HAL
open science

Influence de la rugosité de surfaces Ti-6Al-4V obtenues par fabrication additive SLM sur l'ostéointégration : Évaluation in vitro et in silico

Thomas Thenard

▶ **To cite this version:**

Thomas Thenard. Influence de la rugosité de surfaces Ti-6Al-4V obtenues par fabrication additive SLM sur l'ostéointégration : Évaluation in vitro et in silico. Biomécanique [physics.med-ph]. HESAM Université, 2021. Français. NNT : 2021HESAE009 . tel-03474194

HAL Id: tel-03474194

https://pastel.hal.science/tel-03474194v1

Submitted on 10 Dec 2021

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

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

HESAM UNIVERSITÉ

Arts et Métiers Sciences et Technologies

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DES MÉTIERS DE L'INGÉNIEUR

[Institut de biomécanique Humaine Georges Charpak – Campus de Paris]

[Institut de mécanique et d'ingénierie de Bordeaux – Campus de Bordeaux]

THÈSE

présentée par : **Thomas THENARD**

soutenue le : **15 Février 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur d'HESAM Université**

préparée à : **École Nationale Supérieure d'Arts et Métiers**

Spécialité : **Sciences des métiers des ingénieurs**

Influence de la rugosité de surfaces Ti-6Al-4V obtenues par fabrication additive SLM sur l'ostéointégration : Évaluation in vitro et in silico

THÈSE dirigée par :
Mme ALLENA Rachele
Mr MESNARD Michel

et co-encadrée par :
Mme CATAPANO Anita

Jury

Ridha HAMBLI, PU, PRISME, Université d'Orléans	Président du jury
Yves REMOND, PU, ICUBE, Université de Strasbourg	Rapporteur
Guillaume THOMANN, MCF HDR, GSCOP, Université Grenoble	Rapporteur
Nicolas SANTIER, PU, I2M, ENSAM Bordeaux	Examinateur
Claude VERDIER, DR, LIP, Université Grenoble	Examinateur
Rachele ALLENA, MCF HDR, IBHGC, ENSAM Bordeaux	Examinatrice
Anita CATAPANO, MCF, MATMECA, I2M, Bordeaux INP	Examinatrice
Michel MESNARD, PA HDR, I2M, ENSAM Bordeaux	Examinateur
Marlène DURAND, PhD, CIC-IT, Bordeaux	Invitée
Damien LE NIHOUANNEN, MCF, BIOTIS, Université de Bordeaux	Invitée
Antonio RAMOS, MCF, Dpt Ingénierie Mécanique, Université d'Aveiro	Invitée

THÈSE

Table des matières

Liste des figures iii
Liste des tableaux xi
Remerciements 1
Introduction générale 2
Chapitre 1 : Revue de littérature 4
1.1. Le remodelage osseux et l'ostéogénèse 5
1.2. Les implants et la surface implantaire 13
1.3. Procédés de fabrication des implants 17
1.4. Conclusion 23
Références 24
Chapitre 2 : Caractérisation de la rugosité des surfaces SLM 30
2.1. Fabrication des éprouvettes SLM et caractérisation de la rugosité 32
2.2. Analyse de la rugosité et de la mouillabilité de surfaces obtenues par SLM 40
2.3. Traitement de surfaces issues du procédé SLM par polissage chimique 56
2.4. Traitement de surfaces issues de procédé SLM par sablage 72
2.5. Conclusion 77
Références 78
Chapitre 3 : Analyse biologique in vitro de la biocompatibilité et de l'ostéointégration de surfaces SLM 80
3.1. Préparation des échantillons 82
3.2. Analyse de biocompatibilité 85
3.3. Evaluation de l'influence de la topographie sur la morphologie cellulaire 102
3.4. Conclusion 122
Références 124
Chapitre 4 : Effet de la rugosité sur la migration unicellulaire : étude numérique 126
4.1. Choix du modèle numérique 128
4.2. Implémentation du modèle CP sur des surfaces numériques 134
4.3. Implémentation du modèle CP pour des surfaces obtenues par FA SLM 150
4.4. Conclusions 160
Références 162
Chapitre 5 : Effet de la rugosité sur la prolifération cellulaire : étude numérique 166
5.1. Implémentation du modèle CP 167
5.2. Résultats 172
5.3. Discussion 192
5.4. Conclusion 194
Références 195
Chapitre 6 : Conclusions et perspectives 196

6.1. Les résultats acquis 197
6.2. Les perspectives 198
Annexe A 200
A.1. Analyse préliminaire de la rugosité selon les paramètres de la machine SLM 201
A.2. Modèle CP multicellulaire 207
Références 222
Glossaire 223

Liste des figures

Figure 1.1 : Tissus osseux [biologydictionary.net/spongy-bone]. 5

Figure 1.2 : Description des différents phénotypes cellulaires osseux [open.oregonstate.education/aandp/chapter/6-3-bone-structure/]. 6

Figure 1.3 : Description du cycle de remodelage osseux [3]. 7

Figure 1.4 : Etude histologique de l'ostéointégration d'une vis [7]. 8

Figure 1.5 : Profil de stabilité de la connexion os-implant en fonction du temps [9]. 9

Figure 1.6 : Réorganisation de la structure interne de la cellule selon la rigidité du substrat [www.asianscientist.com]. 11

Figure 1.7 : Surfaces obtenues par des traitements soustractifs. (a) usinage [73] ; (b) sablage [73] ; (c) attaque chimique [73] ; (d) SLA [74]. 16

Figure 1.8 : Revêtement d'hydroxyapatite appliquée à une vis [78]. 17

Figure 1.9 : Description du procédé SLM [84]. 19

Figure 1.10 : Description du processus de fabrication SLM. 20

Figure 1.11 : Descriptions des paramétres du processus de fabrication. (a) Exemple de différentes stratégie de passage [85] ; (b) Description des paramètres machines principaux [86]. 21

Figure 1.12 : Description de la rugosité de surface obtenue par le procédé SLM. (a) Effet escalier ou d'inclinaison de la surface [92] ; (b) Rugosité créée par les particules emprisonnées sur une surface fabriquée avec une inclinaison de 90°. 22

Figure 2.1 : Dimensions de l'éprouvette cylindrique. 33

Figure 2.2 : Description de la fabrication d'une couche. 34

Figure 2.3 : Plateau de fabrication des éprouvettes (plateau de dimension 280 mm X 280 mm). 34

Figure 2.4 : Description de la différence entre les écarts d'ondulation et la rugosité [https://www.leica-microsystems.com/]. 35

Figure 2.5. : Equipements utilisés pour l'étude de l'état de surface. (a) Rugosimètre 3D laser. (b) Rugosimètre par contact. 37

Figure 2.6 : Schéma de l'angle de contact et de l'équilibre thermodynamique des phases solide, liquide et gazeuse [9]. 38

Figure 2.7 : Schéma d'une goutte sur une surface selon les modèles de mouillabilité (de gauche à droite : (a) modèle parfait, (b) modèle de Wenzel, (c) modèle de Cassie-Baxter [16]. 38

Figure 2.8. : Mesure de la mouillabilité d'une surface. (a) banc de mouillage. (b) image de la goutte. 39

Figure 2.9 : Topographie créée par le passage du laser. (a) Description des différents facteurs influençant la formation du bain de fusion [23]. (b) Description du upskin et du downskin [24]. 41

Figure 2.10 : Schéma des particules de poudres enkystées à la surface après refroidissement du bain de fusion. (a) Schéma de l'enkystement des particules. (b) Particules de TA6V enkystées à la surface. 42

Figure 2.11 : Morphologie des surfaces selon leur inclinaison. 44

Figure 2.12 : Vue MEB des surfaces SLM 90B par rapport au plan de fabrication selon différents grossissements. 45

Figure 2.13 : Trace du passage du laser. 45

Figure 2.14 : Données mesurées via le profilomètre numérique et comparées à l'état de surface réel obtenu via le MEB pour une surface 90B. (a) Image obtenue par MEB pour une surface de 600 µm x 500 µm. (b) Données 3D obtenues avec le profilomètre numérique pour une surface de 400 µm x 400 µm. 46

Figure 2.15 : Profil 1D de la rugosité des différentes surfaces. 47

Figure 2.16 : Graphe évolution de Sa et S_q en fonction de l'inclinaison. 48

Figure 2.17 : Graphe évolution de S_z en fonction de l'inclinaison et comparaison avec l'évolution de h. (a) Calcul du paramètre h. (b) Comparaison entre S_t et h. 49

Figure 2.18 : Graphe évolution de S_{sk}, S_{dr} et S_{tr} en fonction de l'angle d'inclinaison α....50

Figure 2.19 : Evolution de la mouillabilité selon l'inclinaison de la surface. (a) Angle de contact aqueux θ_{eau}. (b) Energie de surface apparent Υ_{app}. 51

Figure 2.20 : Mise en évidence de la microstructure pour des éprouvettes de TA6V fabriquées à 90B. (a) Microstructure observée au MEB pour des échantillons fabriqués à 90° avec un post traitement CIC, thèse de B. Vaysette [3]. (b) Microstructure observée sur les éprouvettes fabriquées dans cette étude. 52

Figure 2.21 : Découpe de l'éprouvette dans le plan X-Z afin de réaliser des mesures de dureté. 53

Figure 2.22 : Evolution de la dureté mesurée en fonction de la distance de la surface. 54

Figure 2.23 : Cliché de la mesure de la mouillabilité avec de l'eau distillée pour P02, P05 et P09. .54

Figure 2.24 : Evolution de θ_{eau} et Υ_{app} en fonction de la distance h de la surface. (a) Valeur de θ_{eau}. (b) Valeur de Υ_{app}. 55

Figure 2.25 : Description du traitement par polissage chimique. 56

Figure 2.26 : Morphologie de la surface d'éprouvettes 90B traitées chimiquement selon différentes compositions et différents temps d'immersion. (a) Morphologie de la surface sous lumière blanche pour différents polissages chimiques. (b) Morphologie 3D de la surface sous lumière blanche pour différents polissages chimiques. (c) Morphologie de la surface sous MEB pour différents polissages chimiques. Pour chaque sous-figure, chaque colonne représente une composition et chaque ligne représente un temps d'immersion. 58

Figure 2.27 : Défauts de surface observés pour un polissage chimique (10% HF, 10% HNO_3). (a) Couche d'oxyde due au polissage chimique. (b) Fissuration observée. 59

Figure 2.28 : Evolution de la perte de poids ainsi que de la perte d'épaisseur e d'éprouvettes 90B traitées chimiquement selon différentes compositions et différents temps d'immersion. (a) Schéma de la perte d'épaisseur e de la surface. (b) Perte de poids. (c) Perte d'épaisseur e. 61

Figure 2.29 : Evolution de θ_{eau} et Υ_{app} d'éprouvettes 90B traitées chimiquement selon différentes compositions et différents temps d'immersion. (a) Angle de contact aqueux θ_{eau}. (b) Energie de surface apparent Υ_{app}. 63

Figure 2.30 : Morphologie de la surface polie obtenue au MEB selon différents grossissements. ...63

Figure 2.31 : Morphologie de la surface P15. 64

Figure 2.32 : Evolution de la perte de poids et de la perte d'épaisseur e de surfaces polies traitées chimiquement en fonction du temps d'immersion. (a) Perte de poids. (b) Perte d'épaisseur. 65

Figure 2.33 : Evolution de θ_{eau} et de Υ_{app} pour des éprouvettes 90B polies et traitées chimiquement par une solution de 3% HF et 10% HNO_3 en fonction du temps d'immersion. (a) Angle de contact aqueux θ_{eau}. (b) Energie de surface apparent Υ_{app}. 65

Figure 2.34 : Morphologie 3D des éprouvettes 0B, 30B, 60B et 90B traitées chimiquement. 66

Figure 2.35 : Evolution de la perte d'épaisseur e de surfaces 0B, 30B, 60B et 90B traitées chimiquement. 67

Figure 2.36 : Evolution de θ_{eau} et de Υ_{app} en fonction de l'inclinaison pour des éprouvettes 0B, 30B, 60B et 90B traitées chimiquement par une solution de 3% HF et 10% HNO_3 pour 30 minutes. (a) Angle de contact aqueux θ_{eau}. (b) Energie de surface apparent Υ_{app}. 68

Figure 2.37 : Evolution de l'angle de contact aqueux θ_{eau} en fonction du ratio de surface développée S_{dr} pour la surface 90B. 71

Figure 2.38 : Description de la sableuse. 73

Figure 2.39 : Morphologie de la surface 90B pour les différents types de sable. 74

Figure 2.40 : Morphologie de la surface S60 obtenue au MEB pour trois grossissements. 75

Figure 2.41 : Evolution de θ_{eau} et Υ_{app} de la surface 90B après sablage. (a) Angle de contact aqueux θ_{eau}. (b) Energie de surface apparent Υ_{app}. 76

Figure 3.1 : Description des différents matériaux obtenus selon les différents protocoles appliqués. (a) Matériaux d'études de biocompatibilité. (b) Plaque de culture cellulaire. Le contrôle plastique se compose d'un puit sans matériau 83

Figure 3.2 : Morphologie et données de rugosité des surfaces d'études. (a) Morphologies des matériaux observées sous MEB. (b) Valeurs de principaux paramètres de rugosité et de mouillabilité 84

Figure 3.3 : Cellules souches humaines mésenchymateuses [promocell.com] 85

Figure 3.4 : Résultats de la cytotoxicité par extrait sur C0 et C4. Les résultats ont été normalisés par rapport aux résultats de la surface contrôle. La ligne en pointillés présente 70% de viabilité cellulaire. La mention * indique $p<0.05$. 87

Figure 3.5 : Résultats de la cytotoxicité par contact direct pour les matériaux témoins. (a) Configuration du puit avec les cellules. (b) Images du test au rouge neutre par contact. (b) Images du test au rouge neutre par contact. (c) Résultats de la cytotoxicité par contact direct. Les résultats ont été exprimés en % de la surface contrôle. La ligne en pointillés présente 70% de viabilité cellulaire. 88

Figure 3.6 : Images du test au rouge neutre par contact pour les différentes surfaces 89

Figure 3.7 : Résultats de la cytotoxicité par contact direct sur les 5 différentes surfaces. Les résultats ont été exprimés en % de la surface contrôle. La ligne en pointillés présente 70% de viabilité cellulaire. 89

Figure 3.8 : Evolution de la population sur la surface contrôle à 1 heure et 3 heures pour les deux pools de cellules. 91

Figure 3.9 : Résultats du test d'adhésion cellulaire sur les 5 différentes surfaces pour des durées de 1H et de 3H ainsi que pour les deux pools de cellules. La première colonne (a et c) présente les résultats normalisés par rapport aux résultats de la surface contrôle à t= 3h. La deuxième colonne (b et d) présente les résultats normalisés par rapport à C4 pour chaque heure. 92

Figure 3.12 : Cycle de vie cellulaire, tiré de [13] 94

Figure 3.13 : Résultats de l'analyse d'absorbance du test contrôle au sein des deux milieux pour une durée de 11 jours et pour les deux pools de cellules. (a) Milieu de prolifération. (b) Milieu de différenciation. 95

Figure 3.14 : Résultats du test de prolifération en milieu de prolifération pour les 5 différentes surfaces et pour une durée de 11 jours. Ces résultats regroupent l'analyse de deux pools de cellules. (a) Prolifération du pool 1 normalisée par la surface contrôle à J11. (b) Prolifération du pool 1 normalisée par la surface C4. (c) Prolifération du pool 2 normalisée par la surface contrôle à J11. (d) Prolifération du pool 2 normalisée par la surface C4. 97

Figure 3.15 : Résultats du test de prolifération en milieu de différentiation pour les 5 différentes surfaces et pour une durée de 11 jours. Ces résultats regroupent l'analyse de deux pools de cellules. (a) Prolifération du pool 1 normalisée par la surface contrôle à J11. (b) Prolifération du pool 1

normalisée par la surface C4. (c) Prolifération du pool 2 normalisée par la surface contrôle à J11. (d) Prolifération du pool 2 normalisée par la surface C4. 99

Figure 3.16 : Problèmes liés à la mesure de la minéralisation via le rouge Alizarine 101

Figure 3.17 : Cliché d'un ensemencement en goutte au fond d'un puit de culture à J4 103

Figure 3.18 : Description de la population de cellules sur la surface plastique en milieu de prolifération. (a) centre de la goutte. (b) périphérie de la goutte. 104

Figure 3.19 : Description de la population de cellules sur la surface témoin. (a) centre de la goutte. (b) périphérie de la goutte. 104

Figure 3.20 : Distribution des hMSCs sur C0 pour une épaisseur de 24 µm. 105

Figure 3.21 : Mise en évidence des zones non cellularisées 106

Figure 3.22 : hMSCs observées à J0 et J4 pour les 5 surfaces en milieu de prolifération classique. La flèche jaune représente l'orientation topographique de la surface. Les clichés à J4 ont été pris en périphérie de la population. 106

Figure 3.23 : Mesures quantitatives de la morphologie cellulaire des hMSCs sur les 5 surfaces en milieu de prolifération classique 107

Figure 3.24 : Comparaison de la morphologie cellulaires des hMSCs à J4 par rapport à la topographie de la surface pour les 5 matériaux en milieu de prolifération 109

Figure 3.25 : Description de la population de cellules sur la surface plastique en milieu de différenciation. (a) centre de la goutte. (b) périphérie de la goutte. 110

Figure 3.26 : Description de la population de cellules sur C0 en milieu de différenciation. (a) centre de la goutte. (b) périphérie de la goutte 110

Figure 3.27 : Distribution des hMSCs sur la hauteur de C0 111

Figure 3.28 : hMSCs observées à J0 et J4 pour les 5 surfaces en milieu ostéoinducteur. La flèche jaune représente l'orientation topographique de la surface. Les clichés à J4 ont été pris en périphérie de la population. 112

Figure 3.29 : Comparaison de la morphologie cellulaires des hMSCs à J4 par rapport à la topographie de la surface pour les 5 matériaux en milieu de différenciation 113

Figure 3.30 : Résultats de l'ensemencement en gouttes sur les 5 surfaces à J0 pour les hMSCs en milieu de prolifération La flèche jaune représente l'orientation de la surface dans le cas où celle-ci existe. 114

Figure 3.31 : Résultats de l'ensemencement en gouttes sur les 5 surfaces à J4 pour les hMSCs en milieu de prolifération classique. La flèche jaune représente l'orientation de la surface dans le cas où celle-ci existe. 115

Figure 3.32 : Mesures quantitatives de la morphologie de la population de hMSCs sur les 5 surfaces en milieu de prolifération 116

Figure 3.33 : Cliché de la disposition des hMSCs du centre de la population dur C3 117

Figure 3.34 : Résultats de l'ensemencement en gouttes sur les 5 surfaces à J0 pour les hMSCs en milieu ostéoinducteur. La flèche jaune représente l'orientation de la surface dans le cas où celle-ci existe. 117

Figure 3.35 : Résultats de l'ensemencement en gouttes sur les 5 surfaces à J0 pour les hMSCs en milieu ostéoinducteur. La flèche jaune représente l'orientation de la surface dans le cas où celle-ci existe. 118

Figure 3.36 : Disposition des filaments d'actine au sein de la population pour C0. (a) cliché des cellules au centre de la population. (b) mise en évidence des filaments d'actine. 119

Figure 3.37 : Disposition des filaments d'actine au sein de la population pour C1. (a) cliché des cellules au centre de la population. (b) mise en évidence des filaments d'actine. 119

Figure 3.38 : Distribution des hMSCs sur la hauteur de C0.....120

Figure 4.1 : (a) Description schématique des méthodes discrète et continue, adaptée de Discher et al [8]. (b) Complexité de calcul VS échelle d'analyse pour les différentes méthodes de modélisation, adaptée de S. Tanaka et al [7].....129

Figure 4.2 : (a) Champs des déformations appliqué sur le substrat sous-jacent [36]. (b) Champ des forces de traction calculé à partir de la forme la cellule [45]. 132

Figure 4.3 : (a) Morphologie acquise par la cellule en fonction la géométrie du substrat [49]. (b) Modèle CP de Albert et al. [52] prenant en compte les forces tangentielles. 133

Figure 4.4 : Migration cellulaire (en 3D) au sein d'un réseau de fibres de collagène [56].....134

Figure 4.5 : (a) Surface avec une topographie aléatoire. (b) Surface avec rainures parallèles à la direction de migration. (c) Surface avec rainures perpendiculaires à la direction de migration. (d) Surface avec sinusoïdes parallèles à la direction de migration (la légende en couleur indique l'altitude Zx, y de chaque point x, y de la surface). 137

Figure 4.6 : Morphologie de la cellule au repos sur la surface contrôle dans le plan (X-Y) (a), (Y-Z) (b) et en mouvement dans le plan (X-Y) à t=2000 MCS (c). 139

Figure 4.7 : Simulations de migration cellulaire sur la surface contrôle. Chaque figure montre les résultats de 10 simulations. (a) Trajectoire de la cellule dans le plan (X-Y). (b) Evolution de la surface de contact entre la cellule et la surface. (c) Évolution de l'élongation (i.e. paramètre ac) de la cellule. 140

Figure 4.8 : Morphologie de la cellule au repos sur une surface avec une topographie aléatoire (R*=0.25) dans le plan (X-Y) (a) et (Y-Z) (b) et en mouvement dans le plan (X-Y) à t=2000 MCS (c). 140

Figure 4.9 : Simulations de la migration cellulaire sur une surface présentant une topographie aléatoire (R*=0.25). Chaque figure montre les résultats de 10 simulations. (a) Trajectoire de la cellule dans le plan (X-Y). (b) Evolution de la surface de contact entre la cellule et la surface. (c) Évolution de l'élongation ac de la cellule. 141

Figure 4.10 : Migration cellulaire selon différentes valeurs de J_{CS} et R*. (a) Évolution de la vitesse de migration. (b) Évolution de la surface de contact. (c) Évolution de l'élongation ac. 141

Figure 4.11 : Morphologie de la cellule au repos sur une surface avec des rainures parallèles (w*=0.5 et d*=0.25) à la direction de migration p dans le plan (X-Y) (a) et (Y-Z) (b) et en mouvement dans le plan (X-Y) à t=2000 MCS (c). 143

Figure 4.12 : Simulations de la migration cellulaire sur une surface avec rainures parallèles à la direction de migration (w*=0.5 et d*=0.25). Chaque figure montre les résultats de 10 simulations. La ligne en pointillée représente la valeur moyenne du paramètre étudié pour la surface de contrôle. (a) Trajectoire de la cellule dans le plan (X-Y). (b) Evolution de la surface de contact. (c) Évolution de l'élongation ac.....144

Figure 4.13 : (a) Évolution de la vitesse de migration. (b) Évolution de la surface de contact. (c) Évolution de l'élongation ac. La ligne noire représente la valeur du paramètre étudié pour la surface de contrôle.....144

Figure 4.14 : Morphologie de la cellule au repos sur une surface avec des rainures perpendiculaires (w*=1 et d*=0.15) à la direction de migration dans le plan (X-Y) (a) et (X-Z) (b) et en mouvement dans le plan (X-Y) à t=2000 MCS (c). 145

Figure 4.15 : Simulations de la migration cellulaire sur une surface avec rainures perpendiculaires à la direction de migration p (w*=1 et d*=0.15). Chaque figure montre les résultats de 10 simulations. La ligne en pointillée représente la valeur du paramètre étudié sur la surface de contrôle (R*=0). (a) Trajectoire de la cellule dans le plan (X-Y). (b) Évolution de la surface de contact. (c) Évolution de l'élongation ac. 146

Figure 4.16 : Migration cellulaire sur une surface rainurée orientée dans le sens des X selon différentes valeurs de w*et d*. (a) Évolution de la vitesse de migration. (b) Évolution de la surface de contact. (c) Évolution de l'élongation ac. La ligne noire représente la valeur du paramètre étudié sur la surface de contrôle. 147

Figure 4.17 : Morphologie de la cellule au repos sur une surface avec des rainures sinusoïdales parallèles à la direction de migration p (λ*=0.5 et A*=0.25) dans le plan (X-Y) (a) et (Y-Z) (b) et en mouvement dans le plan (X-Y) à t=2000 MCS (c). 147

Figure 4.18 : Simulations de la migration cellulaire sur une surface à rainures sinusoïdales parallèles à la direction de migration p (w*=0.5 et d*=0.15). Chaque figure montre les résultats de 10 simulations. La ligne en pointillée représente la valeur du paramètre étudié sur la surface lisse (R*=0). (a) Trajectoire de la cellule dans le plan (X-Y). (b) Évolution de la surface de contact. (c) Évolution de l'élongation ac. 148

Figure 4.19 : Migration cellulaire sur une surface rainurée orientée dans le sens des Y selon différentes valeurs de w*et d*. (a) Évolution de la vitesse de migration. (b) Évolution de la surface de contact. (c) Évolution de l'élongation ac. La ligne noire représente la valeur du paramètre étudié sur la surface de contrôle. 148

Figure 4.20 : (a) Représentation graphique du déplacement efficace Df , du déplacement total Dt et de l'orientation du déplacement αt (b) Description des différentes positions initiales de simulation. 152

Figure 4.21 : Représentation des surfaces de contact effective SCE et projetée SCP. 152

Figure 4.22 : Images des six surfaces étudiées. La légende en couleur représente l'altitude z de chaque point de la surface. 153

Figure 4.23 : Simulation de la motilité cellulaire sur les six surfaces. Les images sont prises à t=8500 MCS 154

Figure 4.24 : (a) Surface de contact et projetée pour les six surfaces analysées. (b) Élongation normalisée par rapport à la surface CTRL pour les six surfaces. Pour chaque valeur, la rugosité Ra est indiquée. 154

Figure 4.25 : (a, c, e) Distance efficace D_f, (b, d, f) Distance totale D_t. 156

Figure 4.26 : Répartition des orientations de migration α_t tout le long de la simulation en fonction des surfaces. Les résultats affichés correspondent à trois simulations différentes pour chaque surface, en position 1. 159

Figure 5.1 : Distribution des forces d'extension à deux cas : cellule sur une surface sans topographie (a et b) et cellule sur une surface avec une topographie aléatoire (c et d). (a) et (c) montrent les sites composant la cellule avec leurs élévations ; (b) et (d) donne l'estimation des forces d'extension $F\sigma$ au niveau de chaque site de la cellule. 169

Figure 5.2 : Démarche afin de déterminer l'orientation locale de la surface. (a) Calcul de l'orientation de la surface au niveau d'un site x. (b) Carte des vecteurs orientation d'une surface. 170

Figure 5.3 : Cycle cellulaire modifié modélisé au sein de notre modèle. 171

Figure 5.4 : Description de l'algorithme de croissance cellulaire et de mitose. $S\sigma, 0, initial$ définit la surface cible défini à l'état initial dans le modèle ; φ_0 définit le pas de prolifération à l'état initial dans le modèle 172

Figure 5.5 : Résultats des simulations de prolifération cellulaire pour différentes valeurs de J_{CE}. (a) Morphologie de la population de cellules selon les différentes valeurs de J_{CE} à t=3000 MCS. (b) Courbes de croissance cellulaire sur une période de 3000 MCS pour différentes valeurs de J_{CE}. ... 174

Figure 5.6 : Evolution de la prolifération cellulaire selon J_{CE}. (a) Aire totale de la population de cellule à t=3000 MCS. (b) Nombre de cellules à t=3000 MCS. 175

Figure 5.7 : Résultats des simulations de prolifération cellulaire pour différentes valeurs de λ_S. (a) Morphologie de la population de cellules selon les différentes valeurs de λ_S à t=3000 MCS. (b) Courbes de croissance cellulaire sur une période de 3000 MCS pour différentes valeurs de λ_S 176

Figure 5.8 : Evolution de la prolifération cellulaire selon la rigidité cellulaire λ_S. (a) Aire totale de la population de cellule à t=3000 MCS. (b) Nombre de cellules à t=3000 MCS. 177

Figure 5.9 : Résultats des simulations de prolifération cellulaire pour différentes valeurs de λ_M. (a) Morphologie de la population de cellules selon les différentes valeurs de λ_M à t=3000 MCS. (b) Courbes de croissance cellulaire sur une période de 3000 MCS pour différentes valeurs de λ_M.....178

Figure 5.10 : Evolution de la prolifération cellulaire selon λ_M. (a) Aire totale de la population de cellule à t=3000 MCS. (b) Nombre de cellules à t=3000 MCS. 178

Figure 5.11 : Résultats des simulations de prolifération cellulaire pour différentes valeurs de λ_e. (a) Morphologie de la population de cellules selon les différentes valeurs de λ_e à t=3000 MCS. (b) Courbes de croissance cellulaire sur une période de 3000 MCS pour différentes valeurs de λ_e.....179

Figure 5.12 : Evolution de la prolifération cellulaire selon λ_e. (a) Aire totale de la population de cellule à t=3000 MCS. (b) Nombre de cellules à t=3000 MCS. 180

Figure 5.13 : Résultats des simulations de prolifération cellulaire pour différentes valeurs de R. (a) Morphologie de la population de cellules selon les différentes valeurs de R à t=4000 MCS. (b) Courbes de croissance cellulaire pour différentes valeurs de R. 181

Figure 5.14 : Evolution de la prolifération cellulaire sur une surface aléatoirement rugueuse suivant une augmentation du paramètre R (en µm). (a) Aire totale de la population de cellule à t=4000 MCS. (b) Nombre de cellules à 4000 MCS. (c) Elongation de la population de cellule à t=4000 MCS. 182

Figure 5.15 : Résultats des simulations de prolifération cellulaire pour différentes valeurs de d. (a) Morphologie de la population de cellules selon les différentes valeurs de d à t=4000 MCS. (b) Courbes de croissance cellulaire pour différentes valeurs de d.....183

Figure 5.16 : Evolution de la prolifération cellulaire sur une surface rainurée en fonction de d (en µm). (a) Aire totale de la population de cellule à t=4000 MCS. (b) Nombre de cellules à 4000 MCS. (c) Elongation de la population de cellule à t=4000 MCS. 184

Figure 5.17 : Résultats des simulations de prolifération cellulaire pour différentes valeurs de w. (a) Morphologie de la population de cellules en fonction de w à t=4000 MCS. (b) Courbes de croissance cellulaire pour différentes valeurs de w.....185

Figure 5.18 : Evolution de la prolifération cellulaire sur une surface rainurée en fonction de w. (a) Aire totale de la population de cellule à t=4000 MCS. (b) Nombre de cellules à 4000 MCS. (c) Elongation de la population de cellule à t=4000 MCS.....186

Figure 5.19 : Morphologie de référence pour chaque surface étudiée. Chaque pixel des images correspond à un carré de côté 2.5 µm. 187

Figure 5.20 : Déformation de la population cellulaire due à la mitose.....187

Figure 5.21 : Morphologie pris par la population de cellules selon les différentes surfaces après un temps de simulation de 4000 MCS.....188

Figure 5.22 : Evolution de la prolifération cellulaire sur les six différentes surfaces. (a) Courbe de croissance de l'aire du cluster de cellules pour les six différentes surfaces. (b) Courbe de l'évolution du double de population pour les six différentes surfaces.....190

Figure 5.23 : Comparaison entre les résultats numériques et les résultats expérimentaux selon les différentes surfaces.....192

Figure A.1 : Etat de surface en fonction des différents paramètres de fabrication.....202

Figure A.2 : Etat de surface des différents paramètres de fabrication.....203

Figure A.3 : Evolution de S_a et S_t en fonction des différents paramètres de fabrication SLM. Les graphes représentent les valeurs moyennes des paramètres. (a) S_a en fonction de la puissance. (b) S_t en fonction de la puissance. (c) S_a en fonction de la vitesse de passage. (d) S_t en fonction de la vitesse de passage. 205

Figure A.4 : Evolution de θ_{app} et de Υ_{app} selon les différents paramètres de fabrication SLM. Les graphes représentent les valeurs moyennes des paramètres. (a) θ_{app} en fonction de la puissance. (b) Υ_{app} en fonction de la puissance. (c) θ_{app} en fonction de la vitesse de passage. (d) Υ_{app} en fonction de la vitesse de passage. 206

Figure A.5 : Diagramme de fonctionnement du modèle CP de prolifération 207

Figure A.6 : Influence de J_{CE} sur différentes propriétés cellulaires. (a) Vitesse moyenne de migration ; (b) Aire moyen de la cellule ; (c) Force d'extension moyen estimée. 208

Figure A.7 : Influence de T et λ_S sur différentes propriétés cellulaires. (a) Vitesse moyenne de migration ; (b) Aire moyen de la cellule ; (c) Force d'extension moyen estimée. 209

Figure A.8 : Influence de λ_M sur différentes propriétés cellulaires. (a) Vitesse moyenne de migration ; (b) Aire moyen de la cellule ; (c) Force d'extension moyen estimée. 209

Figure A.9 : Influence de λ_e sur différentes propriétés cellulaires. (a) Vitesse moyenne de migration ; (b) Aire moyen de la cellule ; (c) Force d'extension moyen estimée. 210

Figure A.10 : Influence de λ_o sur différentes propriétés cellulaires. (a) Vitesse moyenne de migration ; (b) Aire moyen de la cellule ; (c) Force d'extension moyen estimée. 210

Figure A.11 : Résultats des simulations de migration sur une topographie aléatoirement rugueuse. (a) Simulation de migration a t=1500 MCS sur surface plane (R=0) ; (b) Simulation de migration a t=1500 MCS pour R=5 µm ; (c) Valeurs des vitesses moyennes de migration. La barre orange donne la valeur de la vitesse de migration sur la surface plane. 212

Figure A.12 : Résultats des simulations de migration sur une surface rainurée avec une profondeur variable d. (a) Simulation de migration a t=1500 MCS ; (b) Valeurs des vitesses moyennes de migration. La barre orange donne la valeur de la vitesse de migration sur la surface plane. 213

Figure A.13 : Résultats des simulations de migration sur une surface rainurée avec une largeur variable w. (a) Simulation de migration a t=1500 MCS pour w=4 µm ; (b) Simulation de migration a t=1500 MCS pour w=20 µm ; (c) Valeurs des vitesses moyennes de migration. La barre orange donne la valeur de la vitesse de migration sur la surface plane. 214

Figure A.14 : Résultats des simulations de migration sur une surface rainurée avec une profondeur variable d. (a) Simulation de migration a t=1500 MCS ; (b) Valeurs des vitesses moyennes de migration. La barre orange donne la valeur de la vitesse de migration sur la surface plane. 215

Figure A.15 : Résultats des simulations de migration sur une surface rainurée avec une largeur variable w. (a) Simulation de migration a t=1500 MCS pour w=4 µm ; (b) Simulation de migration a t=1500 MCS pour w=20 µm ; (c) Valeurs des vitesses moyennes de migration. La barre orange donne la valeur de la vitesse de migration sur la surface plane. 216

Figure A.16 : Calcul du vecteur polarisation. 218

Figure A.17 : Migration cellulaire créée par une cellule suiveuse. 219

Figure A.18 : Description des différentes phases de simulation. 219

Figure A.19 : Résultats des simulations de migration collective selon les différentes surfaces. (a-b) ; surface plane ; (c-d) surface C0 ; (e-f) surface C1 ; (g-h) surface C2. La colonne de gauche donne l'état de la simulation en phase 2 et la colonne de droite donne l'état de la simulation à t=4000 MCS. 221

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Récapitulatif d'études traitant de l'influence de la rugosité (aléatoire sans patterns/motifs) de surfaces en titane sur différentes fonctions cellulaires. 12

Tableau 1.2 : Paramètres mécaniques de différents biomatériaux. Les valeurs des paramètres mécaniques proviennent du site azom [www.azom.com]. 14

Tableau 1.3 : Description des procédés de traitements de surface. 15

Tableau 2.1 : Propriétés physiques de l'alliage TA6V [1, p. 04]. 32

Tableau 2.2 : Composition chimique de la poudre de TA6V. 33

Tableau 2.3 : Paramètres SLM nominales pour les bords, les contours, et le cœur de la couche. 33

Tableau 2.4 : Composant dispersif et polaire des liquides de mesures (base de données du banc de mouillage) 40

Tableau 2.5 : Valeurs des paramètres de rugosité pour les différentes inclinaisons. 47

Tableau 2.6 : Mesure de l'angle de contact et de l'énergie de surface. 51

Tableau 2.7 : Composition de la solution de HF et HNO3 pour le polissage chimique. 57

Tableau 2.8 : Valeur des paramètres de rugosité pour les différentes compositions et les différents temps d'immersion. 60

Tableau 2.9 : Valeurs des paramètres de rugosité des surfaces polies traitées chimiquement pour les différents temps d'immersion. 64

Tableau 2.10 : Valeurs des paramètres de rugosité pour des éprouvettes 0B, 30B, 60B et 90B traitées chimiquement 67

Tableau 2.11 : Tailles des grains selon le type de sable. 73

Tableau 2.12 : Paramètres de rugosité de la surface 90B après sablage. 75

Tableau 2.13 : Valeurs de θeau et ϒapp de la surface 90B après sablage. 76

Table 4.1 : Paramètres du modèle CP 136

Tableau 4.2 Paramètres définissant les surfaces étudiées. 138

Tableau 4.3 : Liste des paramètres CP. 151

Tableau 4.4 : Paramètres de rugosité et de mouillabilité des différentes surfaces 153

Table 5.1 : Paramètres du modèle CP 173

Tableau A.1 : Paramètres de fabrication de la frontière externe de l'échantillon 201

Tableau A.2 : Paramètres de rugosité en fonction des paramètres machine 204

Tableau A.3 : Mesures de l'angle de contact et de l'énergie de surface en fonction des paramètres machine 205

Tableau A.4 : Paramètres du modèle CP 208

Tableau A.5 : Paramètres du modèle CP 211

Tableau A.7 : Paramètres du modèle CP. 218

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu au cours de cette thèse, en particulier mes encadrants qui m'ont aidé à gérer les imprévus.

Je tiens aussi à remercier le CIC-IT et BIOTIS (INSERM1026) pour m'avoir permis de réaliser les tests biologiques in vitro.

Je remercie le Réseau Santé pour m'avoir financé au cours de cette thèse.

Je remercie également les membres du jury qui ont accepté de rapporter et d'examiner ces travaux.

Je remercie mes collègues des Laboratoires I2M et IBHGC avec qui j'ai vécu de très bons moments.

Enfin, je remercie ma famille qui m'a permis d'arriver où je suis actuellement.

Introduction générale

La présence de pathologies ou de traumatismes lourds entrainent parfois la mise en place d'un dispositif médical (implant, prothèse…) et cette pratique a augmenté depuis ces dernières années dans le cas des implants endo-osseux (implant dentaire…). Le bon fonctionnement de ces implants passe, entre autres, par la mise en place de l'ostéointégration, qui est un processus biologique permettant d'établir une connexion entre un implant et le tissu osseux. Cette connexion est essentielle au bon fonctionnement de l'implant en garantissant sa stabilité et sa fiabilité. Parmi les différents facteurs influençant l'ostéointégration, la rugosité de la surface joue un rôle important et elle est prise en compte au sein de la conception afin d'optimiser l'ostéointégration. Le procédé de fabrication utilisé pour obtenir la surface définit le type de rugosité obtenu. En particulier, pour le procédé innovant de fabrication additive (FA) « Selective Laser Melting » (SLM) prometteur dans le domaine biomédical, les propriétés surfaciques, dont la rugosité, sont très différentes de celles obtenues via des procédés de fabrication traditionnels (usinage…). De plus, les pièces en Ti-6Al-4V (TA6V) obtenues par SLM subissent systématiquement des traitements de surface afin de modifier la rugosité. Dans ce contexte, il est difficile de pouvoir comprendre et quantifier l'influence de la rugosité sur la biocompatibilité de la surface ainsi que sur l'ostéointégration, surtout que cette quantification reste souvent empirique. L'objectif de cette thèse est donc de comprendre l'influence de la rugosité sur la biocompatibilité et l'ostéointégration de pièces de TA6V produites par le procédé de FA SLM, puis de proposer un modèle numérique permettant, à partir de caractéristiques des surfaces, de déterminer le comportement de différents processus cellulaires (migration, prolifération).

Cette thèse financée par le Réseau Santé de l'ENSAM, a été conduite dans le cadre d'une collaboration entre l'IBHGC à Paris et l'I2M à Bordeaux. L'étude est organisée autour du triptyque « Biomatériau – Procédé – Produit » avec un aspect fortement interdisciplinaire (modélisation numérique et caractérisation expérimentale, mécanique et biologie). Ainsi, la production des éprouvettes a été réalisée en collaboration avec la plateforme SLM Futurprod au sein de l'ENSAM de Bordeaux. Un second partenariat a été finalisé avec l'INSERM BIOTIS et le CIC-IT du CHU Xavier Arnozan afin de développer l'étude expérimentale, prendre appui sur des équipements et des personnels qualifiés lors de l'élaboration des protocoles et de la réalisation des tests biologiques.

Ce manuscrit est composé de 5 chapitres :

- Le Chapitre 1 présente l'état de l'art autour de l'ostéointégration, les matériaux biocompatibles ainsi que les différents traitements de surface. Le procédé de fabrication additive SLM est décrit pour des pièces de TA6V.
- Le Chapitre 2 présente une étude sur la rugosité et la mouillabilité de surfaces SLM en fonction des paramètres de fabrication et l'inclinaison de fabrication. De plus, une étude de différents traitements de surface a aussi été réalisée afin d'améliorer l'état de surface.
- Le Chapitre 3 montre l'ensemble des résultats des tests biologiques de cytocompatibilité et d'ostéointégration pour les différents matériaux. La compréhension de la réponse cellulaire sur les différentes surfaces est complétée par des analyses de morphologie cellulaire au microscope à fluorescence pour les différentes surfaces.
- La Chapitre 4 présente le développement d'un modèle numérique basé sur la méthode Cellular Potts afin de comprendre l'influence de la rugosité sur la migration cellulaire.
- Le Chapitre 5 applique le modèle à la prolifération cellulaire avec une comparaison par rapport aux résultats expérimentaux.

Le manuscrit se conclut par une synthèse du travail effectué et les résultats principaux. Pour finir, des perspectives de recherche sont proposées afin d'améliorer le travail effectué.

Chapitre 1 : Revue de littérature

Sommaire

1.1. Le remodelage osseux et l'ostéogénèse 5

1.1.1. Le remodelage osseux 6

1.1.2. L'ostéogénèse en présence d'un corps étranger ou ostéointégration 8

1.1.3. Les propriétés de l'interface os-implant 10

1.3.1. Les propriétés mécaniques 10

1.1.3.2. Les propriétés chimiques 11

1.1.3.3. Les propriétés topographiques : la rugosité 12

1.2. Les implants et la surface implantaire 13

2.1. Brève historique des implants et de la biocompatibilité 13

2.2. La surface implantaire et les solutions innovantes 13

2.2.1. L'évolution du matériau 13

2.2.2. L'évolution de la surface implantaire 15

1.3. Procédés de fabrication des implants 17

3.1. Des procédés de fabrication classiques à la fabrication additive 17

3.2. Le procédé de FA SLM 19

3.2.1. Description du procédé SLM 19

3.2.2. Les avantages 21

3.2.3. Les défauts induits par le procédé SLM 22

1.4. Conclusion 23

Références 24

Dans ce chapitre, nous présentons des études antérieures de l'ostéointégration, de l'évolution de la surface implantaire et des nouveaux procédés de fabrication d'implants.

1.1. Le remodelage osseux et l'ostéogénèse

Le squelette est un élément essentiel du corps humain, lui servant de structure. Il est composé à la fois de structures osseuses (telles que la colonne vertébrale, le crâne…) mais aussi d'os simples et de cartilages. De ce fait, l'os est une unité essentielle de cette structure, agissant à la fois comme un élément de protection pour les organes, comme réserve de corps gras et de minéraux, mais aussi comme structure rigide, fournissant un support pour les muscles et permettant le mouvement ainsi que le contrôle de la posture. Au sein du squelette, on distingue deux types de tissus osseux : l'os cortical (*compact bone* dans la figure 1.1) et l'os spongieux (*spongy bone* dans la figure 1.1). L'os cortical est le plus abondant, représentant 80% de la masse osseuse. Il s'agit d'un tissu compact et mécaniquement résistant, avec une matrice minéralisée organisée en lamelles parallèles et concentriques traversées par des vaisseaux sanguins. L'os spongieux est un tissu moins dense, composé de trabécules qui forment des cavités irrégulières lui permettant de servir de réservoir pour la moelle osseuse.

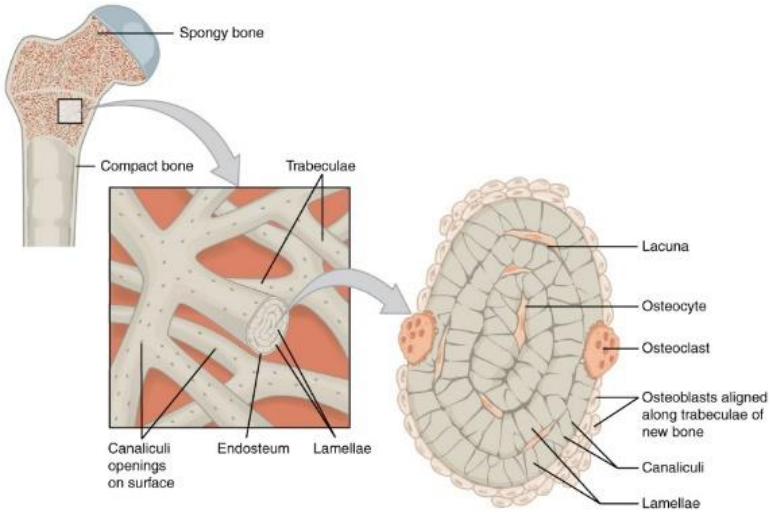


Figure 1.1 : Tissus osseux [biologydictionary.net/spongy-bone].

Qu'il s'agisse de l'os spongieux ou de l'os cortical, le tissu osseux est composé d'une matrice extracellulaire (MEC), formée d'une partie organique (avec des fibres de collagènes et d'autres éléments) et d'une partie minérale (composée de sel, de phosphate, de calcium…). La MEC présente une structure complexe et organisée permettant de fournir un support mécanique ainsi qu'une résistance aux charges fonctionnelles. Les cellules osseuses jouent un rôle clé dans le fonctionnement et la préservation de l'os. Quatre phénotypes cellulaires peuvent être distingués (voir figure 1.2) :

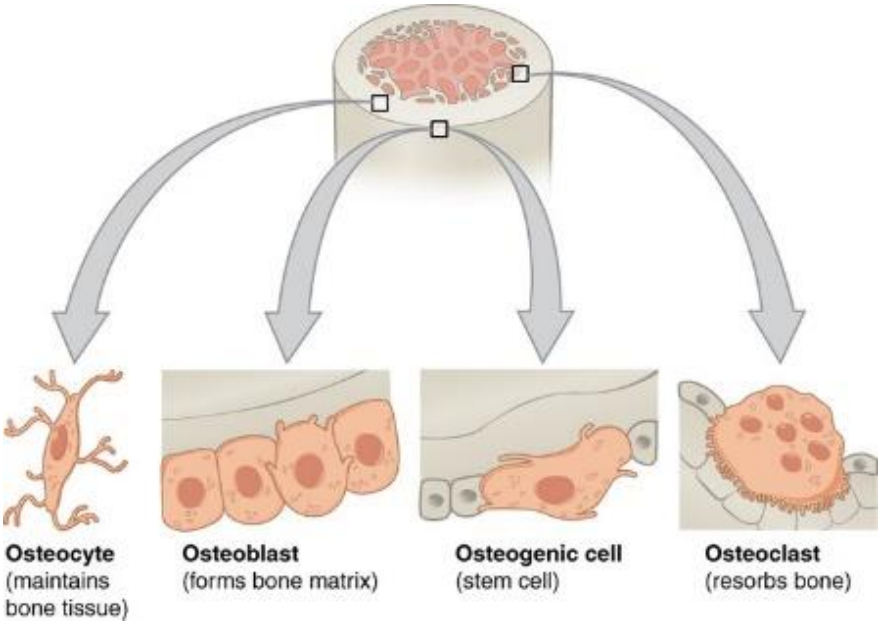


Figure 1.2 : Description des différents phénotypes cellulaires osseux [open.oregonstate.education/aandp/chapter/6-3-bone-structure/].

- Les ostéocytes [1], ostéoblastes matures (donc fixes) dérivant d'une différenciation terminale des ostéoblastes. Ils sont entièrement entourés par la matrice extracellulaire osseuse minéralisée et sont incapables de se diviser et de migrer. Leur rôle est de détecter les contraintes induites dans l'os et d'envoyer des signaux aux ostéoclastes en sécrétant des protéines en réponse à ces forces mécaniques.
- Les ostéoblastes [1], cellules de taille comprise entre 20 et 30 μm de diamètre, situés sur la surface externe et interne du tissu osseux croissant. Il s'agit de cellules fixes qui synthétisent la partie non minéralisée (telle que le collagène) et participent à la formation de la matrice organique et minérale.
- Les cellules ostéogéniques [1] (cellules mésenchymateuses MSC) sont des cellules immatures qui se différentient en ostéoblastes. Dans leur forme indifférenciée, ces cellules affichent une activité mitotique élevée et sont les seules cellules osseuses capables de mitose.
- Les ostéoclastes [1], cellules sont très volumineuses, présentent un diamètre compris entre 20 à 100 μm et possèdent plusieurs noyaux. Ils dérivent de pré-ostéoclastes et constituent les macrophages des os. Ils sont responsables de la résorption osseuse et participent ainsi à au renouvellement du tissu osseux en réponse à la croissance osseuse ou aux sollicitations mécaniques.

1.1.1. Le remodelage osseux

Tout le long de la vie d'une personne, le tissu osseux se renouvelle constamment et ce renouvellement osseux s'opère selon un cycle de résorption osseuse et d'ostéogénèse (formation osseuse), s'effectuant à l'aide d'unités fonctionnelles de remodelage (UFRs) auxquelles appartiennent les cellules osseuses. Des millions d'UFRs composent l'os et progressent librement au sein du tissu osseux. En général, le cycle de remodelage osseux dure environ 6 mois chez l'adulte [2]. On peut alors distinguer cinq grandes phases au sein du remodelage (figure 1.3) :

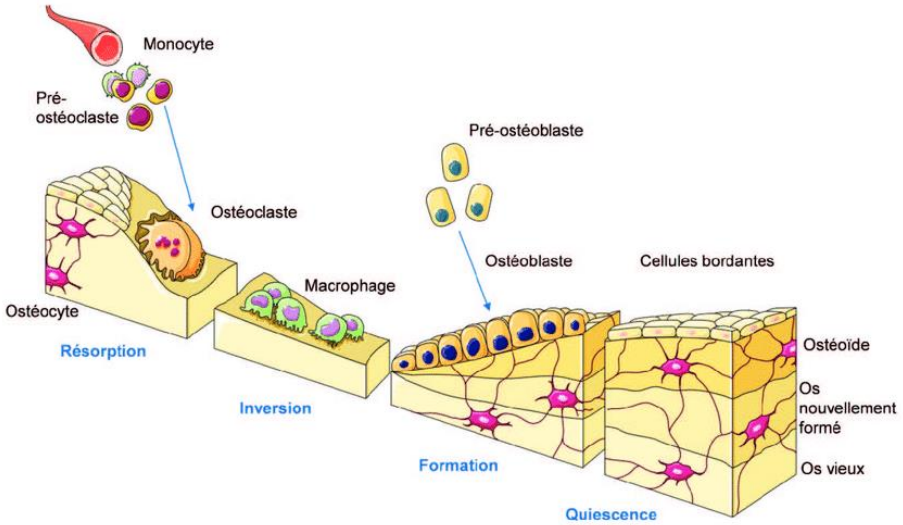


Figure 1.3 : Description du cycle de remodelage osseux [3].

1. La pré-phase d'activation (présente avant la phase de résorption sur la figure 1.3). Durant cette phase, différents facteurs et protéines induisent la différentiation des cellules pré-ostéoclastes en ostéoclastes et préparer la surface de la MEC pour les ostéoclastes.
2. La phase de résorption du tissu osseux. Durant cette phase, les ostéoclastes deviennent actifs et elles dissolvent la phase minérale de la MEC. Simultanément, la partie organique de la MEC est dégradée sous l'action d'enzymes.
3. La phase d'inversion. Durant cette phase, les ostéoclastes meurent par apoptose et les ostéoblastes les remplacent.
4. La phase d'ostéogénèse, aussi appelée la phase de formation de tissu osseux. Cette phase se déroule en deux temps : (i) la production de MEC par les ostéoblastes, (ii) la minéralisation de la MEC. Dans un premier temps, les ostéoblastes synthétisent une nouvelle MEC non minéralisée (aussi appelée tissu ostéoïde) dans la zone créée par les ostéocytes. Toute cette phase est régulée par des hormones et des protéines qui contrôlent la quantité de MEC créée. La production de cette MEC est liée à la prolifération et à l'activation des ostéoblastes. Dans un second temps, la phosphatase alcaline, enzyme synthétisée par les ostéoblastes, initie la minéralisation du tissu ostéoïde (en favorisant les concentrations locales en ions calcium et phosphates). Cette minéralisation se réalise au niveau du front de minéralisation, à la jonction entre le tissu ostéoïde et le tissu minéralisé.
5. La phase de quiescence. Durant cette phase, l'ensemble de l'activité cellulaire réalisée lors de la formation osseuse s'arrête dans l'attente du cycle de remodelage osseux suivant.

Le remodelage osseux, constant tout au long de la vie d'une personne, montre que l'os s'adapte aux différentes situations rencontrées. Il se traduit généralement par un changement de densité et de structure de l'os. Ce changement a été étudié et quantifié par la loi de Wolff [4], qui décrit l'évolution de la densité osseuse en fonction des chargements mécaniques appliquées.

Comme le décrit la figure 1.1, l'ostéogénèse est généralement précédée par la phase de résorption osseuse. Cependant, il se peut que la phase de résorption n'ait pas lieu, par exemple dans le cas d'une fracture ou de la pose d'un implant (due potentiellement à un manque de stabilité ou un manque d'afflux sanguin). Dans ces cas, on parle de réparation osseuse et le remodelage se limite à l'ostéogénèse. De plus, dans le cas spécifique d'une fracture, l'ostéogénèse se traduit par des types différents d'ossification selon le site source (ossification intra membranaire ou ossification endochondrale).

1.1.2. L'ostéogénèse en présence d'un corps étranger ou ostéointégration

Le concept d'ostéointégration introduit par Branemark et al [5] a révolutionné le monde de l'implantologie. Il décrit la connexion directe entre le tissu osseux vivant et l'implant (figure 1.4) et il peut être caractérisé par le temps de cicatrisation osseuse nécessaire à une utilisation fonctionnelle [6]. L'implantologie avant 1965 ne prenait pas en compte le temps de cicatrisation, ce qui ne conduisait qu'à des succès à court et moyen termes. Par la prise en compte de cette connexion, Branemark a permis de construire des succès à très long terme [7].

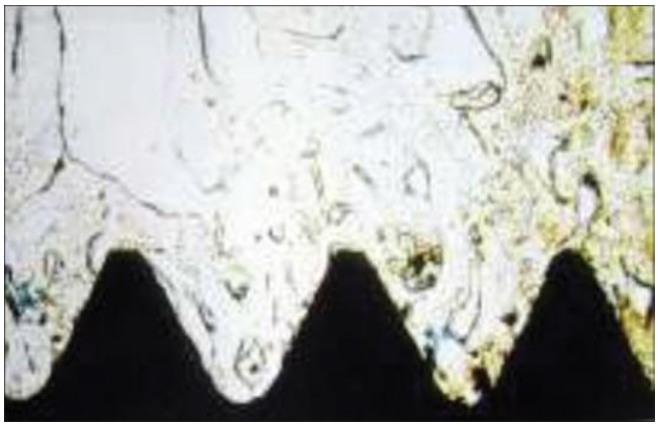


Figure 1.4 : Etude histologique de l'ostéointégration d'une vis [7].

La mise en place de cette connexion biologique se déroule en trois temps au sein de la zone implantaire : l'hémorragie, l'inflammation, l'ostéogénèse. L'ostéogénèse se sépare en une phase de colonisation cellulaire et de création de MEC à la surface de l'implant, puis une phase de création du tissu osseux. Après la formation du tissu osseux, l'ostéointégration suit un processus de remodelage osseux divisé en trois étapes [8]: (i) l'apposition de l'os immature, de faible densité ; (ii) l'adaptation de la densité osseuse aux sollicitations ; (iii) l'intégration fonctionnelle du tissu osseux à la morphologie de l'implant et son fonctionnement.

D'un point de vue mécanique, l'ostéointégration réalise la fixation (et la solidarisation) de l'implant au sein du site osseux, permettant la transmission des actions mécaniques de l'implant à l'os et inversement. Elle se manifeste donc via un encastrement complet de l'implant dans le site osseux, garantissant la stabilité implantaire nécessaire au succès fonctionnel de l'implant à long terme. Cette stabilité est assurée par une connexion réalisée en deux phases :

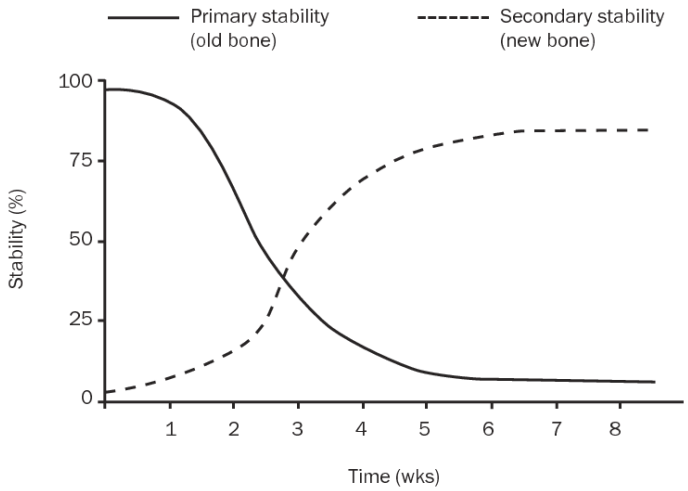


Figure 1.5 : Profil de stabilité de la connexion os-implant en fonction du temps [9].

- La connexion primaire (*primary stability*, figure 1.5), mécanique, est obtenue par le vissage ou l'ancrage de l'implant dans le site osseux. Cette liaison permet la mise et le maintien en position de l'implant durant la mise en de l'ostéointégration. Sa robustesse dépend des caractéristiques de l'implant (i.e. géométrie, matériau…), de la qualité du tissu osseux, et elle diminue progressivement au cours du processus de remodelage osseux.
- La connexion secondaire (*secondary stability*, figure 1.5), biologique, progressive via la croissance de tissus osseux, résulte de la réponse biologique du tissu existant (i.e. ostéointégration) et elle se renforce continûment au cours de la cicatrisation osseuse.

Parmi les échecs d'implantation, certains interviennent durant les premières semaines suivant l'implantation (de 4 à 6 semaines), avec un défaut de connexion osseuse entre l'os et l'implant (se traduisant par un faible contact entre l'os et l'implant) [10], [11]. Des études ont montré que ces échecs étaient plus nombreux durant cette phase initiale que durant la phase avancée de l'implantation [12]–[14]. Ceci prouve que la période durant laquelle l'ostéointégration se met en place est critique, d'où la nécessité de bien comprendre les mécanismes et les facteurs régulant l'ostéogénèse. L'objectif de notre étude est donc concentré sur l'ostéogénèse, allant de l'arrivée des cellules à la surface de l'implant au début de la minéralisation osseuse.

L'ostéointégration est initiée par l'arrivée de cellules osseuses à la surface de l'implant, et elle dépend donc de leur interaction avec cette dernière. Albrektsson et al [15] ont défini des prérequis cliniques et mécaniques assurant l'obtention d'une « bonne » ostéointégration. Ces prérequis se basent sur six paramètres qui peuvent influencer la liaison os-implant. On peut distinguer trois facteurs cliniques :

- L'état du site receveur. L'obtention d'une ostéointégration de qualité constante dans le temps nécessite un site receveur parfaitement sain (i.e. présence de cellules, nutriments…) [16]. Des pathologies infectieuses ou inflammatoires, locales ou générales, peuvent influencer la qualité de l'ostéointégration et la durée de vie de l'implant. Un site receveur présentant une faible densité osseuse verra son taux d'échec augmenter.
- La technique chirurgicale [15]. Le respect du protocole d'asepsie doit être pris en compte afin d'éviter l'introduction de germes dans la zone d'implantation et, par la suite, l'apparition d'une infection.
- Le temps de cicatrisation et les conditions de mise en charge. Le temps de cicatrisation nécessaire à l'obtention d'une ostéointégration efficace est d'environ 3 à 4 mois [17]. Durant cette période, il est important que le site d'implantation soit soumis à un chargement spécifique

et à des micromouvements pour stimuler la croissance afin d'éviter la résorption de la matière osseuse. Ces conditions sont spécifiées par la loi de Wolff [4] dès 1892.

Ces paramètres dépendant du patient et de la méthode d'implantation peuvent évoluer selon les facteurs de risques spécifiques du patient, tels que le sexe, l'âge, la présence de pathologies complémentaires, etc. Ces paramètres doivent donc être considérés lors de la planification de l'implantation afin de minimiser les risques d'échecs. De plus, les paramètres directement liés à l'implant doivent aussi être intégrés, tels que :

- Le matériau. Il est important que le matériau utilisé puisse supporter les sollicitations mécaniques appliquées par la structure osseuse tout en étant biocompatible [18]. Ce point sera abordé plus en détail dans la deuxième partie.
- La structure de l'implant. La forme et la géométrie de d'implants endo-osseux agissent aussi sur les conditions d'ostéointégration, en particulier sur la stabilité primaire de l'implant. Au cours de ces dernières années, certaines formes se sont imposées, telles que les implants paraboliques, filetés ou la combinaison des deux. Des études ont montré que les implants présentant une racine parabolique permettaient une meilleure répartition des charges mécaniques à l'os [19]. La connexion par filetage via une structure vissée assure un verrouillage mécanique avec une augmentation de la surface de contact de l'implant dans l'os. Par ailleurs, d'autres formes ont émergé plus récemment, avec les structures lattices qui permettent d'augmenter la surface de contact entre l'implant et l'os nouvellement formé [20].
- Les propriétés surfaciques de l'implant [15]. La surface est le premier intermédiaire entre le tissu osseux et l'implant. La réponse des cellules osseuses dépend des propriétés de la surface sur laquelle se trouvent les cellules, particulièrement lors de la colonisation cellulaire de la surface. L'interface os-implant et la biocompatibilité de l'implant se caractérisent par des propriétés surfaciques qui sont de trois types : mécaniques, chimiques et topographiques.

Parmi les différents prérequis pour l'ostéointégration, les propriétés surfaciques sont les paramètres auxquels nous allons nous intéresser dans la suite de notre étude.

1.1.3. Les propriétés de l'interface os-implant

On s'intéresse ici au comportement des cellules osseuses (les MSCs et les ostéoblastes) sur la surface de l'implant, tel que la migration cellulaire et la prolifération. La littérature souligne que les cellules adoptent un comportement spécifique en liaison avec les propriétés de la surface.

1.3.1. Les propriétés mécaniques

Les différentes études réalisées au cours des dernières décennies ont montré un impact des propriétés mécaniques de l'implant sur la densité du tissu osseux. Cet impact mécanique est aussi visible aux échelles mésoscopique et microscopique avec l'influence de la rigidité de la surface sur le comportement cellulaire. En effet, la communication cellule-substrat via la matrice extracellulaire influence la dynamique interne de la cellule ainsi que sa structure [21]. Cet effet a été nommé mechanotaxis et se visualise par le comportement cellulaire suivant : plus rigide est le substrat, plus élevées sont l'adhésion et l'élasticité de la cellule [22]–[25] (voir figure 1.6). Un second mécanisme, la durotaxis, montre qu'une cellule, libre de se mouvoir, se déplacera toujours selon un gradient de rigidité croissant. Lo et al [25] prouvent que cet effet a pour conséquence d'améliorer la migration de fibroblastes le long d'un substrat rigide. Suivant cette observation, différentes études ont alors prouvé

que le mouvement cellulaire pouvait être contrôlé juste par la seule modulation de la rigidité de la surface [26], [27].

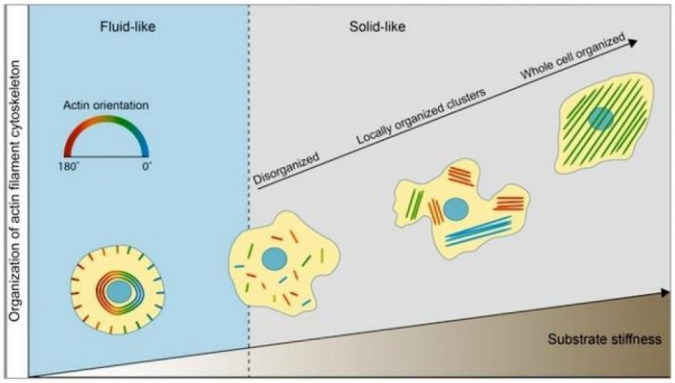


Figure 1.6 : Réorganisation de la structure interne de la cellule selon la rigidité du substrat [www.asianscientist.com].

Les études d'influence de la rigidité du substrat concernent généralement son effet sur la différentiation. Elles ont montré que la rigidité du substrat à elle seule influence la différenciation de MSC en différentes lignées cellulaires [23], [28]–[30]. Dans ce sens, il a été prouvé que des MSCs cultivées sur des gels présentant des rigidités proches du muscle, du cerveau, et de l'os différenciaient en myoblastes, neurones, et ostéoblastes respectivement.

1.1.3.2. Les propriétés chimiques

D'un point de vue chimique, la littérature a établi que la modification de la composition chimique de la surface (en modifiant par exemple la proportion d'oxygène présente à la surface) avait pour effet d'affecter positivement ou négativement la biocompatibilité de la surface. On sait par exemple que la couche de TiO2 formée lors de la fabrication d'implants en titane améliore la biocompatibilité du matériau, avec une meilleure adhésion cellulaire [7], [24], [31]. D'autres études montrent que l'utilisation de certains revêtements, tels que l'hydroxyapatite, ont pour effet de promouvoir l'ostéogénèse avec un contact os-implant plus important [32], [33]. Ainsi, l'utilisation d'un traitement de surface peut permettre d'améliorer la composition chimique de la surface du point de vue de la biocompatibilité.

Du point de vue thermodynamique, Le paramètre important à prendre en compte dans l'analyse de la surface est la mouillabilité. Elle caractérise l'équilibre thermodynamique d'une goutte à la surface du matériau et reflète l'énergie libre de la surface du matériau. La mouillabilité est généralement évaluée par un test en goutte, consistant en la mesure statique de l'angle de contact créé par l'équilibre thermodynamique de la goutte entre les trois différentes phases : liquide, solide et gazeuse. En utilisant l'eau comme une phase liquide, l'hydrophilicité est généralement définie par un angle de contact inférieur à 90°, tandis que l'hydrophobicité est définie par un angle de contact supérieur à 90° [34]. La mouillabilité donne l'image de la capacité de la surface à pouvoir attirer d'autres molécules. Ainsi, en se référant à l'étude de Rupp et al [35], une faible énergie de surface donne au matériau un caractère hydrophobe, tandis qu'une forte énergie de surface donne un caractère hydrophile. La mouillabilité a une influence notable sur la biocompatibilité du matériau ; à l'échelle macroscopique, une mouillabilité est considérée comme « bonne » si elle permet un recouvrement rapide de la surface par le sang du patient. D'un point de vue microscopique, une plus grande adhésion et une plus grande prolifération cellulaire ont été observées sur les surfaces avec une forte mouillabilité [36], [37].

1.1.3.3. Les propriétés topographiques : la rugosité

Les travaux de Branemark sur l'ostéointégration ont permis de mettre en avant les différences entre les surfaces rugueuses et les surfaces lisses ; les surfaces rugueuses étant souvent préférées aux lisses pour un meilleur contact osseux et un raccourcissement du temps de guérison [15], [16]. En effet, la rugosité joue un rôle important durant la première phase de l'ostéogénèse, lors de l'arrivée des cellules osseuses à la surface de l'implant. Cette phase initiale a été étudiée par des tests in vitro, et de nombreuses études expérimentales ont prouvé que la rugosité à l'échelle microscopique (0 - 40 μm) joue un rôle significatif dans les interactions cellule-substrat [38]. Ainsi, Albrektsson et Wennerberg [39] classent les rugosités (écart moyen arithmétique Ra) des implants disponibles sur le marché en quatre catégories : lisse (Ra<0.5 μm), peu rugueux (0.5 μm <Ra<1 μm), modérément rugueux (1 μm <Ra<2 μm) et très rugueux (Ra>2 μm).

Auteurs	Matériau	Aspect cellulaire			Rugosité optimale
		Adhésion	Morphologie	Migration	
Huang et al, 2004 [40]	Ti	+			Ra=0.15 µm
Rosales - Leal et al, 2010 [36]	CPTi	+	+		Ra=1 – 1.6 µm
Anselme et al, 2000 [38]	Ti6Al4V	+	+		Ra ∈ [0.16 - 0.3 µm]
Anselme et al, 2005 [22]	Ti	+			Ra ∈ [0.76 - 1 µm]
Anselme et al, 2014 [41]	Ti, Ti6Al4V	+			Ra ∈ [1.2 - 4.5 µm]
Vilardell, 2018 [42]	Ti6Al4V	+	+		Ra ∈ [18 - 40 µm]
Wu et al, 2015 [43]	Ti6Al4V	+	+		Ra ∈ [0.5 - 1 µm]
Feller et al, 2015 [24]	Ti6Al4V	+			Ra ∈ [1 - 2 µm]
Grizon et al, 2002 [44]	Ti	+	+	+	Ra=0.26 µm

Tableau 1.1 : Récapitulatif d'études traitant de l'influence de la rugosité (aléatoire sans patterns/motifs) de surfaces en titane sur différentes fonctions cellulaires.

