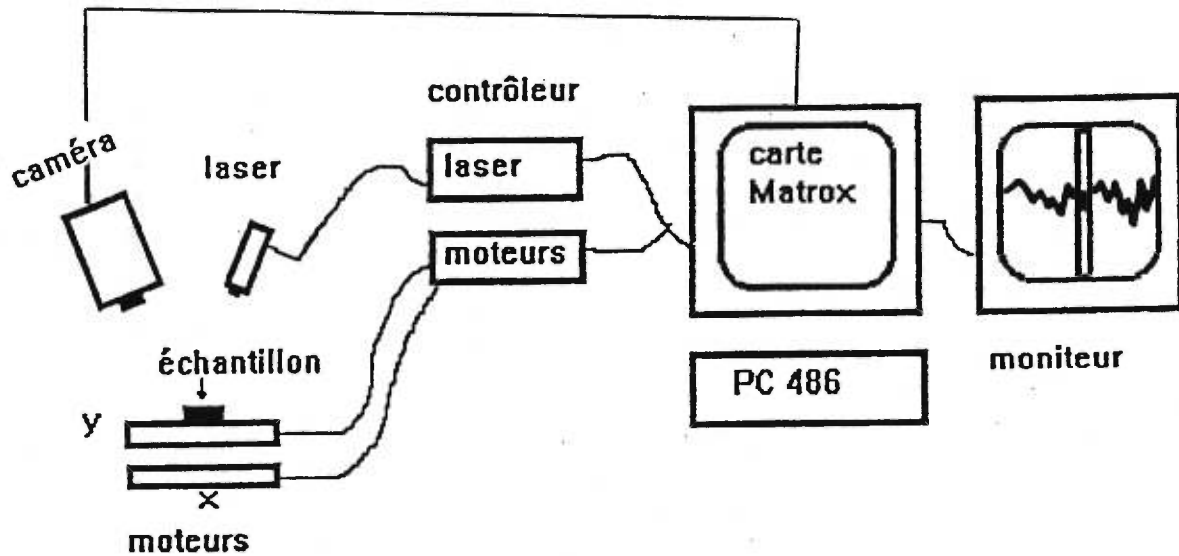
Figure 3.4: Profilométrie tactile. L'échantillon est placé sur la plate-forme.

### 3.4.2 Profilométrie optique

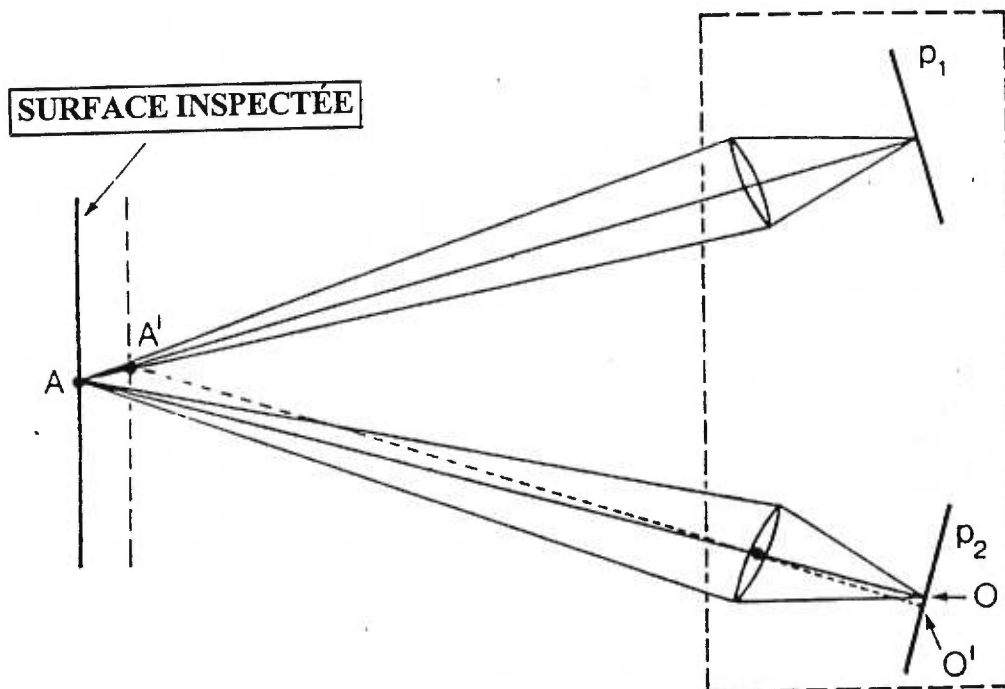
La profilométrie optique permet l'inspection d'une surface sans aucun contact physique par l'appareil, ni destruction de l'échantillon. Nous avons développé dans notre laboratoire un système de profilométrie optique composé d'un faisceau laser à diode qui effectue, point par point, le balayage de la surface comme une pointe de lecture optique. Cependant, la fonction de balayage n'est pas assurée par la sonde qui est maintenant fixe, mais par un ensemble porte-échantillons constitué de deux tables croisées actionnées pas à pas respectivement dans les directions  $x$  et  $y$  par deux moteurs (Figure 3.5). La chaîne de mesure est constituée par un capteur, un amplificateur et une carte interface de conversion analogique/numérique. Tout point repéré dans l'espace est représenté par ces coordonnées  $(x,y)$ , et l'altitude relative  $z(x, y)$  par rapport à une référence externe.

La méthode d'analyse optique se base sur le principe de triangulation démontré à la Figure 3.6. Le principe physique par focalisation ou par défocalisation est fondé sur l'étude des variations du flux lumineux (à travers une pupille fixe) lorsque la position de l'objet réfléchissant sur l'axe optique du système varie. Le faisceau émis par le point source  $S$  est focalisé sur un point  $A$  de l'échantillon à l'aide de la lentille d'objectif. Le deuxième cube séparateur intercepte (à travers la lentille d'objectif) le faisceau réfléchi focalisé et permet d'obtenir deux points images conjugués de  $A$ . En ces points sont placés les deux photodiodes  $p_1$  et  $p_2$ . Un déplacement de l'axe optique amènerait devant le faisceau un autre point soit  $A'$  d'altitude différente de celle de  $A$  et donc une défocalisation du point d'exploration. Cette défocalisation entraîne un déplacement du point image de part et d'autre du plan détecteur et donc une variation de l'intensité détectée.

Ces techniques optiques sont compatibles avec le contrôle de la microrugosité au niveau industriel car elles sont sensibles, peuvent fonctionner à distance de la surface, et ne sont pas affectées par les vibrations ambiantes (Cielo, 1988).



**Figure 3.5 :** Principe de la profilométrie optique. Un faisceau laser à diode effectue point par point, le balayage de la surface comme une pointe de lecture optique. La fonction de balayage est assurée par un ensemble porte-échantillons constitué de deux tables croisées actionnées pas à pas respectivement dans les directions x et y par deux moteurs. Les données sont alors captées, amplifiées et une carte interface matrox permet la conversion analogique/numérique sur l'écran.

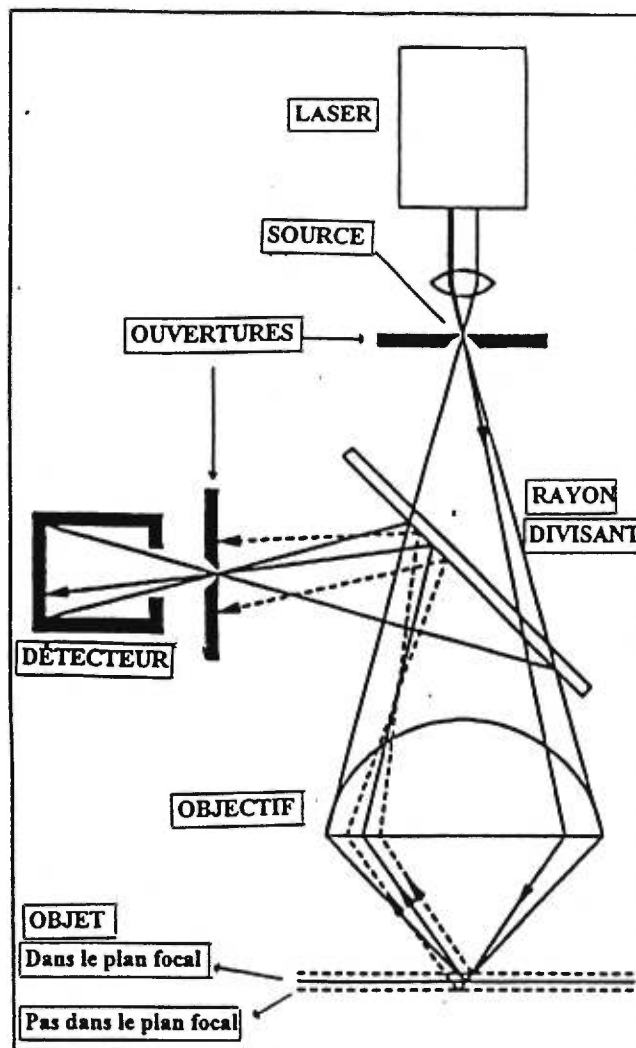


**Figure 3.6:** Principe de triangulation. Un point A sur la surface inspectée est imagé sur les plans  $p_1$  et  $p_2$ . Si la position longitudinale du point imagé change de A vers A', son image sur  $p_2$  bouge de O à O'. En enregistrant la position du point imagé, on peut déterminer la position de la surface le long de l'axe du faisceau et un profil de surface est obtenu ( voir le texte pour plus de détails) (Cielo, 1988).

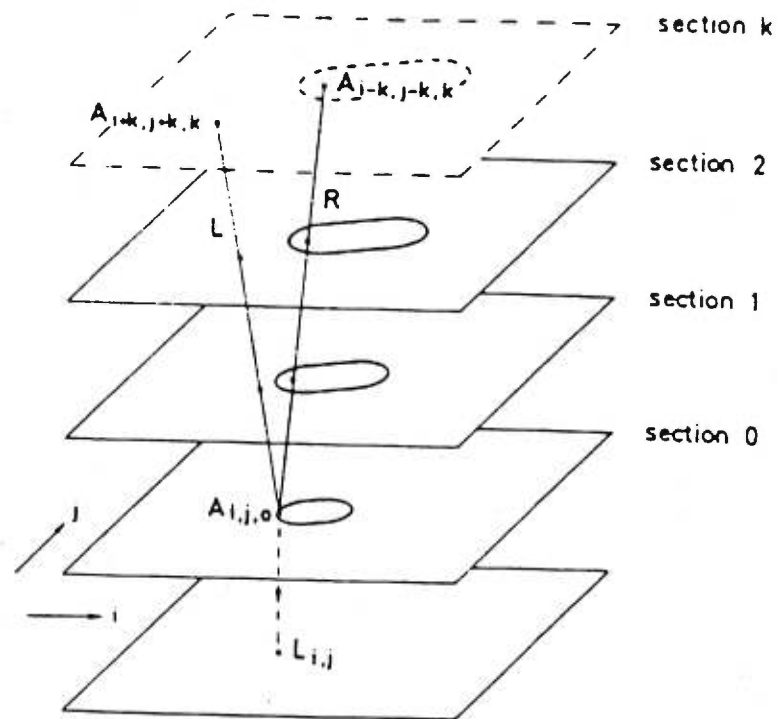
### 3.4.3 Microscopie confocale

La microscopie confocale permet de sectionner l'échantillon en plusieurs couches. Ainsi, en enregistrant un nombre de sections optiques à différents niveaux de profondeur, la structure tridimensionnelle de la surface peut être obtenue. Cette méthode permet une amélioration au niveau de la résolution latérale par rapport à la microscopie conventionnelle (Figure 3.7 et Figure 3.8) (Carlsson et Lundahl, 1991; Ockleford, 1995; Kino et Corle, 1989).

La reconstruction d'images implique le devoir de fournir des coordonnées spatiales à chaque valeur de l'ensemble. Dans le cas de la microscopie confocale chaque section optique est exprimée par deux valeurs d'intensité numérique associées à des coordonnées spécifiques  $x$  et  $y$ . De plus, puisque l'on connaît la distance entre les sections optiques, une coordonnée  $z$  peut être évaluée à chaque point en se basant sur ces distances. Ainsi, des coordonnées spécifiques  $x$ ,  $y$  et  $z$  correspondant à une localisation particulière sur l'échantillon, sont assignées. Ceci permet la reconstruction de l'image en 3 dimensions (Brakenhoff et coll., 1988).



**Figure 3.7:** Principe du microscope confocale. L'échantillon est balayé par un faisceau laser en mode de réflexion. La lumière émanant de la source laser est focalisée sur un point de l'échantillon. Ce point est alors imagé grâce au détecteur. Cette technique se nomme confocale puisque deux images de l'échantillon sont enregistrées soit l'image illuminée et celle dans le détecteur. Une fois l'image détectée, une reconstruction tridimensionnelle est possible.



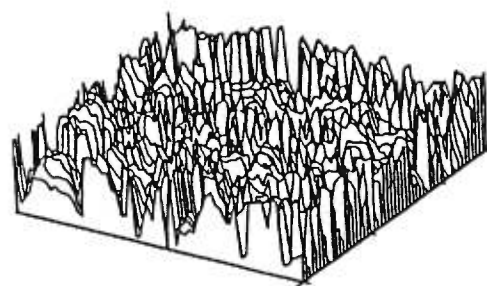
**Figure 3.8** : La microscopie confocale optique possède l'avantage de découper l'image en plusieurs couches et permet d'analyser chaque section.

### 3.4.4 Analyse d'images

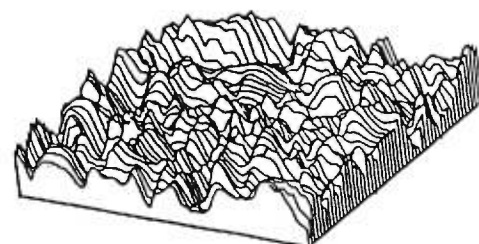
L'analyse quantitative d'images se compose de trois phases soit l'acquisition, le traitement et l'analyse de l'image proprement dite. Cependant, il n'existe pas de standard établi dans ce domaine et le choix des méthodes employées se base sur le but recherché en fonction du type d'images à analyser (Serra, 1982; Chermant et Coster, 1987; Levine, 1985; Smart et Leng, 1993). Une image est le plus souvent représentée par une matrice de pixels caractérisés par leur position et leur intensité. Il faut donc, lors de l'analyse de ces pixels, être capable de pouvoir extraire les objets de l'image et de les reconnaître pour éventuellement prendre des mesures sur ces derniers.

L'acquisition des données se fait par traduction de l'image en un signal électrique grâce à un convertisseur. Le traitement de l'image consiste à transformer et simplifier l'image (par filtrage, restauration, reconstruction...) pour mettre en évidence les informations recherchées. Par exemple, les filtres permettent d'éliminer le bruit qui cause des petites fluctuations sur l'image ou encore permettent de rehausser l'image en mettant en évidence les contours des objets. Les filtres numériques, contrairement aux filtres électriques (imposés par les constructeurs), peuvent s'adapter à tout défaut par le choix de la fenêtre appropriée. En effet, le filtrage consiste à remplacer chaque altitude  $z(x,y)$  par la valeur moyenne  $z(x,y)$  des altitudes de  $n \times n$  points définissant un carré (fenêtre du filtre) centré sur le point  $(x, y)$ . En fonction de l'importance du défaut, une fenêtre de  $3 \times 3$ ,  $5 \times 5$ ,  $7 \times 7$  ou  $n \times n$  points sera utilisée (Figure 3.9). Cette opération s'accompagne d'une perte d'informations. Il s'agit donc, selon le cas particuliers, de réaliser un filtrage "fonctionnel" n'altérant pas les fréquences caractéristiques du phénomène à observer (Chermant et Coster, 1987).

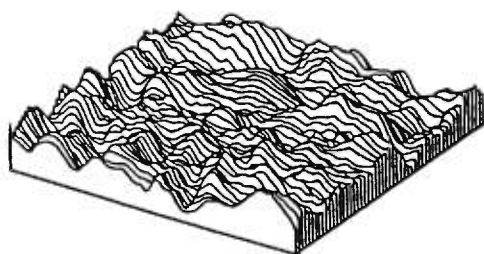




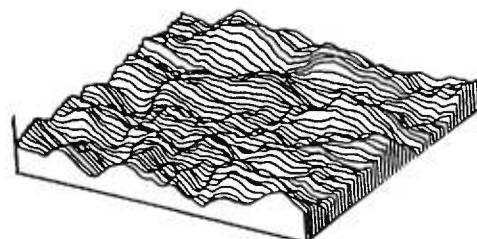
Surface A



Surface B



Surface C



Surface D

**Figure 3.9:** Structure tridimensionnelle d'une surface rugueuse (A). L'utilisation de filtres (B) 3X3, (C) 5X5 et (D) 7X7 donnent des images plus adoucies des surfaces analysées ( $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ ).

Le traitement proprement-dit implique le processus de détection et d'identification ainsi que la prise de mesures. Finalement, l'analyse d'images permet de décrire des images et par la suite de relier les caractéristiques morphologiques aux autres propriétés des objets ou matériaux étudiés.

Ce qu'il faut tout d'abord préciser c'est que, pour un utilisateur potentiel, les méthodes optiques et les méthodes tactiles sont essentiellement complémentaires. Pour des applications où le double emploi est possible. Il est bien sûr préférable de choisir la technique la moins agressive selon le sujet en question. En effet, pour les matériaux facilement déformables plastiquement ou intrinsèquement fragiles, un palpeur mécanique peut entraîner, lors de son passage, des effets secondaires non désirables, en l'occurrence des sillons creusés dans la surface ou des microfissures. Un des atouts des méthodes optiques est donc leur caractère non destructif.

## 4- ANALYSE FRACTALE

### 4.1 Définition de la géométrie fractale

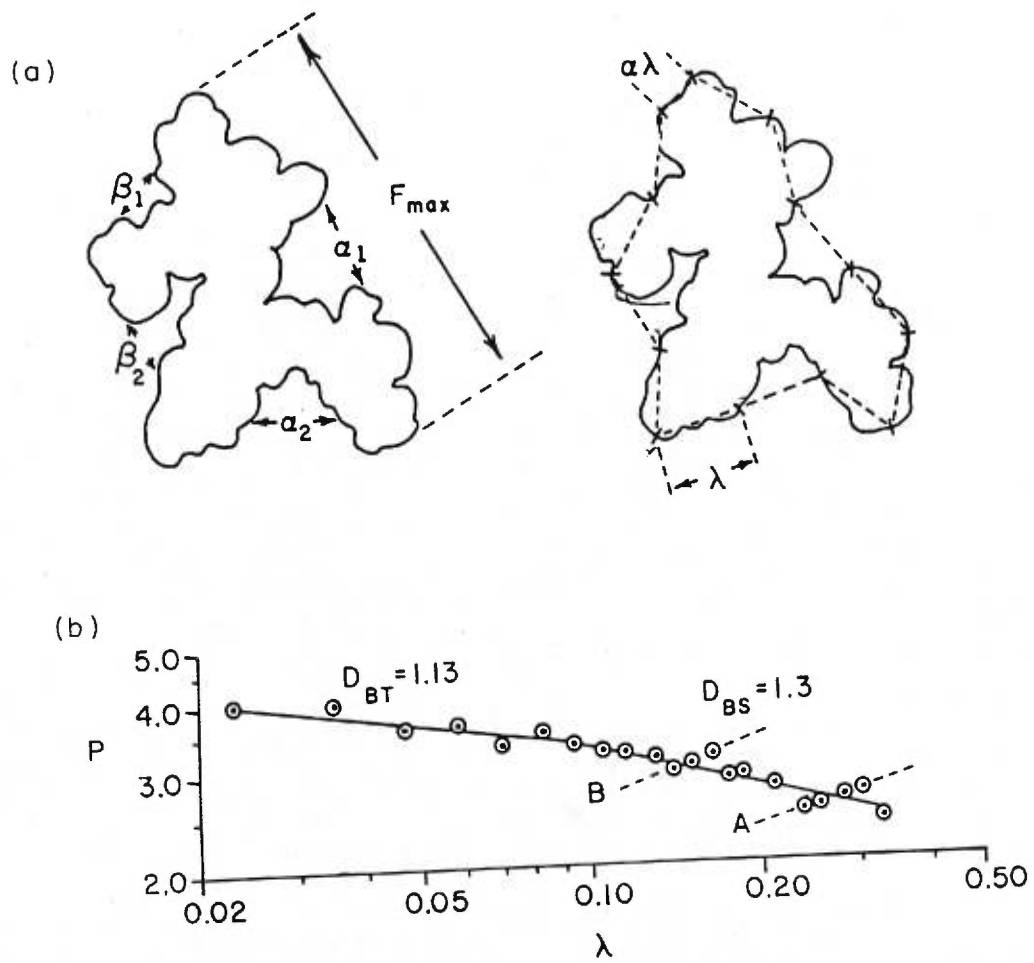
Depuis une vingtaine d'années la notion de dimension fractale a pris de l'ampleur. Le terme "fractal" créé par Benoît Mandelbrot dans les années 1970 est tiré du latin *fractus*, c'est à dire *interrompu* ou encore *brisé* afin notamment d'exprimer l'aspect trop irrégulier d'objets ne pouvant être étudiés en géométrie classique (Mandelbrot, 1982). Des disciplines aussi diverses que la physique, la chimie (Avnir, 1990), la biologie (Vilela et coll., 1995), la géographie (Goodchild, 1980) et la topographie de surface (Chesters et coll., 1989; Mandelbrot, 1984; Majumdar et Bhushan, 1990) y ont trouvé de puissants outils pour décrire des phénomènes liés à leur spécialité. Les exemples sont forts nombreux où la forme d'objets naturels peut être appréhendée à l'aide de la géométrie fractale. Nous retrouvons ce concept dans l'étude de la diminution de taille des particules (Akbarieh et Tawashi, 1987; 1989; Thibert et coll., 1988), celle du processus de granulation (Thibert et Tawashi, 1988) pour des particules en aérosols (Naumann et Bunz, 1991), pour la caractérisation des particules médicamenteuses (Fernandez-Hervas et coll., 1994; van Damme et coll., 1988), pour les phénomènes de percolation (Guyon et coll., 1989), pour la dissolution des particules (Farin et Avnir, 1992; Kocova et coll., 1993) et pour la croissance microbienne (Obert et coll., 1990) pour ne nommer que quelques-uns.

Deux tentatives de Mandelbrot afin de définir une fractale comme un ensemble dont "la dimension de Hausdorff-Besicovitch excède strictement sa dimension topologique ou encore comme une forme faite de parties semblables au tout dans une certaine manière" se sont avérées soit trop limitées soit trop larges (Mandelbrot, 1982). C'est peut-être à ces difficultés de définitions qu'on doit l'épanouissement de la géométrie fractale depuis la fin des années soixante dix.

La géométrie fractale est un nouveau langage qui permet de décrire les formes complexes de la nature. Mais, contrairement aux éléments du langage traditionnel, la géométrie euclidienne (ou familière) dont les formes de base sont des lignes, des cercles et des sphères, ceux du nouveau langage ne peuvent être directement observés. Ce sont des algorithmes qui peuvent se transformer en formes et structures avec l'aide d'ordinateurs.

#### 4.2 Notion de dimension fractale

La dimension topologique est la dimension au sens intuitif où nous l'entendons. Très tôt, dans notre apprentissage des mathématiques, on voit que la dimension d'un point est zéro, celle d'une ligne est un, celle d'une surface est deux et d'un volume est trois. Mais, pour une courbe plane de longueur infinie avec beaucoup de méandres, sa dimension fractale est comprise entre un et deux. Plus la courbe est compliquée et occupe une portion étendue du plan, plus sa dimension est élevée et s'approche de deux, la dimension même du plan. La même idée peut s'appliquer à des surfaces dont la dimension est comprise entre deux et trois. Plus la dimension s'approche de trois, plus la surface a tendance à remplir un volume (Peitgen et coll., 1992). En général, la dimension fractale,  $d$ , apparaît sous forme d'exposant. Sa valeur est déterminée par une mesure de pente sur un tracé log-log. Sur ce type de tracé, des changements de pente peuvent être observés. En fonction de la position sur l'échelle de mesure des points de transition, ils peuvent être interprétés en termes de changements dans la micro-structure fine des profils étudiés (Figure 4.1). La partie linéaire du graphique bilogarithmique représente l'échelle où on peut observer une stabilité de la surface étudiée.



**Figure 4.1** : Différentes dimensions fractales peuvent être observées selon l'échelle d'observation de la structure (Avnir, 1990).

Mandelbrot (1984) montre effectivement que l'on doit prendre en compte les vecteurs de base utilisés dans le calcul de  $D$ , sinon à chaque amplification d'un même profil correspondrait une dimension fractale différente. En ce qui concerne les applications physiques où les surfaces jouent le rôle d'interface, Mandelbrot définit une dimension fractale globale et une dimension fractale locale qui peuvent être différenciées par exemple par un changement de pente. Ces variations de pente peuvent être interprétées en terme de changements dans la micro-structure fine des profils étudiés (Tricot et coll., 1988).

Dans notre étude, le modèle de l'analyse fractale est appliquée pour la description de surfaces complexes. C'est une approche d'autant plus intéressante que la notion de dimension fractale se rapproche de façon intuitive de la notion de rugosité de surface et caractérise la propriété de remplissage de l'espace relié à la complexité (Pentland, 1984; 1985).

#### 4.3 Caractéristiques de la dimension fractale

Plusieurs caractéristiques définissent la dimension fractale. Nous avons principalement l'invariance d'échelle qui nous permet de prévoir un profil ou des structures à toute échelle (Feder, 1988; Peitgen et coll., 1992). De plus, les fractales sont décrites par des fonctions continues auxquelles aucune pente ne peut être associée (Avnir, 1990). Une loi de puissance la définit. L'équation générale suit la forme suivante:

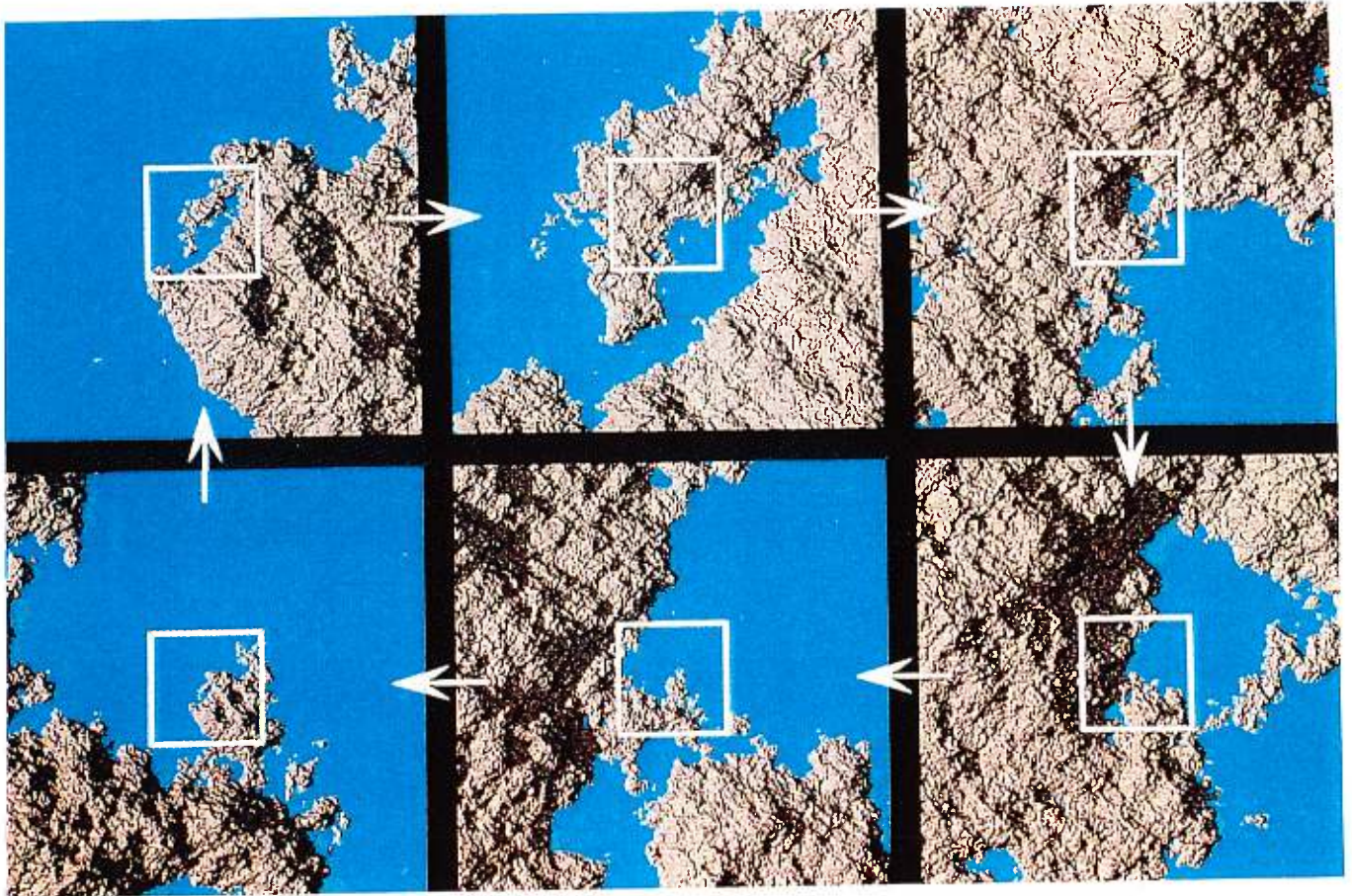
$$L\varepsilon = \lambda\varepsilon^{1-D} \quad (\text{équation 4.1})$$

L'indice,  $D$ , représente la dimension fractale qui définit la capacité d'une forme à remplir l'espace qu'elle occupe (Mandelbrot, 1982). Sa valeur est déterminée par une mesure de pente sur un tracé logarithmique.

La notion de similitude interne fait appel à l'observation des structures d'un objet à n'importe quelle échelle. Les objets fractales naturels tels que les montagnes (Figure 4.2) ou le brocoli romanesco (Figure 4.3) possèdent une similitude interne statistique, c'est-à-dire, que les structures observées ne seront identiques que sur un écart d'échelle donné. Leurs caractéristiques fractales disparaissent à des échelles suffisamment petites. Néanmoins, au dessus d'un certain rang d'échelle, ils apparaissent très semblables à des fractales et c'est à ces échelles là qu'il convient de les considérer comme telles.

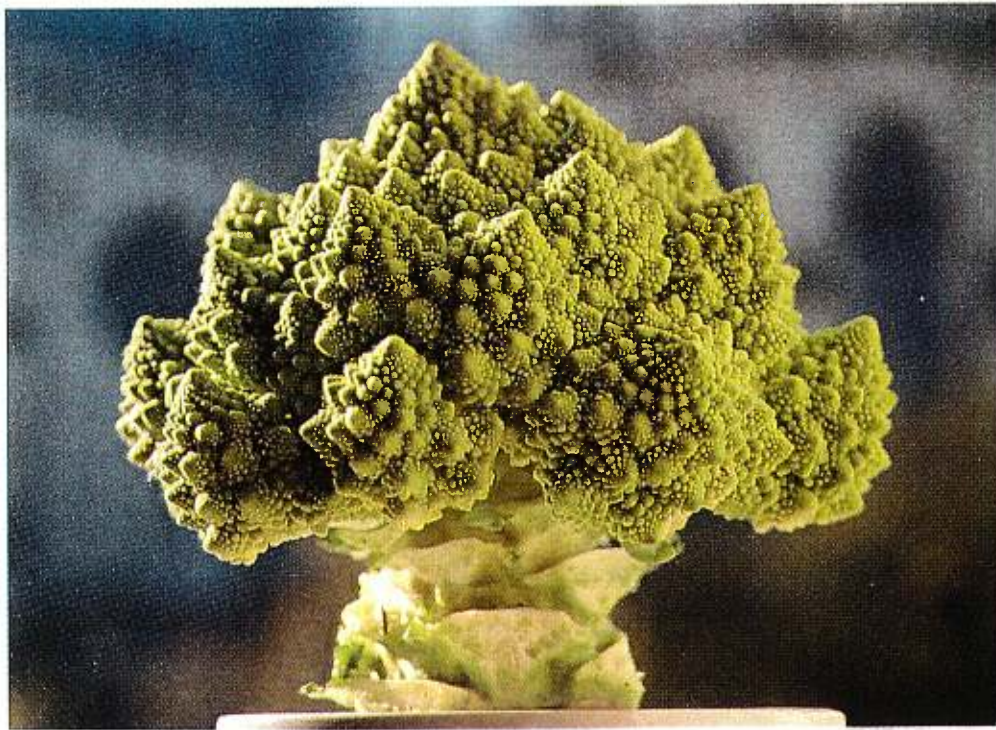
La notion d'affinité interne quant à elle fait allusion aux différents rapports qui existent entre les contractions des axes  $x$  et  $y$  lors de la construction de l'objet (exemple: le mouvement Brownien) (Peitgen et coll., 1992).

Pour illustrer le concept d'invariance d'échelle, prenons un exemple: la courbe de von Koch (Peitgen et coll., 1992) (Figure 4.4). On part avec le segment unité. On divise ce segment en 3 segments de longueur égale et on remplace le segment du milieu par deux côtés d'un triangle équilatéral. On se retrouve avec quatre segments dont la longueur est égale au tiers de celle du segment de départ. On répète cette opération sur chacun de ces segments, c'est-à-dire, on divise chaque segment en trois et on remplace le segment du milieu par les côtés d'un triangle équilatéral. On répète ce procédé à l'infini et la limite nous donne ce qu'on appelle la courbe de von Koch. La courbe de von Koch a cette particularité que chaque partie, une fois grossie, reproduit exactement le tout. On dit alors de cette courbe qu'elle a une invariance d'échelle.



**Figure 4.2** : Structure observée à différents grossissements. Tiré de Peitgen et coll., 1992.





**Figure 4.3:** Brocoli Romanesco. Structures similaires observées à différentes échelles. Tiré de Peitgen et coll., 1992.

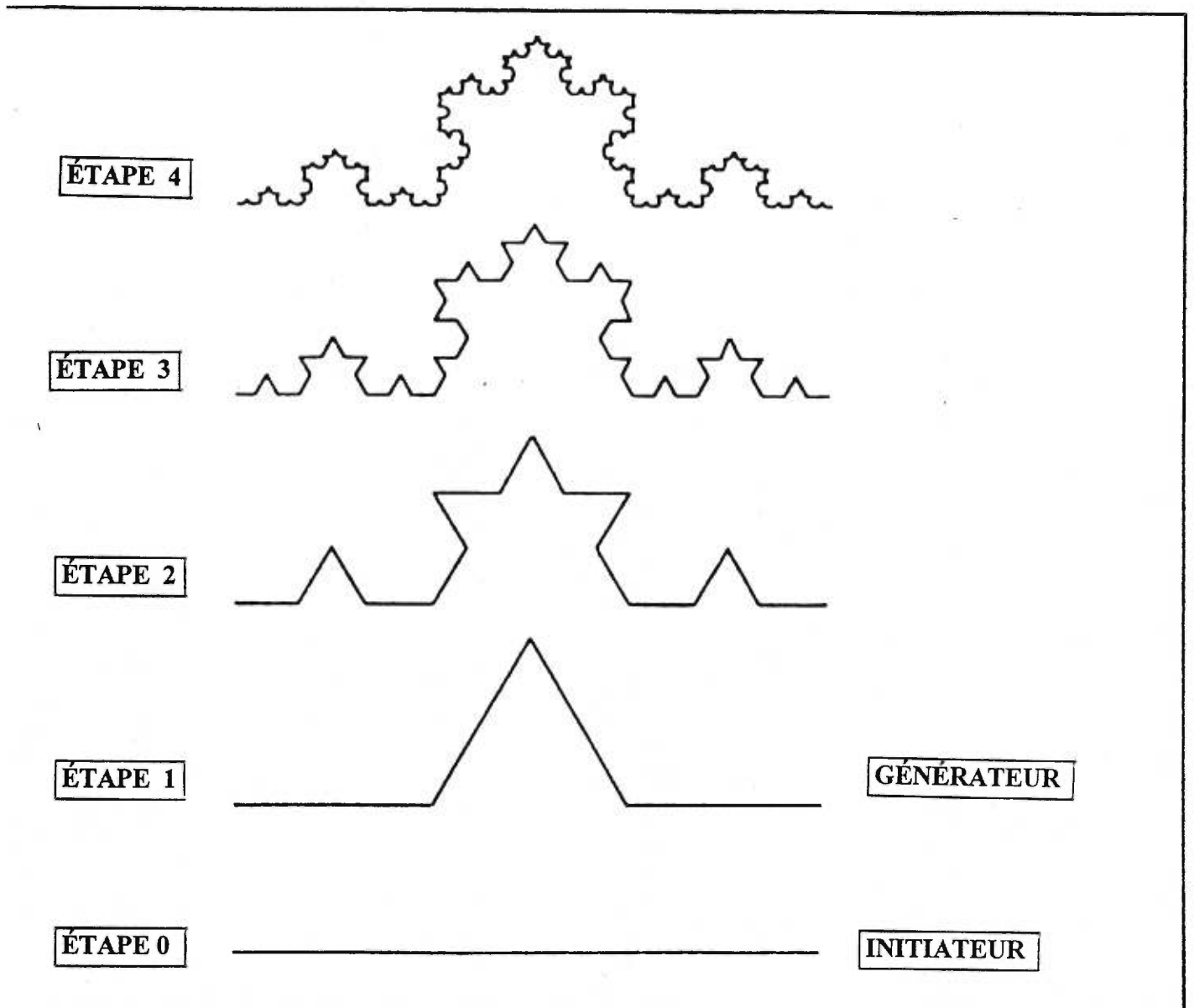


Figure 4.4 : Courbe de Von Koch. Tiré de Peitgen et coll., 1992.

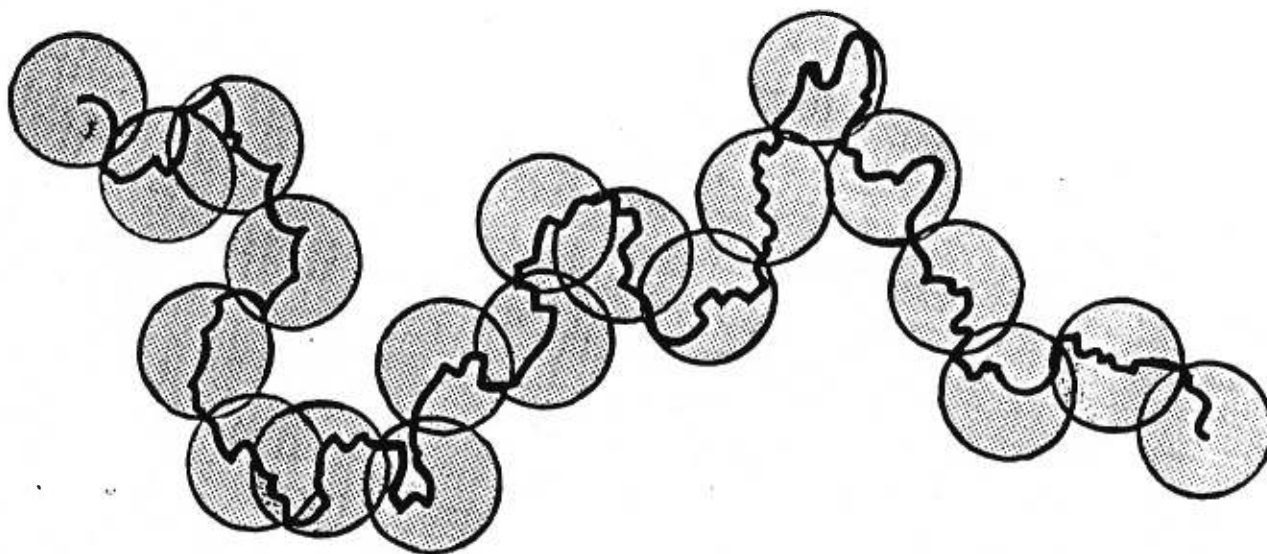
A partir de la définition théorique de la dimension ont été développés des algorithmes de calculs, certains généraux, d'autres spécifiques. La difficulté principale de l'estimation de la dimension fractale vient du fait que c'est une limite qui ne peut, en pratique, qu'être approchée et dont la précision va dépendre de la vitesse de convergence de la méthode (Tricot et Salem, 1994). Il existe de nombreuses définitions de dimensions fractionnaires. Nous nous intéresserons principalement à la dimension de Minkowski-Bouligand, à la dimension de variations, à la dimension de boîtes, et à la dimension de Richardson (compas).

#### 4.4 Calcul de la dimension fractale

##### 4.4.1 Méthode de Minkowski-Bouligand

La dimension de recouvrement de Minkowski-Bouligand présente l'avantage de pouvoir être déterminée expérimentalement à partir d'un analyseur d'images. Le principe consiste à recouvrir une ligne ( $E$ ), par un ensemble de cercles,  $\Delta(E)$ , centrés sur chaque valeur,  $\epsilon$ , de cette ligne. Le ruban obtenu représente la dilatation de la ligne. La pente de la droite de régression sur la partie linéaire (partie où l'on retrouve le moins de variations) du graphe logarithmique ( $\log |\Delta(E)|$  en fonction de  $\log \epsilon$ ) permet l'estimation de la dimension fractale (Avnir, 1990) (Figure 4.5).

$$\Delta(E) = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \left( 2 - \frac{\log |\Delta(E)|}{\log \epsilon} \right) \quad (\text{équation 4.2})$$



**Figure 4.5:** Méthode de Minkowski-Bouligand. Tiré de Tricot et Salem, 1994.

#### 4.4.2 Méthode de variations

Cette méthode a été développée par Claude Tricot (Tricot et coll., 1988) et évaluée expérimentalement par Dubuc et coll., (1989). Elle est applicable et efficace pour des graphes de fonctions ayant une tendance verticale. La méthode de variations découle de celle de Minkowski-Bouligand en poussant à la limite la forme des boules  $\varepsilon$  jusqu'à l'obtention d'un carré plat. Cette méthode laisse entrevoir une meilleure estimation numérique de fonctions avec dimensions fractales connues (Weierstrass-Mandelbrot et mouvement Brownien) dont le pourcentage d'erreur varie entre 0.4% à 1.6% avec l'algorithme des variations (Dubuc et coll., 1987).

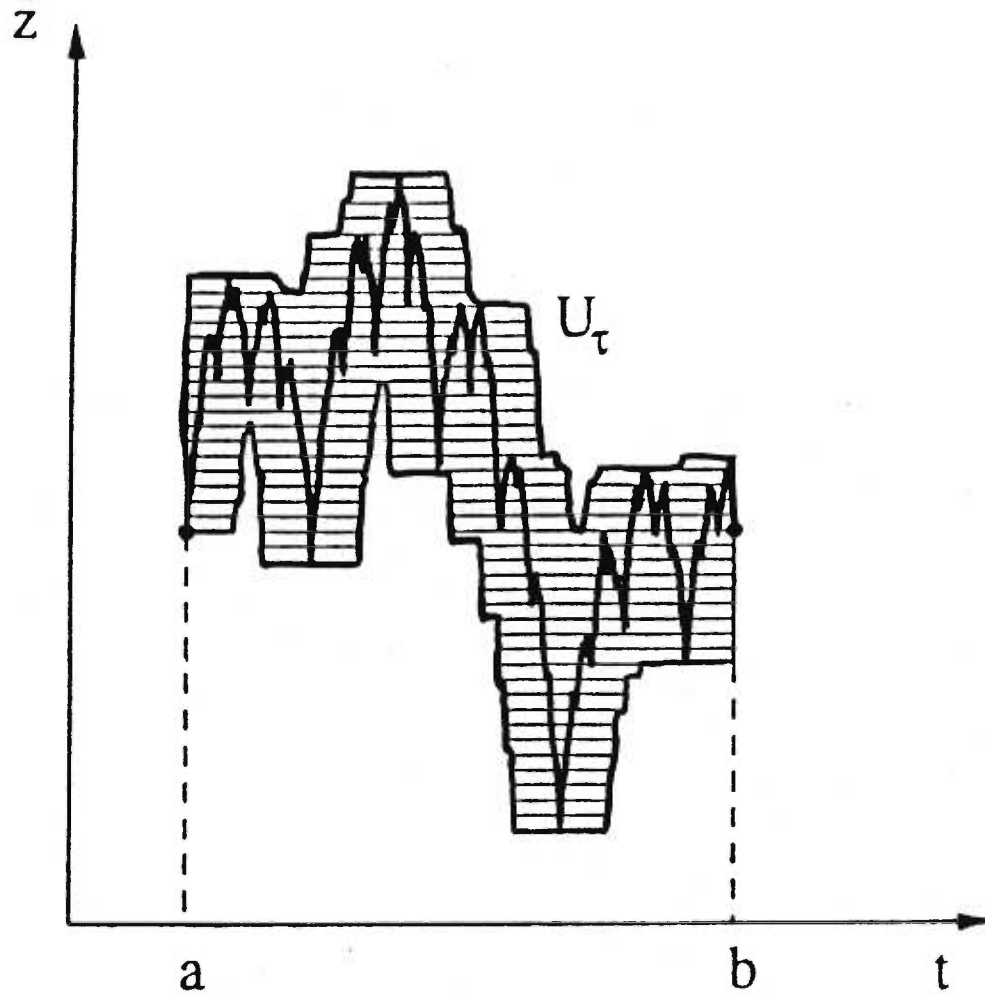
La méthode des variations est déterminée par la surface  $S$  composée de nombreux pics et vallées et dilatée par un segment horizontal de longueur  $2\varepsilon$  pour donner  $S(\varepsilon)$  (l'approximation de  $S$  à l'échelle  $\varepsilon$ ) (Dubuc et coll., 1989) (Figure 4.6). Le volume  $V(S\varepsilon)$ , de cet objet dilaté, est ensuite calculé. C'est le taux de croissance de  $V(S\varepsilon)$  lorsque  $\varepsilon$  tend vers 0 qui est relié à la dimension fractale de l'objet. La relation est la suivante:

$$D = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left[ 3 - \frac{\log V(S\varepsilon)}{\log \varepsilon} \right] \quad (\text{équation 4.3})$$

$D$  représente la dimension fractale de surface. En pratique, elle est obtenue via la pente de la droite de régression du graphe  $\log(1/\varepsilon)$  en fonction du  $\log [V(S\varepsilon)/\varepsilon^3]$ . Cette méthode attribue une tendance verticale au graphique de la fonction qui est étudiée et ceci est particulièrement vrai dans le cas des surfaces rugueuses.

Par ailleurs, la détermination de l'échelle à laquelle l'analyse doit être faite est également importante. La dimension fractale est calculée à l'échelle  $f$ , où  $f$  est la plus petite valeur  $\varepsilon$  pour les données log-log. Lorsque la dimension tend vers un plateau (dimension fractale locale), l'échelle pour l'analyse dans cette région est conservée (Dubuc et Dubuc, 1997).

Au cours des dernières années, l'avènement sur le marché de nouvelles techniques d'investigation ont permis de réaliser une analyse tridimensionnelle des surfaces. Le plus souvent le mouvement en  $x$ , d'un appareil de mesure de profil, est complété par un mouvement en  $y$ . Un balayage de la surface est alors réalisé, avec prise de profils successifs, par incrémentation de la variable  $y$ . Des résultats obtenus avec la méthode des variations a permis de mesurer la dimension fractale de calculs rénaux (Thibert et coll., 1993).



**Figure 4.6:** Méthode des variations. Tiré de Dubuc et coll., 1987.

#### 4.4.3 Méthode du compas

En partant d'une idée de Richardson, la méthode du compas a été utilisée pour l'estimation de courbes à similitude interne par Mandelbrot (1982). Ainsi pour un profil de surface  $z(x)$ , il est possible de calculer une longueur de profil  $L(\eta) = N\eta$  en reportant sur ce profil  $N$  fois un étalon de mesure de longueur  $\eta$  (Figure 4.7).

$$L(\eta) = N \eta^{1-D} \quad (\text{équation 4.4})$$

où  $D$  apparaît sous forme d'exposant. Sa valeur est déterminée par la mesure de la pente sur un tracé log-log de  $L(\eta)$  en fonction de  $\eta$ .



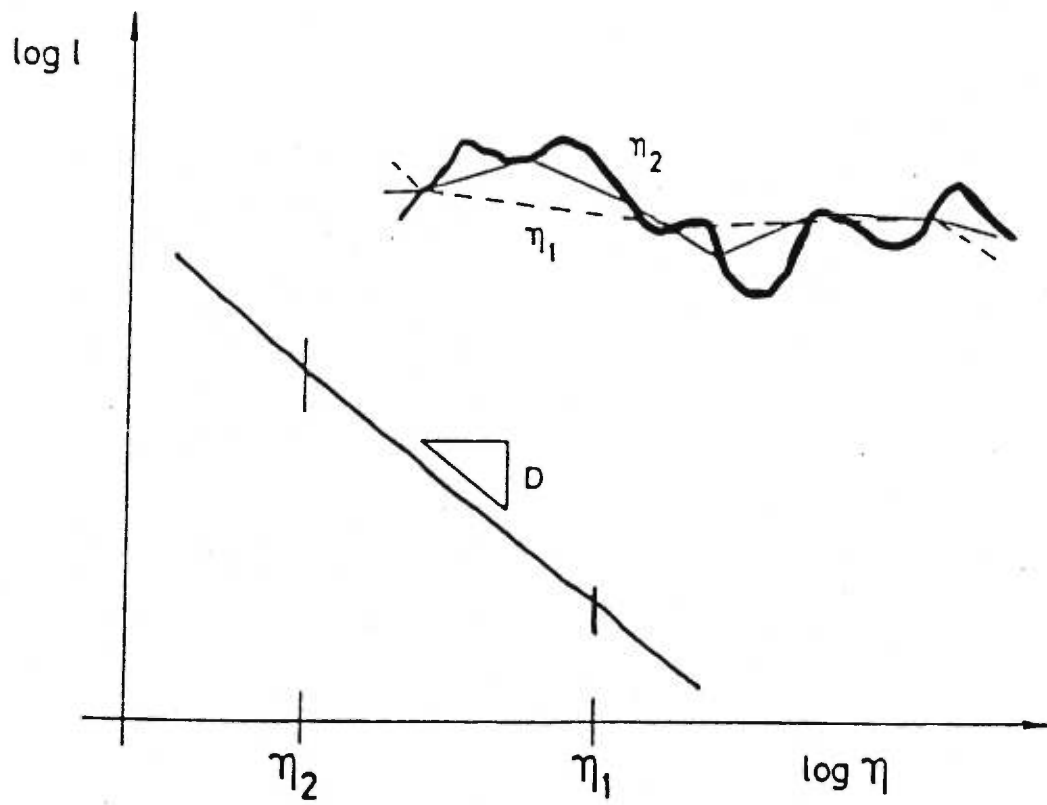


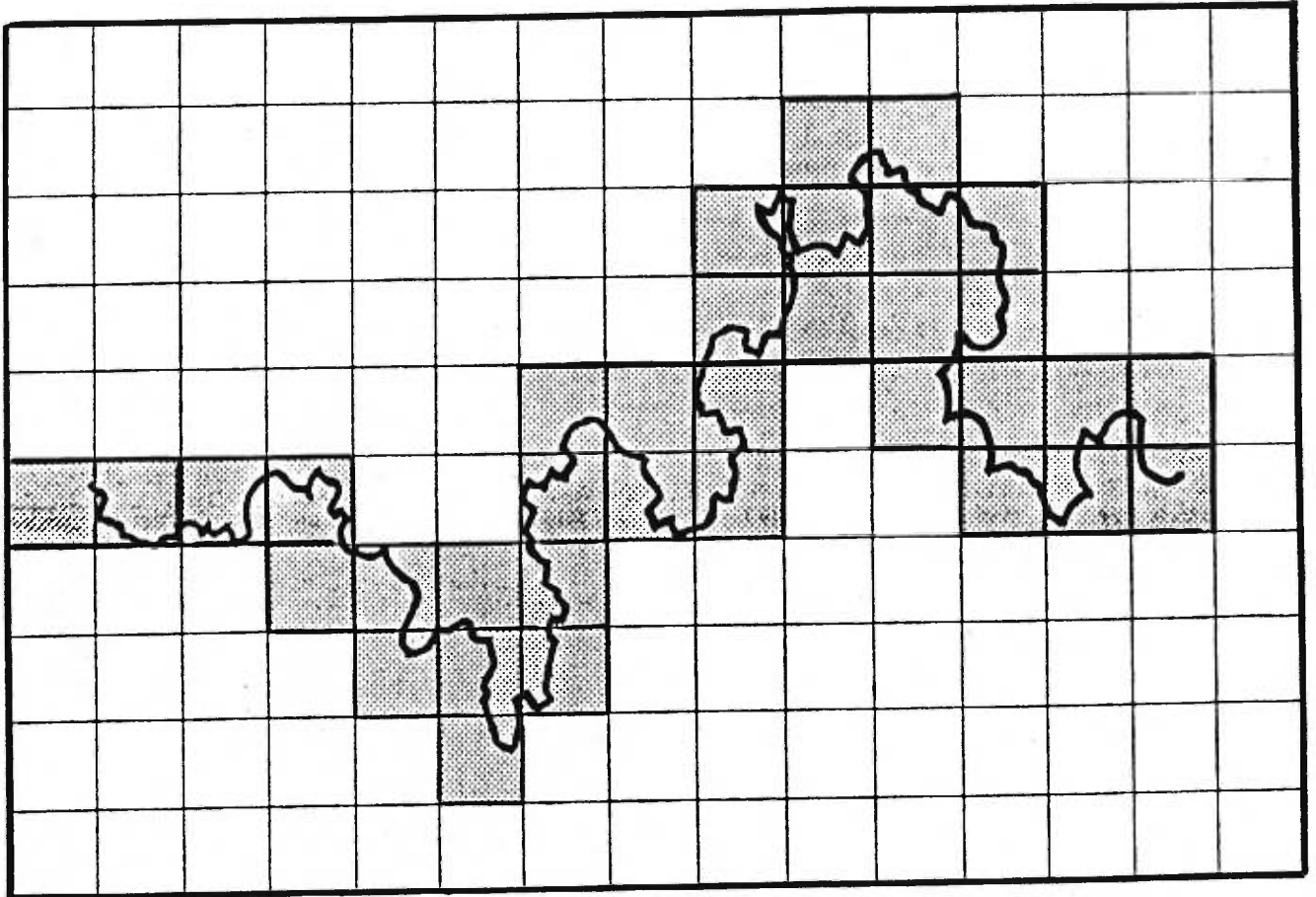
Figure 4.7: Méthode du compas. Tiré de Wright et Karlsson, 1998.

#### 4.4.4 Méthode des boîtes (Box-counting)

Cette méthode consiste à recouvrir un ensemble,  $\Delta(E)$ , par un réseau. Le nombre de boîtes ou de mailles du réseau  $\omega_\varepsilon(E)$  de longueur  $\varepsilon$  qui recouvrent l'ensemble est alors déterminé (Avnir, 1990) (Figure 4.8).

$$\Delta(E) = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\log(\omega_\varepsilon(E))}{\log(\varepsilon)} \quad (\text{équation 4.5})$$

Dans la pratique, on choisit une famille appropriée de  $n$  valeurs décroissantes afin de pouvoir obtenir la meilleure estimation du profil à analyser ( $\varepsilon_1, \dots, \varepsilon_n$ ) (Avnir, 1990). On note alors  $\omega_\varepsilon(E)$ , le nombre de mailles qui recouvrent  $E$ . Le diagramme log-log de  $\omega_\varepsilon(E)$  en fonction de  $\varepsilon$  présente une partie linéaire. La pente de la droite de régression sur cette partie permet l'estimation de la dimension.



**Figure 4.8** : Méthode des boîtes. Tiré de Tricot et Salem, 1994.

## 5- HYPOTHÈSE

Notre projet étudie l'influence de la rugosité de surface vis-à-vis les interactions entre l'interface de l'implant et le tissu vivant. La rugosité de surface est un facteur qui prend de plus en plus d'ampleur, au fur et à mesure, que les mécanismes d'ostéo-intégration sont élucidés. Entre autre, une certaine rugosité de surface favoriserait l'ostéo-intégration orthopédique. Ceci pourrait jouer un rôle essentiel lors de la fabrication et la mise en forme de biomatériaux compatibles et adéquats.

L'hypothèse de notre travail repose sur la description quantitative de cette rugosité de surface par le concept de la dimension fractale. Ce paramètre, grâce à ses caractéristiques invariantes et son indépendance par rapport aux contraintes des méthodes conventionnelles, permet de quantifier une surface par un index de complexité. La caractérisation de la rugosité de surface devient essentielle là où la surface est impliquée en tant qu'interface.

## 6-OBJECTIFS

### 6.1 Objectifs généraux

Les objectifs généraux sont d'apporter une contribution à la caractérisation de surface d'implants (en titane et en cobalt-chrome) avec l'utilisation, principalement, de la dimension fractale. Cet outil peut s'avérer complémentaire à toutes études de rugosité de surface pour l'obtention d'une description quantitative de la complexité d'un objet. Son utilisation éventuelle lors de la fabrication industrielle ou lors du contrôle de qualité d'implants orthopédiques peut être bénéfique.

### 6.2 Objectifs spécifiques

Le but de ce travail est triple. Dans un premier temps, nous avons mis en application une méthode d'analyse de surface par profilométrie optique basée sur la diffusion d'un faisceau laser diode le tout relié à un programme d'analyse fractale (Chapitre 7). L'originalité de la méthode réside principalement dans l'utilisation d'un programme d'analyse fractale qui nous permet d'évaluer la complexité d'une surface tout en permettant sa construction tridimensionnelle.

Dans un deuxième temps, cet indice de dimension fractale est comparé aux paramètres conventionnels et méthodes standards d'analyse de surface telles que la microscopie confocale, la profilométrie tactile et l'analyse d'image (Chapitre 8).

Et dans un troisième temps, une analyse de l'angle de contact et de l'adhésion de macrophages sur les biomatériaux (de titane et de cobalt-chrome) est entreprise afin d'élucider *in vitro* le rôle de la rugosité de surface caractérisée par une dimension fractale (Chapitre 9).

## **DEUXIÈME PARTIE**

## **PRÉSENTATION DES MANUSCRITS**

## **Chapitre 7**

**Surface fractal dimension and the quantification of roughness of titanium implant material.**



## SURFACE FRACTAL DIMENSION AND THE QUANTIFICATION OF ROUGHNESS OF TITANIUM IMPLANT MATERIAL

C. Pimienta, B. Dubuc and R. Tawashi\*

Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada.