Le tableau 1.1 récapitule des résultats d'études analysant l'influence de la rugosité par rapport à une surface lisse. L'adhésion cellulaire est le comportement cellulaire le plus étudié par rapport à la rugosité ; une augmentation de la rugosité semble produire une augmentation de l'adhésion. Généralement, à l'échelle microscopique, une rugosité optimale pour une bonne adhésion et une bonne réponse cellulaire se situe autour de 1 μm [45]. Dans le cas où la rugosité présente une texture, d'autres études montrent l'influence de cette topographie de la surface sur l'adhésion et l'orientation du tissu osseux [46]. Ainsi, les études de Wu et al [47] et de Kaiser et al [48] révèlent que la présence de rainures crée des guides de contact (améliorant l'adhésion et la migration) et influence l'orientation des cellules et leurs migrations en les dirigeant selon les rainures. Des études récentes montrent l'influence significative de la rugosité à l'échelle nanoscopique sur le comportement cellulaire, via une adhésion cellulaire plus importante et une prolifération cellulaire plus efficace [49]. C'est en effet à cette échelle que se joue la liaison d'adhésion entre la cellule et le substrat (via l'adhésion focale). Le tableau 1 montre également une adhésion cellulaire améliorée pour des rugosités Ra à l'échelle de la centaine de nanomètres. En revanche, si on se réfère à l'étude de Ra et al [50], bien que la présence de nanostructures (telles que celles liées à la porosité de la surface) améliore l'attachement et la prolifération cellulaire, la différentiation ne présente une amélioration notable qu'en présence de la combinaison micro/nano. Ceci,

ainsi que la conception récente de traitements de surface se focalisant sur la création de nanostructures, prouve l'importance de la prise en compte des deux échelles de rugosité. Néanmoins, aucune technique n'a été standardisée afin d'évaluer de la même manière l'influence de la rugosité à l'échelle microscopique et nanoscopique.

1.2. Les implants et la surface implantaire

2.1. Brève historique des implants et de la biocompatibilité

Un implant est un dispositif médical servant de substitut artificiel temporaire ou permanent à des organes non fonctionnels. Parmi les différentes catégories d'implants, les implants endo-osseux sont des dispositifs qui permettent de remplacer une partie ou la totalité d'une structure osseuse en intégrant l'implant directement au sein du tissu. L'utilisation d'implants endo-osseux est très ancienne et notée dès 2000 av. JC avec le placement de substituts dentaires [51]. Jusqu'au milieu du 20ème siècle, le seul aspect pris en compte était le non-rejet de l'implant par le corps humain. Cependant, dans le cas d'implant endo-osseux en contact étroit avec l'os (endo), la connexion osseuse n'était pas assurée. A la place, une capsule fibreuse isolait l'implant en se formant entre celui-ci et l'os ; on parle alors de « fibrointégration » [52]. Ce type de liaison a longtemps été défini comme une référence dans le domaine des prothèses dentaires, le but étant de mimer le ligament parodontal afin d'amortir les chocs à l'interface ; l'utilisation de matériaux non-biocompatibles (i.e. acier, tantale) accentuait cet effet. Cette connexion entre l'implant et l'os était toutefois imparfaite, engendrant des échecs à long terme. En 1952, Branemark découvre les propriétés ostéoinductrices du titane et en 1965 il définit le concept actuel d'ostéointégration. L'introduction de ce concept a permis d'augmenter significativement le taux de succès à long terme, pouvant atteindre aujourd'hui 95%. Actuellement, les critères de succès (temps de guérison, stabilité de l'implant…) reconnus internationalement sont ceux d'Albrektsson et al [15].

La définition de la biocompatibilité a aussi évolué dans le temps et elle a été influencée par l'introduction du concept d'ostéointégration. La biocompatibilité a longtemps été considérée comme l'aptitude d'un matériau à ne pas générer des effets toxiques ou nuisibles au sein d'un environnement biologique (i.e. inertie biologique) [53]. Cependant, les études récentes ont inclus dans cette définition l'induction par la surface d'interactions positives entre l'hôte et le matériau (dont l'ostéointégration pour un implant) [18]. Ainsi, une définition plus juste de la biocompatibilité est la capacité d'un biomatériau à remplir une fonction spécifique avec une réponse appropriée de l'hôte. Dans le cas de l'ostéointégration, la biocompatibilité recherchée consiste en des interactions positives entre le biomatériau et le tissu osseux, permettant une amélioration et une accélération de la cicatrisation osseuse. La caractérisation de la biocompatibilité des matériaux implantables fait l'objet de la norme internationale ISO 10993 [54], qui liste un ensemble de tests nécessaires en fonction de la nature du contact et de la durée d'implantation du biomatériau.

2.2. La surface implantaire et les solutions innovantes

Les surfaces implantaires ont connu de nombreuses évolutions au cours des années récentes. Ces évolutions impliquent principalement trois auteurs : le matériau, la structure et les traitements appliqués à la surface.

2.2.1. L'évolution du matériau

Comme il a été indiqué précédemment, le matériau composant l'implant, appelé biomatériau, est un élément important de la biocompatibilité. Par définition, un biomatériau est un matériau non vivant utilisé dans un dispositif médical, à des fins thérapeutiques ou non, et appelé à interagir avec les systèmes biologiques [53]. On peut distinguer les biomatériaux bioinertes (i.e. aucune interaction avec

l'environnement biologique) et les biomatéraiux bioactifs (i.e. interaction forte avec l'environnement). Historiquement, la première avancée significative dans la fabrication de surfaces implantaires fut l'introduction du titane (Ti) dans la réalisation d'implants endo-osseux [16]. Les implants disponibles aujourd'hui sont majoritairement fabriqués en titane. Cependant, les technologies évoluent et intègrent d'autres matériaux reconnus pour leur biocompatibilité [18]. Les principaux sont présentés dans le tableau 1.2 :

Matériaux	Masse volumique (g/cm^3)	Module d'Young (MPa)	Limite élastique (MPa)	Limite à la rupture (MPa)
Acier inoxydable 316L	8	193	205	515
Cobalt Chrome	8.4	230	470-1600	1130-1900
Céramique ZrO_2	5	100-250	115-711	177-1000
Ti grade 2	4.51	105	275	344
Ti6Al4V	4.43	113	880	950

Tableau 1.2 : Paramètres mécaniques de différents biomatériaux. Les valeurs des paramètres mécaniques proviennent du site azom [www.azom.com].

- L'acier inoxydable 316L [55]. Ce matériau est peu coûteux, bioinerte. Son inertie biologique ainsi que ses bonnes propriétés mécaniques (tableau 1.2) en font un matériau de choix pour les applications orthopédiques. Il a cependant une densité élevée et ne présente aucune propriété ostéoinductrice.
- La céramique. Ce matériau se caractérise par un comportement inerte en milieu biologique ainsi que par des bonnes propriétés mécaniques. Il est particulièrement utilisé dans le domaine dentaire. Cependant, sa faible ductilité limite son utilisation [56].
- Les alliages de cobalt et de chrome [57] et de fer-chrome-nickel ont connu un fort développement au cours de ces dernières années. Ces matériaux présentent, en plus d'une très bonne biocompatibilité, des bonnes propriétés mécaniques (tableau 1.2) ainsi qu'une excellente résistance à la corrosion. Néanmoins, leur densité est élevée. De plus, la fiabilité de ces matériaux a été nettement moins étudiée que celle des alliages de titane.
- Enfin, le titane « pur » et son alliage Ti-6Al-4V (TA6V) sont les biomatériaux les plus utilisés dans la fabrication des implants endo-osseux. Ces matériaux sont choisis en raison de leur stabilité, de leurs très bonnes propriétés mécaniques (tableau 1.2) et d'une excellente biocompatibilité résultant de la formation d'une couche d'oxyde stable à la surface (résultat des interactions physico-chimiques entre le matériau et l'oxygène de l'atmosphère) [56], [58], [59]. Il existe d'autres alliages de titane reconnus pour leur biocompatibilité. Cependant, l'introduction de ces alliages de titane à base de niobium ou de zirconium [60] est récente et nécessite des études complémentaires.

D'autres matériaux sont également réputés pour leur biocompatibilité, tels que l'or ou le platine. Cependant, ils ne sont pas adaptés aux sollicitations appliquées au sein de tissu osseux et ils sont plus utilisés lorsque les charges mécaniques sont faibles, par exemple dans les cas des cathéters ou des stents [61].

Le titane permet une bonne interaction avec les milieux biologiques [62]. Plus particulièrement, d'un point de vue des propriétés mécaniques, il présente un module élastique d'environ 1000 *GPa* pour une limite élastique autour de 350 *MPa*. Cette limite élastique atteint 870 *MPa* dans le cas de l'alliage de titane TA6V. Le matériau peut ainsi résister aux chargements articulaires. D'un point de vue des propriétés physiques, le titane et ses alliages sont amagnétiques et présentent une masse volumique moyenne faible de 4.5 g/cm^3. Cela permet d'obtenir des implants légers et donc de réduire l'encombrement au sein du corps humain. Le titane et ses alliages présentent aussi une excellente

résistance à la corrosion [63] et la formation d'une fine couche d'oxyde à sa surface améliore la biocompatibilité. Les prérequis pour des implants faits en TA6V sont encadrés par les normes ISO 10993-1:2018 et ASTM F1108 [54], [64].

2.2.2. L'évolution de la surface implantaire

La modification de la topographie et de la chimie des surfaces des implants est le principal moyen par lequel on peut interagir avec le milieu cellulaire afin d'améliorer ou d'accélérer l'ostéointégration. Au cours des années 1980, les études de Branemark [5], [16], [65], validées par d'autres études plus récentes [15], [39], [66], ont montré qu'une surface lisse pour un implant était à éviter et qu'il fallait plutôt privilégier une surface rugueuse pour une meilleure intégration de l'implant. Parmi les surfaces rugueuses existantes, la plus connue est la surface usinée. A l'origine, les surfaces implantaires étaient obtenues par usinage et considérées comme lisses. Cependant, à l'échelle microscopique, ces surfaces affichent des micro-rainures dues à l'usinage. Elles présentent de très bons résultats en termes d'ostéointégration, et sont généralement considérées comme des surfaces de référence. De nouvelles méthodes de modification de surface ont été mises en place afin d'améliorer la biocompatibilité. Les différents traitements ont été répertoriés dans le tableau 1.3.

Auteurs, date	Matériau de base	Processus de surface	Type de procédé	Ordre de grandeur Ra	Accessibilité de la surface	Complexité	% contact os - implant
Branemark et al [5]	Ti	Usinage	Soustractif	1 μm	+	+	33% [67]
Rahman, 2014 [68]	Ti	Electropolissage	Soustractif	~100 nm	+	+	N.A.
Buser et coll, 2004 [69]	Ti	SLA	Soustractif	~100 nm – 10 μm	+	-	66% [67]
Mandl et al, 2002 [70]	Ti	Projection plasma	Additif	~100 nm – 5 μm	-	-	55% [67]
Ban et al, 2006 [71]	cpTi	Attaque chimique	Soustractif	1-2 μm	++	++	58% [67] [72]
Kim et al, 2013 [31]	cpTi	Anodisation	Additif	~200 nm	++	+	39% [67]
Hung et al, 2013 [33]	TA6V	Revêtement hydroxyapatite	Additif	1 - 3 μm	++	-	60-70% [67] [72]
Wennerberg et al, 1998 [66]	TA6V	Sablage	Soustractif	1 - 2 μm	-	++	52% [67] [66] [72]

Tableau 1.3 : Description des procédés de traitements de surface.

Chacun des traitements listés part d'une surface lisse comme surface initiale. Les traitements de surface peuvent être décomposés en deux catégories : les traitements additifs qui créent de la rugosité par ajout de matière et les traitements soustractifs qui créent de la rugosité par enlèvement de matière. Nous allons décrire par la suite des traitements de surfaces appliquées sur du titane ou des alliages de titane.

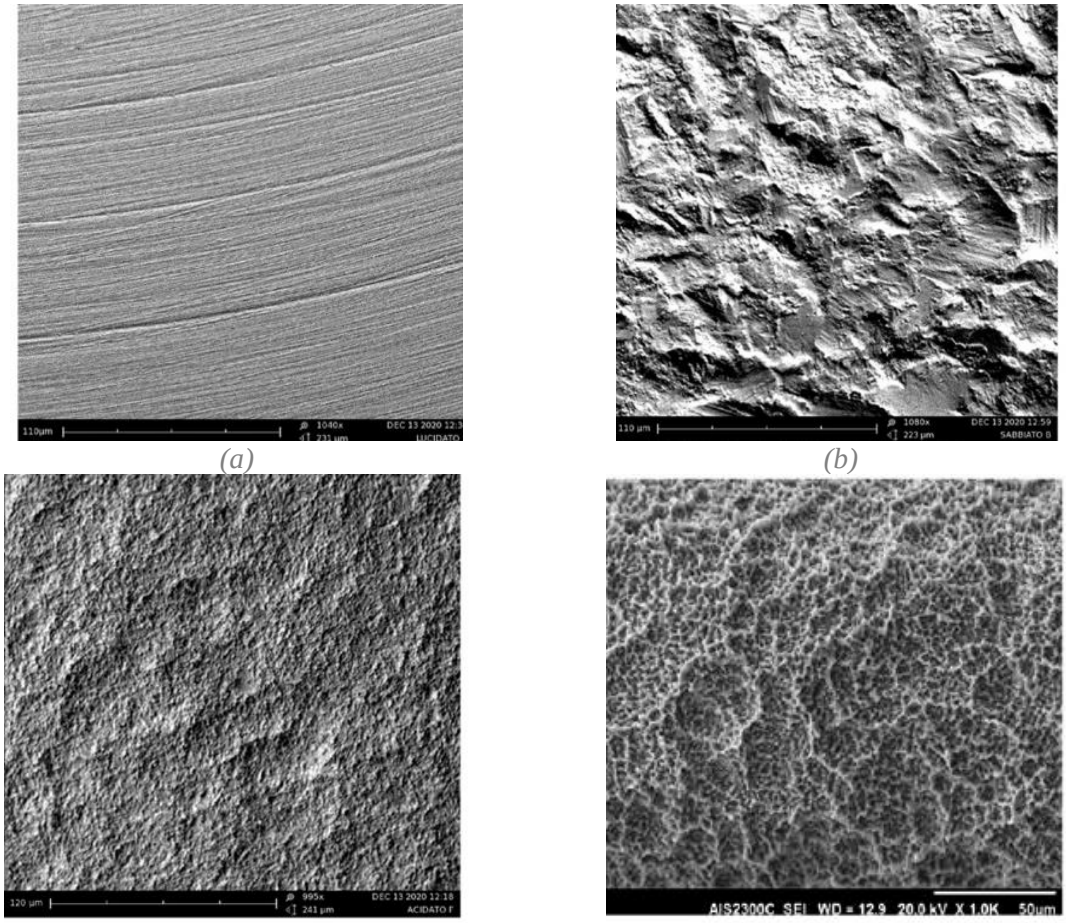


Figure 1.7 : Surfaces obtenues par des traitements soustractifs. (a) usinage [73] ; (b) sablage [73] ; (c) attaque chimique [73] ; (d) SLA [74].

Pour améliorer la biocompatibilité, les traitements soustractifs ont été utilisés les premiers. Le plus ancien est l'usinage, permettant de créer une surface lisse à l'échelle macroscopique, mais structuré à l'échelle microscopique avec la présence de micro rainures (figure 1.7a). Les études sur une telle surface révèlent un contact entre l'os et l'implant en titane d'environ 33% lors de la phase d'ostéointégration. Cependant, des échecs au niveau de la connexion os-implant sont observés pour des sites osseux de faible densité avec les surfaces usinées [75]. Un autre traitement de surface par sablage est aussi applicable (tableau 1.3). Le principe consiste à bombarder la surface à l'aide de particules de matériaux de dureté élevée (i.e. oxyde de titane, alumine…) et de tailles spécifiques (allant de quelques µm à la centaine de µm) afin d'augmenter la rugosité (figure 1.7b). La taille des particules influence l'amplitude de la rugosité et la composition chimique de la surface. Des études montrent une amélioration de l'ostéointégration sur ce type de surface et une interface os-implant pouvant atteindre 52% de contact 4 semaines après implantation [66].

Un autre traitement de surface est envisageable afin de modifier la surface : le traitement de surface par attaque chimique (tableau 1.3). Le principe consiste à mettre la surface en contact avec un acide qui dissout de la matière. Ce traitement permet de contrôler la micro et nano rugosité par un enlèvement homogène sur l'ensemble de la surface (figure 1.7c). La mise en place du traitement est relativement simple ; la surface est immergée au sein de la solution d'attaque dans laquelle elle peut être déplacée. Les surfaces en titane ou ses alliages sont généralement traités à base de solution d'acide hydrofluorique (HF). En effet, une étude de Zahran et al [76] montre une amélioration de la biocompatibilité en présence de rugosité, avec notamment de meilleures adhésion et prolifération cellulaires. De plus, un dépôt de fluorine améliore la croissance cellulaire [77] et les études démontrent

une augmentation du contact os-implant pouvant atteindre les 60% - 70% après quatre semaines. Parmi les autres traitements de surface, on peut aussi citer l'électropolissage qui consiste en une attaque chimique amplifiée par un courant. Bien que ce procédé puisse être utilisé dans le traitement des surfaces d'un implant, il est généralement retenu comme un prétraitement pour pré-lisser la surface. Enfin, de nouveaux traitements émergent comme le traitement de surface SLA (*Sandblasted with Larged grits and Acid etched*) (voir tableau 1.3), qui consiste à attaquer chimiquement une surface ayant été sablée au préalable (figure 1.7d). La SLA améliore l'apposition osseuse durant la phase initiale de l'ostéointégration, avec un pourcentage de contact os-implant d'environ 66% à quatre semaines.

La surface lisse d'un implant peut aussi être modifiée pour en augmenter la rugosité par des traitements additifs à l'échelle microscopique. Une technique régulièrement utilisée sur le titane est le dépôt de titane par projection plasma (voir tableau 1.3). Cette technique consiste à déposer un revêtement sur la surface par pulvérisation thermique de gouttelettes qui se condensent et se solidifient. L'épaisseur de la couche déposée peut varier entre 30 et 50 μm. Le procédé permet de modifier la surface en donnant un aspect irrégulier et globulaire tout en appliquant un revêtement aux propriétés ostéoinductrices (i.e. métal, polymères, céramique…), pouvant aboutir à l'augmentation du pourcentage de contact os-implant jusqu'à 55%. Le deuxième traitement de surface additif communément utilisé est le revêtement à l'hydroxyapatite (voir tableau 1.3). Ce traitement consiste à déposer une couche de phosphate de calcium (entre 30 et 50 μm), offrant des propriétés ostéoinductrices pour l'adhésion et la prolifération de cellules ostéogéniques (figure 1.8). Ce revêtement permet de réduire significativement la durée de la cicatrisation osseuse, avec un pourcentage de contact os-implant qui atteint 60 à 70% après quatre semaines [72].

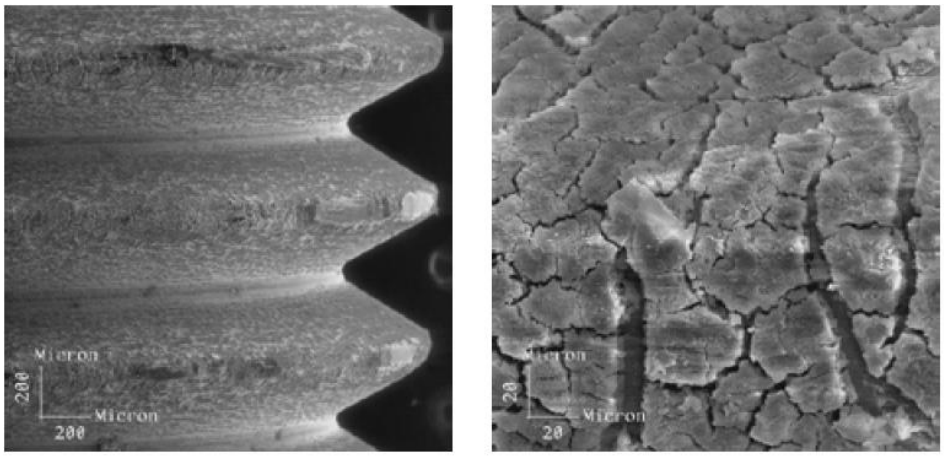


Figure 1.8 : Revêtement d'hydroxyapatite appliquée à une vis [78].

Enfin, un traitement par anodisation est aussi applicable (tableau 1.3). L'anodisation est une méthode couramment utilisée pour obtenir des pores nanométriques sur les métaux tels que le titane. Le principe consiste à déposer une fine couche (< 1 μm) de dioxyde de titane TiO2 sur la surface. Des études montrent son influence positive sur l'adhésion et la prolifération cellulaire [31], ainsi que sur la croissance osseuse, avec une amélioration du pourcentage de contact os-implant jusqu'à 40%.

1.3. Procédés de fabrication des implants

3.1. Des procédés de fabrication classiques à la fabrication additive

La production d'un implant spécifique se déroule selon un processus partant des données patients : (i) Acquisition des données des radiographies ; (ii) Segmentation anatomique ; (iii) Planning pré-chirurgical ; (iv) Validation par le chirurgien ; (v) CAO et analyse numérique ; (vi) Fabrication de

l'implant ; (vii) Contrôle qualité ; (viii) Stérilisation et implantation. Généralement, les techniques de fabrication standard passent par une phase de préfabrication ou ébauche de l'implant, puis par une étape de finition avec de l'usinage. Les procédés traditionnels de mise en forme tels que la fonderie, le frittage et le moulage par compression ont connu un développement pour convenir à la fabrication d'implants avec des propriétés satisfaisantes [79]. Cependant, la combinaison de ces procédés de fabrication et l'introduction de nouveaux matériaux biocompatibles peut engendrer l'utilisation de techniques spécifiques ou d'un outillage particulier, augmentant ainsi les coûts de production. On peut par exemple citer la fabrication d'implants à base d'alliages de cobalts et de chrome. L'utilisation de ces alliages procure une excellente biocompatibilité. Cependant, ces alliages sont difficiles à usiner à cause de leur dureté et leur forte résistance à l'usure [80]. Combiné à de la production en petites séries, voire en mode unitaire, on peut comprendre que certains procédés traditionnels ne soient pas adaptés.

Actuellement, la fabrication des implants se tournent vers l'exploitation de la fabrication additive (FA), qui semble être prometteuse [79]. La FA regroupe des procédés de fabrication innovants qui, contrairement aux techniques traditionnelles (i.e. fraisage, découpe…), consistent à ajouter de la matière [81], [82]. A partir du fichier CAO de la pièce, les données tridimensionnelles (3D) de la pièce sont découpées en tranches bidimensionnelles (2D) d'épaisseur constante. La machine FA superpose ces couches afin d'obtenir la structure finale souhaitée. Selon les techniques de FA, la méthode appliquée pour créer ces couches varie et on peut lister les technologies suivantes :

- Les technologies basées sur la photopolymérisation [81]. La photopolymérisation est un procédé d'impression 3D qui utilise des polymères liquides capables de se solidifier à la lumière. Elle est à la base de la stéréo-lithographie. Cette technologie est souvent employée pour réaliser du prototypage.
- Les technologies basées sur le dépôt progressif de matière [81]. Il s'agit d'un procédé où la poudre fusionnée (ou le filament fondu) est directement déposée sur la couche précédente. C'est ce qui est utilisé pour les imprimantes 3D grand public.
- Les technologies basées sur les lits de poudres [81]. Leur particularité est d'utiliser la poudre en tant que matériau de base. Cette poudre est fusionnée selon des techniques variées (par laser, faisceau d'électrons…). Le principal avantage de la poudre est d'offrir une grande diversité de matériaux à imprimer.

La FA permet de réaliser des structures aux géométries complexes, difficiles à produire par des procédés de fabrication traditionnels, tout en minimisant les pertes de matière. Cependant, ce procédé n'est pas adapté à la grande série mais plutôt au prototypage, à la petite série voire à la customisation. Si ces technologies ont déjà donné lieu à de nombreuses applications dans les domaines de l'aéronautique et du bâtiment, elles apportent aussi de réelles possibilités d'innovations dans le domaine biomédical [83]. En effet, le procédé permet de répondre à la problématique de personnalisation de l'implant, ou de gestion de l'inter variabilité morphologique.

Dans le cadre de l'étude, nous nous intéressons aux procédés FA à lit de poudre. Cette famille de procédés FA est particulièrement bien adaptée à la fabrication de pièces allégées métalliques, car les pièces produites présentent des propriétés mécaniques proches de ce qui peut être obtenu avec les procédés de fabrication traditionnels. Ce procédé consiste à déposer une couche de poudre métallique sur un plateau. Le lit de poudre est ensuite fondu à des emplacements spécifiques et se solidifie. Un nouveau lit de poudre est ensuite superposé au précédent. Le processus est répété couche par couche afin de reconstruire l'objet. Les procédés FA à base de lits de poudre diffèrent par la technique de fusion de la poudre. ; on peut ainsi citer : (i) le *Selective Laser Sintering* (SLS) [81], (ii) le *Multi Jet Fusion* (MJF) [81], (iii) le *Electron Beam Melting* (EBM) [81] ou encore (iv) le *Selective Laser Melting* (SLM aussi appelé *Laser Beam Melting* LBM) qui a connu un fort développement au cours de ces dernières années. Notre étude se concentre sur le procédé de FA par lit de poudre SLM et son utilisation pour des applications biologiques.

3.2. Le procédé de FA SLM

3.2.1. Description du procédé SLM

Le principe de ce procédé se base sur la fusion sélective localisée de la couche de poudre métallique afin d'obtenir un objet 3D couche par couche [55] (voir figure 1.9). Cela est réalisé par un dépôt de fines couches de poudres métalliques et par la fusion complète des particules métalliques par le laser afin de former une section 2D de l'objet. La fabrication est réalisée au sein d'une chambre avec un flux constant de gaz inerte afin d'éviter la contamination, la présence d'oxygène notamment pourrait dégrader les caractéristiques mécaniques de la pièce. La plateforme de fabrication translate selon l'axe Z (« Building direction » sur la figure 1.9) après la fabrication de chaque couche.

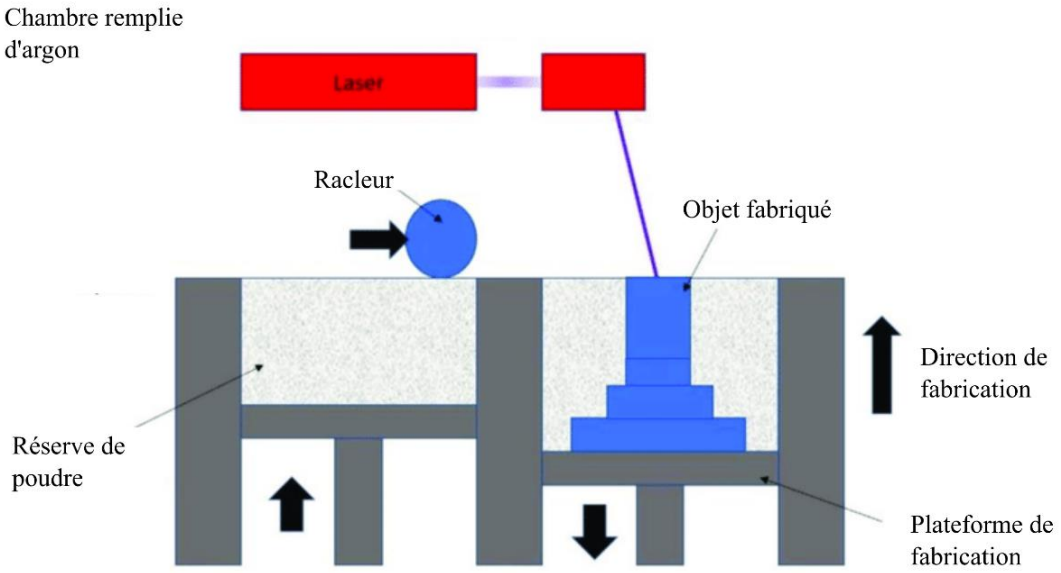


Figure 1.9 : Description du procédé SLM [84].

La réalisation d'une pièce par SLM suit un processus qui peut être divisé en 4 étapes, comme le décrit la figure 1.10 :

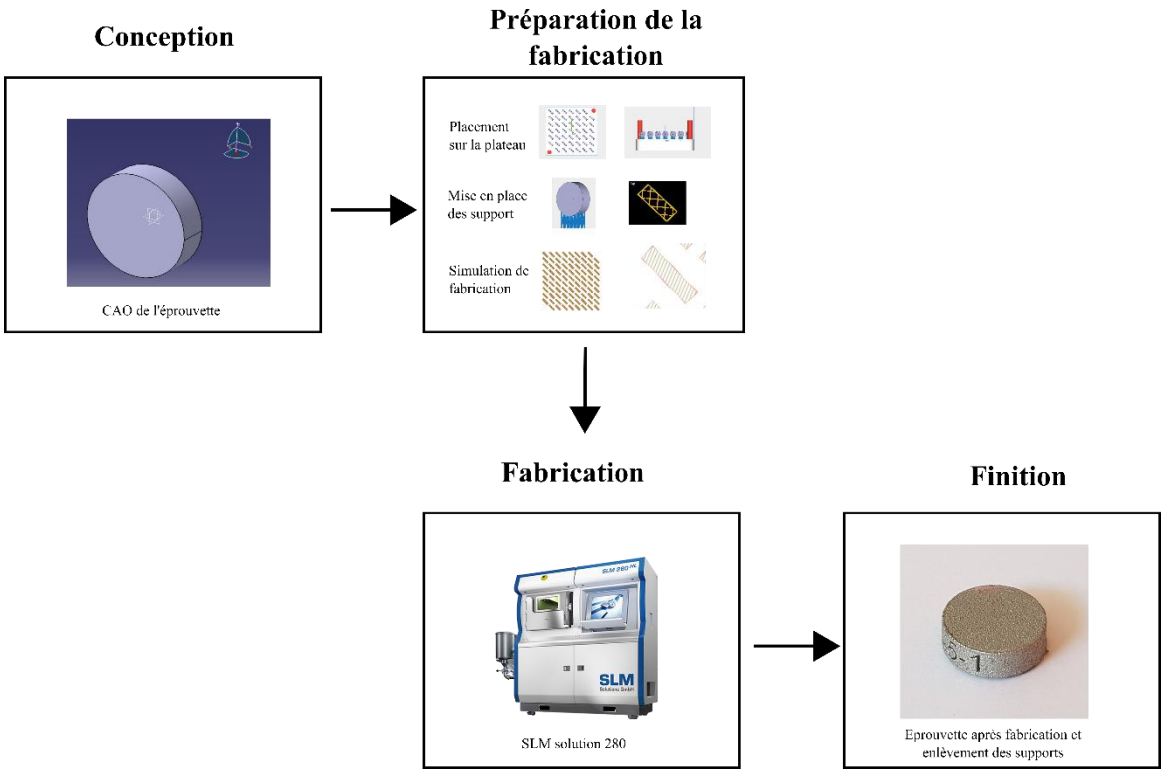
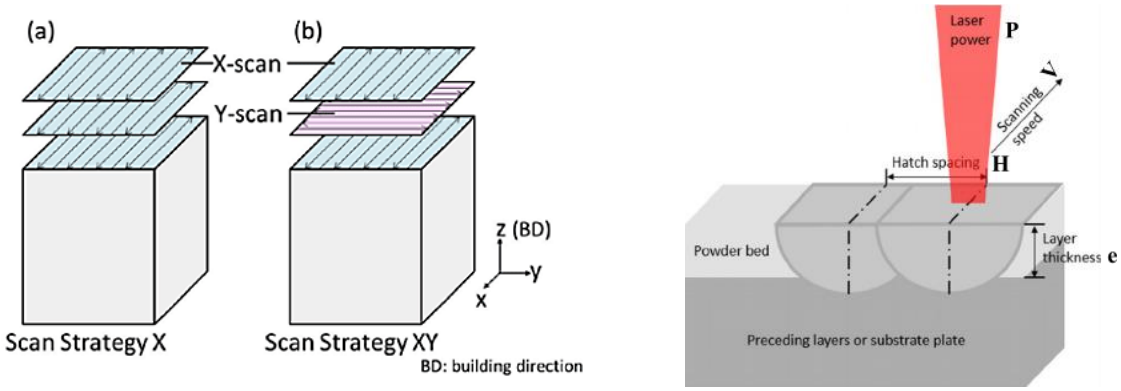


Figure 1.10 : Description du processus de fabrication SLM.

1. La conception de la pièce. Lors de cette phase, le modèle CAO de la pièce est réalisé, puis converti en fichier STL afin de pouvoir être lu par le logiciel de préparation de fabrication de la machine (MAGICS pour la machine SLM solutions utilisée lors de cette étude).
2. La préparation de la fabrication. Après l'importation de la pièce sous format STL, le plateau de fabrication est alors réalisé. Pour cela, les pièces sont placées sur le plateau selon des règles garantissant le bon déroulement de la fabrication de la pièce selon ses dimensions et sa géométrie. Pour chaque pièce, des supports sont alors apposés afin de supporter la pièce et d'éviter que la pièce soit directement collée au plateau, tout en garantissant une bonne diffusion thermique. Passée cette étape, les paramètres de fonctionnement sont alors introduits dans la machine. Les jeux de paramètres sont déterminés en fonction du matériau utilisé et sont calibrés afin d'obtenir la meilleure qualité de pièce possible (via un jeu de paramètres permettant de minimiser la porosité au sein de la pièce par exemple). La fabrication du plateau est alors simulée sous un autre logiciel afin de vérifier la bonne réalisation du plateau.
3. La fabrication de la pièce. Durant cette étape, la pièce est fabriquée couche par couche. A la fin de fabrication de chaque couche, le logiciel vérifie qu'il n'y a eu aucun problème au niveau de la fabrication (pièce qui se relève, zone de la pièce non fusionnée). En l'absence de problème, la fabrication se poursuit ; dans le cas contraire, la fabrication est stoppée jusqu'à l'arrivée de l'opérateur. Cette fabrication est réalisée sous un flux constant d'argon afin d'éviter une détérioration du matériau.
4. La finition de la pièce. Après la fin de la fabrication, la poudre non fusionnée est enlevée du plateau, puis la pièce est extraite du plateau en retirant les supports. Dans le cas où cela est nécessaire, un traitement thermique peut être appliqué à la pièce avec le plateau afin de diminuer les contraintes résiduelles, réduire la porosité, et augmenter les performances mécaniques (rigidité, résistance mécanique…).

La fabrication d'une couche se fait en deux étapes. D'abord, la frontière externe est réalisée par la fusion du contour, puis la surface centrale est fusionnée. Le lasage de la surface centrale suit un pattern

que l'on appelle la stratégie de passage qui peut affecter les propriétés mécaniques de la pièce (figure 1.11a). Cette stratégie de passage est déterminée lors de la phase de préparation de la fabrication.



(a) *(b)*

Figure 1.11 : Descriptions des paramétres du processus de fabrication. (a) Exemple de différentes stratégie de passage [85] ; (b) Description des paramètres machines principaux [86].

De nombreux paramètres déterminent l'efficacité du procédé, tels que la puissance du laser *P*, la vitesse de scan *V*, l'épaisseur de la couche *e*, ou la distance de scan *H* (représentant la distance entre deux cordons de fusion) (figure 1.11b). Ces paramètres permettent de définir l'énergie apportée par le laser par unité de volume, via le paramètre de densité énergétique *E*, suivant l'équation (1.1) :

$$E = \frac{P}{V.e.H} \tag{1.1}$$

Ce paramètre de densité énergétique joue sur la densité de matière ainsi que sur les propriétés mécaniques.

3.2.2. Les avantages

Tout comme d'autres technologies de FA par lit de poudre, le procédé SLM présente de nombreux avantages pour la fabrication d'implants métalliques [55] : (i) il permet de fabriquer des structures creuses et complexes non réalisables avec des procédés traditionnels, (ii) il s'agit d'un procédé à coût réduit avec une perte minimale de matière, (iii) il permet de combiner différents matériaux, (iv) les matériaux en sortie ont des propriétés mécaniques similaires à celles obtenues via des procédés de fabrication traditionnel. Un des plus grands avantages reste la fabrication sur mesure de l'implant à partir de radiographies pour que celui-ci s'adapte à la morphologie du patient.

Des études ont évalué la fabrication de pièces en SLM à base de Ti pour une application biomédicale et ont prouvé l'adaptabilité du procédé en termes de biocompatibilité [62]. En effet, le procédé SLM présente l'avantage d'être utilisable pour de nombreux matériaux biocompatibles. On peut citer l'acier inoxydable 316L, des alliages de cobalt et de chrome, et aussi le titane et ses alliages. En s'intéressant au titane et à ses alliages, de nombreuses études ont montré que les implants en TA6V fabriqués via le procédé SLM permettent de respecter les spécifications encadrées par des normes ISO 10993-1:2018 et ASTM F1108 [54], [64]. Du point de vue de la densité, le TA6V obtenu par SLM présente une densité maximale observée de 99.8% sans aucun post traitement [87]. En termes de performances mécaniques, Sing et al [55] ont proposé une comparaison des différentes propriétés

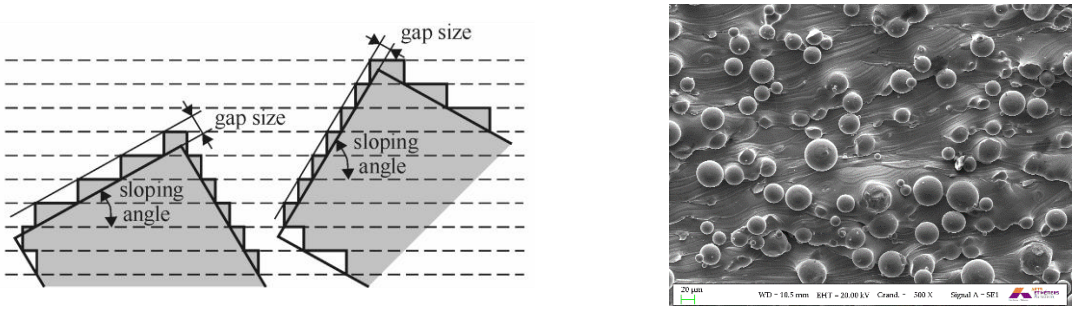
mécaniques des matériaux obtenus par SLM et moulage (voir le tableau 1.2), indiquant de meilleures performances pour le SLM, avec une limite élastique située entre 1110 et 1125 MPa et une limite à la rupture de 1250 – 1270 MPa.

Par ailleurs, de nombreuses études ont prouvé que la SLM permet de créer des structures lattices ayant des propriétés mécaniques proches de l'os évitant ainsi le phénomène de résorption osseuse apporté par une structure trop rigide [88], [89]. Il peut être ajouté que Wysocki et al [90] ont mené une étude cellulaire in vitro sur des lattices poreuses créés en titane pur, et ils ont montré une amélioration de la réponse cellulaire au sein des structures, et prouvé qu'un contrôle de la réponse cellulaire via des structures poreuses (de l'ordre de la centaine de µm) était possible. Enfin, des études ont été réalisées sur le TA6V mis en forme par SLM ; elles ont montré la faisabilité ainsi que des résultats prometteurs sur la recolonisation osseuse [91].

3.2.3. Les défauts induits par le procédé SLM

Malgré les nombreux avantages que présente le procédé SLM, des limitations existent, que ce soit en termes de volume fabricable ou de cadence de production. Cela s'explique en partie par la nouveauté du procédé, qui ne dispose pas de la maturité que possèdent les procédés de fabrication traditionnels.

Néanmoins, un des principaux challenges de la FA SLM reste l'état de surface obtenu en sortie de fabrication. En effet, les surfaces obtenues par FA SLM présentent un aspect irrégulier et la qualité de la surface varie significativement selon la paramétrie ou la machine employée. La rugosité créée varie de 5 à 50 μm selon les paramètres machines (la poudre, l'épaisseur de la couche, les paramètres de réglage des machines…) et les paramètres de conception (l'inclinaison, les supports utilisés…) [93], [94]. La première cause de rugosité provient de l'inclinaison de la surface. Herzog et al [95] expliquent que la rugosité est variable selon l'inclinaison de la surface, et excepté pour une inclinaison de 0°, il a été observé une forte rugosité à faible inclinaison (inférieur à 10°) suivi par une diminution de celle-ci jusqu'à 90° (figure 1.12a).



(a) (b)

Figure 1.12 : Description de la rugosité de surface obtenue par le procédé SLM. (a) Effet escalier ou d'inclinaison de la surface [92] ; (b) Rugosité créée par les particules emprisonnées sur une surface fabriquée avec une inclinaison de 90°.

La raison de cette évolution est l'effet escalier lors de la fabrication. La deuxième cause de rugosité est créée par la présence de particules de poudre métallique emprisonnées dans la surface à cause de la fusion partielle en périphérie. Ces particules au voisinage du bain de fusion mais en encore solide se retrouve emprisonnées dans la surface lors de sa solidification et cela engendre une autre rugosité venant s'ajouter à la rugosité déjà présente (figure 1.12b) [94]. La proportion de particules présentes à la surface va elle-même dépendre de l'orientation de la surface. Une troisième source de rugosité est liée à la fabrication par couche, entrainant des discontinuités de surfaces au niveau des jonctions entre les couches ; ces discontinuités créent une anisotropie topographique de surface. Ces rugosités sont la source de nombreuses problématiques qui vont diminuer les performances d'une pièce.

D’un point de vue mécanique, une diminution des propriétés mécaniques en fatigue a été observée sur les surfaces SLM présentant ces rugosités (limite élastique, résistance mécanique…), créant des concentrations de contraintes et des amorces de ruptures [96], [97]. Du point de vue de la mouillabilité de la surface, les surfaces fabriquées verticalement montrent des propriétés hydrophobes [90], ce qui est un frein à des applications médicales.

Pour améliorer ces états de surfaces, un post-traitement peut être appliqué ; ce traitement devra être adapté à la complexité de la géométrie. La prise en compte du traitement de surface adapté peut limiter la liberté géométrique de la pièce, et donc diminuer la liberté apportée par ce procédé de fabrication. Un questionnement sur le traitement de surface à réaliser est donc à prendre en compte en amont de la fabrication.

1.4. Conclusion

Pour résumer, la maitrise de l’ostéointégration est essentielle lors d’une implantation au sein d’un site osseux afin de garantir la robustesse de la connexion secondaire. L’ostéointégration se caractérise par une phase d’ostéogénèse avec au préalable la recolonisation cellulaire de la surface de l’implant par les cellules osseuses. Durant cette phase de recolonisation, les cellules sont en contact avec la surface de l’implant. Or, les propriétés surfaciques de l’implant, notamment la rugosité, conditionnent la réponse cellulaire. La rugosité doit donc être contrôlée par le procédé de fabrication, mais aussi par les modifications des surfaces via par traitements. Dans le cadre de notre étude, nous nous concentrons sur les surfaces obtenues par le procédé SLM avec des modifications de surface appropriées.

Références

[1] N. H. Nam et N. Kampa, « Bone Cell Function: A Review », *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, vol. 43, nº 3, p. 329-336, 2013.

[2] J. C. Gallagher et A. J. Sai, « Molecular biology of bone remodeling: implications for new therapeutic targets for osteoporosis », *Maturitas*, vol. 65, nº 4, p. 301-307, avr. 2010, doi: 10.1016/j.maturitas.2010.01.002.

[3] B. Charbonnier, « Développement de procédés de mise en forme et de caractérisation pour l'élaboration de biocéramiques en apatites phosphocalciques carbonatées. », phdthesis, Université de Lyon, 2016.

[4] D. H. Enlow, « Wolff's law and the factor of architectonic circumstance », *American Journal of Orthodontics*, vol. 54, nº 11, p. 803-822, nov. 1968, doi: 10.1016/0002-9416(68)90001-8.

[5] P. I. Brånemark, « Osseointegration and its experimental background », *J Prosthet Dent*, vol. 50, nº 3, p. 399-410, sept. 1983.

[6] S. Parithimarkalaignan et T. V. Padmanabhan, « Osseointegration: An Update », *J Indian Prosthodont Soc*, vol. 13, nº 1, p. 2-6, mars 2013, doi: 10.1007/s13191-013-0252-z.

[7] R. S. Jayesh et V. Dhinakarsamy, « Osseointegration », *J Pharm Bioallied Sci*, vol. 7, nº Suppl 1, p. S226-S229, avr. 2015, doi: 10.4103/0975-7406.155917.

[8] R. K. Schenk et D. Buser, « Osseointegration: a reality », *Periodontol. 2000*, vol. 17, p. 22-35, juin 1998, doi: 10.1111/j.1600-0757.1998.tb00120.x.

[9] S. Raghavendra, M. C. Wood, et T. D. Taylor, « Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature », *Int J Oral Maxillofac Implants*, vol. 20, nº 3, p. 425-431, juin 2005.

[10] P. S. Talreja, G. V. Gayathri, et D. S. Mehta, « Treatment of an early failing implant by guided bone regeneration using resorbable collagen membrane and bioactive glass », *J Indian Soc Periodontol*, vol. 17, nº 1, p. 131-136, 2013, doi: 10.4103/0972-124X.107490.

[11] M. Esposito, P. Thomsen, L. E. Ericson, et U. Lekholm, « Histopathologic observations on early oral implant failures », *Int J Oral Maxillofac Implants*, vol. 14, nº 6, p. 798-810, déc. 1999.

[12] D.-Y. Kang *et al.*, « Early implant failure: a retrospective analysis of contributing factors », *J Periodontal Implant Sci*, vol. 49, nº 5, p. 287-298, sept. 2019, doi: 10.5051/jpis.2019.49.5.287.

[13] B. Friberg et T. Jemt, « Rehabilitation of edentulous mandibles by means of osseointegrated implants: a 5-year follow-up study on one or two-stage surgery, number of implants, implant surfaces, and age at surgery », *Clin Implant Dent Relat Res*, vol. 17, nº 3, p. 413-424, juin 2015, doi: 10.1111/cid.12116.

[14] T. Jemt, M. Olsson, et V. Franke Stenport, « Incidence of First Implant Failure: A Retroprospective Study of 27 Years of Implant Operations at One Specialist Clinic », *Clin Implant Dent Relat Res*, vol. 17 Suppl 2, p. e501-510, oct. 2015, doi: 10.1111/cid.12277.

[15] T. Albrektsson, P. I. Brånemark, H. A. Hansson, et J. Lindström, « Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man », *Acta Orthop Scand*, vol. 52, nº 2, p. 155-170, 1981.

[16] U. Breine et P. I. Brånemark, « Reconstruction of alveolar jaw bone. An experimental and clinical study of immediate and preformed autologous bone grafts in combination with osseointegrated implants », *Scand J Plast Reconstr Surg*, vol. 14, nº 1, p. 23-48, 1980.

[17] T. Albrektsson, P. I. Brånemark, A. Eriksson, et J. Lindström, « The preformed autologous bone graft. An experimental study in the rabbit », *Scand J Plast Reconstr Surg*, vol. 12, nº 3, p. 215-223, 1978.

[18] M. Saini, Y. Singh, P. Arora, V. Arora, et K. Jain, « Implant biomaterials: A comprehensive review », *World J Clin Cases*, vol. 3, nº 1, p. 52-57, janv. 2015, doi: 10.12998/wjcc.v3.i1.52.

[19] R. L. Holt, M. M. Rosenberg, P. J. Zinser, et J. Ganeles, « A concept for a biologically derived, parabolic implant design », *Int J Periodontics Restorative Dent*, vol. 22, nº 5, p. 473-481, oct. 2002.

[20] J. P. Li *et al.*, « Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition », *Biomaterials*, vol. 28, nº 18, p. 2810-2820, janv. 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.02.020.

[21] K. Anselme *et al.*, « Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 49, nº 2, p. 155-166, févr. 2000.

[22] K. Anselme et M. Bigerelle, « Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion », *Acta Biomaterialia*, vol. 1, nº 2, p. 211-222, mars 2005, doi: 10.1016/j.actbio.2004.11.009.
[23] D. E. Discher, P. Janmey, et Y.-L. Wang, « Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate », *Science*, vol. 310, nº 5751, p. 1139-1143, nov. 2005, doi: 10.1126/science.1116995.
[24] L. Feller, Y. Jadwat, R. A. G. Khammissa, R. Meyerov, I. Schechter, et J. Lemmer, « Cellular Responses Evoked by Different Surface Characteristics of Intraosseous Titanium Implants », *BioMed Research International*, 2015. https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/171945/ (consulté le avr. 05, 2018).
[25] C. M. Lo, H. B. Wang, M. Dembo, et Y. L. Wang, « Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. », *Biophys J*, vol. 79, nº 1, p. 144-152, juill. 2000.
[26] M. Diez *et al.*, « Molding Micropatterns of Elasticity on PEG-Based Hydrogels to Control Cell Adhesion and Migration », *Advanced Engineering Materials*, vol. 13, nº 10, p. B395-B404, 2011, doi: 10.1002/adem.201080122.
[27] D. S. Gray, J. Tien, et C. S. Chen, « Repositioning of cells by mechanotaxis on surfaces with micropatterned Young's modulus », *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 66A, nº 3, p. 605-614, 2003, doi: 10.1002/jbm.a.10585.
[28] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, et D. E. Discher, « Matrix elasticity directs stem cell lineage specification », *Cell*, vol. 126, nº 4, p. 677-689, août 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.06.044.
[29] D. P. Byrne, D. Lacroix, J. A. Planell, D. J. Kelly, et P. J. Prendergast, « Simulation of tissue differentiation in a scaffold as a function of porosity, Young's modulus and dissolution rate: application of mechanobiological models in tissue engineering », *Biomaterials*, vol. 28, nº 36, p. 5544-5554, déc. 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.09.003.
[30] M. Ventre, F. Causa, et P. A. Netti, « Determinants of cell–material crosstalk at the interface: towards engineering of cell instructive materials », *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 9, nº 74, p. 2017-2032, sept. 2012, doi: 10.1098/rsif.2012.0308.
[31] K. Kim, B.-A. Lee, X.-H. Piao, H.-J. Chung, et Y.-J. Kim, « Surface characteristics and bioactivity of an anodized titanium surface », *J Periodontal Implant Sci*, vol. 43, nº 4, p. 198-205, août 2013, doi: 10.5051/jpis.2013.43.4.198.
[32] I.-C. Brie *et al.*, « Comparative in vitro study regarding the biocompatibility of titanium-base composites infiltrated with hydroxyapatite or silicatitanate », *J Biol Eng*, vol. 8, p. 14, juin 2014, doi: 10.1186/1754-1611-8-14.
[33] K.-Y. Hung, S.-C. Lo, C.-S. Shih, Y.-C. Yang, H.-P. Feng, et Y.-C. Lin, « Titanium surface modified by hydroxyapatite coating for dental implants », *Surface and Coatings Technology*, vol. 231, p. 337-345, sept. 2013, doi: 10.1016/j.surfcoat.2012.03.037.
[34] C. Piao, J. Winandy, et T. Shupe, « From hydrophilicity to hydrophobicity: A critical review: Part I. Wettability and surface behavior », *Wood and Fiber Science*, vol. 42, p. 490-510, oct. 2010.
[35] F. Rupp *et al.*, « A Review on the Wettability of Dental Implant Surfaces: Theoretical and Experimental Aspects », *Acta Biomater*, vol. 10, nº 7, p. 2894-2906, juill. 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.040.
[36] J. I. Rosales-Leal *et al.*, « Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 365, nº 1, p. 222-229, août 2010, doi: 10.1016/j.colsurfa.2009.12.017.
[37] Y. Li *et al.*, « Surface Wettability Switched Cell Adhesion and Detachment on Conducting Polymer Nanoarray », *Advanced Materials Interfaces*, vol. 3, nº 19, p. 1600598, oct. 2016, doi: 10.1002/admi.201600598.
[38] K. Anselme, « Osteoblast adhesion on biomaterials », *Biomaterials*, vol. 21, nº 7, p. 667-681, avr. 2000, doi: 10.1016/S0142-9612(99)00242-2.
[39] A. Wennerberg et T. Albrektsson, « Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review », *Clin Oral Implants Res*, vol. 20 Suppl 4, p. 172-184, sept. 2009, doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x.
[40] H.-H. Huang, C.-T. Ho, T.-H. Lee, T.-L. Lee, K.-K. Liao, et F.-L. Chen, « Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion », *Biomolecular Engineering*, vol. 21, nº 3, p. 93-97, nov. 2004, doi: 10.1016/j.bioeng.2004.05.001.

[41] K. Anselme et M. Bigerelle, « On the relation between surface roughness of metallic substrates and adhesion of human primary bone cells », *Scanning*, vol. 36, nº 1, p. 11-20, janv. 2014, doi: 10.1002/sca.21067.
[42] A. M. Vilardell *et al.*, « Osteoblastic cell response on high-rough titanium coatings by cold spray », *J Mater Sci: Mater Med*, vol. 29, nº 2, p. 19, févr. 2018, doi: 10.1007/s10856-018-6026-8.
[43] P.-H. Wu, A. Giri, S. X. Sun, et D. Wirtz, « Three-dimensional cell migration does not follow a random walk », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 111, nº 11, p. 3949-3954, mars 2014, doi: 10.1073/pnas.1318967111.
[44] F. Grizon, E. Aguado, G. Huré, M. F. Baslé, et D. Chappard, « Enhanced bone integration of implants with increased surface roughness: a long term study in the sheep », *Journal of Dentistry*, vol. 30, nº 5, p. 195-203, juill. 2002, doi: 10.1016/S0300-5712(02)00018-0.
[45] L. Feller, Y. Jadwat, R. A. G. Khammissa, R. Meyerov, I. Schechter, et J. Lemmer, « Cellular Responses Evoked by Different Surface Characteristics of Intraosseous Titanium Implants », *BioMed Research International*, 2015. https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/171945/ (consulté le avr. 05, 2018).
[46] J.-P. Kaiser, A. Reinmann, et A. Bruinink, « The effect of topographic characteristics on cell migration velocity », *Biomaterials*, vol. 27, nº 30, p. 5230-5241, oct. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.06.002.
[47] C. Wu, M. Chen, T. Zheng, et X. Yang, « Effect of surface roughness on the initial response of MC3T3-E1 cells cultured on polished titanium alloy », *Biomed Mater Eng*, vol. 26 Suppl 1, p. S155-164, 2015, doi: 10.3233/BME-151301.
[48] J.-P. Kaiser, A. Reinmann, et A. Bruinink, « The effect of topographic characteristics on cell migration velocity », *Biomaterials*, vol. 27, nº 30, p. 5230-5241, oct. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.06.002.
[49] G. Mendonça, D. B. S. Mendonça, F. J. L. Aragão, et L. F. Cooper, « Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography », *Biomaterials*, vol. 29, nº 28, p. 3822-3835, oct. 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.05.012.
[50] G. Ra *et al.*, « The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. », *Biomaterials*, vol. 32, nº 13, p. 3395-3403, mai 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.029.
[51] C. M. Abraham, « A Brief Historical Perspective on Dental Implants, Their Surface Coatings and Treatments », *Open Dent J*, vol. 8, p. 50-55, mai 2014, doi: 10.2174/1874210601408010050.
[52] R. Jain et D. Kapoor, « The dynamic interface: A review », *J Int Soc Prev Community Dent*, vol. 5, nº 5, p. 354-358, 2015, doi: 10.4103/2231-0762.165922.
[53] A. Behera, « Classification of Biomaterials used in Medicine », *International Journal of Advances in Applied Sciences (IJAAS)*, vol. 1, p. 125~129, sept. 2012.
[54] 14:00-17:00, « ISO 10993-1:2018 », *ISO*. http://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/06/89/68936.html (consulté le janv. 09, 2020).
[55] S. L. Sing, *Selective Laser Melting of Novel Titanium-Tantalum Alloy as Orthopaedic Biomaterial*. Springer Singapore, 2019.
[56] N. Sykaras, A. M. Iacopino, V. A. Marker, R. G. Triplett, et R. D. Woody, « Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. », *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 2000.
[57] K. Arvidson, M. Cottler-Fox, E. Hammarlund, et U. Friberg, « Cytotoxic effects of cobalt-chromium alloys on fibroblasts derived from human gingiva », *European Journal of Oral Sciences*, vol. 95, nº 4, p. 356-363, 1987, doi: 10.1111/j.1600-0722.1987.tb01853.x.
[58] H. Tschernitschek, L. Borchers, et W. Geurtsen, « Nonalloyed titanium as a bioinert metal--a review », *Quintessence Int*, vol. 36, nº 7-8, p. 523-530, août 2005.
[59] G. Ravnholt, « Corrosion current and pH rise around titanium coupled to dental alloys », *Scand J Dent Res*, vol. 96, nº 5, p. 466-472, oct. 1988, doi: 10.1111/j.1600-0722.1988.tb01585.x.
[60] L.-C. Zhang et L.-Y. Chen, « A Review on Biomedical Titanium Alloys: Recent Progress and Prospect », *Advanced Engineering Materials*, vol. 21, nº 4, p. 1801215, 2019, doi: 10.1002/adem.201801215.

[61] O. Sinitsyna, P. Paralikar, R. Pandit, et M. Rai, « Platinum in Biomedical Applications », in *Biomedical Applications of Metals*, M. Rai, A. P. Ingle, et S. Medici, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2018, p. 151-165.
[62] L.-C. Zhang, H. Attar, M. Calin, et J. Eckert, « Review on manufacture by selective laser melting and properties of titanium based materials for biomedical applications », *Materials Technology*, vol. 31, nº 2, p. 66-76, janv. 2016, doi: 10.1179/1753555715Y.0000000076.
[63] R. B. Koca, O. Güven, M. S. Çelik, et E. Fıratlı, « Wetting properties of blood lipid fractions on different titanium surfaces », *Int J Implant Dent*, vol. 6, mai 2020, doi: 10.1186/s40729-020-00213-x.
[64] F04 Committee, « Specification for Titanium-6Aluminum-4Vanadium Alloy Castings for Surgical Implants (UNS R56406) », ASTM International. doi: 10.1520/F1108-97A.
[65] P. I. Brånemark *et al.*, « Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period », *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*, vol. 16, p. 1-132, 1977.
[66] A. Wennerberg, « The importance of surface roughness for implant incorporation », *International Journal of Machine Tools and Manufacture*, vol. 38, nº 5, p. 657-662, mai 1998, doi: 10.1016/S0890-6955(97)00114-4.
[67] L. Hoff, « Influence des traitements de surface implantaire sur l'accélération de l'ostéo-intégration », other, Université de Lorraine, 2012.
[68] Z. Ur rahman, L. Pompa, et W. Haider, « Erratum to: Influence of Electropolishing and Magnetoelectropolishing on Corrosion and Biocompatibility of Titanium Implants », *Journal of Materials Engineering and Performance*, vol. 23, août 2014, doi: 10.1007/s11665-014-1205-3.
[69] D. Buser *et al.*, « Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface », *J. Dent. Res.*, vol. 83, nº 7, p. 529-533, juill. 2004, doi: 10.1177/154405910408300704.
[70] S. Mändl *et al.*, « Investigation on plasma immersion ion implantation treated medical implants », *Biomolecular Engineering*, vol. 19, nº 2, p. 129-132, août 2002, doi: 10.1016/S1389-0344(02)00025-4.
[71] S. Ban, Y. Iwaya, H. Kono, et H. Sato, « Surface modification of titanium by etching in concentrated sulfuric acid », *Dent Mater*, vol. 22, nº 12, p. 1115-1120, déc. 2006, doi: 10.1016/j.dental.2005.09.007.
[72] D. Buser, R. K. Schenk, S. Steinemann, J. P. Fiorellini, C. H. Fox, et H. Stich, « Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 25, nº 7, p. 889-902, juill. 1991, doi: 10.1002/jbm.820250708.
[73] M. Lelli *et al.*, « Different corrosive effects on hydroxyapatite nanocrystals and amine fluoride-based mouthwashes on dental titanium brackets: a comparative in vitro study », *Int J Nanomedicine*, vol. 8, p. 307-314, 2013, doi: 10.2147/IJN.S35245.
[74] B.-S. Kim, J. S. Kim, Y. M. Park, B.-Y. Choi, et J. Lee, « Mg ion implantation on SLA-treated titanium surface and its effects on the behavior of mesenchymal stem cell », *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 33, nº 3, p. 1554-1560, avr. 2013, doi: 10.1016/j.msec.2012.12.061.
[75] R. A. Jaffin et C. L. Berman, « The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis », *J. Periodontol.*, vol. 62, nº 1, p. 2-4, janv. 1991, doi: 10.1902/jop.1991.62.1.2.
[76] R. Zahran, J. I. Rosales Leal, M. A. Rodríguez Valverde, et M. A. Cabrerizo Vílchez, « Effect of Hydrofluoric Acid Etching Time on Titanium Topography, Chemistry, Wettability, and Cell Adhesion », *PLoS One*, vol. 11, nº 11, nov. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0165296.
[77] S. F. Lamolle, M. Monjo, M. Rubert, H. J. Haugen, S. P. Lyngstadaas, et J. E. Ellingsen, « The effect of hydrofluoric acid treatment of titanium surface on nanostructural and chemical changes and the growth of MC3T3-E1 cells », *Biomaterials*, vol. 30, nº 5, p. 736-742, févr. 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.052.
[78] C. Costa de Almeida, L. Á. Sena, M. Pinto, C. A. Muller, J. H. Cavalcanti Lima, et G. de A. Soares, « In Vivo Characterization of Titanium Implants Coated with Synthetic Hydroxyapatite by Electrophoresis », *Brazilian Dental Journal*, vol. 16, nº 1, p. 75-81, avr. 2005, doi: 10.1590/S0103-64402005000100013.
[79] C.-W. Kang et F.-Z. Fang, « State of the art of bioimplants manufacturing: part I », *Adv. Manuf.*, vol. 6, nº 1, p. 20-40, mars 2018, doi: 10.1007/s40436-017-0207-4.

[80] H. A. Zaman, S. Sharif, D.-W. Kim, M. H. Idris, M. A. Suhaimi, et Z. Tumurkhuyag, « Machinability of Cobalt-based and Cobalt Chromium Molybdenum Alloys - A Review », *Procedia Manufacturing*, vol. 11, p. 563-570, janv. 2017, doi: 10.1016/j.promfg.2017.07.150.
[81] K. V. Wong et A. Hernandez, « A Review of Additive Manufacturing », *ISRN Mechanical Engineering*, 2012. https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/208760/ (consulté le mai 12, 2020).
[82] T. D. Ngo, A. Kashani, G. Imbalzano, K. T. Q. Nguyen, et D. Hui, « Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges », *Composites Part B: Engineering*, vol. 143, p. 172-196, juin 2018, doi: 10.1016/j.compositesb.2018.02.012.
[83] Mohd. Javaid et A. Haleem, « Additive manufacturing applications in medical cases: A literature based review », *Alexandria Journal of Medicine*, vol. 54, nº 4, p. 411-422, déc. 2018, doi: 10.1016/j.ajme.2017.09.003.
[84] L. Jiao, Z. Y. Chua, S. K. Moon, J. Song, G. Bi, et H. Zheng, « Femtosecond Laser Produced Hydrophobic Hierarchical Structures on Additive Manufacturing Parts », *Nanomaterials (Basel)*, vol. 8, nº 8, août 2018, doi: 10.3390/nano8080601.
[85] T. Ishimoto, K. Hagihara, K. Hisamoto, S.-H. Sun, et T. Nakano, « Crystallographic texture control of beta-type Ti–15Mo–5Zr–3Al alloy by selective laser melting for the development of novel implants with a biocompatible low Young's modulus », *Scripta Materialia*, vol. 132, p. 34-38, avr. 2017, doi: 10.1016/j.scriptamat.2016.12.038.
[86] C. Y. Yap *et al.*, « Review of selective laser melting: Materials and applications », *Applied Physics Reviews*, vol. 2, nº 4, p. 041101, déc. 2015, doi: 10.1063/1.4935926.
[87] B. Vandenbroucke et J. Kruth, « Selective laser melting of biocompatible metals for rapid manufacturing of medical parts », *Rapid Prototyping Journal*, vol. 13, nº 4, p. 196-203, janv. 2007, doi: 10.1108/13552540710776142.
[88] A. Barbas, A.-S. Bonnet, P. Lipinski, R. Pesci, et G. Dubois, « Development and mechanical characterization of porous titanium bone substitutes », *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, vol. 9, p. 34-44, janv. 2012, doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.01.008.
[89] S. C. Cosma et D. Leordan, « Research on Improving the Manufacturing of Titanium Medical Implants, by SLM », *BALNEO*, vol. 6, nº 4, p. 211-216, déc. 2015, doi: 10.12680/balneo.2015.1107.
[90] B. Wysocki *et al.*, « Post Processing and Biological Evaluation of the Titanium Scaffolds for Bone Tissue Engineering », *Materials (Basel)*, vol. 9, nº 3, mars 2016, doi: 10.3390/ma9030197.
[91] M. Elsayed, M. Ghazy, Y. Youssef, et K. Essa, « Optimization of SLM process parameters for Ti6Al4V medical implants », *Rapid Prototyping Journal*, vol. 25, nº 3, p. 433-447, avr. 2019, doi: 10.1108/RPJ-05-2018-0112.
[92] J. Kruth, B. Vandenbroucke, J. V. Vaerenbergh, et I. Naert, « Digital manufacturing of biocompatible metal frameworks for complex dental prostheses by means of SLS/SLM », 2005.
[93] M. Ahamed, « Surface roughness justification in additive manufacturing », avr. 2018.
[94] B. Vayssette, N. Saintier, C. Brugger, M. Elmay, et E. Pessard, « Surface roughness of Ti-6Al-4V parts obtained by SLM and EBM: Effect on the High Cycle Fatigue life », *Procedia Engineering*, vol. 213, p. 89-97, 2018, doi: 10.1016/j.proeng.2018.02.010.
[95] P. Karlow Herzog, « Surface characterization in Additive Manufacturing - An empirical study of angular dependency », 2018.
[96] B. Vayssette, N. Saintier, C. Brugger, et M. El May, « Surface roughness effect of SLM and EBM Ti-6Al-4V on multiaxial high cycle fatigue », *Theoretical and Applied Fracture Mechanics*, vol. 108, p. 102581, août 2020, doi: 10.1016/j.tafmec.2020.102581.
[97] J. Gockel, L. Sheridan, B. Koerper, et B. Whip, « The influence of additive manufacturing processing parameters on surface roughness and fatigue life », *International Journal of Fatigue*, vol. 124, p. 380-388, juill. 2019, doi: 10.1016/j.ijfatigue.2019.03.025.

Chapitre 2 : Caractérisation de la rugosité des surfaces SLM

Sommaire

2.1. Fabrication des éprouvettes SLM et caractérisation de la rugosité 32
2.1.1. Propriétés de la poudre de TA6V 32
2.1.2. Fabrication des éprouvettes SLM 33
2.1.3. Caractérisation de la rugosité 34
2.1.3.1. Définition de la rugosité 34
2.1.3.2. Mesure de la rugosité 35
2.1.4. Caractérisation de la mouillabilité 37
2.1.4.1. Définition de la mouillabilité 37
2.1.4.2. Description des modèles de mouillabilité 38
2.1.4.3. Mesure de la mouillabilité 39
2.2. Analyse de la rugosité et de la mouillabilité de surfaces obtenues par SLM 40
2.2.1. Description de la rugosité de surfaces obtenues par SLM 40
2.2.2. Evolution de la rugosité selon l'inclinaison de la surface 42
2.2.2.1. Protocole expérimental 42
2.2.2.2. Morphologie de la surface selon les différentes inclinaisons 43
2.2.2.3. Effet de l'inclinaison de fabrication des éprouvettes sur la rugosité 45
2.2.2.4. Relation entre la mouillabilité et la rugosité 50
2.2.2.5. Discussion sur l'influence de l'inclinaison de la surface extérieure 52
2.2.3. Caractérisation du matériau TA6V obtenu par SLM et étude de l'influence du procédé sur la mouillabilité 52
2.2.3.1. SLM et microstructure 52
2.2.3.2. Protocole expérimental 53
2.2.3.3. Résultats et discussion 53
2.2.4. Remarques générales 55
2.3. Traitement de surfaces issues du procédé SLM par polissage chimique 56
2.3.1. Traitement de surface par polissage chimique 56
2.3.2. Analyse des paramètres du polissage chimique : composition et temps d'immersion 56
2.3.2.1. Matériels et méthodes 56
2.3.2.2. Morphologie 57
2.3.2.3. Paramètres de rugosité 59
2.3.2.4. Perte de matière 60
2.3.2.5. Mouillabilité 61
2.2.4. Polissage chimique d'une surface plane 63

2.2.4.1. Matériels et méthodes 63
2.2.4.2. Morphologie et paramètres de rugosité 64
2.2.4.3. Mouillabilité 65
2.3.3. Polissage chimique pour différentes inclinaisons de fabrication 66
2.3.3.1. Matériels et méthodes 66
2.3.3.2. Morphologie et paramètres de rugosité 66
2.3.3.3. Perte de matière 67
2.3.3.4. Mouillabilité 67
2.3.4. Discussion de l'impact du polissage chimique 68
2.3.4.4. Choix des paramètres du polissage chimique 72
2.3.4.5. Limites de l'étude 72
2.4. Traitement de surfaces issues de procédé SLM par sablage 72
2.4.1. Description du procédé de sablage 72
2.4.2. Matériels et méthode 73
2.4.3. Résultats 73
2.4.3.1. Morphologie 74
2.4.3.2. Paramètres de rugosité 75
2.4.3.3. Mouillabilité 75
2.4.4. Discussion et limitations 76
2.5. Conclusion 77
Références 77

Le but de ce deuxième chapitre est d'élaborer des surfaces biocompatibles en termes de topographie et rugosité. Pour cela, des éprouvettes en alliage biocompatible TA6V issues du procédé FA SLM ont été fabriquées et analysées. Plus spécifiquement, la biocompatibilité des surfaces brutes ainsi que celle des surfaces ayant subi différents traitements a été évaluée afin d'améliorer la qualité en vue d'une application médicale.

Dans ce chapitre, les essais expérimentaux suivant seront réalisés :

- Caractérisation de la rugosité de la surface à l'aide d'un profilomètre laser, d'un microscope optique ainsi qu'un microscope électronique à balayage
- Quantification de la mouillabilité via l'utilisation d'un banc de mouillage

2.1. Fabrication des éprouvettes SLM et caractérisation de la rugosité

2.1.1. Propriétés de la poudre de TA6V

Le TA6V est un alliage constitué de titane, d'aluminium (entre 5% et 7%), et de vanadium (de 3% à 4.5%), avec des traces de carbone, de fer, d'oxygène, et d'azote [1]. Comme il a été vu précédemment, il s'agit de l'alliage de titane le plus utilisé dans l'industrie (aéronautique, aérospatiale, biomédicale…). Il représente plus de 50% de l'ensemble des alliages de titane présents sur le marché. Sa création remonte aux années 1950 aux Etats-Unis et son succès s'explique par le bon compromis qu'il réalise entre résistance mécanique et ténacité (capacité du matériau à résister à la propagation d'une fissure), une densité faible et une excellente résistance à la corrosion. Ses propriétés mécaniques essentielles sont répertoriées au sein du tableau 2.1 [1, p. 04].