(Received for publication August 22, 1994 and in revised form December 27, 1994)

### Abstract

Proper characterization of surface topography is critical for understanding a wide range of chemical and biological processes at the interface. This paper describes a technique to quantify surface complexity, using visible diode laser scattering and fractal geometry. Two samples of plasma-coated titanium plates generated under different spraying conditions were analyzed. These coatings were meant to create a suitable surface for enhanced fixation of a prosthetic device to bone. The goal of the study was to provide a quantification technique for standardization of the coating process. The samples were placed in a dynamic active vision system to measure three-dimensional coordinates on the surface. Surface fractal dimension was assessed over a range of scales, using the variation method. The results show that fractal dimension is a valuable parameter for the determination of surface roughness and for the study of bioadhesion.

**Key Words:** Biomaterials, surface analysis, fractal geometry.

\*Address for correspondence:

Rashad Tawashi  
 Université de Montréal, Faculté de Pharmacie,  
 Montréal (Québec),  
 Canada H3C 3J7

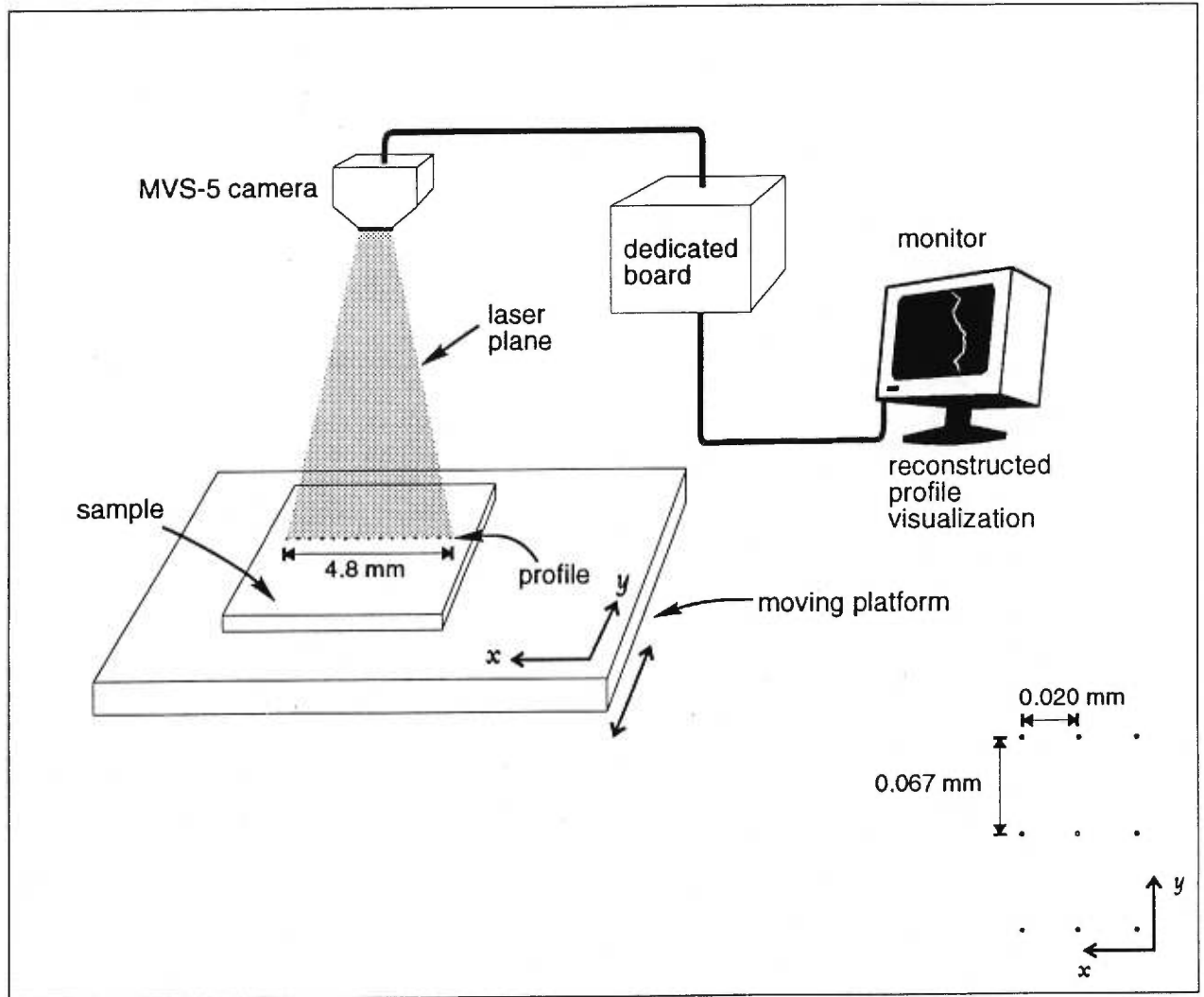
Telephone number: [REDACTED]  
 FAX number: (514) 343-2102

### Introduction

Biomaterials are devices implanted in contact with patient tissues for a significant amount of time (Williams, 1981). These materials include metals, glasses, polymers, ceramics, carbons and composites. Their use in a wide spectrum of disciplines such as ophthalmology, cardiology, neurosurgery, dentistry and orthopedics has contributed to the advancement of biomedical technologies.

Proper characterization of biological interactions and biocompatibility of biomaterials requires a thorough understanding of surface complexity. Biological reactions have been shown to be influenced by surface roughness (Ratner *et al.*, 1987). A number of studies suggest that chemical composition and the morphological nature of surfaces directly determines the cellular response (Brunette, 1986, 1988), susceptibility to infections (Hanson *et al.*, 1980, Ratner, 1988), biocompatibility (Williams, 1981), bacterial adhesion (Cook *et al.*, 1993), and protein adsorption (Anderson *et al.*, 1990). Certain surface features of polymeric materials can influence interactions between cells and materials. Studies have shown that cellular adhesion correlates with the surface energy (Lydon, 1986) and surface charge (van Wachem *et al.*, 1987) of polymers. Environmental topography influences the cellular response to surface microstructures, leading to mechanical interlocking and increasing implant fixation in tissues (Meyle *et al.*, 1993). Surface roughness can modify the biocompatibility response, depending on the implantation site. If the material is implanted into hard tissue, stress of the implant will be distributed over a large surface area. If it is exposed to blood flow, turbulence of the flow as well as thrombus formation will be induced (Albrektsson *et al.*, 1983).

Most studies have mainly provided a qualitative or semi-quantitative appreciation of surface irregularity. A quantitative description of material roughness is crucial not only in the determination of biological interactions but also in the standardization and validation of manufacturing technology. In previous work (Thibert *et al.*,



**Figure 1.** Data acquisition with the MVS LaserVision camera. The MVS-5 camera projects a plane of laser light on the sample, producing a line on the surface. The profile is extracted from the two-dimensional image of the laser reflection on the surface using a MVS LaserVision dedicated board. Profile geometry is then sampled, digitized (we call this the 2 or horizontal axis), and displayed on the monitor. Moving the camera in a perpendicular direction permits scanning of a given region on the surface (the moving direction is defined as the y or longitudinal axis). Spatial sampling resolution is illustrated in the bottom right corner (0.020 mm in x, 0.067 mm in y).

1993), a non-destructive technique was presented for the evaluation of surface roughness of renal stones in three dimensions. The goal of this paper is to quantify the complexity of a surface at a given scale, using a laser vision sensor and surface fractal dimension.

### Materials and Methods

#### Materials

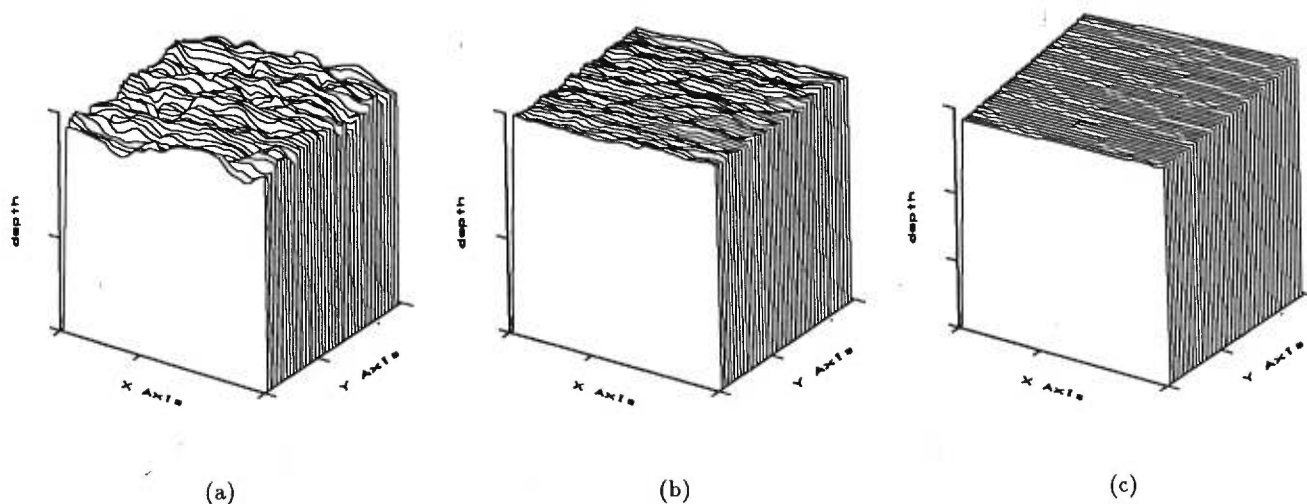
Surface analysis was conducted on two plasma-coated titanium plates (APS Materials Inc., Dayton, Ohio)

generated by thermal spray process. These plasma coatings (Mueller and Bapna, 1993) use an electrical discharge to produce reactive atoms, ions and free electrons from an appropriate gas at low pressure. Volatile compounds formed from plasma elements interact with the material's surface, creating a raspy, hook-like surface which enhances the fixation of prosthetic devices to bone (Ratner *et al.*, 1987).

#### Data acquisition

Data were acquired by optical profilometry (Cielo,

## Quantification of the roughness of biomaterials



**Figure 2.** Three-dimensional plots of regions of the selected samples: (a) coarse, (b) fine and (c) uncoated. Each plot was generated by selecting a 120 x 120 pixels region on each image, applying a median filter (with a 5 x 5 pixels spatial extent), and then displaying with sub-sampling at every 3 points.

1988) with a MVS-5<sup>®</sup> LaserVision<sup>®</sup> (Modular Vision Systems, Montreal, Quebec, Canada) sensor. The MVS-5 camera had a 50  $\mu\text{m}$  thick laser plane and a lateral field view of 4.8 mm. Each profile (4.8 mm wide) had 240 points, leading to a horizontal sampling spacing of 0.020 mm (Fig. 1). In the other direction, data were acquired at a speed of 2 mm/s at the rate of 30 Hz. Sampling spacing was 0.067 mm. An important factor to consider is that, due to speed control limits of the moving platform, sampling was not spatially isotropic: 0.020 mm between samples in one direction, 0.067 mm in the other (Fig. 1, bottom right). This has an effect on the determination of scale range and will be discussed further in this paper.

Two titanium plasma-coated surfaces (referred to as surface A and surface B), and an uncoated surface (surface C) were scanned and analyzed. Surface A had a coarser texture than surface B. Surface C constituted a reference point. Three samples (4.8 mm x 24 mm) of each surface were scanned. At each position on the sample, a value for the height of surface,  $z(x,y)$ , was obtained from a dedicated vision processor board attached to the MVS-5 camera. This board extracts the centroid of the laser line reflection pattern in the camera field of view, giving in real time, the relative depth profile of the studied surface. Figure 2 presents a three dimensional (3D) reconstruction of the acquired data. In these graphs, the value of the function correlates with height on the profile. Although it is difficult to see from the reconstructed graphs, depth variance over the regions studied was very small. This had dramatic effects on

the estimation of fractal dimension. Two alternatives were considered: (i) correction of the data, or (ii) using the camera with finer depth resolution. The second option was not possible due to the limits of the system. We therefore chose the first option and obtained astounding results.

#### Data analysis

In materials science, the characterization of surface roughness is done by first measuring the altitude  $z(x,y)$  of different points of the surface  $S$  with respect to a reference plane, by tactile or optical techniques for instance. The function  $z(x,y)$  being often considered to be a random variable, statistical methods based on the determination of the correlation function, height distribution moments, power spectral density, have led to the establishment of various standards for the characterization of roughness such as ISO 468 (1982) and BS 1134 (1988). However it turns out that:

- (1) all the criteria or parameters are dependent on the sampling length;
- (2) the results are highly dependent on the amplitude of the signal; and
- (3) the systematic reference to a Gaussian distribution is not always justified.

The search for alternatives methods to quantify roughness therefore became a concern. Over the past, it has been shown that many of these rough surfaces could be modelled as fractals, i.e., as surfaces with a non-integer index of dimension taking values between 2 and 3 which correlate with the space-filling property of

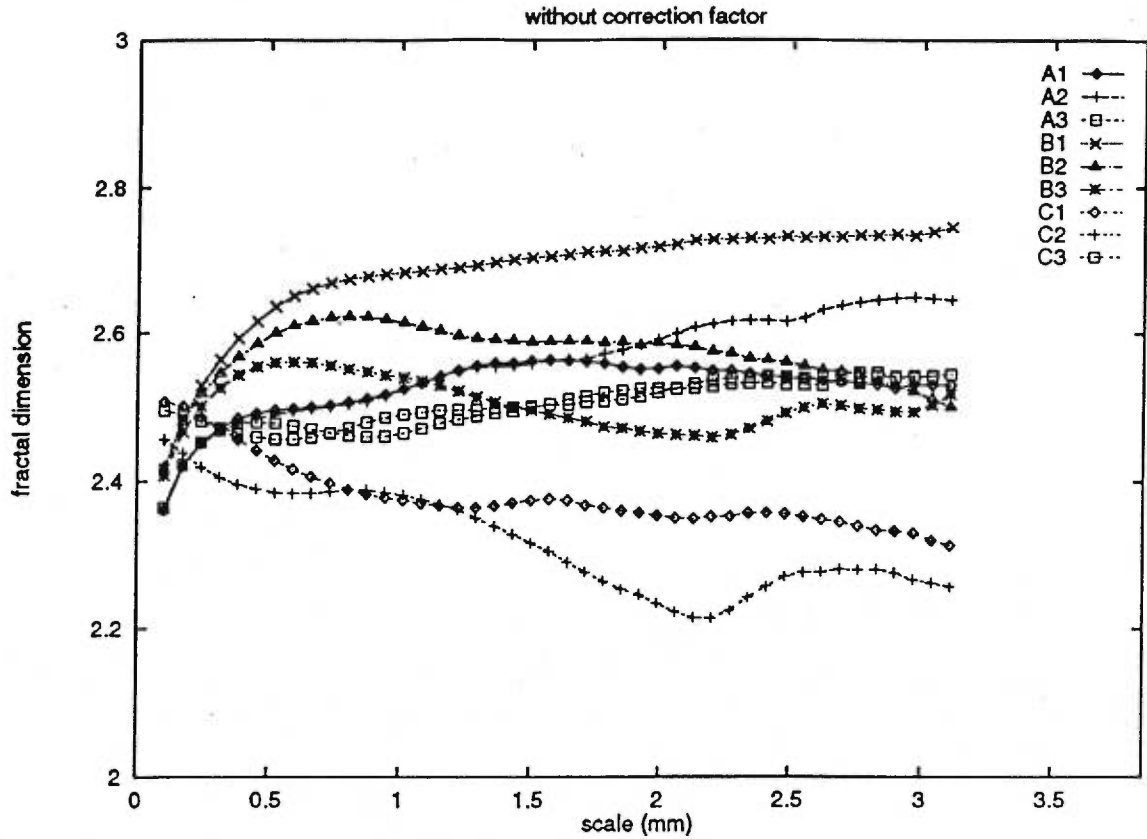


Figure 3. Fractal dimension over a range of scales for two samples. The legend in the top right corner indicates which patch was analyzed. The letters (A, B or C) identify the surface while the numbers (1, 2 or 3) identify the sample. The fractal dimension is obtained here by fitting a straight line to the  $\log(1/\epsilon)$ ,  $\log\{(|S(\epsilon)|_3)/\epsilon^3\}$  data.

the object (Mandelbrot, 1992). Very jagged surfaces with many peaks and valleys will have a dimension around 3.0, while surfaces with smooth rounded peaks will have values closer to 2.0. As was pointed out by Wehbi (1986), with the use of fractal analysis, two parameters could be sufficient to define and model the surface topography: (i) the non-integer fractal dimension  $\Delta(S)$ , and (ii) the scale  $\delta$  at which the complexity is determined.

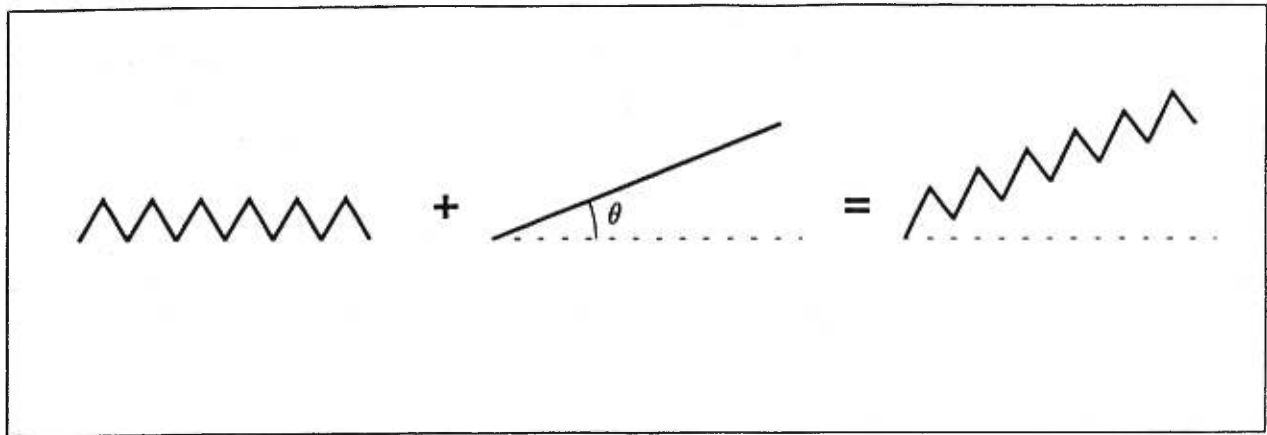
In this study, fractal dimension was assessed by the variation method (Dubuc *et al.*, 1989). Surface  $S$  was first dilated (Serra, 1982; Tricot *et al.*, 1988) by a horizontal square of side  $2\epsilon$  to give  $S(\epsilon)$ , the approximation of  $S$  at scale  $\epsilon$ . Then, volume  $|S(\epsilon)|_3$  of this dilated object was calculated. The rate of growth of  $|S(\epsilon)|_3$  when  $\epsilon$  tends to 0 is related to the fractal dimension of the object in the following way:

$$\Delta(S) = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \left[ 3 - \frac{\log |S(\epsilon)|_3}{\log \epsilon} \right] \quad (1)$$

where  $\Delta(S)$  is the surface fractal dimension. In practice, however,  $\Delta$  is obtained as the slope of a straight line fit to the log-log plot  $[\log(1/\epsilon); \log\{(|S(\epsilon)|_3)/\epsilon^3\}]$ . In this study, instead of calculating the growth rate around 0, the dimension was estimated at a particular scale  $\delta$  for the following reasons: (i) the limits of the resolution prevents the analysis to be done at 0; (ii) it can be shown that close to the resolution, a lot of numerical errors occur in the estimation of the dimension (Dubuc and Dubuc, in press); (iii) the problem at hand is dictating the scale at which the analysis should be done. It will be shown in the next section that plotting fractal dimension as a function of scale provides a means of choosing the appropriate scale to characterize the complexity of the various samples.

#### Determining the scale

As mentioned before, fractal dimension is obtained by applying a straight line fit to a collection of log-log data. The dimension is calculated at scale  $\delta$ , where  $\delta$  is the smallest  $\epsilon$  for the log-log data. Moreover, the "real



**Figure 4.** Tilting to improve the data. Correction of a profile is illustrated here. An hypothetical depth profile is pictured on the left. The middle section shows the correcting linear function (tilt with angle  $\theta$ ), while the result of correction (the sum of the two) is seen on the right.

world" relative value for  $\epsilon$  is obtained from the sampling specifications. Dilation being done on a pixel basis (Dubuc *et al.*, 1989), if  $k$  is the number of dilating pixels, the value for  $\epsilon$  will be:

$$\epsilon = (k + 0.5)f$$

where  $f$  is a scaling factor equal to half the diameter of pixel size in world coordinates. In our case, each pixel was 0.020 mm x 0.067 mm in size (see previous section and Fig. 1) leading to  $f = 0.70 \mu\text{m}$ .

### Results and Discussion

Analysis was first done on the raw data without filtering or correction. The results of the variation method over a range of scales (between 0.1 mm and 3.2 mm) are shown in Figure 3. From this figure, it is almost impossible to define a classification scheme for the various surfaces. Scattering of the data is due to the fact that the variation method does not perform well when the data are almost constant. Dilation should be done in a direction normal to the local structure of the set. Adding a plane to the data (tilting, see Fig. 4) will induce a correction that will greatly improve segregation. These results are shown in Figure 5. The added plane had a slope angle of  $45^\circ$  (Fig. 4). The results obtained are distinctly better although the dilation is not normal to the surface. The key point is that it has not been done in a direction parallel to the local structure (Dubuc and Tawashi, 1995).

The choice of tilt angle has been performed to allow a maximum separation between the samples. A better understanding of the expected separation as a function of

**Table 1.** Data analysis using the variation method. The letters (A, B or C) identify the surface while the numbers (1, 2 or 3) identify the sample. For this example, we set the scale at 1.2 mm in all cases. Note the consistency of the results within each sample yet they are significantly different within each surface.

Sample	Surface A	Surface B	Surface C
1	2.32	2.20	2.09
2	2.31	2.20	2.09
3	2.31	2.20	2.09

the tilting angle could be obtained, but most importantly, one should try to assess the complexity from the local estimates of the object (tangent planes) much in the way as was done for curves in Dubuc and Zucker (1994).

Figure 5 shows that for small scales, complexity seems to vary before stabilizing. This is due to the fact that the scale is close to the resolution and is a known phenomenon in the estimation of fractal dimension (Dubuc and Dubuc, in press). A scale larger than 1.0 mm would be an appropriate choice. We chose to set the scale at 1.2 mm and concentrated on values of dimension for the different samples. We used this as an index of complexity. These results are presented in Table 1. It can be seen that the values are consistent within each surface. Between surfaces, the values are significantly different, and correlate with our intuitive perception of roughness.

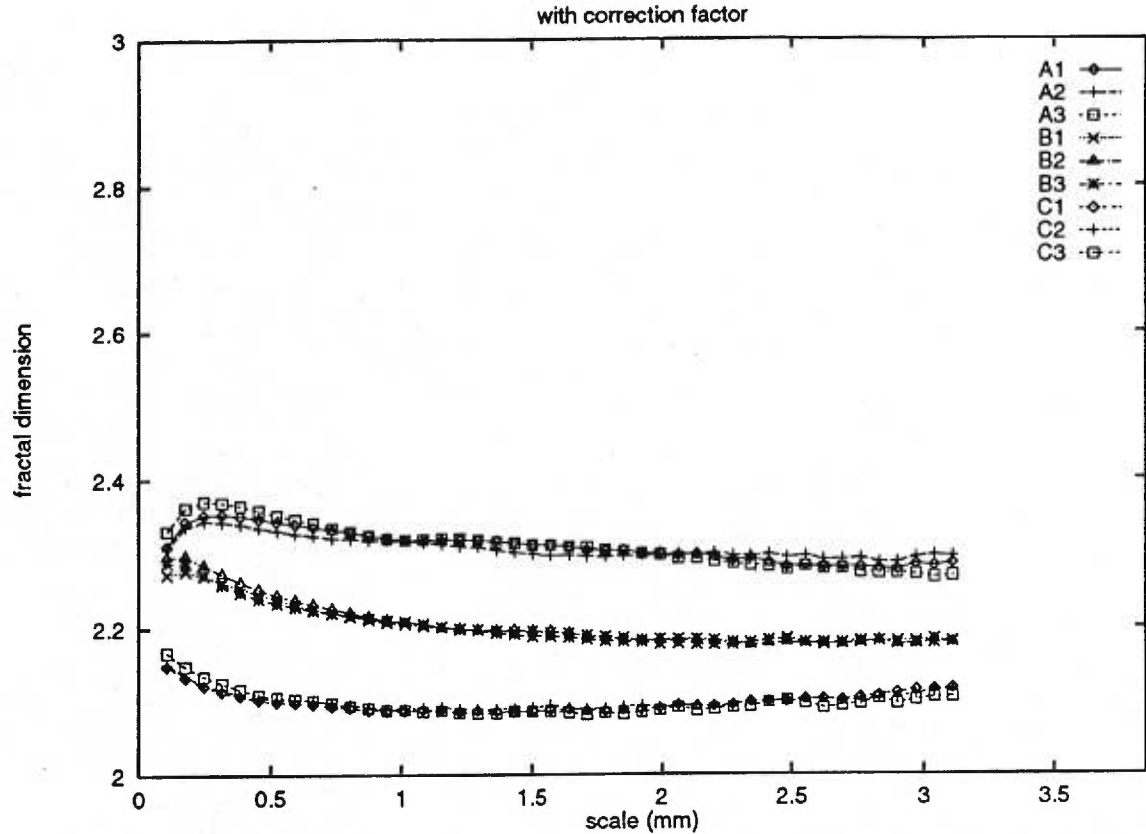


Figure 5. Fractal dimension over a range of scales for various samples. The legend in the top right corner indicates which patch was analyzed. The letters (A, B or C) identify the surface while the numbers (1, 2 or 3) identify the sample. The surface data were tilted to allow better performance of the variation method. This figure clearly shows segregation of the three types of surfaces, suggesting a robust estimator of the roughness of surfaces.

This study provides a practical protocol for testing the complexity of the surface of titanium implants and similar biomaterials. It depends basically on:

- (1) use of the MVS-5 camera to acquire 3D data (sampling resolution of 0.02 mm, moving platform at 2 mm/s at a 30 Hz sampling frequency with 0.01 mm depth resolution);
- (2) correction by adding a plane with a slope of 45°; and
- (3) calculation of fractal dimension at the 1.2 mm scale and its use as the index of complexity.

### Conclusion

The surface structure of biomaterials to a great extent influences biological interactions at the interface. A powerful analytical tool is essential to guide the development of biomedical implants and to find correlations between surface interactions and their environment. We propose a non-destructive technique which allows us, under specific conditions, to obtain an index of the com-

plexity of surfaces at a given scale. This method could determine limits for the surface roughness of titanium implants and similar biomaterials. It also improves the with correction factor validation of manufacturing technologies, and the standardization of surface properties of biomaterials.

### Acknowledgements

The authors thank the MVS Company (Montreal, Quebec, Canada) for acquiring and providing the depth data. This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada.

### References

- Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Kasemo B, Larson K, Lundstrom I, McQueen DH, Kalak RS. (1983) The interface zone of inorganic implants in vivo: Titanium implants in bone. *Ann. Biomed. Eng.* 11, 1-27.