Propriétés mécaniques	Valeur
Dureté (Hv)	300 – 400
Module de Young (GPa)	110 – 140
Limite élastique (MPa)	800 – 1100
Résistance maximale à la traction (MPa)	900 – 1200
Elongation à la rupture (%)	13 – 16
Ténacité (MPa $\sqrt{m}$)	33 – 110
Masse volumique (kg.m^{-3})	4430

Tableau 2.1 : Propriétés physiques de l'alliage TA6V [1, p. 04].

En termes de microstructure, le TA6V est un alliage α – β qui présente deux formes allotropiques [2]. Sa forme α est stable en-dessous de 882 °C alors que la phase β est stable au-dessus de 882 °C. Avec une température de fusion de 1660 °C, cet alliage peut être utilisé pour des applications à hautes températures. De plus, la présence d'aluminium renforce la phase β et permet de réduire la densité de l'alliage alors que le vanadium améliore la ductilité. Généralement, le TA6V présente trois microstructures, selon les procédés de fabrication utilisés et les traitements appliqués : (i) martensitique ; (ii) lamellaire ; (iii) équiaxe (aucune orientation préférentielle des grains n'est privilégiée dans l'espace). Parmi ces microstructures, la microstructure martensitique est majoritairement obtenue via le procédé SLM.

Pour la fabrication des éprouvettes, le matériau employé est du TA6V grade 5 sous la forme de poudre, avec des particules ayant une taille moyenne de 30 µm. La poudre utilisée est de la poudre recyclée (à l'issue des travaux de thèse de B. Vaysette [3] dont la composition est décrite en tableau 2.2). Elle a donc pu subir 10 à 30 passages de recyclage, étape durant laquelle la poudre non fusionnée

est tamisée puis récupérée. Le recyclage peut avoir un effet sur les performances mécaniques de la pièce. Cependant, aucune information ne met en lumière une influence significative sur la surface du matériau [4]. Afin de réduire la variabilité sur l'état de surface des échantillons, l'ensemble des éprouvettes est fabriqué au sein d'un même cycle.

	Ti	**Al**	**V**	**C**	**Fe**	**O**	**N**
(% en masse)	Base	5.5 – 6.75	3.5 – 4.5	≤0.08	≤0.25	≤0.2	≤0.05

Tableau 2.2 : Composition chimique de la poudre de TA6V.

2.1.2. Fabrication des éprouvettes SLM

Les éprouvettes SLM cylindriques, appelées aussi pastilles, sont produites par la machine SLM solution SLM280 (2.0 SLM SOLUTIONS GROUP AG). La géométrie des éprouvettes, standard pour les tests biologiques, s'adapte à la forme et à la dimension des puits de cellules (figure 2.1) utilisés pour les tests biologiques qui seront présentés en Chapitre 3.

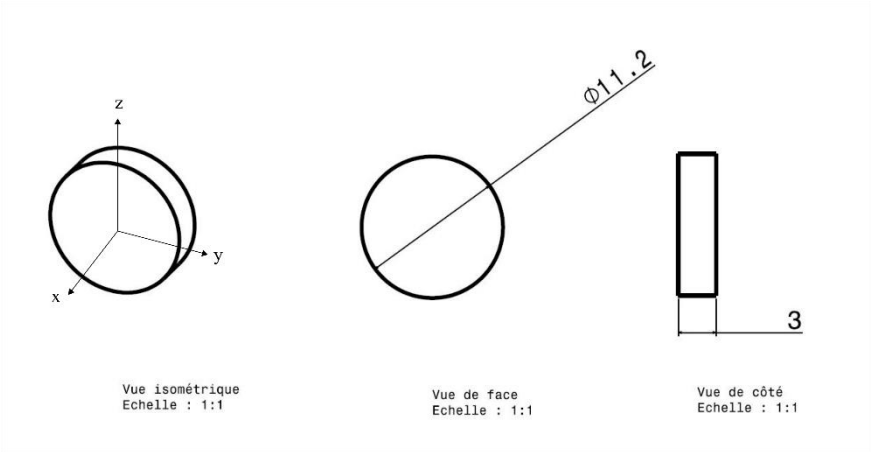


Figure 2.1 : Dimensions de l'éprouvette cylindrique.

Au sein de notre étude, nous avons sélectionné les paramètres de fabrication des éprouvettes SLM par défaut. Les éprouvettes sont fabriquées avec les paramètres machine présentés dans le tableau 2.3. Ces paramètres de fabrication ont été déterminé dans le cadre de la thèse de B. Vaysette [3] afin d'obtenir des propriétés mécaniques et matériaux optimales.

Bords et contour		Cœur de la couche	
Puissance *P* (W)	150	Puissance *P* (W)	275
Vitesse de passage *V* (mm/s)	450	Vitesse de passage *V* (mm/s)	1100
Distance de passage *H* (mm)	0.08	Distance de passage *H* (mm)	0.12
Epaisseur de couche *e* (mm)	0.03	Epaisseur de couche *e* (mm)	0.03
Densité énergétique (kJ/mm^3)	138.9	Densité énergétique (kJ/mm^3)	69.4

Tableau 2.3 : Paramètres SLM nominales pour les bords, les contours, et le cœur de la couche.

Pour chaque couche, deux bordures externes délimitant la section de la pièce sont fabriquées, suivies par un contour interne (voir la figure 2.2). Le cœur de la couche est alors lasé selon un hachurage rectiligne suivant la distance de passage, avec une orientation de 67° par rapport à la couche précédente.

Chaque spécimen est fabriqué sur des supports de hauteur 4 mm afin de permettre l'évacuation thermique ainsi que le détachement des éprouvettes du plateau de fabrication.

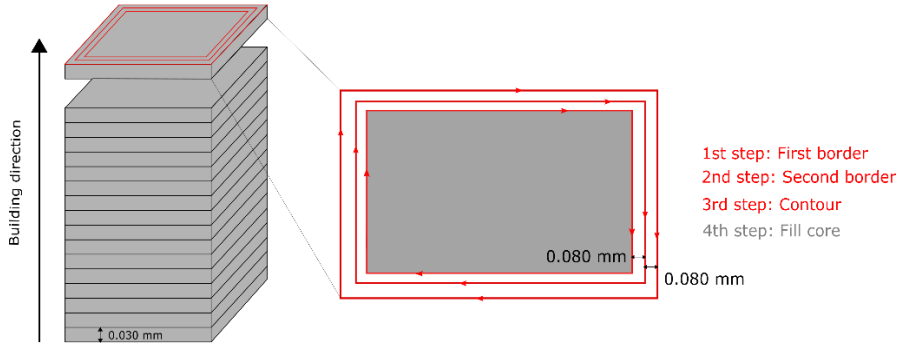


Figure 2.2 : Description de la fabrication d'une couche.

L'ensemble des éprouvettes est fabriqué au sein du même batch afin de minimiser les variations liées au recyclage de la poudre (voir figure 2.3). Chaque éprouvette est disposée avec un espacement de 5 mm par rapport aux autres éprouvettes afin d'éviter les influences entre les pièces au moment de la fabrication.

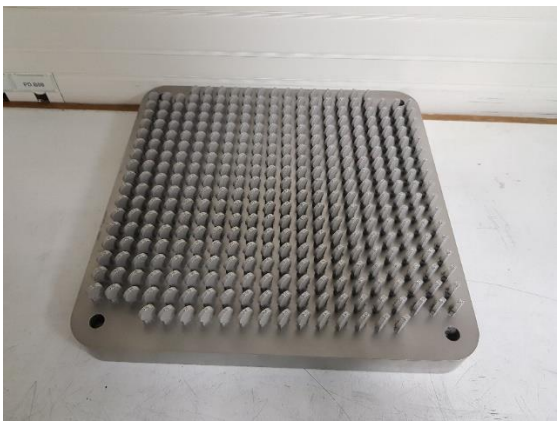


Figure 2.3 : Plateau de fabrication des éprouvettes (plateau de dimension 280 mm X 280 mm).

2.1.3. Caractérisation de la rugosité

2.1.3.1. Définition de la rugosité

La rugosité d'une pièce définit généralement les défauts géométriques (ou écarts de dimension) intervenant durant la fabrication. Celle-ci peut être décomposée selon 4 niveaux [5] :

- Les écarts de forme. Ces écarts de formes et de géométries par rapport à la forme nominale de la pièce sont généralement liés au procédé lui-même par rapport à la forme nominale de la pièce. Les défauts de planéité ou de circularité entrent dans cette catégorie.
- Les écarts d'ondulation (figure 2.4). Il s'agit d'écarts complémentaires à la rugosité, mais de plus grandes longueurs d'ondes, se situant entre l'échelle microscopique et macroscopique. Ces écarts peuvent être généralement dus à la répétition d'un certain paterne lors de la fabrication, ou à un défaut de la machine-outil lors de la phase de finition.

- Les écarts de rugosité périodiques (figure 2.4). Il s'agit de défauts micro géométriques de la surface pouvant prendre la forme de stries ou de sillons périodiques. Ces défauts sont inhérents aux procédés de fabrication ainsi qu'au procédé de finition.
- Les écarts de rugosité apériodiques. Il s'agit de micro écarts géométriques ponctuels présents à la surface. Ceux-ci peuvent prendre la forme d'entailles ou autres.

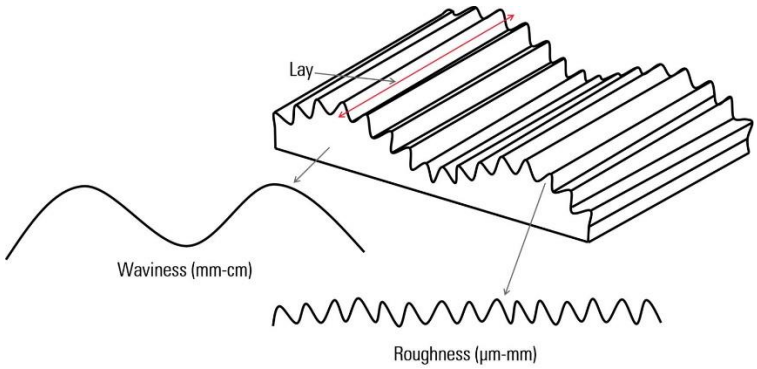


Figure 2.4 : Description de la différence entre les écarts d'ondulation et la rugosité [https://www.leica-microsystems.com/].

2.1.3.2. Mesure de la rugosité

Afin de caractériser la rugosité, différentes méthodes et paramètres sont définis et répertoriés au sein de la norme NF EN ISO 4287 [6] dans le cas d'un profil 1D et ISO 25178-2 [7] dans le cas d'un profil 2D.

- La rugosité arithmétique R_a (ou S_a pour une surface) est définie par la moyenne des écarts absolus par rapport à la ligne moyenne (i.e. la moyenne des élévations du profil Z_{mean}), que ce soit pour un profil 1D de longueur l ou pour une surface de dimension (l_x, l_y) :

$$R_a = \frac{1}{l}\int_0^l |Z(x)|dx \tag{2.1}$$

$$S_a = \frac{1}{l_x\, l_y}\int_0^{l_y}\int_0^{l_x} |Z(x,y)|dxdy \tag{2.2}$$

- La rugosité quadratique moyenne R_q (ou S_q en pour une surface) est définie par la moyenne quadratique des écarts absolus à la ligne moyenne par rapport un profil 1D de longueur l ou pour une surface de dimension (l_x, l_y) :

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{l}\int_0^l |Z(x)|^2 dx} \tag{2.3}$$

$$S_a = \sqrt{\frac{1}{l_x\, l_y}\int_0^{l_y}\int_0^{l_x} |Z(x,y)|dxdy} \tag{2.4}$$

- La hauteur maximale du profil, nommée R_t (ou S_t), définie par rapport à la ligne moyenne via le paramètre de profondeur maximale R_v (ou S_v) et le paramètre de hauteur maximale de pics R_p (ou S_p) :

$$R_p = Z_{max} - Z_{mean} \tag{2.5}$$

$$R_v = |Z_{mean} - Z_{min}| \tag{2.6}$$

$$R_t = Z_{max} - Z_{min} \tag{2.7}$$

- L'asymétrie de la surface R_{sk} (ou S_{sk}) mesure le manque de symétrie de la distribution d'élévation par rapport à la ligne moyenne. Du point de vue de la rugosité, une valeur de R_{sk} positive définit une distribution d'écarts placés supérieurement par rapport à la ligne moyenne, définissant donc une surface composée en majorité de pics. Au contraire une valeur de R_{sk} négative définit une distribution d'écarts biaisée inférieurement par rapport à la moyenne, définissant donc une surface composée en majorité de « creux ». Ce paramètre est calculé de la manière suivante :

$$R_{sk} = \frac{1}{{R_q}^3} \frac{1}{l} \int_0^l |Z(x)|^3 dx \tag{2.8}$$

$$S_{sk} = \frac{1}{{R_q}^3} \frac{1}{l_x\, l_y} \int_0^{l_y} \int_0^{l_x} |Z(x,y)|^3 dxdy \tag{2.9}$$

- Le ratio de surface développée S_{dr}, définit l'ajout de surface supplémentaire apporté par la rugosité via le calcul du ratio entre l'aire de la surface réelle et l'aire de la surface projetée dans le plan XY. Celui-ci se définit de la manière suivante :

$$S_{dr} = \frac{1}{A} \iint_A \left(\sqrt{\left[1 + \left(\frac{\partial z(x,y)}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial z(x,y)}{\partial y}\right)^2\right]} - 1 \right) dxdy \tag{2.10}$$

Au sein de notre étude, le paramètre S_{dr} est modifié afin d'être supérieur ou égal à 1. Il prend alors la forme suivante :

$$S_{dr} = \frac{1}{A} \iint_A \left(\sqrt{\left[1 + \left(\frac{\partial z(x,y)}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial z(x,y)}{\partial y}\right)^2\right]} \right) dxdy \tag{2.11}$$

Dans le cas de la fabrication SLM, les surfaces affichent une anisotropie créée par la fabrication couche par couche. Afin de caractériser cette anisotropie, certains paramètres peuvent être déterminés, par le calcul au préalable d'une fonction d'autocorrélation. Cette fonction détermine les similitudes entre une surface, et cette même surface translatée dans le plan de (t_x, t_y). Cette fonction prend la forme suivante :

$$f_{ACF}(t_x\,, t_y) = \frac{\iint_A z(x,y) z(x - t_x, y - t_y) dxdy}{\iint_A z(x,y) z(x,y) dxdy} \tag{2.12}$$

Via cette fonction, l'uniformité de la surface peut donc être déterminée via le calcul du paramètre de ratio de texture S_{tr}, défini comme étant le rapport entre la distance dans la direction, où f_{ACF}

décroit le plus rapidement sur la distance dans la direction, où f_{ACF} décroit le plus lentement. Ce ratio S_{tr} est une mesure de la longueur d'onde de la surface. Celui-ci prend la forme suivante :

$$S_{tr} = \frac{R_{min}}{R_{max}} = \frac{\min\limits_{t_x, t_y \in \mathrm{R}} \sqrt{{t_x}^2 + {t_y}^2}}{\max\limits_{t_x, t_y \in \mathrm{Q}} \sqrt{{t_x}^2 + {t_y}^2}} \quad o\grave{u} \quad \begin{cases} R = (t_x, t_y) \; tels \; que \; f_{ACF}(t_x, t_y) \leq s \\ Q = (t_x, t_y) \; tels \; que \; f_{ACF}(t_x, t_y) \geq s^* \end{cases} \tag{2.13}$$

Au sein de notre étude, une valeur seuil arbitraire de S_{tr} est définie, $S_{tr,\,seuil} = 0.5$. Si $S_{tr} < S_{tr,seuil}$, la surface est considérée comme affichant une anisotropie de surface. Dans le cas contraire, la surface est considérée comme homogène.

Le paramètre R_{min} utilisé pour déterminer le paramètre S_{tr} fournit également une indication sur le contenu spectral de la surface, notamment sa longueur d'onde. Ainsi, le paramètre spatial S_{al} (exprimé en µm) est défini sous la forme :

$$S_{tr} = R_{min} = \min_{t_x, t_y \in \mathrm{R}} \sqrt{{t_x}^2 + {t_y}^2} \quad o\grave{u} \; R = (t_x, t_y) \; tels \; que \; f_{ACF}(t_x, t_y) \leq s \tag{2.14}$$

L'ensemble des paramètres de rugosité sont estimés via l'utilisation du logiciel *Gwyddion* sur les données 3D de surface obtenues par le rugosimètre optique *Altisurf500* (AltiMet, France) en mode confocal (figure 2.5.a). Par ailleurs, des mesures d'élévations de surfaces sont réalisées via un rugosimètre par contact comme étude préliminaire (figure 2.5.b).

(a) *(b)*

Figure 2.5. : Equipements utilisés pour l'étude de l'état de surface. (a) Rugosimètre 3D laser. (b) Rugosimètre par contact.

2.1.4. Caractérisation de la mouillabilité

2.1.4.1. Définition de la mouillabilité

La mouillabilité définit la capacité d'un liquide à maintenir le contact avec une surface solide, via des interactions moléculaires résultant d'un équilibre thermodynamique [8], [9]. Cette propriété permet de définir l'adhésion liquide/surface, qui joue un rôle important dans la biocompatibilité [10]–[13]. D'un point de vue thermodynamique, cette adhérence se définit par le travail d'adhésion W_a nécessaire pour de garantir l'équilibre entre les phase liquide, solide et gazeuse, se caractérisant par un angle de contact θ (figure 2.6).

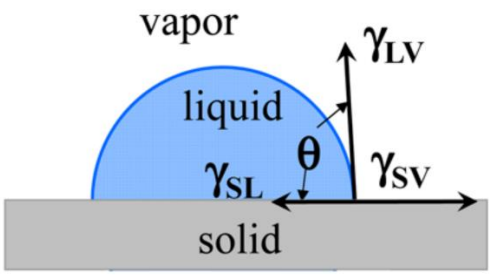


Figure 2.6 : Schéma de l'angle de contact et de l'équilibre thermodynamique des phases solide, liquide et gazeuse [9].

En définissant Υ_{LV} l'énergie de l'interface liquide/vapeur, Υ_{SL} l'énergie de l'interface liquide/solide, et Υ_{SV} l'énergie de l'interface solide/vapeur, le travail d'adhésion de la surface peut être déterminée à partir de la relation de Dupré [9] :

$$W_a = \Upsilon_{LV} + \Upsilon_{SV} - \Upsilon_{SL} \tag{2.15}$$

Ainsi, la relation suivante est obtenue à l'équilibre et appelée équation de Young :

$$\Upsilon_{SV} = \Upsilon_{SL} + \Upsilon_{LV}\, cos(\vartheta) \tag{2.16}$$

Généralement, une surface hydrophile est définie par un angle de contact aqueux θ_{eau} entre une goutte d'eau et la surface inférieur à 90°. Au contraire, une surface hydrophobe est définie par un θ_{eau} supérieur à 90°. Afin de faciliter la caractérisation d'une surface se trouvant à la frontière entre hydrophile et hydrophobe, une surface « équiphilique » est définie pour un θ_{eau} se situant au sein de l'intervalle [85° - 95°]. La surface est considérée comme présentant un bon mouillage (ou un mouillage efficace) pour θ_{eau} < 85°.

2.1.4.2. Description des modèles de mouillabilité

L'équation de Young part de l'hypothèse que la surface solide est rigide, parfaitement plane, physiquement et chimiquement inerte. En réalité, la surface présente une hétérogénéité chimique et n'est jamais parfaitement plane [14], [15] ; elle présente un niveau de rugosité et des topographies spécifiques. Ces aspects sont généralement pris en compte au sein de modèles de mouillabilité. Deux théories sont utilisées afin de déterminer correctement la mouillabilité de la surface : la théorie de Wenzel et la théorie de Cassie-Baxter (figure 2.7).

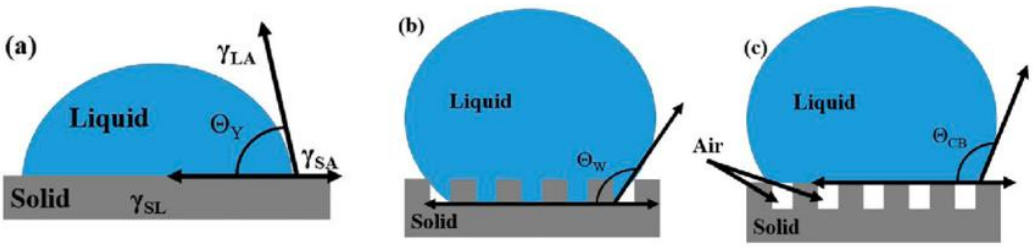


Figure 2.7 : Schéma d'une goutte sur une surface selon les modèles de mouillabilité (de gauche à droite : (a) modèle parfait, (b) modèle de Wenzel, (c) modèle de Cassie-Baxter [16].

Dans la théorie de Wenzel [17], la goutte est supposée en contact total avec la surface et les hétérogénéités topographiques de la surface sont supposées amplifier la mouillabilité qui serait obtenue sur une surface idéale équivalente. De ce fait, ce type de modèle est plus appliqué dans le cadre d'hétérogénéités topographiques. Le modèle établit à l'équilibre une relation entre l'angle de contact

mesuré, appelé l'angle de contact apparent θ_{app}, l'angle de contact de Young θ_Y, et le ratio de surface développée S_{dr} sous la forme suivante :

$$cos(\theta_{app}) = S_{dr}\ cos(\theta_\gamma) \tag{2.17}$$

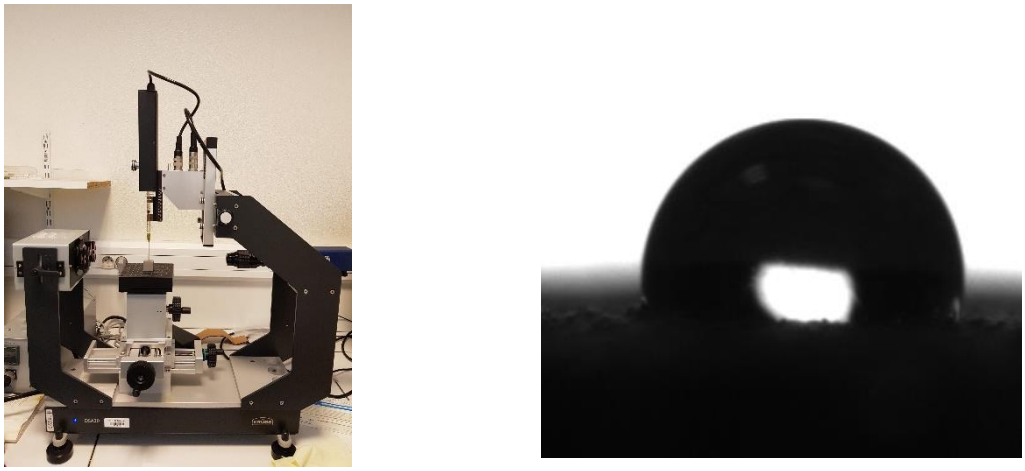
Ainsi, sachant que S_{dr} est toujours supérieur ou égal à 1, cela engendre donc une amplification de la mouillabilité sur une surface lisse. De ce fait, une surface lisse hydrophobe apparait encore plus hydrophobe en présence de rugosité. Au contraire, une surface lisse hydrophile en présence de rugosité apparait encore plus hydrophile. La théorie de Cassie-Baxter [18] permet de modéliser le comportement en mouillabilité d'une goutte sur une surface hétérogène physiquement et/ou chimiquement. Cette hétérogénéité peut résulter d'une composition chimique de surface hétérogène, ou de l'emprisonnement de "poches" d'air entre la goutte et la surface. Du point de vue du modèle, cela se traduit par la décomposition de l'aire sous la goutte en deux parties distinctes : la fraction surfacique de la goutte en contact avec la surface solide f_1, et la fraction surfacique de la goutte en contact avec les poches d'air f_2. Ainsi, à l'équilibre, la relation entre l'angle de contact apparent θ_{app}, l'angle de contact de Young θ_Y prend la forme :

$$cos(\theta_{app}) = f_1\ cos(\theta_\gamma) - f_2 \tag{2.18}$$

Au sein de ce modèle, la rugosité n'est pas modélisée directement, mais plutôt par son influence sur les paramètres f_1 et f_2. Il existe aussi des modèles hybrides, de mouillabilité partielle [19], faisant la transition entre le modèle de Cassie-Bexter et celui de Wenzel. Au sein de notre étude, nous nous limiterons à ces deux théories.

2.1.4.3. Mesure de la mouillabilité

Différentes approches existent afin de mesurer l'angle de contact. Au sein de notre étude, nous adopterons la méthode de mesure statique de l'angle de contact (figure 2.8). Une seringue dépose 5 µL de volume sous la forme d'une goutte axisymétrique sur la surface solide. Cette goutte possède une masse assez faible qui permet de négliger l'effet de la pesanteur. Un système automatisé basé sur un goniomètre enregistre la forme de la goutte sur la surface tous les 0.1 s, ainsi que l'angle statique formé par la goutte, à gauche et à droite. L'état d'équilibre est supposé quand aucun changement visible n'est observé sur la goutte. Dans le cas d'une surface hétérogène, la mise en place de l'état d'équilibre n'est pas instantanée, en raison par exemple d'un état rugueux. Ainsi, la méthode appliquée, plus effective, consiste à moyenner l'angle de contact mesuré par le temps d'enregistrement et l'angle des deux côtés de la goutte.



(a) *(b)*

Figure 2.8. : Mesure de la mouillabilité d'une surface. (a) banc de mouillage. (b) image de la goutte.

Au sein de notre étude, deux liquides de mesure sont utilisés : de l'eau distillée et du diiodométhane. L'angle de contact obtenu avec l'eau est noté θ_{eau} et celui obtenu avec du diiodométhane est noté θ_{diiodo}. Les caractéristiques des deux liquides sont définies dans le tableau 2.4.

	Composant dispersif ${\sigma_L}^D$ (mN/m)	Composante polaire ${\sigma_L}^P$ (mN/m)
Diiodométhane	47.4	2.6
Eau	19.9	52.2

Tableau 2.4 : Composant dispersif et polaire des liquides de mesures (base de données du banc de mouillage)

L'utilisation de ces deux liquides de mesure permet de déterminer une énergie de surface apparente, définie par le paramètre Υ_{app}, représentant l'énergie libre de la surface en incluant la présence de rugosité. L'énergie de surface Υ_{app} est déterminée via la méthode d'Owen-Wendt. Pour cela, chaque liquide de mesure est caractérisé par une composante énergétique polaire ${\sigma_L}^P$ et une composante énergétique dispersif ${\sigma_L}^D$. A partir de la mesure de l'angle de contact apparent de chaque liquide de mesure (ϑ_{eau} et ϑ_{diiodo}), Υ_{app} est calculée par la relation suivante :

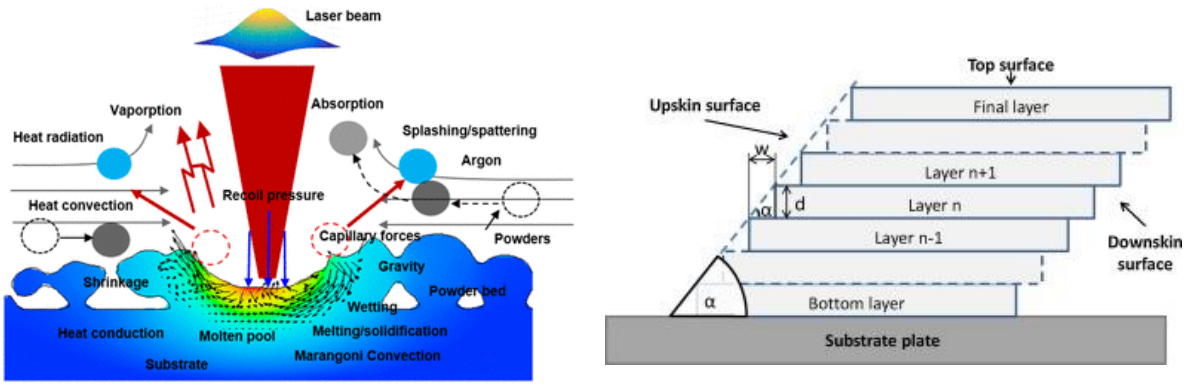
$$\frac{\sigma_L(1+cos\vartheta)}{2\sqrt{{\sigma_L}^D}} = \sqrt{{\sigma_S}^P}\sqrt{\frac{{\sigma_L}^P}{{\sigma_L}^D}} + \sqrt{{\sigma_S}^D} \tag{2.19}$$

L'énergie de surface Υ_{app} (égale à ${\sigma_S}^P + {\sigma_S}^D$) est calculée via une régression linéaire. La mouillabilité mesurée (via l'angle de contact apparent et l'énergie de surface) est celle en présence de rugosité afin de déterminer le mouillage de la surface.

2.2. Analyse de la rugosité et de la mouillabilité de surfaces obtenues par SLM

2.2.1. Description de la rugosité de surfaces obtenues par SLM

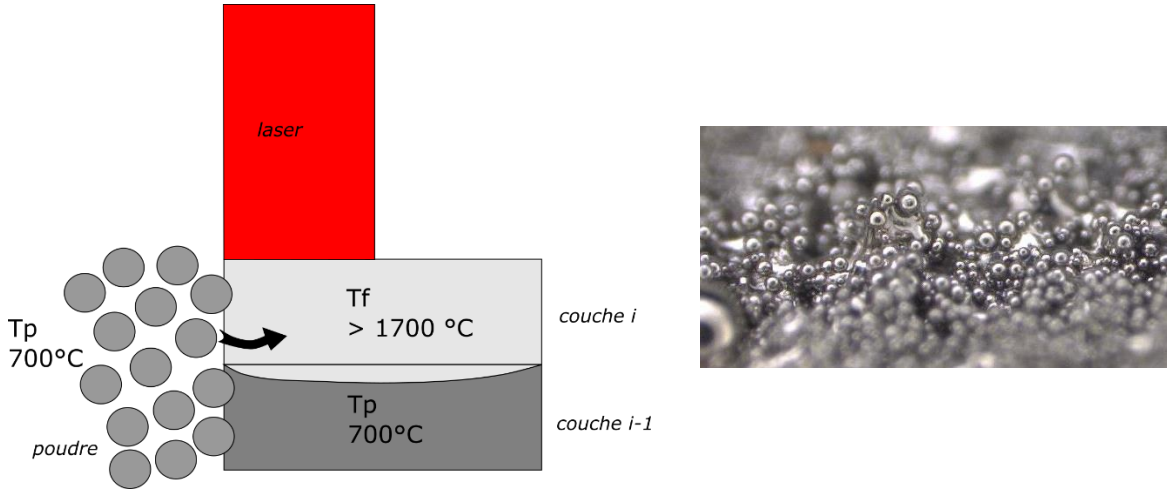
La nature de la rugosité des surfaces obtenues par le procédé SLM se différencie significativement de la rugosité observée avec d'autres procédés de fabrication. En effet, la rugosité des surfaces SLM provient d'une part de la stratégie de fabrication, d'autre part de l'interaction entre le laser et la poudre. Dans un premier temps, la topographie de surface créée par le passage du laser sur la couche de poudre peut être citée et appelée rugosité de type I. Lors de ce passage, le laser interagit avec les grains en formant un bain de fusion dont la forme résultant de la solidification dépend de phénomènes thermomécaniques (figure 2.9.a). Selon les réglages des paramètres sélectionnés sur machine, plusieurs phénomènes peuvent être observés au niveau de la formation et de la solidification du bain de fusion, notamment l'apparition d'instabilités dans le bain de fusion qui peut modifier la surface et les paramètres mécaniques de la pièce finale [20]–[22].



(a) *(b)*

Figure 2.9 : Topographie créée par le passage du laser. (a) Description des différents facteurs influençant la formation du bain de fusion [23]. (b) Description du upskin et du downskin [24].

Un autre facteur influençant la topographie et provenant de l'interaction entre le laser et la matière provient de la refonte de la (ou des) couche située sous la couche en cours de fusion. En effet, lors du passage du laser, la fonte se fait sur une profondeur supérieure à l'épaisseur de couche, pouvant ainsi modifier les topographies déjà existantes. Cet effet a une influence plus importante dans le cas de surfaces fortement inclinées et en particulier pour des surfaces en surplans (« downskins », figure 2.9.b). La deuxième source majeure de rugosité, nommée rugosité de type II, provient de l'inclinaison de la surface de la pièce qui produit un « effet escalier ». Cet effet est créé par la superposition de couches décalées les unes par rapport aux autres afin de créer l'inclinaison de la surface (figure 2.9.b). La rugosité créée en forme de marches, adoucie par la fusion de chaque couche, génère plutôt une rugosité sous forme de vagues. L'effet de l'inclinaison est plus visible sur la couche supérieure (upskin) que sur la couche intérieure (downskin). Enfin, la troisième source de rugosité, de type III, a pour origine l'enkystement en surface de particules de poudre non fondues. En effet, lors du passage du laser et de la formation du bain de fusion, les particules au voisinage du bain de fusion qui n'ont été que partiellement fondues sont piégées lors de la solidification (figure 2.10.a). Ceci donne donc une topographie de surface particulière, visible sur la figure 2.10.b. Cet effet est variable selon le matériau employé. Cependant, il est particulièrement important sur le TA6V ; les hautes températures de liquidus T_l (1660 °C) et de solidus T_s (1605 °C) font que lors de la solidification du bain de fusion, les particules sont encore à l'état solide et conservent leur forme sphérique. Cette rugosité étant latérale au bain de fusion, elle ne se manifeste que pour une surface inclinée par rapport au plan de fabrication.



(a) *(b)*

Figure 2.10 : Schéma des particules de poudres enkystées à la surface après refroidissement du bain de fusion. (a) Schéma de l'enkystement des particules. (b) Particules de TA6V enkystées à la surface.

L'addition de cette rugosité crée une surface réelle significativement différente de la surface dessinée, ce qui peut influencer la biocompatibilité. Dans la suite de cette partie, nous n'analysons que les rugosités de type II et III, sur le « upskin ».

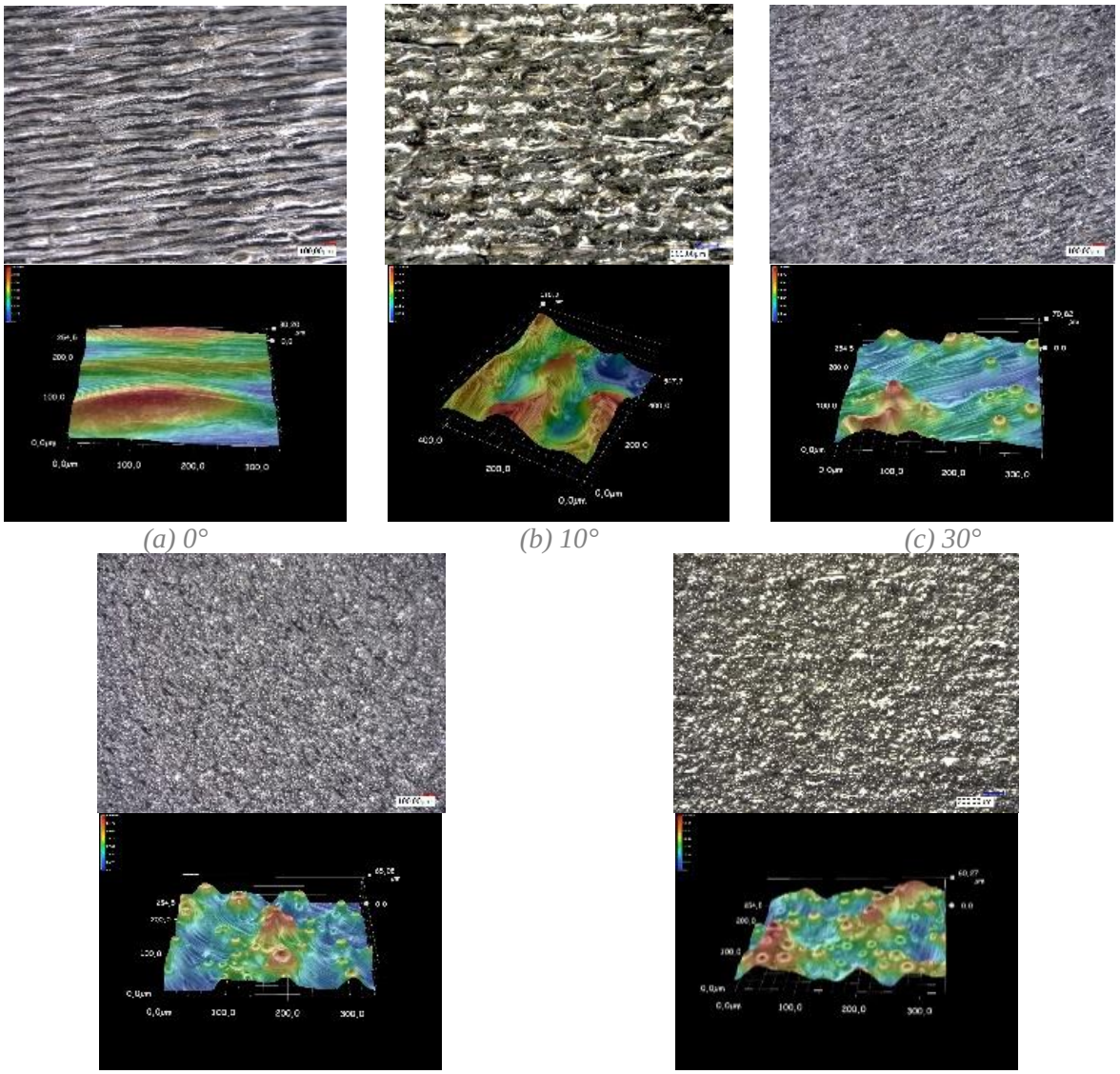
2.2.2. Evolution de la rugosité selon l'inclinaison de la surface

2.2.2.1. Protocole expérimental

Des éprouvettes cylindriques de diamètre 11.2 mm et d'épaisseur 3 mm sont fabriquées via la machine de FA SLM 280 avec une épaisseur de couche de 30 µm et une distance de passage de 0.08 mm. La production de chaque couche suit la méthodologie décrite précédemment. La fabrication de la zone externe de la couche (deux bords externes + contour interne) ainsi que de la zone interne de la couche utilise les paramètres machine sélectionnés par défaut. Cinq groupes d'échantillons produits par SLM sont définis, chacun étant caractérisé par une inclinaison α par rapport au plan (x, y) ; le plan (x, y) est le plan du plateau d'impression de la machine SLM (figure 2.1). L'inclinaison α prend les valeurs suivantes : 0° (i.e. échantillon horizontal par rapport au plan d'impression), 10°, 30°, 60° et 90° (i.e. échantillon vertical par rapport au plan d'impression). Les échantillons cylindriques sont fabriqués sur le même plateau avec des supports placés entre les échantillons et le plateau d'impression afin de faciliter le décollage des éprouvettes. Enfin, aucun post traitement thermique n'est appliqué. Des mesures de rugosité et de mouillabilité des surfaces sont réalisées avec un répétabilité de 5 échantillons par mesure. Par ailleurs, des clichés sont pris à l'aide du microscope à lumière blanche Keyence VHX-5000. La morphologie de la surface est ensuite évaluée sur des images de 1600 x 1200 pixels et une reconstruction 3D de chaque image est effectuée avec le logiciel intégré au microscope. La nomenclature 0B, 10B, 30B, 60B et 90B est introduite pour identifier les surfaces correspondantes aux surfaces brutes fabriquées respectivement à 0°, 10°, 30°, 60° et 90°. Les résultats sont analysés statistiquement via un test de Kruskal-Wallis, accompagné par un test de corrélation de Spearman. Pour chacun de ces tests, une hypothèse nulle est analysée et validée par un p-value *p* seuillé à 0.05.

2.2.2.2. Morphologie de la surface selon les différentes inclinaisons

L'étude au microscope sous lumière blanche révèle des différences de morphologie de la surface significatives (figure 2.11). La surface 0B présente une anisotropie (figure 2.11a). Cette texture est créée par le passage du laser sur la poudre de TA6V formant des cordons de fusion lors du refroidissement. L'inclinaison à 0° permet de visualiser la texture de la surface due à la stratégie de passage du laser. Bien que difficilement mesurable, la largeur de ces cordons de fusion varie entre 80 µm et 120 µm, correspondant à la distance de passage définie au sein de la machine SLM. Pour la surface 10B, une texture selon une direction horizontale est observée avec des hétérogénéités ponctuelles (figure 2.11b). En effet, à distance régulière, des particules de poudre sont retrouvées, selon une ligne horizontale suivant la direction de la surface. En raison du décalage des couches successives pour créer l'inclinaison de la surface, les extrémités de la zone de jonction de chaque couche sont décalées (le décalage entre chaque couche est présenté dans la figure 2.9b). Au moment de la fusion de la couche de poudre, les particules au voisinage de la zone de fusion se retrouvent emprisonnées dans la surface, expliquant la rugosité observée. Cette distance régulière varie entre 170 et 180 µm, correspondant au pas de l'escalier nécessaire pour créer un angle de 10° avec une épaisseur de couche de 30 µm. La taille des particules présentes à la surface varie de 20 µm à 60 µm, et crée une rugosité en forme de vagues, de longueur d'onde d'environ 170 µm. Pour une inclinaison α allant de 30° à 90°, la présence de texture à la surface devient de moins en moins visible avec une augmentation du nombre de particules enkystées. Ceci s'explique par l'augmentation du nombre de jonctions qui augmente le nombre de particules piégées à la surface. Cela se vérifie avec les distances de jonctions passant d'environ 50 µm pour 30B à ~30 µm pour 90B.

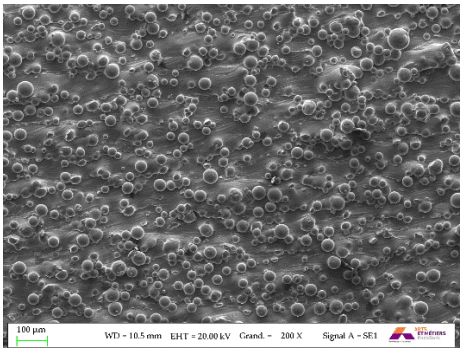


(a) 0° *(b) 10°* *(c) 30°*

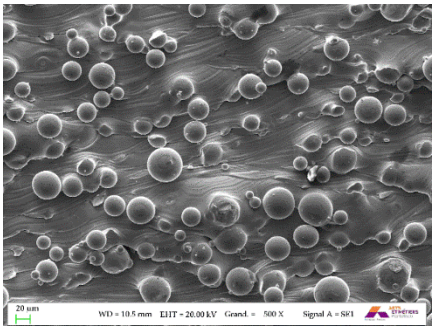
(d) 60° *(e) 90°*

Figure 2.11 : Morphologie des surfaces selon leur inclinaison.

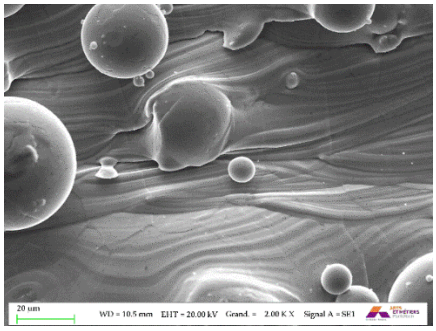
Contrairement à ce qui est observé pour l'aluminium ou d'autres métaux avec des températures de fusion (T_f) faibles, la haute température de fusion du TA6V (T_f =1660 °C) permet aux particules emprisonnées à la surface de rester relativement sphériques. Cela s'observe sur les images MEB de la surface inclinée à 90° (figure 2.12). Les particules de la poudre de TA6V sont obtenues par atomisation ce qui leur donne une forme sphérique. Les particules présentes à la surface se séparent en deux catégories : celles partiellement emprisonnées au sein du bain de fusion, et celles qui demeurent en dehors du bain de fusion. Pour ces dernières, il semble que seulement la base de la particule soit emprisonnée au sein du bain de fusion. Dans les deux cas, celles-ci gardent leur forme sphérique. Les diamètres des particules observées varient d'environ 10 µm à 60 µm.



(a) X 200



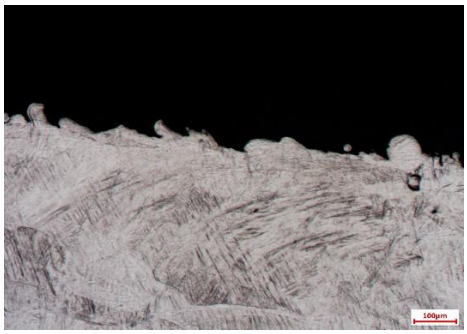
(b) X 500



(c) X 1000

Figure 2.12 : Vue MEB des surfaces SLM 90B par rapport au plan de fabrication selon différents grossissements.

En s'intéressant à la vue de coupe de la surface (figure 2.13), une forme spécifique de surface est observée. En effet, la littérature montre que le passage du laser crée une morphologie en forme de vague. Cela semble se retrouver sur la vue en coupe par la présence de petites vaguelettes. Par ailleurs, des creux et des entailles sont localement présentes en surface (caractéristiques non visibles au MEB et au microscope à lumière blanche).



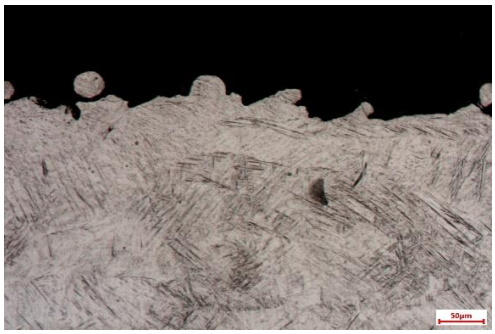
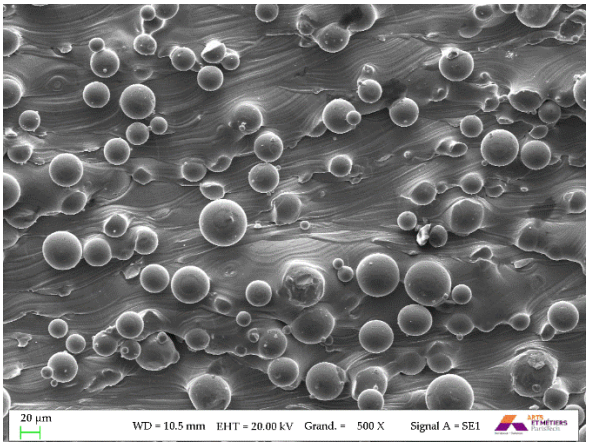


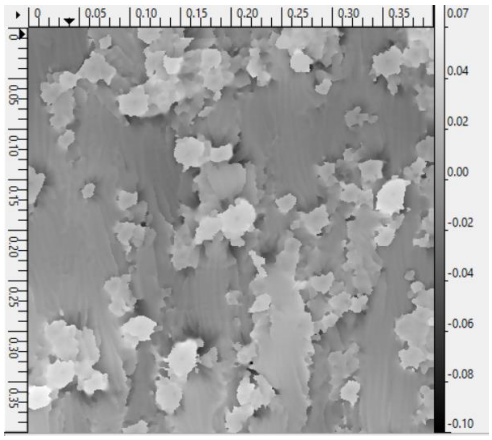
Figure 2.13 : Trace du passage du laser.

2.2.2.3. Effet de l'inclinaison de fabrication des éprouvettes sur la rugosité

Les paramètres de rugosité sont mesurés à l'aide d'un profilomètre laser enregistrant les élévations de surface. Les mesures sont réalisées avec une précision de 1 µm² dans le plan du disque et 10 nm en hauteur. En comparant ce qui est mesuré par le rugosimètre et l'état de surface observé au MEB (voir figure 2.14), une perte de précision est observée au niveau des surfaces, surtout sur la forme des particules. L'étude de la surface se fait cependant par rapport à des entités cellulaires de forme ellipsoïdale dont les dimensions des axes varient de 20 à 100 µm. De ce fait, le niveau de précision est considéré comme acceptable au sein de cette étude.



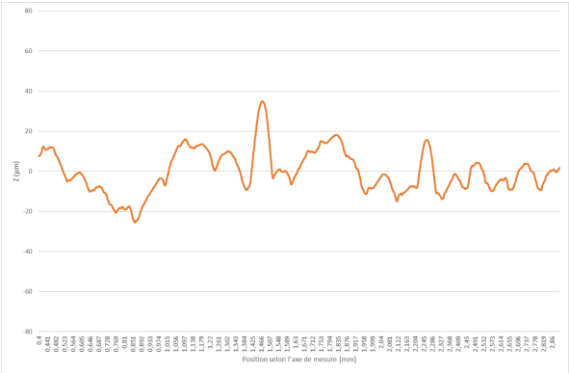
(a)



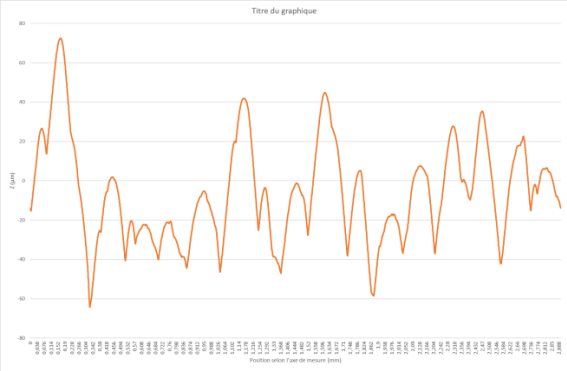
(b)

Figure 2.14 : Données mesurées via le profilomètre numérique et comparées à l'état de surface réel obtenu via le MEB pour une surface 90B. (a) Image obtenue par MEB pour une surface de 600 µm x 500 µm. (b) Données 3D obtenues avec le profilomètre numérique pour une surface de 400 µm x 400 µm.

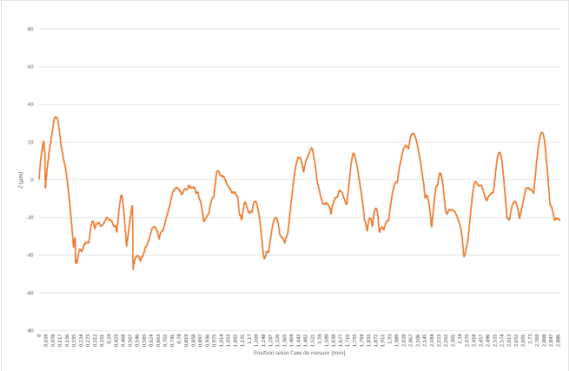
Une première approche passe par une analyse du profil unidimensionnel (1D) de la surface pour déterminer les différents ordres de grandeurs de topographies (figure 2.15). D'un point de vue qualitatif, dans le cas d'une inclinaison de α=0°, les variations de la surface sont faibles et de longueur d'onde assez importantes, correspondant à l'ordre de grandeur de la distance de passage du laser. Pour α=10°, de fortes amplitudes d'élévation sont observées ainsi que de grandes longueurs d'ondes. Cela rejoint ce qui est observé au microscope. De la même manière, pour des inclinaisons α≥30°, la fréquence des variations d'élévation diminue en amplitude et augmente en fréquence, soulignant la présence des particules à la surface.



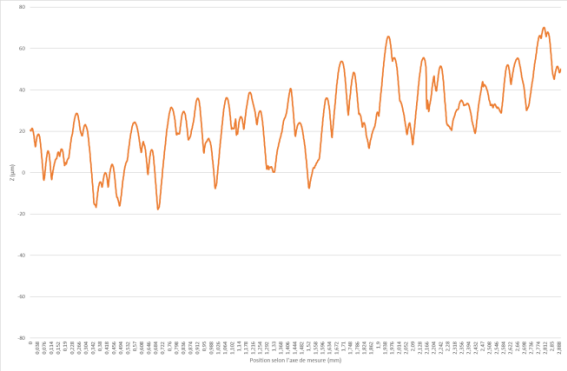
(a) 0B



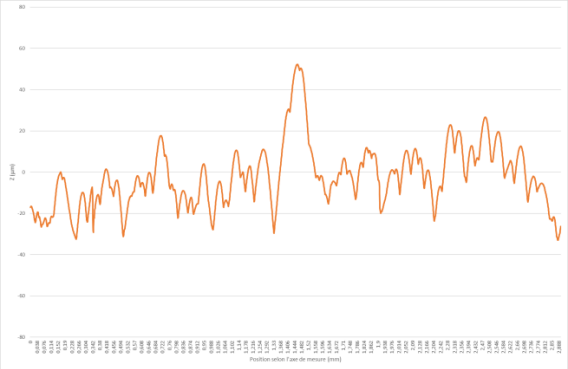
(b) 10B



(c) 30B



(d) 60B



(e) 90B

Figure 2.15 : Profil 1D de la rugosité des différentes surfaces.

Une analyse des paramètres de rugosité est réalisée par la suite. Ceux-ci sont répertoriés au sein du tableau 2.5.

	S_a (µm)	S_q (µm)	S_t (µm)	S_{sk}	S_{dr}	S_{tr}	S_{al} (µm)
0B	9.35 (± 1.44)	11.89 (± 1.56)	64.29 (± 12.15)	-0.21 (± 0.18)	1.38(± 0.2)	0.32 (± 0.1)	171.9 (± 53)
10B	18.1 (± 2.2)	25.4 (± 2.4)	136.2 (± 12.2)	1.2 (± 0.22)	1.88 (± 0.18)	0.35 (± 0.13)	155 (± 50)
30B	15.33 (± 1.07)	20.25 (± 1.11)	133.13 (± 4.42)	0.88 (± 0.21)	2.32 (± 0.09)	0.39 (± 0.15)	141.6 (± 37.9)
60B	13.77 (± 0.79)	18.19 (± 1.17)	134.93 (± 11.72)	0.96 (± 0.24)	2.81 (± 0.07)	0.45 (± 0.17)	35.2(± 6.2)
90B	15.75 (± 1.15)	19.9 (± 1.2)	130.8 (± 9.6)	0.56 (± 0.4)	3.17 (± 0.17)	0.65 (± 0.2)	36.2 (± 8.2)

Tableau 2.5 : Valeurs des paramètres de rugosité pour les différentes inclinaisons.

Les résultats pour S_a ainsi que S_q sont tracés sur la figure 2.16 pour les différentes inclinaisons. La rugosité à α=0° est considérée comme un état de surface de référence, avec un S_a = 9.48 µm (± 1.2) et un S_q =12.4 µm (± 0.9). Une augmentation de la rugosité est observée de 0B à 10B, avec un S_a =18.1 µm (± 2.2) et un S_q =25.4 µm (± 2.4). Cette forte augmentation semble être le résultat de l'effet escalier combiné à la présence ponctuelle des particules en surface. Une diminution de la rugosité est alors observée de 10B à 30B, S_a diminuant à 15.7 µm (± 1.3) et S_q diminuant à 19.5 µm (± 2.3). Aucune différence significative n'est observée pour 30B, 60B et 90B pour S_a (p=0.06) et S_q (p=0.33). En termes d'interprétation, la diminution initiale observée provient de la diminution de l'effet escalier. Cette diminution est cependant accompagnée d'une augmentation du nombre de particules à la surface, pouvant ainsi expliquer la stabilisation de la rugosité.

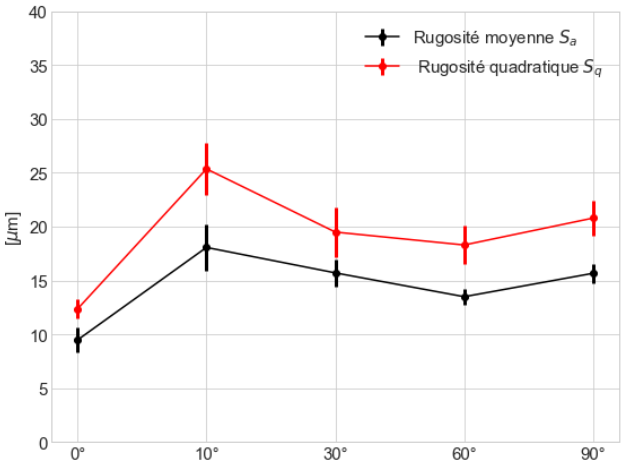
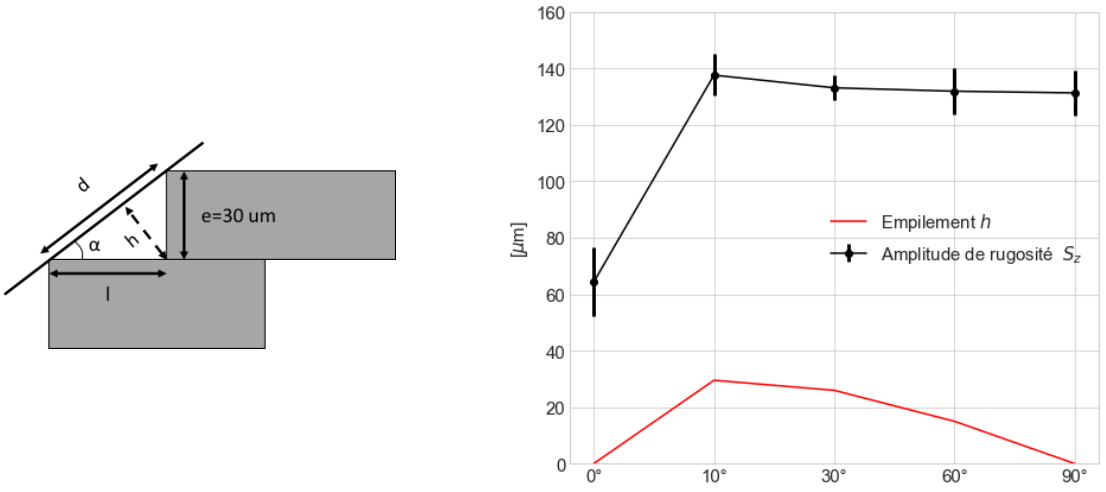


Figure 2.16 : Graphe évolution de Sa et S_q en fonction de l'inclinaison.

Afin de valider notre hypothèse, l'évolution de la rugosité et de l'amplitude *h* créées par l'effet escalier sont représentées sur le même graphique (figure 2.17). La différence entre S_t et *h* montre la faible influence de l'effet escalier sur l'amplitude de la rugosité. Cependant, il faut se rappeler que les particules de poudre se concentrent au niveau des jonctions, accentuant ainsi l'anisotropie de la surface. En résumé, de 0B à 10B, *h* et S_t augmentent. Cependant, au-delà 10B, une diminution de *h* est observée jusqu'à 0 µm alors que S_t diminue légèrement avant de se stabiliser. Au contraire, S_t se stabilise à partir de 10B sans différence significative entre 10B, 30B, 60B et 90B (p=0.79). Ceci montre que si l'effet escalier affecte la rugosité à faible amplitude, la rugosité totale (type I, II et II ensemble) provient majoritairement de la texture des cordons de fusion et de la présence des particules.



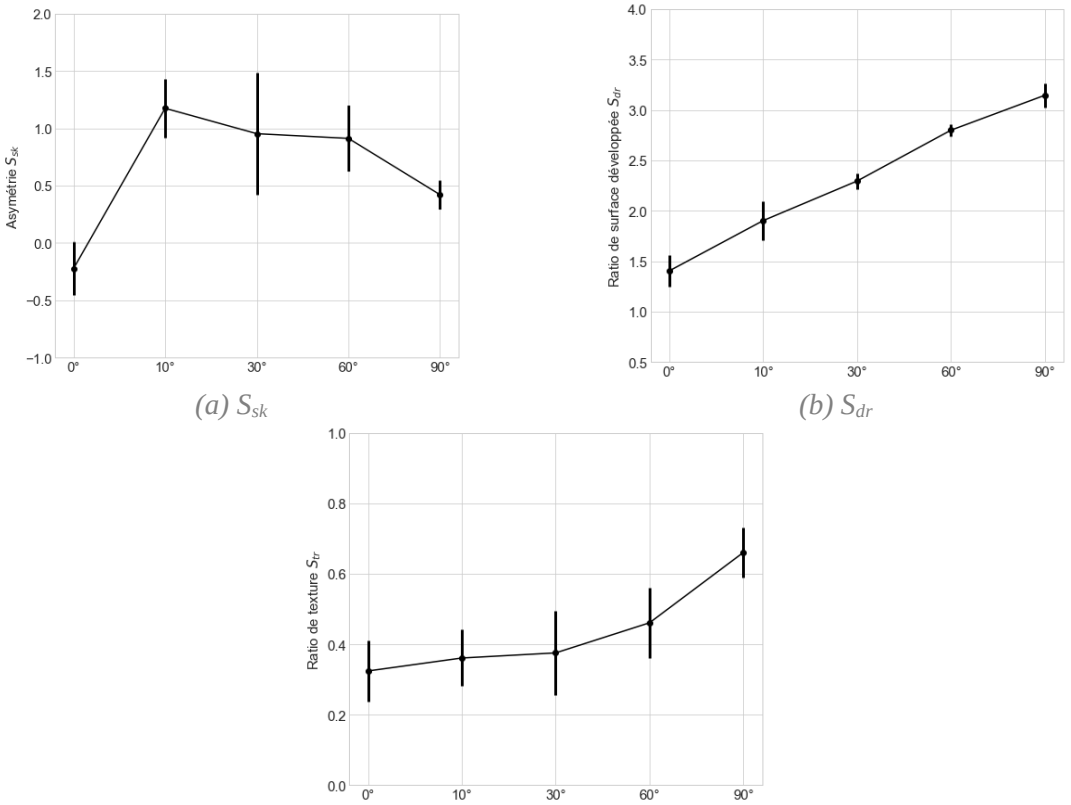
(a) *(b)*

Figure 2.17 : Graphe évolution de S_z en fonction de l'inclinaison et comparaison avec l'évolution de h. (a) Calcul du paramètre h. *(b) Comparaison entre* S_t *et* h.

Concernant les autres paramètres de rugosité, le paramètre d'asymétrie de la surface permet de révéler la présence des particules (figure 2.18.a). En effet, pour une inclinaison 0B, S_{sk} prend une valeur négative tandis que les autres inclinaisons montrent un S_{sk} positif. La valeur de S_{sk} positif souligne une asymétrie de la surface par une prédominance des pics. Ces pics reflètent la présence des particules à la surface. La présence de ces particules se visualise aussi dans l'évolution du paramètre S_{dr}, par l'augmentation constante de celui-ci (figure 2.18.b).

Bien que n'ayant pas quantifié l'évolution de la densité de rugosité de type III en fonction de l'inclinaison, des études de la littérature montrent une augmentation de cette densité avec l'inclinaison de 0° à 90°. En effet, Lerebours et al [25] ont étudié l'effet de la rugosité local d'éprouvettes de TA6V fabriquées en SLM sur l'adhésion cellulaire, et ils ont montré une augmentation linéaire du nombre de particules non fondues par mm² pour une inclinaison de fabrication allant de 0 à 90°. L'augmentation du paramètre S_{dr} étant lui-même linéaire, on peut donc supposer que cette augmentation constante est le résultat de la présence des particules ce qui souligne une fois de plus l'aspect déterminant de ces particules au sein de la rugosité. Il est à noter que l'enregistrement des données 3D via le rugosimètre ne permet pas d'obtenir l'ensemble de la surface, en particulier celle sur la face inférieure de la particule. Une hypothèse est que le paramètre S_{dr} est sous-évalué.

Enfin, une analyse de la texture de la surface est réalisée. En effet, les résultats précédents ont prouvé que la surface affichait une orientation créée par les cordons de fusion ainsi que par l'effet escalier. Afin de quantifier cette anisotropie topographique, la mesure du paramètre S_{tr} est réalisée (figure 2.18.c). De 0B à 30B, S_{tr} est inférieur à 0.5, montrant que l'anisotropie de surface est présente. Cependant, à partir de 60B, la présence des particules efface l'anisotropie de surface. Par ailleurs, l'augmentation du paramètre S_{tr} coïncide avec l'apparition des particules. Les particules ont donc aussi pour effet de faire disparaître l'effet de la topographie sous-jacente. Cet effet influence l'évolution de la longueur d'onde de la surface, via le paramètre S_{al}, par une diminution selon l'inclinaison. En plus de suivre l'augmentation de la densité de particules de rugosité de type III, cela suit aussi l'effet escalier avec la diminution du paramètre *d*.



(a) S_{sk} *(b) S_{dr}*

(c) S_{tr}

Figure 2.18 : Graphe évolution de S_{sk}, S_{dr} et S_{tr} en fonction de l'angle d'inclinaison α.

Au final, l'effet majoritaire observé selon l'inclinaison de la surface est lié à la présence des particules. En effet, si l'effet escalier ajoute un autre niveau de rugosité à la surface, les longueurs d'ondes vont de 30 µm (avec aucun effet escalier) à ~170 µm. Ces longueurs d'onde se placent donc à des ordres de grandeurs supérieurs ou égaux aux dimensions de la cellule, avec un effet qui sera donc limité. De même, du point de vue de la cellule, la texture créée par le passage du laser présente une courbure assez faible, ce qui a une influence limitée sur le comportement cellulaire. Une hypothèse peut donc être formulée : d'un point de vue topographique, les particules ont la plus grande influence.

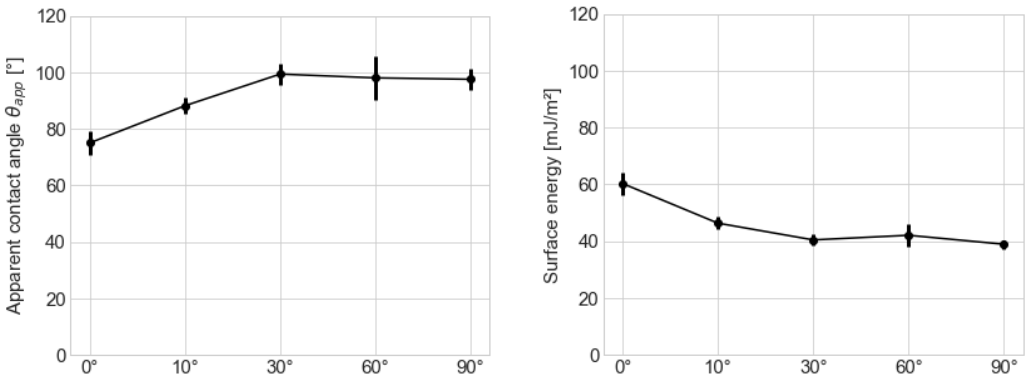
2.2.2.4. Relation entre la mouillabilité et la rugosité

Un autre paramètre important qui influence le comportement surfacique d'un implant est la mouillabilité de la surface. Le tableau 2.6 montre l'évolution de l'angle de contact apparent pour l'eau et le diiodométhane, ainsi que celle de l'énergie de surface pour les différentes orientations. Pour la surface 0B, un θ_{eau} de 75° (± 4.1) est mesuré, qui montre une surface présentant des propriétés hydrophiles (figure 2.19.a). Une augmentation de θ_{eau} est enregistrée en passant à une inclinaison 10B pour atteindre 88° (± 4.1), se situant donc dans les propriétés d'une surface équiphilique. Pour 30B, la surface exhibe des propriétés hydrophobes avec un θ_{eau} supérieur à 90°. Aucune différence significative n'est observée pour une inclinaison supérieure à 30B (p=0.22).

Orientation	θ_{eau}	θ_{diiodo}	Υ_{app}
0B	75 (± 4.1)	38.1 (± 1.8)	60.3 (± 4.1)
10B	88.1 (± 2.7)	45.3 (± 2.7)	46.4 (± 2.2)
30B	99.3 (± 3.7)	42.3 (± 1.9)	40.5 (± 1.9)
60B	98 (± 7.8)	41.2 (± 2.5)	42.1 (± 4.1)
90B	97.5 (± 3.6)	39.7 (± 2.5)	38.9 (± 1.5)

Tableau 2.6 : Mesure de l'angle de contact et de l'énergie de surface.

L'évolution de Υ_{app} (figure 2.19.b) suit une évolution contraire à θ_{eau}, avec une diminution de Υ_{app} suivant l'augmentation de l'inclinaison, suivie par une stagnation de celle-ci à partir de 3B0 jusqu'à 90B (caractérisée par une absence de différence significative avec p=0.08). Statistiquement, une corrélation de 0.7 est mesurée entre θ_{eau} et Υ_{app}, bien que cette corrélation ne soit pas vérifiée statistiquement (p=0.18).



(a) *(b)*

Figure 2.19 : Evolution de la mouillabilité selon l'inclinaison de la surface. (a) Angle de contact aqueux θ_{eau}. (b) Energie de surface apparent Υ_{app}.

En termes d'interprétation, l'augmentation de θ_{eau} avec l'inclinaison montre qu'une fois de plus, la présence des particules conditionne la réponse de la surface. En effet, les propriétés hydrophobes de la surface commencent à apparaître à l'instant où les particules sont présentes en surface et elles augmentent avec le nombre de particules.

Un point intéressant au niveau de la mouillabilité est que les effets d'hydrophobie de la surface augmentent donc avec la rugosité. Sachant que pour le TA6V la surface sans rugosité montre des propriétés hydrophiles, le comportement observé ne suit donc pas la théorie de Wenzel. Le régime de mouillabilité correspondant à la théorie de Cassie-Baxter, dans laquelle le contact entre le médium et la surface n'est que partiel, peut donc être considéré. Une hypothèse est que les particules présentes sur la surface peuvent piéger des poches d'air à leur base essentiellement. Plus le nombre de ces particules est élevé, plus le nombre de poches d'air est important, et la mouillabilité de la surface évolue vers l'hydrophobicité. Une étude de corrélation via un test de Spearman montre un lien entre θ_{eau} et S_{dr} (c=0.6) sans que cela soit prouvé statistiquement (p=0.28). Une autre cause d'hydrophobicité pourrait être le ralentissement de l'état d'équilibre en raison de la présence des particules. Néanmoins, l'ensemble des résultats avancés prouve que l'état de surface généré par SLM brute est à éviter, essentiellement pour éviter la présence des particules.