## Quantification of the roughness of biomaterials

- Anderson JM, Bonfield TL, Ziats NP. (1990) Protein adsorption and cellular adhesion and activation on biomedical polymers. *Int. J. Artif. Organs* 13, 375-382.
- Brodmann R, Allgauer M. (1988) Comparison of light scattering from rough surfaces with optical and mechanical profilometry. In: *Surface Measurement and Characterization*. Proc. SPIE 1009, 111-117.
- Brunette DM. (1986) Spreading and orientation of epithelial cells on grooved substrata. *Exp. Cell Res.* 167, 203-217.
- Brunette DM. (1988) The effect of surface topography on cell migration and adhesion. In: *Surface Characterization of Biomaterials*. Ratner BD (ed.). Elsevier, New York. pp. 203-217.
- BS 1134. (1988) Assessment of Surface Texture. Part I: Methods and Instrumentation. Part II: Guidance and General Information (1990). British Standards Institution, Milton Keynes, U.K.
- Chesters S, Wang H-C, Kasper G. (1991) A fractal-based method for describing surface texture. *Solid State Technol.* 34(1), Jan., 73-77.
- Cielo P. (1988) Surface Inspection. In: *Optical Techniques for Industrial Inspection*. Academic Press, San Diego. Chapter 4, pp. 185-212.
- Cook AD, Sagers RD, Pitt WG. (1993) Bacterial adhesion to poly(HEMA)-based hydrogels. *J. Biomater. Res.* 27, 79-126.
- Dubuc S, Dubuc B. (in press) Error bounds on the estimation of fractal dimension. *SIAM Num. Anal.* (Soc. Industrial and Applied Mathematics).
- Dubuc B, Tawashi R. (1995) Quantifying the complexity of small-scale 3d laser range data. In: *Electronic Imaging: Science and Technology*. SPIE Proc. 2412, 8-10.
- Dubuc B, Zucker SW. (1994) Curve-like sets, complexity maps and representation. CIM Technical Report 94-02, McGill University, Center for Intelligent Machines, Montreal, Canada. Available at McGill Univ. Library.
- Dubuc B, Zucker SW, Tricot C, Quiniou J-F, Wehbi D. (1989) Evaluating the fractal dimension of surfaces. *Proc. R. Soc. Lond. A* 425, 113-127.
- Hanson SR, Harker LA, Ratner BD, Hoffman AS. (1980) In vivo evaluation of artificial surfaces with a nonhuman primate model of arterial thrombosis. *J. Lab. Clin. Med.* 95, 289-304.
- ISO 468. (1982) Surface Roughness Parameters: Their Values and General Rules for Specifying Requirements. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Lydon MJ. (1986) Synthetic hydrogels as substrata for cell adhesion studies. *Brit. Polym. J.* 18, 22-27.
- Mandlebrot BB. (1982) *The Fractal Geometry of Nature*. W.H. Freeman, New York. p. 486.
- Meyle J, Wolburg H, von Recum AF. (1993) Surface micromorphology and cellular interactions. *J. Biomater. Appl.* 7, 362-374.
- Mueller HJ, Bapna, MS. (1993) Microstructure enhancement of dental composite and ceramic materials by plasma etching. *Cells and Materials* 3, 37-43.
- Ratner BD. (1988) How finely can we resolve surface structure? In: *Surface Characterization of Biomaterials*. Ratner BD (ed.). Elsevier, New York. pp. 13-36.
- Ratner BD, Johnston AB, Lenk TJ. (1987) Biomaterials surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* 21(A1 Suppl.), 59-90.
- Serra J. (1982) Hit or Miss Transformation, Erosion and Opening. In: *Image analysis and mathematical morphology*. Academic Press, San Diego. Chapter II, pp. 34-92.
- Thibert R, Dubuc B, Dufour M, Tawashi R. (1993) Evaluation of the surface roughness of cystine stones using a visible laser diode scattering approach. *Scanning Microsc.* 7, 555-561.
- Tricot C, Quiniou J-F, Wehbi D, Roques-Carnes C, Dubuc B. (1988) Evaluation de la dimension fractale d'un graphe (Evaluation of the fractal dimension of a graph). *Revue Phys. Appl.* 23, 111-124.
- van Wachem PB, Hogt AH, Beugeling T, Feijen J, Bantjes A, Detmers JP, van Aken WG. (1987) Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge. *Biomater.* 8, 323-328.
- Wehbi D. (1986) Approche fractale de la rugosité des surfaces et implications analytiques (Fractal approach of surface roughness and analytical implications). These de docteur ingénieur, ENSMM, Besançon, France.
- Williams DF. (1981) Biomaterials and biocompatibility. In: *Fundamental Aspects of Biocompatibility*. Vol. 1. CRC Press Inc., Boca Raton, FL. pp. 1-7.

## Discussion with Reviewers

**D.M. Brunette:** Would this method work for materials which are not as reflective as Ti?

**Authors:** The measurement is based on a triangulation principle and it is the scattered light rays that are detected and used to calculate the height of the surface at a given position (Cielo, 1988). The diffused reflected rays are those that count and the method will perform at its best for surfaces that are not too reflective. In the case presented in this paper, the texture of the surface was adequate to perform the measurement at the chosen scale and resolution.

**D.M. Brunette:** How do the results of your measure-

ment system compare with that of profilometry and confocal laser scanning microscopy?

**Authors:** During our preliminary experiments, we found that the texture of the sample was in some cases too coarse (Brodmann and Allgauer, 1988) to be analyzed by a mechanical profilometer. Moreover, we were originally seeking a non-destructive technique. Another advantage of the measurement technique used in this paper is its speed which allows us to perform the assessment of surface complexity almost in real time, a key factor for controlling the manufacturing process. As far as confocal microscopy is concerned, we do not have the results on this particular set at hand but studies are under way.

**T. O. Albrektsson:** How is the measuring equipment being calibrated?

**Authors:** Calibration is done once and for all when the sensor is built. A target with 5 points is used to determine the interrelation between the image values and the camera displacements. A simple set of equations with eight coefficients obtained by the camera calibration procedure then describes the camera space and all the range points can be calibrated.

**X. Maldagne:** The method allows to obtain a quantitative relative measurement of roughness between different specimens. Would it be possible to somehow link these relative measurement with some absolute values assessing roughness (such as surface texture standards)? Such possibility would be very exciting for comparing values obtained by different measurement techniques.

**Authors:** We do not know the formal relationship between our complexity measure and the texture standards. However, the problems with the existing standards and the motivation for using the fractal dimension as an index of complexity have been mentioned in the text. It has also been shown in the past that the fractal dimension could "provide a picture of surface roughness that is more detailed than roughness parameters" (Chesters *et al.*, 1991).



## **Chapitre 8**

**Quantifying the surface geometry of titanium implant material by different methods of analysis.**

## QUANTIFYING THE SURFACE GEOMETRY OF TITANIUM IMPLANT MATERIAL BY DIFFERENT METHODS OF ANALYSIS

Clara Pimienta<sup>1,\*</sup> and Rashad Tawashi<sup>1,§</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada; <sup>§</sup>Retired

(Received for publication December 24, 1996 and in revised form November 16, 1998)

### Abstract

Biomaterial implant manufacturers have used rough surfaces to ensure better biocompatibility, less rejection and better adaptation of implants in the body. Proper characterization of biological interactions and biocompatibility of biomaterials requires a thorough understanding of surface complexity. Surface roughness has often been shown to be important in influencing biological reactions with the surface. Previous communications from our laboratory have described a dynamic active vision system (MVS camera) capable of measuring three-dimensional coordinates of titanium implant material surfaces. Fractal analysis, due to its straightforward relationship to texture, is used to characterize the degree of irregularity of a surface and is expressed over a range of scales with the variation method. This paper compares the fractal approach with the results of image analysis, tactile profilometry, and confocal microscopy. The data obtained in these studies show that surface fractal dimension, in particular, can be a valuable parameter to describe the complexity of surface of titanium implant materials.

**Key Words:** Fractal analysis, surface roughness, tactile profilometry, image analysis, confocal microscopy, biomaterials.

### Introduction

The goal of osseointegration of orthopedic implants is the rapid and reliable achievement of mechanically stable, long-lasting fixation between living bone and textured implant surface (Taylor and Gibbons, 1983; Meyle *et al.*, 1993). Textured surfaces can be produced by the application of plasma-spray coatings (Wang *et al.*, 1993) or through sandblasting of the surface (Gotfredsen *et al.*, 1995; Ong *et al.*, 1996). Titanium has long been a material of choice for many orthopedic and dental implant prostheses because it is lightweight and durable. It can easily be prepared in many different shapes and textures without affecting its biocompatibility. The spontaneous production of an inert oxide layer on its surface upon exposure to air is believed to be responsible for the high corrosion resistance exhibited by titanium (Quinquis *et al.*, 1993).

Surface composition (Wong *et al.*, 1995), surface energy (den Braber *et al.*, 1995), surface roughness and topography (Chehroudi *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1995; Piatelli *et al.*, 1996; Norton, 1998) all play a role in determining the surface characteristics of implants and success or failure at the bone-biomaterial interface (Brunette, 1988; Brunette *et al.*, 1991; Schwartz and Boyan, 1994; Gray *et al.*, 1996; Esposito *et al.*, 1998). Many *in vivo* studies have demonstrated better anchorage of bone implants if they have rough surfaces (Carlsson *et al.*, 1988; Gotfredsen *et al.*, 1995; Wennerberg *et al.*, 1996b; 1998). Several authors measured the torque removal force of orthopedic screws with different surface treatments and found a general trend of increasing removal torque with increasing surface roughness (Chong-Hyun and Dong-Hoo, 1994; Wennerberg *et al.*, 1995; 1996a, b; Han *et al.*, 1998). Thomas and Cook (1985) reported that implants with a rough surface had greater interface strength and higher surface coverage by bone than smooth polished implants which tended to be encased by fibrous tissue. Wennerberg *et al.* (1996b) investigated the histologic response to rough and smooth implants in cancellous bone. Implants blasted with 75  $\mu\text{m}$   $\text{Al}_2\text{O}_3$  particles showed statistically significant differences with respect to percentage bone-

\*Address for correspondence:

Clara Pimienta  
Université de Montréal, Faculté de Pharmacie,  
Case postale 6128, Succ. Centre-Ville,  
Montréal (Québec)  
Canada H3C 3J7

Telephone number: [REDACTED]  
FAX number: (514) 343-2102

o-metal contact

**Table 1.** Surface fractal dimension data on titanium biomaterial surfaces obtained by laser-active 3D vision described in Pimienta *et al.* (1994). Measurements were performed in triplicate and are significantly different ( $p \leq 0.05$ ).

	Coarse titanium (A)	Fine titanium (B)	Uncoated surface (C)
Surface fractal dimension	$2.31 \pm 0.0$	$2.20 \pm 0.0$	$2.09 \pm 0.0$

compared to machined implants after 12 weeks in rabbit bone.

Quantitative description of the roughness of materials and the search for new tools to characterize surfaces are becoming more important not only to assess the effect of roughness on biological interactions (Taborelli *et al.*, 1997; Bourauel *et al.*, 1998) but also to simplify the reproduction of specimens (Ratner *et al.*, 1987) and to reduce batch to batch variations. Roughness can be visualized by scanning electron microscopy or light microscopy at different levels of resolution. However, quantifying the degree of roughness can be time-consuming and complex (Lausmaa and Kasemo, 1990).

Although surface topology can greatly influence osseointegration of an implant material, it is difficult to assess which of the various parameters for quantifying surface topology are the most appropriate. Surface roughness is often characterized by measuring the altitude of different points of the surface with respect to a reference plane by means of tactile or optical techniques (Cielo, 1988). Instruments with different resolutions and scan lengths yield different values of these statistical roughness parameters for the same surface. The underlying problem with conventional methods is that although rough surfaces contain roughness on a large number of length scales, characterization parameters depend entirely on instrument resolution or sample length. A logical solution to this problem is to use scale invariant parameters to characterize rough surfaces.

The notion of fractal dimension is very close to our intuitive definition of roughness (Pentland, 1984, 1985). Mandelbrot's (1982) original definition of a pure fractal object includes another aspect, namely, infinite scaling or self-similarity. This means that no matter at what magnification we observe such a fractal object, its texture and hence its fractal dimension remain the same. Fractal dimension is directly related to the regular notion of dimension and is not an integer but rather a fractional number (between 1 and 2 for a curve, and between 2 and 3 for a surface) correlating with the space-filling property of a curve or surface (Chesters *et al.*, 1989; Gagnepain and Roques-Carmes, 1986).

The objective of this study was to characterize the surface roughness of titanium implant materials by comparing the roughness parameters of samples by tactile profilometry, confocal microscopy and image

analysis of boundary lines (used to confirm the thickness of coating) with those previously derived from three-dimensional (3D) surface analysis and using the fractal approach.

### Materials and Methods

All measurements were conducted on two plasma-coated titanium plates and an uncoated control plate (APS Materials Inc., Dayton, Ohio). The titanium plates were coated by the manufacturer with titanium particles deposited on commercially pure titanium surfaces by thermal spray process. Basically, thermal spray coatings are applied by injecting materials into an electric arc flame where they are heated to a molten or semi-molten state and propelled onto the substrate at high velocities. The coating is deposited particle by particle until the desired thickness is achieved. The capability of plasma to alter surface physical and chemical properties without affecting the bulk properties of materials is advantageous in the design, development and manufacture of biocompatible biomaterials (Nicholson, 1983; Ratner *et al.*, 1987). The samples were used as received from the manufacturer. The surface topology of each sample was examined by scanning electron microscopy (SEM, JEOL JSM-820, JEOL USA, Peabody, MA).

#### Laser-active 3D vision system

The laser-active 3D vision system allows the measurement of 3D coordinates on sample surfaces. We have described the experimental details of this method in an earlier report (Pimienta *et al.*, 1994). Briefly, two titanium plasma-coated surfaces (A and B) and an uncoated surface (C) were analyzed. Scanning electron micrographs showed that surface A had a coarser texture than surface B. Surface C constituted a reference point. Three areas (4.8 mm x 24 mm) of each surface were scanned. At each position on the sample, a value for the height of surface  $z(x,y)$  was obtained from a dedicated vision processor board attached to a MVS-5 camera (Modular Vision Systems, Montreal, Quebec, Canada).

Data were acquired by optical profilometry and processed to obtain 3D reconstruction depth profiles of the study surface (Table 1 and Figure 1). Surface fractal dimension was determined over a range of scales with the variation method (Dubuc *et al.*, 1989). The surface roughness of each imaged area was evaluated quantitatively using the instruments

## Assessment of surface roughness of titanium implant material

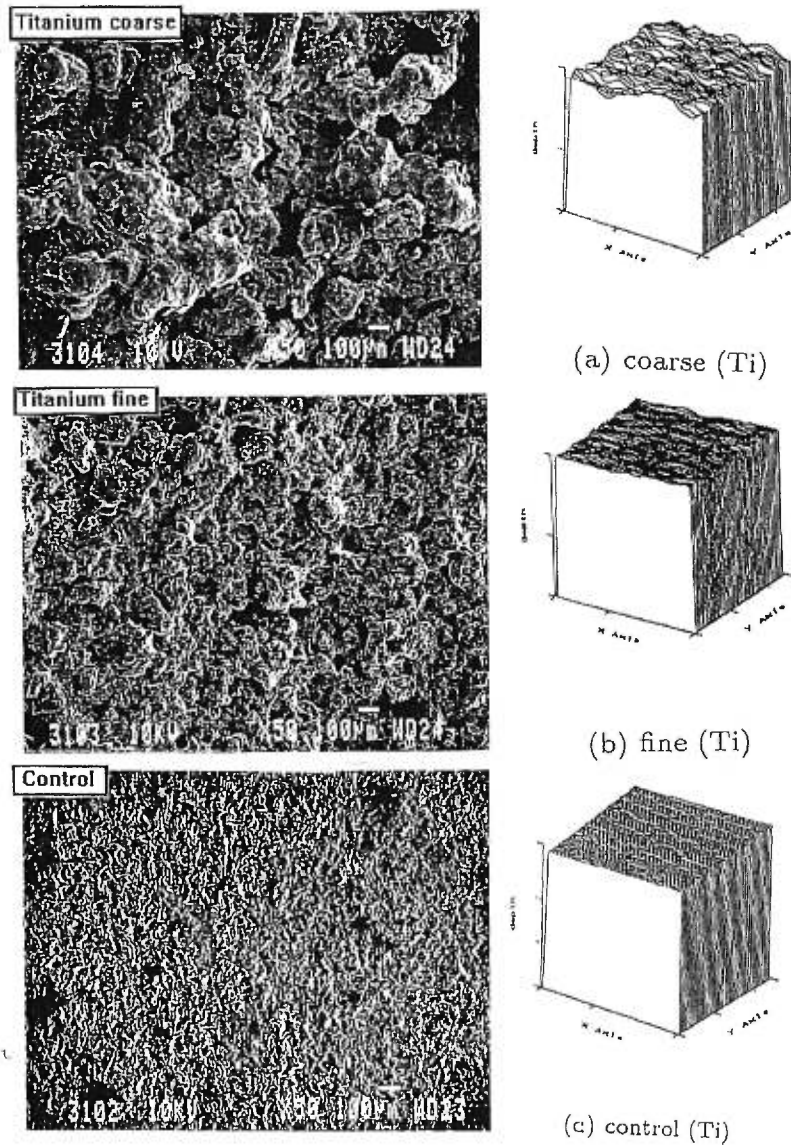


Figure 1. Scanning electron microphotographs (at left) of (a) coarse, (b) fine, and (c) uncoated titanium samples compared with their respective 3D reconstruction depth maps (at right).

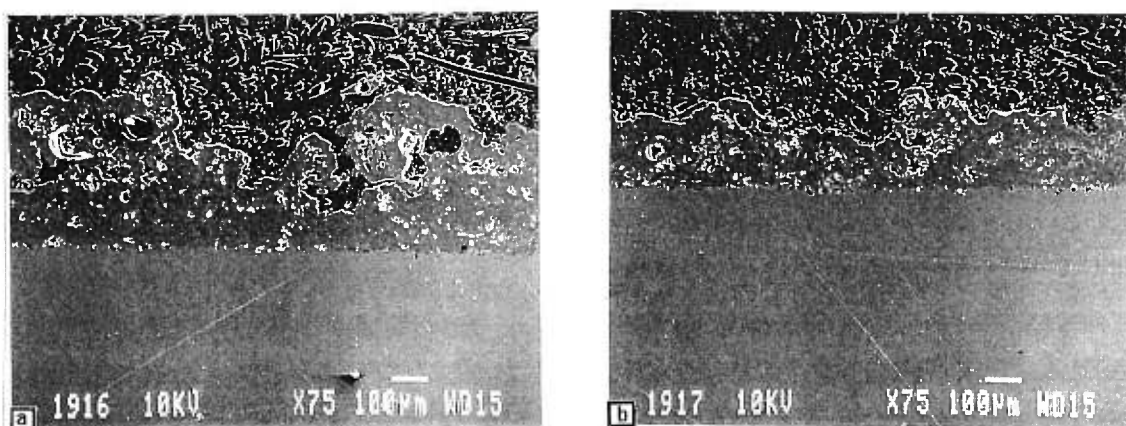


Figure 2. Scanning electron microphotographs of cross-sectional textured samples of (a) coarse and (b) fine titanium surfaces.

Table 2. Summary of results obtained by image analysis of boundary lines of coarse titanium and fine titanium materials. The data are expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD).

Specimen	Coating thickness ( $\mu\text{m}$ )	Peak height ( $\mu\text{m}$ )
Coarse titanium	$323.35 \pm 89.03$	$73.13 \pm 65.21$
Fine titanium	$203.95 \pm 43.0$	$41.03 \pm 35.44$

and mean values were calculated for each type of surface. Figures 1a, 1b and 1c present scanning electron micrographs of the surface and 3D plots of selected regions.

#### Image analysis of boundary lines

This method was used to measure the coating thickness of titanium surfaces as well as the degree of roughness. For data acquisition, samples of titanium material were diamond cut horizontally, fixed on a bakelite support and examined by SEM (JEOL JSM-20). Figure 2 presents a cross-sectional view of the material surface which simplifies analysis with the

Kontron image analyzer (Kontron Bildanalyse-Image Analysis System, Munich, Germany). Figure 3 gives a brief description of the processing steps with this method. Generally, SEM images are digitized to 256 grey levels. The encoded image is smoothed, cleaned and put into contrast. Several image analysis studies (Serra, 1982) were proposed to map large voids and large particles by the erosion\*dilatation method which is also applicable to surfaces. In this work, the baseline is established by the operator and does not move. A portion of the image analyzed is divided into sections and coating thickness is measured at each step (30  $\mu\text{m}$ ). The average of the whole image is determined and expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). The second variable measured is average peak height (between the highest and the lowest peak; Table 2).

#### Tactile profilometry

For surface roughness evaluation, stylus instruments

## Assessment of surface roughness of titanium implant material

**Table 3.** Characterization of the surface roughness of different titanium implant surfaces by tactile profilometry and confocal analysis. The values obtained from uncoated surface (control) were equivalent to the standard used to calibrate the equipment.

Parameters	Tactile profilometry		Confocal microscopy	
	Coarse titanium*	Fine titanium	Coarse titanium	Fine titanium
$R_a$ ( $\mu\text{m}$ )	---	$26.79 \pm 1.79$	$3.77 \pm 1.03$	$3.64 \pm 0.65$
$R_q$ ( $\mu\text{m}$ )	---	$33.16 \pm 1.54$	$7.23 \pm 1.41$	$6.88 \pm 0.90$
$R_{\text{max}}$ ( $\mu\text{m}$ )	---	$175.80 \pm 8.77$	$139.33 \pm 4.71$	$128.40 \pm 10.80$
Skewness	---	---	$1.41 \pm 1.13$	$-0.99 \pm 0.84$

\*Coarse titanium surface was outside the range of the tactile profilometer used in this study.

are standard tools for precise surface profilometry. The diamond stylus, whose tip radius typically measures some micrometers, is slowly trailed along the surface to be inspected. As it moves across the surface, the up-down motion is converted into electrical signals which are plotted against distance traversed. This method is not completely non-destructive because a small groove mark is often left along the scanned line (Cielo, 1988). However, stylus displacements represent a convolution of tip geometry and surface profile; lateral resolution is limited by stylus radius.

Tactile profilometry was conducted with a Surface Roughness Tester (Mitutoyo, Tokyo, Japan). Sampling length was 1 mm at a measuring speed of 0.5 mm/sec. The stylus is reported by the manufacturer to have a spherical tip with a radius of 5  $\mu\text{m}$  on a 90° cone. Maximal horizontal range is 250  $\mu\text{m}$ . The usual roughness parameters, such as the arithmetic mean of the roughness profile ( $R_a$ ), the square root of the arithmetic mean ( $R_q$ ) and the measured difference between the lowest and the highest points for a particular z-section ( $R_{\text{max}}$ ) were calculated. Samples from the surface were analyzed 3 to 6 times. The results are expressed as means  $\pm$  SD. The performance of the instrument was checked against calibrated height standards for the contact stylus.

### Confocal microscopy

Confocal microscopy has the ability to discriminate against out-of-focus specimen parts by so-called optical sectioning (Kino and Corle, 1989; Carlsson and Lundahl, 1991; Ockleford, 1995). By recording a number of optical sections at various depth levels in the specimen, knowledge of the 3D structure of the specimen can be obtained. By using confocal microscopy, it is possible to improve the images lateral resolution compared to conventional microscopy. In this study, a Leica Confocal Scanning Microscope (Leica Laser Technik GmbH, Heidelberg, Germany) was used. It is equipped with an argon-ion laser source

(488-514 nm), fast x-y mirror scanner, high resolution z-stage (170  $\mu\text{m}$ , z-movement range) and a single channel detector unit for confocal reflection or fluorescence microscopy. The pinhole setting can be made either by computer or manually but once it is set for a scan, it will not vary. The size of the pinhole was 40, the microscope objective was 16x and wavelength of the laser beam was 488 nm. The measuring range in x and y for 16x magnification was 313 X 313  $\mu\text{m}$  in x,y plane and for z it was 170  $\mu\text{m}$  maximum for any magnification in the x,y plane. Pixel size for 16x magnification was 0.612  $\mu\text{m}$  X 0.612  $\mu\text{m}$  in x,y plane. Resolution at 16x with a 0.45 numerical aperture (NA) was 2.05  $\mu\text{m}$  for lateral resolution and 4.10  $\mu\text{m}$  for axial resolution. Calibration followed the manufacturer's specifications prior to analysis.

Duplicate images of each surface were scanned. Images were obtained in x,y plane. The total height of the surface scanned was determined, i.e., 147  $\mu\text{m}$  or 170  $\mu\text{m}$ , and divided by the number of sections (i.e., 128). The height of each section was 1.15 and 1.33  $\mu\text{m}$ , respectively, for each of the samples. Scanning was done line by line twice to average the intensity signal (see, Figure 4). Some pictures gave maximum information at 147  $\mu\text{m}$  of depth while others were outside the limits of the instrument. Conventional roughness parameters  $R_a$ ,  $R_q$ ,  $R_{\text{max}}$  and skewness were determined.

### Results and Discussion

The topology of the three surfaces in this study was examined by SEM (Figure 1) to obtain an overall view of surface finish and topography of the titanium samples. Surface examination (compared to uncoated surface) in Figure 1 revealed a globular texture characteristic of plasma-spray surfaces. The fine surface displayed peaks interrupted by relatively flat areas. On the other hand, the rough surface revealed surface irregularities characterized by the presence of

Assessment of surface roughness of titanium implant material

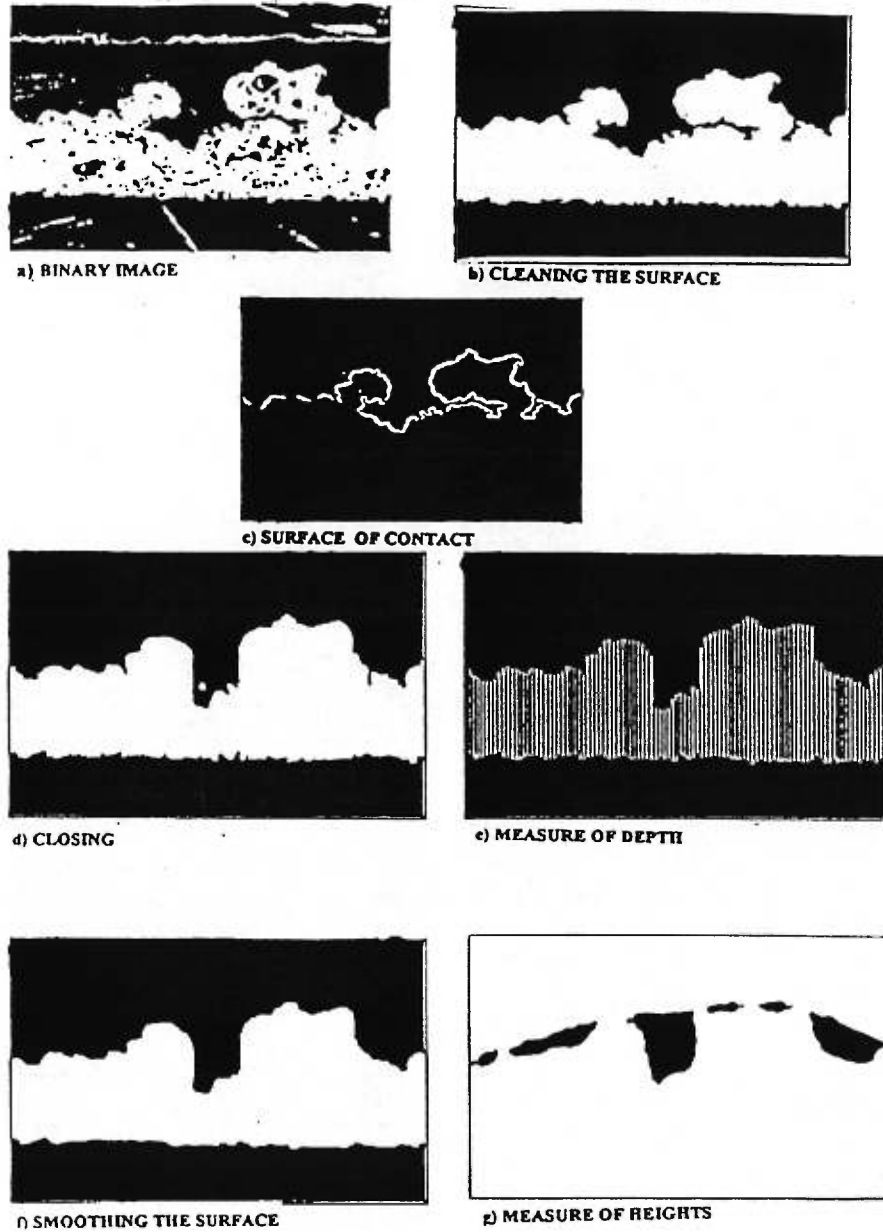
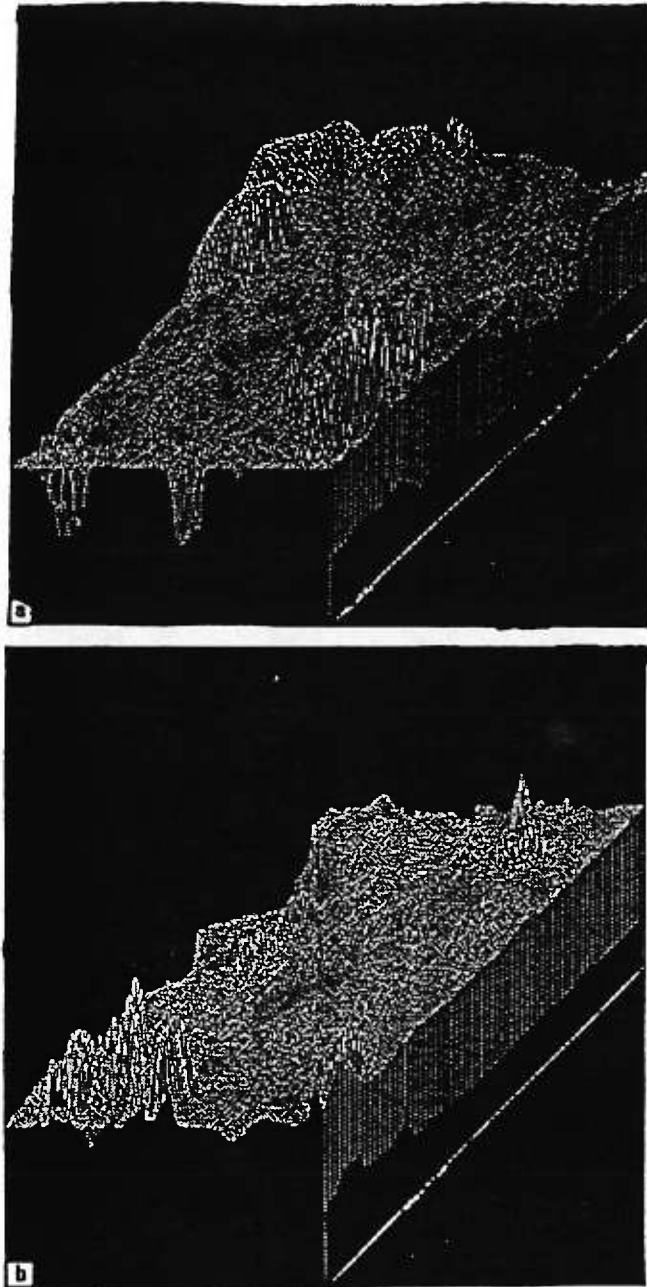


Figure 3. Image analysis method. The scanning electron microphotograph of the sample is scanned and binarized (a). The image is then cleaned of all small details and pores (b). The contact surface is put into contrast (c). Then, the grooves are closed (d) and groove depth is measured (e). The surface is smoothed (f) and peak heights are measured (g).



**Figure 4.** Three-dimensional reconstructed surfaces of (a) coarse and (b) fine titanium samples by confocal microscopy.



Clara Pimienta and Rashad Tawashi

enteries of varying shapes, depth and height. The raspy, hook-like surface, produced by the coating process provided an excellent locking mechanism for bone and elicited a favorable biological response in the form of bony ingrowths (Feighan *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1995). In Figure 2, numerous pores and wave-like structures can be seen on the coarse titanium surface while the fine titanium surface presented a more compact look and less grooves.

Similarly, image analysis of boundary lines (Serra, 1982; Chermant and Coster, 1987) gave an approximation of coating thickness of the different titanium samples, ranging between 300  $\mu\text{m}$  for the rough surface to 200  $\mu\text{m}$  for the finer surface (Table 2). The images were significantly altered and had little resemblance to the starting surface (Figure 3). Nevertheless, once the image was binarized and put into contrast, the results obtained (coating thickness and peak heights) became an expression of the sample surface.

A detailed characterization of surface topography and roughness was undertaken by tactile profilometry and confocal microscopy. The coarse sample was too rough for the tactile profilometer used in this study. However, with a finer diamond stylus, it would be possible to determine the surface parameters. Table 3 summarizes the results obtained in this study by tactile profilometry and confocal microscopy.  $R_a$  is the arithmetic mean of the departure of the roughness profile from the mean measured in  $\mu\text{m}$ . It gives good representation of height variations.  $R_q$  is the root mean square parameter corresponding to  $R_a$ , measured in  $\mu\text{m}$ .  $R_{\text{max}}$  is the maximum valley height of the profile in a single sampling length (in  $\mu\text{m}$ ). This parameter may have a large scatter due to random sampling. Skewness is the measure of symmetry of the profile. A surface with more valleys than peaks has a negative skewness value (Blouet, 1988; Cielo, 1988; Wennerberg *et al.*, 1996b).

Data obtained by confocal microscopy indicated a significant difference in surface roughness between the two titanium sample types. The fine surface regions were characterized by a negatively skewed distribution indicative of more valleys than peaks.

Values representing roughness ( $R_a$ ,  $R_q$ ,  $R_{\text{max}}$ ) obtained by these two methods varied considerably. For example, a seven fold difference for  $R_a$  ( $\mu\text{m}$ ) was found for fine titanium when measured by tactile profilometry and confocal microscopy. This could be explained by the fact that these parameters depend on the high spatial frequency cutoff of the measuring instrument which is determined by stylus radius in a mechanical profilometer or by light wavelength in a light-scattering device (Cielo, 1988). The stylus cannot register narrow cracks which may be very deep but almost invisible on the chart if their width is considerably less than the stylus tip radius. Tactile

profilometry has the potential to scratch the material. Optical profilometry with light-scattering devices can at least deal with surface irregularities that are of the order of magnitude of the light wavelength used. Thus, the problem with conventional methods of surface characterization is that they depend on either resolution of the measuring instrument or length of the sample. In contrast, fractal dimension is capable of describing surface roughness by a single parameter over many orders of magnitude (Pfeifer, 1984). Fractal geometry as an alternative tool for roughness determination, particularly with the laser-active 3D vision system, could contribute to amelioration of the surface characterization process and control the variations produced during coating processes.

### Conclusion

The possible effect of surface topography on tissue responses to implanted biomaterials has been recognized for the last few years. It is not easy to provide an ideal method for quantitative assessment of the surface roughness of titanium implant materials. The basic criteria required must be non-invasive, non-destructive, quantitative, sensitive, and versatile, with fast acquisition speed and invariant to scale. Conventional roughness parameters, while useful, have certain shortcomings resulting from the condensation of all complex surface information into a single number. The concept of fractal dimension can be a possible refinement for single roughness parameter texture.

Within the confines of the materials and parameters of this study, we found that the most important conclusions that can be drawn are: (1) 3D surface analysis with the laser system meets the requirements of a meaningful method for roughness determination; and (2) surface fractal dimension can provide a valuable descriptor for quantifying the complexity of titanium implant surfaces. It could be used as a quality tool in areas where surface finish is critical to establish regions of acceptability after surface treatments.

### Acknowledgements

Thanks are due to Josiane Schasle from Paprican Inc. (Montreal, Quebec, Canada) for technical assistance with the confocal microscope, to Michel Lefevre from Noranda Inc. (Montreal, Quebec, Canada) for help with the tactile profilometer, and to Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche and MRC for support of this work.

### References

- Blouet J (1988). Microgéométrie et Rugosimétrie. In: Méthodes Usuelles de Caractérisation des Surfaces.

## Assessment of surface roughness of titanium implant material

- David D, Caplan R (eds.). Eyrolles, Paris. pp. 270-289.
- Bourauel C, Fries T, Drescher D, Plietsch R (1998). Surface roughness of orthodontic wires via atomic force microscopy, laser specular reflectance, and profilometry. *Eur J Orthodont* **20**: 79-92.
- Brunette DM (1988). The Effect of surface topography on cell migration and adhesion. In: *Surface Characterization of Biomaterials*. Ratner BD (ed.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp. 203-217.
- Brunette DM, Ratkay J, Chehroudi B (1991). Behaviour of osteoblasts on macromachined surfaces. In: *The Bone-Biomaterial Interface*. Davies JE (ed.). University of Toronto Press, Toronto. pp. 170-180.
- Carlsson K, Lundahl P (1991). Three-dimensional specimen recording and interactive display using confocal laser microscopy and digital image processing. *Mach Vis Appl* **4**: 215-225.
- Carlsson L, Rostlund T, Albrektsson B, Albrektsson T (1988). Removal torques for polished and rough titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* **3**: 21-24.
- Chehroudi B, Ratkay J, Brunette DM (1992). The role of implant surface geometry on mineralization *in vivo* and *in vitro*: A transmission and scanning electron microscopic study. *Cells Mater* **2**: 89-104.
- Chermant JL, Coster M (1987). Introduction à l'Analyse d'Images (Introduction to image analysis). *J Microsc Spectrosc Electron* **12**: 1-21.
- Chesters S, Wen HY, Lundin M, Kasper G (1989). Fractal-based characterization of surface texture. *Appl Surf Sci* **40**: 185-192.
- Chong-Hyun H, Dong-Hoo H (1994). A study on shear-bond strength of the interface between bone and titanium plasma-sprayed IMZ implants in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* **9**: 698-709.
- Cielo P (1988). Surface inspection. In: *Optical Techniques for Industrial Inspection*. Cielo P (ed.). Academic Press, Inc., San Diego. pp. 185-257.
- den Braber ET, de Ruijter JE, Smits HTJ, Ginsel LA, von Recum AF, Jansen JA (1995). Effect of parallel surface microgrooves and surface energy on cell growth. *J Biomed Mater Res* **29**: 511-518.
- Dubuc B, Zucker SW, Tricot C, Whebi D, Quiniou JF (1989). Evaluating the fractal dimension of surfaces. *Proc Roy Soc (Lon) Ser A: Math Phys Sci* **425**: 113-127.
- Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P (1998). Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci* **106**: 721-764.
- Feighan JE, Goldberg VM, Davy D, Parr JA, Stevenson S (1995). The influence of surface-blasting on the incorporation of titanium-alloy implants in a rabbit intramedullary model. *J Bone Joint Surg* **77-A**: 1380-1395.
- Gagnepain JJ, Roques-Carmes C (1986). Fractal approach to two-dimensional and three-dimensional surface roughness. *Wear* **109**: 119-126.
- Goldberg VM, Stevenson S, Feighan J, Davy D (1995). Biology of grit-blasted titanium alloy implants. *Clin Orthop Relat Res* **319**: 122-129.
- Gotfredsen K, Wennerberg A, Johansson C, Skovgaard LT, Hjorting-Hansen E (1995). Anchorage of TiO<sub>2</sub>-blasted, HA-coated, and machined implants: An experimental study with rabbits. *J Biomed Mater Res* **29**: 1223-1231.
- Gray C, Boyde A, Jones SJ (1996). Topographically induced bone formation *in vitro*: Implications for bone implants and bone grafts. *Bone* **18**: 115-123.
- Han CH, Johansson CB, Wennerberg A, Albrektsson T (1998). Quantitative and qualitative investigations of surface enlarged titanium and titanium alloy implants. *Clin Oral Impl Res* **9**: 1-10.
- Kino GS, Corle TR (1989). Confocal scanning optical microscopy. *Phys Today*. **42**: 55-62.
- Lausmaa GJ, Kasemo B (1990). Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials. *Appl Surf Sci* **44**: 133-146.
- Mandelbrot BB (1982). *The Fractal Geometry of Nature*. Freeman WH, (ed.). San Francisco, CA.
- Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford Jr J, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD (1995). Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res* **29**: 389-401.
- Meyle J, Gültig K, Wolburg H, von Recum AF (1993). Fibroblast anchorage to microtextured surfaces. *J Biomed Mater Res* **27**: 1553-1557.
- Nicholson DR (1983). *Introduction to Plasma Theory*. John Wiley & Sons, Inc., New York. pp. 1-15.
- Norton MR (1998). Marginal bone levels at single tooth implants with a conical fixture design. The influence of surface macro- and microstructure. *Clin Oral Impl Res* **9**: 91-99.
- Ockleford C (1995). The confocal laser scanning microscope (CLSM). *J Pathol* **176**: 1-2.
- Ong JL, Prince CW, Raikar GN, Lucas LC (1996). Effect of surface topography of titanium on surface chemistry and cellular response. *Implant Dent* **5**: 83-88.
- Pentland AP (1984). Fractal-based description of natural scenes. *IEEE Trans Pattern Anal and Mach Intell* **PAMI-6**: 661-674. Pentland AP (1985). On describing complex surface shapes. *Image Vis C* **3**: 153-162.
- Pfeifer P (1984). Fractal dimension as working tool for surface-roughness problems. *Appl Surf Sci* **18**: 146-164.
- Piattelli A, Scarano A, Piattelli M, Calabrese L (1996). Direct bone formation on sand-blasted titanium

implants: An experimental study. *Biomaterials* 17: 1015-1018.

Pimienta C, Dubuc B, Tawashi R (1994). Surface fractal dimension and the quantification of roughness of titanium implant material. *Cells Mater* 4: 379-386.

Quinquis P, Batifouye-Celhay C, Colat-Parros J (1993). Le Titane: Un Matériau de Choix? *J Biom Dent* 8: 31-47.

Ratner BD, Johnston AB, Lenk TJ (1987). Biomaterial Surfaces. *J Biomed Mater Res* 21 (Suppl. A1): 59-90.

Schwartz Z, Boyan BD (1994). Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem* 56: 340-347.

Serra J (1982). Hit or miss transformation, erosion and opening. In: *Image Analysis and Mathematical Morphology*. Serra J, (ed.). Academic Press, Inc. London. pp. 2-23.

Taborelli M, Jobin M, François P, Vaudraux P, Tonetti M, Szmukler-Moncler S, Simpson JP, Descouts P (1997). Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. *Clin Oral Impl Res* 8: 208-216.

Taylor SR, Gibbons DF (1983). Effect of surface texture on the soft tissue response to polymer implants. *J Biomed Mater Res* 17: 205-227.

Thomas K, Cook S (1985). An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J Biomed Mater Res* 19: 875-890.

Wang BC, Lee TM, Chang E, Yang CY (1993). The shear strength and the failure mode of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings to bone: The effect of coating thickness. *J Biomed Mater Res* 27: 1315-1327.

Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ (1995). A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Impl Res* 6: 24-30.

Wennerberg A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B (1996a). Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomaterials* 17: 15-22.

Wennerberg A, Albrektsson T, Lausmaa J (1996b). Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25- and 75- $\mu$ m- sized particles of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *J Biomed Mater Res* 30: 251-260.

Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S (1998). A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Impl Res* 9: 11-19.

Wong M, Eulenberger J, Schenk R, Hunziker E (1995). Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *J Biomed Mater Res* 29: 1567-1575.

**Reviewer I:** Can the authors fully explain the fractal dimension method in sufficient details.

**Authors:** Fractal dimension is considered to be the space filling property closely related to complexity. It is a number between 1 and 2 for curves, and 2 and 3 for surfaces. The fractal surface model has been extended to a form which can describe complex natural 3D surfaces. One of the basic rules of the fractal concept is that the complex geometry of an object can be analyzed quantitatively if it is invariant to a transformation of scale. In other words, the same features are viewed at different magnifications. Fractal dimension, in this study, was measured by the variation method. Briefly, surface S was first dilated (Serra, 1982; Tricot *et al.*, 1988) by a horizontal square of side  $2\epsilon$  to give  $S(\epsilon)$ , the approximation of S at scale  $\epsilon$ . Then, volume  $S(\epsilon)_3$  of this dilated object was calculated. The rate of growth of  $S(\epsilon)_3$  when  $\epsilon$  tends to 0 is related to the fractal dimension of the object in the following way:

$$\Delta(S) = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \left[ 3 \cdot \frac{\log |S(\epsilon)|_3}{\log \epsilon} \right]$$

where  $\Delta(S)$  is the surface fractal dimension. In practice, however,  $\Delta$  is obtained as the slope of a straight line fit to the log-log plot [ $\log (1/\epsilon)$ ;  $\log (*S(\epsilon)_3)*\epsilon^3$ ]. The variation method has the property of being invariant to scale and translation (Thibert *et al.*, 1993). A detailed mathematical description of the algorithm is found in Dubuc *et al.* (1989) and the application to titanium implants has been reported by Pimienta *et al.* (1994).

**Reviewer II:** The number of methods compared and the number of measurements presented are both rather low, with the result that the significance of the findings is not clear.

**Authors:** We disagree with the reviewer, and feel that the information presented is new and of practical importance to the manufacturer of titanium implant material, particularly in quality assurance.

**Reviewer V:** For the Zeiss system (with which I am more familiar), it is necessary to do a z section to set parameters and calibration for the highest and lowest points in this line scan. This will determine the number of sections and therefore the thickness of the optical section that may be made.

### Assessment of surface roughness of titanium implant material

**Authors:** In the Leica microscope we used, the images were acquired in x,y plane. The reviewer is correct in saying that it is necessary to set parameters for z section. Indeed, 128 sections of either 1.15  $\mu\text{m}$  to 1.33  $\mu\text{m}$  were scanned. However, in x,y plane, it is impossible to adjust the height of each section individually. Instead, we determined the total height of the surface we scanned, i.e., 147 or 170  $\mu\text{m}$ , and divided that height by the number of sections we wished to work with, i.e., 128. Each section will be 1.15 to 1.33  $\mu\text{m}$ , respectively.

**Reviewer V:** If the authors feel that the confocal microscope's ability to analyze a very small surface at one time is a potential pitfall, wouldn't decreasing the objective to 5x from 16x increase the sample area. Did the authors scan the samples at different magnifications to verify  $R_a$ ,  $R_q$ , etc., values? Do they intrinsically change?

**Authors:** Changing the magnification would definitely change the size of the area and the resolution (lateral and axial). Probably with a lower magnification (the Leica has a 6.3x \* 0.2 NA), we would have been able to look at a larger area and perhaps not exceed the range of the machine, i.e., 170  $\mu\text{m}$  in height but resolution would have suffered. Lateral resolution with a 0.2 NA objective is 11  $\mu\text{m}$  and axial resolution is 22  $\mu\text{m}$ . All depends on the range of roughness we are interested in. We scanned the samples at only one magnification (16x) and the roughness at that magnification only.

### Additional References

Thibert R, Dubuc B, Dufour M, Tawashi R (1993). Evaluation of the surface roughness of cystine stones using a visible diode laser scattering approach. *Scanning Microsc* 7: 555-561.

Tricot C, Quiniou JF, Wehbi D, Roques-Carmes C, Dubuc B (1988). Evaluation de la Dimension Fractale d'un Graphe. *Rev Phys Appl* 23: 111-124.  
Editorial Items:

## **Chapitre 9**

**Macrophage response and contact angle measurements on different titanium and cobalt-chrome surfaces.**

**Macrophage response and contact angle measurements on different titanium and cobalt-chrome surfaces**

Clara Pimienta and Rashad Tawashi

Faculty of Pharmacy, University of Montreal (Quebec), Canada

Cells and Materials (submitted)

## ABSTRACT

The interaction between an implant and the surrounding tissue are of a complicated nature. The biological response to an implanted material is believed to be determined by three main factors such as surface energy, surface chemistry and surface roughness. In this study, surface energy of titanium and cobalt-chrome biomaterials was measured by contact angle with the sessile drop method. Macrophage cellular culture model was used to quantify the degree of cellular attachment. The results obtained were studied as a function of surface roughness. The concept of fractal dimension was used as a surface characterisation parameter (the data was based on a previous report). In this study we found a relationship between the contact angle values for the cobalt-chrome sample and the ability of the substrate to support cell attachment. The cobalt-chrome surface possessing the lowest contact angle thus expressing the highest surface energy that promotes better cellular attachment. However, there was no predictable relationship between the contact angle and surface roughness for the titanium surfaces. Our results suggest that surface roughness is but one parameter that can influence cell adhesion and tissue response. The fractal dimension concept can be a valuable tool in studies that need to assess the importance of surface complexity.

**KEY WORDS**

Surface roughness, fractal dimension, biomaterial, contact angle, macrophage adhesion.



## INTRODUCTION

Initial interaction of foreign materials with the living tissues begins with adsorption of proteins onto their surfaces (Andrade and Hlady., 1986). Therefore the surface properties of the materials such as surface energy, surface topography and surface chemistry are critical for biocompatibility and have to be considered in the selection of materials suitable for surgical implantation. The initial interaction between host and implant surface is conditioned by tissue fluids elicited by the inflammatory response associated with wound healing. This interaction leads to the deposition on the metallic implants of a layer of macromolecules composed of plasma and extracellular matrix components such as fibrinogen or fibrin, fibronectin and other glycoproteins or glycosaminoglycan components, which modulate subsequent cellular response and colonisation (den Braber et al., 1995).

The influence of surface topography has been often studied by comparisons of cell culture or *in vivo* assays on surfaces prepared by different polishing and abrading treatments (Wennerberg et al., 1996a,b). However, quantitative values of the surface roughness are rarely given. Furthermore, it is difficult to decide at what scale the surface roughness should be characterised. These problems arise because the biological components interacting with the implant surface cover a wide range of dimensions from the size of the cell down to that of the biofilm and cell membrane proteins.

Surface energy is largely dependent on surface wettability and the degree of contact with the physiologic environment. Increased wettability enhances interactions between implant surface and the biologic environment (Baier et al., 1984; Schrader, 1982). Measurement of surface free energy can be expressed in term of the angle formed between a drop of liquid and the plane surface of the solid on which it rests. This is called the contact angle and it has an inverse relationship with surface free energy, i.e., the lower the contact angle the greater the surface free energy and hence, the greater the adhesion (Adamson, 1990; Uyen et al., 1990).

Certain shortcoming of surface characterisation results from the condensation of complex information into a single number such as the usual surface roughness parameters (Chesters, 1989). They are not sufficiently descriptive to correlate surface texture with other surface related measurements. A number of possible refinements on the single parameter texture description exist, such as the more recent concept of fractal dimension. The fractal concept has already been applied by various groups as a means of characterising metal surfaces and their corresponding treatments (Mandelbrot, 1984; Majumdar and Bushan., 1990). The fractal dimension does not depend on the scale of measurement compared to the conventional roughness parameter. We used the fractal analysis approach that characterises space-filling property and is closely related to complexity (Pentland, 1985). Fractal dimension is a number between one and two for curves and between two and three for surfaces (Mandelbrot, 1982). This paper attempts to find a correlation between the surface complexity characterised by fractal dimension as a function of surface wettability and macrophage attachment to titanium and cobalt-chrome biomaterials.

## **MATERIALS AND METHODS**

The biomaterials' samples used were two plasma-coated titanium and one cobalt-chrome plate (APS Materials Inc, Dayton, Ohio) produced by thermal spray process. The samples were used as such, they were cleaned in methanol and rinsed abundantly with distilled water and flamed dried prior to the experiments. An uncoated surface for each sample was used as a control throughout the study.

### **Surface morphology**

Scanning Electron Microscopy (SEM-JEOL JSM 820 GW-Electronics Inc, Norcross GA) was used to obtain an overall picture of the surface finish and topography of the samples (Figure 9.1). Scanning electron micrographs were taken at several randomly chosen areas on the samples' surfaces. Each surface roughness was characterised by fractal dimension. Surface A was characterised as the roughest titanium surface with a fractal dimension of 2.31. Surface B, the fine titanium, was the smoothest one with a fractal dimension of 2.20. The cobalt-chrome surface had a fractal dimension of 2.26. The control surface for both titanium and cobalt-chrome was polished and had a fractal dimension of 2.09. A more detailed explanation of the fractal analysis was carried out in a previous study (Pimienta et al., 1994).

**Contact angle measurement**

The wettability of the titanium and cobalt-chrome samples was measured with a goniometer (Ramé-Hart, Mountain Lakes, NJ, USA). The contact angle was determined from the angle created between the profile of a sessile droplet of distilled water placed upon the surface of the test material. All wetting angle experiments were conducted in a controlled laboratory atmosphere at 25°C and 70% humidity. The values for the sessile contact angle (SCA) were measured on the samples of titanium, cobalt-chrome and their respective uncoated control surface. Contact angles were taken from the right hand side of the individual droplets placed on the test materials within 120 seconds after placement. Distilled water (surface tension 72.6 dynes/cm) was used as test liquid. The sessile drop, sitting on a sample, was viewed through a glass window using a goniometer-telescope. Several readings were made on the same drop taken at different sections of the sample and an average was taken. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. (Table 9.1). Statistical significance was obtained with the student-t test ( $p \leq 0.05$ ).

### **Cellular culture**

Female CD1 mice (Charles river, St Constant, Montreal, Quebec) were injected i.p. with 1.5 ml of thiogluconate broth. Four days later, they were killed by vertebral dislocation and the peritoneal cell population recovered. The harvested cells were collected by centrifugation and resuspended in 10 ml of culture medium RPMI 1640 solution containing 10% calf serum and 50  $\mu\text{m}/\text{ml}$  gentamicin sulphate at a density of  $1 \times 10^6$  cells/ml. The experiments were done under sterile conditions. On each substrate (size: 5  $\text{mm}^2$ )  $1 \times 10^6$  cells/ $\text{cm}^2$  were seeded and allowed to attached for the desired time (1.5h and 3.5h) in a humidified incubator at 37°C and 5%  $\text{CO}_2$  (Figure 9.2).

After 1.5h and 3.5h, a sample of each biomaterial and their controls were taken from the wells, rinsed with saline to remove non-adherent cells and fixed with a solution of 10% glutaraldehyde. Each sample was examined by scanning microscopy using 2 magnifications (X200 and X500). Photographs of two areas at distinct positions on each test surface were taken (Figures 9.3 and 9.4). From these photographs the number of adhering macrophages was determined. A number of fields (16 to 20 fields) were read and values were expressed as mean per  $\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$  (Table 9.2). Statistical significance was performed with student-t test ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTS

Surface characterisation of the biomaterials' samples was determined by scanning electron microscopy. The coarse titanium surface appeared with numerous highs and peaks while the fine titanium surface was more flat. The cobalt-chrome surface showed round shaped structures (Figure 9.1). The uncoated control surface was considered the smoothest. An index of surface roughness for the titanium and cobalt-chrome samples was attributed by fractal dimension as a measure of surface complexity.

The SEM micrographs showed a number of round cells (diameter 5-10  $\mu\text{m}$ ) adhering to the surface. Some were free or within a network. We also observe a great number of clusters varying in shape and size that were omitted while counting the cells.

According to our contact angle results (Table 9.1) we find at 120 seconds a significant difference between fine titanium ( $61.9^\circ$ ) and the uncoated control ( $73.1^\circ$ ), between cobalt-chrome ( $50.7^\circ$ ) and fine titanium ( $61.9^\circ$ ), and between cobalt-chrome ( $50.7^\circ$ ) and coarse titanium ( $70.8^\circ$ ). The contact angle determination for the two titanium materials revealed that there were no significant differences for the smooth and rough titanium surfaces. This indicates that the surface energetics of each material is similar.

The lowest contact angle value was reported for the cobalt-chrome surface. Thus being the most wettable surface and possessing a higher surface free energy it promotes an increased in cellular attachment that has been confirmed by the results obtained with the macrophage's attachment experiment (Table 9.2).

The macrophage attachment experiments showed a significant difference between each surface with its control and between each surface versus incubation time. For example, if we examine the titanium samples, a significant difference appears between coarse (13.4) and fine titanium (17.4) at 3.5h of incubation time. The fine titanium sample showed the highest macrophage attachment. However, if we take into account the cobalt-chrome samples (23.3) and compared them to the titanium samples, we see that it has the highest macrophage attachment of all at 3.5h of incubation time (Table 9.2 and Figure 9.4). This phenomenon could be explained by the different chemical composition and surface roughness of the cobalt-chrome versus the titanium samples.

The contact angle values recorded for the surfaces appear to correlate with cellular attachment for the cobalt-chrome surface possessing the lowest contact angle and promoting the highest macrophage attachment. However, we observe same contact angles between the titanium surfaces, but when comparing the cellular attachment experiments, a significant difference appears between coarse and fine titanium at 3.5h of incubation time.

## DISCUSSION

This work was undertaken to better understand the effects of surface roughness characteristics on short term macrophage adhesion *in vitro*. The results obtained with the cobalt-chrome samples agree with previous theories confirming the correlation between surface energy and cellular adhesion (Möller et al., 1994; Johnson et al., 1992). As for the titanium samples, many variables have to be considered. The wetting angle determinations revealed no significant differences between the fine and coarse titanium surfaces. Although the polar and dispersive components of surface energetics for each surface were not determined in this work, the wetting angle data indicates that the surface energies of the titanium substrates' surfaces are probably similar.

The results of the macrophage attachment assay indicated that the highest levels of macrophage attachment were obtained with the cobalt-chrome surface. As demonstrated in Table 9.2, there is no difference in the level of macrophage attachment for both titanium surfaces. Very few studies have compared the attachment of cobalt-chrome with other biomaterials. In a study by Haynes et al., (1998) the *in vitro* response to cobalt-chrome particles were compared with stainless steel, titanium aluminium and vanadium alloy. No differences in the biological response to cobalt-chrome particles were observed however, they were toxic to the cells compared to the other materials studied. Cobalt-chrome in the



soluble form provokes a significant increase in the incidence of cell transformation (Doran et al., 1998).

The results of the SEM study (Figure 9.1) to evaluate cell morphology did not show any significant difference in cell morphology between the titanium surfaces. Proper interpretation of the micrographs and exact identification of adsorbed macrophages is tedious and can never be done with 100% certainty. The micrographs shown demonstrate that generally it is hard to estimate, with the present technique, to what extent macrophages are visible, as only the structures of the outermost macrophage are seen. Macrophages will then most likely clump together creating big clusters not easily identifiable.

Because the adhesion experiments in this study were carried out in serum, adsorption of serum proteins onto the surfaces may have influenced the adhesion of macrophages and their agglutination in clusters. The composition of the adsorbed proteins at the surfaces, in serum, is known to promote cell adhesion (Andrade and Hlady, 1986). Serum contains two glycoproteins, fibronectin and vitronectin that are known to promote the attachment of anchorage dependent cells to surfaces (Möller et al., 1994) as a prerequisite for successful cell adhesion and spreading. Fibronectin and vitronectin possess, as a structural similarity, the same sequence of amino acids Arg-Gly-Asp in the binding sites for ligands (Ruoslahti et Pierschbacher, 1986).

All cell types that adhere to substrates live in an environment with some form of topography. Several theories assume that the geometric surface properties impose mechanical restrictions on the cytoskeletal components that are involved in cell spreading and locomotion (den Braber et al., 1995). Besides geometric properties, it is also recognized that physicochemical properties are able to influence cellular behavior. For

example, it has been described that cellular adhesion tends to correlate with the surface free energy of the substratum material (van Wachem et al., 1987). Surfaces with a low surface free energies are reported to be less adhesive than those with a high surface free energy (Uyen et al., 1990).

Several mechanisms have been proposed to explain the influence of surface free energy on cell behavior. The general theory presumes a selective effect on the configuration or conformation of the proteins that are deposited on the substratum surface (Tanagisawa et al., 1989; Baier et al., 1984; Schrader et al., 1982). These proteins play an important role in the cellular adhesion process. In this context, it has also been noted that the wettability of a substratum surface is primarily determined by the nature and packing of the outermost or exposed surface atoms in a solid (Johnson et al., 1992).