2.2.2.5. Discussion sur l'influence de l'inclinaison de la surface extérieure

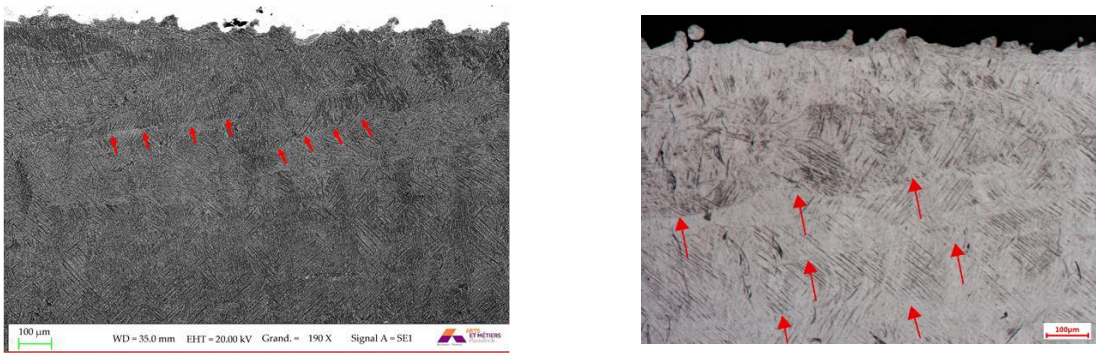
Les résultats ont montré une influence nette de l'inclinaison de fabrication sur l'état de surface, avec la présence d'une rugosité hétérogène. L'inclinaison fait apparaître différents types de rugosité selon la valeur de l'inclinaison. Pour une inclinaison 0B, seule la rugosité de type 1 est présente. Pour une inclinaison 10B, les rugosités de type II et III apparaissent, devenant ainsi prédominantes devant celle de type I. Par la suite, la rugosité de type II devient de moins en moins importante pour donner à 90B une rugosité composée exclusivement de la rugosité de type III, i.e. liée aux particules. D'autres études ont montré un effet plus conséquent de la rugosité de type III sur les surfaces inférieures (downskin) avec une densité de particules plus importante combinée à un bain de fusion moins stable [26], [27]. De plus, la rugosité de type III fait apparaître les propriétés hydrophobes de la surface. Bien que ceci ne soit pas prouvé statistiquement, la manifestation de propriétés hydrophobes correspond à l'apparition des particules à la surface.

2.2.3. Caractérisation du matériau TA6V obtenu par SLM et étude de l'influence du procédé sur la mouillabilité

Pour un même matériau, la mouillabilité est influencée essentiellement par la rugosité du substrat. Cependant, d'autres facteurs jouent aussi un rôle, notamment la composition chimique de la surface ou la microstructure du matériau. Ce dernier aspect en particulier est intéressant car le procédé SLM est connu pour engendrer des changements de microstructures dans la pièce. Par la suite, une étude de la modification des propriétés matériaux doit être réalisée.

2.2.3.1. SLM et microstructure

La littérature nous donne beaucoup d'informations au sujet de la microstructure observée au sein de pièces fabriquées par SLM. B. Vaysette [3] a travaillé sur la forme de la microstructure sur des éprouvettes fabriquées à 90B sur la même machine utilisée au sein de cette étude, en utilisant les mêmes paramètres de fabrication; ceci constitue donc un élément de comparaison. La microstructure des éprouvettes est composée de fines lamelles martensitiques avec différentes couches parallèles à la direction de fabrication (figure 2.20). Bien que cet aspect ne soit pas étudié ici, cette hétérogénéité de microstructure peut potentiellement affecter le comportement de la surface du matériau, notamment en termes de mouillabilité.



(a) *(b)*

Figure 2.20 : Mise en évidence de la microstructure pour des éprouvettes de TA6V fabriquées à 90B. (a) Microstructure observée au MEB pour des échantillons fabriqués à 90° avec un post traitement CIC, thèse de B. Vaysette [3]. (b) Microstructure observée sur les éprouvettes fabriquées dans cette étude.

2.2.3.2. Protocole expérimental

Afin de caractériser l'évolution de microstructure dans le matériau, des mesures de dureté sont réalisées. La dureté du matériau en surface et en profondeur (sur une coupure transversale) est évaluée via des tests de dureté par micro indentation. Pour cela, des éprouvettes sont fabriquées selon les caractéristiques de 90B, donc verticalement par rapport au plan de fabrication, et selon les paramètres de fabrication par défaut. Dix mesures de dureté sont effectuées de la surface au cœur de l'éprouvette pour une même coordonnée selon z (figure 2.21) avec un espacement de 150 µm entre les points de mesure (suivant la coordonnée x), en appliquant une charge de 500 g via un analyseur de micro dureté de Vickers. Les mesures sont répétées selon trois coordonnées z différentes pour chaque éprouvette.

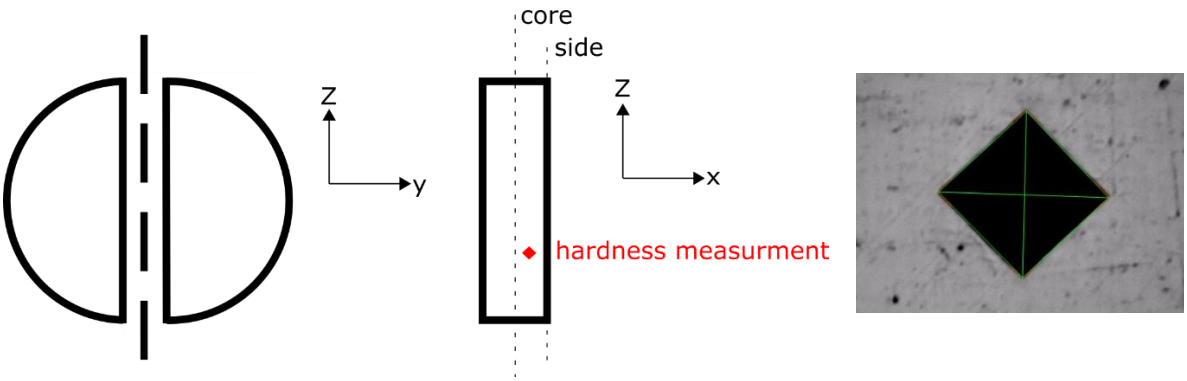


Figure 2.21 : Découpe de l'éprouvette dans le plan X-Z afin de réaliser des mesures de dureté.

Afin d'analyser l'influence du changement de microstructure sur la mouillabilité de la surface, des mesures de mouillabilité à différentes profondeurs sont également réalisées. Un groupe d'éprouvettes de type 90B est fabriqué, et séparé en six sous-groupes distincts de 5 éprouvettes. Chaque sous-groupe est usiné orthogonalement à l'axe x (donc dans le plan y-z) selon une profondeur *h*, correspondant à un enlèvement de matière d'épaisseur *h*. Six valeurs de *h* sont définies : 0.2 mm, 0.3 mm, 0.4 mm, 0.5 mm, 0.7 mm et 0.9 mm. Les sous-groupes sont nommés respectivement P02, P03, P04, P05 et P09. Les mesures de mouillabilité sont répétées cinq fois pour chaque typologie d'éprouvette.

2.2.3.3. Résultats et discussion

La figure 2.22 montre l'évolution de la dureté selon la profondeur de la mesure suivant x. Une augmentation de la dureté est enregistrée, allant de 341 HV (± 1.5) pour 0.2 mm à 368 HV (± 2) pour 0.5 mm. Passée cette profondeur, aucune différence significative n'est observée de 0.5 mm à 0.9 mm (p=0.6, Kruskal-Wallis, montrant donc une stabilisation des propriétés matériaux).

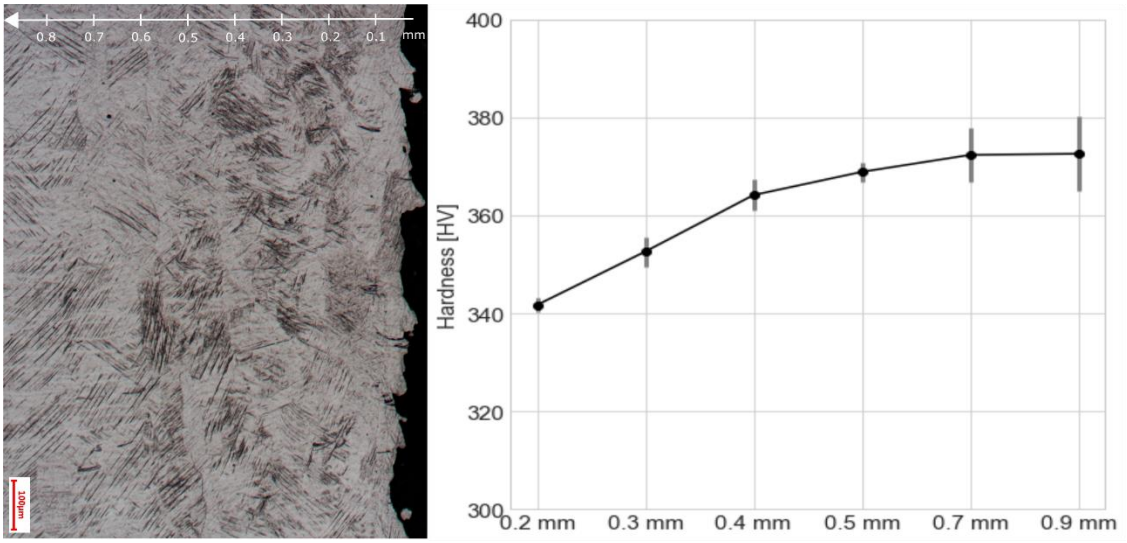
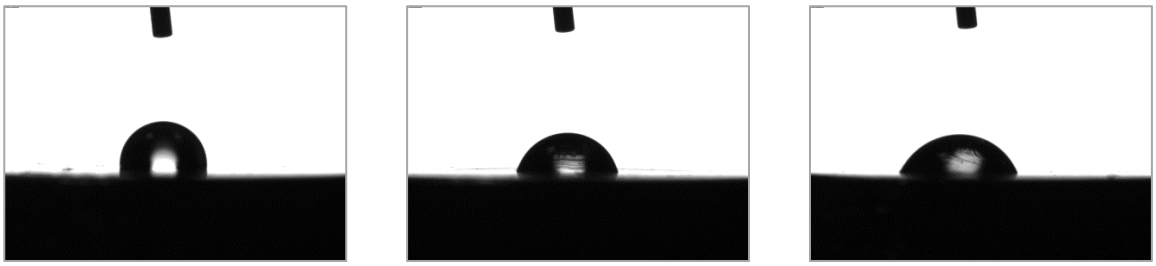


Figure 2.22 : Evolution de la dureté mesurée en fonction de la distance de la surface.

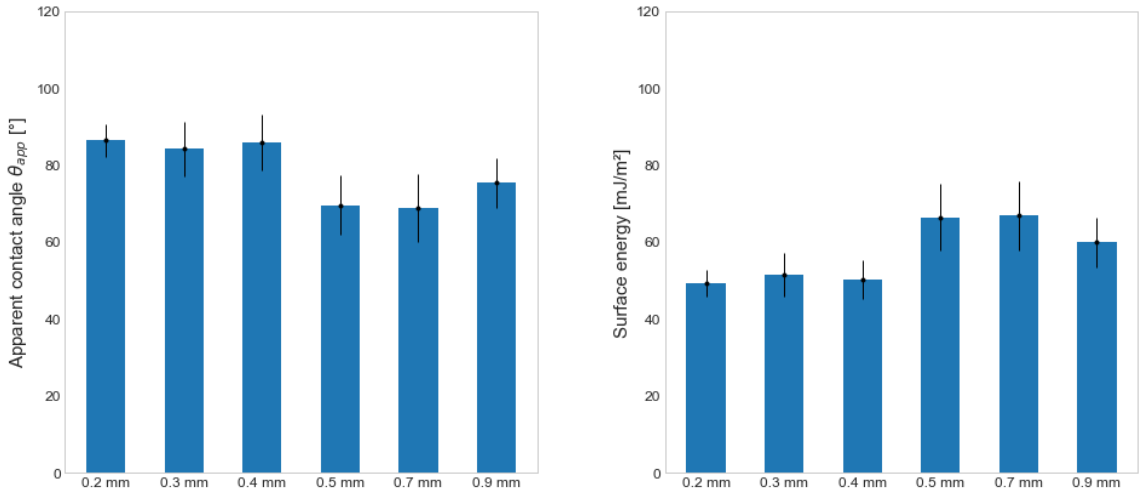
En comparant avec les résultats de B. Vaysette, la présence de variations de microstructure est retrouvée, qui présentent des variations de phases α et de phases β au sein du matériau. Selon l'étude de B. Vaysette, les plus grandes variations de microstructures sont généralement observées sur les premiers 500 µm à partir de la surface externe, et cela se retrouve sur nos mesures de dureté. Ce résultat valide donc la présence d'un gradient de propriétés matériaux (via la mesure d'un gradient de dureté) en fonction de l'épaisseur de l'éprouvette. Des mesures de mouillabilité sont donc réalisées sur les différentes profondeurs, via la mesure de l'angle de contact sur des surfaces obtenues par usinage à différentes profondeurs (figure 2.23). L'usinage des surfaces crée en surface une rugosité à l'échelle nanoscopique qui influence donc la mouillabilité. Néanmoins, le même procédé d'usinage est appliqué à l'ensemble des surfaces, ce qui annule donc l'influence de celui-ci dans l'étude de comparaison des propriétés matériaux à différentes profondeurs dans l'éprouvette.



(a) 0.2 mm *(b) 0.5 mm* *(c) 0.9 mm*

Figure 2.23 : Cliché de la mesure de la mouillabilité avec de l'eau distillée pour P02, P05 et P09.

L'évolution de l'angle de contact θ_{eau} ainsi que celle de l'énergie de surface apparente γ_{app} sont présentées sur la figure 2.24. Les résultats montrent un gradient de θ_{eau} ainsi que de γ_{app} avec l'augmentation de la profondeur de mesure. Concernant l'évolution de l'angle de contact θ_{eau}, proche de la surface à h=0.2 mm, l'angle de contact aqueux θ_{eau} prend la valeur 86.4° (± 4.2), sans différence significative observée de P02 à P04 (p=0.78, Kruskal-Wallis). Passés les 0.4 mm de profondeur, une diminution significative de θ_{eau} est observée pour atteindre la valeur de 69.6° (± 7.8), suivie par une absence de différence significative de P05 à P05 (p=0.3, Kruskal-Wallis). Du point de vue de l'énergie de surface γ_{app}, une évolution opposée est observée. Après la stagnation de γ_{app} autour de 49.3 mJ/m² (± 3.5) de P02 à P04, une augmentation significative est observée afin d'atteindre la valeur de 66.4 mJ/m² (± 8.6) de P05 à P09. Ces résultats prouvent que la mesure de la mouillabilité via l'angle de contact aqueux reflète l'évolution de l'énergie de surface.



(a) *(b)*

Figure 2.24 : Evolution de θ_{eau} et Υ_{app} en fonction de la distance h de la surface. (a) Valeur de θ_{eau}. (b) Valeur de Υ_{app}.

Les résultats confirment la présence d'un gradient de propriétés du matériau au sein de la pièce ainsi que son influence sur la mouillabilité. De plus, cela confirme la frontière entre P04 et P05 au niveau de ces propriétés. En s'appuyant sur les observations faites au sein de la thèse de B. Vaysette [3], cela semble confirmer l'influence de la taille des grains sur la mouillabilité. Un autre point peut être remarqué ; cette zone de $h \in [0,\ 0.5]$ mm correspond à la zone couverte par le faisceau durant la fabrication du double contour ainsi que du contour interne. Sachant que la densité énergétique est différente au niveau du double contour et au cœur de l'éprouvette, la raison d'une telle hétérogénéité de propriétés matériaux peut venir de la stratégie de passage du laser.

2.2.4. Remarques générales

Cette étude a montré l'hétérogénéité observée sur les surfaces SLM. De l'ensemble des rugosités présentes, celle de type III est prépondérante, avec des dimensions de particules de l'ordre de grandeur de la cellule. La surface 90B présente la plus grande densité de rugosité de type III, expliquant pourquoi cette surface est étudiée ensuite. Les particules observées à la surface sont du même ordre de grandeur que la cellule. En s'appuyant sur la littérature, l'hypothèse est que ces particules ont une grande influence sur le comportement cellulaire, par l'augmentation de la surface de contact qui favorise l'adhésion des cellules sur ces particules. De plus, cela entraîne aussi la création d'obstacles au déplacement de la cellule. La mouillabilité des surfaces contenant les particules se rapproche du modèle de Cassie-Bexter. Cela suppose un contact partiel entre le liquide et la surface. Dans le cadre d'un implant où un mouillage maximal est privilégié, ce comportement est donc considéré comme non approprié. Un traitement de surface soustractif doit donc être mis en œuvre. Par ailleurs, une étude de l'évolution des propriétés de dureté au sein du matériau a montré la présence d'un gradient de propriétés du matériau, créé par la stratégie de passage du laser et influençant la mouillabilité du matériau à différentes profondeurs dans l'éprouvette. Cette observation doit être intégrée dans le cadre d'un traitement de surface entraînant une perte de matière.

2.3. Traitement de surfaces issues du procédé SLM par polissage chimique

2.3.1. Traitement de surface par polissage chimique

Le traitement par polissage chimique est réalisé via la mise en place d'un banc expérimental (figure 2.25). Les éprouvettes sont trempées, à température ambiante, dans un réactif de polissage composé d'acide hydrofluorique HF et d'acide nitrique HNO_3, dilué dans un solvant composé d'eau distillée. Un bac à ultrasons est utilisé afin d'homogénéiser le polissage.

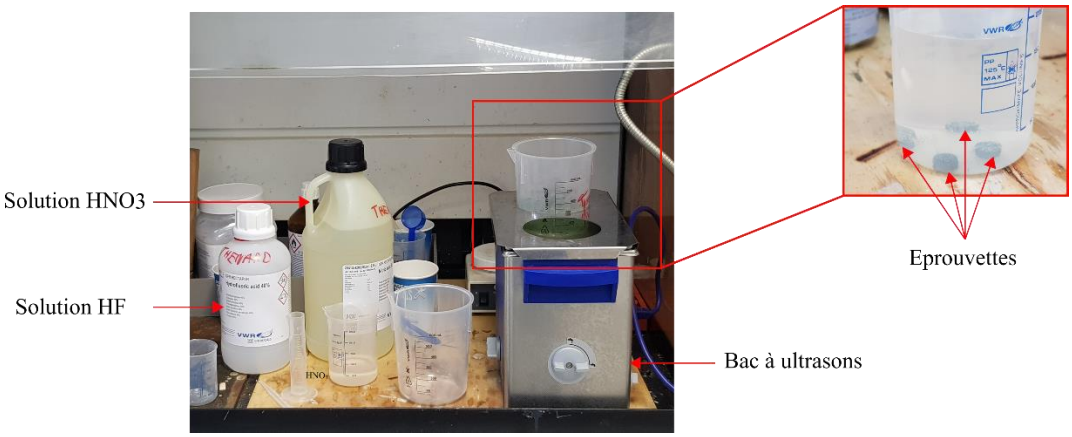


Figure 2.25 : Description du traitement par polissage chimique.

La composition de la solution ainsi que le temps d'immersion sont des facteurs qui influencent la qualité du polissage chimique et font l'objet d'une étude au sein de cette analyse. Le polissage chimique présente l'avantage d'être très flexible par rapport à la géométrie de la pièce. De plus, il s'agit d'un procédé fréquemment utilisé dans le domaine biomédical pour améliorer la biocompatibilité des surfaces d'implants en TA6V. Cependant, notre point d'étude diffère des études traditionnelles par la surface de départ traitée. Contrairement aux traitements par polissage chimique traditionnels appliqués sur des surfaces issues de procédés traditionnels et lissées au préalable (soit par usinage, soit par électropolissage), notre objectif ici est de déterminer les états de surface possibles obtenus directement via le polissage chimique de surface brute SLM.

2.3.2. Analyse des paramètres du polissage chimique sur la surface 90B : composition et temps d'immersion

2.3.2.1. Matériels et méthodes

Des éprouvettes 90B sont fabriquées selon une géométrie et un procédé d'obtention décrits au sein de la section 2.1. Les supports sont alors retirés et les éprouvettes sont nettoyées, puis réparties en 3 sous-groupes avec chaque sous-groupe correspondant à une composition de solution donnée (voir tableau 2.7). Les surfaces traitées chimiquement par une composition de (3% HF, 10% HNO_3), (3% HF, 20% HNO_3) et (10% HF, 10% HNO_3) sont nommées respectivement S310, S320 et S1010.

n°	HF (%)	HNO_3 (%)
1	3	10
2	3	20
3	10	10

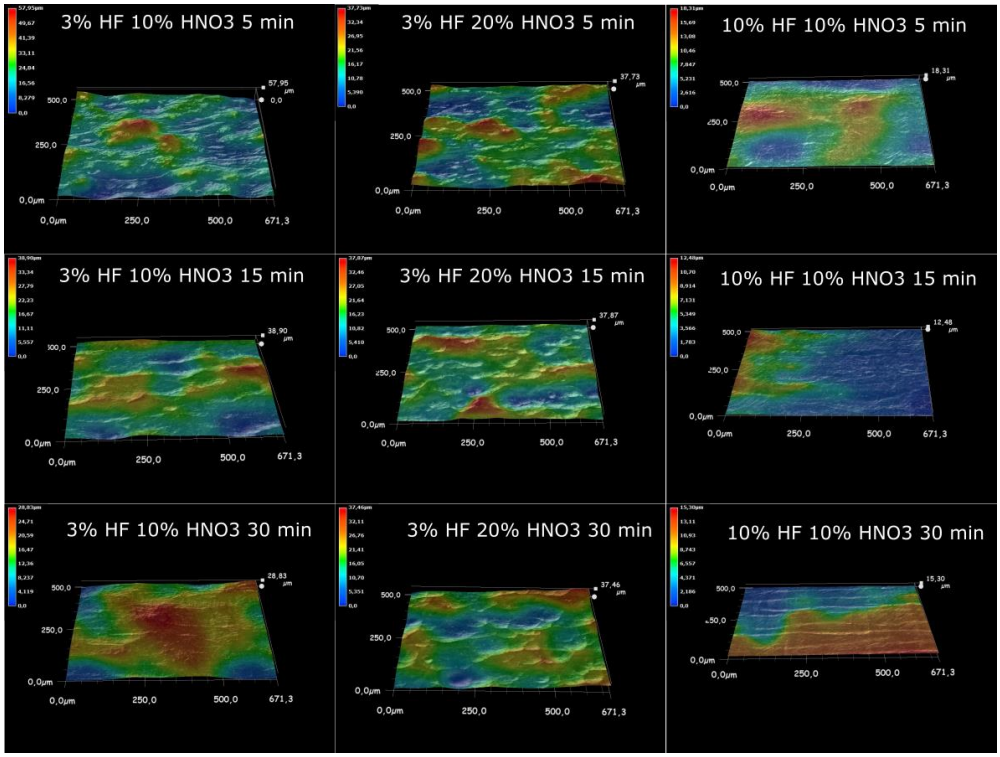
Tableau 2.7 : Composition de la solution de HF et HNO3 pour le polissage chimique.

Pour chaque sous-groupe, les éprouvettes sont attaquées chimiquement par la mixture de HF et HNO_3 pendant cinq temps d'immersions différents : 5, 10, 15, 20 et 30 min. Pour chaque temps d'immersion, cinq éprouvettes sont testées. Après chaque polissage chimique, les éprouvettes sont nettoyées dans de l'éthanol et de l'eau distillée au sein d'une cuve à ultrasons afin de retirer toutes les traces d'acides. La masse de chaque éprouvette est mesurée avant et après le polissage chimique pour estimer la perte de matière.

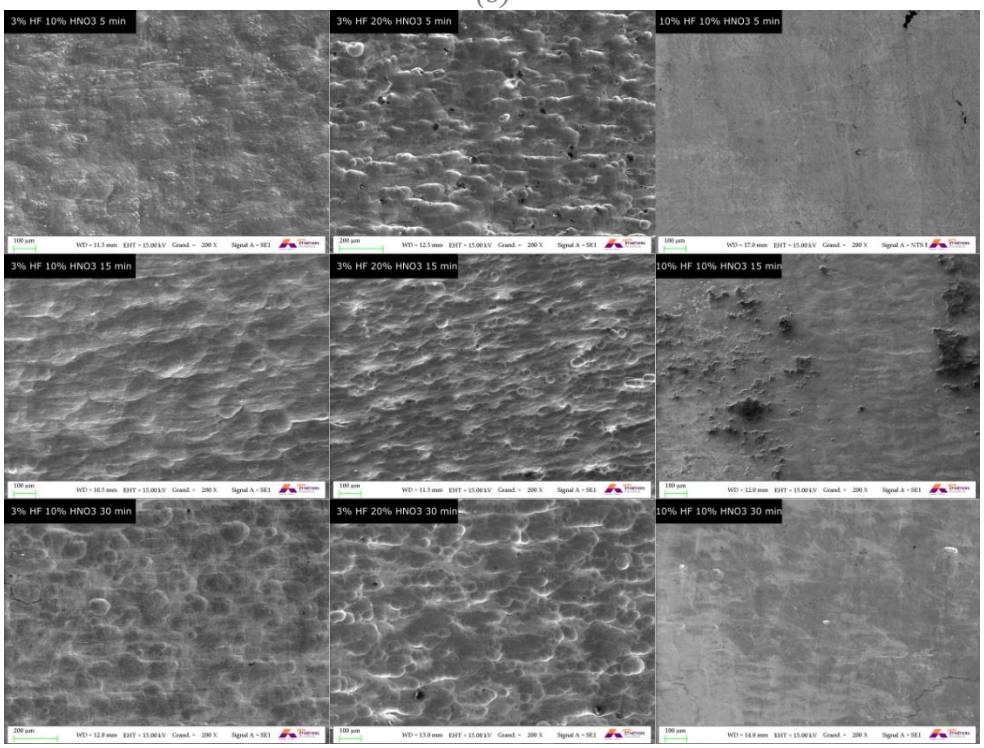
2.3.2.2. Morphologie

La figure 2.26 montre la morphologie de surfaces 90B SLM traitées par polissage chimique via le protocole décrit précédemment. En termes de morphologies, les résultats montrent une élimination de la rugosité de type III à t=5 min pour l'ensemble des compositions chimiques. De plus, une diminution de l'amplitude est observée avec l'augmentation du temps d'immersion pour les trois compositions, avec néanmoins des différences significatives selon les compositions. Les morphologies de surfaces observées au MEB (figure 2.26.c) montrent que S310 et S320 gardent les traces du procédé SLM avec la présence d'une anisotropie de surface même après 30 minutes de temps d'immersion, alors que S1010 n'a plus aucune trace du procédé dès t=5 min d'immersion.

(a)



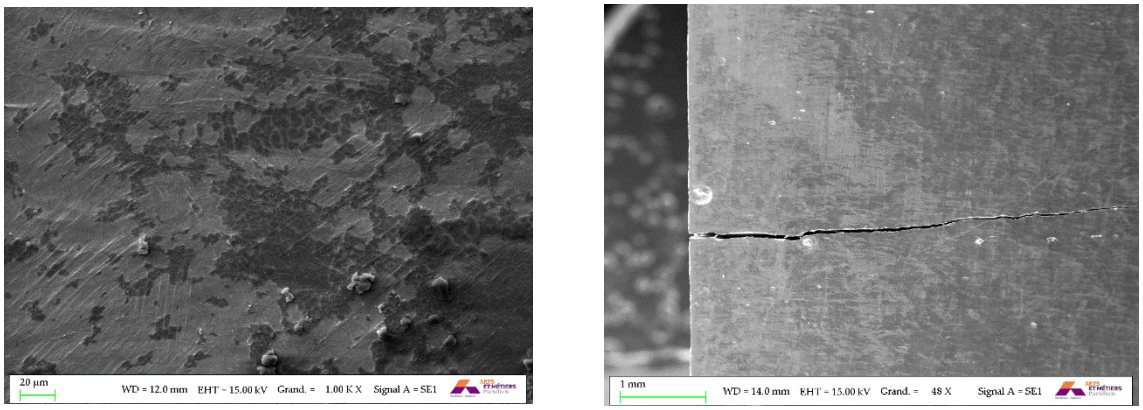
(b)



(c)

Figure 2.26 : Morphologie de la surface d'éprouvettes 90B traitées chimiquement selon différentes compositions et différents temps d'immersion. (a) Morphologie de la surface sous lumière blanche pour différents polissages chimiques. (b) Morphologie 3D de la surface sous lumière blanche pour différents polissages chimiques. (c) Morphologie de la surface sous MEB pour différents polissages chimiques. Pour chaque sous-figure, chaque colonne représente une composition et chaque ligne représente un temps d'immersion.

Le pourcentage de HF au sein de la solution semble influencer la puissance de la réaction. En particulier, la composition (10% HF, 10% HNO_3) affecte significativement la surface avec la formation de couche d'oxyde à la surface (figure 2.27.a), allant jusqu'à la fissuration de la pièce (figure 2.27.b). Il est à noter qu'aucun traitement n'a été appliqué aux éprouvettes pour diminuer les contraintes résiduelles. Cela peut donc expliquer la fissuration observée.



(a) *(b)*

Figure 2.27 : Défauts de surface observés pour un polissage chimique (10% HF, 10% HNO_3). (a) Couche d'oxyde due au polissage chimique. (b) Fissuration observée.

2.3.2.3. Paramètres de rugosité

Le tableau 2.8 donne la valeur des paramètres de rugosité pour les différentes compositions et les différents temps d'immersion. La surface S310 présente une diminution de la rugosité avec l'augmentation du temps d'immersion, passant d'une valeur de S_a de 14.5 µm (± 2.6) pour cinq min à un S_a de 6.8 µm (± 0.7) pour 30 min. Les paramètres S_q, S_t et S_{dr} suivent les mêmes évolutions. Le paramètre S_{sk} garde des valeurs positives durant l'ensemble du polissage chimique, excepté à t=30 min où la porosité locale apparait à la surface (reflétée par un S_{sk} <0). En termes de texture, une augmentation de S_{tr} est observée pour atteindre la valeur de 0.51 (± 0.12) à t=30 min, montrant ainsi une diminution de l'anisotropie topographique de la surface. Cependant, la surface ne peut être considérée comme homogène que à t=30 min. En termes de longueur d'onde via le paramètre S_{al}, une augmentation de celle-ci est observée avec le temps d'immersion, pour atteindre une valeur supérieure à 100 µm à t=30 min.

La surface S320 montre une évolution similaire avec l'augmentation du temps d'immersion. Une diminution du paramètre S_a est enregistrée durant les 20 premières minutes, passant de 12.1 µm (± 2.8) pour 5 min à 7.6 µm (± 1.4) pour 20 min. Une augmentation de R_a est cependant observée de t=20 min à t=30 min, arrivant à une valeur de 9.2 µm (± 1.6). La même évolution est observée pour S_q, S_t et S_{dr}, bien qu'aucune différence significative ne soit relevée entre t=20 min et t=30 min pour S_z et S_{dr}. Quant au paramètre S_{sk}, il reste positif jusqu'à t=20 min où des valeurs négatives commencent à être observées, révélant l'apparition de porosités locales. L'évolution du paramètre S_{tr} suit celle de la surface S310, avec cependant une anisotropie persistante même à t=30 min. En termes de longueur d'onde, S_{al} augmente avec le temps d'immersion, pour atteindre une valeur supérieure à 100 µm à t=30 min.

Enfin, la surface S1010 affiche une forte diminution de la rugosité durant les 5 premières minutes, où R_a prend la valeur de 4.8 µm (± 0.1) à t=5 min. Une diminution plus faible de cette rugosité est ensuite mesurée pour atteindre la valeur de 2.2 µm (± 0.3) à t=30 min. La relation directe entre les paramètres de rugosité fait que S_q, S_t et S_{dr} suivent la même évolution. En termes de S_{sk}, celui-ci reste proche de 0 à t=5 min, puis devient négatif avec l'augmentation de la porosité locale. L'évolution de S_{tr}

montre que les valeurs oscillent autour de 0.5 en restant globalement supérieures, tandis que l'évolution de S_{al} montre des valeurs supérieures ou égales à 200 µm.

Composition	t (min)	S_a (µm)	S_q (µm)	S_t (µm)	S_{sk}	S_{dr}	S_{tr}	S_{al}
S310	5	14.5 (± 2.6)	16.7 (± 2.2)	101.3 (± 13.6)	0.47 (± 0.13)	2.02 (± 0.07)	0.32 (± 0.1)	72 (± 15)
	10	12.8 (± 1.9)	16.3 (± 2.7)	95.5 (± 18.7)	0.64 (± 0.07)	1.71 (± 0.2)	0.31 (± 0.2)	62 (± 23)
	15	9.7 (± 1.9)	12.2 (± 1.7)	74.1 (± 8.6)	0.27 (± 0.17)	1.41 (± 0.08)	0.43 (± 0.21)	75 (± 32)
	20	8.4 (± 2.2)	10.7 (± 2.8)	50.8 (± 6.2)	0.32 (± 0.18)	1.34 (± 0.07)	0.34 (± 0.13)	98 (± 45)
	30	5.9 (± 0.7)	8.4 (± 0.6)	40.7 (± 4.6)	-0.03 (± 0.28)	1.26 (± 0.09)	0.51 (± 0.12)	110 (± 32)
S320	5	12.1 (± 2.8)	16.2 (± 3)	111 (± 13.3)	0.85 (± 0.75)	1.99 (± 0.21)	0.36 (± 0.17)	48 (± 15)
	10	10.7 (± 1.6)	13.6 (± 2.1)	89.2 (± 16.1)	0.23 (± 0.18)	1.75 (± 0.18)	0.21 (± 0.15)	33 (± 22)
	15	10.3 (± 1.3)	12.9 (± 1.5)	80.1 (± 11.1)	0.13 (± 0.18)	1.5 (± 0.11)	0.33 (± 0.19)	86 (± 45)
	20	7.6 (± 1.4)	9.9 (± 1.2)	59.6 (± 13.7)	-0.23 (± 0.44)	1.47 (± 0.11)	0.52 (± 0.21)	95 (± 16)
	30	9.2 (± 1.6)	11.8 (± 1.2)	58.9 (± 19.9)	-0.18 (± 0.2)	1.45 (± 0.15)	0.47 (± 0.29)	104 (± 23)
S1010	5	4.8 (± 0.1)	6 (± 0.14)	27.3 (± 1.6)	0.08 (± 0.06)	1.25 (± 0.03)	0.45 (± 0.1)	190 (± 30)
	10	2.9 (± 0.8)	3.6 (± 0.3)	12.7 (± 2.6)	-0.04 (± 0.06)	1.2 (± 0.04)	0.67 (± 0.15)	231 (± 25)
	15	2.5 (± 0.5)	3.2 (± 0.7)	13.6 (± 2.9)	-0.33 (± 0.91)	1.14 (± 0.19)	0.53 (± 0.14)	270 (± 26)
	20	3 (± 1.2)	3.8 (± 1.5)	15.9 (± 3.2)	-0.05 (± 0.15)	1.09 (± 0.04)	0.45 (± 0.16)	265 (± 32)
	30	2.2 (± 0.3)	2.8 (± 0.6)	15 (± 2.8)	-0.18 (± 0.2)	1.03 (± 0.06)	0.5 (±0.08)	298 (± 24)

Tableau 2.8 : Valeur des paramètres de rugosité pour les différentes compositions et les différents temps d'immersion.

2.3.2.4. Perte de matière

La modification de la surface suite au polissage chimique s'accompagne d'une perte de matière à prendre en compte. La mesure de la perte de matière ainsi que l'estimation de la perte d'épaisseur *e* d'une moitié de l'éprouvette sont présentées au sein des figures 2.28b et 2.28c. La perte d'épaisseur estimée *e* correspond à la moitié de la différence d'épaisseur de l'éprouvette avant traitement et l'éprouvette après traitement (figure 2.28a).

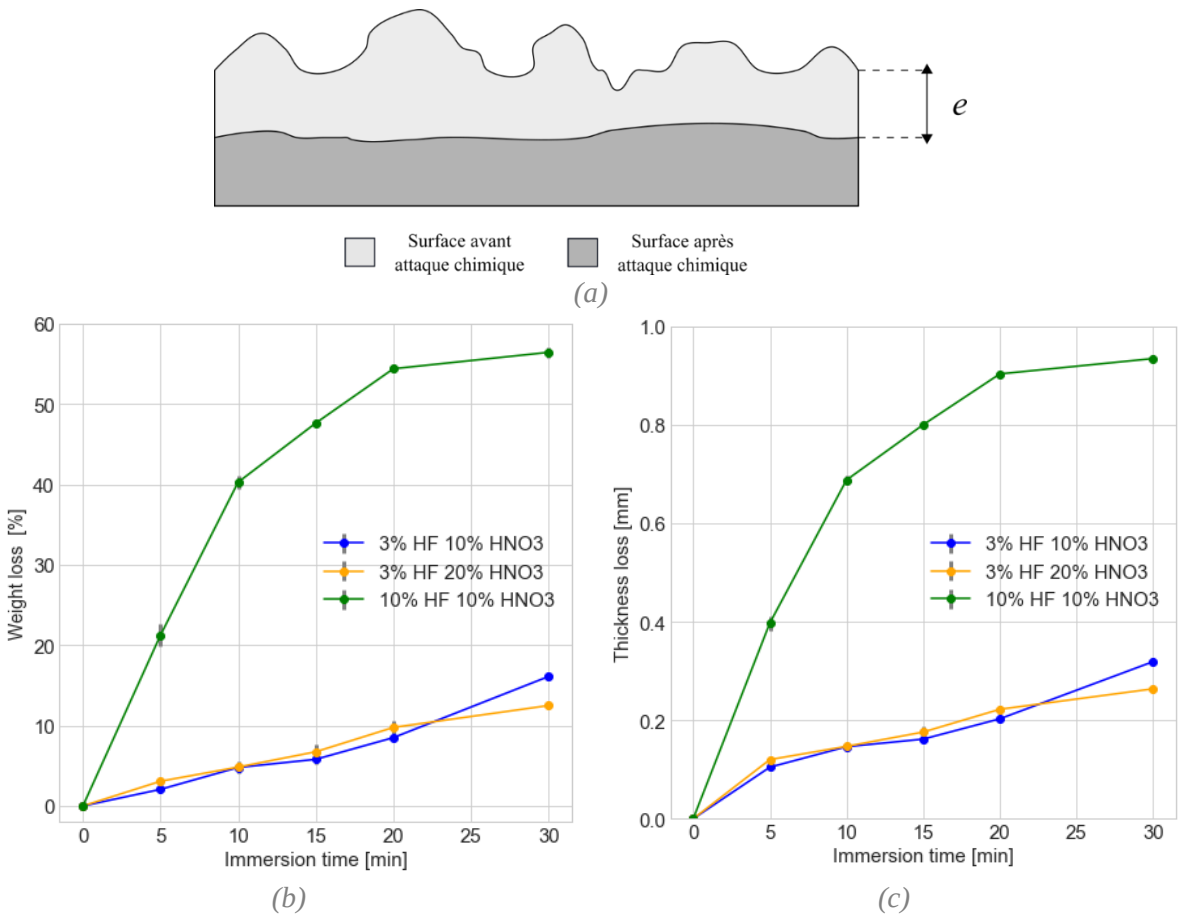


Figure 2.28 : Evolution de la perte de poids ainsi que de la perte d'épaisseur e d'éprouvettes 90B traitées chimiquement selon différentes compositions et différents temps d'immersion. (a) Schéma de la perte d'épaisseur e *de la surface. (b) Perte de poids. (c) Perte d'épaisseur e.*

La cinétique de la perte de poids de S310 montre une perte de 0.4%/min du poids de l'éprouvette durant les 5 premières minutes, correspondant à une perte d'épaisseur d'environ 20 µm/min. Après ces 5 minutes, une diminution de la vitesse de réaction est observée, avec une perte de poids global de 0.6%/min de t=10 min à t=30 min, correspondant à une perte d'épaisseur de 9 µm/min. Une perte de poids totale de 16% (± 0.2) est donc atteinte pour une perte d'épaisseur totale de 319 µm (± 3).

La cinétique de la perte de poids de S320 suit une évolution similaire, avec une perte de 0.6%/min de la masse durant les 5 premières minutes, correspondant à une perte d'épaisseur d'environ 24 µm/min. De t=5 min à t=30 min, une perte de poids de 0.4%/min est observée, correspondant à une perte d'épaisseur d'environ 6 µm/min. Au final, une perte de poids totale de 12% (± 0.3) est mesurée pour une perte d'épaisseur totale de 264 µm (± 4).

Enfin, la cinétique de S1010 montre une perte de 4%/min de la masse durant les 5 premières minutes, correspondant à une perte d'épaisseur d'environ 80 µm/min, suivi par une perte de 1.2%/min de la masse, correspondant à une perte d'épaisseur d'environ 18 µm/min durant le reste du temps d'immersion. En fin de réaction (t=30 min), une perte de poids totale de 56% (± 0.3) est enregistrée pour une perte d'épaisseur totale de 934 µm (± 6).

2.3.2.5. Mouillabilité

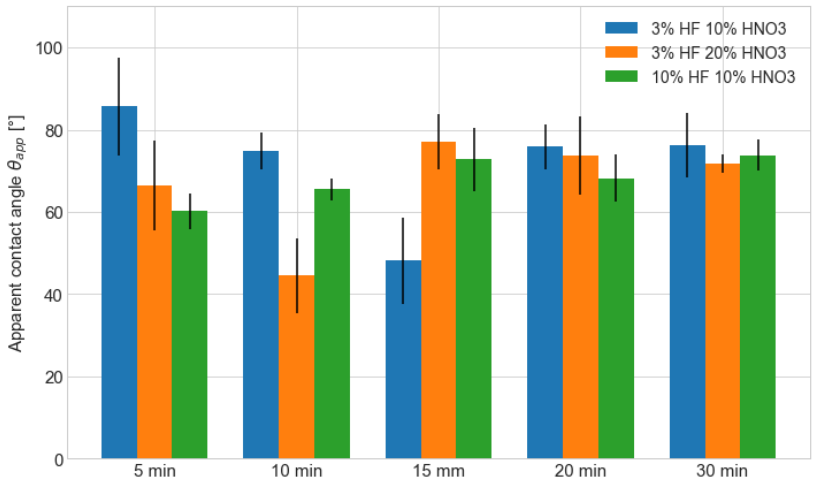
La figure 2.29 donne les résultats de la mouillabilité des surfaces attaquées chimiquement en fonction de la composition de la solution de polissage et du temps d'immersion. L'ensemble des

compositions chimiques du polissage montre des variations significatives de la mouillabilité, et cela durant le temps d'immersion.

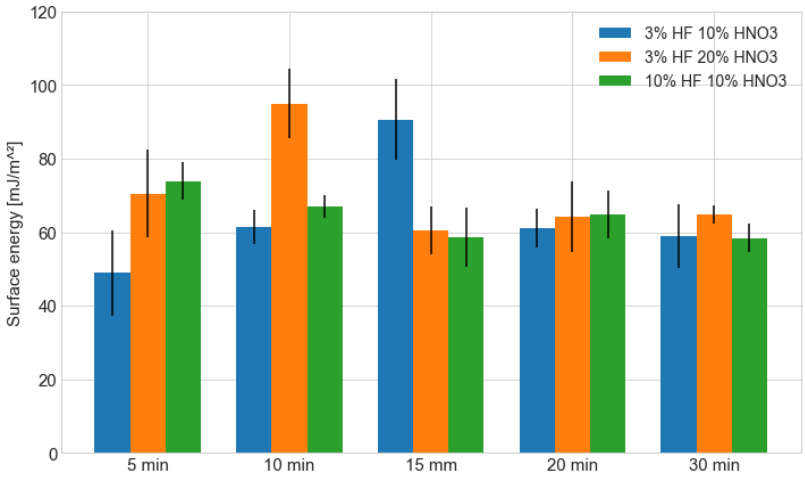
La surface S310 montre une diminution significative de l'angle de contact apparent aqueux θ_{eau} durant les quinze premières minutes, jusqu'à atteindre la valeur de 48.1° (± 10.4). Une augmentation de θ_{eau} est alors observée de t=15 min à t=20 min pour atteindre la valeur de 75.8° (± 5.5). Aucune différence significative n'est observée entre t=20 min et t=30 min (p=0.89, Kruskal-Wallis). Simultanément, S310 présente une augmentation initiale de l'énergie de surface apparente Υ_{app} durant les 15 premières minutes pour atteindre la valeur de 90.6 mJ/m² (± 11), suivie par une diminution jusqu'à 61 mJ/m² (± 5.2) à t=20 min. Aucune différence significative n'est observée entre t=20 min et t=30 min (p=0.89, Kruskal-Wallis). Une corrélation négative forte est trouvée entre θ_{eau} et Υ_{app} (c>0.9 et p<0.05, Spearman).

S320 présente aussi une diminution de θ_{eau} (jusqu'à la 10ème minute) prenant la valeur de 44.6° (± 9.1). L'angle de contact aqueux θ_{eau} montre ensuite une augmentation pour atteindre la valeur de 77° (± 6.7). Aucune différence n'est observée entre t=15 min et t=30 min (p=0.5, Kruskal-Wallis). Simultanément, Υ_{app} suit une évolution opposée avec un maximum à 95 mJ/m² (± 9.4) et une stabilisation à 60.6 mJ/m² (± 6.4).

Enfin, S1010 présente un θ_{eau} minimum à 5 minutes pour une valeur de 60.3° (± 4.3), puis une augmentation jusqu'à t=10 min avec une valeur de 65.5° (± 2.8). Aucune différence n'est observée entre t=15 min et t=30 min (p=0.5, Kruskal-Wallis). Simultanément, Υ_{app} suit une évolution opposée avec un maximum à 73.9 mJ/m² (± 5.2) et une stabilisation à 67 mJ/m² (± 3.2).



(a)



(b)

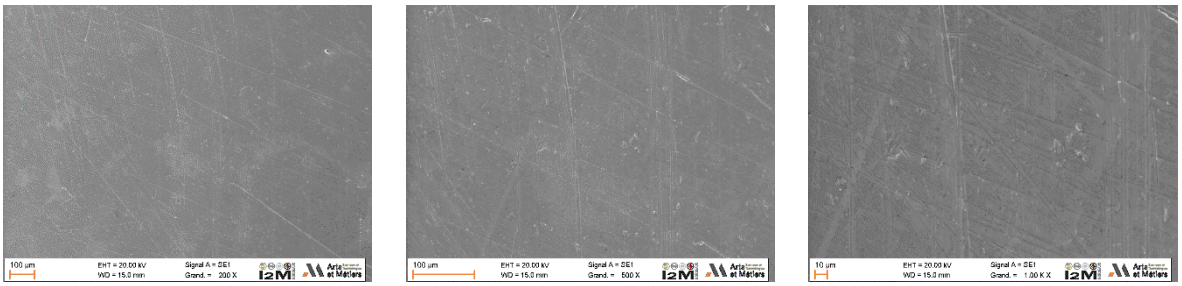
Figure 2.29 : Evolution de θ_{eau} et Υ_{app} d'éprouvettes 90B traitées chimiquement selon différentes compositions et différents temps d'immersion. (a) Angle de contact aqueux θ_{eau}. (b) Energie de surface apparent Υ_{app}.

2.3.3. Polissage chimique d'une surface 90B polie par abrasion

Les modifications de surface via le polissage chimique montrent un effet direct sur la topographie de surface ainsi que sur la mouillabilité. Or, il existe une relation directe entre ces deux paramètres qu'il est important de comprendre.

2.3.3.1. Matériels et méthodes

Des éprouvettes 90B sont fabriquées selon une géométrie et un procédé d'obtention décrits au sein de la section 2.1. Les supports sont alors retirés et les éprouvettes sont nettoyées. Ces éprouvettes sont alors polies par abrasion en utilisant du papier abrasif, caractérisé par une taille de grains qui définie la précision du polissage. Le polissage suit la séquence suivante (P80 (201 µm) → P100 (162 µm) → P400 (35 µm) → P800 (25 µm) → P1200 (18 µm) → P2400 (10 µm)). Un traitement chimique avec une composition de (3% HF, 10% HNO_3) selon 5 temps d'immersion (5 min, 10 min, 15 min, 20 min et 30 min) est ensuite appliqué. Les surfaces obtenues prennent respectivement le nom P5, P10, P15, P20 et P30. Pour chaque temps d'immersion, cinq éprouvettes sont testées. Après chaque polissage chimique, les éprouvettes sont nettoyées dans un bain d'éthanol et d'eau distillée au sein d'une cuve à ultrasons afin de retirer toutes les traces d'acides. La masse de chaque éprouvette est mesurée avant et après polissage chimique afin de pouvoir estimer la perte de matière. La figure 2.30 donne la morphologie de la surface polie observée au MEB.



(a) X 200 *(b) X 500* *(c) X 1000*

Figure 2.30 : Morphologie de la surface polie obtenue au MEB selon différents grossissements.

2.3.3.2. Morphologie et paramètres de rugosité

La figure 2.31 ainsi que le tableau 2.9 montrent la morphologie des surfaces polies attaquées chimiquement ainsi que les valeurs des paramètres de rugosité. Contrairement aux autres études, les paramètres S_{tr} et S_{al} ne sont pas donnés car les faibles valeurs de rugosité donnaient des valeurs aberrantes.

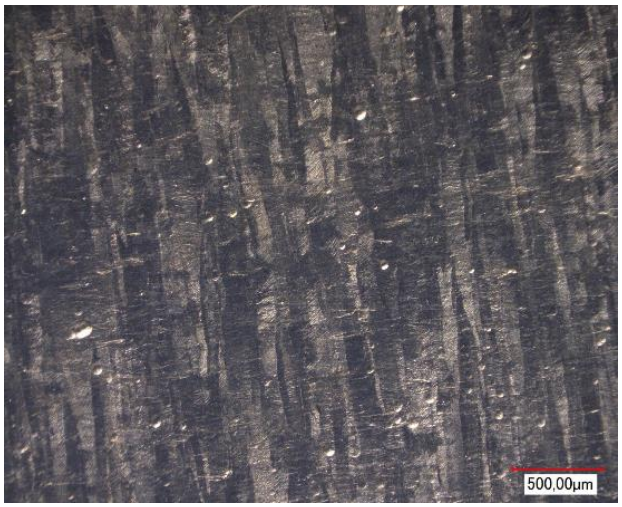


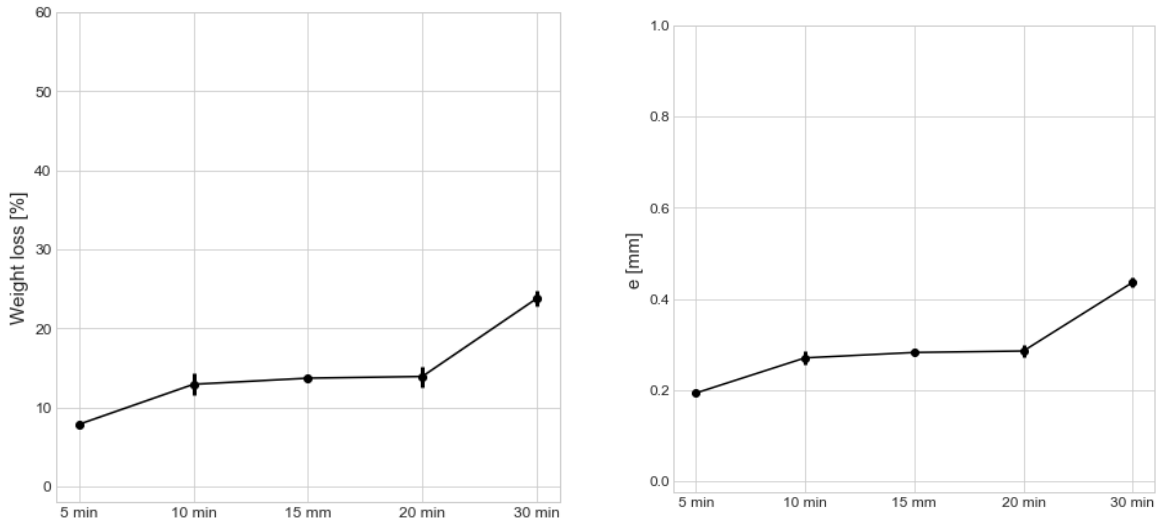
Figure 2.31 : Morphologie de la surface P15.

L'étude des paramètres de rugosité montre que la surface polie reste relativement plane durant le polissage chimique, avec cependant une légère augmentation de la rugosité avec le temps d'immersion. En effet, S_a varie de 0.9 µm (± 0.2) à l'état initial jusqu'à 1.61 µm (± 0.22) à t=20 min. Aucune différence significative n'est observée entre t=20 min et t=30 min. S_q, S_t ainsi que S_{dr} suivent le même type d'évolution. Le paramètre S_{sk} oscille autour de 0 à l'état initial et durant le polissage chimique, excepté pour t=30 min où la porosité locale change S_{sk} en une valeur négative.

	S_a (µm)	S_q (µm)	S_t (µm)	S_{sk}	S_{dr}	S_{tr}	S_{al} (µm)
Non traitée	0.9 (± 0.2)	1.5 (± 0.1)	10.1 (± 1.1)	0.05 (± 0.01)	1.01 (± 0.01)		
P5	1.12 (± 0.11)	1.8 (± 0.4)	10.5 (± 1.3)	0.02 (± 0.01)	1.03 (± 0.01)		
P10	1.37 (± 0.14)	2.2 (± 0.5)	12.4 (± 1.2)	0.12 (± 0.14)	1.04 (± 0.01)		
P15	1.3 (± 0.13)	2.1 (± 0.5)	11 (± 1.5)	0.25 (± 0.14)	1.06 (± 0.02)		
P20	1.61 (± 0.22)	2.6 (± 0.6)	16 (± 1.6)	-0.06 (± 0.06)	1.12 (± 0.02)		
P30	1.45 (± 0.1)	2.4 (± 0.7)	18.6 (± 3.2)	-1.3 (± 0.24)	1.09 (± 0.02)		

Tableau 2.9 : Valeurs des paramètres de rugosité des surfaces polies traitées chimiquement pour les différents temps d'immersion.

La figure 2.32 présente la perte de matière ainsi que la perte d'épaisseur en fonction du temps d'immersion. La perte de matière prend en compte comme masse de départ celle résultant du polissage abrasif. En termes d'évolution, de t=5 min à t=30 min, on observe une perte de poids moyenne de 0.6%/min, correspondant à une perte d'épaisseur d'environ 8 µm/min (allure proche de ce qui est observé sur les éprouvettes 90B non polies).

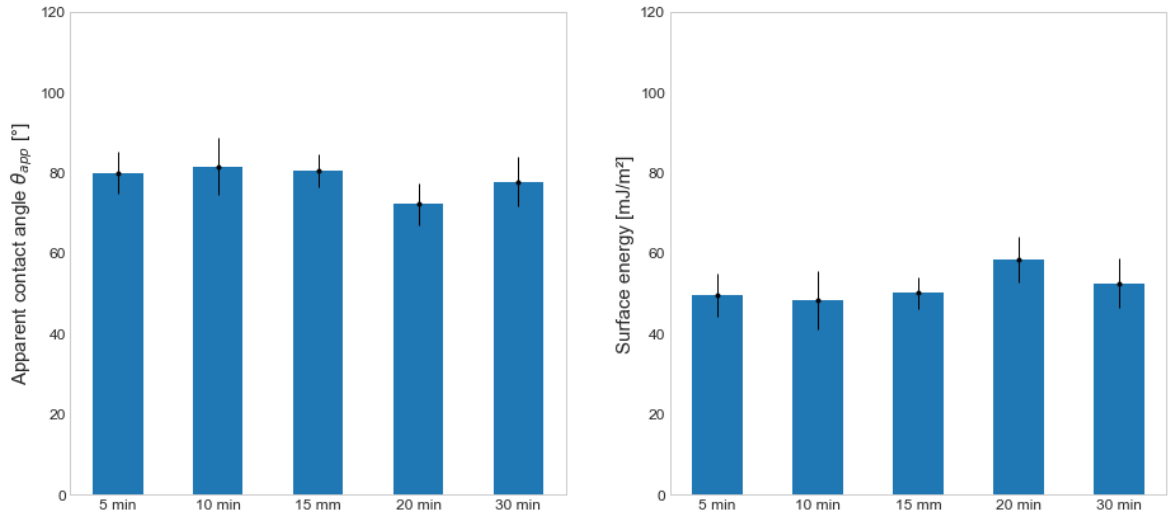


(a) *(b)*

Figure 2.32 : Evolution de la perte de poids et de la perte d'épaisseur e de surfaces polies traitées chimiquement en fonction du temps d'immersion. (a) Perte de poids. (b) Perte d'épaisseur.

2.3.3.3. Mouillabilité

En termes de mouillabilité, la figure 2.33 présente l'évolution de l'angle de contact aqueux θ_{eau} ainsi que celle de l'énergie de surface apparente en fonction du temps d'immersion. La surface exclusivement polie se définit par un angle de contact aqueux θ_{eau} de 78.6° (± 6) correspondant à une énergie de surface de 52.7 mJ/m² (± 6.2). Aucune différence significative n'est observée durant les 15 premières minutes pour θ_{eau} et Υ_{app} (p=0.13, Kruskal-Wallis). Une diminution de θ_{eau} est observée à t=20 min à la valeur de 70° (± 6.1) correspondant à une augmentation de Υ_{app} à la valeur de 64.2 mJ/m² (± 6.8). A t=30 min, θ_{eau} augmente à la valeur de 75.4° (± 7.2) correspondant à une diminution de Υ_{app} à la valeur de 57.5 mJ/m² (± 7.4).



(a) *(b)*

Figure 2.33 : Evolution de θ_{eau} et de Υ_{app} pour des éprouvettes 90B polies et traitées chimiquement par une solution de 3% HF et 10% HNO_3 en fonction du temps d'immersion. (a) Angle de contact aqueux θ_{eau}. (b) Energie de surface apparent Υ_{app}.

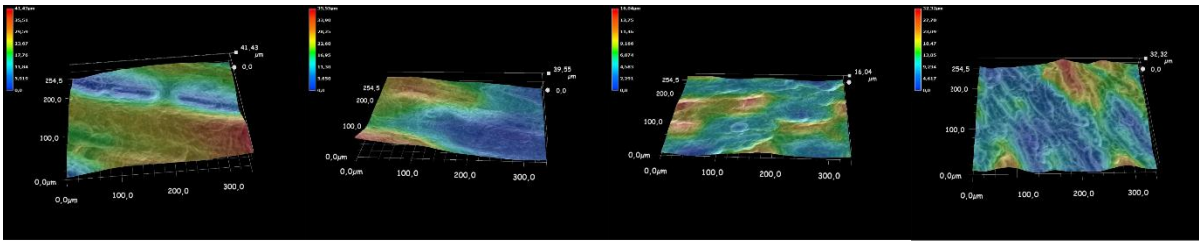
2.3.4. Polissage chimique pour différentes inclinaisons de fabrication

2.3.4.1. Matériels et méthodes

Des éprouvettes 0B, 30B, 60B et 90B sont fabriquées selon la géométrie et le procédé d'obtention décrit au sein de la section 2.1. Les supports sont alors retirés et les éprouvettes sont nettoyées, puis traitées chimiquement avec une composition de (3% HF, 10% HNO_3) pour 30 min. Les surfaces 0B, 30B, 60B et 90B obtenues par polissage chimique prennent respectivement le nom 0AC, 30AC, 60AC et 90AC. Pour chaque surface, cinq éprouvettes sont testées. Après chaque polissage chimique, les éprouvettes sont nettoyées dans de l'éthanol et de l'eau distillée au sein d'une cuve à ultrasons afin de retirer toutes traces d'acides. La masse de chaque éprouvette est mesurée avant et après polissage chimique afin de pouvoir estimer la perte matière.

2.3.4.2. Morphologie et paramètres de rugosité

La figure 2.34 ainsi que le tableau 2.10 décrivent le changement de topographies sur les surfaces à différentes orientations après polissage chimique.



(a) 0° (b) 30° (c) 60° (d) 90°

Figure 2.34 : Morphologie 3D des éprouvettes 0B, 30B, 60B et 90B traitées chimiquement.

En termes de paramètres de rugosité, S_a décroît avec l'orientation α allant de 0° à 60°, avec les valeurs allant de 7.88 µm (± 0.56) à 4.79 µm (± 0.21). Une augmentation de la rugosité pour 90AC avec une valeur de S_a de 6.51 µm (± 1.39) est cependant mesurée. La même évolution est observée pour S_q et S_t. Concernant S_{sk}, 0AC, 30AC et 90AC présentent des valeurs négatives proches de 0 tandis que 60AC montre un S_{sk} positif mais proche de 0. Des différences sont observées pour le paramètre S_{dr}. En effet, si une augmentation est observée de 0AC à 30AC (tableau 2.10), on observe cependant une diminution pour 60AC et 90AC. En comparant les valeurs des rugosités à leurs homologues non traitées (0B, 30B, 60B et 90B), de nombreuses différences sont visibles selon l'inclinaison de la surface. Concernant le paramètre S_a, une diminution de 21% est observée pour 0AC tandis qu'une diminution proche de 60% est observée pour 30AC, 60AC et 90AC. Concernant le paramètre S_{dr}, une diminution de 6% est observée sur 0AC tandis que cette diminution augmente avec l'inclinaison, de 41% pour 30° à 62% pour 90°. En termes de texture, 0AC continue de présenter une anisotropie de surface comparée à 0B. Cependant, le paramètre S_{al} observé est plus élevé. Pour 30AC, une augmentation du paramètre S_{tr} est mesurée par rapport à 30B, montrant un lissage de la surface qui est aussi reflété par une légère augmentation de S_{al}. Pour la surface 60AC, une anisotropie de la surface est toujours présente, avec cependant une forte augmentation de S_{al} au-delà de 100 µm par rapport à 60B. 90AC montre une diminution de S_{tr}, restant tout de même au-dessus de 0.5 et une augmentation significative de S_{al}.

	S_a (µm)	S_q (µm)	S_t (µm)	S_{sk}	S_{dr}	S_{tr}	S_{al} (µm)
0AC	7.9 (± 0.6)	9.6 (± 0.7)	36.2 (± 8.2)	-0.08 (± 0.1)	1.30 (± 0.02)	0.38 (± 0.2)	219.7 (± 51.6)
30AC	6.3 (± 0.3)	7.4 (± 0.4)	41.7 (± 2.2)	-0.3 (± 0.1)	1.35 (± 0.03)	0.71 (± 0.23)	153.3 (± 32.3)
60AC	4.8 (± 0.2)	5.6 (± 0.2)	32.7 (± 2.7)	0.1 (± 0.2)	1.29 (± 0.01)	0.45 (± 0.1)	110.5 (± 41.2)
90AC	6.5 (± 1.4)	7.8 (± 1.6)	40.7 (± 4)	-0.03 (± 0.2)	1.23 (± 0.06)	0.51 (± 0.12)	110 (± 32)

Tableau 2.10 : Valeurs des paramètres de rugosité pour des éprouvettes 0B, 30B, 60B et 90B traitées chimiquement.

2.3.4.3. Perte de matière

En termes de cinétique de perte de matière (figure 2.35), une perte d'épaisseur de 249 µm (± 24) est mesurée sur 0AC, suivie par une perte d'épaisseur de 356 µm (± 19) sur 30AC. Cette perte de matière diminue alors avec l'inclinaison, afin d'atteindre la valeur de 321 µm (± 10) sur 90AC.

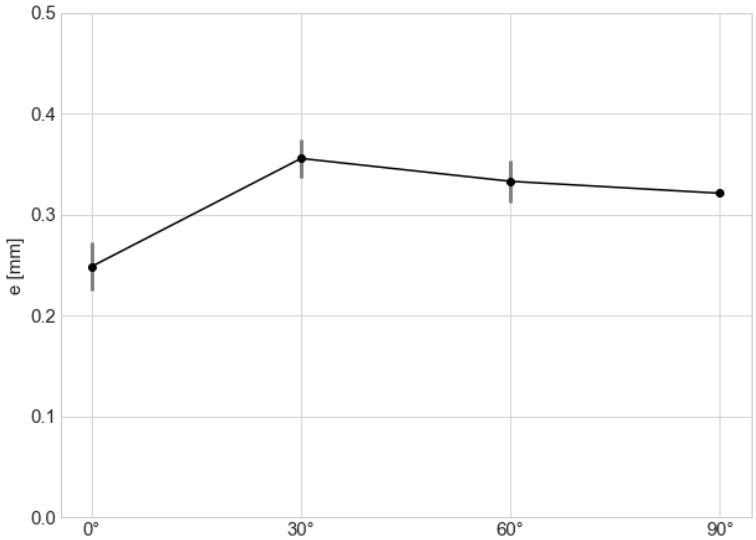
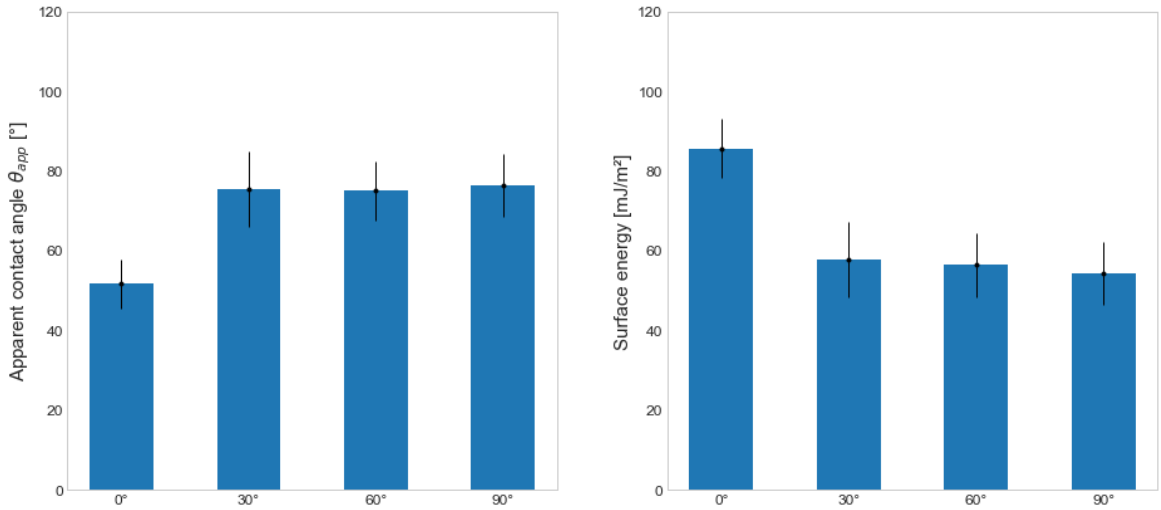


Figure 2.35 : Evolution de la perte d'épaisseur e de surfaces 0B, 30B, 60B et 90B traitées chimiquement.

2.3.4.4. Mouillabilité

En termes de mouillabilité, la figure 2.36 présente l'évolution de l'angle de contact aqueux θ_{eau} ainsi que de l'énergie de surface apparente Υ_{app} en fonction du temps d'immersion. Les résultats de θ_{eau} valident l'effet positif du polissage chimique sur la mouillabilité de la surface. En effet, l'ensemble des surfaces montrent des propriétés hydrophiliques, indépendamment de l'inclinaison α. Pour 0AC, un θ_{eau} de 51.7° (± 6.3) est mesuré pour un Υ_{app} de 85.7 mJ/m² (± 9.4). Une augmentation est alors observée en termes de θ_{eau} pour 30AC avec une valeur de 75.5° (± 9.5), correspondant à une baisse de Υ_{app} à 57.7 mJ/m² (± 9.4). Aucune différence significative n'est observée en termes de θ_{eau} pour 30AC, 60AC et 90AC (p=0.84, Kruskal-Wallis) et Υ_{app} suit le même comportement. Comparativement aux surfaces non traitées, une diminution de θ_{eau} de 32% est enregistrée pour 0AC, alors que cette diminution oscille entre 10% et 20% pour les autres inclinaisons. Concernant Υ_{app}, une augmentation d'environ 40% est observée pour l'ensemble des inclinaisons par rapport aux surfaces non traitées.



(a) *(b)*

Figure 2.36 : Evolution de θ_{eau} et de Υ_{app} en fonction de l'inclinaison pour des éprouvettes 0B, 30B, 60B et 90B traitées chimiquement par une solution de 3% HF et 10% HNO_3 pour 30 minutes. (a) Angle de contact aqueux θ_{eau}. (b) Energie de surface apparent Υ_{app}.

2.3.5. Discussion de l'impact du polissage chimique

Le but du polissage chimique est d'éliminer la rugosité de type III de la surface et d'améliorer sa topographie pour obtenir une bonne biocompatibilité cellulaire. Cela passe par une diminution de l'amplitude de la rugosité ainsi que par une augmentation de la longueur d'onde de la texture de la surface afin de générer une longueur d'onde supérieure à la dimension de la cellule. Par ailleurs, l'autre objectif est d'obtenir des propriétés hydrophiles au niveau de la surface.

Afin de déterminer l'efficacité du polissage chimique à base de HF/HNO_3, une analyse de la composition de la solution de polissage ainsi que du temps d'immersion est réalisée sur des surfaces obtenues par SLM. Les variations de la composition de la solution de polissage chimique ainsi que du temps d'immersion ont montré une influence significative sur la topographie de la surface ainsi que sur la mouillabilité. En effet, l'amplitude de la rugosité présente une décroissance suivant l'augmentation du temps d'immersion pour l'ensemble des compositions.

2.3.5.1. Analyse de la rugosité

Le polissage chimique (3% HF, 10% HNO_3) génère une réduction significative de la rugosité microscopique selon le temps d'immersion ; l'amplitude des rugosités (S_a, S_q, S_t) est divisée par deux après 30 minutes. Cette évolution est aussi observée pour une composition (3% HF, 20% HNO_3) bien que le minimum de rugosité soit atteint plus rapidement et soit suivi d'une nouvelle augmentation de la rugosité. La composition (10% HF, 10% HNO_3) présente quant à elle une forte diminution de la rugosité, atteignant un tiers de la rugosité initiale après 5 minutes seulement. Ces résultats suggèrent que le pourcentage de HF contrôle la puissance de la réaction et la réduction de la rugosité, tandis que la proportion en HNO_3 contrôle la vitesse de la réaction (résultats validés par Sutter et al [28]).

Le polissage chimique joue aussi sur la répartition de la rugosité à la surface. L'étude du paramètre S_{sk} a montré des valeurs positives pour les surfaces 90B non traitées en raison de la présence de la rugosité de type III qui génère une prédominance de pics. Après les différents polissages chimiques, une diminution de R_{sk} est observée pour les compositions de polissages chimiques. Cette diminution suit celle de l'amplitude de la rugosité, jusqu'à obtenir une certaine planéité. Cette planéité atteinte, le polissage chimique creuse la surface, aboutissant à la mesure d'un S_{sk} négatif. L'analyse de S_{sk} nous

permet donc de distinguer 3 phases successives au cours du polissage chimique : (i) la disparition de la rugosité de type III de la surface ; (ii) la réduction de l'amplitude de la rugosité jusqu'à obtenir une certaine planéité ; et (iii) la création de porosités locales.