Recognising the potential effect of surface properties on cellular behaviour, there are two other factors that need to be considered. First, it has been found that surface roughness or surface topography affects the wettability characteristics of a solid (Good, 1992). Therefore a correlation between wettability and surface topography or roughness was not demonstrated. Although this observation is not in agreement with some earlier studies (Johnson et Dettre, 1964), it correlates the findings of Schmidt and Von Recum (1992), who reported that squares 2, 5, 8 and 10  $\mu\text{m}$  grooves on silicon surfaces did not increase the critical surface tension and energy of these surfaces compared with smooth silicone substrate.

The most important conclusion that can be drawn is that wettability and surface free energies play no measurable role in the shape and orientation of cells on microtextured surfaces. Apparently the cells are forced into place by the surface texture. For example, as mentioned by Meyle et al., (1991) it can be hypothesised that the strong induction of contact guidance by 2 and 5  $\mu\text{m}$  groove indicates the need of cells for mechanical stabilization against interfacial movement. However, it cannot be excluded

that this orientation phenomenon is caused by the efforts of the cell to reach a biomaterial equilibrium with the net sum of forces minimised.

Some researchers have stated that wettability should be considered a primary indication of implant surface biocompatibility and may be an important parameter of biological effect at the cellular level (Tanagisawaw et al., 1989). On the other hand, no significant relation between cellular attachment and surface wettability has been reported in the presence of serum (Keller et al., 1989; Swart et al., 1992).

As well, it is difficult to establish a simple inverse relationship between fractal dimension and contact angle. The ability of contact angle readings is dependent on the smoothness of the solid surface; it may be that as the specimens become rougher the measured contact angles become less reliable. Wenzel (1936) found that to make precise measurements of small contact angles  $< 90^\circ$  the surface had to be smoother than when measuring larger contact angles. In our study, precision has been lost since all contact angles were measured at less than  $90^\circ$  (Table 9.1).

The importance of clusters observed on the SEM micrographs infer that surface roughness and surface chemical composition makes macrophages active. Caution must be applied to these results before making any correlation's. Several texture factors can be influencing the cellular response, the texture, the shape, the height or depth of the mountains and valleys of the surface.

## CONCLUSION

The reactions of cells to the topography of their environment influence a number of processes *in vitro* and in *in vivo*. Contact angle methods are used routinely in the characterisation of biomaterials to describe wettability or to estimate surface energy. However, a number of factors need to be considered such as the presence of ions in the cleaning solutions or the media and differences in surface roughness. The results suggest that surface wettability and cellular attachment of titanium and cobalt-chrome implant biomaterial is largely dependent on the complexity of the surface. Undoubtedly, a better understanding of cell-biomaterial interaction could aid in the selection and design of more efficient orthopaedic implants. Analytical methods, however, must be interpreted with some caution when considering a roughened surface. The application of the fractal dimension to study the surface geometry of biomaterial could offer a valuable tool for understanding biological interactions at the interface. However, how those differences in the adsorption properties reflect the biological reactivity of materials especially on a cellular level is not well understood. A significant future activity will involve merging knowledge of cell biology with materials science to design a new generation of biomaterials that can actually promote desired medical outcomes.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

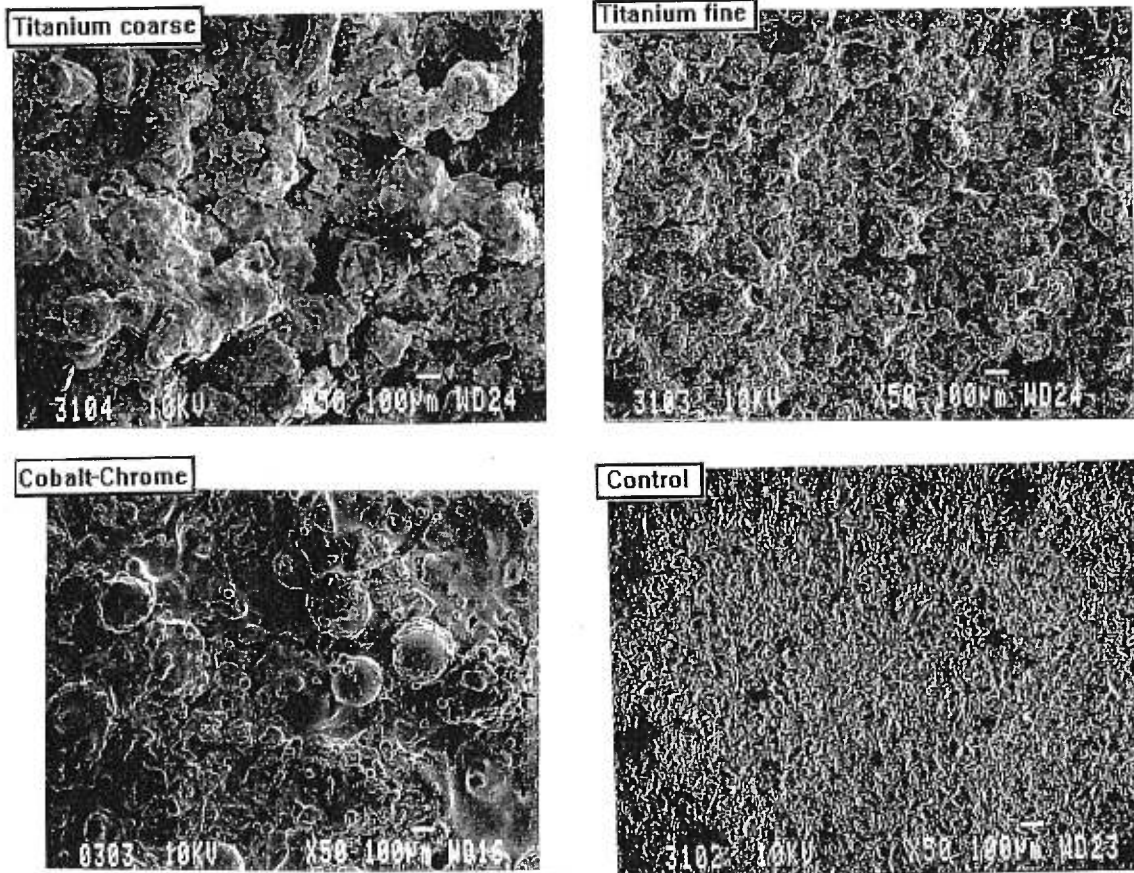
The authors thank Dr. Nigel Phillips (University of Montreal, Faculty of Pharmacy) for the help with the cellular model and the Faculty of Graduate Studies of University of Montreal for financial support.

**Table 9.1:** Contact angle measurements (°) by the goniometer method within 120 seconds of liquid dropped on titanium and cobalt-chrome biomaterial samples. Liquid tested: distilled water (surface tension 72.6 dynes/cm). Measurements were done 8 times on each sample. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical significance done by student-t test ( $p \leq 0.05$ ).

<b>WATER</b>	<b>Contact angle (°) at 120 sec</b>
Coarse titanium	70.8 $\pm$ 5.7
Fine titanium	61.9 $\pm$ 10.1
Uncoated titanium surface	73.1 $\pm$ 2.6
Cobalt-chrome	50.7 $\pm$ 14.0
Uncoated cobalt-chrome surface	60.9 $\pm$ 12.0

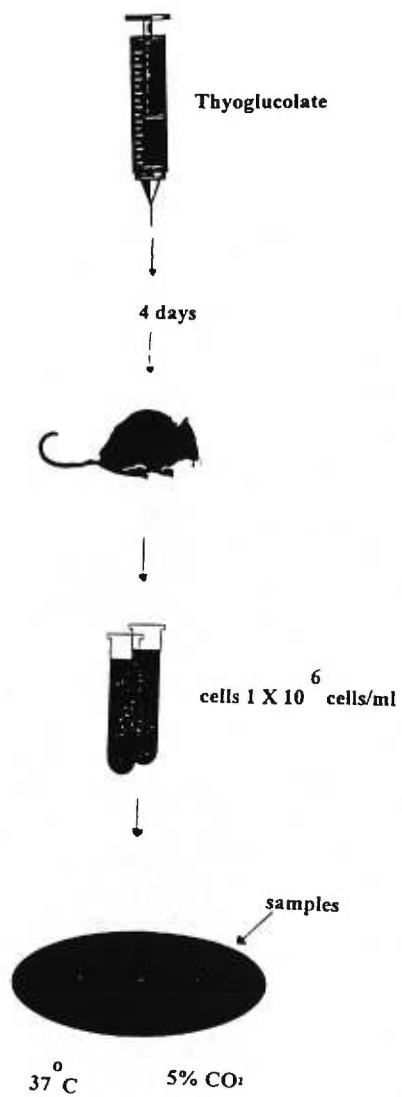
**Table 9.2:** Macrophage attachment experiments performed on titanium and cobalt-chrome samples and their respective uncoated surfaces under two different incubation time. Average number of macrophages per  $\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$ . Statistical significance done with student-t test ( $p \leq 0.05$ ).

Time of incubation	Coarse Ti	Fine Ti	Uncoated Ti	Co-Cr	Uncoated Co-Cr
1.5h	6.72 $\pm$ 3.71	8.53 $\pm$ 2.91	8.82 $\pm$ 5.01	14.10 $\pm$ 4.72	25.31 $\pm$ 6.31
3.5h	13.40 $\pm$ 5.82	17.4 1 $\pm$ 5.42	9.14 $\pm$ 4.82	23.31 $\pm$ 8.83	17.70 $\pm$ 6.20

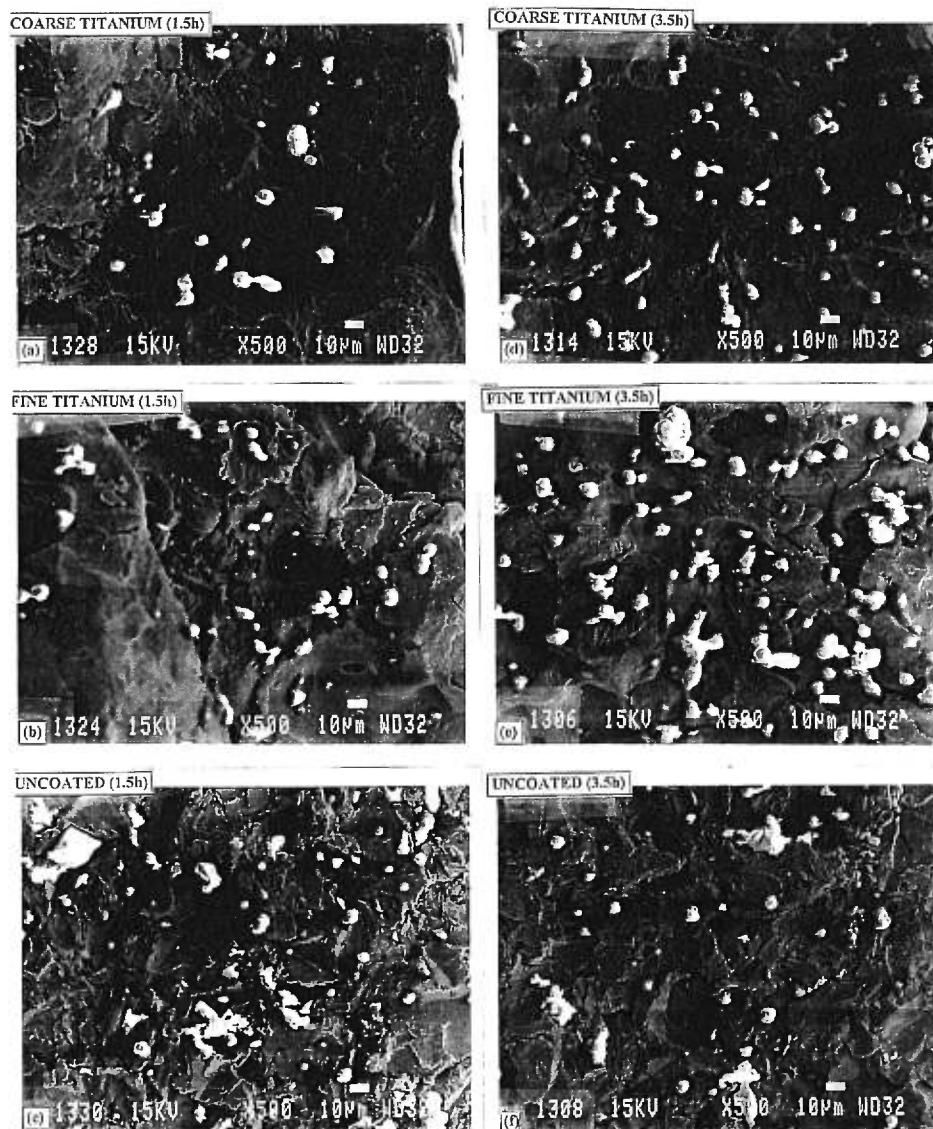


**Figure 9.1:** Surface characterization was determined by scanning electron microscopy on titanium samples (a) coarse titanium, (b) fine titanium, (c) cobalt-chrome, and (d) uncoated surface (control).

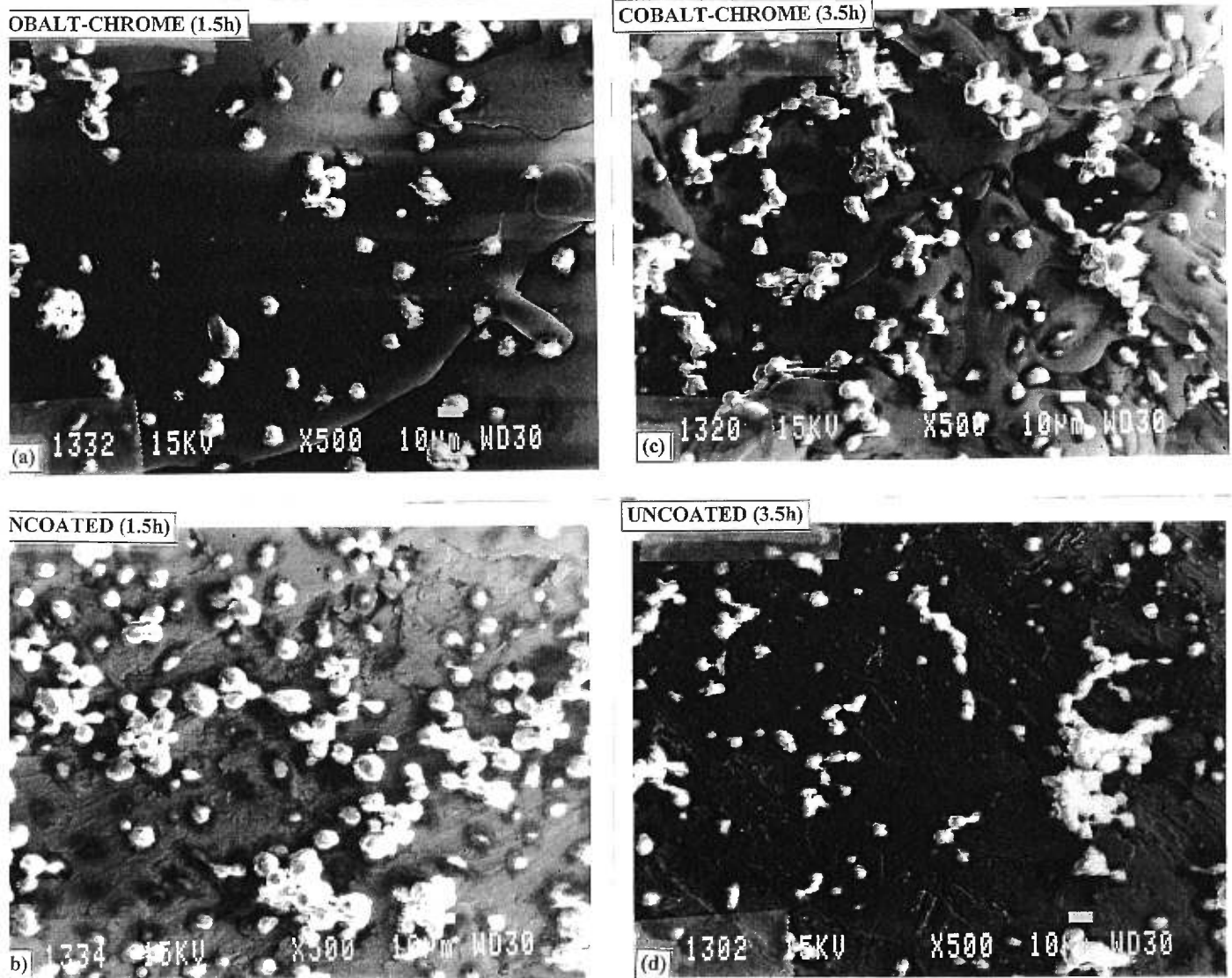




**Figure 9.2:** Schematic illustration of the cellular culture experiment. See *cellular culture* in Materials and Methods for more details.



**Figure 9.3:** Scanning electron micrographs of macrophage attachment at 1.5h and at 3.5h of incubation time onto (a) and (d) coarse titanium surface; (b) and (e) fine titanium surface; and (c) and (f) uncoated control surface at X500.



**Figure 9.4:** Scanning electron micrographs of macrophage attachment at 1.5h and at 3.5h of incubation time onto (a) and (c) cobalt-chrome surface and (b) and (d) cobalt-chrome uncoated surface (control) at X500.

## REFERENCES

- Adamson, A.W. Physical chemistry of surfaces. John Wiley & Sons Inc (ed), New York, 1990, pp. 329-420.
- Andrade, J.D. et Hlady, V. Protein adsorption and materials. Biocompatibility: a tutorial review and suggested hypothesis. *Adv. Polym. Sc.*, **79**:1-63, 1986.
- Baier, R.E., Meyer, A.E., Natiella, J.R., Natiella, R.R. et Carter, J.M. Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results. *J. Biomed. Mater. Res.*, **18**: 337-355, 1984.
- Chesters, S., Wen, H.Y., Lundin, M. et Kasper, G. Fractal-based characterisation of surface texture. *Appl. Surf. Sci.*, **40**: 185-192, 1989.
- den Braber, E.T., de Ruijter, J.E., Smits, H.T.J., Ginsel, L.A., von Recum, A.F. et Jansen, J.A. Effect of parallel surface microgrooves and surface energy on cell growth. *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**: 511-518, 1995.
- Doran, A., Law, F.C., Allen, M.J. and Rushton, N. Neoplastic transformation of cells by soluble but not particulate forms of metals used in orthopaedic implants. *Biomater.*, **19**: 751-759, 1998.
- Good, R.J. Contact angle, wetting, and adhesion: A critical review. *J. Adhesion Sci.*, **6**: 1269-1302, 1992.
- Haynes, D.R., Boyle, S.J., Rogers, S.D., Howie, D.W. and Vernon-Roberts, B. Variation in cytokines induced by particles from different prosthetic materials. *Clin. Orthop.*, **352**: 223-230, 1998.
- Johnson, S.D., Anderson, J.M. and Marchant, R.E. Biocompatibility studies on plasma polymerized interface materials encompassing both hydrophobic and hydrophilic surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**: 915-935, 1992.
- Johnson, R.E. et Dettre, R.H. Contact angle hysteresis III. Study of an idealized heterogeneous surface. *J. Phys. Chem.*, **68**: 1744-1750, 1964.
- Keller, J.C. Dougherty, W.J., Grotendorst, G.R. and Wightman, J.P. In vitro cell attachment to characterised titanium surfaces. *J. Adhesion*; **28**: 115-133, 1989.

Majumdar, A. and Bushan, B. Role of fractal geometry in roughness characterization and contact mechanics of surfaces. *J. of Tribology*, **112**: 205-216, 1990.

Mandelbrot, B.B. *The Fractal Geometry of Nature*. Freeman WH, (ed.). San Francisco, CA, 1982, pp. 1-60.

Mandelbrot, B.B., Passoja, D.E. et Paullay, A.J. Fractal character of fracture surfaces of metals. *Nature*, **308**: 721-722, 1984.

Meyle J, Von Recum AF, Gibbesch B, Hüttemann W, Schlagenhaut U, Schulte W. Fibroblast shape conformation to surface micromorphology. *J. Appl. Biomat* **2**: 273-276, 1991.

Möller, K., Meyer, U., Szulczewski, D.H., Heide, H., Priessnitz, B. and Jones, D.B. The influence of zeta potential and interfacial tension on osteoblast-like cells. *Cells & Materials* **4**: 263-274, 1994.

Pentland, A.P. *Image and Vision computing*, **3**: 153-162, 1985.

Pimienta, C., Dubuc, B. and Tawashi, R. Surface fractal dimension and the quantification of roughness of titanium implant material. *Cells and Materials*, **4**: 379-386, 1994.

Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M, D. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell* **44**: 517-518, 1986.

Schmidt J.A. and von Recum A.F. Macrophage response to microtextured silicone. *Biomat.*, **13**: 1059-1061, 1992.

Schrader, M.E. On adhesion of biological substances to low energy solid surface. *J. Colloid. Interf. Sci.*, **88**: 296-297, 1982.

Swart, K.M. Keller, J.C., Wightman, J.P., Draught, RA, Stanford, Ch.M. and Michaels, C.M.

Short-term plasma-cleaning treatments enhance in vitro osteoblast attachment to titanium. *J. Oral. implantol.*, **18**: 130-137, 1992.

Tanagiswaw, I., Sakuma, H., Shimura, M., Wakamatsu, S., Yanggisawa, S. and Sairenji, E. The effects of wettability of biomaterials on culture cells. *J. Oral. Implantol.*, **15**: 168-177, 1989.

Uyen, H.M.W., Schakenraad, J.M., Sjollema, J., Noordmans, J., Jongebloed, W.L., Stokroos, I. and Busscher, H.J. Amount and surface structure of albumin adsorbed to solid substrata with different wettabilities in a parallel plate flow cell. *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**: 1599-1614, 1990.

van Wachem, P.B., Hogt, A.H., Beugeling, T., Feijen, J., Bantjes, A., Detmers, J.P. et van Aken, W.G. Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge. *Biom.*, **8**: 323-328, 1987.

Wennerberg, A., Albrektsson, T., Johansson, C. and Andersson, B. Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biom.*, **17**: 15-22, 1996a.

Wennerberg, A., Albrektsson, T. et Lausmaa, J. Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25- and 75- $\mu\text{m}$ - sized particles of  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . *J. Biomed. Mater. Res.*, **30**: 251-260, 1996b.

Wenzel, R.N. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Ind. Eng. Chem*, **28**: 988-994, 1936.

**TROISIÈME PARTIE**

***SYNTHÈSE ET CONCLUSION***

## SYNTHÈSE

L'utilisation de biomatériaux de plus en plus sophistiqués a permis de concentrer la recherche sur les mécanismes régissant les interactions implant-tissu. Ces interactions dépendent, en premier lieu, de la stabilité de la prothèse. A cet égard, des études ont démontré que des matériaux avec des surfaces rugueuses permettaient une meilleure intégration *in vivo* de l'os sur l'implant (Buser et coll., 1991). L'utilisation d'une surface rugueuse affecte de façon significative l'apposition directe de l'os, tandis qu'une surface lisse entraîne l'encapsulation fibreuse de l'implant (Thomas et Cook., 1985).

Une caractérisation adéquate des interactions biologiques et de la biocompatibilité des biomatériaux demande une compréhension de la complexité de la surface. Les réactions biologiques sont, entre autres, influencées par la rugosité de surface (Ratner et coll., 1987). Des études suggèrent que la composition chimique et la nature morphologique des surfaces déterminent directement la réponse cellulaire (Brunette, 1986; 1988), la susceptibilité aux infections (Hanson et coll., 1980), la biocompatibilité (Williams, 1981a), l'adhésion bactérienne (Cook et coll., 1993), et l'adsorption de protéines (Anderson et coll., 1990).

Notre étude s'est basée principalement sur la caractérisation de surfaces rugueuses d'implants en titane et en cobalt-chrome. Le concept à la base de ce travail est la notion de dimension fractale. Cette notion permet de décrire quantitativement et qualitativement la complexité d'un objet. En outre, les données de dimension fractale obtenues permettent de visualiser une surface de façon plus spécifique. Ces composantes décrites dans un intervalle entre un et deux pour des courbes et entre deux et trois pour des surfaces déterminent les particularités d'une courbe ou d'une surface composée de méandres, de pics, ou de vallées (Mandelbrot, 1982). Ce concept peut être interprété comme un paramètre géométrique décrivant la capacité d'un profil à remplir une surface ou d'une surface à remplir un volume.



Un des inconvénients lors de la quantification d'une rugosité de surface est la variabilité des paramètres standards utilisés. La notion de dimension fractale peut pallier ce problème. Le développement d'une méthode d'acquisition des données en trois dimensions basée sur le principe de balayage par laser à diodes, nous a permis d'envisager une application en rugosimétrie (Chapitre 7) (Figure 7.1). Ce travail a permis de mesurer un index de complexité et de caractériser des surfaces de titane de différentes rugosités (Tableau 7.1). Les échantillons de titane ont été ainsi caractérisés, par un indice de dimension fractale, en surface rugueuse (A, dimension fractale de  $2.31 \pm 0.0$ ) et en surface fine (B, dimension fractale de  $2.20 \pm 0.0$ ) par rapport à une surface contrôle (C, dimension fractale de  $2.09 \pm 0.0$ ). Il est évident que l'application de la méthode décrite dépend du choix de la surface rugueuse, de l'angle d'inclinaison de la surface et de l'appareillage utilisé. La ségrégation des surfaces s'est alors révélée significative (Figure 7.4) et nous a permis d'envisager d'autres avenues d'utilisation, notamment dans le contrôle de qualité de produits finis.

La deuxième partie de l'étude (Chapitre 8) décrit les méthodes (profilométrie tactile, microscopie confocale, analyse d'images) et paramètres conventionnels de mesure de surface ( $R_a$ ,  $R_q$ ...). Les résultats obtenus ont permis de classifier certaines surfaces selon les résolutions de l'instrument. La surface lisse de titane se situe aux alentours de  $200 \mu\text{m}$  par rapport à la surface rugueuse qui est de  $300 \mu\text{m}$ . Il est donc évident que chaque méthode possède ses propres sensibilités et limites de résolution ce qui rend le travail ardu.

L'inconvénient de ces méthodes réside dans le fait que les mêmes conditions d'échantillonnage et de standardisation doivent être conservées. Le problème a été soulevé avec la profilométrie tactile qui n'a permis que la caractérisation de l'échantillon en titane fin. L'échantillon en titane rugueux était trop grossier pour les limites de la pointe du stylet employé de  $5 \mu\text{m}$  (Table 8.3). Cette méthode n'est pas suffisamment sensible à de faibles rugosités de telle sorte que des surfaces peuvent apparaître plus lisses qu'elles ne le sont. La perte d'informations due à la pointe et à la géométrie du stylet peut causer une sous

estimation des paramètres rugosimétriques. De plus un des grands désavantages avec la profilométrie tactile est la formation de sillons sur la surface analysée.

La microscopie confocale, quant à elle, a permis une caractérisation complète des échantillons en titane (Tableau 8.3). Cependant, la façon dont les données sont obtenues (par sections de couches) fait en sorte que les zones sombres présentes lors de l'étude de chaque couche sont désignées par des variables aléatoires par le programme de l'ordinateur. Afin d'éviter cet inconvénient, un filtre local permet de pallier ce problème sans provoquer un lissage de la surface.

L'analyse d'images effectuée sur des photographies de microscopie électronique à balayage ne donne toutefois que l'information sur l'épaisseur et la profondeur des pics des échantillons (Tableau 8.2). Mais, elle permet cependant de faire une corrélation avec les données obtenues par dimension fractale pour la caractérisation des différentes surfaces. Les désavantages de cette méthode sont la modification des surfaces (par l'utilisation de filtres qui nettoient l'image) et la lenteur des procédés.

La caractérisation de la rugosité de surface demeure de nos jours un problème crucial. Mais, comme nous l'avons fait remarquer les valeurs de rugosités peuvent varier d'une méthode à l'autre et il devient impératif de normaliser les paramètres statistiques qui décrivent une surface. L'utilisation de la notion de dimension fractale permet d'analyser des surfaces sans les variations rencontrées lors de l'utilisation de paramètres et des appareils standards.

Quelques expériences préliminaires nous ont permis d'étudier les propriétés d'angle de contact et d'adhésion cellulaire (Chapitre 9). Pour la méthode de l'angle de contact nous avons obtenu, à 120 secondes, une différence significative entre le titane fin ( $61.9^\circ$ ) et le contrôle ( $73.1^\circ$ ) entre le cobalt-chrome ( $50.7^\circ$ ) et le titane fin et entre le cobalt-chrome et le titane rugueux. La couche d'oxyde qui se trouve à la surface des matériaux peut également donner des valeurs comparables d'énergie de surface et d'angle de contact (Tableau 9.1).

Entre autre, plusieurs facteurs sont à considérer soit la composition chimique, la topographie, la rugosité, la composition de l'oxyde de surface, l'étendue de la cristallinisation et le degré de contamination.

Dans le cas des échantillons en titane, les valeurs d'angle de contact n'ont pas permis de faire une corrélation entre les surfaces et leur habilité à supporter l'adhésion cellulaire. Des facteurs techniques tels que la présence d'ions ou la possibilité d'altération de la charge peuvent influencer les angles de contact mesurés. Des différences au niveau de la rugosité sont également importantes. Plus l'échantillon est rugueux, plus l'angle de contact subit une perte de précision. Effectivement, les angles de contact mesurés dans notre étude sont tous inférieurs à 90° (Wenzel, 1936).