Des paramètres spatiaux en deux dimensions sont aussi analysés afin de déterminer la texture de la surface et son évolution (i.e. S_{dr}, S_{tr} et S_{al}). A l'état initial, la surface 90B présente une grande surface développée créée par la rugosité de type III. Malgré l'anisotropie de surface créée par la fabrication additive, la rugosité de type III rend la surface homogène avec une très faible longueur d'onde due à la présence des particules. Le polissage chimique modifie significativement ces paramètres. Pour (3% HF, 10% HNO_3) et (3% HF, 20% HNO_3), le polissage chimique s'accompagne d'une baisse de la surface développée S_{dr}, avec cependant une augmentation de la longueur d'onde S_{al}. Pour ce qui est de l'uniformité de la texture de la surface, la disparition initiale de la rugosité de type III entraîne une baisse du paramètre S_{tr} avec la mise en avant de l'anisotropie de surface créée par la fabrication additive. Cependant, l'accroissement de la durée d'immersion fait augmenter peu à peu l'uniformité de la surface. Concernant la composition (10% HF, 10% HNO_3), l'uniformité de la surface est atteinte après cinq minutes, avec une forte augmentation de la longueur d'onde et une forte diminution de la surface développée.

2.3.5.2. Analyse de la perte de matière

La réduction de la rugosité de la surface s'accompagne d'une perte de matière significative. Pour l'ensemble des compositions, une forte perte d'épaisseur est observée durant les 5 premières minutes, malgré un faible changement en termes de pertes de poids, qui se stabilise pour des temps d'immersion plus longs. Si cela peut s'expliquer par une quantité de réactifs plus importante dans la solution, cela vient aussi de la perte de la couche externe du matériau qui intègre la rugosité (assimilable à une couche homogène de TA6V de plus faible densité). Les échantillons traités à (3% HF, 10% HNO_3) et (3% HF, 20% HNO_3) présentent des pertes similaires de poids tout le long de la réaction jusqu'à t=20 min où la perte semble être plus importante sur (3% HF, 10% HNO_3). En fin de réaction, une perte de poids moyenne d'environ 15% est enregistrée pour une perte d'épaisseur de surface d'environ 300 µm. La composition (10% HF, 10% HNO_3) montre la plus grande cinétique de polissage chimique, avec une perte de poids totale de 60% pour une perte d'épaisseur de surface de presque 1 mm. Selon la dimension du volume attaqué chimiquement et les tolérances à respecter, ces pertes de matières seront des facteurs significatifs à prendre en compte dès la phase de conception d'une pièce mécanique.

2.3.5.3. Analyse de la mouillabilité

La mouillabilité des surfaces est étudiée en termes d'angle de contact aqueux θ_{eau} et d'énergie de surface apparent Υ_{app}. L'ensemble des mesures de mouillabilité a montré une corrélation négative entre la mesure de θ_{eau} et l'estimation de Υ_{app}. Ainsi, l'observation seule de θ_{eau} permet d'estimer la mouillabilité et l'énergie libre de la surface. Pour l'ensemble des compositions chimiques, une baisse significative de θ_{eau} est observée durant la phase initiale (t=5 min) suivant la disparition de la rugosité de type III (i.e. particules enkystées) qui donne ainsi un caractère hydrophile aux surfaces. Pour (3% HF, 10% HNO_3), un minimum de θ_{eau} est mesuré à 15 min respectivement, suivi par une stabilisation des valeurs après la 15ème minute. Ce même minimum est observé pour (3% HF, 20% HNO_3). Cependant, celui-ci est atteint plus rapidement (à t=10 min) et il se stabilise à la même valeur qu'avec la composition précédente. Une composition proche (2.2% HF, 20% HNO_3) a été étudiée par Wysocki et al [29], [30], montrant un minimum atteint après 6 minutes pour une valeur de 45°. Bien que proche, nous obtenons une valeur de mouillabilité moins élevée. Pour finir, θ_{eau} des éprouvettes traitées à (10% HF, 10% HNO_3) atteint son minimum avant 5 minutes, et se stabilise pour un temps suffisamment long autour des valeurs des deux premières compositions.

Ces résultats confirment les relations de modèles de mouillabilité en affirmant le lien entre la topographie de la surface et sa mouillabilité apparente [14], [15]. Cependant, d'autres facteurs peuvent intervenir, tels que : (i) les changements de composition chimique de la surface apportée par le polissage chimique ; (ii) les changements de propriétés mécaniques observées au sein du matériau. Concernant (i), pour des raisons de calendrier, nous n'avons pas caractérisé à ce jour, les changements de composition chimique de la surface résultant du polissage. L'étude du polissage chimique (3% HF, 10% HNO_3) a cependant été réalisée sur une surface polie où les effets de la rugosité sont minimisés (faible variation de S_a et topographie spécifique à l'échelle microscopique et nanoscopique). Si l'on excepte les résultats à t=20 min, aucune différence significative n'est observée sur θ_{eau} et Υ_{app}. L'étude de Zahran et al [31], a montré que les changements de composition chimique dus au polissage chimique d'une surface en titane polie au HF pouvaient apporter des changements de mouillabilité, mais seulement durant les 3 premières minutes. La rugosité devenait par la suite déterminante dans l'évolution de la mouillabilité. Tout ceci permet donc de supposer que le changement de composition chimique a un effet moins important sur la mouillabilité que la rugosité de la surface. Concernant (ii), des modifications de mouillabilité sont observées selon la profondeur au sein du matériau, selon un gradient de dureté. Le polissage chimique creusant le matériau, ce gradient de propriétés matériaux influence donc la mouillabilité selon les pertes matières, et donc le temps d'immersion. Les variations de mouillabilité observées pour les différentes compositions sont cependant plus importantes que ce qui est présenté au sein de la figure 2.24. Une hypothèse peut donc être formulée : la rugosité influence la mouillabilité de façon prépondérante.

En supposant que le TA6V soit un matériau hydrophile (θ_Y<90°) et en se référant aux modèles de mouillabilité présentés dans la section 2.1.4, deux évolutions de la mouillabilité sont possibles selon la diminution de la rugosité : (i) l'augmentation de θ_{eau} (selon le modèle de Wenzel avec la diminution de l'effet amplificateur de la rugosité) ; et (ii) la diminution de θ_{eau} (selon le modèle de Cassie-Baxter avec la diminution des poches d'air en surface et donc l'augmentation de f_1). La figure 2.37 montre l'évolution de l'angle de contact aqueux θ_{eau} en fonction du ratio de surface développé S_{dr}, représentant l'évolution de la rugosité pour les différents temps d'immersion. Les flèches indiquent la direction de l'augmentation du temps d'immersion. L'évolution de θ_{eau} sur S310 montre une diminution initiale avec l'augmentation de la rugosité (représentée par S_{dr}) jusqu'à la valeur de 1.41. Cette diminution est suivie par une augmentation de θ_{eau} jusqu'à l'état initial. L'évolution de θ_{eau} sur S320 suit une évolution similaire passée S_{dr} =1.5, avec un minimum autour de S_{dr} =1.75. Une diminution est cependant observée de 1.45 à 1.5. Concernant l'évolution de θ_{eau} sur S1010, celui-ci diminue globalement avec l'augmentation de S_{dr}, exceptée pour une valeur en S_{dr} =1.09.

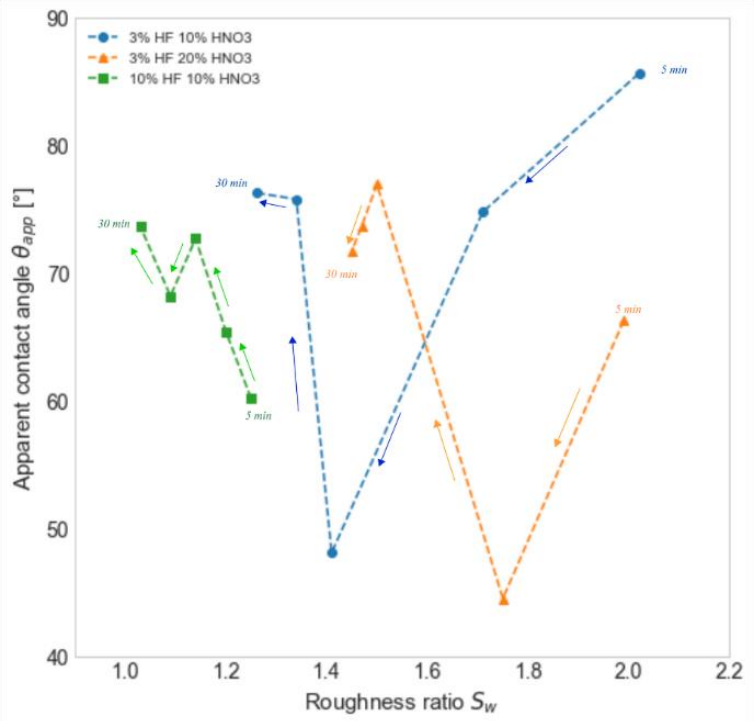


Figure 2.37 : Evolution de l'angle de contact aqueux θ_{eau} en fonction du ratio de surface développée S_{dr} pour la surface 90B.

En supposant que la mouillabilité des surfaces suit le modèle de Wenzel, l'augmentation de S_{dr} aboutit alors à une diminution de θ_{eau}. Or, passées certaines valeurs de S_{dr} une augmentation de θ_{eau} est mesurée pour S310 et S320. L'hypothèse de contact complet entre la goutte et la surface n'est donc pas valable pour l'ensemble des temps d'immersion pour (3% HF, 10% HNO_3) et (3% HF, 20% HNO_3). Un modèle plus général peut être appliqué : le modèle de Cassie-Baxter. Celui-ci suppose qu'une augmentation de la rugosité conduit à une augmentation de poches d'air sur la surface, et donc à la diminution de la surface de contact entre la goutte et le solide. Cette hypothèse est applicable à la surface brute 90B, la base des particules enkystées à la surface pouvant servir de zones d'accrochage des poches d'air. Cependant, ces poches d'air n'ont pas pu être observées et donc l'hypothèse n'est pas validée expérimentalement. Concernant les surfaces attaquées chimiquement, ce modèle semble être valable pour des grandes valeurs de S_{dr} (S_{dr} >1.75) ; pour de valeurs plus faibles, les résultats semblent cependant suivre le modèle de Wenzel.

Au vu des résultats, différents régimes de mouillabilité prennent place sur les surfaces SLM durant le polissage chimique. L'évolution de la surface part donc à l'état initial d'une surface 90B suivant le modèle de Cassie-Baxter. En considérant la composition chimique (3% HF, 10% HNO_3), une diminution de θ_{eau} est observée avec la diminution de la rugosité, jusqu'à atteindre S_{dr} =1.41 où la goutte est en contact total avec la surface. Cela fait passer la mouillabilité de la surface dans un régime de Wenzel où θ_{eau} augmente avec la diminution de la rugosité. La même démarche est applicable à (3% HF, 20% HNO_3), avec un changement de régime à S_{dr} =1.45 qui peut être dû à l'apparition de porosités locales. Pour (10% HF, 10% HNO_3), un contact total avec la surface est supposé dès 5 minutes. Des études ont proposé des modèles de changement de régimes de mouillabilité de Wenzel à Cassie-Baxter ; le modèle de Nagayama et al. [19] peut être cité, qui propose un modèle de mouillabilité partielle pour des surfaces microstructurées et nanostructurées. Cependant, les informations disponibles sont insuffisantes pour avancer ultérieurement.

2.3.5.4. Choix des paramètres du polissage chimique

Bien que le polissage chimique (10% HF, 10% HNO_3) montre la plus faible rugosité, une homogénéité de surface ($S_{tr} \geq 0.5$), une planéité ($S_{al} \geq 100$ µm) et des propriétés hydrophiles ; la puissance de la réaction ainsi que le fort dégagement gazeux des hétérogénéités importantes au niveau de la surface (porosité…). De plus, on observe la formation de couches d'oxydes dont la nature n'est pas connue et les pertes de matière sont trop importantes pour des pièces structurées. Toutes ces observations ne permettent pas de considérer ce traitement comme viable. Dans le cas où la perte de matière doit être minimisée, les polissages chimiques (3% HF, 20% HNO_3, 5 min) et (3% HF, 10% HNO_3, 5 min) donne les meilleurs résultats, avec une perte de poids d'environ 10%. Dans le cas où la mouillabilité doit être maximisée, le polissage chimique (3% HF, 20% HNO_3, 10 min) donne le meilleur résultat (sur les temps considérés) pour atteindre un minimum d'angle de contact aqueux de 45°. Enfin, dans le cas où la rugosité doit être minimisée, le polissage chimique (3% HF, 10% HNO_3, 30 min) est choisi pour la suite de l'étude, avec une rugosité d'environ 6 µm. L'efficacité de cette combinaison a été testée sur différentes orientations de fabrication (0°, 30°, 60° et 90°). Les quatre orientations montrent une diminution de la rugosité et une amélioration de la mouillabilité. Bien que ces résultats soient encourageants, des tests complémentaires sont nécessaires, notamment le polissage chimique de surfaces en surplan (« downside ») et de surfaces à faibles inclinaisons ($\alpha \leq 10°$) qui présentent les plus grandes rugosités.

2.3.5.5. Limites de l'étude

Cette étude du polissage chimique apporte de nombreuses informations mais présente des limitations pour une application biologique. Cette étude a montré une prédominance de la rugosité par rapport à d'autres facteurs (mécanique, chimique…) sur la mouillabilité. Cependant, cela ne s'applique pas forcément au comportement biologique. Autre que les changements de rugosité et de mouillabilité, l'autre facteur modifié par le polissage chimique est la composition chimique de la surface avec l'utilisation de la composition (HF, HNO_3). La littérature nous dit que pour les compositions choisies, un effet bénéfique est observé sur le comportement cellulaire. Ce paramètre n'a pas été étudié au sein de notre étude malgré l'aspect important de ce facteur.

2.4. Traitement de surfaces issues de procédé SLM par sablage

Afin de réduire la rugosité, un traitement par sablage est envisagé. Des études ont montré le changement de composition chimique de la surface via les particules d'alumines utilisées lors du sablage, supposé bénéfique à la réponse cellulaire [32]. Contrairement au sablage traditionnel appliqué sur des surfaces préalablement lissées par usinage ou par électro polissage, notre objectif ici est de déterminer les états de surface obtenus via le sablage de surface brute SLM.

2.4.1. Description du procédé de sablage

Le traitement par sablage est réalisé via un dispositif présenté sur la figure 2.38. Une buse éjecte de l'air comprimé contenant du « sable » sur l'éprouvette afin de sabler la surface.

(a) Image de la sableuse *(b) Schéma de fonctionnement*

Figure 2.38 : Description de la sableuse.

La distance entre l'éprouvette et la buse est supposée constante, suffisamment grande pour permettre à l'ensemble de la surface d'être sablée de la même manière. Chaque surface de l'éprouvette est sablée pour une durée fixe permettant un sablage homogène. Au sein de ce dispositif, de nombreuses incertitudes existent. Parmi ces incertitudes, différents facteurs peuvent être cités : la distance de la buse, la densité de particules par flux d'air et l'angle d'attaque des particules de sablage. Ces incertitudes existent mais se réduisent avec le temps de sablage, qui homogénéise progressivement la surface. Le seul paramètre modifiable et contrôlable de manière significative est le type de sable utilisé au sein de la sableuse, qui permet de choisir la taille des particules. Ceci définit donc un paramètre d'entrée. Parmi les sables communément utilisés, cette étude utilise des sables à base d'alumine (Al_2O_3), connus pour leur efficacité, leur dureté ainsi que pour leur possible réutilisation.

2.4.2. Matériels et méthode

Le sablage est réalisé sur des éprouvettes 90B, dont la géométrie et l'obtention sont décrites dans la section 2.1. Une distance d'environ 10 cm est maintenue entre l'échantillon et la buse, et un temps de 1 minute de sablage est choisi. Le sable utilisé est un sable à base d'alumine (Al_2O_3) et trois sables différents sont utilisés au sein de cette étude : BF360, F60 et F20. Leurs caractéristiques sont regroupées dans le tableau 2.11.

Référence du sable	Taille moyenne des grains (µm)
F360	12 – 40
F60	212 – 300
F20	850 – 1180

Tableau 2.11 : Tailles des grains selon le type de sable.

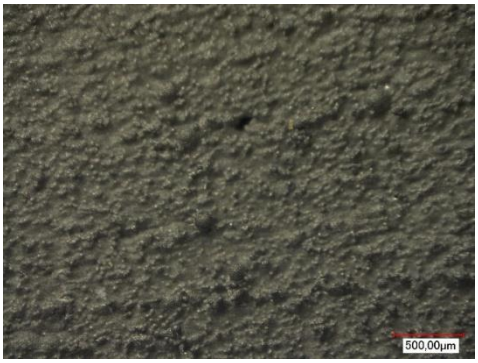
Les surfaces sablées avec les sables F360, F60 et F20 sont désignées respectivement par S360, S60 et S20. Après sablage, les surfaces sont nettoyées à l'éthanol ainsi qu'à l'eau distillée au sein d'une cuve à ultrasons afin de retirer les résidus de la surface. Pour chaque type de sable, un groupe de 5 échantillons est défini. Un groupe d'échantillons 90B est aussi défini comme surface de référence.

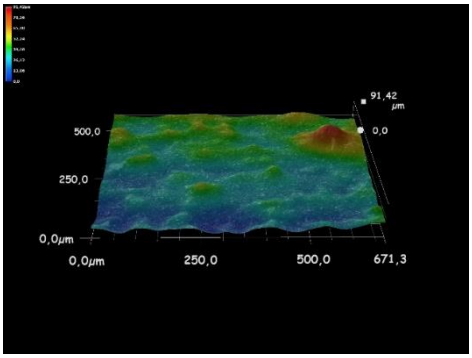
2.4.3. Résultats

Les résultats pour les surfaces de référence 90B sont donnés dans la section 2.1.

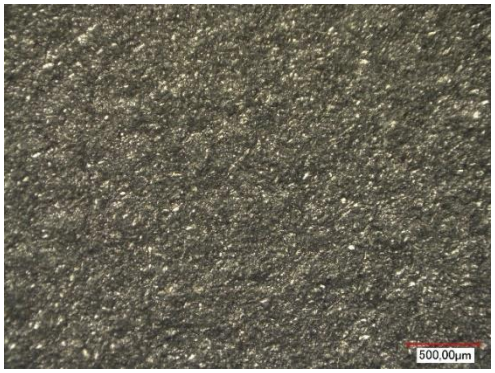
2.4.3.1. Morphologie

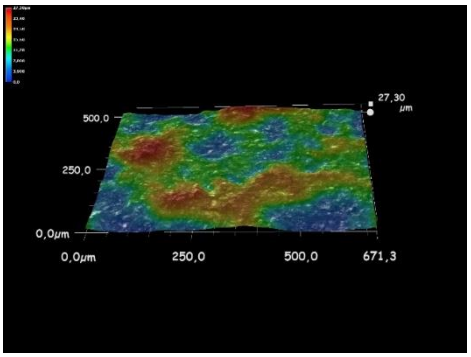
La figure 2.39 montre les différentes morphologies obtenues avec les différents sables. Des différences en termes de morphologies sont observables. Concernant la disparition de la rugosité de type III, une disparition totale est observée pour des tailles de particules de sablage supérieures à la taille des particules de poudre de TA6V, i.e. pour les surfaces correspondant à un sablage S60 et S20. La surface S360 montre la présence de la rugosité de type III. Si l'on excepte la surface S360, l'augmentation de la rugosité semble suivre l'augmentation de la taille des grains du sable. Une forte variation d'amplitude ressort de S20.



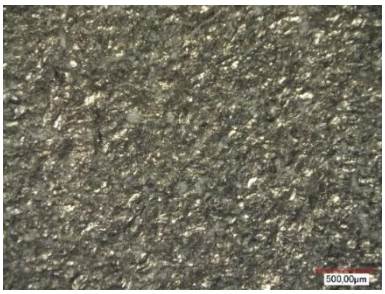


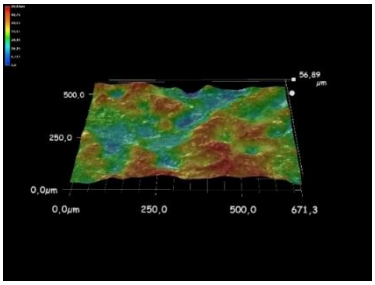
(a) S360





(b) S60

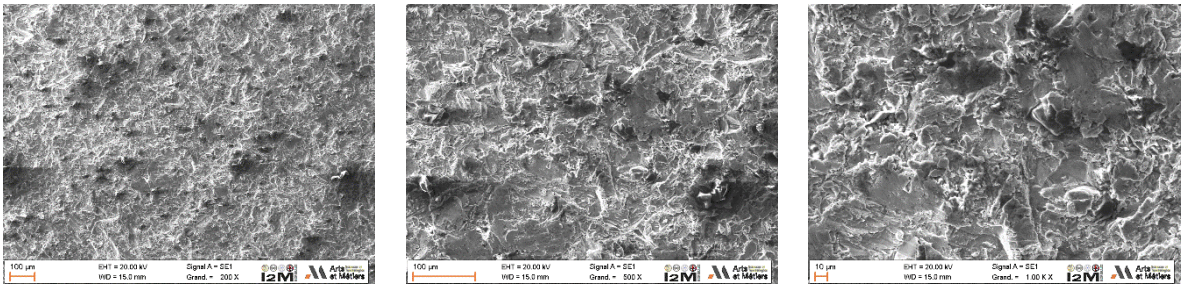




(c) S20

Figure 2.39 : Morphologie de la surface 90B pour les différents types de sable.

La morphologie des surfaces observées dépend donc de la taille du sable utilisé. Bien que F360 permette de réduire localement la rugosité de surface, la rugosité de type III persiste. F60 et F20 parviennent à faire disparaître la rugosité de type III, mais donne différents niveaux d'homogénéité. F20 présente une surface homogène, très accidentée en raison de l'utilisation de particules de l'ordre de 1 mm. Au contraire, F60 avec l'utilisation de particules plus petites homogénéise la surface à un niveau plus petit, donnant à la surface la morphologie présentée sur la figure 2.40.



(a) X 200 *(b) X 500* *(c) X 1000*

Figure 2.40 : Morphologie de la surface S60 obtenue au MEB pour trois grossissements.

2.4.3.2. Paramètres de rugosité

Les résultats des paramètres de rugosité sont répertoriés dans le tableau 2.12. Les valeurs de rugosité mesurées sont en accord avec les morphologies observées pour les trois sables. L'évolution de la rugosité moyenne S_a montre que l'ensemble des procédés de sablage a permis de réduire la rugosité. S60 présente le plus faible R_a tandis que S360 présente le plus fort R_a. La même évolution est observée pour S_q et S_t ainsi que S_{dr}. Aucune corrélation n'est trouvée entre la taille du sable et R_a ($p<0.05$, Spearman), mais un minimum est observé pour une taille de sable de 200 - 300 µm. En ce qui concerne l'évolution de S_{sk}, sa valeur reflète l'efficacité du sablage. Sur S360 où la rugosité de type III est toujours présente, un S_{sk} positif et proche de 1 est mesuré. Au contraire, sur les surfaces S60 et S20 homogénéisées, un S_{sk} proche de 0 est enregistré.

	S_a (µm)	S_q (µm)	S_t (µm)	S_{sk}	S_{dr}	S_{tr}	S_{al} (µm)
S360	13.6 (± 1.2)	17.3 (± 1.6)	145.5 (± 23)	0.81 (± 0.28)	1.48 (± 0.05)	0.62 (± 0.05)	49.2 (± 2.4)
S60	8.3 (± 0.4)	10.4 (± 0.5)	70.5 (± 1.6)	-0.005 (± 0.008)	1.26 (± 0.02)	0.65 (± 0.24)	137 (± 16.9)
S20	9.25 (± 0.2)	11.5 (± 0.3)	86.9 (± 9.3)	-0.01 (± 0.12)	1.35 (± 0.03)	0.74 (± 0.05)	59.2 (± 9.3)

Tableau 2.12 : Paramètres de rugosité de la surface 90B après sablage.

Les résultats de la distance d'autocorrélation donnent des informations significatives sur la fréquence spatiale ainsi que sur la texture des surfaces. S360 ainsi que S60 et S20 présentent un S_{dr} supérieur à 0.5, montrant l'absence d'orientation spécifique. S20 et S360 présentent un S_{al} autour de 50 – 60 µm, créé par la persistance de la rugosité de type III pour S360 et par la forte rugosité de surface pour S20. Seule S60 affichent un S_{al} au-dessus de 100 µm. Cependant, une forte rugosité submicroscopique persiste.

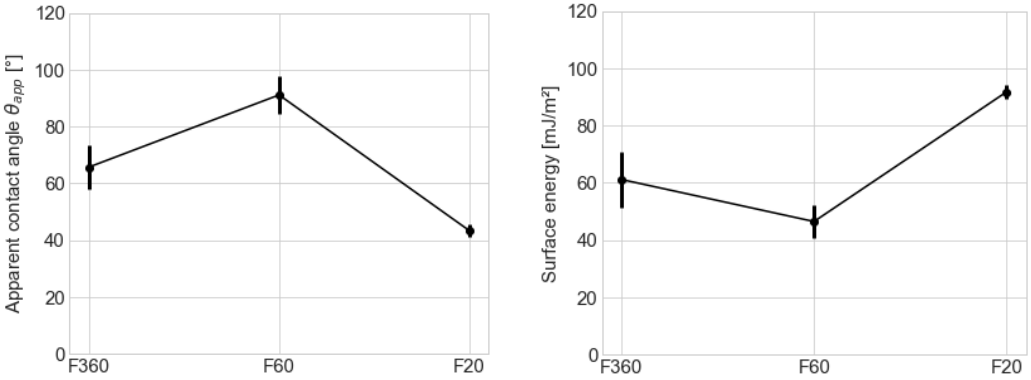
2.4.3.3. Mouillabilité

La mouillabilité des surfaces est analysée et les résultats sont répertoriés au sein du tableau 2.13 ainsi que sur la figure 2.41.

Orientation	θ_{eau}	θ_{diiodo}	Υ_{app}
S360	65.7 (± 7.6)	83.7 (± 1.2)	61.1 (± 9.8)
S60	91.1 (± 6.5)	39.8 (± 6.3)	46.5 (± 5.6)
S20	43.3 (± 2.1)	63.3 (± 5.3)	91.7 (± 2.5)

Tableau 2.13 : Valeurs de θeau et ϒapp de la surface 90B après sablage.

L'ensemble des sables appliqués semblent avoir plus ou moins amélioré la mouillabilité de la surface si l'on compare à la surface de référence. L'angle de contact aqueux θ_{eau} le plus faible est observé pour la surface hydrophile S20, avec une valeur de 43.3 (± 2.1), accompagné par l'énergie de surface apparent Υ_{app} le plus élevé avec une valeur de 91.7 (± 2.5). S60 présente des propriétés équiphiliques avec un angle de contact aqueux θ_{eau} de 91.1 (± 6.5) suivi par une énergie de surface apparent Υ_{app} de 46.5 (± 5.6). De la même manière que S20, S360 présente des propriétés hydrophiliques avec un angle de contact aqueux θ_{eau} de 65.7 (± 7.6) suivi par une énergie de surface apparent Υ_{app} de 61.1 (± 9.8). Aucune corrélation n'est trouvée entre la taille du sable et la mouillabilité de la surface.



(a) (b)

Figure 2.41 : Evolution de θ_{eau} et Υ_{app} de la surface 90B après sablage. (a) Angle de contact aqueux θ_{eau}. (b) Energie de surface apparent Υ_{app}.

2.4.4. Discussion et limitations

Le but de cette analyse était d'étudier les états de surface suite au sablage d'éprouvettes 90B ainsi que d'évaluer la biocompatibilité potentielle de ces surfaces. La première exigence du traitement de surface par sablage est de faire disparaître la rugosité de type III. L'utilisation du sable F360 ne parvient pas à faire disparaître l'ensemble de la rugosité de type III après 1 minute de sablage par face. Les grains composant le sable ont une taille du même ordre de grandeur que les particules composant la rugosité de type III. De ce fait, il semble que leurs tailles soient insuffisantes pour décrocher complètement les particules et homogénéiser la surface. F60 et F20 ont permis de réduire la rugosité en faisant disparaître la rugosité de type III et en homogénéisant la surface. Cependant, les valeurs de rugosité restent supérieures à ce qui est trouvé sur des surfaces biocompatibles traditionnelles. L'étude de la mouillabilité montre une forte hydrophilicité observée pour S20 tandis que S60 présente des caractéristiques équiphiliques. Aucun lien n'a pu être prouvé entre la rugosité et la taille des particules. Cela permet de supposer que différents comportements de mouillage sont créés par le traitement. Nous sommes cependant incapables par cette étude de pouvoir déterminer le régime de mouillage associé à chaque sablage. Enfin, le choix de la surface sablée est effectué via la texture ainsi que la fréquence spatiale de la rugosité. Malgré de bonnes caractéristiques hydrophiles, S20 présente une forte amplitude

de rugosité avec une faible longueur d'onde spatiale. En se mettant à l'échelle des cellules (entre 50 et 100 µm), cette rugosité affecte directement l'entité cellulaire et contrarie la dispersion cellulaire en surface. Au contraire, si l'amplitude de la rugosité sur S60 est similaire à celle sur S20, la longueur d'onde spatiale est de l'ordre de 100 µm, ce qui affecte moins l'entité cellulaire.

Cette étude du sablage présente cependant une limitation pour une application biologique. En effet, la rugosité et la mouillabilité ne sont pas les seuls facteurs qui vont jouer un rôle. Le sablage modifie la surface en augmentant les contraintes résiduelles présentes à la surface, ce qui va donc affecter la MEC et donc le comportement de la cellule. Des modifications de compositions chimiques de la surface sont aussi à prendre en compte, dues aux interactions entre l'alumine Al_2O_3 et le TA6V à la surface. Ces facteurs mécaniques et chimiques n'ont pas été étudiés, ne permettant pas d'isoler le paramètre de rugosité dans cette étude.

2.5. Conclusion

Cette étude nous a permis de caractériser la rugosité et la mouillabilité de surfaces SLM brutes et modifiées via différents traitements. Sur les surfaces brutes, les résultats ont montré que la rugosité était composée en majorité de particules de poudres enkystées dans la surface. En plus d'avoir une influence significative sur la mouillabilité des surfaces, ces particules présentent des dimensions proches de celles des cellules, faisant d'eux des éléments importants à analyser d'un point de vue biologique. Afin de faire disparaitre la rugosité de type III ainsi que de diminuer la rugosité, deux traitements de surface ont été considérés : le sablage et le polissage chimique. Les résultats du sablage ont montré la disparition de la rugosité de type III ainsi qu'une baisse de la rugosité pour une taille de sable supérieure ou égale à 200 µm. Cependant, la disparition de cette rugosité s'est accompagnée par l'apparition d'une rugosité submicroscopique importante combinée à une rugosité microscopique plus grande. Les résultats du polissage chimique ont montré la disparition de la rugosité de type III pour l'ensemble des solutions de polissage de 5 min à 30 min, ainsi que l'exhibition de propriétés hydrophiles. Le groupe de paramètres (3% HF, 10% HNO_3, 30 min) (C2) donne la plus faible rugosité et des propriétés hydrophiles, malgré des pertes matières de l'ordre de 200 µm. Le groupe de paramètres (3% HF, 20% HNO_3, 10 min) (C1) donne la plus forte hydrophilicité et des pertes matières de l'ordre de 100 µm, malgré une forte rugosité. Cependant, l'étude menée présente une limitation. En effet, les facteurs surfaciques influençant les interactions avec les cellules ont été réduits à la rugosité et la mouillabilité. D'autres facteurs (chimiques, mécaniques…) ont une influence significative mais n'ont pas été étudiés. Ainsi, cela ne permet pas d'isoler la rugosité ou la mouillabilité afin de déterminer leur influence.

Dans la suite de notre étude, cinq différentes surfaces ont été choisies afin de réaliser des analyses biologiques :

- C0 : surface brute (90B) obtenue directement en sortie de fabrication ;
- C1 : surface 90B attaquée chimiquement par une solution 3% HF et 20% HNO3 pour une durée de 5 minutes ;
- C2 : surface 90B attaquée chimiquement par une solution 3% HF et 10% HNO3 pour une durée de 30 minutes ;
- C3 : surface 90B sablée avec du sable F060 ;
- C4 : surface 90B polie via un papier abrasif.

Ces dénominations seront utilisées pour caractériser les surfaces testées biologiquement.

Références

[1] F04 Committee, « Specification for Titanium-6Aluminum-4Vanadium Alloy Castings for Surgical Implants (UNS R56406) », ASTM International. doi: 10.1520/F1108-97A.

[2] T. R. Bieler, R. M. Trevino, et L. Zeng, « Alloys: Titanium », in *Encyclopedia of Condensed Matter Physics*, F. Bassani, G. L. Liedl, et P. Wyder, Éd. Oxford: Elsevier, 2005, p. 65-76.

[3] B. Vayssette, N. Saintier, C. Brugger, M. Elmay, et E. Pessard, « Surface roughness of Ti-6Al-4V parts obtained by SLM and EBM: Effect on the High Cycle Fatigue life », *Procedia Engineering*, vol. 213, p. 89-97, 2018, doi: 10.1016/j.proeng.2018.02.010.

[4] J. Sukal, D. Palousek, et D. Koutny, « The effect of recycling powder steel on porosity and surface roughness of SLM parts », *MM Science Journal*, 2018, Consulté le: oct. 26, 2020. [En ligne]. Disponible sur: https://www.mmscience.eu/journal/issues/december-2018/articles/the-effect-of-recycling-powder-steel-on-porosity-and-surface-roughness-of-slm-parts.

[5] B. Bhushan, « Surface Roughness Analysis and Measurement Techniques », 2000, doi: 10.1201/9780849377877-10.

[6] « ISO 4287:1997(fr), Spécification géométrique des produits (GPS) — État de surface: Méthode du profil — Termes, définitions et paramètres d'état de surface ». https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:4287:ed-1:v1:fr (consulté le oct. 06, 2020).

[7] « ISO 25178-2:2012(en), Geometrical product specifications (GPS) — Surface texture: Areal — Part 2: Terms, definitions and surface texture parameters ». https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:25178:-2:ed-1:v1:en (consulté le oct. 06, 2020).

[8] S. Ebnesajjad, « 3 - Surface Tension and Its Measurement », in *Handbook of Adhesives and Surface Preparation*, S. Ebnesajjad, Éd. Oxford: William Andrew Publishing, 2011, p. 21-30.

[9] K.-Y. Law, « Definitions for Hydrophilicity, Hydrophobicity, and Superhydrophobicity: Getting the Basics Right », *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 5, nº 4, p. 686-688, févr. 2014, doi: 10.1021/jz402762h.

[10] E. A. Vogler, « Thermodynamics of short-term cell adhesion in vitro. », *Biophys J*, vol. 53, nº 5, p. 759-769, mai 1988.

[11] Y. Li *et al.*, « Surface Wettability Switched Cell Adhesion and Detachment on Conducting Polymer Nanoarray », *Advanced Materials Interfaces*, vol. 3, nº 19, p. 1600598, oct. 2016, doi: 10.1002/admi.201600598.

[12] G. Strnad, N. Chirila, C. Petrovan, et O. Russu, « Contact Angle Measurement on Medical Implant Titanium Based Biomaterials », *Procedia Technology*, vol. 22, p. 946-953, janv. 2016, doi: 10.1016/j.protcy.2016.01.094.

[13] I. Yanagisawa, H. Sakuma, M. Shimura, Y. Wakamatsu, S. Yanagisawa, et E. Sairenji, « Effects of "wettability" of biomaterials on culture cells », *J Oral Implantol*, vol. 15, nº 3, p. 168-177, 1989.

[14] P.-G. de Gennes, F. Brochard-Wyart, et D. Quéré, « Wetting and Long-Range Forces », in *Capillarity and Wetting Phenomena: Drops, Bubbles, Pearls, Waves*, P.-G. de Gennes, F. Brochard-Wyart, et D. Quéré, Éd. New York, NY: Springer, 2004, p. 87-105.

[15] E. Y. Bormashenko, *Wetting of Real Surfaces*. De Gruyter, 2019.

[16] M. Ran, W. Zheng, et H. Wang, « Fabrication of superhydrophobic surfaces for corrosion protection: a review », *Materials Science and Technology*, vol. 35, nº 3, p. 313-326, févr. 2019, doi: 10.1080/02670836.2018.1560985.

[17] R. N. Wenzel, « Surface Roughness and Contact Angle. », *J. Phys. Chem.*, vol. 53, nº 9, p. 1466-1467, sept. 1949, doi: 10.1021/j150474a015.

[18] A. B. D. Cassie et S. Baxter, « Wettability of porous surfaces », *Trans. Faraday Soc.*, vol. 40, nº 0, p. 546-551, janv. 1944, doi: 10.1039/TF9444000546.

[19] G. Nagayama et D. Zhang, « Intermediate wetting state at nano/microstructured surfaces », *Soft Matter*, vol. 16, nº 14, p. 3514-3521, avr. 2020, doi: 10.1039/C9SM02513H.

[20] I. Yadroitsev et I. Smurov, « Selective laser melting technology: From the single laser melted track stability to 3D parts of complex shape », *Physics Procedia*, vol. 5, p. 551-560, janv. 2010, doi: 10.1016/j.phpro.2010.08.083.

[21] C. Galy, E. Le Guen, E. Lacoste, et C. Arvieu, « Main defects observed in aluminum alloy parts produced by SLM: From causes to consequences », *Additive Manufacturing*, vol. 22, p. 165-175, août 2018, doi: 10.1016/j.addma.2018.05.005.

[22] T. de Terris, F. Adamski, P. Peyre, et C. Dupuy, « Influence of SLM process parameters on Inconel 625 superalloy samples », p. 12.
[23] Z. Chen *et al.*, « Thermal dynamic behavior during selective laser melting of K418 superalloy: numerical simulation and experimental verification », *Appl. Phys. A*, vol. 124, nº 4, p. 313, mars 2018, doi: 10.1007/s00339-018-1737-8.
[24] F. Cabanettes *et al.*, « Topography of as built surfaces generated in metal additive manufacturing: A multi scale analysis from form to roughness », *Precision Engineering*, vol. 52, p. 249-265, avr. 2018, doi: 10.1016/j.precisioneng.2018.01.002.
[25] A. Lerebours, P. Vigneron, S. Bouvier, A. Rassineux, M. Bigerelle, et C. Egles, « Additive manufacturing process creates local surface roughness modifications leading to variation in cell adhesion on multifaceted TiAl6V4 samples », *Bioprinting*, vol. 16, p. e00054, déc. 2019, doi: 10.1016/j.bprint.2019.e00054.
[26] N. Soro, N. Saintier, H. Attar, et M. S. Dargusch, « Surface and morphological modification of selectively laser melted titanium lattices using a chemical post treatment », *Surface and Coatings Technology*, vol. 393, p. 125794, juill. 2020, doi: 10.1016/j.surfcoat.2020.125794.
[27] A. Townsend, N. Senin, L. Blunt, R. K. Leach, et J. S. Taylor, « Surface texture metrology for metal additive manufacturing: a review », *Precision Engineering*, vol. 46, p. 34-47, oct. 2016, doi: 10.1016/j.precisioneng.2016.06.001.
[28] E. M. M. Sutter et G. J. Goetz-Grandmont, « The behaviour of titanium in nitric-hydrofluoric acid solutions », *Corrosion Science*, vol. 30, nº 4, p. 461-476, janv. 1990, doi: 10.1016/0010-938X(90)90051-6.
[29] B. Wysocki *et al.*, « Post Processing and Biological Evaluation of the Titanium Scaffolds for Bone Tissue Engineering », *Materials (Basel)*, vol. 9, nº 3, mars 2016, doi: 10.3390/ma9030197.
[30] B. Wysocki *et al.*, « The Influence of Selective Laser Melting (SLM) Process Parameters on In-Vitro Cell Response », *Int J Mol Sci*, vol. 19, nº 6, mai 2018, doi: 10.3390/ijms19061619.
[31] R. Zahran, J. I. Rosales Leal, M. A. Rodríguez Valverde, et M. A. Cabrerizo Vílchez, « Effect of Hydrofluoric Acid Etching Time on Titanium Topography, Chemistry, Wettability, and Cell Adhesion », *PLoS One*, vol. 11, nº 11, nov. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0165296.
[32] T. P. T. Nguyen *et al.*, « Evaluation of Sandblasting on Mechanical Properties and Cell Response of Bioactive Glass Infiltrated Zirconia », *J Nanosci Nanotechnol*, vol. 17, nº 4, p. 2740-2742, 2017, doi: 10.1166/jnn.2017.13329.
[33] A. Triantaphyllou *et al.*, « Surface texture measurement for additive manufacturing », *Surf. Topogr.: Metrol. Prop.*, vol. 3, nº 2, p. 024002, mai 2015, doi: 10.1088/2051-672X/3/2/024002.
[34] J. Gockel, L. Sheridan, B. Koerper, et B. Whip, « The influence of additive manufacturing processing parameters on surface roughness and fatigue life », *International Journal of Fatigue*, vol. 124, p. 380-388, juill. 2019, doi: 10.1016/j.ijfatigue.2019.03.025.

Chapitre 3 : Analyse biologique in vitro de la biocompatibilité et de l'ostéointégration de surfaces SLM

Sommaire

3.1. Préparation des échantillons....82
3.1.1. Description des différents matériaux....82
3.1.2. Choix du type de cellule....84
3.2. Analyse de biocompatibilité....85
3.2.1. Etude préliminaire : Analyse de cytotoxicité....85
3.2.1.1. Description de la cytotoxicité....85
3.2.1.2. Matériels et méthodes....86
3.2.1.3. Résultats....87
3.2.2. Analyse de l'adhésion....90
3.2.2.1. Description de l'adhésion cellulaire....90
3.2.2.2. Matériels et méthodes....90
3.2.2.3. Résultats....91
3.2.3. Analyse de la prolifération cellulaire....93
3.2.3.1. Description de la prolifération cellulaire....93
3.2.3.2. Matériels et méthodes....94
3.2.3.3. Résultats....95
3.2.3.3.1. Activité métabolique des deux pools de cellules....95
3.2.3.3.2. Activité métabolique en milieu de prolifération....96
3.2.3.3.1. Activité métabolique en milieu de différenciation....98
3.2.4. Analyse de la minéralisation osseuse....100
3.2.4.1. Description de la minéralisation osseuse....100
3.2.4.2. Matériels et méthodes....100
3.2.4.3. Résultats....100
3.2.5. Discussion quant à l'étude de biocompatibilité....101
3.3. Evaluation de l'influence de la topographie sur la morphologie cellulaire....102
3.3.1. Matériels et méthodes....102
3.3.2. Interface cellule/ substrat....104
3.3.2.1. Morphologie cellulaire sur le contrôle plastique....104
3.3.2.2. Morphologie cellulaire sur la surface C0....104
3.3.2.3. Evolution de la morphologie en milieu de prolifération....106
3.3.2.4. Evolution de la morphologie en milieu de différenciation....109
3.3.3. Du substrat à la population de cellules....113

3.3.3.1. Evolution de la morphologie en milieu de prolifération.....114
3.3.3.2. Evolution de la morphologie en milieu de différenciation 117
3.3.4. Discussion.....120
3.4. Conclusion.....122
Références.....124

Les principaux paramètres de surfaces pouvant potentiellement affecter la réponse cellulaire ayant été caractérisés précédemment (rugosité, mouillabilité, anisotropie de surface…), la détermination expérimentale de l'influence de l'état de surface sur la réponse cellulaire nécessite donc des tests cellulaires pour différents états de surfaces créés par différents traitements de surface. Le plan d'expérience réalisé permet de quantifier l'influence de la rugosité, de caractériser la création de minéralisation ainsi que la morphologie cellulaire, et de construire et comparer un modèle numérique de comportement cellulaire. Les cultures cellulaires ainsi que les tests de cytocompatibilité ont été réalisés par un stagiaire, puis par une ingénieure du laboratoire CIC-IT à Bordeaux.

Dans ce chapitre, les essais expérimentaux suivant seront réalisés :

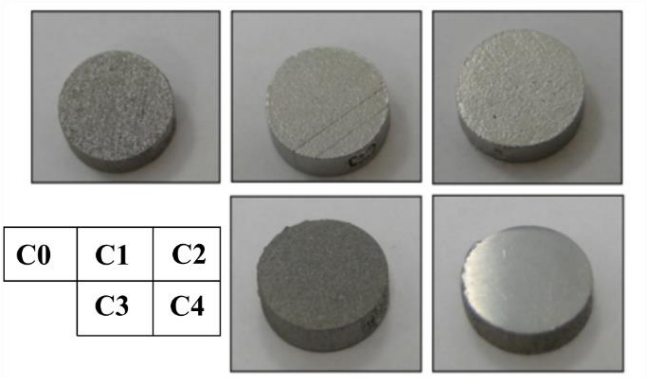
- Caractérisation de la toxicité de la surface afin de valider la non toxicité du procédé et des modifications de surface : essais de cytotoxicité selon la norme ISO 10993-5 sur lignée de fibroblastes murins.
- Quantification de l'influence de l'état de surface sur l'adhésion cellulaire.
- Quantification de l'influence de l'état de surface sur la prolifération cellulaire selon deux types cellulaires.
- Quantification de la minéralisation selon les différents états de surfaces
- Quantification de la morphologie cellulaire à J0 et J4

3.1. Préparation des échantillons

Afin de caractériser et de quantifier l'influence de la morphologie de la surface sur la biocompatibilité ainsi que sur la réponse cellulaire, des groupes d'échantillons ont été fabriquées et testées avec différents états de surface (figure 3.1).

3.1.1. Description des différents matériaux

La géométrie des échantillons est celle de cylindres en alliages de TA6V de diamètre 11.2 mm et d'épaisseur 3 mm, produits par FA SLM à base de poudre de TA6V. Les paramètres de fabrication par défaut sont définis au sein du chapitre 3 avec une orientation de 90° par rapport au plan de fabrication. Après fabrication, les supports sont retirés et les surfaces sont nettoyées avec de l'éthanol puis de l'eau distillée au sein d'une cuve à ultrasons.



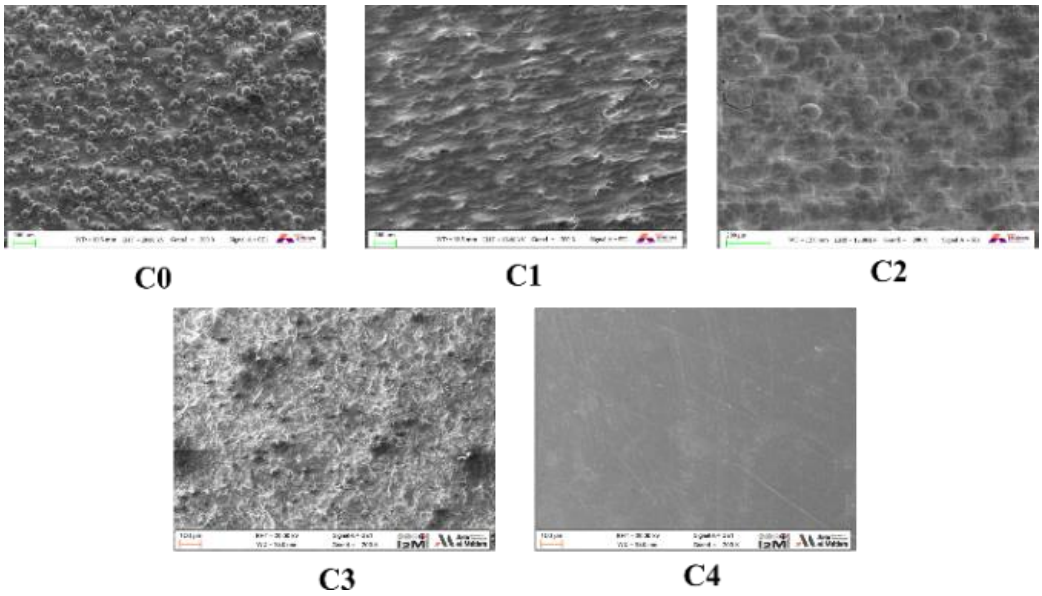
(a)

(b)

Figure 3.1 : Description des différents matériaux obtenus selon les différents protocoles appliqués. (a) Matériaux d'études de biocompatibilité. (b) Plaque de culture cellulaire. Le contrôle plastique se compose d'un puit sans matériau

Un premier groupe de matériaux bruts sans aucun post traitement a été défini. On nomme ce groupe d'échantillons C0. Un autre groupe de matériaux a alors subi un polissage abrasif successif (voir section 2.2.4.1). Cela permet d'obtenir un groupe d'échantillons ne présentant aucune rugosité à l'échelle microscopique et donc de servir de groupe de référence. On nomme ce groupe le groupe C4. Afin de caractériser l'influence de l'attaque chimique sur la biocompatibilité des surfaces SLM brute, des matériaux ont été traités via un polissage chimique. Un groupe d'éprouvettes a été immergé au sein d'un bain de 3% d'acide hydrofluorique (HF) et 20% d'acide nitrique (HNO3) pour une durée de 10 minutes à température ambiante. La réaction a été réalisée au sein d'une cuve à ultrason afin de garantir un polissage homogène sur l'ensemble de la surface. On nomme ce groupe le groupe C1. Suivant le même principe, un autre groupe de matériaux a subi un polissage chimique avec une composition de solution différente et un temps d'immersion différent. L'objectif est d'obtenir un gradient de surface entre la surface brute C0 et la surface de référence polie C4, permettant ainsi d'évaluer l'influence de la rugosité sur différents niveaux. Ainsi, un groupe de matériaux a été immergé au sein d'un bain de 3% d'acide hydrofluorique (HF) et 10% d'acide nitrique (HNO3) pour une durée de 30 minutes à température ambiante. La réaction a été réalisée au sein d'une cuve à ultrason afin de garantir un polissage homogène sur l'ensemble de la surface. On nomme ce groupe le groupe C2. Enfin, un groupe de matériaux a été sablé avec des particules de Al_2O_3 de type F060 selon un protocole expérimental que l'on retrouve dans le chapitre précédent. Ce type de traitement permet à la fois de faire disparaître la rugosité de type III et de modifier profondément la surface, pouvant entraîner une diminution de la biocompatibilité. Ce groupe nous sert de résultat négatif quant à l'influence de la rugosité. On nomme ce groupe d'échantillons le groupe C3. Pour l'ensemble des protocoles, les matériaux ont été nettoyées avec de l'éthanol puis de l'eau au sein d'une cuve à ultrason après avoir subi le traitement. Enfin, afin de pouvoir utiliser les matériaux, une étape de stérilisation a été réalisée à l'aide d'un autoclave, avec

une montée puis un maintien en température à 121 °C pour un temps donnée de 10 minutes. Les détails concernant la morphologie des surfaces ainsi que les valeurs des paramètres de rugosité peuvent être trouvés au sein de la figure 3.2.



(a)

	S_a (µm)	St (µm)	S_{dr}	S_{tr}	Sal	θ_{eau} (°)
C0	15.3 (± 1.2)	121 (± 9.6)	3.2 (± 0.17)	0.7 (± 0.2)	36.2 (± 8.2)	95 (± 3.6)
C1	12.1 (± 2.8)	111 (± 13.3)	1.99 (± 0.21)	0.36 (± 0.17)	48 (± 15)	64 (± 8.4)
C2	5.9 (± 0.7)	43.9 (± 4.8)	1.26 (± 0.09)	0.77 (± 0.12)	103.5 (± 32)	75.5 (± 5.5)
C3	8.3 (± 0.4)	76 (± 1.6)	1.26 (± 0.02)	0.65 (± 0.24)	137 (± 16.9)	91.1 (± 6.5)
C4	0.9 (± 0.2)	10.1 (± 1.1)	1.02 (± 0.01)	0.51 (± 0.12)	233.4 (± 45)	75 (± 6)

(b)

Figure 3.2 : Morphologie et données de rugosité des surfaces d'études. (a) Morphologies des matériaux observées sous MEB. (b) Valeurs de principaux paramètres de rugosité et de mouillabilité

En plus de ces 5 surfaces, une surface de contrôle plastique est définie, nommée « surface contrôle ». Cette surface est composée du fond du puit de la plaque de culture.

3.1.2. Choix du type de cellule

L'étude portant sur l'ostéointégration a utilisé des cellules intervenant lors de l'ostéointégration : les cellules souches mésenchymateuses (figure 3.3). En effet, il s'agit des cellules à l'origine des cellules osseuses lors de leur différenciation dans une lignée ostéoblastique, donnant des pré-ostéoblastes qui vont finir de se différencier en ostéoblastes, et synthétiser la matrice osseuse (voir la section 1.1). Au sein du corps humain, ces cellules proviennent de la moelle osseuse et jouent un rôle important lors de la régénération osseuse.

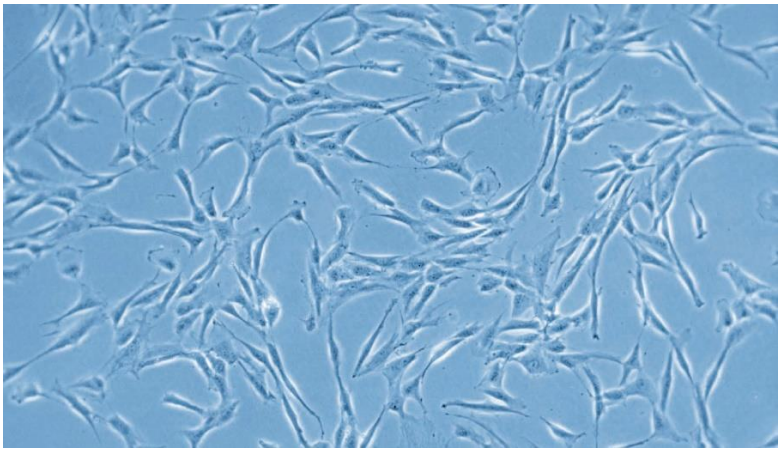


Figure 3.3 : Cellules souches humaines mésenchymateuses [promocell.com]

L'ensemble des tests cellulaires (hors cytotoxicité) a été réalisé sur des cellules souches mésenchymateuses isolées à partir du stroma de moelle osseuse humaine (hMSCs) (déchets opératoires fournis par le CHU de Bordeaux et traités par l'Unité Inserm 1026 BIOTIS). Les cellules ont été cultivées et étudiées avec un milieu de prolifération (alpha MEM, GIBGO avec 10% de sérum de veau fœtal) et 5µg/ml gentamycine. Les cellules utilisées lors des analyses de cytotoxicité sont des cellules BALB-3T3 (simplifiées à l'appellation 3T3), lignée de de fibroblastes embryonnaires de souris commercialisées par ATCC. La raison derrière le choix de ces cellules vient de la recommandation ISO 10993.

3.2. Analyse de biocompatibilité

Le premier objectif de cette étude est de valider la biocompatibilité du procédé FA SLM ainsi que celle des surfaces ayant été modifiées via différents traitements de surface.

3.2.1. Etude préliminaire : Analyse de cytotoxicité

3.2.1.1. Description de la cytotoxicité

La cytotoxicité définie la toxicité causée par des agents chimiques, par une substance, ou par un élément étranger sur des cellules vivantes [1], pouvant affecter des processus cellulaires tels que la survie cellulaire, la prolifération ou d'autres phénomènes biochimiques et physiologiques. L'exposition à cette cytotoxicité mène généralement à la mort de la cellule, via l'apoptose. Cela peut se traduire généralement par une phase de nécrose où la cellule gonfle, perd son intégrité membranaire ainsi que son activité métabolique, suit par une fuite de ces éléments au sein de la MEC [2]. Sa mesure est essentielle avant la mise en place de tests in vitro et in vivo car elle permet de déterminer s'il y a des éléments pouvant potentiellement être des risques sanitaires au sein du corps humain. La non cytotoxicité du TA6V est bien documentée mais les procédés d'usinage et les post traitement peuvent induire une toxicité. Les étapes de nettoyage devraient y remédier mais il faut s'en assurer.

Au sein de cette étude, nous avons défini la cytotoxicité par la viabilité cellulaire, que l'on distingue de la prolifération. D'autres études peuvent fusionner la viabilité cellulaire et la prolifération au sein de la cytotoxicité. On peut distinguer deux catégories de tests de cytotoxicité : celles par extrait et celles par contact direct. Dans le cas de la cytotoxicité par extrait, l'élément d'étude est plongé dans du milieu de culture cellulaire avec un ratio défini par la norme (ici choisi avec sérum, mais peut être sans sérum suivant le choix d'extraire des éléments polaires ou non). Après une 24H, l'élément est retiré et la solution obtenue compose l'extrait. Les cellules sont alors mises à incuber au sein de cet extrait

selon un certain pourcentage (dilution possible) et la viabilité cellulaire est alors étudiée [3]. Dans le cas de la cytotoxicité par contact direct, les cellules sont mises à incuber dans le puit, puis le matériau est déposé sur les cellules, et le tout est laissé à incuber. Cette méthode permet de déterminer si le contact direct avec l'élément d'étude peut donner lieu à de la toxicité. Chacune de ses deux méthodes à ses avantages et ces inconvénients. La cytotoxicité par extrait est généralement utilisée afin de déterminer si l'élément étudié relargue des agents toxiques au sein du milieu. Cependant, ce test seul ne permet pas de valider la non toxicité d'un élément. La cytotoxicité par contact direct ajoute des résultats supplémentaires permettant de valider (ou non) la non toxicité [4].

La caractérisation de la cytotoxicité se fait généralement via la mesure de la viabilité cellulaire, via la mesure de cellules vivantes en contact avec l'élément étranger étudié. Cette viabilité cellulaire peut être caractérisée de différentes manières [5]. Au sein de ce chapitre, nous nous concentrerons sur la description de la méthode colorimétrique, qui est l'une des plus utilisées en cytotoxicité [6], [7]. La méthode consiste à mesurer des marqueurs biochimiques afin d'évaluer l'activité métabolique de la cellule. Des réactifs sont utilisés afin de développer une certaine coloration en réponse à l'activité métabolique des cellules qui est alors mesuré par spectrophotométrie. L'avantage de cette méthode de mesure est qu'elle est applicable pour des cellules adhérentes ou en suspension, tout en étant facilement réalisable et économique.

3.2.1.2. Matériels et méthodes

L'analyse de la cytotoxicité des différentes surfaces est faite via la réalisation de deux différents tests de cytotoxicité sur des 3T3, suivant la norme ISO 10993-5 : cytotoxicité par extrait et cytotoxicité par contact direct.

La toxicité des extraits est étudiée sur C0 et le C4. Comme on l'a vu précédemment, ce test permet de mesurer la présence éventuelle d'agents toxiques se diffusant dans le milieu. On a choisi ces surfaces afin de déterminer si les changements subis par le TA6V durant le procédé SLM entraîne l'émission de toxiques par rapport à du TA6V obtenu via un procédé traditionnel (choix de la surface C4). Par ailleurs, la présence des particules à la surface et le risque de détachement peut aussi être une source de toxicité (d'où le choix de C0). A partir de la géométrie des matériaux, un ratio de 3cm²/ml de milieu a été pris (recommandation de l'ISO). Pour chaque matériau, une extraction est obtenue en 24h sous 60 PRM à 37°C dans le milieu de culture (ici avec sérum). L'étude a été réalisée sur des extraits purs, à 50%, à 10% et à 1%. Dans le cas où une toxicité est bien présente, cela permet de déterminer l'amplitude de celle-ci. En plus des matériaux d'études, des contrôles positifs et négatifs ont été utilisés afin de vérifier la cohérence des résultats, sous la forme du PTFE et du latex (étant respectivement les témoins négatifs et positifs de toxicité). Ce test de cytotoxicité par extrait se réalise en 3 jours selon 3 différentes étapes : (i) le premier jour les matériaux sont mis à extraire et les cellules sont ensemencées à 15000/cm² dans des puits de 31cm² ; (ii) le second jour, les extraits sont récupérés, dilués et déposé au contact des cellules ; (iii) le troisième jour, les extraits sont retirés et un colorant (le rouge neutre) est incubé avec les cellules durant 3H. Après rinçage, une lyse des cellules est réalisée ; le colorant ayant intégré les membranes des cellules vivantes est ensuite récupéré et mesuré à 540 nm après la lyse des cellules. Chaque étape est précédée d'un rinçage. Une excellente reproductibilité lors de l'ensemencement est primordiale, et constitue un des critères d'acceptation de l'essai. Un répliquât de 5 intra essais et 3 essais indépendants sont réalisés.

La cytotoxicité de toutes les conditions de surfaces choisies a ensuite été quantifiée dans un deuxième temps par un test de cytotoxicité par contact direct. Tout comme la cytotoxicité par extrait, le test de cytotoxicité par contact direct se réalise sur 3 jours en étapes : (i) le premier jour, des puits de 10 cm² sont ensemencés avec 15000 cellules 3T3/cm² ; (ii) le deuxième jour, le matériau est déposé au contact des cellules au centre du puits (une partie des cellules sont « écrasées/étouffées » par le matériau, cette toxicité liée au modèle est celle du contrôle. Dans le respect de la norme, le matériau est placé dans le puit de culture de façon à recouvrir 1/10 des cellules en phase de prolifération) ; (iii) le troisième jour, les matériaux sont ôtés, le colorant mis à incuber pour 3H, chaque puits est observé avec la prise de

clichés (figures 3.5 et 3.6) et la toxicité décrite, puis les cellules sont lysées et le surnageant dosé à 540 nm. Chaque étape est précédée d'un rinçage. De même que pour les tests de cytotoxicité précédents, un répliquât de 5 intra essais et 3 essais indépendants sont réalisés. De la même manière que pour la cytotoxicité par extrait, des contrôles positifs et négatifs ont été définis afin de vérifier la cohérence des résultats, sous la forme du PTFE et du latex.

Pour l'ensemble des tests de cytotoxicité, l'activité métabolique des 3T3 a été quantifiée par une solution de rouge neutre sigma-Aldrich 3.3 [6], [8]. Il s'agit d'une méthode de mesure colorimétrique mesurant l'activité métabolique des cellules. Les résultats sont mesurés via des mesures d'absorbance avec une longueur d'excitation de 540 nm, puis normalisés par rapport au contrôle. Le matériau est considéré comme toxique quand une diminution de plus de 30% est observée par rapport au groupe contrôle (soit un seuil de viabilité cellulaire de 70%). Dans le cas de la cytotoxicité par contact direct, une analyse qualitative est aussi réalisée via l'observation des cellules au microscope afin de caractériser la toxicité.

3.2.1.3. Résultats

La première étude passe par le test de cytotoxicité par extrait. Les résultats de cytotoxicité par extrait sur la figure 3.4 montrent une viabilité cellulaire supérieure à 70% pour l'ensemble des extraits du C0 et de C4, et les contrôles positif (PTFE) et négatif (latex) confirment les résultats. Par rappel, la viabilité cellulaire représente les mesures d'activité métabolique des cellules normalisées par rapport aux cellules dans un puit de culture sans matériau. On remarque que pour chaque condition (C0 et C4), la viabilité diminue avec la concentration de l'extrait. L'absence de différence significative entre C0 et C4 montre que à la fois que le matériau TA6V ne présente pas de toxicité suite au procédé SLM et aux étapes de nettoyages, et que la rugosité du C0, via la présence de particules, ne semble pas diffuser de toxicité.

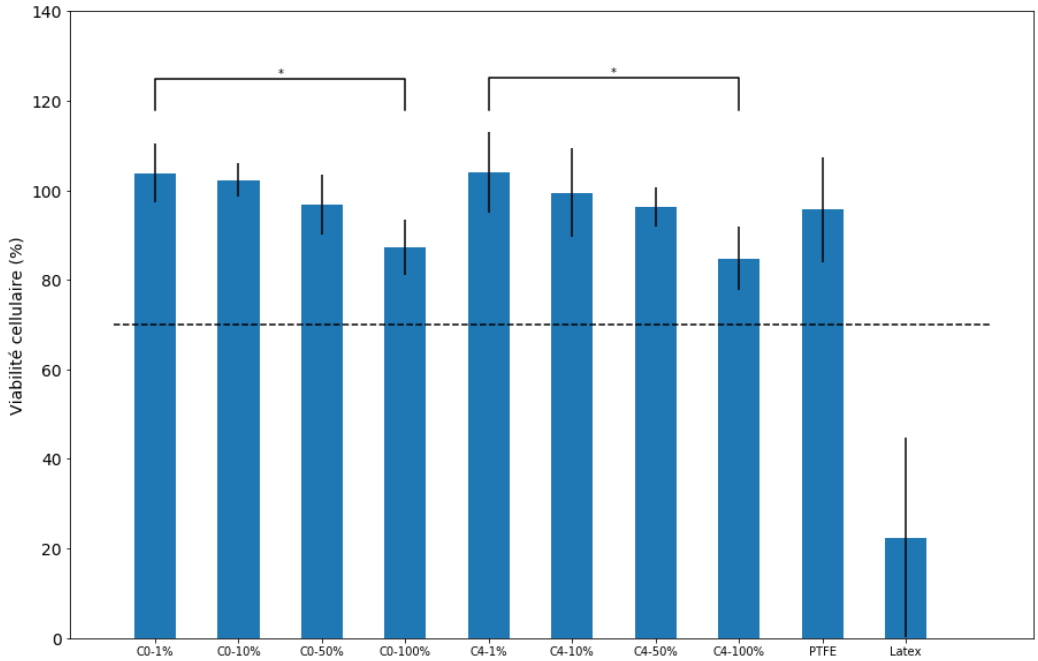


*Figure 3.4 : Résultats de la cytotoxicité par extrait sur C0 et C4. Les résultats ont été normalisés par rapport aux résultats de la surface contrôle. La ligne en pointillés présente 70% de viabilité cellulaire. La mention * indique p<0.05.*

La figure 3.5 présente les résultats qualitatifs et quantitatifs de la cytotoxicité par contact direct sur les matériaux témoins ainsi que sur la surface contrôle. D'un point de vue qualitatif (figure 3.5b), les clichés des cellules de la surface contrôle et du PTFE en zone libre montrent la présence d'une zone dense de cellules, avec de petites granules intracytoplasmiques. Aucune différence n'est observée entre ces deux surfaces. En zone de contact avec le matériau PTFE, une plus faible densité de cellules est observée, due à la présence d'une zone vide créée par l'écrasement des cellules. Cependant, la présence des cellules en périphérie du matériau montre bien l'absence de toxicité du contrôle positif. Les clichés du témoin négatif montrent une absence de cellules dans la zone en contact avec le matériau, ainsi que l'absence de granules intracytoplasmiques dans la zone libre. Ceci traduit une absence d'activité métabolique des cellules, et donc une toxicité présente dans l'environnement cellulaire. D'un point de vue quantitatif, le PTFE présente une viabilité cellulaire d'environ 92% tandis que le latex présente une viabilité d'environ 10%. Cela valide donc l'essai de cytotoxicité par contact direct.

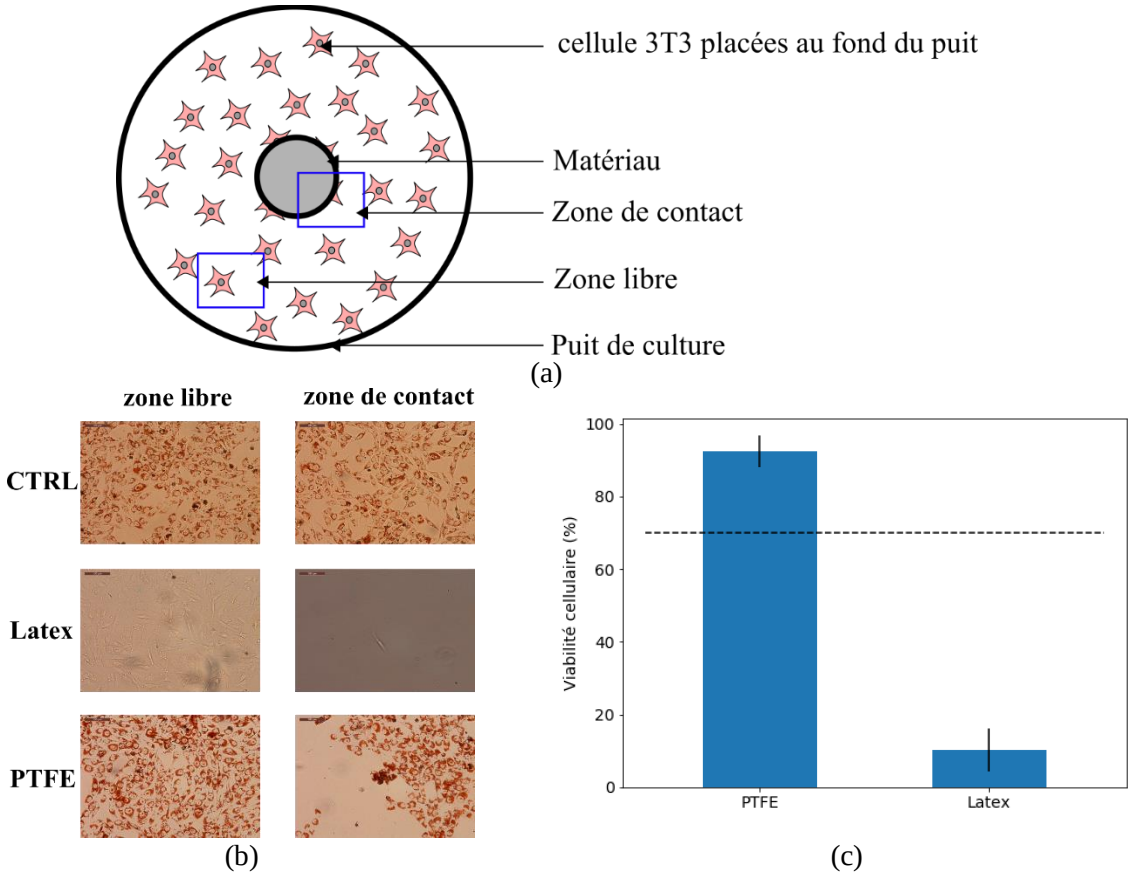


Figure 3.5 : Résultats de la cytotoxicité par contact direct pour les matériaux témoins. (a) Configuration du puit avec les cellules. (b) Images du test au rouge neutre par contact. (b) Images du test au rouge neutre par contact. (c) Résultats de la cytotoxicité par contact direct. Les résultats ont été exprimés en % de la surface contrôle. La ligne en pointillés présente 70% de viabilité cellulaire.

La figure 3.6 montre la population cellulaire en contact et éloignée du matériau pour les différentes surfaces. Dans les zones en contact avec le matériau, les cellules se retrouvent écrasées par celui-ci, donnant donc une zone avec un plus faible nombre de cellules. Concernant les zones libres à proximité du matériau, pour les matériaux de C0 à C4, on retrouve une zone dense de cellules allongées, avec la présence de petites granules intracytoplasmiques. Cela laisse supposer une réactivité faible des cellules à la présence du matériau (en termes de toxicité), limitée à la zone de contact. Qualitativement, aucune différence significative n'est observée entre les différentes surfaces.

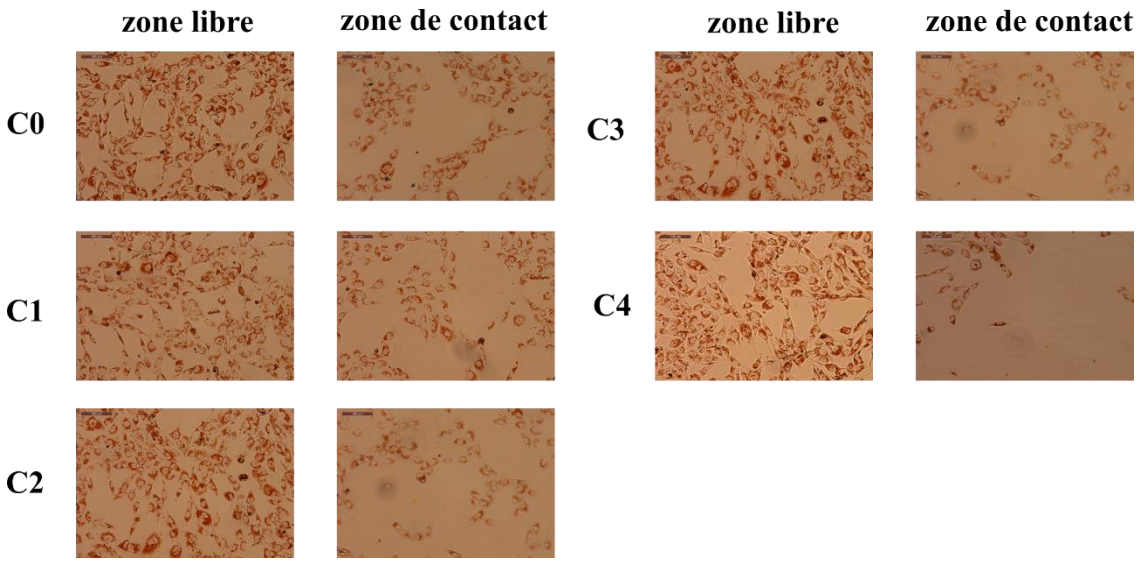


Figure 3.6 : Images du test au rouge neutre par contact pour les différentes surfaces

Les résultats du test de cytotoxicité par contact direct sont présentés dans la figure 3.7. L'ensemble des surfaces testées (de C0 à C4) montrent une viabilité cellulaire supérieure à 70%, avec aucune différence significative observée. Ces résultats valident bien que le procédé SLM ainsi que les différents traitements de surfaces appliquées n'engendrent pas de toxicité significative sur le TA6V.

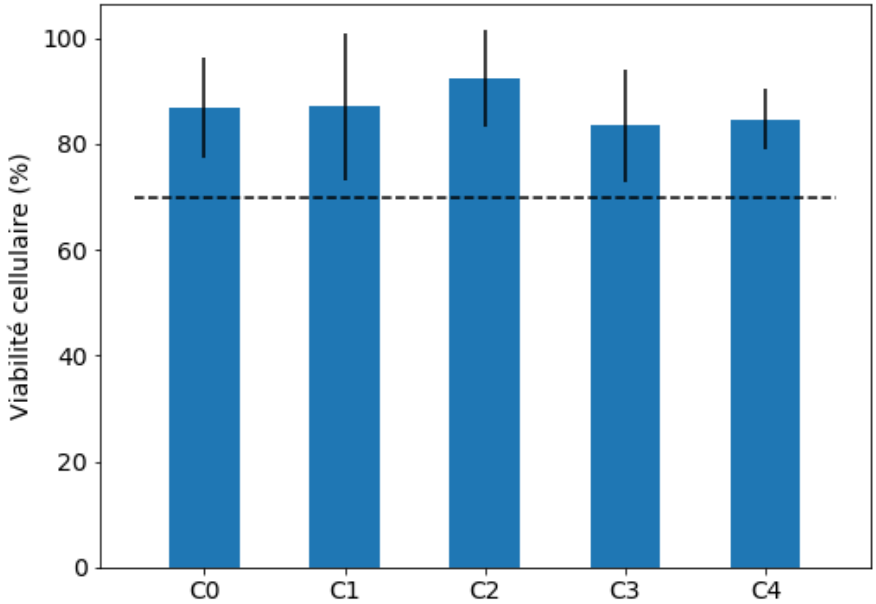


Figure 3.7 : Résultats de la cytotoxicité par contact direct sur les 5 différentes surfaces. Les résultats ont été exprimés en % de la surface contrôle. La ligne en pointillés présente 70% de viabilité cellulaire.

Les résultats permettent donc de vérifier la non toxicité du procédé SLM sur le TA6V. La littérature indique que les alliages de TA6V présentent une protection à la corrosion liée à la création spontanée d'une couche passive de TiO2. Cette couche, d'une épaisseur de quelques nanomètres, est affectée par les traitements de surface. Ainsi, ces traitements peuvent réduire la résistance à la corrosion pour des implants médicaux. Bien que de nombreuses études aient montré les effets positifs des traitements appliqués en termes de biocompatibilité, toutes se basent sur des surfaces initialement lisses et non rugueuses. L'influence de ces traitements appliquées à des surfaces initialement rugueuses n'a

été que très peu étudiée. Nos résultats de cytotoxicité ont montré que des résultats favorables ont été obtenus pour l'ensemble des surfaces, démontrant ainsi une cytotoxicité satisfaisante pour une application médicale d'ostéointégration. Le risque le plus important provenait de la surface brute, apportée par la présence de particules potentiellement détachables. On peut citer dans ce cas l'étude de K. Tamura et al [9] qui analyse l'influence particules de Ti et de Ni de différentes tailles sur la cytotoxicité, et montre l'effet significatif de fines particules de Ti sur la cytotoxicité, en particulier pour une taille de particule inférieure à la taille de la cellule.

3.2.2. Analyse de l'adhésion

3.2.2.1. Description de l'adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire sur un substrat solide joue un rôle significatif au sein de l'ostéointégration car il s'agit du premier contact entre la cellule et la surface du substrat, servant de base au développement et à la maintenant de tissues osseux [10]. L'adhésion cellulaire est impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires, tels que la migration, le cycle cellulaire, et la différentiation cellulaire. Son affinité au substrat va jouer un rôle crucial au sein de la conception de biomatériaux. L'adhésion à la surface se fait selon des adhésions focales, permettant la liaison entre la cellule et le substrat via la formation de sites d'adhésions formés d'intégrines et de molécules d'adhésions (protéines transmembranaires) permettant d'ancrer la cellule à la MEC. Ces adhésions focales sont directement connectées au cytosquelette de la cellule, permettant une transmission directe des forces adhésives et des forces de traction. L'adhésion de la cellule au substrat peut être décomposée en 3 étapes [11] : (i) une phase de sédimentation où la cellule arrive au contact de la surface. Cette phase va dépendre des interactions électrostatiques afin de permettre un bon contact entre la cellule et le substrat ; (ii) une phase d'adhésion initiale où la cellule va commencer à s'aplatir et à créer des liaisons d'intégrines avec la MEC ; (iii) une phase de stabilisation de l'adhésion où la cellule va se répandre sur la surface et formée des points d'adhésions focales stables avec la surface. La littérature nous montre globalement une augmentation de l'adhésion initiale avec la présence de rugosité à l'échelle microscopique. Ainsi, au sein de notre étude, nous n'analyserons pas les différentes phases d'adhésion mais nous nous concentrerons sur les différences de comportements d'adhésion selon les différentes surfaces.

Différentes méthodes existent afin de mesurer l'adhésion des cellules à la surface, que ce soit via une mesure de l'attachement ou du détachement des cellules. Une liste de l'ensemble des méthodes existantes est faite au sein de l'article de Khalil et al [10]. Les méthodes sont différentes selon la mesure d'une cellule ou d'une population de cellules. Parmi les différentes méthodes de mesure de l'adhésion pour une population de cellules, on peut citer la méthode micro fluidique, celle par résonance fréquentielle, ou celle par rinçage, communément utilisée. Nous nous concentrerons sur cette dernière méthode ici. Le principe consiste à mettre en culture les cellules sur le substrat pour une période d'incubation donnée. Après cette période, la surface est alors rincée, puis analysée en termes d'adhésion (nombre de cellules, quantité d'ADN…). La méthode par rinçage permet d'obtenir des données quantitatives sur l'adhésion, en déterminant la fraction de cellules restant adhérée à la surface après un ou plusieurs rinçages. L'avantage de cette méthode est qu'elle est simple à mettre en place tout en étant efficace. Cependant, il reste à noter qu'il s'agit d'une mesure statique avec une faible reproductibilité. On peut aussi ajouter que cette méthode de mesure est plus qualitative que quantitative.

3.2.2.2. Matériels et méthodes

La quantification de l'adhésion cellulaire pour chacun des matériaux a été réalisée, avec l'ajout de la surface contrôle comme surface de référence connue pour les cellules. Au préalable, les matériaux ont été déposés dans des puits de culture de même surface et mis à incuber pour une durée de 24h en

milieu DMEM (dépourvu de sérum et de rouge phénol). Chaque essai a été réalisé avec un pool différent de cellules humaines souches hMCS (pool de 3 donneurs différents obtenu via BIOTIS U1026). Une suspension de 50 000 cellules/cm² dans un milieu dépourvu de rouge phénol et de sérum (DMEM) est déposée dans les puits sur les matériaux et le contrôle, puis laissée à incuber. Afin de quantifier l'adhésion des hMSCs sur la surface contrôle ainsi que sur les éprouvettes des différentes catégories, un dosage de l'activité d'une enzyme lysosomale (Sigma: la N acétyl β-D-hexosaminidase [12]) a été réalisé à 2 temps : 1 heure (1H) et 3 heures (3H). Pour cela, chaque puits a été rincé avec du PBS à la fin de la période d'adhésion pour éliminer les cellules non adhérentes. Une solution contenant le substrat (N acétyl β-D-hexosaminidase) est alors déposée sur les matériaux avec les cellules et laissée incuber 2h à 37°C. La valeur d'absorbance de chaque matériau nu (non cellularisés) est alors retirée des valeurs des matériaux cellularisés. Cette valeur d'absorbance mesure l'activité métabolique qui est corrélée à la quantité de cellules présente. Chaque condition a été répétée 5 fois en intra essai (pour un même pool de cellules).

3.2.2.3. Résultats

Les tests n'ont pu être réalisés que sur deux pools de cellules, ce qui ne permet pas de valider statistiquement les résultats. Le paragraphe suivant analyse les résultats établis avec ces deux pools.

La figure 3.8 montre l'évolution des mesures d'absorbance de l'adhésion cellulaire sur la surface contrôle pour les deux pools de cellules. Le pool 1 ne présente pas de différence significative entre la mesure d'absorbance à 1H et 3H ($p>0.05$, Kruskal-Wallis). Au contraire, une augmentation significative est observée pour le pool 2 de 1H à 3H ($p<0.05$, Kruskal-Wallis).

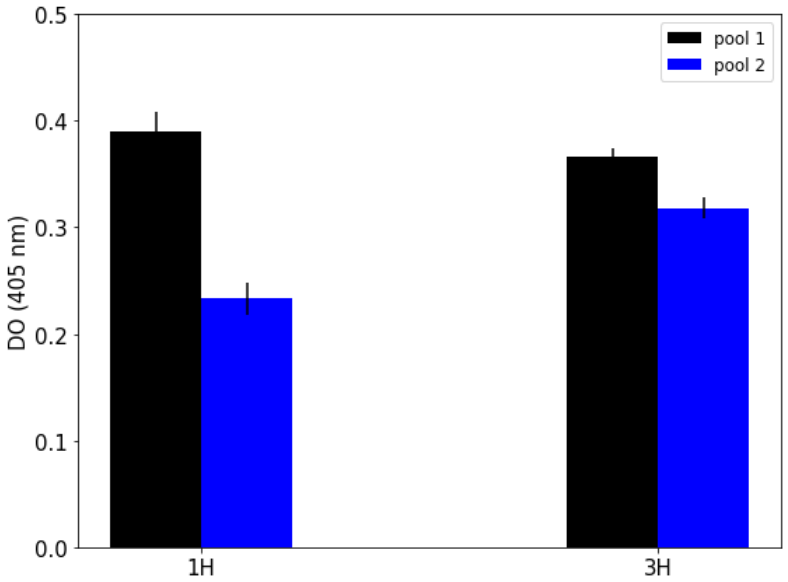


Figure 3.8 : Evolution de la population sur la surface contrôle à 1 heure et 3 heures pour les deux pools de cellules.

La figure 3.9 montre l'évolution de l'adhésion cellulaire sur les 5 différentes surfaces pour des durées de 1H et de 3H, et pour deux pools de cellules.

Concernant le pool 1, l'adhésion cellulaire à 1H est la plus grande sur C0 avec une valeur atteignant 91% (± 4) de la surface contrôle. On observe ensuite les surfaces C1 et C3, présentant une adhésion respective de 68% (± 5) et 71% (± 7), sans aucune différence significative entre les deux surfaces ($p>0.05$, Kruskal-Wallis). Enfin, C2 et C4 présentent les plus faibles adhésions, avec des valeurs respectives de 62% (± 5) et 58% (± 4), sans aucune différence significative entre les deux

surfaces (p>0.05, Kruskal-Wallis). L'évolution de l'adhésion de 1H à 3H dans la figure 3.9a ne montre aucune différence significative pour C0, C1 et C3. Cependant, une augmentation significative est observée pour C2 et C4 (p<0.05, Kruskal-Wallis). Pour l'adhésion 3H, aucune différence significative n'est observée entre C4 et les autres surfaces (C0, C1, C2 et C3), avec C0, C1, C2, C3 et C4 affichant des valeurs respectives de 92% (± 4), 81% (± 12), 82% (± 10), 74% (± 7) et 79% (± 9) de la surface contrôle. Les résultats du pool 1 nous permettent donc de supposer une adhésion initiale (adhésion à 1H) importante sur C0, avec cependant une homogénéisation de l'adhésion à 3H, comme on le voit sur la figure 3.9b.

Cependant, les résultats du pool 2 ne semblent pas confirmer les observations faites. En effet, les résultats de l'adhésion cellulaire à 1H (figure 3.9c) ne montrent aucune différence significative entre les surfaces (p>0.05, Kruskal-Wallis), avec des valeurs oscillant autour de 55% de l'adhésion sur la surface contrôle. De plus, l'évolution de l'adhésion cellulaire de 1H à 3H montre une augmentation significative uniquement pour C0 et C4. On obtient alors à 3H une adhésion cellulaire pour C1, C2, C3 et C4 de valeurs respectives 72% (± 4), 61% (± 14), 55% (± 13), 61% (± 8) et 78% (± 8) de la surface contrôle. Seule C0 et C4 montre une différence significative (p<0.05, Kruskal-Wallis). Contrairement au pool 1, une différence claire se crée entre C4 et les autres surfaces à 3H (figure 3.9d).

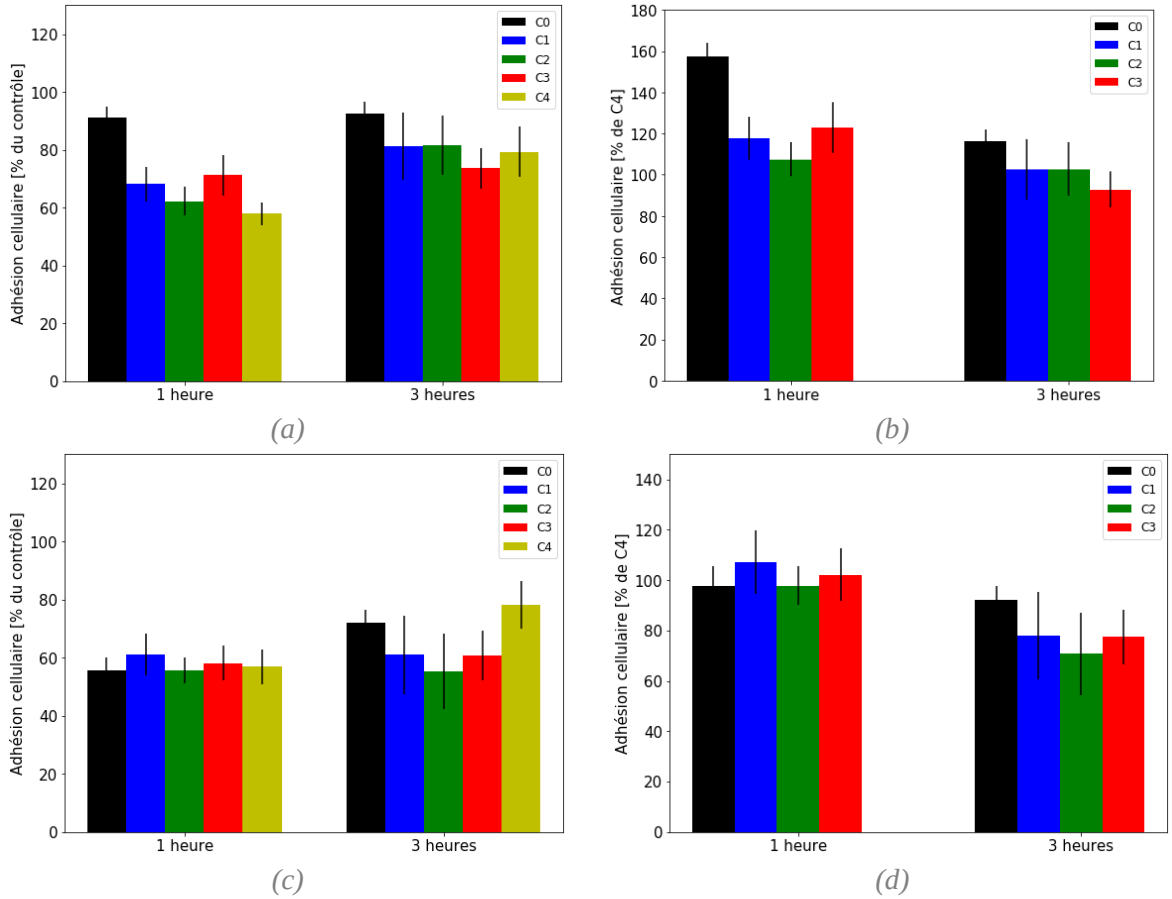


Figure 3.9 : Résultats du test d'adhésion cellulaire sur les 5 différentes surfaces pour des durées de 1H et de 3H ainsi que pour les deux pools de cellules. La première colonne (a et c) présente les résultats normalisés par rapport aux résultats de la surface contrôle à t= 3h. La deuxième colonne (b et d) présente les résultats normalisés par rapport à C4 pour chaque heure.

Les résultats de l'adhésion cellulaire de la figure 3.9 ne permettent pas de mettre en lumière une tendance sur la cinétique d'adhésion ainsi que sur la différence d'adhésion entre les surfaces. Le seul résultat commun aux deux surfaces est l'augmentation de l'adhésion cellulaire de C1 à C4. De plus, les écart-types observés sur les résultats d'adhésion cellulaire varient de 5% à 20% de leur valeur moyenne. En

particulier, les plus grands écart-types sont observés pour les surfaces C1 et C2 à 3H, montrant ainsi une certaine hétérogénéité dans l'adhésion cellulaire sur ces surfaces. Néanmoins, ces écart-types sont considérés comme faibles devant les variations apportées par le changement de pool, garantissant une bonne répétabilité du test ainsi que des matériaux.

Afin de comparer l'influence des différents états de surfaces sur l'adhésion cellulaire, une étude comparative entre C4 (matériau polie) et les autres matériaux est réalisée (figure 3.9b et 3.9d).

Le matériau C0 présente la surface la plus rugueuse (Sa=15.3 µm (± 1.2)) et le plus grand angle de contact aqueux (θ_{eau} = 95° (± 3.6)). Le pool 1 de hMSCs nous montre que l'adhésion initiale (1H) est plus importante par rapport à C4 avec une valeur de 157% (figure 3.9b). Cependant, cette différence se réduit de 1H à 3H afin d'obtenir une adhésion équivalente à C4 pour t=3H ($p>0.05$, Kruskal-Wallis). Cependant, les résultats du pool 2 contredisent ces résultats, en ne montrant aucune différence significative entre C0 et C4 pour t=1H et t=3H (figure 3.9d). Les résultats ne nous permettent pas de conclure sur l'influence de la rugosité de C0 sur l'adhésion cellulaire.

C1 et C2 présente une diminution progressive de la rugosité avec l'attaque chimique (dans le sens suivant : C1>C2) avec des propriétés hydrophiles. Les résultats du pool 1 (figure 3.9b) ne montrent aucune différence significative entre C1, C2 et C4 au moment de l'adhésion initiale et l'adhésion à 3H. Cependant, si les résultats du pool 2 (figure 3.9d) ne montrent pas de différences significatives durant l'adhésion initiale, de plus faibles valeurs d'adhésions sont néanmoins observées sur C1 et C2 pour l'adhésion à 3H, atteignant respectivement les valeurs de 78% et 71% de C4. Pour l'ensemble des résultats, aucune différence significative n'est observée ($p>0.05$, Kruskal-Wallis).

C3 est une rugosité du même ordre de grandeur que C1 avec un fort angle de contact aqueux (voir figure 3.2b). Les résultats du pool 1 (figure 3.9b) montrent une adhésion initiale supérieure à C4, avec une valeur de 123% de C4. Cependant, une adhésion équivalente à C4 est observée à t=3H. Les résultats du pool 2 montrent quant à eux une adhésion initiale équivalente, suivie par une adhésion plus faible à t=3H, prenant pour valeur 77% de C4 (figure 3.9d).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats ne mettent pas en évidence de corrélation entre la rugosité et l'adhésion cellulaire, ainsi qu'entre la mouillabilité et l'adhésion cellulaire.

3.2.3. Analyse de la prolifération cellulaire

3.2.3.1. Description de la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est un processus durant lequel les cellules croissent et se divisent ; cela fait de la prolifération cellulaire un élément essentiel au bon fonctionnement de l'organisme.

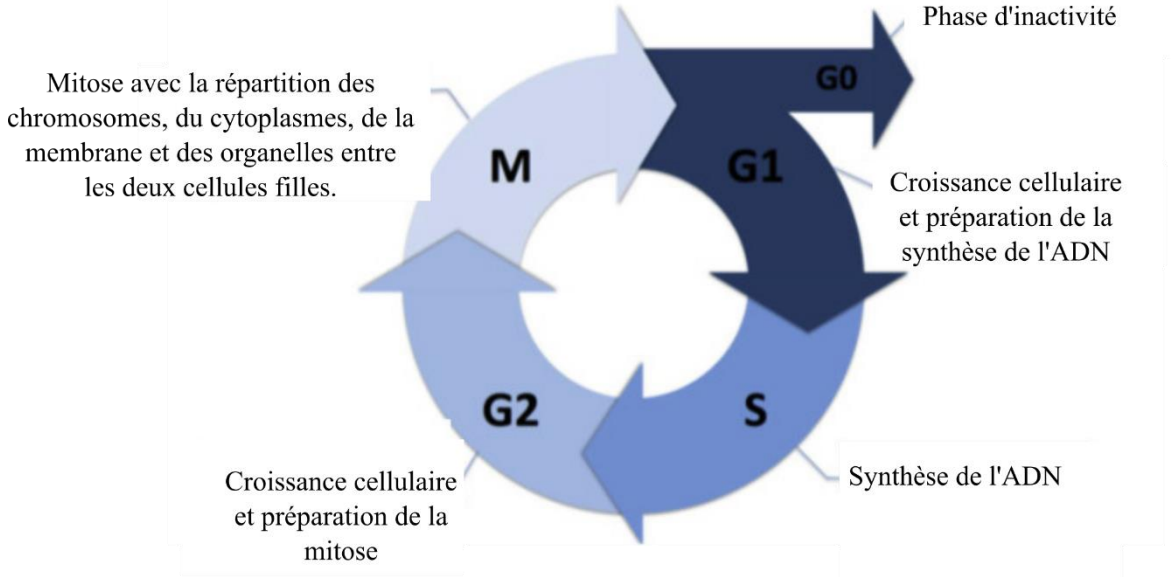


Figure 3.12 : Cycle de vie cellulaire, tiré de [13]

La prolifération cellulaire est régie par le cycle de vie cellulaire, composé de deux phases majeures (figure 3.12) : l'interphase et la mitose. Cette interphase, composant la majorité de la vie de la cellule, se décompose en 3 sous-phases : (i) la phase G1 où le cellule croît et prépare la synthèse de l'ADN ; (ii) la phase S où la cellule synthétise de l'ADN ; et (iii) la phase G2 où la cellule continue de croître et se prépare à la mitose [13]. La phase M de mitose résulte de, la création de deux cellules filles identiques à la cellule mère d'origine. Après cette phase, on arrive dans une phase G0 où la cellule va devenir inactive.

Les tests de proliférations utilisent généralement les caractéristiques de chaque phase pour pouvoir quantifier celle-ci. Différentes méthodes existent afin de quantifier la prolifération cellulaire et une liste de celles-ci est décrite au sein de l'étude de Romar et al [13]. Celles-ci peuvent être décomposées selon 3 différentes catégories selon les éléments mesurés : (i) les méthodes basées sur la mesure de la synthèse d'ADN ; (ii) les méthodes basées sur la mesure de l'activité métabolique ; (iii) les méthodes basées sur la mesure de protéines jouant un rôle au sein de la prolifération. Au sein de notre étude, nous nous concentrerons sur les mesures de prolifération cellulaire via l'activité métabolique. Une méthode communément utilisée se base sur une méthode colorimétrique utilisant l'activité enzymatique comme marqueur de la viabilité cellulaire. Les enzymes testées produisent une couleur ou une fluorescence pouvant être mesurées par spectrophotométrie.

3.2.3.2. Matériels et méthodes

La quantification de la prolifération des hMSCs a été réalisée via des tests de prolifération sur les 5 différents matériaux et la surface contrôle avec 2 pools de cellules humaines souches hMCS, utilisés précédemment au sein de l'étude d'adhésion cellulaire. Au préalable, les matériaux ont été incubés 24h dans un milieu permettant la prolifération des cellules (composé de alpha MEM et de sérum et antibiotique [7], [14]), puis ensemencés avec des hMSCs à 5000 cellules/cm^2. Un suivi comparatif à 1 jour (J1), 4 jours (J4), 7 jours (J7) et 11 jours (J11) a été fait pour chaque essai. Concernant l'essai sur le pool 2, la prolifération a pu être conduite jusqu'à 18 jours (J18) (avec un temps intermédiaire à 14 jours (J14)). Seuls les résultats jusqu'à J11 ont été conservés. Les tests de prolifération ont été réalisés avec deux milieux en parallèle, un dit de prolifération (alpha MEM (GIBGO) avec 10% de sérum de

veau fœtal) et l'autre dit de différenciation vers la voie ostéoblastique (STEMPRO Osteogenesis Differentiation Kit (Life Technology)).

La prolifération des cellules a été mesurée à l'aide de l'Alamar Blue, qui mesure l'activité métabolique cellulaire. Son le principe actif est basé sur la résazurine, utilisée comme indicateur d'oxydoréduction. Elle subit un changement colorimétrique en réponse à la réduction métabolique cellulaire. La résazurine, bleue à l'état natif, est perméable aux cellules, non toxique et faiblement fluorescente [15]. Sous forme réduite, la résazurine est rose et hautement fluorescente. L'intensité de la fluorescence est proportionnelle au nombre de cellules vivantes, et a été mesurée selon une longueur d'onde d'excitation de 530 nm. De la même manière que pour l'attachement, les matériaux nus ont aussi été testés et leurs valeurs ont été déduites des mesures. Chaque condition a été répétée 5 fois en intra essai (pour un même pool de cellules).

3.2.3.3. Résultats

3.2.3.3.1. Activité métabolique des deux pools de cellules

L'ensemble des tests de prolifération n'ayant pas pu être réalisés, les résultats obtenus ne sont pas vérifiables statistiquement (seulement deux pools). Ainsi, l'ensemble des interprétations faites dans cette partie ne sont qu'hypothétiques.

La figure 3.13 présente l'évolution de l'activité métabolique des hMSCs jusqu'à 11 jours sur la surface contrôle avec la mesure de l'absorbance de l'Alamar Blue (via sa fluorescence), en milieu de prolifération (figure 3.13a) et en milieu de différenciation (figure 3.13b). Les résultats montrent des différences significatives selon le pool de cellules et le milieu utilisé. En milieu de prolifération (figure 3.13a), une croissance globale est observée de J1 à J11 pour le pool 1 bien qu'une diminution ponctuelle soit observée à J7. Le pool 2 présente une phase inerte de J1 à J4, pour ensuite augmenter jusqu'à J11. Pour les deux pools de cellules, au moins deux phases de mitoses se sont déroulées. Ces résultats semblent donc mettre en évidence une différence de dynamique cellulaire entre les deux populations. Cette différence de dynamique cellulaire entre les deux pools se retrouve aussi en milieu de différentiation. Le pool 1 présente une augmentation de son activité métabolique de J1 à J7, suivi par une diminution à J11. On retrouve une phase inerte de J1 à J4 pour le pool 2, avec par la suite une augmentation de l'activité métabolique jusqu'à J11. De la même manière qu'en milieu de prolifération, au minimum deux phases de mitoses se sont déroulées pour les deux pools de cellules. Les résultats obtenus sur la surface contrôle dévoilent deux observations importantes : (i) la prolifération semble être moins importante en milieu de différenciation avec la présence d'un plateau ; (ii) le pool 2 de cellules semble présenter une dynamique cellulaire moins importante.

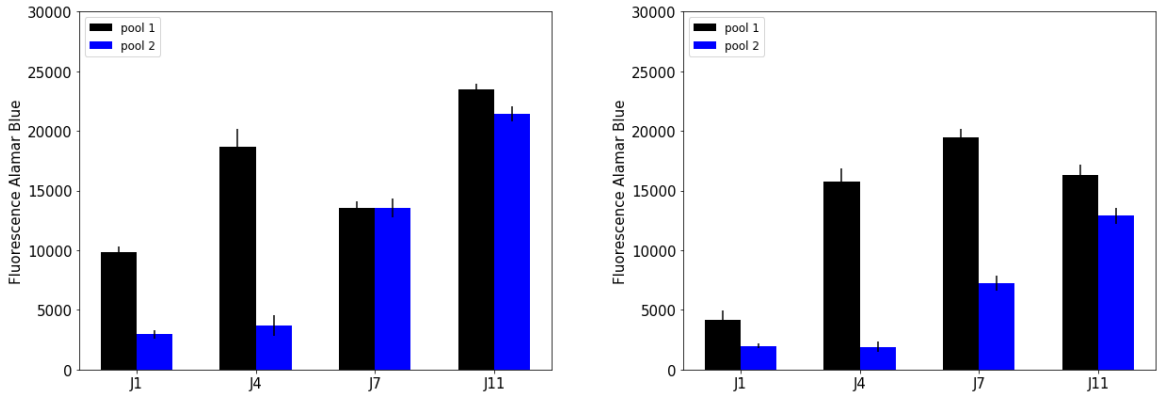


Figure 3.13 : Résultats de l'analyse d'absorbance du test contrôle au sein des deux milieux pour une durée de 11 jours et pour les deux pools de cellules. (a) Milieu de prolifération. (b) Milieu de différenciation.

3.2.3.3.2. Activité métabolique en milieu de prolifération

La figure 3.14 montre l'évolution de l'activité métabolique de la population pour les différents matériaux en pourcentage de la surface contrôle à J11 (figure 3.14a et 3.14c) et en pourcentage de C4 (figure 3.14b et 3.14d) en milieu de prolifération classique. Deux pools de cellules sont étudiés.

Les résultats de la prolifération cellulaire du pool 1 (figure 3.14a) montre une augmentation de l'activité métabolique sur l'ensemble des matériaux d'études de J1 à J11. De plus, deux phases de mitoses sont observées pour l'ensemble des matériaux (de J1 à J4 et de J7 à J11). La phase initiale de la prolifération (J1) montre une plus faible prolifération sur C0 par rapport aux autres matériaux ($p=0.03$, Krukal-Wallis). Cela se retrouve à J11 avec C0 et C3 affichant les plus faibles proliférations, prenant respectivement les valeurs de 87.4% (± 6.2) et 96.7 % (± 3). Les plus grandes proliférations sont observées pour C1, C2 et C4, avec pour valeurs respectives 106.2% (± 7), 107.4% (± 4) et 113% (± 2.9).

Les résultats obtenus sur le pool 2 (figure 3.14c) présentent des différences significatives par rapport au pool 1. En effet, on retrouve bien une augmentation de l'activité métabolique à de J1 à J11 avec la présence de deux phases de mitose. Cependant, une absence de croissance significative ($p>0.05$, Krukal-Wallis) est observée entre J1 et J4 pour tous les matériaux. De plus, si aucune différence significative n'est observée entre les matériaux à J1 et J4, les résultats obtenus à J11 montre les proliférations maximales sont mesurées pour C0, C1, C2 et C4, avec des valeurs respectives de 104.7% (± 7.1), 100.7% (± 7.3), 112.1% (± 7.5) et 100.3% (± 10.7). Le matériau C3 présente une prolifération significativement plus faible à J11 ($p<0.01$, Krukal-Wallis) avec une valeur de 71.9% (± 6). Les résultats ne permettent pas de mettre en évidence des différences significatives entre les matériaux. On peut supposer que les matériaux C1, C2 et C4 présentent un taux de prolifération équivalent à la surface contrôle tandis que C0 semble présenter une prolifération un peu moins importante. C3 semble montrer la prolifération la moins importante ; cependant aucune de ces hypothèses n'est vérifiable.

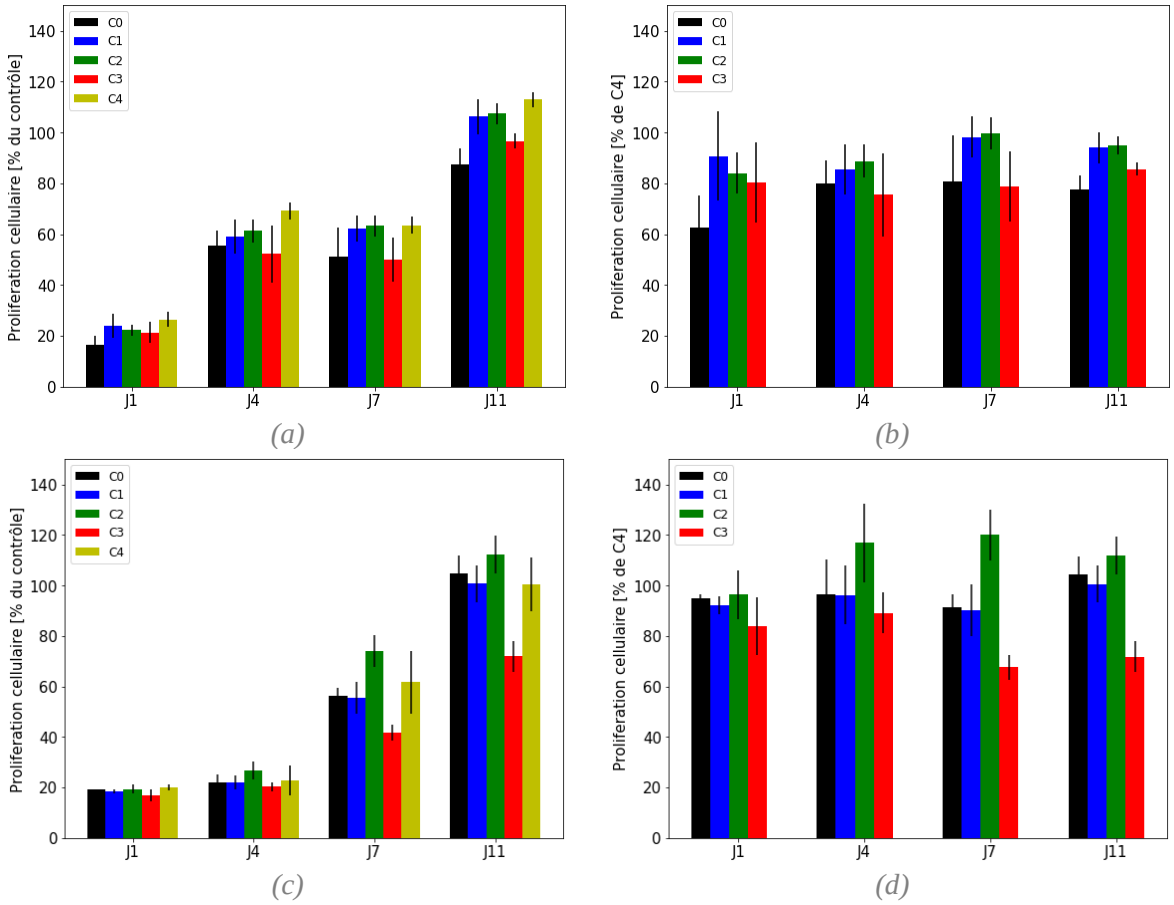


Figure 3.14 : Résultats du test de prolifération en milieu de prolifération pour les 5 différentes surfaces et pour une durée de 11 jours. Ces résultats regroupent l'analyse de deux pools de cellules. (a) Prolifération du pool 1 normalisée par la surface contrôle à J11. (b) Prolifération du pool 1 normalisée par la surface C4. (c) Prolifération du pool 2 normalisée par la surface contrôle à J11. (d) Prolifération du pool 2 normalisée par la surface C4.

Dans le but de comparer l'influence des différents états de surfaces sur la prolifération, une étude comparative entre C4 (matériau polie) et les autres matériaux est réalisée (figure 3.14b et 3.14d).

C0 est le matériau présentant la plus grande rugosité et le plus grand angle de contact aqueux (voir figure 3.2b). Le pool 1 montre que ce changement de surface donne une prolifération plus faible, C0 restant globalement inférieur à 80% de l'activité cellulaire de C4 tout le long de la prolifération. Cependant, le pool 2 montre une diminution progressive de la différence relative entre les deux matériaux, passant de 92% de C4 pour J1 à 100% de C4 pour J11. Ce dernier résultat vient donc contredire l'hypothèse d'une influence de l'état de surface de C0 sur la prolifération à long terme.

C1 et C2 présentent une diminution progressive de la rugosité avec l'attaque chimique (dans le sens suivant : C1>C2) avec des propriétés hydrophiles. Le pool 1 montre que les deux matériaux ne présentent pas de différences significatives tout le long de l'attaque chimique. La comparaison avec C4 montre une diminution de la différence relative avec celui-ci, passant d'environ 85% pour J1 à 100% pour J11. Le pool 2 quant à lui présente des différences significatives avec le pool 1, notamment avec des différences entre l'évolution de C1 et de C2. Comparé à C4, C1 reste à la même différence relative de 90% de J1 à J11. Au contraire, La prolifération sur C2 est plus efficace comparé à C4 pour J4, J7 et J11, bien qu'aucune différence significative n'ait été observée ($p>0.05$, Krukal-Wallis). Les résultats des deux pools ne permettent donc pas de mettre en évidence des différences d'influence entre l'état de surface de C1/C2 et celui de C4.

C3 est une rugosité du même ordre de grandeur que C1 avec un fort angle de contact aqueux (voir figure 3.2b). Les résultats du pool 1 ne montrent pas de différence significative entre les différents temps avec des valeurs restant autour de 80% de la valeur de C4. Cependant, le pool 2 montre une diminution plus importante de la prolifération, atteignant la valeur de 69% de C4 à J11. On peut donc supposer que la prolifération des hMSCs est moins efficace sur C3 par rapport à C4. Néanmoins, cela reste une supposition.

3.2.3.3.1. Activité métabolique en milieu de différenciation

La figure 3.15 montre l'évolution de l'activité métabolique de la population pour les différents matériaux en pourcentage de la surface contrôle à J11 (figure 3.15a et 3.15c) et en pourcentage de C4 (figure 3.15b et 3.15d) en milieu de différentiation. De la même manière que précédemment, les deux pools de cellules sont étudiés. Contrairement au milieu de prolifération, le milieu de différenciation a pour effet de favoriser la différenciation les hMSCs vers une lignée ostéoblastique. Cependant, cela ne signifie pas que les cellules analysées sont des hMSCs différenciés.

L'évolution de l'activité métabolique de la population au sein du pool 1 (figure 3.15a) montre une augmentation de cette activité pour l'ensemble des matériaux jusqu'à J7, avec la présence de deux phases de mitoses. Différents comportements sont alors observés selon les matériaux. C0 et C3 présentent les plus faibles proliférations en atteignant les valeurs respectives de 95.2% (± 9.3) et 97% (± 11) de la surface contrôle à J7. Aucune différence significative n'est observée à J11 ($p>0.05$, Kruskal-Wallis). C1 présente un maximum à J7 avec la valeur de 110.5% (± 10) à J7, suivi par une diminution de l'activité métabolique à 96.7% (± 7.4). Enfin, C2 et C4 présentent les plus fortes proliférations, avec maximum à J7 pour des valeurs respectives de 119.5% (± 9.2) et 117.7% (± 3.6). Aucune différence significative n'est observée à J11 ($p>0.05$, Kruskal-Wallis).

La dynamique cellulaire des hMSCs du pool 2 sur les différents matériaux (figure 3.15c) change significativement par rapport au pool 1. L'augmentation de l'activité métabolique de J1 à J11 n'est pas observée sur l'ensemble des surfaces, avec seulement C2 montrant deux phases de mitose. De plus, excepté C0, une phase inerte est observée de J1 à J4. C0 présente une augmentation jusqu'à J7, suivi par aucune évolution significative à J11 ($p>0.05$, Kruskal-Wallis), atteignant ainsi la valeur de 54.3% (± 24.5) de la surface contrôle. C1, C2 et C4 montrent une augmentation continue jusqu'à J11, pour des valeurs respectives de 58.8% (± 8.8), 93.1% (± 19.9) et 69% (± 8.1). Les hMSCs sur C2 présentent donc la plus grande prolifération tandis qu'aucune différence significative n'est observée entre C1 et C4. Enfin, aucune évolution significative n'existe pour C3 entre J1, J4, J7 et J11 ($p=0.21$, Kruskal-Wallis), la valeur d'activité métabolique variant de 20.7% (± 2.8) pour J1 à 36% (± 19.4) pour J4. La prolifération des hMCS n'est donc pas prouvée sur C3.

Les différences significatives de résultats entre le pool 1 et le pool 2 ne permettent pas de conclure sur l'influence des différentes surfaces. On peut cependant supposer que C2 est l'une des surfaces où la prolifération est la plus efficace tandis que C3 est celle où la prolifération est la moins efficace. De plus, de forts écarts-types (pouvant atteindre plus de 50% de la moyenne) sont observés pour le pool 2 en milieu de différenciation. Cependant, des écart-types ne sont observés ni sur le pool 1 en milieu de différenciation, ni pour le pool 2 en milieu de prolifération. On peut donc supposer que cette différence n'est ni le résultat d'une hétérogénéité de surface entre un même matériau, ni le résultat de variations intra expérience, mais plutôt la réponse de la dynamique cellulaire à l'état de surface.

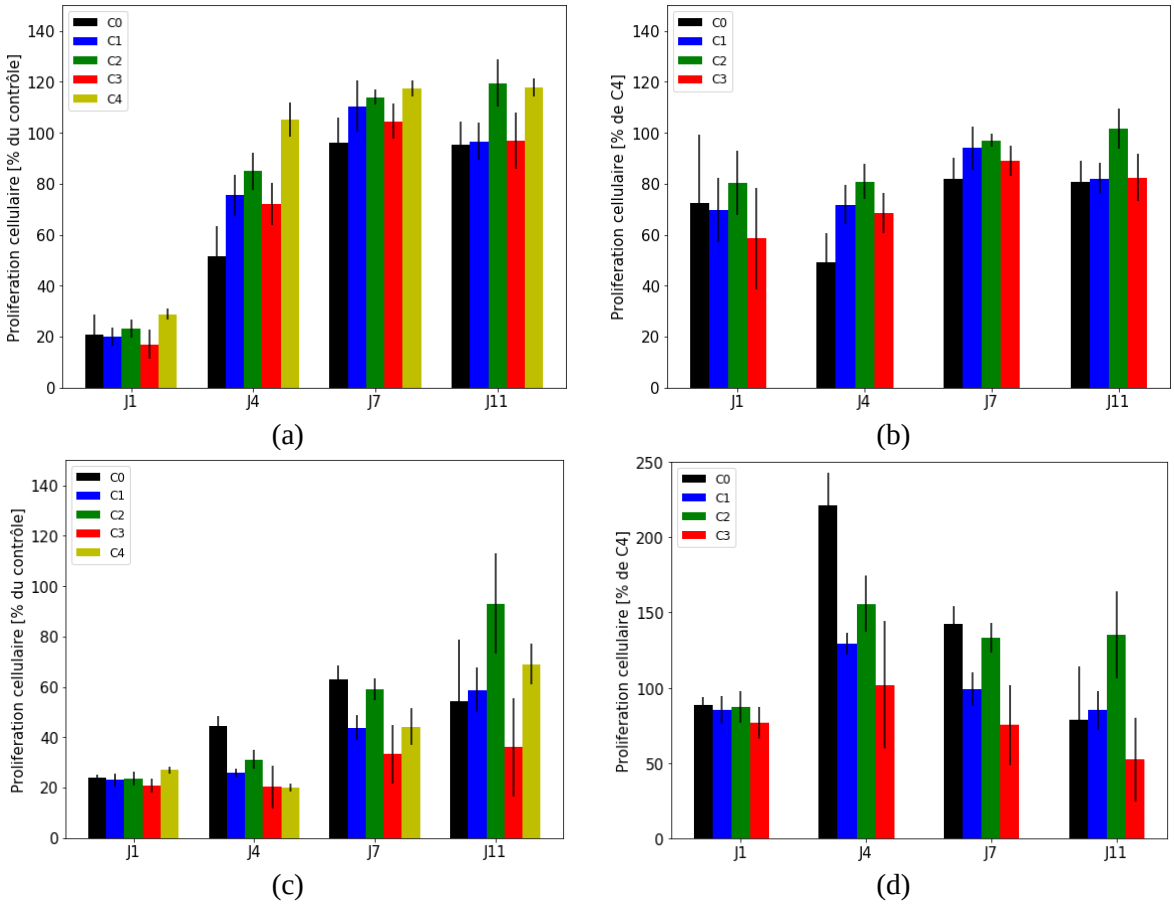


Figure 3.15 : Résultats du test de prolifération en milieu de différentiation pour les 5 différentes surfaces et pour une durée de 11 jours. Ces résultats regroupent l'analyse de deux pools de cellules. (a) Prolifération du pool 1 normalisée par la surface contrôle à J11. (b) Prolifération du pool 1 normalisée par la surface C4. (c) Prolifération du pool 2 normalisée par la surface contrôle à J11. (d) Prolifération du pool 2 normalisée par la surface C4.

De la même manière que pour l'analyse de la prolifération en milieu de prolifération, une étude comparative de C4 par rapport aux autres surfaces est réalisée afin de déterminer l'influence de la rugosité.

La figure 3.15b montre les résultats de l'activité métabolique du pool 1 pour chacun des matériaux et chacun des temps en pourcentage de C4 pour le milieu de différenciation. C0 et C4 reste inférieure à 80% de C4 tout le long de la prolifération tandis que C1 approche 92% de C4 à J7, pour redescendre à 82% de C4 à J11. La matériau C2 réduit son écart avec C4 tout le long de la prolifération, de 80% pour J1 à 102% pour J11. Bien qu'aucune corrélation ne soit trouvée entre la rugosité moyenne Sa des matériaux et la prolifération, on peut supposer que la diminution de Sa donne une prolifération plus importante. Aucun lien n'a pu être trouvé avec la mouillabilité de la surface.

Cependant, cette hypothèse est contredite par les résultats du pool 2 (figure 3.15d). La comparaison de C0 avec C4 montre une activité métabolique significativement plus grande à J4 et J7, prenant les valeurs respectives de 221% et 142%. Néanmoins, à J11, aucune différence significative n'est observée entre C0 et C4. De manière similaire, C1 présente une activité métabolique plus importante à J4 par rapport à C4, pour une valeur de 129%. Cette différence relative se réduit alors à J7 pour augmenter de nouveau à J11 et atteindre la valeur de 85%. Le matériau C3 montre une activité métabolique similaire à C4 pour J4. Cependant, une diminution de la prolifération cellulaire est observée par rapport à C4, pour atteindre la valeur relative de 52%. Enfin, C2 présente une activité métabolique plus importante que C4 de J4 à J11, avec une valeur à J11 de 134%. Les résultats du pool 2 ne permettent

donc pas de conclure quant à l'influence de la rugosité et de la mouillabilité. Le manque de dynamique des hMSCs du pool 2 semble être la cause de cette différence de résultats.

3.2.4. Analyse de la minéralisation osseuse

3.2.4.1. Description de la minéralisation osseuse

L'ossification de la surface d'un implant au sein d'un site osseux est un processus complexe réalisé par des cellules spécialisées que sont les ostéoblastes. Cependant, ces cellules responsables de la fabrication osseuse ont pour origines des cellules progénitrices que sont les cellules souches mésenchymateuses (MSC). Via un ensemble de signaux biochimiques complexes, ces hMSCs se différencient en préostéoblastes et donnent par la suite des ostéoblastes qui viennent synthétiser de la matière osseuse via la minéralisation. Il existe un nombre important de facteurs (protéines, molécules…) régissant la différenciation des hMSCs en ostéoblastes ainsi que la minéralisation, tels que l'activité du phosphate alcalin ainsi l'expression de collagènes de type I. Cependant, plusieurs études montrent que la forte présence de ces facteurs n'est pas toujours liée à la formation osseuse ni la biocompatibilité. Afin de caractériser l'ossification à la surface, le mesure de la quantité de tissu minéralisé à la surface reste l'approche la plus fiable.

De nombreuses techniques existent afin de caractériser l'apparition de la minéralisation au sein d'une culture de cellules. On peut distinguer deux types d'approches : qualitative et quantitative. L'approche qualitative se base sur l'utilisation d'agents fluorescents, tels que la tétracycline, la calcine et le rouge Alizarine qui vont venir se fixer aux tissus minéralisés, et leur observation se fait au microscope à fluorescence. Il s'agit donc d'une étude locale de la minéralisation, ne donnant qu'un résultat qualitatif, et non appropriée pour l'observation de grandes zones. L'autre approche est une approche quantitative basée sur le marquage de la minéralisation via l'utilisation du rouge Alizarine. Via un dosage colorimétrique et une mesure de la fluorescence, la quantité de tissu minéralisé peut être déterminée. Nous nous concentrerons sur cette méthode au sein de notre étude.

3.2.4.2. Matériels et méthodes

La capacité de minéralisation des hBMSCs, cultivées en milieu de différenciation a été évaluée sur une surface plastique et sur les différents matériaux. Pour cela, les cellules ont été mises à proliférer sur les surfaces des différents groupes, plus sur une surface de contrôle plastique, en milieu de différenciation (STEMPRO Osteogenesis Differentiation Kit (Life Technology)). Un autre contrôle a été créé, composé de cellules cultivées en milieu de prolifération (alpha MEM GIBGO) avec 10% de sérum de veau fœtal). A J=21 jours les cellules sont rincées et fixées au PFA. Elles sont ensuite rincées et mises en contact 3 minutes avec une solution de rouge Alizarine à 2% avant d'être rincées au PBS. Les puits sont alors décantés et la lyse s'opère sous l'action de la solution de CPC (cetylpyrimidium chloride). Enfin, l'absorbance des lysats est mesurée à 550/630nm.

3.2.4.3. Résultats

Aucun des tests réalisés n'a abouti. Concernant la mesure de la minéralisation via l'utilisation du rouge Alizarine, des problèmes ont été rencontrés durant les essais. Le premier problème observé lors de l'exploitation des résultats fût le bruit de fond observé via le test de matériaux nus (non cellularisés). Sur les surfaces les plus rugueuses (C0 et C3), une forte coloration est observée, du même ordre de grandeur que la coloration obtenue sur les matériaux cellularisées (figure 3.16). De plus, un décollement de la couche de coloration a aussi été observé sur les matériaux les plus lisses, pouvant devenir un problème lors de la phase de rinçage.

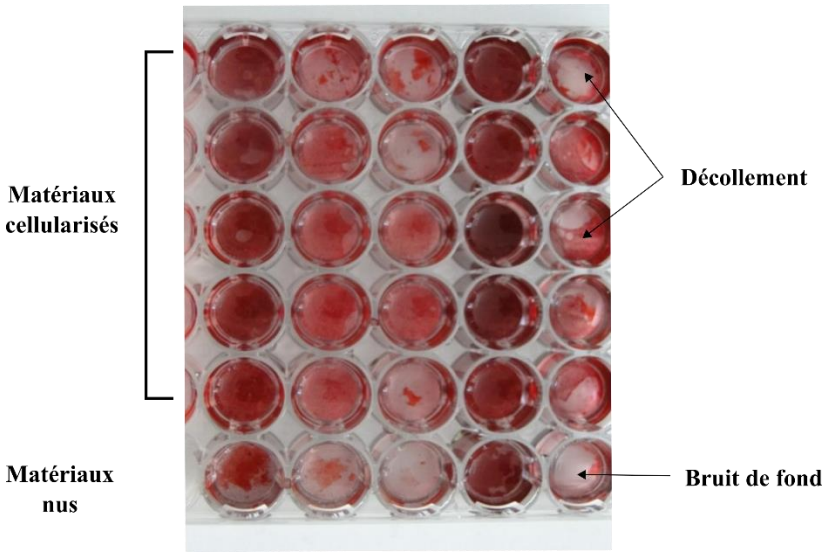


Figure 3.16 : Problèmes liés à la mesure de la minéralisation via le rouge Alizarine

Cette étude est toujours en cours et des résultats sont espérés d'ici la soutenance.

3.2.5. Discussion quant à l'étude de biocompatibilité

Le succès d'un implant orthopédique dépend de la capacité de la surface à stimuler une rapide adhésion, migration, prolifération et différentiation afin de réparer rapidement le tissu osseux. Ce premier point en particulier passant par l'adhésion va être essentiel à la suite de l'ostéointégration, l'ensemble du processus découlant d'une cascade de signaux initiée par l'adhésion cellulaire.

Au sein de notre étude, l'adhésion initiale est mesurée par l'adhésion observée à 1 heure. Bien que non validées statistiquement, les surfaces les plus rugueuses semblent afficher les adhésions initiales les plus importantes, avec les adhésions les plus fortes observées pour C0 et C3, et celles les plus faibles observées sur C2 et C4. Cela semble confirmer que les hMSCs adhèrent mieux sur les surfaces rugueuses que sur les surfaces lisses. Il faut se rappeler que l'adhésion cellulaire dépend de l'absorption de protéines d'adhésion de la MEC au substrat, suivi par la mise en place de liaisons formées par des intégrines et la formation de sites d'adhésions focales. Cette observation peut venir contredire certains résultats de la littérature [17], surtout au niveau des surfaces sablées. Cette forte adhésion initiale sur les surfaces sablées [18], [19] peut être expliquée par une modification de la composition chimique de la surface grâce aux particules de Al_2O_3 formant une couche d'oxyde. Cependant, une influence topographique est plus à prendre en compte, ayant été prouvé que l'adhésion des ostéoblastes est plus influencée par la rugosité que par des légers changements de compositions chimiques (électroérosion) [19]. Ceci est appuyé par la forte adhésion de la surface brute présentant aussi une forte rugosité et agissant comme un « piège à cellules ». Un autre paramètre jouant en faveur de la grande adhésion initiale sur les surfaces rugueuses prend la forme d'une plus grande surface disponible sur les surfaces rugueuses. Ceci est particulièrement vrai pour le cas de la surface C0 qui présente une surface d'adhésion beaucoup plus importante due à la présence des particules.

L'évolution de l'adhésion cellulaire a aussi été étudiée via la mesure de l'adhésion à 3 heures. Si on se réfère à d'autres études quantifiant l'adhésion cellulaire [20], on observe généralement une augmentation du nombre de cellules adhérant à la surface dans le temps. En prenant cette étude réalisée par Schlie et al [20], ceux-ci affirment que le temps d'adhésion (défini comme étant le temps nécessaire afin que la moitié des cellules présentes dans le milieu adhère à la surface) est essentiellement contrôlé par l'absorption des protéines d'adhésion. Malgré l'absence de validité statistique, on semble observer un changement de comportement en termes d'adhésion de 1 heure à 3 heures. On observe une

augmentation significative de cette adhésion au niveau des surfaces les plus lisses que sont C1, C2 et C4. Une augmentation légère non significative est observée pour C0 tandis que l'adhésion reste la même pour C3.

La seconde étape de l'ostéointégration, incluant la migration cellulaire ainsi que la division cellulaire étudiée ici par la prolifération cellulaire. La première chose à regarder est que des différences significatives ont été trouvées entre le pool 1 et le pool 2, ce dernier donnant généralement une prolifération plus faible. Ainsi, en l'absence de validité statistique, la discussion autour des résultats de prolifération ne donne que des suppositions. Le matériau polie C4 nous sert de de matériau témoin afin d'avoir une référence de prolifération sur le matériau TA6V sans rugosité. Les résultats obtenus montrent une prolifération proche du contrôle plastique en milieu de prolifération ainsi qu'en milieu de différenciation pour le pool 1. Cependant, une chute de la prolifération par rapport au contrôle plastique est observée pour le pool 2, sans pouvoir expliquer la raison. En excluant cette dernière valeur de prolifération, on peut donc supposer que C4 présente effectivement de bonnes propriétés de biocompatibilité en termes de prolifération comme on pouvait s'y attendre. L'une de nos hypothèses était que l'état de surface du matériau C0 pouvait avoir pour effet d'inhiber la prolifération cellulaire. En milieu de de prolifération, C0 montre effectivement une plus faible prolifération comparée à C4 ; cependant, le pool 2 vient invalider ces résultats. De même, en milieu de différenciation, seule le pool 1 montre une plus faible prolifération pour C1. Ainsi, les résultats ne permettent ni d'infirmer, ni de confirmer cette hypothèse et des résultats supplémentaires sont nécessaires afin de pouvoir déterminer l'effet réel du matériau C0. Les traitements de surface par attaque chimique subis sur C1 et C2 ont pour but d'améliorer la biocompatibilité, donc la prolifération cellulaire. Pour le matériau C1, seul le pool 1 en milieu de prolifération montre une augmentation significative de la prolifération par rapport à C0. On ne peut donc pas conclure sur l'efficacité du matériau C1. Cependant, le matériau C2 montre une augmentation significative en milieu de prolifération et en milieu de différentiation pour le pool 1. Par ailleurs, la prolifération observée est similaire à celle sur C4. Concernant le pool 2, bien que cela ne soit pas validé statistiquement, de plus grandes proliférations sont observées sur C2. On peut donc supposer que le matériau C2 permet une amélioration de la prolifération cellulaire par rapport à C0. Néanmoins, cela ne peut pas être validé avec les données actuelles. Enfin, le traitement par sablage subi sur le matériau C3 ne respectait pas nos hypothèses de biocompatibilité que l'on s'était fixées. Les résultats de prolifération semblent aller dans ce sens avec une plus faible prolifération comparé à C4 pour l'ensemble des pools et des milieux. Par rapport à C0, les résultats sont soit identiques (pool 1), soit inférieurs (pool 2). On peut donc supposer une mauvaise compatibilité entre le matériau C3 et les hMSCs.

3.3. Evaluation de l'influence de la topographie sur la morphologie cellulaire

3.3.1. Matériels et méthodes

Afin d'étudier la morphologie des hMSCs sur les différents matériaux ainsi que d'analyser leur cinétique de prolifération, un suivi de l'évolution d'une population de cellules via un système de timelapse a été envisagée. Cependant, l'opacité des matériaux de TA6V ainsi que les limites des équipements disponibles n'ont pas permis de mener à bien cette étude. A la place, une analyse de croissance cellulaire pour deux temps différents a été réalisée. Après un ensemencement d'une population de hMSCs en gouttes sur chacun des matériaux (voir figure 3.17), des mesures statiques de la population de cellules par microscopie à immunofluorescence sont réalisées à 0 jours et 4 jours. Pour que cela fonctionne, on suppose que toutes les surfaces d'un matériau donné sont suffisamment

homogènes afin de ne pas engendrer de fortes variabilités intra matériau. On suppose aussi que les cellules se comportent de la même manière pour une surface donnée.

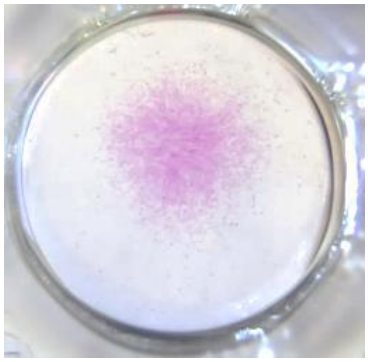


Figure 3.17 : Cliché d'un ensemencement en goutte au fond d'un puit de culture à J4

Afin d'évaluer la morphologie des hMSCs, des analyses au microscope confocal ont été réalisées. 2µl de suspension à 1 500 000 hMSCs/ml ont été déposés au centre de chaque matériau pour chaque groupe. Du milieu de culture est alors ajouté pour un temps de 4 jours (J4) pour un premier groupe tandis que le deuxième groupe de cellules à 0 jours (J0) sont fixées avec du PFA. Après 4 jours, on fixe les cellules du premier groupe avec du PFA, puis on rince l'ensemble avec du PBS. Après une immersion de 5 minutes dans une solution de triton (1%) + BSA afin de perméabiliser les cellules, celles-ci sont alors marquées avec de la Phalloidin-IFluor 488 (marqueur de filaments d'actine, cytosquelette) et du DAPI (marqueur du noyau) afin de caractériser par fluorescence les filaments d'actine et le noyau. Deux milieux ont été étudiés pour cette étude : (i) Le milieu de prolifération. Pour cela, les cellules ont été cultivées en milieu de prolifération ; (ii) Le milieu ostéoinducteur. Les hMSCs ont été cultivées en milieu ostéoinducteur afin de provoquer leur différenciation en ostéoblastes. Ce test est réalisé sur 2 pools de cellules immatures cultivées avec les 2 milieux en parallèle (prolifération et différenciation) à 4 jours avec contrôle à J0, sur tous les matériaux.

La morphologie des cellules a été observée pour chaque surface et pour chaque milieu à J0 et à J4. Les cellules observées ont été approximées par des ellipses, définie par un petit axe l_c, un grand axe L_c, un périmètre p_c et une aire A_c. L'élongation et la circularité de chaque cellule ont été calculées selon les équations suivantes [21]:

- Elongation E_c, définit tel que :

$$E_C = \frac{L}{l} \tag{3.1}$$

- Circularité C_c, définit tel que :

$$C_C = \frac{4\pi A}{p^2} \tag{3.2}$$

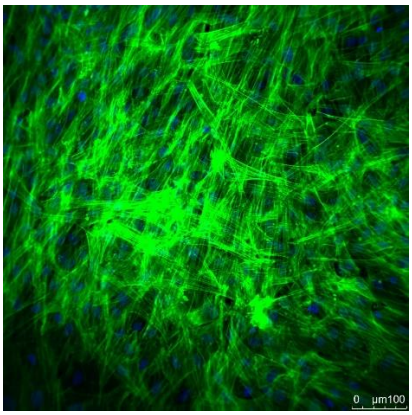
La même approche a été prise afin de caractériser la forme de la population de cellule, avec le calcul des paramètres l_p, L_p, p_p, A_p, E_p et C_p. Les images obtenues au microscope confocal ont été traitées via le logiciel ImageJ. Pour ce qui est des cellules, la morphologie a été mesurée pour 10 cellules par éprouvette pour chaque temps, avec un n=3 nombres de régions aléatoires sur la surface. Chaque temps a été répété 3 fois. Pour ce qui est de la morphologie de la population de cellules, celle-ci est mesurée avec une répétabilité de 3 par surface.

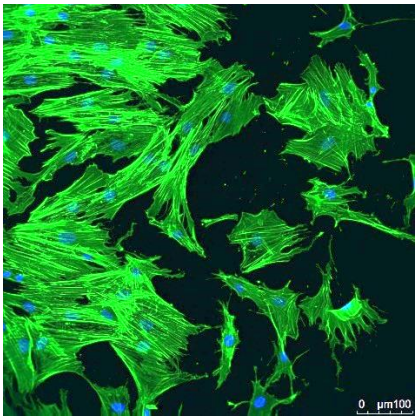
Les cellules utilisées pour ce test sont tirées des deux pools de cellules utilisées pour les tests d'adhésion et de prolifération. Cependant, par manque de temps, aucune analyse comparative n'a été réalisée.

3.3.2. Interface cellule/ substrat

3.3.2.1. Morphologie cellulaire sur le contrôle plastique

Afin de caractériser les hMSCs sans l'influence des matériaux en milieu de prolifération, une analyse de la morphologie des hMSCs sur plastique est réalisée. La figure 3.18 montre la morphologie cellulaire à 4 jours au centre de la goutte (figure 3.18a) et au bord de la goutte (figure 3.18b). La figure 3.18a montre que la population de cellules forme plusieurs couches de cellules, sans aucune orientation spécifique. La figure 3.18b, décrivant les cellules en bord de population, montre les hMSCs s'étalant sur la surface avec de fortes quantités de filaments d'actine, accompagnées d'extensions cytoplasmiques.



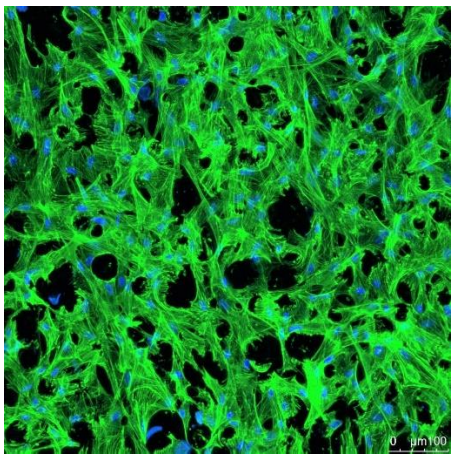


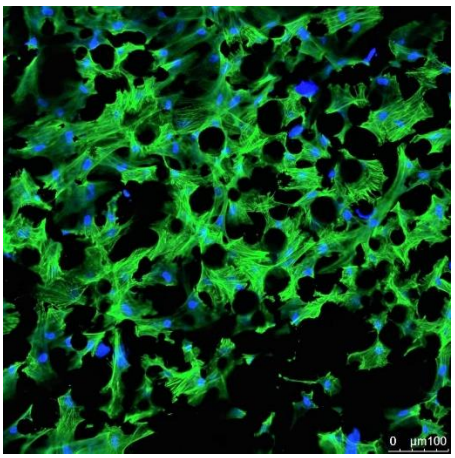
(a) *(b)*

Figure 3.18 : Description de la population de cellules sur la surface plastique en milieu de prolifération. (a) centre de la goutte. (b) périphérie de la goutte.

3.3.2.2. Morphologie cellulaire sur la surface C0

L'observation des cellules sur le matériau C0 sur la figure 3.19 montre un tapis cellulaire clairsemé avec des zones circulaires qui ne sont pas recouvertes, indépendamment de la densité cellulaire (centre ou périphérie).

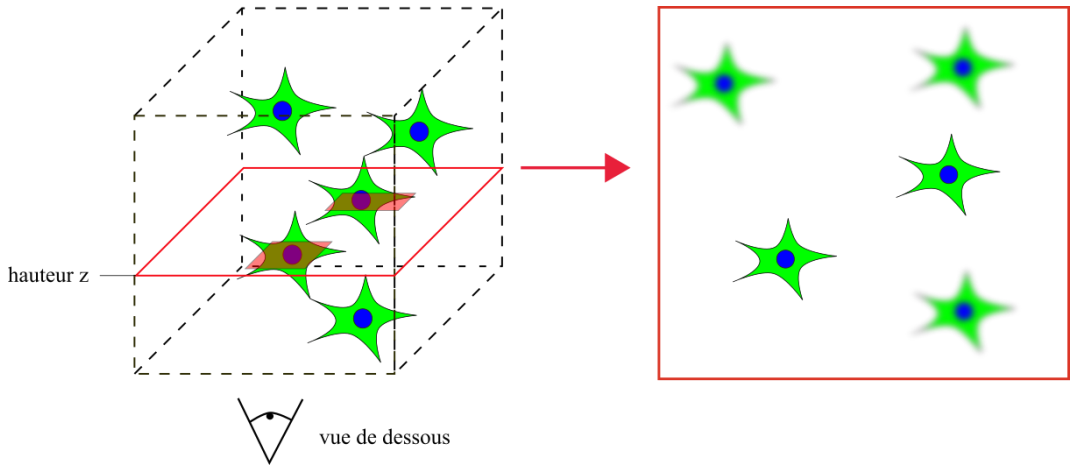




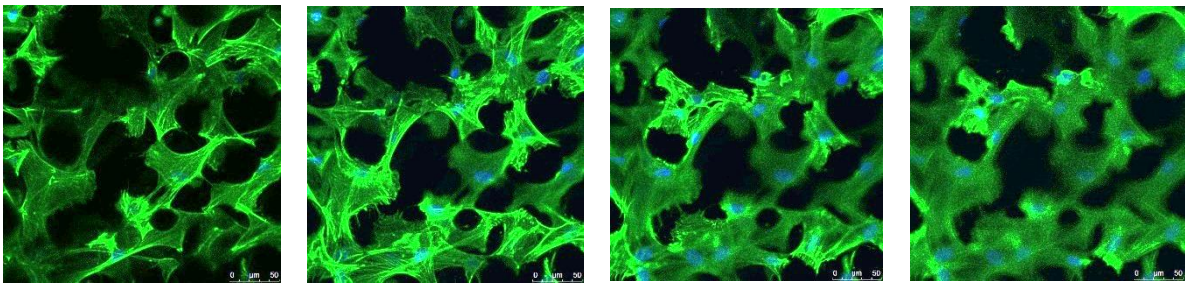
(a) *(b)*

Figure 3.19 : Description de la population de cellules sur la surface témoin. (a) centre de la goutte. (b) périphérie de la goutte.

Contrairement à ce qu'on pourrait observer sur une surface sans rugosité, on observe sur C0 une croissance selon l'axe Z (axe correspondant à la normale à la surface de l'éprouvette). En effet, en observant les clichés de l'axe Z selon différentes altitudes (figure 3.20), on observe des empilements successifs de cellules selon Z autour de zones sombres circulaires. Ces zones représentent les particules présentes à la surface de C0.