Pour l'étude de l'adhésion des morceaux d'implants en titane (de différentes rugosités) et en cobalt-chrome ont été incubés en présence de macrophages pendant une certaine période de temps. Des différences significatives ont été retrouvées entre les échantillons contrôles et ceux en titane (rugueux et fin) et au temps d'incubation de 3.5h entre le titane rugueux et le titane fin. Par contre, les échantillons de cobalt-chrome ont démontré le plus haut taux d'adhésion de macrophages (Table 9.2) et l'angle de contact le plus bas par rapport aux autres surfaces. Ce dernier matériau démontre une surface hydrophile et une augmentation de l'adhésion cellulaire confirmée par les résultats présentés au Tableau 9.2. Ce phénomène peut être expliqué par la différence de composition chimique et énergie de surface par rapports aux échantillons en titane.

La visualisation de macrophages par microscopie électronique est biaisée par la présence d'amas de cellules formées lors du contact entre les surfaces et les macrophages. De plus, les expériences effectuées dans le sérum ont probablement été influencées par les protéines sériques, notamment la fibronectine et la vitronectine (Möller et al, 1994). Ces protéines sont reconnues comme agent de promotion d'adhésion cellulaire (Andrade et Hlady, 1986).

Le concept fractal peut s'appliquer au phénomène des fractures observées sur les matériaux et biomatériaux. Les premières études fractographiques par rugosité ont montré que ce paramètre variait notablement avec le grossissement utilisé (Cahn, 1989). On peut considérer qu'un profil de fracture possède un certain caractère fractal. L'étude des profils de fissuration obtenus par corrosion sous contrainte peut permettre de remonter aux vitesses de fissuration. Ce résultat est important puisque l'étude de la rupture des pièces en service est alors possible (Chermant et Coster, 1987).

Une façon d'aborder l'étude de la fracture consiste à examiner les surfaces de rupture c'est-à-dire, les surfaces qui séparent les morceaux d'un échantillon brisé. Ces surfaces constituent en effet la trace du chemin de fissuration le plus facile dans le matériau. Le relief tourmenté de ces surfaces de fracture peut être caractérisé géométriquement par une dimension fractale qui mesure en quelque sorte l'irrégularité de la surface. L'utilisation d'une méthode profilométrique optique présenterait un avantage dans ces cas.

L'étude des fractures des surfaces permet de prédire l'action des cellules sur les surfaces. Les cellules sont influencées par la topographie de la surface et agissent en conséquence. Par exemple, les cellules peuvent être inhibées ou stimulées selon une topographie spécifique (den Braber et coll., 1995). Le fait de connaître ces phénomènes pourrait aider à déterminer, lors d'une fracture, si les implants sont viables ou non. La dimension fractale nous permettrait de déterminer cette fracture et de prédire le taux de succès de l'implant. L'enjeu de ces recherches est de bâtir une théorie qui permette de rendre compte de la fracture d'un acier comme celle d'une céramique. Cela permettrait de comprendre et généraliser le phénomène de rupture, de le prédire et l'interpréter et ainsi dégager des lois communes. Cette approche pourrait aider dans la conception de nouveaux matériaux.

## CONCLUSION

En conclusion, l'approche fractale apporterait en rugosimétrie un outil complémentaire au nombre de paramètres nécessaires pour décrire une surface. Elle devrait de plus permettre d'interpréter et de modéliser un bon nombre de processus non expliqués par les lois physiques classiques en particulier lorsque des surfaces rugueuses sont impliquées. La méthode d'analyse des surfaces tridimensionnelle permet d'améliorer la qualité des informations obtenues afin d'étudier de manière plus complète les caractéristiques des surfaces. Les résultats obtenus lors de l'analyse d'implants en titane et de cobalt-chrome ont réussi à établir le taux de succès de la méthode tridimensionnelle avec l'index de complexité fractal et la corrélation avec les paramètres standards. La caractérisation de surface et son implication au niveau de l'ancrage du biomatériau permettraient donc de choisir le modèle optimale afin d'assurer le maximum d'ostéo-intégration dans le corps dépendant du site d'implantation.

L'enjeu de ces recherches est de bâtir un système suffisamment simple de la description de surface, qui ne retient que les caractéristiques essentielles du phénomène et qui permet de décrire la surface d'un biomatériau. Cette approche nous l'espérons sera féconde et aidera par exemple dans la conception de nouveaux matériaux. Néanmoins, les méthodes analytiques doivent être approchées avec prudence lorsqu'une surface rugueuse entre en jeu. L'application de la dimension fractale dans ce domaine est un outil complémentaire dans la compréhension des réactions biologiques à l'interface implant-tissu. Les résultats obtenus dans nos études ne peuvent que refléter la complexité des réactions entrant en jeu lors d'expériences *in vitro* et d'autres études supplémentaires pourraient clarifier davantage les mécanismes d'adhésion au niveau moléculaire et permettre une extrapolation au niveau *in vivo*.

Ce travail s'appuie sur une réflexion des méthodes de mesure rugosimétriques. Il introduit surtout une nouvelle approche fondée sur la théorie fractale qui ajouterait un complément au domaine de la description des surfaces.

## **BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

Adamson, A.W. Physical chemistry of surfaces. John Wiley & Sons Inc (éditeur), New York, 1990, pp.329-420.

Andrade, J.D. et Hlady, V. Protein adsorption and materials. Biocompatibility: a tutorial review and suggested hypothesis. *Adv. Polym. Sc.*, **79**:1-63, 1986.

Agins, H.J., Alcock, N.W., Bansal, E.A., Salvati, P.P., Wilson, P.M., Pellicci, P.M. et Bullough, P.G. Metallic wear in failed titanium-alloy total hip replacements. *J. Bone Joint Surg.*, **70A**: 347-356, 1988.

Akbarieh, M. et Tawashi, R. Morfic features of solid particles after micronization in fluid energy mill. *Int. J. Pharm.*, **35**: 81-89, 1987.

Akbarieh, M. et Tawashi, R. Surface study of calcium oxalate dihydrate single crystal during dissolution in presence of stones formers. *Scanning Microsc.*, **3**: 139-146, 1989.

Albrektsson, T. et Jacobsson, M. Bone-metal interface in osseointegration. *J. Prosth. Dent.*, **57**:597-607, 1987.

Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Kasemo B, Larson K, Lundstrom I, McQueen DH, Kalak RS. The interface zone of inorganic implants in vivo: Titanium implants in bone. *Ann. Biomed. Eng.*, **11**:1-27, 1983.

Anderson, J.M., Bonfield, T.L. et Ziats, N.P. Protein adsorption and cellular adhesion and activation on biomedical polymers. *Int. J. Artif. Organs*, **13**:375-382, 1990.

Avnir, D. The fractal approach to heterogeneous chemistry surfaces, colloids, polymers. John Wiley & Sons (ed.), Chichester Great Britain, 1990, pp1-66.

Avnir, D. et Farin, D. Fractal scaling laws in heterogeneous chemistry: part I: Adsorptions, chemisorptions and interactions between adsorbates. *New J. Chem.*, **14**:197-206, 1990.

Baier, R.E., Meyer, A.E., Natiella, J.R., Natiella, R.R. et Carter, J.M. Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results. *J. Biomed. Mater. Res.*, **18**:337-355, 1984.

Baier, R.E., Shafrin, E.G. et Zisman, W.A. Adhesion: mechanisms that assist or impede it. *Science*, **162**:1360-1368, 1968.

Barnogrover, D. Substrata for anchorage-dependent cells. Dans: *Mammalian Cell Technology*, W.G. Thilly (éditeur), Butterworths, Boston, 1986, pp131-149.



Behm, R.J. Scanning tunneling microscopy as a means for surface characterization. *Scanning Microsc.*, **Suppl 1**: 61-65, 1987.

Béranger, G. La notion de surface. Dans: *Méthodes Usuelles de Caractérisation des Surfaces*, David et Caplain (éditeurs). Eyrolles, Paris, 1988, pp1-11.

Blouet, J. Microgéométrie et Rugosimétrie. Dans: *Méthodes Usuelles de Caractérisation des Surfaces*. David et Caplain (éditeurs) Eyrolles, Paris, 1988, pp270-289.

Bourauel, C., Fries, T., Drescher, D, et Plietsch, R. Surface roughness of orthodontic wires via atomic force microscopy, laser specular reflectance, and profilometry. *Eur. J. Orthodont.*, **20**: 79-92, 1998.

Borysenko, J.Z. et Woods, W. Density distribution and mobility of surface anions on a normal/transformed cell pair. *Exp. Cell. Res.*, **118**: 215-227, 1979.

Bowers, K., Keller, J., Randolph, B., Wick, D. et Michaels, C. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int. J. Oral. Maxillofac. Impl.*, **7**: 302-310, 1992.

Boyan, B.D., Hummert, T.W., Dean, D.D. et Schwartz, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomat.*, **17**: 137-146, 1996

Brakenhoff, G.J., van der Voort, H.T.M., van Spronson, E.A. et Nanninga, N. 3-dimensional imaging of biological structures by high resolution confocal scanning laser microscopy. *Scanning Microsc.*, **2**: 33-40, 1988.

Branemark, P.I. Osseointegration and its experimental background. *J. Prosth. Dent.*, **50**: 399-410, 1983.

Brodman, R. et Allgauer, M. Comparison of light scattering from rough surfaces with optical and mechanical profilometry. Dans: *Surface Measurement and Characterization*. Proc. SPIE, **1009**: 111-117, 1988.

Brown, SR. A note on the description of surface roughness using fractal dimension. *Geophys. Res. Lett.*, **11**: 1095-1098, 1987.

Brune, D., Evje, D. et Melson, S. Corrosion of gold alloys and titanium in artificial saliva. *Scand. J. Dent. Res.*, **90**: 168-171, 1982.

Brune, D., Hulquist, G. et Leygraf, C. Corrosion resistance of a passivated and non passivated cobalt-chromium alloy. *Scand. J. Dent. Res.*, **92**: 262-267, 1984.

Brunette, D.M. Spreading and orientation of epithelial cells on grooved substrata. *Exp. Cell. Res.*, **167**: 203-217, 1986.

Brunette, D.M. The effect of surface topography on cell migration and adhesion. Dans: *Surface Characterization of Biomaterials*. Ratner, B.D. (éditeur). Elsevier, New York, 1988, pp. 203-217.

Brunette, D.M., Ratkay, J. et Chehroudi, B. Behaviour of osteoblasts on macromachined surfaces. Dans: *The Bone-Biomaterial Interface*. Davies, J.E. (éditeur), University of Toronto Press, Toronto, 1991, pp.170-180.

BS 1134. (1988) *Assessment of Surface Texture. Part I: Methods and Instrumentation. Part II: Guidance and General Information (1990)*. British Standards Institution (éditeur), Milton Keynes, U.K.

Buser, D., Schenk, R.K., Steinemann, S., Fiorellini, J.P., Fox, C.H. et Stich, H. Influence of surface characteristics on bone reactions to titanium implants . A histomorphometric study in miniature pigs. *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**:889-902, 1991.

Busscher, H.J. et Weerkamp, A.H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata.. *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**: 165-173, 1987.

Campbell, C.E. et von Recum, A.F. Microtopography and soft tissue response. *J. Invest. Surg.*, **2**: 51-74, 1989.

Cahn, R.W. Fractal dimension and fracture. *Nature*, **338**: 201-201, 1989.

Carlsson, K. et Lundahl, P. Three-dimensional specimen recording and interactive display using confocal laser microscopy and digital image processing. *Mach. Vis. Appl.*, **4**: 215-225, 1991.

Carlsson, L., Rostlund, T., Albrektsson, B. et Albrektsson, T. Removal torques for polished and rough titanium implants. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.*, **3**: 21-24, 1988.

Carstensen, J.T. et Franchini, M. The use of fractal geometry in pharmaceutical systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **19**: 85-100, 1993.

Casillas, N., Charlebois, S., Smyrl, W.H. et White, H.S. Pitting corrosion of titanium. *J. Electrochem. Soc.*, **141**: 636-642, 1994.

- Chambers, T.J. The response of the macrophage to foreign material. Dans: *Fundamental Aspects of Biocompatibility*, Williams, D.F. (éditeur) CRC Press Inc., Boca Raton FL, 1981. pp.145-158.
- Chehroudi, B., Ratkay, J. et Brunette, D.M. The role of implant surface geometry on mineralization in vivo and in vitro: A transmission and scanning electron microscopic study. *Cells & Materials*, **2**: 89-104, 1992.
- Chermant, J.L. et Coster, M. Introduction à l'analyse d'images. *J. Microsc. Spectrosc. Electron.*, **12**: 1-21, 1987.
- Chesters, S., Wen, H.Y., Lundin, M. et Kasper, G. Fractal-based characterization of surface texture. *Appl. Surf. Sci.*, **40**: 185-192, 1989.
- Chesters, S., Wang, H-C. et Kasper, G. A fractal-based method for describing surface texture. *Solid State Technol.*, **34**: 73-77, 1991.
- Chong-Hyun, H. et Dong-Hoo, H. A Study on shear-bond strength of the interface between bone and titanium plasma-sprayed IMZ implants in rabbits. *Int. J. Oral. Maxillofac. Impl.*, **9**: 698-709, 1994.
- Cielo, P. Surface Inspection. Dans: *Optical Techniques for Industrial Inspection*. Academic Press (éditeur), San Diego, 1988, Chapter 4, pp. 185-212.
- Clark, N.N. A new scheme for particle shape characterization based on fractal harmonics and fractal dimensions. *Powder Technol.*, **51**: 243-249, 1987.
- Clark, N.N., Durney, T.E. et Meloy, T.P. Recent advances in particle shape characterization. *J. Powder Bulk Solids Technol.*, **8**: 21-24, 1984.
- Cochran, D., Simpson, J., Weber, H. et Buser, D. Attachment and growth of periodontal cells on smooth and rough titanium. *Int. J. Oral. Maxillofac. Impl.*, **9**: 289-297, 1994.
- Collis, J.J. et Embery, G. Adsorption of glycosaminoglycans to commercially pure titanium. *Biomater.*, **13**: 548-552, 1992.
- Cook, S.D., Kay, J.F., Thomas, K.A. et Jarcho, M. Interface mechanics and histology of titanium and hydroxyapatite coated titanium for dental implant applications. *Int. J. Oral Maxillofac. Impl.*, **2**: 15-22, 1987.
- Cook, A.D., Sagers, R.D. et Pitt, W.G. Bacterial adhesion to poly(HEMA)-based hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**: 79-126, 1993.
- Cook, S.P., Walsh, K.A. et Haddad, R.J. Interface mechanics and bone growth into porous Co-Cr-Mo alloy implants. *Clin. Orthop.*, **193**: 271-280, 1985.

- Dalton, J.E., Cook, S.D., Thomas, K.A. et Kay, J.F. The effect of operative fit and hydroxyapatite coating on the mechanical and biological response to porous implants. *J. Bone Joint Surg. Am.*, **77**: 97-110, 1995.
- de Bruin, A. The metabolic fate of foreign compounds. Dans: *Fundamental Aspects of Biocompatibility*, Williams, D.F.(éditeur), CRC Press Inc., Boca Raton Fl, 1981. chapitre 1, pp.3-44.
- de Bruin, J.D., Klein, C.P.A.T., de Groot, K. et van Blitterswijk, C.A. The ultrastructure of the bone-hydroxyapatite interface *in vitro*. *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**:1365-1382, 1992.
- de Groot, K. Effect of porosity and physicochemical properties on the stability resorption and strength of calcium phosphate ceramics. *Ann. N. Acad. Sci.*, **523**: 227-233, 1988.
- de Groot, K., Geesink, R., Klein, C.P. et Serekian, P. Plasma sprayed coatings of hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.*, **21**: 1375, 1987.
- den Braber, E.T., de Ruijter, J.E., Smits, H.T.J., Ginsel, L.A., von Recum, A.F. et Jansen, J.A. Effect of parallel surface microgrooves and surface energy on cell growth. *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**: 511-518, 1995.
- Dexter, S.C. Influence of substratum critical surface tension on bacterial adhesion in situ studies. *J. Colloid. Interface Sci.*, **70**: 346-354, 1979.
- Doran, A., Law, F.C., Allen, M.J. et Rushton, N. Neoplastic transformation of cells by soluble but not particulate forms of metals used in orthopaedic implants. *Biomater.*, **19**: 751-759, 1998.
- Dubuc, S. et Dubuc, B. Error bounds on the estimation of fractal dimension. *SIAM Num. Anal. (Soc. Industrial and Applied Mathematics)*, 1-30, 1997.
- Dubuc, B., Quiniou, J.F., Roques-Carmes, C., Tricot, C. et Zucker, S.W. Evaluating fractal dimension, I: one-dimensional profiles. McGill Research Centre for Intelligent Machines (éditeur), pp.1-30, 1987.
- Dubuc, B. et Tawashi, R. Quantifying the complexity of small-scale 3d laser range data. Dans: *Electronic Imaging: Science and Technology. SPIE Proc.* **2412**: 8-10, 1995.
- Dubuc, B. et Zucker, S.W. Curve-like sets, complexity maps and representation. CIM Technical Report 94-02, McGill University, Center for Intelligent Machines (éditeur), Montreal, Canada. pp. 1-30, 1994.
- Dubuc, B., Zucker, S.W., Tricot, C., Whebi, D. et Quiniou, J.F. Evaluating the fractal dimension of surfaces. *Proc. Roy. Soc. (London Series A): Math. Phys. Sci.*, **425**: 113-127, 1989.

Dujovne, A.R., Bobyn, J.D., Krygier, J.J., Miller, J.E. et Brooks, C.E. Mechanical compatibility of noncemented hip prostheses with the human femur. *J. Arthropl.*, **8**: 7-22, 1993.

Dunn, G.A. et Brown, A.F. Alignment of fibroblasts on grooved surfaces described by a simple geometric transformation. *J. Cell. Sci.*, **83**: 313-340, 1986.

Eftekhari, N.S. et Tzitzikolakis, G.I. Failures and reoperations following low-friction arthroplasty of the hip. *Clin. Orthop. Res.*, **211**: 65-78, 1986.

Eick, J.D., Good, R.J. et Neumann, A.W. Thermodynamics of contact angles II. Rough Solid Surfaces. *J. Colloid. Interface Sci.*, **53**: 235-248, 1975.

Elves, M.W. Immunological aspects of biomaterials. Dans: *Fundamental Aspects of Biocompatibility*, Williams, D.F. (éditeur), CRC Press Inc., Boca Raton FL, 1981. chapitre 9, pp.159-174.

Esposito, M., Hirsch, J.M., Lekholm, U. et Thomson, P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants (II). *Eur. J. Oral Sci.*, **106**: 721-764, 1998.

Facchini, P.J., Neumann, A.W. et Dicosmo, F. Thermodynamic aspects of plant cell adhesion to polymer surfaces. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**: 346-355, 1988.

Farin, D. et Avnir, D. Use of fractal geometry to determine effects of surface morphology on drug dissolution. *J. Pharm. Sci.*, **81**: 54-57, 1992.

Farin, D. et Avnir, D. The reaction dimension in catalysis on dispersed metals. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**: 2039-2045, 1988.

Farin, D., Peleg, S., Yavin, D. et Avnir, D. Applications and limitations of boundary-line fractal analysis of irregular surfaces: proteins, aggregates, and porous materials. *Langmuir*, **1**: 399-407, 1985.

Facchini, P.J., Dicosmo, F., Radvanyi, L.G. et Giguere, Y. Adhesion of *Catharanthus roseus* cells to surfaces: effects of substrate hydrophobicity. *Biotechnol. Bioeng.*, **32**: 935-938, 1988.

Feder, J. The fractal dimension. Dans : *Fractals*, Plenum Press (éditeur), New York, 1988, pp. 1-30.

Feighan, J.E., Goldberg, V.M., Davy, D., Parr, J.A. et Stevenson, S. The influence of surface-blasting on the incorporation of titanium-alloy implants in a rabbit intramedullary model. *J. Bone Joint Surg.*, **77-A**: 1380-1395, 1995.

- Fernández-Hervás, M.J., Holgado, M.A., Rabasco, A.M. et Fini, A. Use of fractal geometry on the characterization of particles morphology. Application to the diclofenac hydroxyethylpyrrolidine salt. *Int. J. Pharm.*, **8**: 187-194, 1994.
- Fletcher, M. et Pringle, J.H. The effect of surface free energy and surface tension on bacterial attachment to solid surfaces. *J. Colloid. Interface Sci.*, **104**: 5-14, 1985.
- Fowkes, F.M. Dispersion force contributions to surface and interfacial tensions, contact angles, and heats of immersion. *Adv. Chem. Ser.*, **1**: 99-111, 1964.
- Gagnepain, J.J. et Roques-Carnes, C. Fractal approach to two-dimensional and three-dimensional surface roughness. *Wear*, **109**: 119-126, 1986.
- Gerner, B.T., Barth, E., Albrektsson, T., Ronningen, H., Solheim, L.F. et Wie, H. Comparison of bone reactions to coated tricalcium phosphate and pure dental titanium in the canine iliac crest. *Scand. J. Dent. Res.*, **96**: 143, 1988.
- Glass, J.R., Dickenson, K.T., Stecker, K. et Polarek, J.W. Characterization of a hyaluronic acid-Arg-Gly-Asp peptide cell attachment matrix. *Biomater.*, **17**: 1101-1108, 1996.
- Goldberg, V.M., Stevenson, S., Feighan, J. et Davy, D. Biology of grit-blasted titanium alloy implants. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **319**: 122-129, 1995.
- Gomer, R. et Gong, Y.M. Surface roughening studies by field emission. *Scanning Microsc.*, **1**: 1571-1574, 1987.
- Good, R.J. Surface free energy of solids and liquids: thermodynamics, molecular forces and structure. *J. Colloid. Interface Sci.*, **59**: 398-419, 1977.
- Good, R.J. Contact angle wetting and adhesion. A critical review. *J. Adhesion Sci.*, **6**: 1269-1302, 1992.
- Goodchild, M.F. Fractals and the accuracy of geographical measures. *Math.Geol.*, **12**: 80-98, 1980.
- Goodman, S.B., Fornasier, V.L., Lee, J. et Kei, J. The effects of bulk versus particulate titanium and cobalt chrome alloy implanted into the rabbit tibia. *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**: 1539-1549, 1990.
- Gotfredsen, K., Wennerberg, A., Johansson, C., Skovgaard, L.T. et Hjorting-Hansen, E. Anchorage of TiO<sub>2</sub>-blasted, HA-coated, and machined implants: an experimental study with rabbits. *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**: 1223-1231, 1995.
- Gray, C., Boyde, A. et Jones, S.J. Topographically induced bone formation in vitro: implications for bone implants and bone grafts. *Bone*, **18**: 115-123, 1996.

- Green, A.M., Jansen, J.A., van der Waerden, J.P.C.M. et von Recum, A.F. Fibroblast response to microtextured silicone surfaces: Texture orientation into or out of the surface. *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**: 647-653, 1994.
- Grinnell, F. Cell spreading factor. Occurrence and specificity. *Exp. Cell. Res.*, **102**: 51-62, 1976.
- Grinnell, F. et Feld, M.K. Adsorption characteristics of plasma fibronectine in relationship to biological activity. *J. Biomed. Mater. Res.*, **15**: 363-381, 1981.
- Grinnell, F. et Feld, M.K. Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *J. Biol. Chem.*, **257**: 4888-4893, 1982.
- Grinnell, F., Milam, M. et Sreere, P. Attachment of normal and transformed hamster kidney cells to substrata varying in chemical composition. *Bioch. Med.*, **7**: 87-90, 1973.
- Grinnell, F. et Hays, D.G. Induction of cell spreading by substratum-adsorbed ligands directed against the cell surface. *Exp. Cell. Res.*, **116**: 275-284, 1978.
- Gristina, A.G. Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, **298**: 106-118, 1994.
- Goshima, J., Goldberg, V.M. et Caplan, A.I. Osteogenic potential of culture-expanded rat marrow as assayed in vivo with porous calcium phosphate ceramic. *Biomater.*, **12**: 253-258, 1991.
- Gross, U., Brandes, J., Strunz, V., Bab, I. et Sela, J. The ultrastructure of the interface between a glass ceramic and bone. *J. Biomed. Mater. Res.*, **15**: 291-305, 1981.
- Groth, T. et Altankov, G. Studies on cell-biomaterial interaction: role of tyrosine phosphorylation during fibroblast spreading on surfaces varying in wettability. *Biomater.*, **17**: 1227-1234, 1996.
- Gundmundsson, G. et Kjaer, J. Failures in total hip replacement, a long-time follow up. *Acta Orthop. Belgica*, **52**: 405-414, 1986.
- Guyon, E., Mitescu, C.D., Hulin, J.P. et Roux, S. Fractals and percolation in porous media and flows? *Physica D.*, **38**: 172-178, 1989.
- Hafsteisson, H. et Rizvi, S.S.H. Acoustic microscopy-principles and applications in the studies of biomaterial microstructure. *Scanning Elect. Microsc.*, **3**: 1237-1247, 1984.
- Han, C.H., Johansson, C.B., Wennerberg, A. et Albrektsson, T. Quantitative and qualitative investigation of surface enlarged titanium and titanium alloy implants. *Clin. Oral Impl. Res.*, **9**: 1-10, 1998.

Haque, Y, et Ratner, B.D. The preparation and properties of plasma-deposited films with surface energies varying over a wide range. *J. Appl. Polym. Sci.*, 32: 4369-4381, 1986.

Hanawa, T., Kaya, M., Itoh, Y., Echizenya, T., Oguchi, H. et Ota, M. Cytotoxicities of oxides, phosphates and sulphides of metals. *Biomat.*, 12: 20-24, 1992.

Hanawa, T. et Ota, M. Calcium phosphate naturally formed on titanium in electrolyte solution. *Biomat.*, 12: 767-774, 1991.

Hanson, S.R., Harker, L.A., Ratner, B.D. et Hoffman, A.S. In vivo evaluation of artificial surfaces with a nonhuman primate model of arterial thrombosis. *J. Lab. Clin. Med.*, 95: 289-304, 1980.

Haynes, D.R. Boyle, S.J., Rogers, S.D., Howie, D.W. et Vernon-Roberts, B. Variation in cytokines induced by particles from different prosthetic materials. *Clin. Orthop.*, 352: 223-230, 1998.

Hazlett, R.D. Fractal applications: wettability and contact angle. *J. Colloid. Interface Sci.*, 137: 527-533, 1990.

Healy, K.E., Thomas, C.H., Rezenia, A., Kim, J.E., McKeown, P.J., Lom, B. et Hockberger, P.E. Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry. *Biomat.*, 17: 195-208, 1996.

Hench, L.L. Stability of ceramics in the physiological environment. Dans: *Fundamental Aspects of Biocompatibility*, Williams, D.F. (éditeur), CRC Press Inc., Boca Raton FL, 1981. chapitre 4, pp.67-86.

Hench, L.L. et Pashall, H.A. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J. Biomed. Mater. Res.*, 7: 25-42, 1973.

Horbett, T.A. et Schway, M.B. Correlations between mouse 3T3 spreading and serum fibronectin adsorption on glass and hydroxyethylmethacrylate-ethylmethacrylate copolymers. *J. Biomed. Mater. Res.*, 22: 763-793, 1988.

Howlett, C.R., Evans, M.D.M., Walsh, W.R., Johnson, G. et Steele, J.G. Mechanism of initial attachment of cells derived from human bone to commonly used prosthetic materials during cell culture. *Biomat.*, 15: 213-222, 1994.

Hughes, R.C., Pena, S.D.J., Clark, J. et Dourmashkin, R.R. Molecular requirements for the adhesion and spreading of hamster fibroblasts. *Exp. Cell. Res.*, 121: 307-314, 1979.

Huh, C. et Mason, S.G. Effect of surface roughness on wetting (theoretical). *J. Colloid Interface Sci.*, 60: 11-38, 1977.



- Hurlen, T. et Hornkjol, S. Anodic growth of passive films on titanium. *Electroc. Acta*, **36**: 189-195, 1991.
- Ikada, Y. Surface modification of polymers for medical applications. *Biomat.*, **15**: 725-736, 1994.
- Ingber, D.E. Cellular tensegrity: Defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J. Cell. Sci.*, **104**: 613-627, 1993.
- ISO 468. Surface Roughness Parameters: Their Values and General Rules for Specifying Requirements. International Organization for Standardization (éditeur), Geneva, Switzerland, 1982, pp. 1-20.
- Israelachvili, J.N. Adhesion. Dans: Intermolecular and surface forces. (2ième édition) Academic Press Inc (éditeur), San Diego, CA. 1992, pp.312-421.
- Ito, E., Kajihara, M. et Imanishi, Y. Materials for enhancing cell adhesion by immobilisation of cell-adhesive peptide. *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**: 1325-1337, 1991.
- Iuliano, D.J., Saavedra, S.S. et Truskey, G.A. Effect of the conformation and orientation of adsorbed fibronectin on endothelial cell spreading and the strength of adhesion. *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**: 1103-1113, 1993.
- Johnson, S.D., Anderson, J.M. et Marchant, R.E. Biocompatibility studies on plasma polymerized interface materials encompassing both hydrophobic and hydrophilic surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**: 915-935, 1992.
- Johnson, R.E. et Dettre, R.H. Contact angle hysteresis III. Study of an idealized heterogeneous surface. *J. Phys. Chem.*, **68**: 1744-1750, 1964.
- Jonsson, U., Ivarsson, B., Lundstrom, L. et Berghem, L. Adsorption behavior of fibronectin on well characterized silica surfaces. *J. Colloid. Interface Sci.*, **90**: 148-163, 1982.
- Kaelble, D.H., Dynes, P.J. et Cirlin, E.H. Interracial bonding and environmental stability of polymer matrix composites. *J. Adhes.*, **6**: 23-48, 1974.
- Kaelble, D.H. et Moacanin, J. A surface energy analysis of bioadhesion. *Polymer*, **18**: 475-482, 1977.
- Kasemo, B. Biocompatibility of titanium implants surface science aspects. *J. Prosth. Dent.*, **49**: 832-837, 1983.