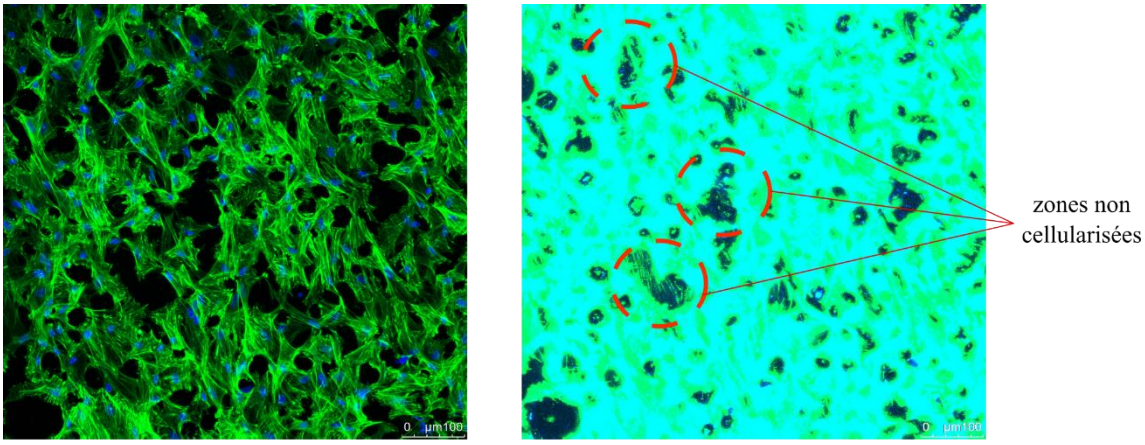
(a) Scan de la population de cellules sur la hauteur z



(a) z=0 µm *(b) z=8 µm* *(c) z=16 µm* *(d) z=24 µm*

Figure 3.20 : Distribution des hMSCs sur C0 pour une épaisseur de 24 µm.

De plus, on observe aussi des zones d'adhérences cellulaires au niveau des particules. En analysant les figures 3.20c et 3.20d, on remarque la présence de points d'adhésion au niveau des particules. Par ailleurs, l'observation des cellules à z=0 µm (figure 3.20a) montre peu de cellules présentes sur la surface elle-même. On observe plutôt une adhésion des cellules autour des zones sombres représentant les particules. On peut donc supposer une adhésion préférentielle des cellules au voisinage de ces particules.



Cellules sur C0 Mise en évidence de C0

Figure 3.21 : Mise en évidence des zones non cellularisées

Enfin, on observe des zones non cellularisées à la surface. En effet, la figure 3.21 montre des zones vides sans particules où les cellules ne semblent pas adhérer. Cette observation appuie l'hypothèse que les cellules n'adhèrent pas sur l'ensemble de la surface.

3.3.2.3. Evolution de la morphologie en milieu de prolifération

Une comparaison de la morphologie des hMSCs sur les différents matériaux est réalisée à J0 et J4. La figure 3.22 montre la morphologie des hMSCs selon le temps d'incubation.

A J0, on note que les cellules prennent une forme sphérique et adhèrent selon cette forme sur toutes les surfaces. Cette adhésion semble être plus rapide sur C3 où elles présentent un début d'étalement.

A J4, on observe un étalement des cellules sur l'ensemble des surfaces comparées à J0, montrant que les cellules réagissent à la surface. D'un point de vue quantitatif, l'étalement cellulaire est plus important sur C1, C2 et C4. L'étalement est significativement plus faible sur C3. Sur C0, les cellules s'étalent en trois dimensions, complexifiant l'analyse de l'étalement. Cependant, les observations semblent montrer une élongation moins importante.

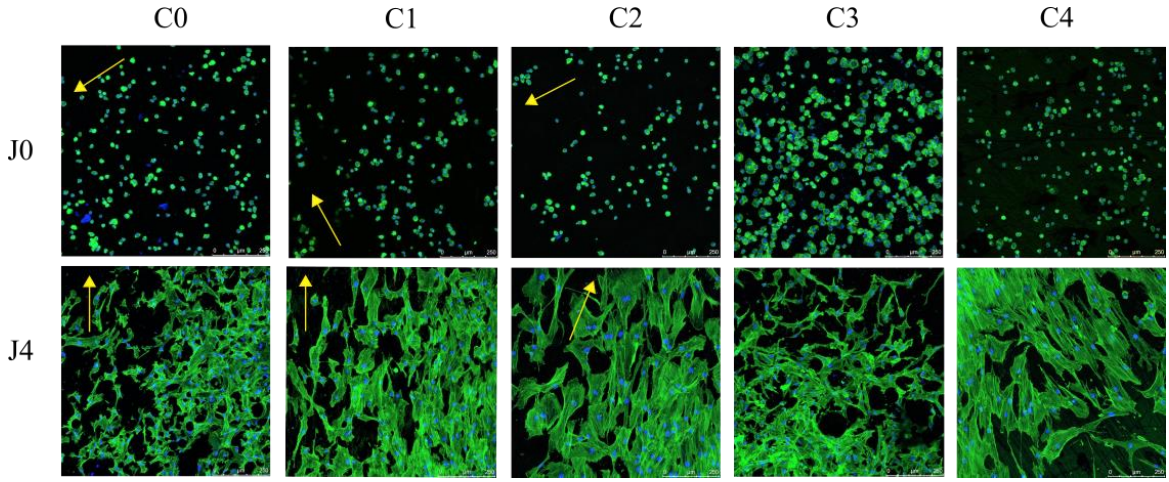


Figure 3.22 : hMSCs observées à J0 et J4 pour les 5 surfaces en milieu de prolifération classique. La flèche jaune représente l'orientation topographique de la surface. Les clichés à J4 ont été pris en périphérie de la population.

De plus, l'orientation de la surface montre une influence sur l'orientation des hMSCs. Les résultats de la figure 3.22 montrent la présence d'une orientation particulière de la population de cellules pour certaines surfaces. En effet, les cellules présentent une orientation uniforme sur les surfaces C1, C2 et C4. Cette polarisation cellulaire vient de la topographie de surface créée par le traitement de surface dans le cas de C1, C2 et C4.

Afin de valider nos interprétations, une analyse semi-quantitative a été réalisée afin de tenter de quantifier la morphologie des cellules selon les différentes surfaces. Pour cela, une comparaison de la morphologie des cellules entre J0 et J4 a été réalisée, en se focalisant sur l'aire de la cellule A_c, son périmètre p_c, sa circularité C_c et son élongation E_c, avec les résultats présentés au sein de la figure 3.23.

A J0, aucune différence significative n'est observée entre les différentes surfaces pour les différents paramètres (p_c, A_c, E_c et C_c), ceux-ci prenant les valeurs moyennes respectives de 73.9 µm, 396 µm², 1.3 et 0.86. Les valeurs d'élongation et de circularité confirment l'aspect sphérique des cellules observées au sein de la figure 3.18. Bien que non prouvé significativement, l'étalement des hMSCs semble commencer plus tôt sur C3, avec un A_c moyen de 600 µm².

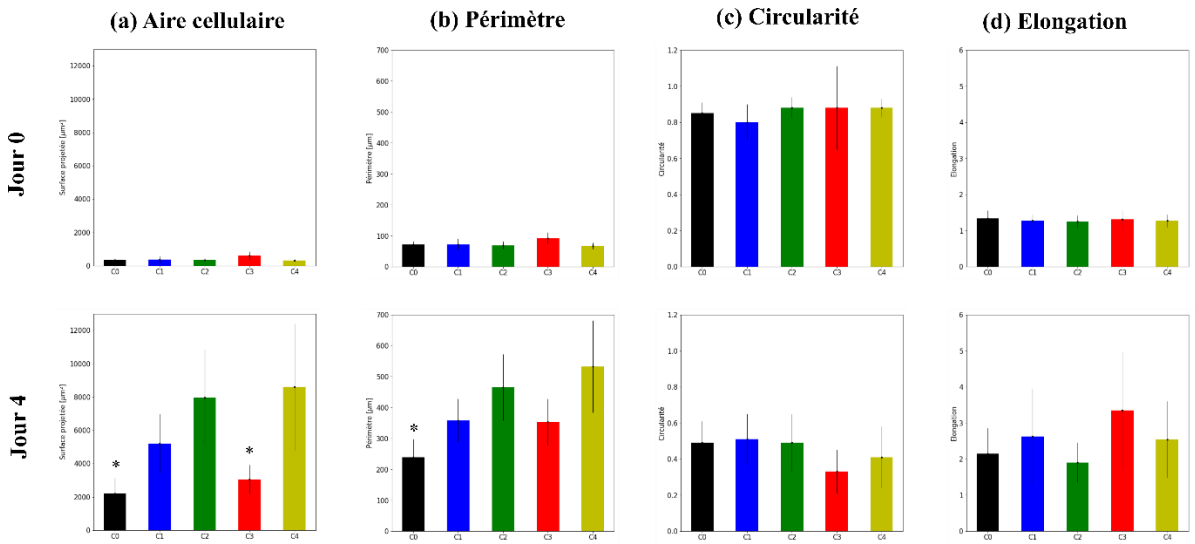


Figure 3.23 : Mesures quantitatives de la morphologie cellulaire des hMSCs sur les 5 surfaces en milieu de prolifération classique

A J4, des différences significatives sont visibles selon les différentes surfaces. En termes de A_c, on observe une augmentation significative de la surface projetée (A_c) pour l'ensemble des surfaces à J4. Les hMSCs présentent les plus grandes surfaces pour les surfaces C2 et C4, suivi par la surface C1 avec des valeurs respectives de 7978 µm² (± 2878), 8604 µm² (± 3810) et 5207 µm² (± 1768). C0 et C3 présentent les plus faibles surfaces projetées, prenant respectivement les valeurs de 2203 µm² (± 927) et 3060 µm² (± 861), et des différences significatives sont observées entre C0/C3 et C1/C2/C4 ($p<0.05$, Kruskall-Wallis). Le périmètre des hMSCs selon les différentes surfaces suit la même évolution que l'aire des hMSCs. Il faut remarquer que les valeurs mesurées sur C0 sont des mesures d'aires projetées dans le plan, donc non représentatives de l'aire réelle. De plus, des variabilités fortes sont observées sur la mesure d'aire des cellules, atteignant plus de 40% de la valeur moyenne. Ainsi, les résultats montrent que les différents matériaux ont une influence significative sur l'étalement cellulaire, mesuré par les paramètres A_c et p_c.

L'orientation de la surface influence la polarisation de la cellule, ce qui s'observe sur l'élongation cellulaire E_c ainsi que la circularité C_c. Le terme de circularité C_c ne présente aucune différence significative entre les différents matériaux à J4. Dans le cas de C3, on observe une valeur de

C_c plus faible, à 0.33 (± 0.12), bien que non différente significativement. Couplée à la forte valeur de E_c =3.4 (± 1.6), ces valeurs valident donc l'élongation significative de hMSCs sur C3. Cependant, aucune polarisation ne semble ressortir. Enfin, en termes d'élongation E_c, une augmentation significative est observée pour l'ensemble des matériaux de J0 à J4. Bien qu'aucune différence significative ne soit enregistrée entre les différents matériaux à J4 et à l'exception de C3, les plus grandes élongations sont observées pour C0, C1 et C4, avec des valeurs respectives de E_c de 2.1 (± 0.7), 2.6 (± 1.3) et 2.5 (± 1.1). La valeur de l'élongation E_c sur C0 peut être considérée comme incorrecte car il s'agit de l'élongation de la surface projetée, ne prenant pas en compte l'élongation selon Z. C2 présente une élongation plus faible (E_c =1.9 (± 0.6)), montrant ainsi une polarisation moins importante sur ce matériau.

La figure 3.24 présente la morphologie des cellules selon différentes topographies présentes sur les différents matériaux afin d'illustrer l'adaptation des hMSCs à la surface. L'analyse de C0 a déjà été faite précédemment. Cependant, la figure 3.24 appuie les précédentes observations avec la mise en évidence de points d'adhésions au niveau des particules enkystées dans la surface.

L'analyse de C1, C2 et C4 mettent en évidence l'influence de la topographie de la surface sur la polarisation des hMSCs, mais à différentes échelles. L'analyse du matériau C1 montre la polarisation des cellules selon une certaine direction, bien que cela n'ait pas pu être validé statistiquement. Cette direction suit celle de la texture de la surface, soulignant l'influence de la topographie sur l'orientation cellulaire. Cette orientation semble être corrélée à l'orientation des filaments d'actine présents au sein de la cellule. Sur le matériau C2, on observe aussi la répartition des filaments d'actine dans la direction de la surface, avec cependant une polarisation moins prononcée. On peut donc supposer le lien entre l'orientation de ces filaments d'actine et l'orientation de la cellule à l'échelle microscopique. Les cellules présentent aussi une polarisation sur le matériau C4, malgré l'absence de topographie. Les clichés mettent en évidence la présence de rainures à l'échelle submicroscopique, créée par le papier abrasif lors du polissage. La polarisation des cellules ainsi que l'alignement des filaments d'actine semblent être plus accentuées sur le matériau C4, malgré l'absence de polarisation spécifique dû à l'aspect désorganisé des cellules. Ces résultats viennent appuyer des observations de la littérature, montrant la forte influence de l'échelle nanoscopique sur la morphologie cellulaire.

Enfin, le matériau C3 présente une topographie très accidentée, sans aucune présence d'orientation spécifique. Sur cette surface, les cellules présentent des formes atypiques, via une élongation significative des hMSCs couplée à une faible aire projetée. Les cellules montrent une forte densité de filaments d'actine, sans montrer d'alignement de ceux-ci. Cette différence de morphologie par rapport aux autres matériaux semble traduire une mauvaise compatibilité des cellules avec la surface. La raison derrière ce phénomène n'est cependant pas connue.

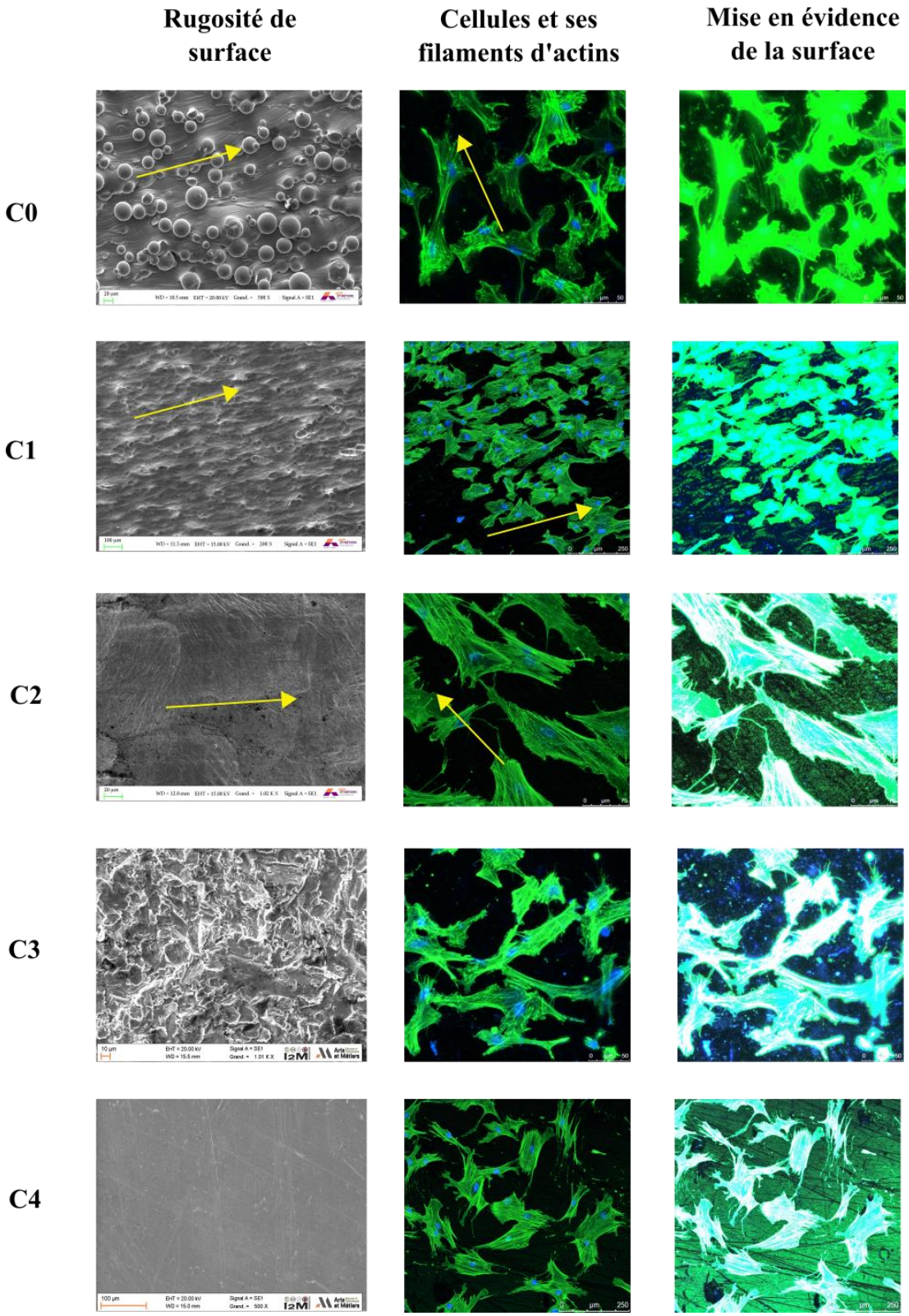


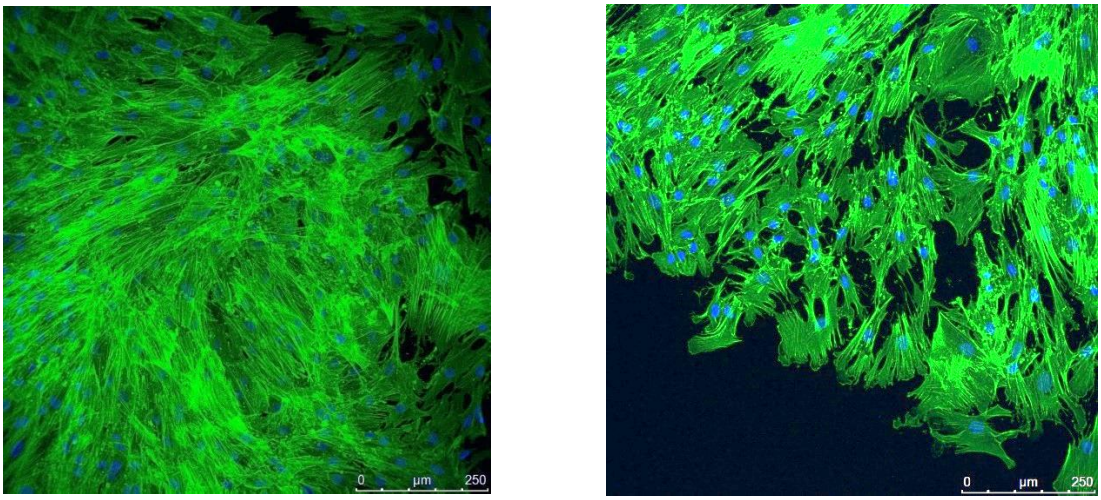
Figure 3.24 : Comparaison de la morphologie cellulaires des hMSCs à J4 par rapport à la topographie de la surface pour les 5 matériaux en milieu de prolifération

3.3.2.4. Evolution de la morphologie en milieu de différenciation

Une analyse qualitative de la morphologie cellulaire en milieu de différenciation a aussi été réalisée. Cependant, des problèmes lors de manipulation n'ont pas permis d'obtenir assez de données

pour permettre d'effectuer une étude quantitative validable statistiquement. Les résultats présentés ici sont donc purement qualitatifs.

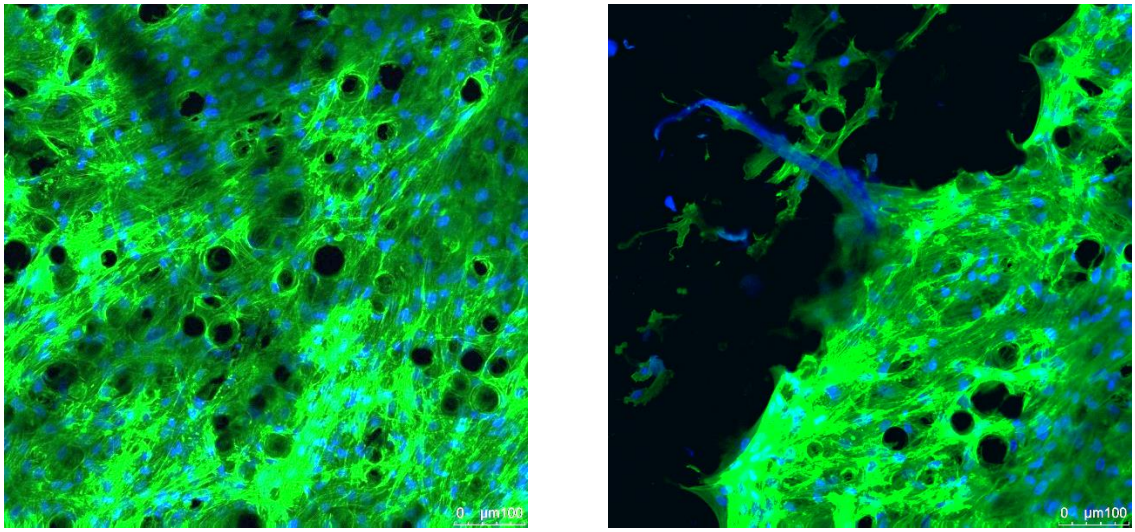
Afin de caractériser les hMSCs sans l'influence des matériaux en milieu de différenciation, une analyse de la morphologie des hMSCs sur plastique est réalisée. L'analyse qualitative des hMSCs ne met pas en évidence de différences significatives de morphologie cellulaire comparée avec le milieu de prolifération (figure 3.25). Cependant, on semble observer une densité de cellules plus importante par rapport au milieu de prolifération.



(a) *(b)*

Figure 3.25 : Description de la population de cellules sur la surface plastique en milieu de différenciation. (a) centre de la goutte. (b) périphérie de la goutte.

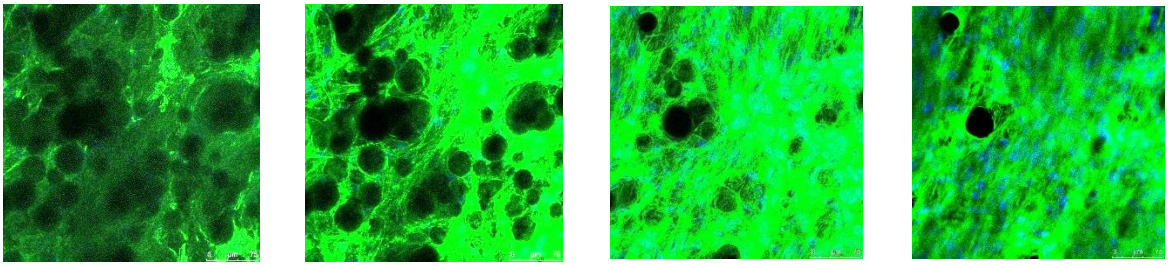
La figure 3.26 montre la morphologie prise par les hMSCs au centre et au bord de la goutte à J4 en milieu de différenciation. Les clichés montrent une couche dense de cellules, sans aucune zone vides. Les zones sombres circulaires que l'on discerne dans la couche correspondent aux particules enkystées dans la surface, comme ce qui était observé en milieu de prolifération classique.



(a) *(b)*

Figure 3.26 : Description de la population de cellules sur C0 en milieu de différenciation. (a) centre de la goutte. (b) périphérie de la goutte

Tout comme le milieu de prolifération, les hMSCs en milieu de différentiation prolifèrent dans les trois dimensions, avec l'empilement de plusieurs couches de cellules. Cet empilement, présenté en figure 3.27, montre peu de cellules au niveau de la base des particules et la formation d'une couche homogène en z=18 µm. De plus, les particules enkystées dans la surface sont visibles pour chaque altitude. On peut donc supposer que l'adhésion cellulaire sur C0 en milieu de différenciation se fait aussi préférentiellement sur les particules.



(a) z=0 µm *(b) z=6 µm* *(c) z=12 µm* *(d) z=18 µm*

Figure 3.27 : Distribution des hMSCs sur la hauteur de C0

Une comparaison qualitative de la morphologie des hMSCs sur les différents matériaux en milieu de différenciation est réalisée à J0 et J4. La figure 3.28 montre la morphologie des hMSCs sur les différents matériaux pour différents temps de cultures.

A J0, la morphologie des cellules est similaire à ce qui est observée sur la figure 3.22, avec une forme sphérique pour l'ensemble des cellules. Seul le matériau C0 semble être différent avec la formation de clusters de cellules à la surface.

A J4, on observe un étalement des cellules sur l'ensemble des matériaux comparées à J0, avec des différences significatives observées par rapport au milieu de prolifération. Globalement, les populations de cellules observées en milieu de différenciation sont plus denses et plus compactes, s'expliquant par une prolifération plus faible en milieu de différenciation. C0 et C1 présentent une population de cellules compactes avec les cellules empilées les unes sur les autres. Au contraire, C2 et C4 ont une population de cellules moins dense avec les cellules qui s'étalent sur la surface. Cela laisse supposer que les cellules s'étalent plus facilement sur ces dernières surfaces. Les cellules sur C3 présentent une morphologie similaire à celle observée en milieu de prolifération, bien que celles-ci semblent présenter une surface plus grande. En termes d'orientation, les hMScs présentent une polarisation prononcée sur C1 et C4, tandis que la polarisation semble moins importante sur C2. Les hMSCs ne semblent pas présenter de polarisation spécifique sur les matériaux C0 et C3. Une analyse quantitative n'a pas pu être réalisée, due aux faibles nombres de clichés exploitables ainsi qu'à la forte densité de la population de cellules, ne permettant pas d'extraire suffisamment de cellules isolées pour l'ensemble des matériaux.

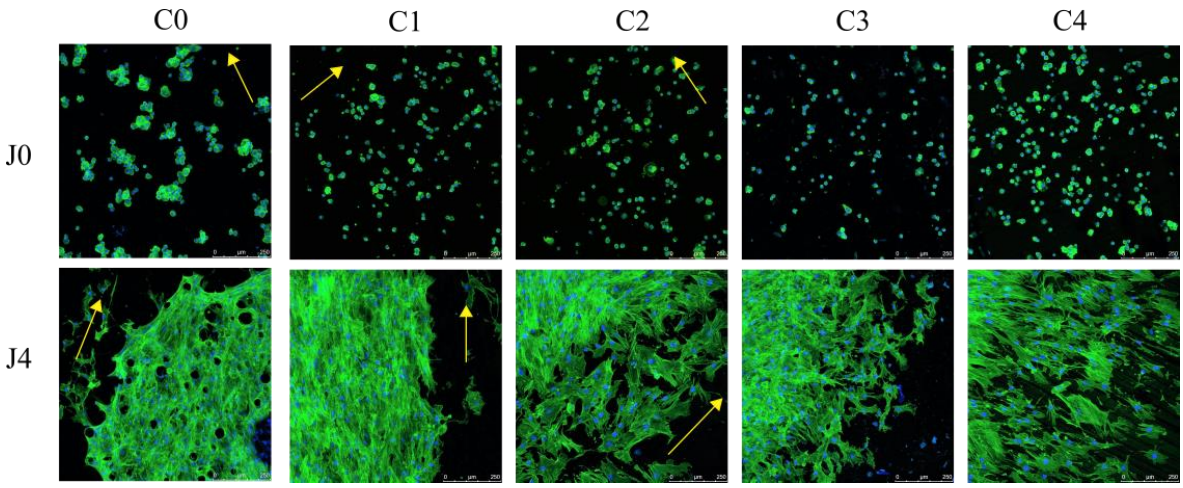


Figure 3.28 : hMSCs observées à J0 et J4 pour les 5 surfaces en milieu ostéoinducteur. La flèche jaune représente l'orientation topographique de la surface. Les clichés à J4 ont été pris en périphérie de la population.

La figure 3.29 présente la morphologie des cellules en milieu de différenciation selon différentes topographies présentes sur les différents matériaux. Les clichés ont été pris en périphérie de la population. L'analyse du matériau C0 en milieu de différenciation rejoint celle effectuée précédemment. Les résultats confirment la présence d'une couche dense de cellules se formant autour des particules présentes sur la surface. Les hMSCs forment une couche dense sur le matériau C1, donc seules quelques cellules ont pu être observées en périphérie de la population. Celles-ci montrent un étalement cellulaire à la surface sans présenter une polarisation prononcée dans la direction de l'orientation de surface. De la même manière, les hMSCs sur C2 et C4 présentent un étalement significatif à la surface, sans exhiber de polarisation spécifique. Enfin, les hMSCs sur C3 présentent des formes atypiques avec un étalement cellulaire moins important. On observe cependant une forme plus étalée comparé au milieu de prolifération.

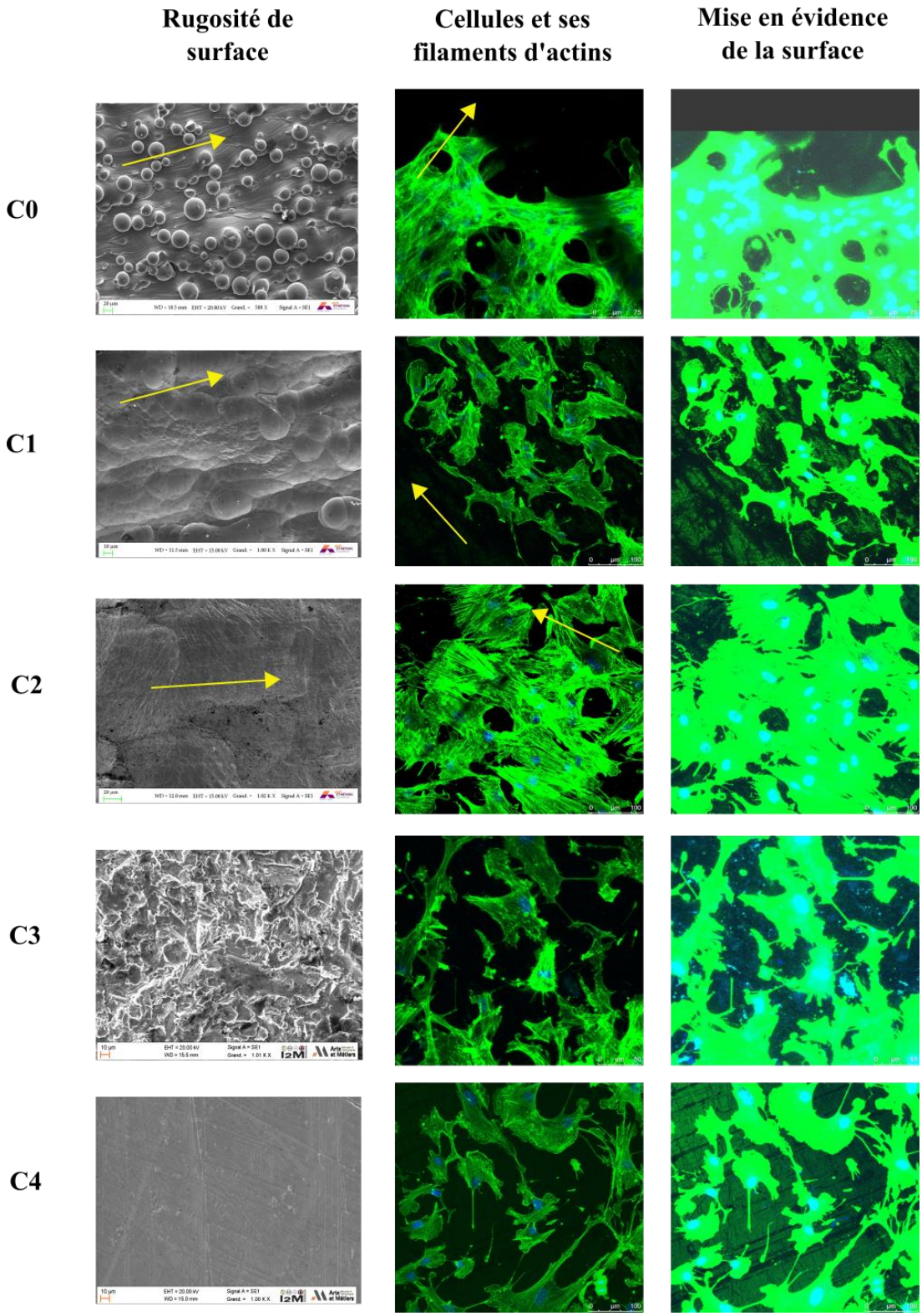


Figure 3.29 : Comparaison de la morphologie cellulaires des hMSCs à J4 par rapport à la topographie de la surface pour les 5 matériaux en milieu de différenciation

3.3.3. Du substrat à la population de cellules

Au sein de cette partie, l'objet d'étude est la population de cellules dans son ensemble et sa morphologie afin de déterminer l'influence des surfaces d'études sur la population.

3.3.3.1. Evolution de la morphologie en milieu de prolifération

La figure 3.30 présente la forme de la population cellulaire à J0 sur les différents matériaux en milieu de prolifération. La goutte prend un aspect circulaire pour l'ensemble des matériaux, excepté C2 où les cellules vont avoir tendance à s'étaler sur la surface. Les différences d'aires observées sur les différents matériaux (voir figure 3.32) peuvent être dues à des différences d'ensemencement. Cependant, les plus grandes aires mesurées sont sur les matériaux les plus rugueux avec un début d'étalement observé sur C3. Ceci rejoint ainsi les résultats d'adhésions pour le pool 1 (voir figure 3.7). Cependant, cette hypothèse n'est pas vérifiable. On remarque que sur les surfaces C0 et C1, une certaine orientation semble se distinguer, bien que cela ne soit pas distinctif.

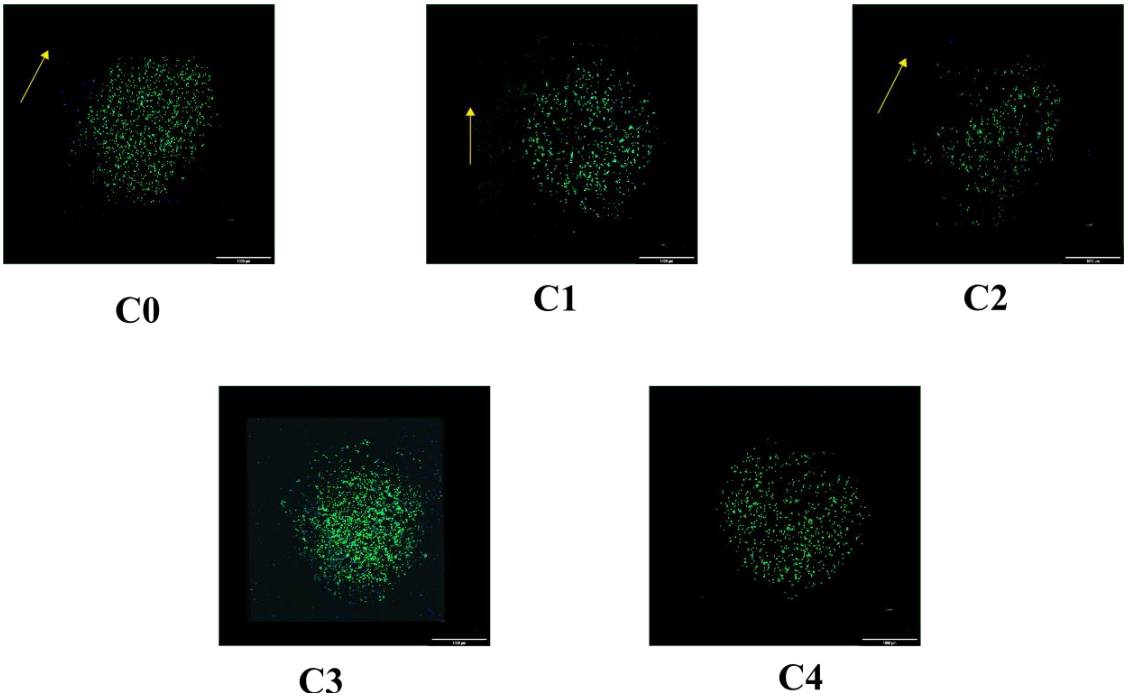


Figure 3.30 : Résultats de l'ensemencement en gouttes sur les 5 surfaces à J0 pour les hMSCs en milieu de prolifération La flèche jaune représente l'orientation de la surface dans le cas où celle-ci existe.

Des clichés des mêmes ensemencements en goutte à J4 ont été pris afin d'évaluer la morphologie prise par les cellules sur les différents matériaux (figure 3.31). L'étude n'étant pas un suivi cinétique, la comparaison entre les différents matériaux peut être faite en gardant à l'esprit les variabilités existantes au niveau de l'ensemencement et de la topographie des surfaces.

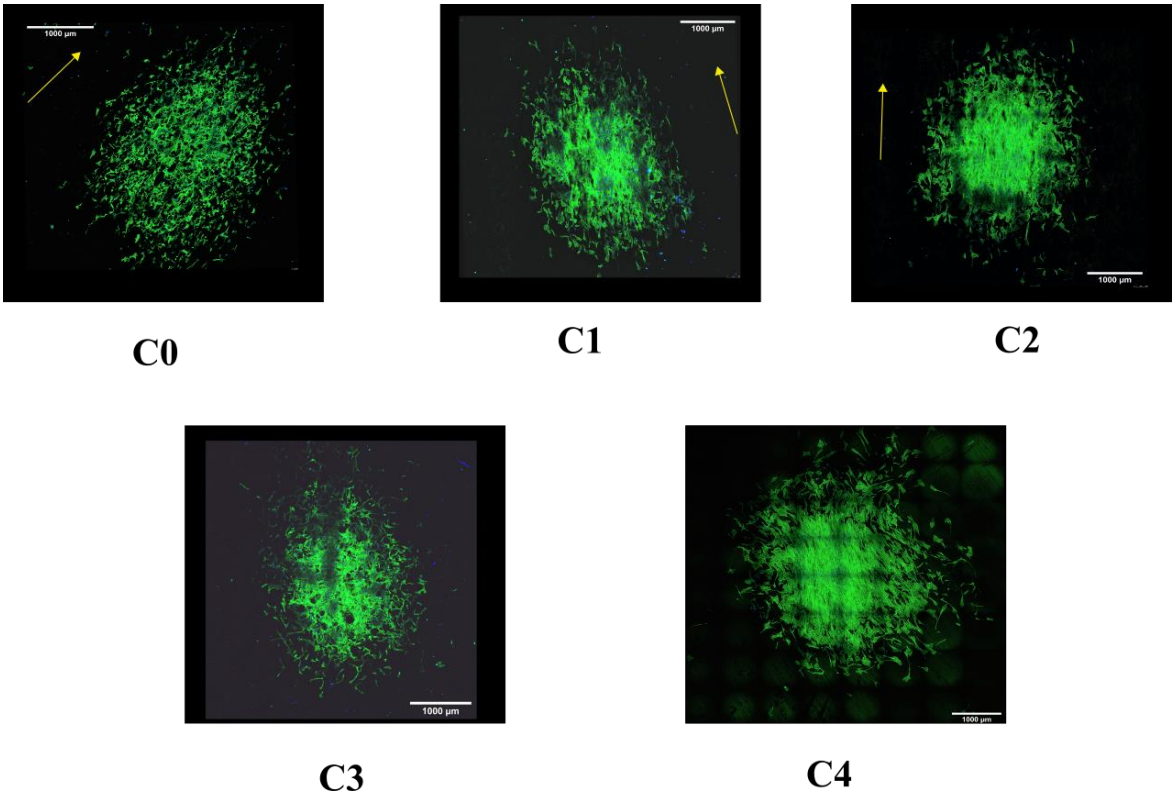


Figure 3.31 : Résultats de l'ensemencement en gouttes sur les 5 surfaces à J4 pour les hMSCs en milieu de prolifération classique. La flèche jaune représente l'orientation de la surface dans le cas où celle-ci existe.

Sur l'ensemble des surfaces, les hMSCs semblent croître autour du point d'ensemencement. D'un point de vue qualitatif, la population sur le matériau C0 présente de la croissance cellulaire par rapport à J0, passant d'une aire moyenne de 4.51 mm² (± 0.62) pour J0 à 6.36 mm² (± 1.92) pour J4 (figure 3.32). A l'échelle de la population, un alignement est observé avec la surface, bien que l'élongation de la population ne soit pas significative. Cependant, aucune cohésion ne semble apparaître au sein de la population, l'adhésion entre les hMSCs n'étant pas fortement présente. Cette orientation de la population de cellules semble être le résultat d'une prolifération orientée afin de passer les obstacles créés par la surface. Cela laisse à supposer que le mécanisme d'élongation de la population ne peut pas être simplement attribué à la polarisation des cellules individuelles. Une hypothèse avancée par G. Abagnale et al [22] est que la polarité de la population de cellule vient de la polarité de la mitose.

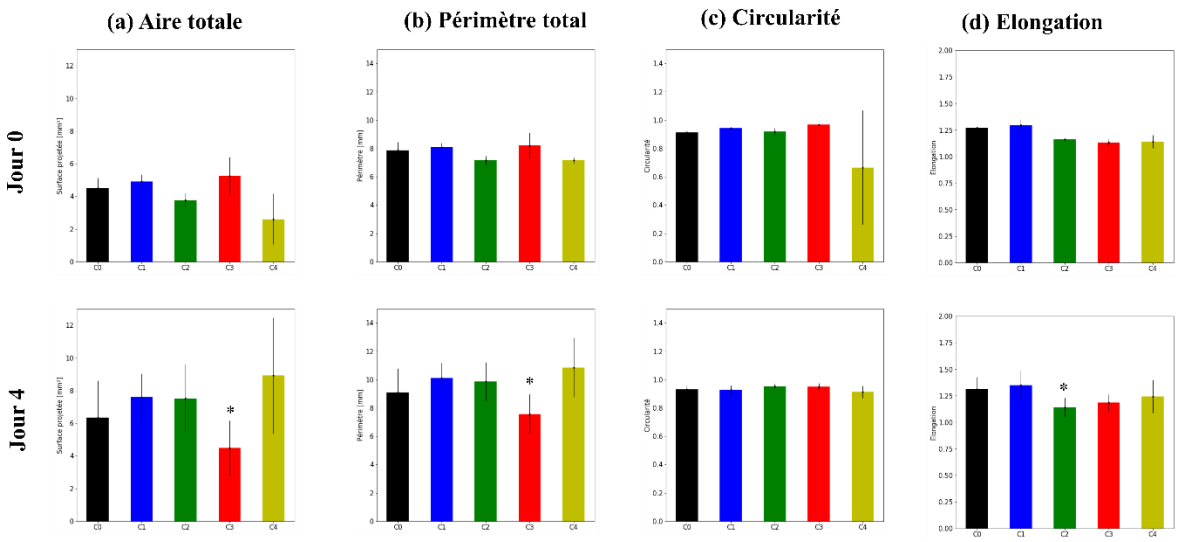


Figure 3.32 : Mesures quantitatives de la morphologie de la population de hMSCs sur les 5 surfaces en milieu de prolifération

Le matériau C4 est défini comme le matériau de référence, définie théoriquement comme surface plane. Une croissance significative de la population de cellules est observée, passant d'une aire moyenne de 2.61 mm² (± 1.55) pour J0 à 8.91 mm² (± 3.54) pour J4 (figure 3.32). Cette augmentation significative semble être le résultat d'un bon étalement cellulaire ainsi qu'une grande prolifération (voir figure 3.13). Du point de vue de l'orientation de la population, on observe la conservation d'une forme circulaire, avec une circularité proche de 1 ainsi qu'une très faible élongation. Cependant, différentes orientations sont visibles au sein de la population. En effet, son polissage par papier abrasif crée aléatoirement des rainures submicroscopiques. La conséquence de ces rainures est un alignement des hMSCs avec celles-ci, qui se traduit par un alignement de la population. Les résultats de la figure 3.31 pour C4 montrent donc différents alignements cellulaires au sein de la population avec ces rainures. Ces alignements sont autant visibles en périphérie de la population qu'au centre, où des empilements de cellules existent. Cela montre donc que l'influence de la topographie est visible sur l'ensemble de la population, même pour les cellules n'étant pas en contact avec cette même surface.

De même que sur les autres matériaux, la croissance cellulaire est aussi observée sur le matériau C1, passant d'une aire moyenne de 4.92 mm² (± 0.41) pour J0 à 7.59 mm² (± 1.42) pour J4 (figure 3.32). De plus, C1 est le matériau sur lequel la polarisation de la population est la plus prononcée, avec une élongation de 1.35 (± 0.13). Contrairement à C0, une cohésion cellulaire semble apparaitre au sein de la population comparée à C0, bien que celle-ci soit moins visible que celle sur C4.

La population sur le matériau C2 suit la même évolution que C1, avec une croissance de l'aire de 3.77 mm² (± 0.43) pour J0 à 7.52 mm² (± 2.08) pour J4 (figure 3.32). Cependant, la polarisation de la population n'est pas significative, celle-ci conservant une forme circulaire (C_p =0.95 (± 0.02) et E_p=1.14 (± 0.09)). Bien que non démontrée quantitativement, l'alignement observé au centre de la population montre la présence d'une cohésion cellulaire au sein de la population.

Enfin, contrairement aux autres matériaux, C3 ne présente pas de croissance cellulaire significative de J0 à J4, avec des valeurs d'aire passant de 5.24 mm² (± 1.14) pour J0 à 4.49 mm² (± 1.68) pour J4 (figure 3.32). La même absence de différence significative de J0 à J4 est aussi observée pour les paramètres p_p, E_p et C_p, malgré le changement de morphologie des hMSCs. La population sur C3 ne présente ni de polarisation à l'échelle de la cellule, ni de polarisation à l'échelle de la population, malgré une élongation de la cellule. De plus, l'observation de cellules au centre de la population ne montre aucune cohésion intercellulaire (figure 3.33). Cette morphologie observée valide donc une mauvaise compatibilité de la cellule au matériau C3.

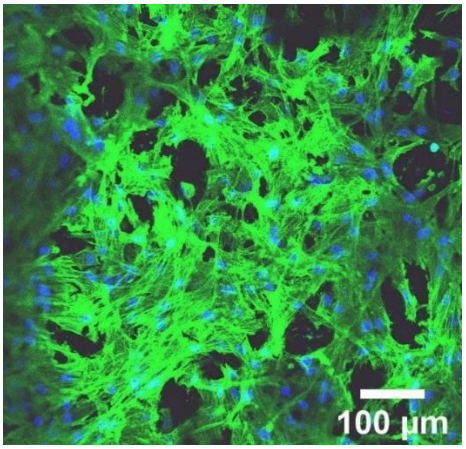


Figure 3.33 : Cliché de la disposition des hMSCs du centre de la population dur C3

3.3.3.2. Evolution de la morphologie en milieu de différenciation

Des imprévus lors des manipulations expérimentales n'ont pas permis d'obtenir assez de clichés exploitables à J0 et à J4 afin de réaliser une analyse statistique, permettant donc d'appuyer nos observations. Ainsi, l'étude réalisée dans la suite n'est qu'une étude qualitative.

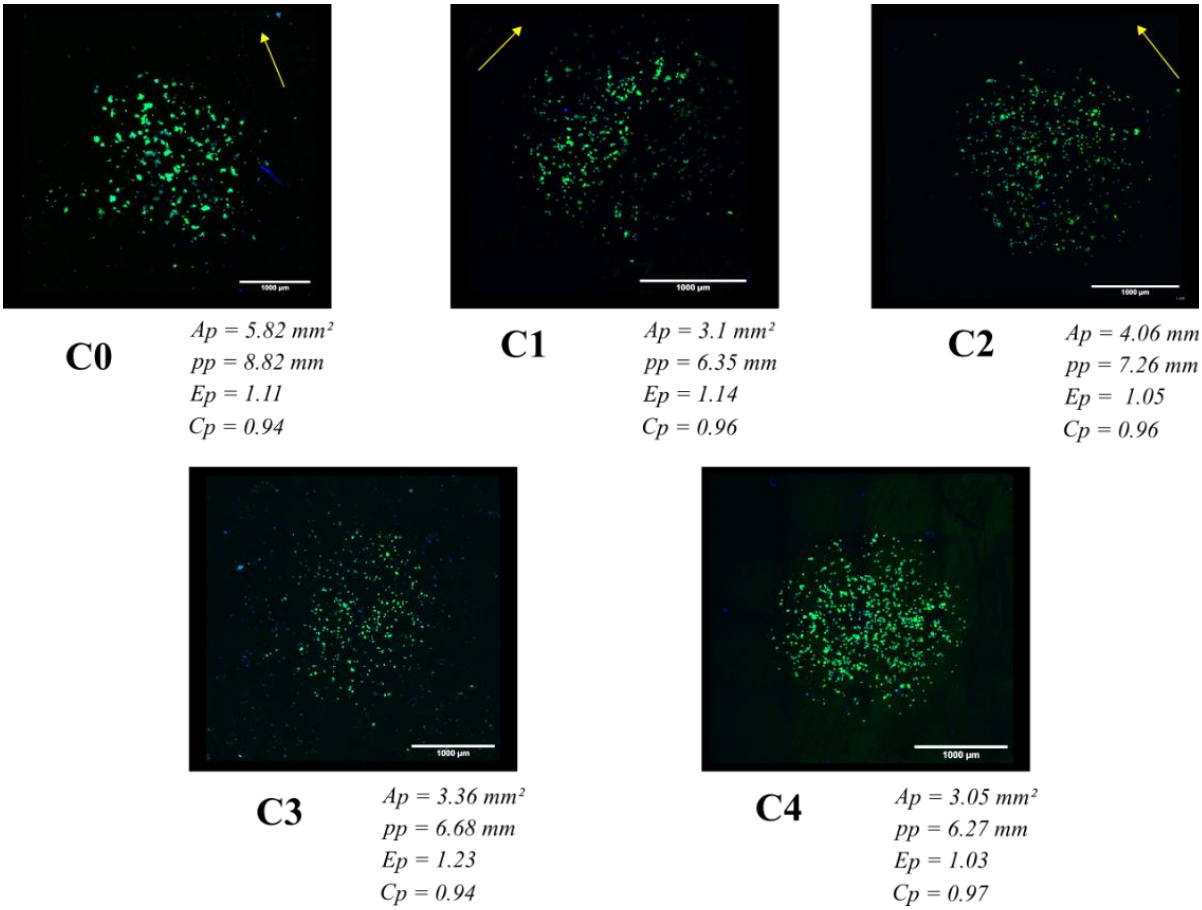


Figure 3.34 : Résultats de l'ensemencement en gouttes sur les 5 surfaces à J0 pour les hMSCs en milieu ostéoinducteur. La flèche jaune représente l'orientation de la surface dans le cas où celle-ci existe.

La figure 3.34 présente la forme prise par la population sur les différentes surfaces à J0 en milieu de différenciation, avec les données morphologiques de la population de cellules. A J0, on observe des populations de cellules plutôt denses sur l'ensemble des différentes surfaces. Tout comme pour les cellules en milieu de prolifération, la goutte de hMSCs en milieu de différenciation prend un aspect circulaire pour l'ensemble des surfaces. Aucun alignement n'est observé sur les clichés des différentes surfaces. En termes de morphologie, le cliché de la surface C0 montre la plus grande aire de population de cellule avec une valeur de 5.82 mm², suivi par C2, C3, C1 et C4 à 3.05 mm². Aucune différence ne semble être observée par rapport aux cellules en milieu de prolifération (figure 3.30). Cependant, le nombre de clichés n'est pas suffisant pour appuyer cette hypothèse.

La figure 3.35 présente la forme prise par la population sur les différents matériaux à J4 en milieu de différenciation.

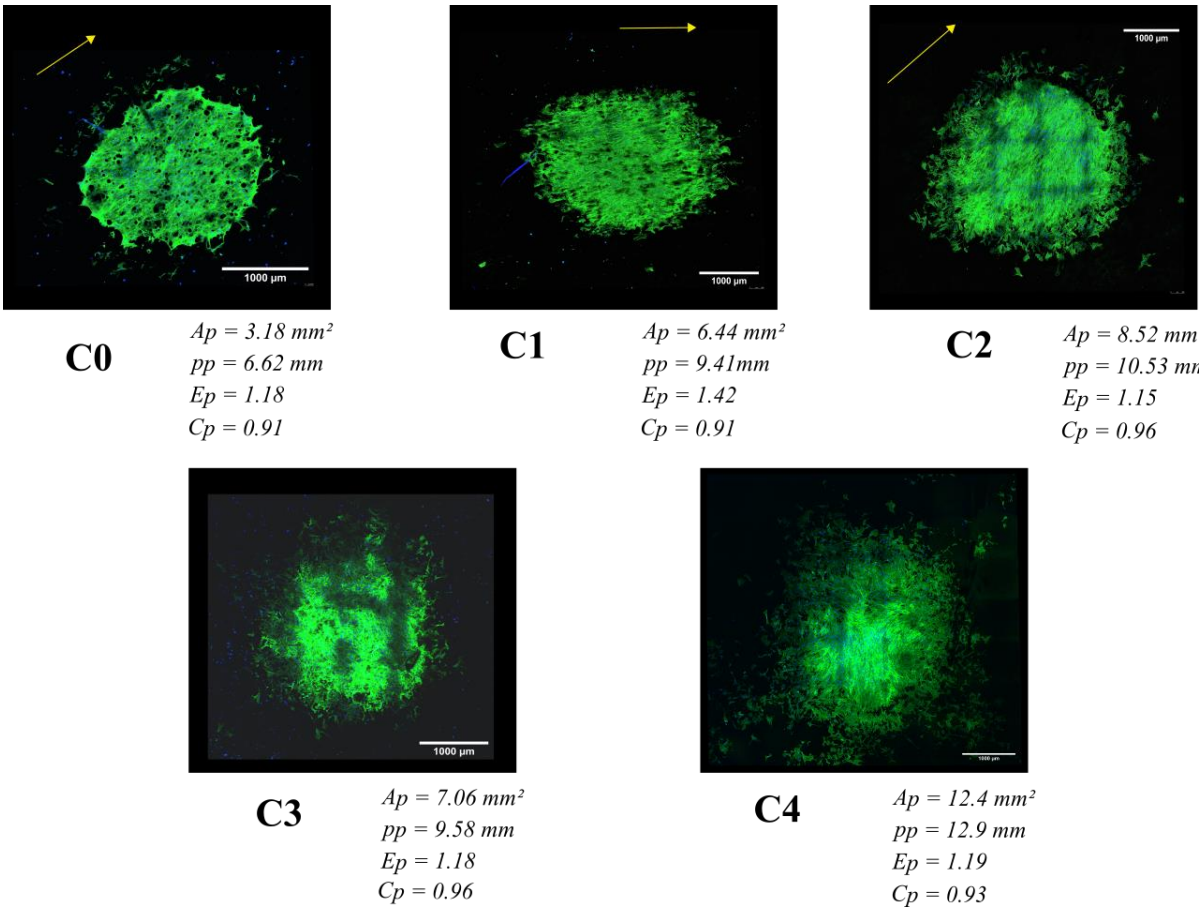
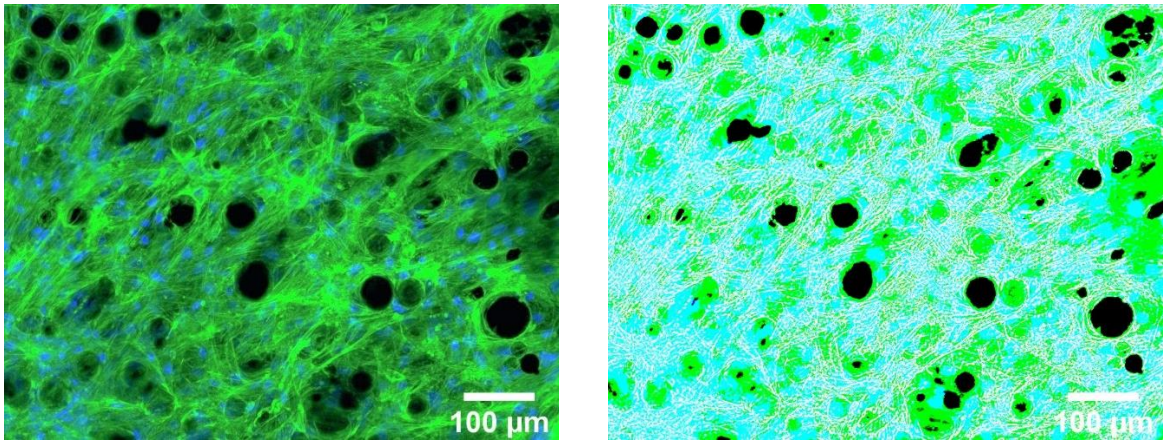


Figure 3.35 : Résultats de l'ensemencement en gouttes sur les 5 surfaces à J0 pour les hMSCs en milieu ostéoinducteur. La flèche jaune représente l'orientation de la surface dans le cas où celle-ci existe.

Globalement, on observe une population cellulaire plus compacte pour l'ensemble des surfaces. Cela est en accord avec les résultats de la prolifération en milieu de différenciation, avec une prolifération plus faible. Les observations au microscope à fluorescence nous permettent de supposer une motilité moins grande pour les hMSCs dans ce milieu.

La population sur le matériau C0 présente une forme très dense avec la formation de plusieurs épaisseurs de cellules. La comparaison à C0 n'est pas réalisable ; cependant la faible valeur de A_p fait

supposer un faible étalement de la population sur la surface. Aucune orientation significative ne semble ressortir du cliché de la population. Cependant, une cohésion semble s'être mise en place dans la population, comme le montre la figure 3.36 avec la mise en place d'un réseau de filaments d'actine. Bien que cette observation ne se limite qu'à un seul cliché, on observe ici un comportement opposé à ce qui est observé en milieu de prolifération.

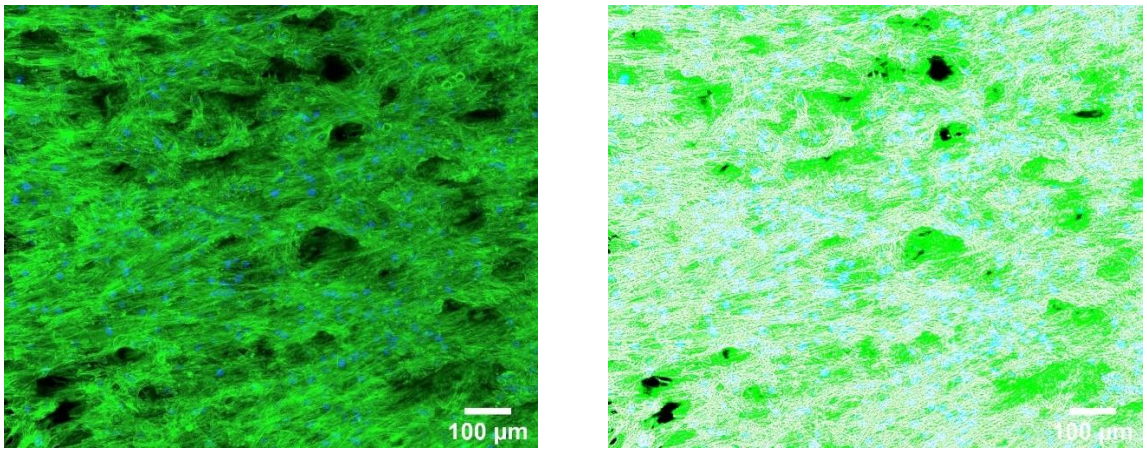


(a) (b)

Figure 3.36 : Disposition des filaments d'actine au sein de la population pour C0. (a) cliché des cellules au centre de la population. (b) mise en évidence des filaments d'actine.

Une forte croissance cellulaire de la population semble être observée sur C4 en milieu de différenciation. De plus, comme pour le milieu de prolifération, la population ici présente de multiples orientations, soulignant ainsi l'effet de la surface sur la population. On peut donc supposer que les hMSCs en milieu de différenciation sont aussi sensibles à la présence des rainures submicroscopiques que des hMSCs en milieu de prolifération. Cependant, cela ne reste qu'une hypothèse.

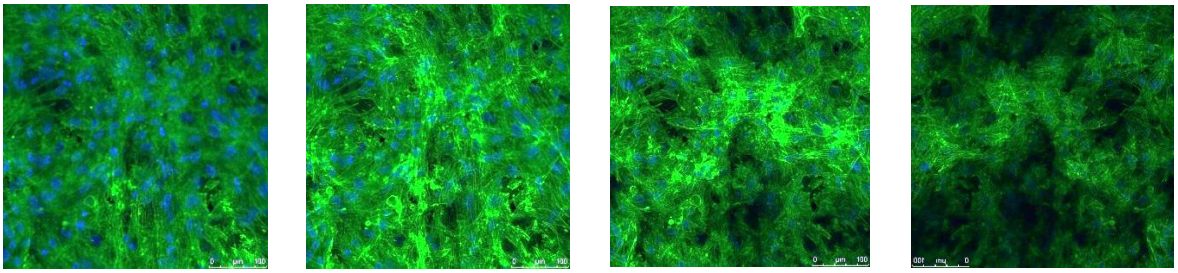
Une croissance cellulaire significative est observée sur les surfaces C1 et C2, bien que cela ne soit pas validé statistiquement. Aucune orientation spécifique n'est observée pour C2. Cependant, une polarisation de la population est observée pour C1, avec une répartition des hMSCs ainsi que de leurs filaments d'actine le long de la surface (figure 3.37). Ces résultats, avec ceux de C0, montrent l'influence de la rugosité à l'échelle microscopique sur la polarisation de la population.



(a) (b)

Figure 3.37 : Disposition des filaments d'actine au sein de la population pour C1. (a) cliché des cellules au centre de la population. (b) mise en évidence des filaments d'actine.

Enfin, la population sur le matériau C3 montre une croissance cellulaire à J4 ainsi qu'une absence d'orientation de la population. La population de cellules est très dense avec la présence de plusieurs couches de cellules (voir figure 3.38). Cette observation montre que la population de cellules croît de préférence en couche, soulignant une fois encore une mauvaise compatibilité de la cellule au matériau C3.



(a) z=0 µm (b) z=8 µm (c) z=16 µm (d) z=24 µm

Figure 3.38 : Distribution des hMSCs sur la hauteur de C0

L'ensemble des résultats observés semble coïncider avec les résultats de prolifération en milieu de différenciation pour le pool 2. Il serait intéressant d'étudier les différences de morphologies des populations de cellules pour les différents pools.

3.3.4. Discussion

Ces analyses morphologiques des hMSCs sur les différents matériaux et selon différents milieux ont permis de faire des observations qui complètent les tests d'adhésion et de prolifération.

L'une des hypothèses de notre étude est que la forte rugosité présente sur la surface brute SLM C0 est un frein à l'ostéointégration, avec une inhibition de la prolifération cellulaire. Les résultats de prolifération obtenus précédemment ne permettent ni d'infirmer, ni de confirmer cette hypothèse. Cependant, les analyses morphologiques apportent des explications sur la manière dont les hMCS prolifèrent sur C0. Le premier point observé est la mise en évidence d'une prolifération dans l'épaisseur, contrairement à ce que l'on peut observer sur la surface C4 où les cellules s'étalent plus sur la surface. En effet, les analyses au microscope à fluorescence montrent une adhésion des cellules sur et autour des particules. Lors de l'arrivée des cellules à la surface, celles-ci se posent par gravité sur les particules présentant une grande surface de contact, favorisant donc l'adhésion au niveau de celles-ci. Les cellules vont donc suivre la topographie de ces particules et proliférer autour de celles-ci dans la hauteur plutôt que dans la longueur. Le deuxième point observé est l'absence de cohésion entre les cellules sur les cellules en milieu de prolifération. Celles-ci forment une couche de cellules trouée, avec la présence de zones sans cellules. Bien que cela ne soit pas démontré, ces zones sans cellules semblent correspondre à une absence de particules. Cela vient donc appuyer notre hypothèse d'adhésion préférentielle au voisinage des particules. On peut aussi ajouter que la quantité de connexions intercellulaires est significativement plus faible pour les cellules sur C0 par rapport au plastique et à C4. Ce problème ne s'observe pas en milieu de différenciation, où les cellules présentent une forte cohésion cellulaire. Le troisième point observé est la connexion entre les cellules et la surface du matériau C0. En effet, quel que soit le milieu de culture, les observations des cellules sur les différentes profondeurs (figure 3.20 et figure 3.27) montrent un faible contact des cellules avec la surface elle-même (z=0 µm), remplacé par un contact important avec les particules. On obtient donc un contact entre les cellules et la surface se faisant exclusivement avec les particules. Cet aspect peut être à l'origine de problèmes par la suite, surtout pour un fonctionnement mécanique où l'ensemble des efforts serait transmis par ces particules. Il serait donc intéressant par la suite d'étudier l'efficacité de la connexion osseuse sur une telle surface. Ainsi, cela montre donc que si la surface SLM brute respecte les critères de biocompatibilité,

l'organisation des cellules à la surface peut être la source de problématiques pour le bon fonctionnement d'un implant.

Les données d'adhésion et de prolifération n'ont pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre les différents matériaux. Cependant, des différences significatives sont observées en termes de morphologie cellulaire. Les morphologies observées à J0 sont assimilables à l'adhésion des cellules mesurées dans la section précédente. A l'échelle de la cellule, celles-ci affichent une forme sphérique, que l'on retrouve lors de l'adhésion initiale à la surface, avec aucune différence significative entre les différents matériaux. Ceci est évidemment l'état initial recherché afin de pouvoir déterminer l'influence des différents matériaux. Les observations à J4 montrent une influence significative des différents matériaux sur la morphologie cellulaire. Comme cela fut expliqué précédemment, la morphologie du matériau C0 modifie le comportement des hMSCs en milieu de prolifération et de différenciation. Cependant, il n'a pas été possible de corréler les observations faites à une baisse de la prolifération cellulaire. Au contraire, le matériau C4 ne présente pas de topographie à l'échelle microscopique, malgré la présence de rainures submicroscopiques créées par le polissage abrasif. Les observations montrent un fort étalement cellulaire des hMSCs sur C4, ainsi qu'une dispersion significative de la population de cellules en milieu de prolifération et de différenciation. Ces résultats sont similaires au comportement des hMSCs sur la surface plastique et viennent appuyer la biocompatibilité du matériau TA6V. Malgré l'absence de validation statistique, les résultats quantitatifs de prolifération sur les matériaux C1 et C2 semblent montrer une amélioration de croissance cellulaire par rapport à C4, C2 présentant les résultats les plus proches de C4. Les analyses morphologiques de C1 et C2 vont dans le même sens que ces résultats. En effet, les hMSCs sur C1 présentent un étalement cellulaire plus important par rapport à C0 avec une polarisation des cellules dans le sens de la surface. Cette polarisation s'observe aussi sur la morphologie de la population, même dans le cas d'empilement de couches de cellules où certaines d'entre elles ne sont pas en contact direct avec la surface. Les hMSCs sur C2 présentent un étalement encore plus important que sur C1, avec cependant une orientation moins prononcée. L'étalement étant le signe que la cellule a bonne interaction avec la surface, les matériaux C1 et C2 peuvent donc être considérés comme meilleures en termes de biocompatibilité par rapport à C0. Enfin, le matériau C3 ne respectait pas nos hypothèses de biocompatibilité que l'on s'était fixées. Les données d'adhésion ont montré une adhésion similaire à C4, avec cependant une diminution de cette adhésion dans le temps. Bien que non démontrée statistiquement, la prolifération observée était significativement plus faible par rapport au plastique et à C4, avec un effet exacerbé en milieu de différenciation. Les données morphologiques obtenues permettent d'expliquer les précédents résultats. Les hMSCs présentent un faible étalement comparé à C4, couplé à une forte élongation cellulaire. La faible présence d'extensions cytoplasmiques ainsi que la désorganisation des filaments d'actine au sein des surfaces montrent une mauvaise compatibilité des cellules avec C3 pour les deux milieux. On peut donc supposer que la topographie de surface obtenue pour C3 n'est pas favorable à une bonne biocompatibilité. Cependant, cette mauvaise compatibilité peut aussi s'expliquer par d'autres facteurs (chimiques, mécaniques…) qui sont modifiés durant le sablage.

Les résultats d'adhésion et de prolifération n'ont pas permis de mettre en évidence de corrélation claire entre la rugosité de la surface, sa mouillabilité et les données de biocompatibilité. Cependant, la combinaison de ces résultats aux analyses morphologiques permet de tirer des suppositions quant à l'influence de de la topographie des surfaces. Le premier point d'intérêt est l'influence des différentes échelles de rugosité sur la morphologie cellulaire. C0 montre la plus grande échelle de rugosité, avec de topographie à la même dimension que la cellule, suivi par C1 puis C2. C4 présente une autre échelle de rugosité, via la présence de rainures submicroscopiques. Enfin, C3 présente un mélange de différentes échelles de rugosité. Le paramètre généralement utilisé afin de caractériser la rugosité de la surface est le paramètre S_a. Le matériau C0 présente la plus grande valeur de S_a, suivi par C1, C3, C2 puis C4. En termes d'étalement des hMSCs, son augmentation semble être corrélé à la diminution de S_a. Cependant, la surface C3 vient contredire cette relation avec la plus faible valeur d'étalement à J4. Globalement, cela valide les observations de la littérature montrant un meilleur étalement cellulaire sur les surfaces de

faible rugosité (entre 1 µm et 2 µm). Cependant, ceci ne prend pas en compte les différentes échelles de rugosité (avec C3) ainsi que les topographies atypiques (avec C0). Du point de vue de l'anisotropie topographique de la surface, mesurée via le paramètre S_{tr}, des influences ont été mises en évidence sur les surfaces C0, C1, C2 et C4. Seul le matériau C1 est défini C1 est défini comme anisotrope ($S_{tr} \leq 0.5$), avec une polarisation significative des hMSCs ainsi que de la population dans le sens de la surface. Le matériau C2 est considéré comme homogène ($S_{tr} \geq 0.5$) avec aucune polarisation explicite observée au niveau des hMSCs ainsi qu'au niveau de la population. Cela laisse donc supposer une corrélation entre le paramètre S_{tr} et la polarisation des cellules. Cependant, le matériau C0 est considéré comme homogène mais présente néanmoins des traces de polarisation au niveau des hMSCs. Cela est dû à l'anisotropie créée par la fabrication en couche cachée par les particules enkystées dans la surface. De même, C4 est considéré comme homogène mais présente de multiples polarisations de hMSCs liées à la présence de rainures submicroscopiques On observe donc la limite de la corrélation entre S_{tr} et la polarisation cellulaire pour des cas où différentes échelles de rugosité coexistent. Un autre point à prendre en compte dans la rugosité est sa fréquence spatiale, définie par le paramètre S_{al}. Cette fréquence spatiale va définir l'espacement entre chaque variation significative de la surface, et affecte donc la morphologie cellulaire, particulièrement pour des valeurs proches de la dimension de la cellule. Sur les matériaux C0 et C1 présentant des valeurs de S_{al} de l'ordre de grandeur de la cellule ($S_{al} \leq 50$ µm), l'influence de la rugosité sur la morphologie cellulaire est le plus prononcé, avec une modification significative de la polarisation cellulaire ainsi que de l'étalement cellulaire par rapport à C4 et au plastique. Au contraire, sur les matériaux C2 et C4 présentant des valeurs de S_{al} supérieures à l'ordre de grandeur de la cellule ($S_{al} \geq 100$ µm), l'influence de la rugosité est plus faible, avec un plus grand étalement cellulaire. Le matériau C4 vient appuyer ces observations avec une modification significative de la polarisation cellulaire en présence de rainures submicroscopiques inférieures à la dimension de la cellule, et non prises en compte dans le calcul du paramètre S_{al}. De la même manière, le matériau C3 modifie significativement la morphologie des hMSCs avec la présence de rugosité à l'échelle submicroscopique, malgré une valeur de $S_{al} \geq 100$ µm. Ainsi, cela montre la limite de l'utilisation du paramètre S_{al} pour des surfaces présentant de multiples échelles de rugosité. Enfin, aucun lien n'a pu être trouvé entre la mouillabilité et la morphologie des hMSCs sur les différents matériaux. Ceci peut être attribué à la grande variété de topographies de surface jouant aussi sur la mouillabilité de celles-ci. Il est alors impossible de déterminer l'effet de la mouillabilité seule par rapport à l'effet de la rugosité, ou d'autres facteurs de surface.