Keller, J.C. Dougherty, W.J., Grotendorst, G.R. et Wightman, J.P. In vitro cell attachment to characterized titanium surfaces. *J. Adhesion*; **28**: 115-133, 1989.

Keller, J., Draughn, R., Wightman, J., Dougherty, W. et Meletiou, S. Characterization of sterilized CP titanium implant surfaces. *Int. J. Oral Maxillofac. Impl.*, **5**:360-367, 1990.

Kilpadi, D.V. et Lemons, J.E. Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**:1419-1425, 1994.

Kinloch, A.J. The science of adhesion. *J. Mater. Sci.*, **15**: 2114-2166, 1980.

Kino, G.S. et Corle, T.R. Confocal scanning optical microscopy. *Phys. Today*, **42**: 55-62, 1989.

Klein, C.P.A.T., Driessen, A.A., de Groot, K. et van den Hoof, A. Biodegradation behaviour of various calcium phosphate materials in bone tissue. *J. Biomed. Mater. Res.* **17**: 769-782, 1983.

Kleinman, H.K., Klebe, R.J. et Martin, G.R. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth cells. *J. Cell. Biol.*, **88**: 473-485, 1981.

Ko, T.M., Lin, J.C. et Cooper, S.L. Surface characterization and platelet adhesion studies of plasma-sulphonated polyethylene. *Biomater.*, **14**: 657-664, 1993.

Kocova, S., Thibert, R. et Tawashi, R. Use of the fractal dimension in the study of fractured surfaces of insulin crystals. *J. Pharm. Sci.*, **82**: 844-846, 1993.

Kokubo, T., Kitsugi, T. et Yamamuro, T. Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**: 331-343, 1990.

Lang, N.P., Bragger, U., Walther, D., Beaner, B. et Kornman, K.S. Ligature-induced peri-implant infection in cynomolgus monkeys. Clinical and radiographic findings. *Clin. Oral Impl. Res.*, **4**: 2-11, 1993.

Larsson, C., Thomsen, P., Lausmaa, J., Rodahl, M., Kasemo, B. et Ericson, L.E. Bone response to surface modified titanium implants: studies on electropolished implants with different oxide thicknesses and morphology. *Biomater.*, **15**: 1062-1074, 1994.

Lausmaa, G.J. et Kasemo, B. Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials. *Appl. Surf. Sci.*, **44**: 133-146, 1990.

Levi-Setti, R., Chabala, J.M., Li, J., Gavilov, K.L., Mogilevsky, R. et Sone, K.K. Imaging-SIMS (secondary ion mass spectroscopy) studies of advanced materials. *Scanning Microsc.*, **7**: 1161-1172, 1993.

Levine, M.D. Vision in man and machine. McGraw-Hill (éditeur), Montréal, Québec, Canada. 1985, pp. 1-20.

Loty, C., Loty, S. et Sautier, J.M. Interfaces os/matériaux bioactifs implantables. *Implant*, **4**: 101-109, 1998.

Lung, C.W. et Zhang, S.Z. Fractal dimension of the fractured surface of materials. *Physica D*, **38**: 242-245, 1989.

Lydon, M.J. Synthetic hydrogels as substrata for cell adhesion studies. *Brit. Polym. J.*, **18**: 22-27, 1986.

Machnée, C.H., Wagner, W.C., Jaarda, M.J. et Lang, B.R. Identification of oxide layers of commercially pure titanium in response to cleaning procedures. *Int. J. Oral Maxillofac. Impl.*, **8**: 529-533, 1993

Majumdar, A. et Bushan, B. Role of fractal geometry in roughness characterization and contact mechanics of surfaces. *J. Tribol.*, **112**; 205-216, 1990.

Mandelbrot, B.B. *The Fractal Geometry of Nature*. Freeman WH, (éditeur), San Francisco, CA, 1982, pp. 1-60.

Mandelbrot, B.B., Passoja, D.E. et Paullay, A.J. Fractal character of fracture surfaces of metals. *Nature*, **308**: 721-722, 1984.

Martin, A. Swarbrick, J. Cammarata, A. *Physical Pharmacy*. Third edition, Lea & Febiger (éditeurs), Washington, USA, 1983, pp. 445-521.

Martin, J.Y., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Schraub, D.M., Simpson, J., Lankford, Jr. J., Dean, D.D., Cochran, D.I. et Boyan, B.D. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**: 389-401, 1995.

McNamara, A. et Williams, D.F. Enzyme histochemistry of the tissue response to pure metal implants. *J. Biomed. Mater. Res.*, **18**:185-206, 1984.

Meachim, G. et Pedley, R.B. The tissue response at implant sites. Dans: *Fundamental Aspects of Biocompatibility*, Williams, D.F. (éditeur), CRC Press Inc., Boca Raton FL, 1981. chapitre 6, pp. 107-144.

Meachim, G. et Williams, D.F. Changes in nonosseous tissue adjacent to titanium implants. *J. Biomed. Mater. Res.*, **7**: 555-571, 1973.

Meakin, P. The growth of self-affine fractal surfaces. *Physica D*. **38**:252-259, 1989.

Merritt, K., Margevicius, R.W. et Brown, S.A. Storage and elimination of titanium aluminium, and vanadium salts in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**: 1503-1515, 1992.

Merritt, K. et Rodrigo, J.J. Immune response to synthetic materials. Sensitization of patients receiving orthopaedic implants. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **326**: 71-79, 1996.

Meyle, J., Gültig, K. et Nisch, W. Variation in contact guidance by human cells on a microstructured surface. *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**: 81-88, 1995.

Meyle, J., Gültig, K., Wolburg, H. et von Recum, A.F. Fibroblast anchorage to microtextured surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**: 1553-1557, 1993.

Meyle, J., Wolburg, H. et von Recum, A.F. Surface micromorphology and cellular interactions. *J. Appl. Biomater.*, **7**: 362-374, 1993a.

Meyle, J., Von Recum, A.F., Gibbesch, B., Hüttemann, W., Schlagenhauf, U. et Schulte, W. Fibroblast shape conformation to surface micromorphology. *J. Appl. Biomater.*, **2**: 273-276, 1991.

Möller, K., Meyer, U., Szulczewski, D.H., Heide, H., Priessnitz, B. et Jones, D.B. The influence of zeta potential and interfacial tension on osteoblast-like cells. *Cells & Materials* **4**: 263-274, 1994.

Molvig, J., Back, L., Christensen, P., Manogue, K.R., Vlassara, H., Platz, P., Nielsen, L.S., Svejgaard, A. et Nerup, J. Endotoxin stimulated human monocyte secretion of IL-1, TNF and PGF2 shows stable interindividual differences. *Scand. J. Immunol.*, **27**: 705, 1988.

Mozes, N., Marshal, F., Hermess, M.P., van Haecht, J.L. et Reuliaux, L. Immobilisation of microorganisms by adhesion: interplay of electrostatic and non electrostatic interactions. *Biotechnol. Bioeng.*, **30**: 439-450, 1987.

Mu, Z.Q. et Lung, C.W. Studies on the fractal dimension and fracture toughness of steel. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **21**: 848-850, 1988.

Mueller, H.J. et Bapna, M.S. Microstructure enhancement of dental composite and ceramic materials by plasma etching. *Cells & Materials* **3**: 37-43, 1993.

Muster, D., Humbert, P. et Mosser, A. Surface physics methods and in vitro bone-biomaterial interface control. *Biomater.*, **11**: 57-62, 1990.

Nakahara, H., Goldberg, V.M. et Caplan, A.I. Cultured-expanded periosteal derived cells exhibit osteochondrogenic potential in porous calcium phosphate ceramics in vivo. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, **276**: 291-298, 1992.

Nanci, A. McCarthy, G.F., Zalzal, S., Clokie C.M.L., Warshawsky, H. et McKee M.D. Tissues response to titanium implants in the rat tibia: ultrastructural, immunocytochemical and lectin-cytochemical characterization of the bone-titanium interface. *Cells & Materials*, **4**:1-3, 1994.

Naumann, K.H. et Bunz, H. Aerodynamic properties of aerosol particles. *J. Aerosol. Sci.*, **22**: 161-164, 1991.

Neo, M., Kotani, S., Fujita, Y., Nakamura, T. et Yamamuro, T. Differences in ceramic-bone interface between surface-active ceramics and resorbable ceramics: a study by scanning and transmission electron microscopy. *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**: 255-267, 1992.

Neo, M., Kotani, S., Nakamura, T. et Yamamuro, T. A comparative study of ultrastructures of the interfaces between four kinds of surface-active ceramic and bone. *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**: 1419-1432, 1992.

Newmann, A.W., Good, R.J., Hope, C.J. et Sejpal, M. An equation of state approach to determine surface tensions of low-energy solids from contact angles. *J. Colloid. Interface Sci.*, **49**: 291-304, 1974.

Newmann, A.W., Hum, O.S., Francis, D.W., Zingg, W. et van Oss, C.J. Kinetic and thermodynamic aspects of platelets adhesion from suspension to various substrates. *J. Biomed. Mater. Res.*, **14**: 499-509, 1980.

Nicholson, D.R. *Introduction to Plasma Theory*. John Wiley & Sons, Inc., (éditeur), New York., 1983, pp. 1-15.

Niederauer, G.G., McGee, T.D., Keller, J.C. et Zaharias, R.S. Attachment of epithelial cells and fibroblasts to ceramic materials. *Biomater.*, **15**: 342-352, 1994.

Norde, W. Adsorption of proteins at solid-liquid interfaces. *Cells & Materials*. **5**: 97-112, 1995.

Norton, M.R. Marginal bone levels at single tooth implants with a conical fixture design. The influence of surface macro- and microstructure. *Clin. Oral Impl. Res.*, **9**: 91-99, 1998.

Oakley, C. Brunette D.M. The sequence of alignment of microtubules, focal contacts and actin filaments in fibroblasts spreading on smooth and grooved titanium substrata. *J. Cell. Sci.*, **106**: 343-354, 1993.

Obert, M., Pfeifer, P. et Sernetz ,M.. Microbial growth patterns described by fractal geometry. *J. Bacteriol.*, **172**: 1180-1185, 1990.

Ockleford, C. The confocal laser scanning microscope (CLSM). *J. Pathol.*, **176**: 1-2, 1995.

Ong, J.L., Prince, C.W., Raikar, G.N. et Lucas, L.C. Effect of surface topography of titanium on surface chemistry and cellular response. *Implant Dent.*, **5**: 83-88, 1996.

Oppenheim, J.J. et Gery, I. Interleukin 1 is more than an interleukin. *Immun. Today*, **3**: 113-119, 1982.

Oseas, R.S., Allen, J., Yang, H.H., Gachner, R.L. et Boxer, L.A. Rabbit cationic protein enhances leucocyte adhesiveness. *Infect. Immun.*, **33**: 523-526, 1981.

Ozeki, S. Estimation of pore and surface structures of solids by dye adsorption: the preadsorption method and fractal analysis. *Langmuir*, **5**: 186-191, 1989.

Park, K., Simmons, S.R. et Albrecht, R.M. Surface characterization of biomaterials by immunogold staining-quantitative analysis. *Scanning Microsc.*, **1**: 339-350, 1987.

Pedley, R.B., Meachim, G. et Williams, D.F. Tumor induction by implant materials. Dans: *Fundamental Aspects of Biocompatibility*, Williams, D.F. (éditeur), CRC Press Inc., Boca Raton Fl, 1981. chapitre10, pp.175-204.

Peitgen, H.O., Jürgens, H. et Saupe, D. Classical fractals and self-similarity. Dans: *Fractals for the classroom. Part 1. Introduction to fractals and chaos*, Springer-Verlag, New York Inc. (éditeur), 1992, pp.75-150.

Pentland, A.P. Fractal-based description of natural scenes. *IEEE Trans. Pattern. Anal. and Mach. Intell.*, **PAMI-6**: 661-674, 1984.

Pentland, A.P. On describing complex surface shapes. *Image Vis. C.*, **3**: 153-162, 1985.

Peppas, N.A. et Buri, P.A. Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *J. Contr. Rel.*, **2**: 257-275, 1985.

Pettit, D.K., Hoffman, A.S. et Horbett, T.A. Correlation between corneal epithelial outgrowth and monoclonal antibody binding to the cell binding domain of fibronectin. *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**: 685-691, 1994.

Pfeifer, P. Fractal dimension as working tool for surface-roughness problems. *Appl. Surf. Sci.*, **18**: 146-164, 1984.

Piattelli, A., Scarano, A., Piattelli, M. et Calabrese, L . Direct bone formation on sand-blasted titanium implants: An experimental study. *Biomat.*, **17**: 1015-1018, 1996.

Pimienta, C., Dubuc, B. et Tawashi, R. Surface fractal dimension and the quantification of roughness of titanium implant material. *Cells & Materials* **4**: 379-386, 1994.

Pimienta, C. et Tawashi, R. Quantifying the surface geometry of titanium implant material by different methods of analysis. *Scanning Microsc.*, 1-11, 1998.

Polanski, J.P., Freed, P., Wasfie, T., Kantrowitz, A., Vaughan, F., Berstam, L., Gray, R. et Bernstein, I. Inhibition of epithelial down growth on percutaneous access devices in swine. *Trans ASAIO* **29**: 569-573, 1983.

Powell, M.S. et Slater, N.K.H. Removal rates of bacterial cells from glass surfaces by fluid shear. *Biotechnol, Bioeng.*, **24**: 2527-2537, 1982.

Pulapura, S. et Kohn, J. Trends in the development of bioresorbable polymers for medical applications. *J. Biom. Appl.*, **6**: 216-250, 1992.

Quinquis, P., Batifouye-Celhay, C. et Colat-Parros, J. Le titane: un matériau de choix ? *J. Biom. Dent.*, **8**: 31-47, 1993.

Quiryneen, M. et Bollen, C.M.L. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra-and subgingival plaque formation in man. A review of the litterature. *J. Clin.Periodont.*, **22**: 1-14, 1995.

Rajaraman, R., Rounds, D.E., Yen, S.P.S. et Rembaum, A. A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. *Exp. Cell. Res.*, **88**: 327-339, 1974.

Ratner, B.D. How finely can we resolve surface structure? Dans: *Surface Characterization of Biomaterials*. Ratner, B.D. (éditeur). Elsevier, New York, 1988. pp.13-36.

Ratner, B.D., Johnson, A.B. et Lenk, T.J. Biomaterial surfaces. *J. Biomed. Mater. Res., Appl. Biomater.*, **21**: 59-90, 1987.

Remes, A. et Williams, D.F. Immune response in biocompatibility. *Biomater.*, **12**: 731-743, 1992.

Rigaut, J.P. et Robertson, B. Modèles fractals en biologie. *J. Microsc. Spectrosc. Electron.*, **12**: 163-167, 1987

Robinson, G., Perry, D.M. et Peterson, R.W. Optical interferometry of surfaces. *Scient. Am.*, **265**: 66-71, 1991.

Roques-Carmes, C. et Wehbi, D. Approche fractale des surfaces et implications analytiques. Dans: *Méthodes usuelles de caractérisation des surfaces*, David, D. et Caplain, R. (éditeurs), St-Germain, Paris, 1988, pp327-337.

- Ruckenstein, E. et Gourisankar, S.V. A surface energetic criterion of blood compatibility of foreign surfaces. *J. Colloid. Interface Sci.*, **101**: 436-451, 1984.
- Ruoslahti, E. et Pierschbacher, M.D. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell* **44**: 517-518, 1986.
- Salthouse, T.N. et Matlaga, B.F. Enzyme histochemistry of cellular response to implants. Dans: *Fundamental Aspects of Biocompatibility*, Williams, D.F. (éditeur), CRC Press Inc., Boca Raton Fl, 1981. chapitre 13, pp. 233-258.
- Sandborn, P.M., Cook, S.D., Spires, W.P. et Kester, M.A. Tissue response to porous coated implants lacking initial bone apposition. *J. Arthropl.*, **3**: 337-346, 1988.
- Sautier, J.M., Nefussi, J.R. et Forest N. Ultrastructural study of bone formation on synthetic hydroxyapatite in osteoblast culture. *Cells & Materials*, **1**: 209-217, 1991.
- Schakenraad, J.M., Oosterbaan, J.A. et Blaauw, E.H. Preservation of the cell-biomaterial interface at the ultrastructure level. *Cells & Materials* **1**: 35-40, 1991.
- Schliephake, H., Neukan, F.W. et Klosa, D. Influence of pore dimension on bone ingrowth into porous hydroxyapatite blocks used as bone graft substitutes. A histochemistic study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **20**: 53-58, 1991.
- Schrader, M.E. On adhesion of biological substances to low energy solid surface. *J. Colloid. Interface Sci.*, **88**: 296-297, 1982
- Schwartz, Z. et Boyan, B.D. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J. Cell. Biochem.*, **56**: 340-347, 1994.
- Serra, J. Hit or miss transformation, erosion and opening. Dans: *Image Analysis and Mathematical Morphology*. Serra, J. (éditeur), Academic Press, Inc. London, 1982, pp. 2-23.
- Sherbett, G.V., Lackshmi, M.S. et Rao, K.V. Characterization of inorganic groups and estimation of the net negative electric charge on the surface of cells using natural pH gradients. *Exp. Cell. Res.*, **70**: 113-123, 1972.
- Shimazaki, K. et Mooney, V. Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute. *J. Orthop. Res.*, **3**: 301-310, 1985.
- Schmidt, J.A. et von Recum, A.F. Surface characterization of microtextured silicone. *Biomat.*, **13**: 675-681, 1992.



Sipehia, R. Attachment and growth of endothelial cells on modified surfaces of polystyrene and poly(tetrafluoroethylene) by anhydrous ammonia gaseous technique. 39<sup>ème</sup> Conférence Canadienne de Génie Chimique, Hamilton, 1-4, 1989.

Smart, P. et Leng, X.. Present developments in image analysis. *Scanning Microsc.*, **7**: 5-16, 1993.

Steele, J.G., Johnson, G., Norris, W.D. et Underwood, P.A. Adhesion and growth of cultured human endothelial cells on perfluorosulphonate role of vitronectin and fibronectine in cell attachment. *Biomater.*, **12**: 531-539, 1991.

Steinberg, J., Newmann, A.W., Absolom, D.R. et Zingg, W. Human erythrocyte adhesion and spreading on protein-coated polymer surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.*, **23**: 591-610, 1989.

Stenström, T.A. Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to oil particles. *App. Env. Microbiol.*, **55**: 142-147, 1989.

Sundgreen, J.E., Bodö, P. et Lundström, I. Auger electron spectroscopic studies of the interface between human tissue and implants of titanium and stainless steel. *J. Colloid. Interface Sci.*, **110**: 9-20, 1986.

Sutherland, D.S., Forshaw, P.D., Allen, G.C., Brown, I.T. et William, K.R. Surface analysis of titanium implants. *Biomater.*, **14**: 893-899, 1993.

Swanson, A.B., Meester, W.D., Swanson, G., Rangaswamy, L. et Schut, G.E.P. Durability of silicone implants-an in vivo study. *Orthop. Clin. North. Am.*, **4**: 1097, 1973.

Swart, K.M. Keller, J.C., Wightman, J.P., Draughn, R.A., Stanford, C.M. et Michaels, C.M. Short-term plasma-cleaning treatments enhance in vitro osteoblast attachment to titanium. *J. Oral. Implantol.*, **18**: 130-137, 1992.

Taborelli, M., Jobin, M., François, P., Vaudraux, P. Tonetti, M., Szmukler-Moncler, S., Simpson, J.P. et Descouts, P. Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. *Clin. Oral Impl. Res.*, **8**: 208-216, 1997.

Tanagiswaw, I., Sakuma, H., Shimura, M., Wakamatsu, S., Yanggisawa, S. et Sairenji, E. The effects of wettability of biomaterials on culture cells. *J. Oral. Implantol.*, **15**: 168-177, 1989.

Tang, L. et Eaton, J.W. Mechanism of acute inflammatory response to biomaterials. *Cells & Materials*, **4**: 429-436, 1994.

Taylor, S.R. et Gibbons, D.F. Effect of surface texture on the soft tissue response to polymer implants. *J. Biomed. Mater. Res.*, **17**: 205-227, 1983.

Tengvall, P. et Lundstrom, I. Physico-chemical considerations of titanium as a biomaterial. *Clin. Mater.*, **9**: 115-134, 1992.

Tengvall, P., Lundstrom, I., Sjoquist, L. et Elwing, H. Titanium hydrogen peroxyde interactions: model studies of the influence of the inflammatory response on titanium implants. *Biomater.*, **10**: 166-175, 1989.

Terranova, V.P., Rohrbach, D.H. et Martin, G. Role of laminin in the attachment of PAM212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. *Cell*, **22**: 719-726, 1980.

Thibert, R., Akbarieh, M. et Tawashi, R. Morfic features variation of solid particles after size reduction: sonification compared to jet mill grinding. *Int. J. Pharm.*, **47**: 171-177, 1988.

Thibert, R., Dubuc, B., Dufour, M. et Tawashi, R. Evaluation of the surface roughness of cystine stones using a visible diode laser scattering approach. *Scanning Microsc.*, **7**: 555-561, 1993.

Thibert, R. et Tawashi, R. Application of fractal dimension to the study of surface ruggedness of granular solids and excipients. *J. Pharm. Sci.*, **77**: 724-726, 1988.

Thomas, K. et Cook, S. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**: 875-890, 1985.

Thomas, K.A., Kay, J.F., Cook, S.D. et Jarcho, M. The effect of surface microtexture and hydroxyapatite coating on the mechanical strengths and histologic profiles of titanium implant material. *J. Biomed. Mater. Res.*, **21**: 1395, 1987.

Thorne, N.A., Dubus, A. et Degève, F. High sensitivity ion microscopy: a tool for material science research. *Scanning Electron Microsc.*, **4**: 1255-1265, 1986.

Toth, R.W., Pan, G.R. et Gardner, L.K. Soft tissue response to endosseous titanium oral implants. *J. Prosth. Dent.*, **54**: 564-567, 1985.

Tricot, C., Quiniou, J.F., Wehbi, D., Roques-Carmes, C. et Dubuc, B. Evaluation de la dimension fractale d'un graphe. *Rev. Phys. Appl.*, **23**: 111-124, 1988.

Tricot, C. et Salem, S. Dérivées fractionnaires et dimension fractale. EMP/RT-94/19. Ecole Polytechnique. Département de mathématiques appliquées, 1994.

Truskey, G.A. et Pirone, J.S. The effect of fluid shear upon cell adhesion to fibronectin-treated surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**: 1333-1353, 1990.

Underwood, P.A. et Bennett, F.A. A comparison of the biological activities of the cell-adhesive proteins vitronectin and fibronectin. *J. Cell. Sci.*, **93**: 641-649, 1989.

Uyen, H.M.W., Schakenraad, J.M., Sjollem, J., Noordmans, J., Jongebloed, W.L., Stokroos, I. et Busscher, H.J. Amount and surface structure of albumin adsorbed to solid substratum with different wettabilities in a parallel plate flow cell. *J. Biomed. Mater. Res.* **24**: 1599-1614, 1990.

Van Blitterswijk, C.A., Grote, J.J., Kuijpers, W., Blok Van Hoek, C.J.G, et Daems, W.T.H. Bioreactions at the tissue/hydroxyapatite interface. *Biomater.*, **6**: 243-251, 1985.

Van Damme, H., Levitz, P., Gatineau, L., Alcover, J.F. et Fripiat, J.J. On the determination of the surface fractal dimension of powders by granulometric analysis. *J. Colloid. Interface Sci.*, **122**: 1-8, 1988.

van Kooten, T.G., Schakenraad, J.M., van der Mei, H.C. et Busscher, H.J. Detachment of human fibroblasts from FEP-Teflon surfaces. *Cells & Materials*, **1**: 307-316, 1991.

van Kooten, T.G., Schakenraad, J.M., van der Mei, H.C. et Buscher, H.J. Influence of substratum wettability on the strength of adhesion of human fibroblasts. *Biomater.*, **13**: 897-904, 1992.

van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W. et Zehnder, A.J.B. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.*, **54**: 75-87, 1990.

van Oss, C.J., Chaudhury, M.K. et Good, R.J. Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chem. Rev.*, **88**: 927-941, 1988.

van Oss, C.J., Good, R.J. et Chaudhury, M.K. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in hydrophobic interactions between biopolymers and low energy surfaces. *J. Colloid. Interface Sci.*, **111**: 378-390, 1986.

van Wachem, P.B., Beugeling, T., Feijen, J., Bantjes, A., Detmers, J.P. et van Aken, W.G. Interaction of cultured endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities. *Biomater.*, **6**: 403-408, 1985.

van Wachem, P.B., Hogt, A.H., Beugeling, T., Feijen, J., Bantjes, A., Detmers, J.P. et van Aken, W.G. Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge. *Biomater.*, **8**: 323-328, 1987.

Vilela, M.J., Martins, M.I. et Boschetti, S.R. Fractal patterns for cells in culture. *J. Pathol.*, **177**: 103-107, 1995.

Vogler, E.A. et Bussian, R.W. Short-term cell-attachment rates: a surface-sensitive test of cell-substrate compatibility. *J. Biomed. Mater. Res.*, **21**: 1197-1211, 1987.

Wang, B.C., Lee, T.M., Chang, E. et Yang, C.Y. The shear strength and the failure mode of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings to bone: The effect of coating thickness. *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**: 1315-1327, 1993.

Ward, M.D. et Hammer, D.A. A theoretical analysis for the effect of focal contact formation on cell-substrate attachment strength. *Biophys. J.*, **64**: 936-959, 1993.

Wataha, J.C., Hanks, C.T. et Sun, Z. In vitro reaction of macrophages to metal ions from dental biomaterials. *Dent. Mater.*, **11**: 239-245, 1995.

Wehbi, D. Approche fractale de la rugosité des surfaces et implications analytiques (Fractal approach of surface roughness and analytical implications). Thèse de docteur ingénieur, ENSMM, Besançon, France, 1986.

Wehbi, D. et Roques-Carnes, C. Surface roughness contribution to the auger electron emission. *Scanning Electron. Microsc.*, **1**: 171-177, 1985.

Wennerberg, A., Albrektsson, T., Andersson, B. et Krol, J.J. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin. Oral Impl. Res.*, **6**: 24-30, 1995.

Wennerberg, A., Albrektsson, T., Johansson, C. et Andersson, B. Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomater.*, **17**: 15-22, 1996a.

Wennerberg, A., Albrektsson, T. et Lausmaa, J. Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25- and 75- $\mu\text{m}$ - sized particles of  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . *J. Biomed. Mater. Res.*, **30**: 251-260, 1996b.

Wenzel, R.N. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Ind. Eng. Chem.* **28**: 988-994, 1936.

Wilke, H.J., Claes, L. et Steinemann, S. The influence of various titanium surfaces on the interface shear strength between implants and bone. *Adv. Biomater.*, **9**: 399-405, 1990.

Williams, D.F. Biomaterials and biocompatibility. Dans: *Fundamental Aspects of Biocompatibility*. Williams, D.F. (éditeur), CRC Press Inc., Boca Raton, FL., 1981a, pp. 1-7.

Williams, D.F. Biodegradation in the human body. Dans: *Fundamental Aspects of Biocompatibility*. Williams D.F. (éditeur), CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1981b, pp. 129-138.

Wilson, J. et Low, S.B. Bioactive ceramics for periodontal treatment; comparative studies in the patas monkey. *J. Applied Biomat.*, 3: 123-129, 1992.

Wooley, P.H., Nasser, S. et Fitzgerald, Jr .R.H. The immune response to implant materials in humans. *Clin. Orth. and Rel. Res.* , 326:63-70, 1996.

Wong, M., Eulenberger, J., Schenk, R., Hunziker, E. Effect of Surface Topology on the Osseointegration of Implant Materials in Trabecular Bone. *J. Biomed. Mater. Res.*, 29: 1567-1575, 1995.

Wright, K. et Karlsson, B. Fractal analysis and stereological evaluation of microtextures. *J. Microsc.*, 129: 185-200, 1983.

Yanagisawa, I., Sakuma, H., Shimura, M., Wakamatsu, S., Yanggisawa, S. et Sairenji, E. The effects of wettability of biomaterials on culture cells. *J. Oral Implantol.*, 15: 168-177, 1989.

Ziats, N.P., Miller, K.M. et Anderson, J.M. In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials. *Biomat.*, 9: 5-13, 1988.

Zisman, W.A. Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution . Dans: *Contact Angle Wettability and Adhesion*. Gould, R. (éditeur) ACS, Washington DC, 1964, pp.45-70.

Zografí, G. et Johnson, B.A. Effects of surface roughness on advancing and receding contact angles. *Int. J. Pharm.*, 22: 159-176, 1984.