3.4. Conclusion

La biocompatibilité des différentes surfaces (C0, C1, C2, C3 et C4) a été caractérisée via différents tests de cytocompatibilité (cytotoxicité, adhésion, prolifération), référencés au sein de la norme ISO 10993-5. Les propriétés d'ostéoinduction de la surface ont été étudiées à l'aide de tests de minéralisation. Les études de cytotoxicité ont permis de montrer l'absence de toxicité significative pour l'ensemble des matériaux. Cela a permis de prouver l'absence d'apport toxique par le procédé SLM et les différents traitements de surface. Les tests de cytocompatibilité ont montré la présence d'adhésion et de prolifération sur l'ensemble des surfaces, ce qui permet de supposer la biocompatibilité de l'ensemble des surfaces. Cependant, les tests n'ont pas pu être menés à terme, empêchant une validation statistique. En termes d'adhésion, les résultats actuels n'ont pas montré de différences nettes entre les différentes surfaces. De la même manière, les tests de prolifération montrent des résultats différents d'un pool à un autre, ne permettant pas de distinguer les surfaces. Cependant, C3 semble montrer une prolifération moins efficace que sur les autres surfaces, montrant l'aspect inhibant de la rugosité à l'échelle submicroscopique. Les propriétés ostéoinductrices des surfaces n'ont pas pu être déterminées dues à des bruits de fond très importants. L'étude de la morphologie cellulaire au microscope à fluorescence a apporté plus d'informations sur les comportements des hMSCs sur les surfaces, permettant de faire une distinction entre les différentes surfaces. Les plus grands étalements cellulaires sont observés sur C4 et C2, signe de bonnes interactions entre les hMSCs et les surfaces. L'anisotropie de C1 apportée par le

procédé SLM a montré une influence directe sur l'orientation des hMSCs. Les hMSCs présentent les plus faibles interactions sur C3, ce qui laisse supposer une mauvaise compatibilité avec les hMSCs. L'ensemble des résultats semble montrer que la rugosité est un facteur important déterminant la réponse cellulaire. Néanmoins, la non prise en compte des autres paramètres surfaciques (mécaniques, chimiques…) ne nous permet pas de valider cette hypothèse.

Références

[1] P. K. Mukherjee, « Chapter 13 - Bioassay-Guided Isolation and Evaluation of Herbal Drugs », in *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs*, P. K. Mukherjee, Éd. Elsevier, 2019, p. 515-537.

[2] E. S. Istifli, M. T. Hüsunet, et H. B. Ila, « Cell Division, Cytotoxicity, and the Assays Used in the Detection of Cytotoxicity », *Cytotoxicity - Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds*, août 2019, doi: 10.5772/intechopen.88368.

[3] B. Hs *et al.*, « Evaluation of the extraction method for the cytotoxicity testing of latex gloves. », *Yonsei Med J*, vol. 46, nº 4, p. 579-583, août 2005, doi: 10.3349/ymj.2005.46.4.579.

[4] G. K. Srivastava *et al.*, « Comparison between direct contact and extract exposure methods for PFO cytotoxicity evaluation », *Scientific Reports*, vol. 8, nº 1, Art. nº 1, janv. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-19428-5.

[5] Ö. S. Aslantürk, « In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages », *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*, déc. 2017, doi: 10.5772/intechopen.71923.

[6] C. R. Parish et A. Müllbacher, « Automated colorimetric assay for T cell cytotoxicity », *Journal of Immunological Methods*, vol. 58, nº 1, p. 225-237, mars 1983, doi: 10.1016/0022-1759(83)90277-6.

[7] T. Mosmann, « Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays », *J. Immunol. Methods*, vol. 65, nº 1-2, p. 55-63, déc. 1983, doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

[8] C. S. Baker, « Crystallization of neutral red vital stain from minimum essential medium due to pH instability », *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal*, vol. 34, nº 8, p. 607-608, sept. 1998, doi: 10.1007/s11626-996-0003-0.

[9] K. Tamura, N. Takashi, R. Kumazawa, F. Watari, et Y. Totsuka, « Effects of Particle Size on Cell Function and Morphology in Titanium and Nickel », *Materials Transactions*, vol. 43, nº 12, p. 3052-3057, 2002, doi: 10.2320/matertrans.43.3052.

[10] A. Ahmad Khalili et M. R. Ahmad, « A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications », *Int J Mol Sci*, vol. 16, nº 8, p. 18149-18184, août 2015, doi: 10.3390/ijms160818149.

[11] S. Hong, E. Ergezen, R. Lec, et K. A. Barbee, « Real-time analysis of cell-surface adhesive interactions using thickness shear mode resonator », *Biomaterials*, vol. 27, nº 34, p. 5813-5820, déc. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.07.031.

[12] U. Landegren, « Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens », *Journal of Immunological Methods*, vol. 67, nº 2, p. 379-388, mars 1984, doi: 10.1016/0022-1759(84)90477-0.

[13] G. A. Romar, T. S. Kupper, et S. J. Divito, « Research Techniques Made Simple: Techniques to Assess Cell Proliferation », *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 136, nº 1, p. e1-e7, janv. 2016, doi: 10.1016/j.jid.2015.11.020.

[14] C. W. G. M. Lowik, M. J. Alblas, M. Vanderuit, S. E. Papapoulos, et G. Vanderpluijm, « Quantification of Adherent and Nonadherent Cells Cultured in 96-Well Plates Using the Supravital Stain Neutral Red », *Analytical Biochemistry*, vol. 213, nº 2, p. 426-433, sept. 1993, doi: 10.1006/abio.1993.1442.

[15] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, et F. Pognan, « Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity », *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, nº 17, p. 5421-5426, sept. 2000, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.

[16] S. Yeniyol et J. L. Ricci, « Alkaline phosphatase levels of murine pre-osteoblastic cells on anodized and annealed titanium surfaces », *Eur Oral Res*, vol. 52, nº 1, p. 12-18, janv. 2018, doi: 10.26650/eor.2018.78387.

[17] K. Anselme, « Osteoblast adhesion on biomaterials », *Biomaterials*, vol. 21, nº 7, p. 667-681, avr. 2000, doi: 10.1016/S0142-9612(99)00242-2.

[18] K. Anselme *et al.*, « The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour », *Biomaterials*, vol. 21, nº 15, p. 1567-1577, août 2000, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00042-9.

[19] K. Anselme et M. Bigerelle, « Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion », *Acta Biomaterialia*, vol. 1, nº 2, p. 211-222, mars 2005, doi: 10.1016/j.actbio.2004.11.009.
[20] S. Schlie, M. Gruene, H. Dittmar, et B. N. Chichkov, « Dynamics of cell attachment: adhesion time and force », *Tissue Eng Part C Methods*, vol. 18, nº 9, p. 688-696, sept. 2012, doi: 10.1089/ten.TEC.2011.0635.
[21] E. G. Long, M. Buluk, M. B. Gallagher, J. M. Schneider, et J. L. Brown, « Human mesenchymal stem cell morphology, migration, and differentiation on micro and nano-textured titanium », *Bioact Mater*, vol. 4, p. 249-255, sept. 2019, doi: 10.1016/j.bioactmat.2019.08.001.
[22] G. Abagnale *et al.*, « Surface Topography Guides Morphology and Spatial Patterning of Induced Pluripotent Stem Cell Colonies », *Stem Cell Reports*, vol. 9, nº 2, p. 654-666, août 2017, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.06.016.

Chapitre 4 : Effet de la rugosité sur la migration unicellulaire : étude numérique

Sommaire

4.1. Choix du modèle numérique 128
4.1.1. Revue de littérature des modèles existants 128
4.1.2. La méthode Cellular Potts 131
4.1.2.1. Description, avantages et limitations 131
4.1.2.2. Applications à des problématique cellules/substrat 132
4.2. Implémentation du modèle CP sur des surfaces numériques 134
4.2.1. Description du modèle CP 134
4.2.1.1. La méthode CP 134
4.2.1.2. Hamiltonien d'adhésion 135
4.2.1.2. Hamiltonien de cohésion 135
4.2.1.2. Hamiltonien de motilité 135
4.2.2. Configuration du modèle 136
4.2.2.1. Paramètres du modèle 136
4.2.2.2. Paramètres d'évaluation 136
4.2.2.3. Surfaces analysées 137
4.2.3. Résultats 139
4.2.3.1. Surface de contrôle 139
4.2.3.2. Surface aléatoirement rugueuse et influence de J_{CS} 140
4.2.3.3. Surface à rainures parallèles 142
4.2.3.4. Surface à rainures perpendiculaires 145
4.2.3.5. Surface à rainures sinusoïdale 147
4.2.4. Pertinence du modèle 149
4.3. Implémentation du modèle CP pour des surfaces obtenues par FA SLM 150
4.3.1. Modification du modèle CP 150
4.3.2. Configuration du modèle 150
4.3.2.1. Paramètres du modèle 150
4.3.2.2. Paramètres d'évaluation 151
4.3.2.3. Surfaces analysées 152
4.3.3. Résultats 153
4.3.3.1. Morphologie cellulaire 153
4.3.3.2. Déplacement cellulaire 155

4.3.3.3. Orientation de déplacement **157**
4.3.4. Discussion **159**
4.4. Conclusions **160**
Références **162**

Les interactions entre les cellules et la surface dépendent des propriétés surfaciques de celle-ci, notamment la topographie de la surface. La topographie semble jouer un rôle important, en particulier pour des dimensions proches de celle de la cellule. La compréhension de la rugosité sur différents phénomènes cellulaires intervenant durant l'ostéointégration nécessite donc le développement d'un modèle numérique basé sur les résultats expérimentaux et la littérature. Ce chapitre présente un modèle numérique de migration sur des surfaces de références et sur des surfaces obtenues par FA SLM.

4.1. Choix du modèle numérique

4.1.1. Revue de littérature des modèles existants

L'ensemble des mécanismes cellulaires qui régissent la migration et la prolifération cellulaire ne sont pas encore complètement maitrisés. En effet, ces mécanismes biologiques sont contrôlés par des signaux biochimiques et par des forces mécaniques extérieures. En interagissant avec la matrice extracellulaire (MEC) et le substrat, les cellules migrent et communiquent entre elles, permettant ainsi la formation de tissus cellulaires. Les interactions entre la cellule et le substrat (via la MCE) sont cruciales pour la formation et le fonctionnement de tissus [1]. Si ces interactions peuvent être de nature chimique [2], [3] ou mécanique [4]–[6], elles peuvent être aussi de nature topographique, en particulier à l'échelle microscopique. Afin de pouvoir identifier l'influence des différentes propriétés de l'état de surface tout en ayant un contrôle de l'environnement, l'utilisation d'un modèle numérique est envisageable.

Différentes approches numériques ont été proposées dans la littérature afin d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires [7] et deux approches de modélisation peuvent être distinguées : l'approche continue et l'approche discrète (figure 4.1).

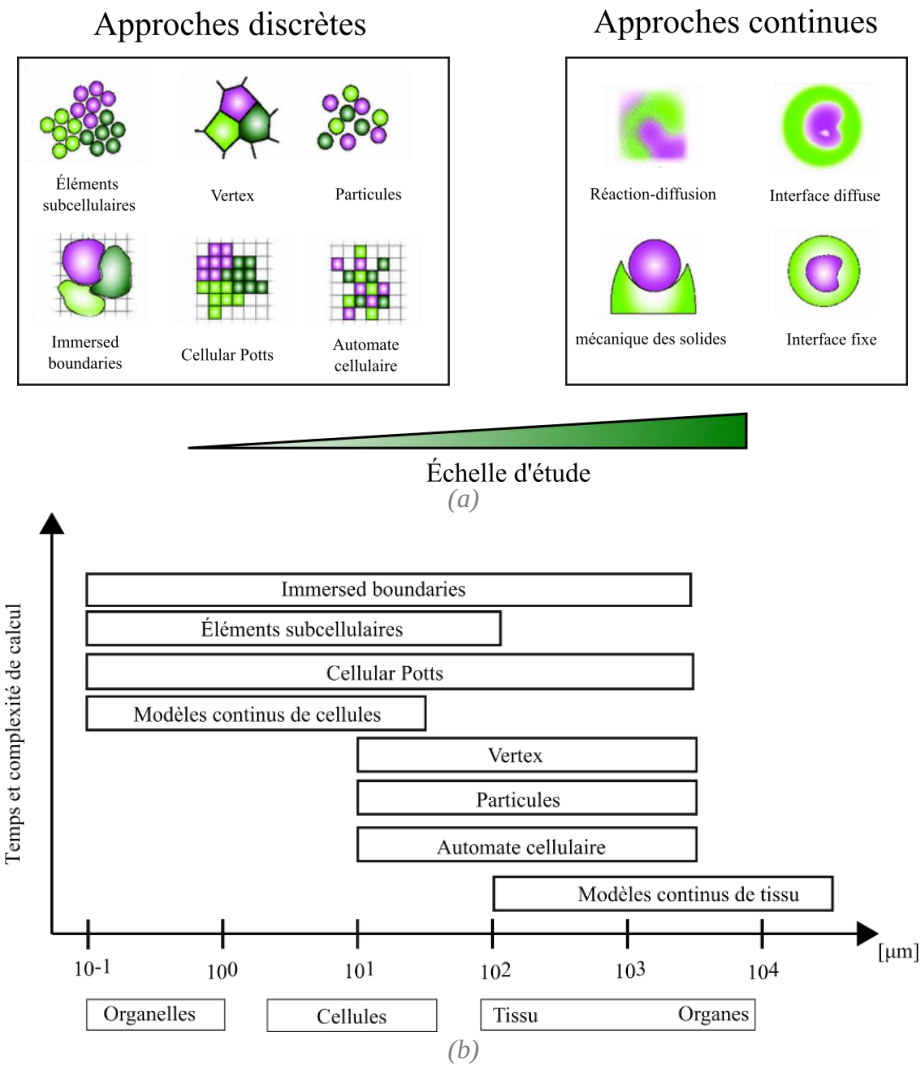


Figure 4.1 : (a) Description schématique des méthodes discrète et continue, adaptée de Discher et al [8]. (b) Complexité de calcul VS échelle d'analyse pour les différentes méthodes de modélisation, adaptée de S. Tanaka et al [7].

Dans l'approche continue, les objets (cellules ou tissus) sont décrits comme des structures continues auxquelles sont attribuées des propriétés mécaniques, chimiques ou autres. A l'échelle de la cellule, on peut distinguer deux familles : les modèles continus cellulaires et les modèles continus tissulaires. La modélisation de phénomènes complexes au niveau du tissu cellulaire (croissance, comportements mécaniques…) se fait généralement via une approche par éléments finis (EF). On peut citer l'étude de Munoz et al [9] analysant les aspects mécaniques de la morphogénèse à partir d'un modèle EF. D'autres modèles continus utilisent la méthode EF afin de prédire la croissance des tissus osseux autour d'une prothèse [10] ou de tissus mous [11] soumis à des contraintes mécaniques. Cependant, l'approche mécanique n'est pas la seule approche utilisée. Cette approche par EF est aussi adoptée dans des modèles continus cellulaire afin d'analyser le mouvement cellulaire ainsi que la migration. Au sein de ces modèles, la cellule est définie par un matériau homogène (ou décomposée en plusieurs parties homogènes) auxquelles des lois et des propriétés sont attribuées. On peut citer deux études de Allena et al [13], [14] analysant différents aspects mécaniques de la cellule au sein de la migration unicellulaire via un modèle EF. De la même manière, Kim et al [15] analysent l'influence de différents aspects cellulaire au sein de la durotaxis à l'aide d'un modèle EF 3D. Les différents modèles décrits ainsi que la figure 4.1 montrent que les modèles continus sont adaptés à l'étude d'un objet cellulaire (cellule, tissu…) avec des temps de calcul relativement faibles selon la complexité de l'objet

étudié. Cependant, les avantages de l'approche continue disparaissent lorsque des problématiques multiéchelles apparaissent.

Concernant les modèles se basant sur l'approche discrète, chaque objet (cellule, tissu…) est défini par un élément ou un ensemble d'éléments finis [7]. L'avantage de cette approche est la capacité de modéliser des systèmes complexes ainsi que l'ajout relativement aisé de mécanismes cellulaires (adhésion, motilité…), tout en prenant en compte les interactions entre les objets. Cette approche est particulièrement bien adaptée à des problématiques multiéchelles. Cependant, cette approche demande une grande puissance de calcul et elle est limitée à un certain nombre d'objets. Dans la suite, les différentes méthodes présentées dans la figure 4.1 sont brièvement décrites.

1. **La méthode Vertex**. Il s'agit d'une approche 2D ou 3D basée sur la méthode de Voronoi [16]. Les cellules sont approximées par des polygones centrés sur un point qui se déplacent suivant la mécanique Newtonienne. C'est une méthode généralement utilisée lorsque l'on étudie des problématiques liées à la morphogénèse [17]–[20], et elle présente l'avantage d'être facile à prendre en main avec une totale liberté sur le code, tout en implémentant la mécanique newtonienne pour avoir une signification physique. Cependant, cette méthode s'applique à la modélisation de populations de cellules denses.
2. **La méthode « Immersed boundary »**. Cette méthode mélange la méthode Vertex et la dynamique des fluides, où les cellules sont modélisées par des polygones [21]. Cependant, contrairement au modèle de Vertex, les cellules ne partagent pas leurs frontières et les polygones sont immergés dans un fluide qui suit l'équation de Navier – Stokes. Cette approche a l'avantage de prendre en compte les changements internes de la cellule mais requiert une grande puissance de calcul (figure 4.1b).
3. **La méthode à base de particules**. Il s'agit d'une méthode où chaque cellule est représentée par une sphère ponctuelle [22]. Dans le même esprit, on peut aussi citer la méthode Cellular Automata qui décrit la cellule comme une particule correspondant à un site au sein d'un lattice [23], [24]. Ces méthodes sont plutôt adaptées à des modélisations de larges populations de cellules en omettant certains détails cellulaires, tels que les variations de forme d'une cellule [25].
4. **La méthode des éléments subcellulaires**. Il s'agit d'une méthode de modélisation de la cellule avec ses différents éléments [26]. Cette approche suppose que le cytosquelette d'une cellule (ou la cellule elle-même) est divisé en un certain nombre fini d'éléments subcellulaires. Chaque élément est mathématiquement et numériquement représenté par un centroïde et interagit biophysiquement via des forces dérivant de potentiels d'interactions. Ces éléments peuvent être de différentes natures, allant d'un composant de la cellule (i.e. membrane, noyau…) à des nœuds [27]. L'inconvénient majeur de cette méthode est la puissance de calcul demandée dans le cas de la modélisation d'une population cellulaire (figure 4.1b).
5. **La méthode « Cellular Potts » (CP)**. C'est une méthode qui modélise un comportement cellulaire via une technique énergétique basée sur la minimisation de l'énergie via l'Hamiltonien H pour pouvoir simuler le comportement cellulaire [28]. L'environnement est constitué d'une grille composée de sites, dont les indices représentent le type d'objets (cellules, substrat…), et le calcul de la variation énergétique du système est basé sur les différents aspects cellulaires, tel que l'adhésion ou la déformabilité de la cellule. Ce type de méthode présente l'avantage d'avoir été utilisé pour étudier de nombreux phénomènes cellulaires (migration cellulaire [29], angiogenèse [30]…).

L'étude de l'ostéointégration en fonction de la rugosité de la surface nous pousse à adopter une méthode permettant non seulement de modéliser la réponse de la cellule à la rugosité, mais aussi de décrire de façon discrète la population de cellules afin de prendre en compte les différentes échelles d'étude. Ces différentes problématiques nous ont fait choisir la méthode Cellular Potts, qui est le bon compromis entre le niveau de détail requis et la complexité de calcul.

4.1.2. La méthode Cellular Potts

4.1.2.1. Description, avantages et limitations

La méthode CP est une méthode de modélisation discrète permettant d'étudier l'interaction entre les cellules et entre les cellules et leur environnement. Contrairement à d'autres méthodes cellulaires discrètes, l'approche CP ne prend pas en compte de processus physiques et chimiques, mais permet d'étudier des phénomènes biologiques complexes. Cette méthode a été introduite par Graner et Glazier en 1992 [28] et repose sur une version modifiée de la méthode Potts, consistant en un modèle d'interactions de spins au sein d'un lattice. A chaque pas de calcul (appelé Monte Carlo Step (MSC)), une copie aléatoire de chaque site du lattice vers un site voisin est testé via le calcul d'une différence énergétique, prenant la forme de l'hamiltonien ΔH. Cette différence énergétique permet de définir une probabilité d'acceptation de Boltzmann P_B afin de décider de la validation ou non de la copie, prenant la forme de l'équation (4.1) :

$$P_B = e^{-\frac{\Delta H}{T}} \tag{4.1}$$

Avec T la température de l'environnement, définissant sa motilité intrinsèque. La méthode CP considère la cellule comme un objet spatial, mais sans structure interne. Les cellules ainsi que les champs associés sont discrétisés en des lattices. La méthode CP suppose que les cellules peuvent subir des petites déformations et des changements de volumes selon le principe de minimisation de l'énergie libre qui contrôle leur dynamique. Par conséquent, les cellules réalisent des petits déplacements (i.e. << taille de la cellule). Cette méthode permet de capturer l'aspect stochastique du mouvement cellulaire ainsi que les changements morphologiques de la cellule.

La méthode CP est une méthode accessible et régulièrement utilisée pour simuler la dynamique cellulaire. L'un des points forts de la méthode est la possibilité de modéliser une propriété cellulaire spécifique relativement aisément. Cette méthode est utilisée pour différentes applications telles que la modélisation du tri cellulaire au sein d'agrégats cellulaires [28], [31], de la croissance tumorale [32] et de l'angiogenèse [33]. L'influence de l'environnement a aussi été étudiée avec la méthode CP. On peut citer l'étude de M. Scianna et al [34] mettant en avant l'influence de l'orientation de la MEC sur la migration cellulaire ou les études de Allena et al [35] et Oers et al [36] qui analysent l'influence de la rigidité du substrat sur la migration. Cette méthode permet de bien gérer la cellule comme entité seule, et donc de pouvoir prendre en compte à la fois le comportement de la cellule seule ainsi que de l'ensemble de la population. Cet aspect multicellulaire a donné lieu à des études de comportement collectif au sein d'une population de cellules. Par exemple, l'étude de Kabla et al [37] prédit numériquement les différents modes de migrations collectifs selon les propriétés intracellulaires, tel que l'adhésion intracellulaire ou la motilité cellulaire. On peut aussi citer l'étude de Turner et al [38] sur l'invasion de cellules cancéreuses qui parvient à prédire le profil de prolifération ainsi que la forme en filament observée lors de l'invasion. Cette méthode est aussi utilisée pour des problèmes biologiques plus complexes. Comme exemple, on peut citer l'étude de Marée et al [39] sur la morphogénèse de *Dictyostelium discoideum*, ou l'étude de Wear et al [40] sur la modélisation du développement ovarien précoce chez la souris.

La méthode CP a été critiquée pour son approche phénoménologique énergétique, jugée non-physique car la méthode est dépourvue de forces Newtoniennes. De plus, la méthode fonctionne pour un intervalle restreint de température *T*. En effet, si la température est trop basse, le système se fixe dans un creux énergétique. Si la température est trop élevée, la connectivité n'est plus assurée, provoquant la fragmentation de l'entité. Cette dernière limite a pour effet de limiter la vitesse de simulation, avec aussi la résolution spatiale. Par ailleurs, la méthode CP est aussi connue pour diverger pour des temps de simulation très long [41]. Cependant, d'autres études ont prouvé la véracité de la méthode [42], [43].

4.1.2.2. Applications à des problématique cellules/substrat

Les signaux mécaniques et géométriques de la surface sur laquelle se situe la cellule sont reconnus comme étant des facteurs importants qui contrôlent le comportement cellulaire.

Concernant l'aspect mécanique, l'influence de la rigidité du substrat sur le comportement cellulaire (i.e. morphologie, motilité et différentiation) a été démontrée. D'un point de vue numérique, des modèles basés sur la méthode CP ont permis d'obtenir une meilleure compréhension du comportement cellulaire. L'une de ces études, réalisée par Allena et al [35], met en lumière les modifications du comportement en fonction de la rigidité du substrat (i.e. durotaxis), plus particulièrement une migration préférentielle sur les surfaces les plus rigides, ainsi qu'une surface de contact plus grande avec le substrat. D'autres études adoptent une approche mécanique en combinant la méthode CP à une méthode aux éléments finis [36] , [44]. En effet, via le calcul des forces de tractions exercées par la cellule sur le substrat, un calcul aux éléments finis permet de déterminer la déformation du substrat et une minimisation de l'énergie est appliquée à ces déformations (figure 4.2a). L'aspect intéressant de ce type de modélisation est la possibilité de pouvoir prédire les forces de tractions s'appliquant sur la cellule à partir de la forme géométrique de la cellule en deux dimensions [45] (figure 4.2b).

Van Oers et al [36] et Scott et al [44] ont pu reproduire de nombreux aspects de la phase de prolifération cellulaire sur un substrat avec une rigidité spécifique, ainsi que la communication intercellulaire et la morphologie adoptée par les cellules. Cette approche est intéressante car elle permet de prendre en compte l'effet du substrat, malgré l'approche en 2D.

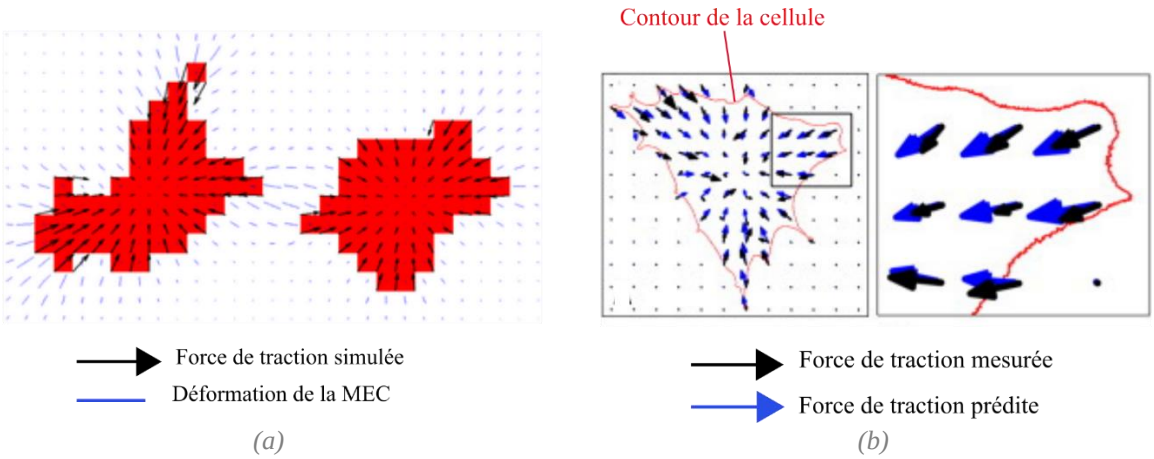
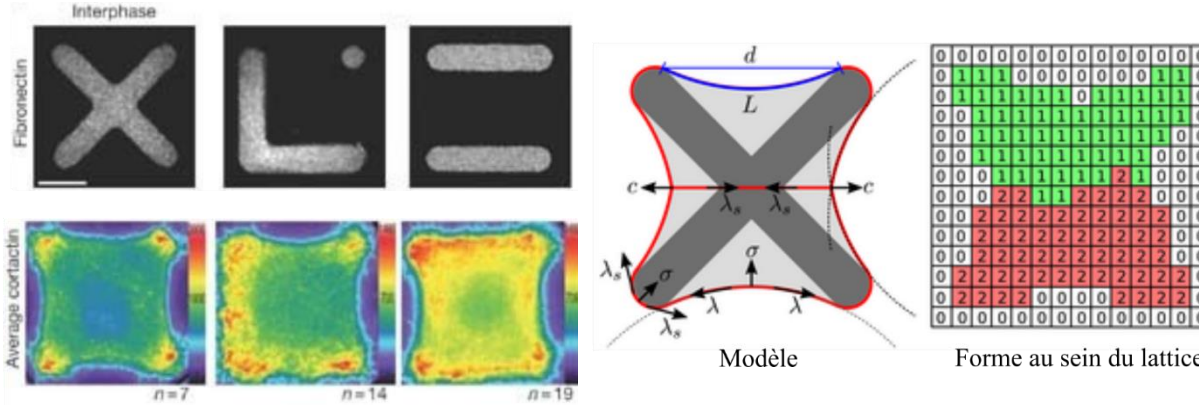


Figure 4.2 : (a) Champs des déformations appliqué sur le substrat sous-jacent [36]. (b) Champ des forces de traction calculé à partir de la forme la cellule [45].

Concernant l'aspect géométrique, des recherches ont été menées ces dernières années et elles ont montré une influence de substrats à géométries spécifiques sur le comportement de la cellule [46], [47]. D'un point de vue expérimental, Théry et al [48] ont été capables d'influencer l'orientation et la polarisation cellulaire, ainsi que la division cellulaire [49], grâce à un contrôle de l'orientation de la MEC. Des résultats similaires ont pu être trouvés dans d'autres études via l'utilisation de patterns adhésifs présentant une géométrie spécifique (figure 4.3a), avec par ailleurs l'observation de la distribution des filaments d'actine suivant la géométrie [50]. Les analyses numériques ont permis de reproduire de tels résultats tout en apportant une meilleure compréhension de ces comportements cellulaires. Vianay et al [51] ont mis en place un modèle CP permettant de prédire la forme et l'orientation adoptée par une cellule sur une géométrie spécifique.



(a) *(b)*

Figure 4.3 : (a) Morphologie acquise par la cellule en fonction la géométrie du substrat [49]. (b) Modèle CP de Albert et al. [52] prenant en compte les forces tangentielles.

On peut aussi citer l'étude de P.J. Albert et al [52], décrivant un modèle CP capable de prédire la forme cellulaire ainsi que la division cellulaire et l'adhésion sur des micro patterns (figure 4.3b). Ce modèle a aussi permis d'étudier la migration multicellulaire, avec la formation de régions incurvées le long d'une bande de fibronectine, ainsi que la formation de tourbillons au sein de la population [53] [54]. Néanmoins, une telle modélisation se limite à l'étude de formes spécifiques sur des patterns adhésifs planes.

D'après la littérature, une cellule n'adhère pas directement au substrat, mais plutôt à la MEC présente sur celui-ci [55]. Cette MEC est composée entre autres de molécules d'adhésion (intégrine, fibronectine…) déposées à la surface selon la topographie de celle-ci. Ainsi, l'influence de la géométrie du substrat joue un rôle important dans le comportement cellulaire. Cette influence a été évaluée numériquement dans différentes études. Scianna et al [56] ont analysé l'influence de l'orientation de la MEC sur la morphologie ainsi que sur la migration cellulaire. Pour cela, ils se sont basés sur un modèle CP avec la MEC modélisés via un réseau fibré de collagène. En plus de discrétiser la cellule en différentes entités (i.e. noyau et cytoplasme), les filaments de collagène sont modélisés par des bandes fines auxquelles une énergie d'adhésion est associée (figure 4.4). Ce modèle a permis de mettre en lumière la forte corrélation entre la direction de migration d'une cellule et la distribution topographique des filaments du réseau, ainsi que sa densité et sa rigidité. Cette étude inclut aussi une analyse de migration collective lors du phénomène de cicatrisation. Cette analyse montre le rôle important joué par l'orientation et la densité du réseau de collagène sur la vitesse de cicatrisation. On peut citer aussi le travail de Bauer et al [57] qui étudie l'influence de la topographie de la MEC sur les interactions intercellulaires dans le cadre de l'angiogenèse. Grâce à ce modèle, les auteurs ont été capables de prédire quelle topographie de MEC avait pour effet d'inhiber la croissance des filaments et quelle densité de fibres permettait de maximiser la croissance cellulaire. En supposant que l'orientation de la MEC est guidée par l'orientation de la surface [58], cette méthode présente un intérêt pour analyser l'influence de l'orientation de la surface.

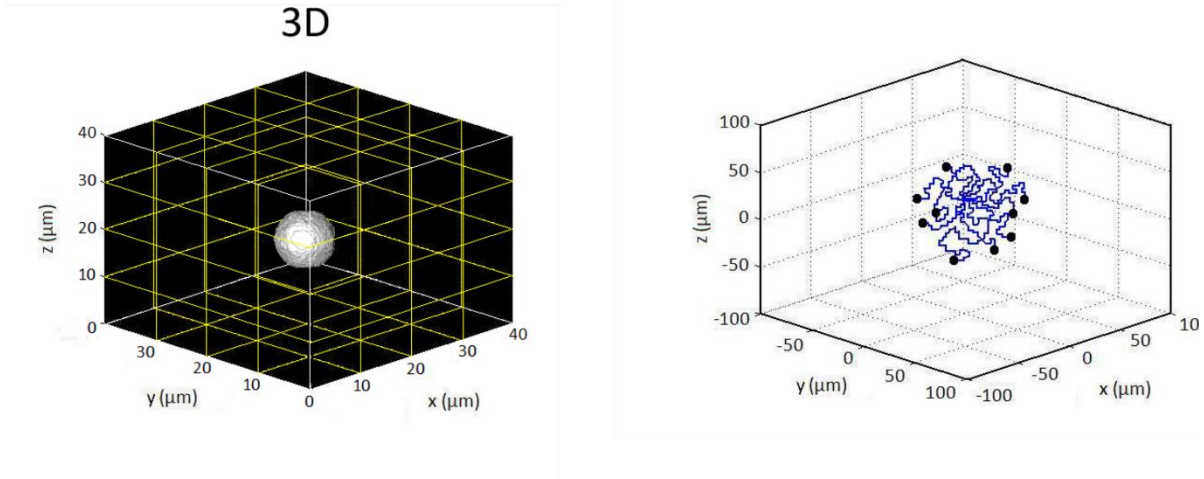


Figure 4.4 : Migration cellulaire (en 3D) au sein d'un réseau de fibres de collagène [56].

A notre connaissance, il n'existe pas aujourd'hui de modèles numériques traitant de l'influence de la topographie 3D sur la migration et la prolifération cellulaire. Nous proposons donc de développer un modèle numérique basé sur la méthode CP afin d'évaluer l'influence de la rugosité sur la migration et la prolifération. Au sein de ce chapitre, la migration unicellulaire est analysée sur différentes topographies de substrat.

4.2. Implémentation du modèle CP sur des surfaces numériques

4.2.1. Description du modèle CP

4.2.1.1. La méthode CP

Le modèle CP utilisé ici repose sur le travail de Allena et al [35] sur la migration cellulaire en présence de durotaxis (i.e. migration cellulaire en présence de durotaxis). Le domaine de simulation $\Omega \in \mathbb{R}^3$ est un réseau maillé (i.e. lattice) en 3D constitué de *m* sites identiques. Chaque site est défini par un centroïde $x_i \in \mathbb{R}^3$ et par un label prenant la forme d'une valeur entière $\sigma(x_i) \in N$. Chaque site voisin à x_i est identifié par x_i'. Chaque sous-groupe, défini par un unique label σ, forme une entité discrète associée à un type τ : τ = M pour le milieu, τ = S pour la surface, τ = C pour les cellules. La dynamique cellulaire est réglée par une méthode itérative et stochastique de minimisation de l'énergie totale du système, via une fonction Hamiltonienne *H*. L'algorithme employé est une modification de la méthode de Metropolis pour une dynamique de Monte Carlo-Boltzmann. A chaque pas de Monte Carlo (MCS), le modèle réalise un calcul énergétique de la tentative de copie aléatoire d'un index x_i (aussi appelé x_{source}) vers son voisin x_i' (aussi appelé x_{cible}). Cette tentative génère une différence énergétique $\Delta H|_{\sigma(x_{source})\to\sigma(x_{cible})}$ au niveau du site x_{source} entre l'état avant copie ($H_{avant\ copie}$) et l'état après copie ($H_{après\ copie}$) :

$$\Delta H|_{\sigma(x_{source})\to\sigma(x_{cible})} = H_{après\ copie} - H_{avant\ copie} \tag{4.2}$$

Cette tentative est acceptée selon une probabilité donnée par la fonction acceptation de Boltzmann :

$$P|_{\sigma(x_{source})\rightarrow\sigma(x_{cible})} = min\{1, P_B\} = min\left\{1, e^{-\frac{\Delta H}{T}}\right\} \quad (4.3)$$

avec T la température de Boltzmann interprétée comme la fluctuation intrinsèque du système. H représente l'énergie libre du système, et se définit comme la somme d'autres fonctions hamiltoniens, chacune d'entre elles décrivant un mécanisme cellulaire. Dans le cadre de notre étude on considère : l'énergie d'adhésion $H_{adhésion}$ entre la cellule et son environnement (i.e. surface, médium ou cellule), l'énergie de cohésion $H_{cohésion}$ interne à la cellule et l'énergie $H_{motilité}$ liée à la motilité cellulaire. H peut donc être exprimé comme :

$$H = H_{adhésion} + H_{cohésion} + H_{motilité} \quad (4.4)$$

4.2.1.2. Hamiltonien d'adhésion

Les interactions entre la cellule et son environnement sont définies par un terme énergétique d'adhésion :

$$H_{adhésion} = \sum_{x}\sum_{x'} J_{\sigma,\sigma'}\left(1 - \delta_{x,x'}\right) \quad (4.5)$$

où $\delta_{x,x'}$ est la fonction de Kronecker et $J_{\sigma,\sigma'}$ peut être de trois formes différentes :

- J_{CC} représente l'adhésion entre les cellules ;
- J_{CM} représente l'adhésion entre la cellule et le médium ;
- J_{CS} représente l'adhésion entre la cellule et la surface.

4.2.1.2. Hamiltonien de cohésion

La variation de la cohésion interne de la cellule est décrite via le terme $\Delta H_{cohésion}$:

$$H_{cohésion} = \sum_{\sigma} \lambda_S\left(S_\sigma - S_{\sigma,0}\right)^2 + \lambda_V\left(V_\sigma - V_{\sigma,0}\right)^2 \quad (4.6)$$

avec λ_S la rigidité de la cellule, S_σ et $S_{\sigma,0}$ la surface actuelle et la surface cible de la cellule respectivement, λ_V le terme de compressibilité mécanique et V_σ et $V_{\sigma,0}$ le volume actuel et cible de la cellule respectivement.

4.2.1.2. Hamiltonien de motilité

Les deux hamiltoniens définis précédemment ne décrivent pas la dynamique cellulaire mais ils permettent de prendre en compte ses interactions avec l'environnement et sa réorganisation interne. Un troisième terme $\Delta H_{motilité}$ est donc introduit :

$$H_{motilité} = \sum_{\sigma} -\lambda_M.\left(\frac{\vec{p} + \overrightarrow{v_\sigma}}{\|\vec{p} + \overrightarrow{v_\sigma}\|}\right).\overrightarrow{\delta_{r_\sigma}} \quad (4.7)$$

avec λ_M le coefficient de motilité, v_σ le vecteur vitesse de la cellule σ, $\vec{p}$ le vecteur polarisation et $\overrightarrow{\delta_{r_\sigma}}$ le déplacement du centre de masse (CM) de la cellule σ créé par la tentative de copie. La cellule conserve un mouvement fixe dans la direction $\vec{p}$ et, en jouant sur λ_M, la probabilité d'acceptation est modifiée, ce qui peut avoir un impact sur la vitesse moyenne.

4.2.2. Configuration du modèle

4.2.2.1. Paramètres du modèle

Le lattice est un parallélépipède de dimensions 400 µm x 240 µm x 80 µm avec des conditions aux limites fixes (i.e. les frontières délimitant l'environnement sont considérées comme des murs infranchissables). Chaque site est défini par un voxel cubique de dimension 1 µm x 1 µm x 1 µm et la cellule est définie par un hémisphère de rayon 20 µm. Le volume initial de la cellule ainsi que sa surface initiale ont été définis égaux à 8000 µm^3 et 5000 µm² respectivement afin de respecter l'échelle de 1 µm^3 par voxel. La température T est fixée à 15 x 10^{-27} kg/m²s², J_{CM} et J_{CS} sont égaux à 15 x 10^{-15} kg/s² et 1 x 10^{-15} kg/s² respectivement. La valeur de J_{CM} a été choisie afin de garantir une surface de contact maximale entre la cellule et la surface. λ_S et λ_V sont fixés à 15 x 10^{-3} kg/s²m² et 50 x 10^{-9} kg/s²m^3 respectivement et λ_M est fixé à 10 x 10^{-18} kg/s²m^3. Un MCS est égal à 10 s et le temps de simulation est de 8500 MCS, soit environ 24h. Pour chaque simulation, la cellule est en position de repos sur la surface pendant 150 MCS. Après cette période, la cellule commence à migrer sur la surface dans la direction $\vec{p}$ comme décrit via le terme $\Delta H_{motilité}$. Toutes les simulations ont été répétées 15 fois afin d'obtenir des données consistantes et reproduisibles. Tous les paramètres du modèle et leurs valeurs sont reportés dans le Tableau 4.1.

Description	Symbole	Valeur	Unité
Pas	t	8500	MCS
Température	T	15 x 10^{-27}	kg m²/s²
Domaine lattice	Ω	400 x 240 x 80	µm
Volume cible	$V_{\sigma,0}$	8 x 10^3	µm^3
Surface cible	$S_{\sigma,0}$	5 x 10^3	µm^2
Lambda volume	λ_V	50 x 10^{-9}	kg/s²m^3
Lambda surface	λ_S	15 x 10^{-3}	kg/s²m²
Lambda motilité	λ_M	10×10^{-18}	kg/s²m^3
Adhésion cellule/médium	J_{CM}	15 x 10^{-15}	kg/s²
Adhésion cellule/surface	J_{CS}	1 x 10^{-15}	kg/s²
Vecteur polarisation	$\vec{p}$	$\begin{bmatrix}1\\0\\0\end{bmatrix}$	-

Table 4.1 : Paramètres du modèle CP

4.2.2.2. Paramètres d'évaluation

Afin d'évaluer le comportement cellulaire au cours de la migration, plusieurs quantités ont été analysées : la vitesse de migration du CM de la cellule, la surface de contact entre la cellule et la surface et l'élongation de la cellule. La vitesse de migration est définie comme étant le rapport entre la distance parcourue par la cellule pendant la simulation et le temps de simulation. Le modèle a été calibré afin

d'obtenir une vitesse de migration de 0.18 µm/s (autour de 9 µm/h) sur une surface plane sans topographie, en accord avec les données expérimentales de la littérature [59], [60], justifiant ainsi le ratio de 1 MCS pour 10 s. Concernant le calcul de la surface de contact, ce paramètre est obtenu en calculant du nombre de voxels de la cellule en contact avec la surface. La surface de contact est enregistrée tous les 10 MCS et sa valeur finale est obtenue correspond à la moyenne de l'ensemble des surfaces de contact. Afin d'analyser la morphologie de la cellule, la cellule est approximée par un ellipsoïde. Les 3 axes principaux (a, b et c avec c le petit axe) sont alors calculés tous les 10 MCS et moyennés à la fin de la simulation. A partir de ces valeurs, un paramètre d'élongation $\frac{a}{c}$ est alors calculé.

4.2.2.3. Surfaces analysées

Nous détaillons ici les différentes surfaces qui ont été testées. Tout d'abord une surface de contrôle (CTRL) a été définie. Cette surface est plane et l'altitude $Z(x, y)$ de chaque point (x, y) de la surface est défini comme :

$$Z(x, y) = Z_0 \tag{4.8}$$

avec Z_0 l'altitude de référence.

En plus de la surface contrôle, quatre différentes surfaces ont été utilisées.

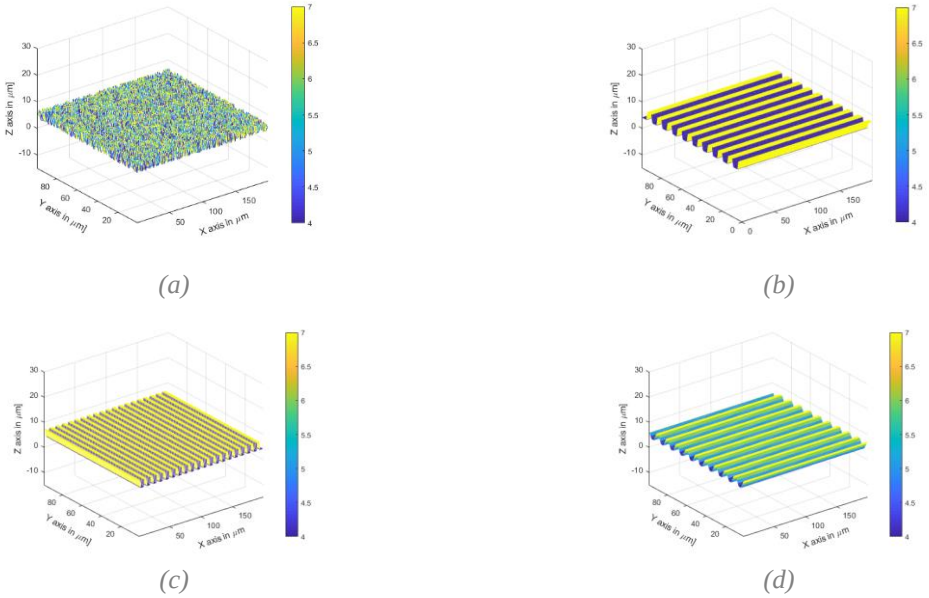


Figure 4.5 : (a) Surface avec une topographie aléatoire. (b) Surface avec rainures parallèles à la direction de migration. (c) Surface avec rainures perpendiculaires à la direction de migration. (d) Surface avec sinusoïdes parallèles à la direction de migration (la légende en couleur indique l'altitude $Z(x, y)$ de chaque point (x, y) de la surface).

1. La première surface présente une topographie aléatoire (figure 4.5a). L'altitude $Z(x, y)$ de chaque point (x, y) de la surface varie aléatoirement entre 0 et $R \in \mathbb{R}$. $Z(x, y)$ et elle donc définie par :

$$Z(x, y) = Z_0 + randi(R) - R \tag{4.9}$$

avec *randi(R)* la fonction générant un nombre entier aléatoire entre 0 et R.

2. La deuxième et troisième surfaces (figure 4.5b et 4.5c) présentent une topographie régulière obtenue via de rainures rectangulaires de largeur w et de profondeur d, orientées parallèlement (figure 4.5b et équation (4.10)) ou perpendiculairement (figure 4.5c et équation (4.11)) à la direction de migration $\vec{p}$. L'altitude $Z(x,y)$ est donc définie par :

$$Z(x,y) = \begin{cases} Z_0 & if\ mod(y,w) \leq \frac{w}{2} \\ Z_0 - d & else \end{cases} \tag{4.10}$$

$$Z(x,y) = \begin{cases} Z_0 & if\ mod(x,w) \leq \frac{w}{2} \\ Z_0 - d & else \end{cases} \tag{4.11}$$

où mod(*) représente l'opérateur module.

3. Enfin, la quatrième surface (figure 4.5d) présente une topographie obtenue via des sinusoïdes d'amplitude A et de longueur d'onde λ, orientées parallèlement à la direction de migration $\vec{p}$. L'altitude $Z(x,y)$ est définie comme :

$$Z(x,y) = Z_0 + \frac{A}{2}\ .cos\left(\frac{2.\pi.y}{\lambda}\right) \tag{4.12}$$

Les surfaces rainurées rectilignement et sinusoïdalement sont utilisées dans la littérature afin d'étudier la migration cellulaire et serviront donc de comparaison. Afin de faciliter la compréhension, certains paramètres précédemment introduits ont été normalisés par rapport au diamètre D de la cellule. Nous obtenons donc : $R^* = \frac{R}{D}$, $w^* = \frac{w}{D}$, $d^* = \frac{d}{D}$, $\lambda^* = \frac{\lambda}{D}$, et $A^* = \frac{A}{D}$. Tous les paramètres définissant les surfaces analysées sont reportés dans le tableau 4.2.

Description	Symbole	Valeur	Unité
Altitude de référence	Z_0	20	µm
Diamètre cellule	D	20	µm
Amplitude maximale de la topographie aléatoire	R	[0 – 10]	µm
Largeur de rainure	w	5, 10, 20	µm
Profondeur de rainure	d	1, 3, 5	µm
Longueur d'onde de sinusoïde	λ	5, 10, 20	µm
Amplitude de sinusoïde	A	2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20	µm
Amplitude maximale de la topographie aléatoire normalisée	R^*	[0 – 0.5]	-
Largeur de rainure normalisée	w^*	0.25, 0.5, 1	-
Profondeur de rainure normalisée	d^*	0.05, 0.15, 0.25	-
Longueur d'onde de sinusoïde normalisée	λ^*	0.25, 0.5, 1	-
Amplitude de sinusoïde normalisée	A^*	0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75, 1	-

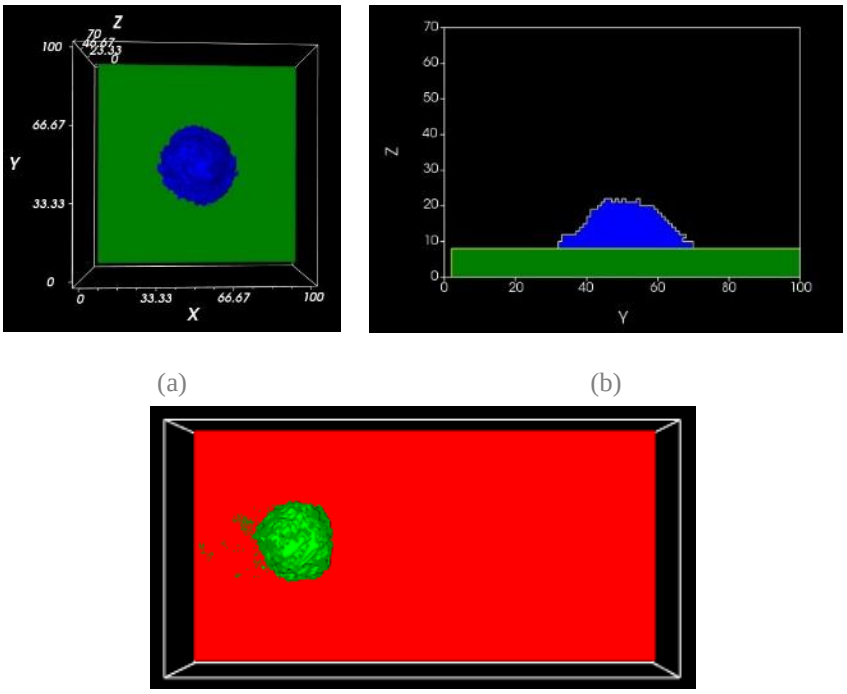
Tableau 4.2 Paramètres définissant les surfaces étudiées.

4.2.3. Résultats

4.2.3.1. Surface de contrôle

Pour la surface de contrôle, nous avons étudié deux configurations : i) la cellule est laissée seule sans motilité sur la surface ; et ii) la cellule est motile selon une direction fixe.

Dans la première configuration (figure 4.6a, b), la cellule adhère à la surface et adopte une forme hémisphérique avec une surface de contact circulaire, ce qui a été aussi observé expérimentalement [6], [61]. Cette morphologie est le résultat de la minimisation de l'énergie et de l'équilibre entre la dynamique interne de la cellule et ses interactions avec l'environnement.

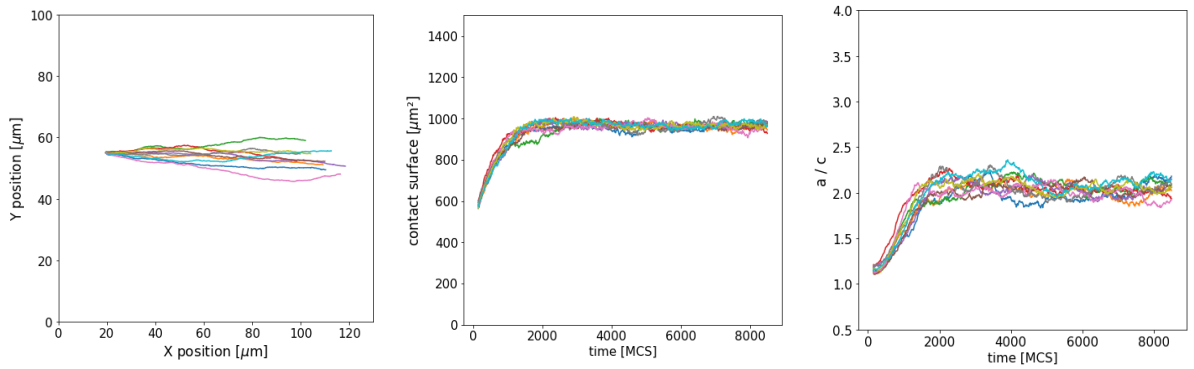


(a) (b)

(c)

Figure 4.6 : Morphologie de la cellule au repos sur la surface contrôle dans le plan (X-Y) (a), (Y-Z) (b) et en mouvement dans le plan (X-Y) à t=2000 MCS (c).

Dans la deuxième configuration, la cellule conserve la forme hémisphérique durant son mouvement (figure 4.6c). Les résultats montrent une trajectoire rectiligne (figure 4.7a) avec une vitesse de migration moyenne de 8.9 µm/h (± 0.33). L'évolution de la surface de contact entre la cellule et la surface présente une phase transitoire jusqu'à la valeur de 940 µm² (± 10) à 2000 MCS où celle-ci se stabilise (figure 4.7b). La même évolution est observée pour l'élongation de la cellule (i.e. le paramètre $\frac{a}{c}$) avec une stabilisation autour de 2 (figure 4.7c). Cette phase de transition est due au temps d'adaptation nécessaire à la cellule afin d'acquérir une morphologique énergétiquement stable.



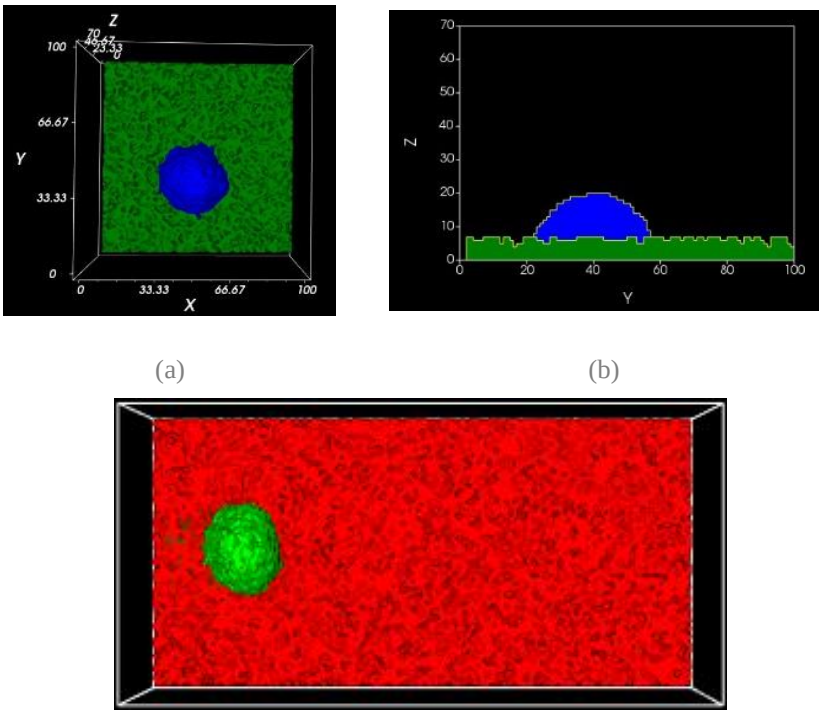
(a) *(b)* *(c)*

Figure 4.7 : Simulations de migration cellulaire sur la surface contrôle. Chaque figure montre les résultats de 10 simulations. (a) Trajectoire de la cellule dans le plan (X-Y). (b) Evolution de la surface de contact entre la cellule et la surface. (c) Évolution de l'élongation (i.e. paramètre $\frac{a}{c}$) de la cellule.

4.2.3.2. Surface aléatoirement rugueuse et influence de J_{CS}

Afin d'analyser la migration d'une cellule sur une surface aléatoirement rugueuse, une surface a été définie suivant l'équation (9) avec une valeur de R^*=0.25. Similairement au cas de la surface contrôle, nous avons aussi considéré les deux configurations de repos et motilité.

Les figures 4.8a et 4.8b montrent la morphologie adoptée par la cellule au repos sur la surface. Aucune différence significative n'est observée en termes de forme par rapport au cas de la surface contrôle. En effet, la cellule conserve une forme hémisphérique. Cependant, celle-ci montre une forme plus compacte lors de sa migration (figure 4.8c).

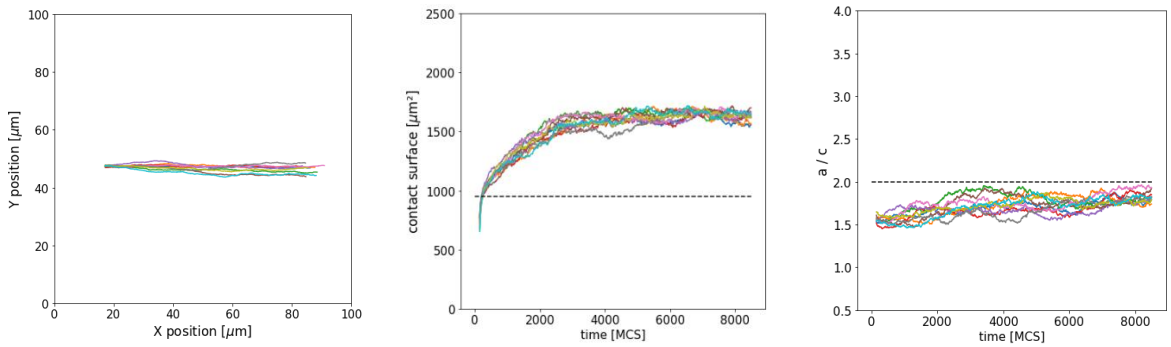


(a) (b)

(c)

Figure 4.8 : Morphologie de la cellule au repos sur une surface avec une topographie aléatoire (R=0.25) dans le plan (X-Y) (a) et (Y-Z) (b) et en mouvement dans le plan (X-Y) à t=2000 MCS (c).*

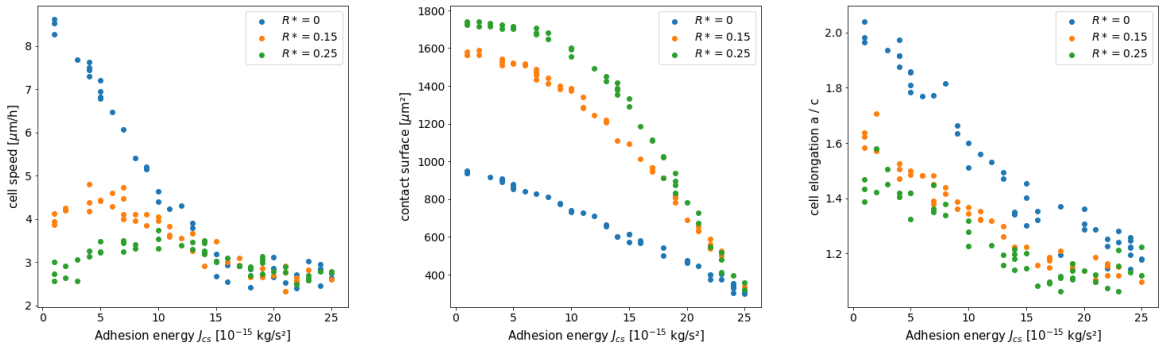
Les trajectoires de la cellule sont toujours rectilignes (figure 4.9a). Cependant, la distance parcourue est beaucoup plus faible, avec une vitesse de migration de 2.8 µm/h (± 0.2) (comparée au 8.9 µm/h sur la surface de contrôle). Au contraire, la surface de contact est significativement plus importante avec une valeur de 1620 µm² (figure 4.9b) (comparée au 940 µm² sur la surface de contrôle) et une élongation $\frac{a}{c}$ moins importante autour de 1.6 (figure 4.9c) (comparée au 2 sur la surface de contrôle) . Comme pour la surface de contrôle, on observe une phase transitoire dans l'évolution de la surface de contact et de l'élongation. Cependant, cette phase transitoire est plus longue que dans le cas de la surface lisse. On peut donc conclure que sur une surface rugueuse la migration cellulaire est inhibée et une énergie plus importante est requise.



(a) *(b)* *(c)*

Figure 4.9 : Simulations de la migration cellulaire sur une surface présentant une topographie aléatoire (R=0.25). Chaque figure montre les résultats de 10 simulations. (a) Trajectoire de la cellule dans le plan (X-Y). (b) Evolution de la surface de contact entre la cellule et la surface. (c) Évolution de l'élongation $\frac{a}{c}$ de la cellule.*

Les résultats montrent donc une interaction entre la cellule et la surface différente de la surface de contrôle. La topographie module donc le comportement migratoire de la cellule. De plus, un autre paramètre interne au modèle CP permet d'influencer l'interaction entre la cellule et la surface : le paramètre d'énergie d'adhésion entre la cellule et la surface J_{CS}. En effet, plus l'adhésion est forte (i.e. faible énergie d'adhésion), plus facilement la cellule se déplace sur la surface. Nous analysons ici l'influence de J_{CS} et R^* sur le comportement cellulaire. Pour ce faire, différentes simulations ont été lancées avec différentes valeurs de J_{CS} (variations aléatoires entre 1.10^{-15} à 25.10^{-15} kg/s²) et trois différentes valeurs de R^* (0, 0.15, and 0.25).



(a) *(b)* *(c)*

Figure 4.10 : Migration cellulaire selon différentes valeurs de J_{CS} et R. (a) Évolution de la vitesse de migration. (b) Évolution de la surface de contact. (c) Évolution de l'élongation $\frac{a}{c}$.*

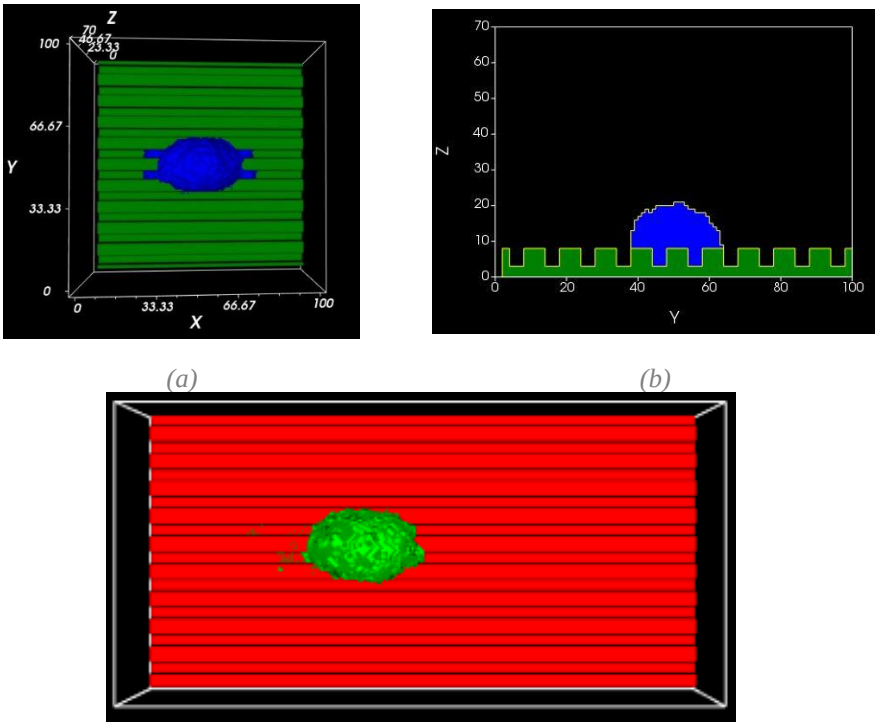
Les résultats de ces évolutions sont présentés dans la figure 4.10. Les premiers résultats montrent que pour $J_{CS} = 1.10^{-15}$ kg/s² (donc pour un maximum d'adhésion à la surface sur la plage de valeur prise), on observe une diminution de la vitesse de migration avec l'augmentation de R^*, prenant les valeurs moyennes de 8.9 µm/h, 4 µm/h et 2.8 µm/h pour les valeurs de R^* respectives de 0, 0.15 et 0.25 (figure 4.10a). Cela s'accompagne d'une diminution de l'élongation de la valeur moyenne de 2 à la valeur moyenne de 1.4 pour une augmentation de R^* de 0 à 0.25, et d'une augmentation de la surface de contact avec R^* pour atteindre une valeur moyenne de 1750 µm² à R^*=0.25 (figures 4.10b et 4.10c). Cela appuie les précédents résultats ainsi que l'aspect inhibant de la topographie aléatoire au sein de la migration.

La paramètre J_{CS} montre aussi une influence significative sur la migration pour les différentes surfaces. Sur la surface de contrôle ($R^*=0$, points bleus), la vitesse de migration décroit avec l'augmentation de J_{CS}, allant de 8.9 µm/h à 2.8 µm/h pour $J_{CS}=15.10^{-15}$kg/s², où la vitesse se stabilise (figure 4.10a). De la même manière, on observe une diminution de la surface de contact (figure 4.10b) et de l'élongation (figure 4.10c) avec l'augmentation de J_{CS}. Ceci montre que la diminution de la force d'adhésion entraine un décollement de la cellule de la surface, entrainant ainsi la reprise d'une forme sphérique de la cellule et une diminution de sa motilité. En présence de topographie aléatoire avec un R^*=0.15 (points orange) et 0.25 (points verts), on observe une diminution de la surface de contact ainsi que de l'élongation avec l'augmentation de J_{CS}. Cependant, une évolution différente est observée pour la vitesse. En effet, la vitesse d'abord augmente jusqu'à $J_{CS} = 15.10^{-15}$kg/s² et atteint les valeurs maximales de 4.5 µm/h pour $R^* = 0.15$ et de 3.3 µm/h pour $R^* = 0.25$. Ensuite, la vitesse diminue jusqu'à une valeur finale de 2.5 µm/h dans les 2 cas. Cette augmentation initiale de la vitesse sur les surfaces aléatoirement rugueuses est le résultat d'une diminution initiale de l'énergie dépensée à la surface avec la diminution de l'adhésion, la cellule étant moins en contact par la topographie de la surface. Cependant, la migration au sein du médium étant moins efficace que sur la surface (pour les valeurs de R^* choisies), une ré-augmentation de cette énergie est observée avec la diminution de la surface de contact avec la surface, résultant en une diminution de la vitesse de migration.

4.2.3.3. Surface à rainures parallèles

Pour la surface à rainures parallèles à la direction $\vec{p}$ de migration, les rainures sont définies par une largeur normalisée w^* =0.5 et une profondeur normalisée d^*=0.25.

Les figures 4.11a et 4.11b présentent la morphologie adoptée par la cellule au repos. La cellule acquiert la forme des rainures en s'allongeant dans leur direction (figure 4.11a).

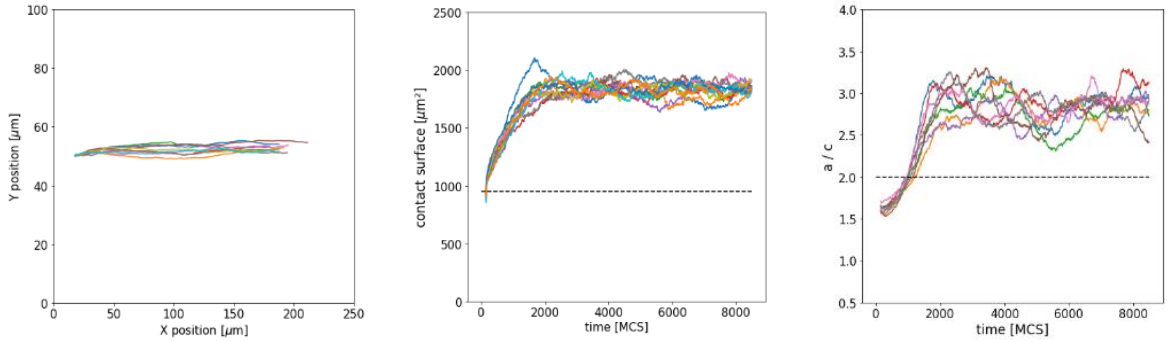


(a) *(b)*

(c)

Figure 4.11 : Morphologie de la cellule au repos sur une surface avec des rainures parallèles (w=0.5 et d*=0.25) à la direction de migration p dans le plan (X-Y) (a) et (Y-Z) (b) et en mouvement dans le plan (X-Y) à t=2000 MCS (c).*

Lorsque la cellule commence à migrer, elle garde cette forme allongée en migrant le long des rainures (figure 4.11c). Même si les trajectoires observées restent rectilignes comme pour les surfaces lisse et aléatoirement rugueuse (figure 4.12a), celles-ci semblent subir moins de variation dans la direction Y. De plus, on obtient une vitesse de migration plus élevée atteignant une valeur moyenne de 15.7 µm/h (± 0.5), soit presque le double que celle obtenue dans le cas de la surface de contrôle. Comme pour la surface de contrôle, les évolutions de la surface de contact ainsi que de l'élongation $\frac{a}{c}$ affichent une période transitoire allant jusqu'à 2000 MCS et se stabilisant ensuite à 1800 µm² (figure 4.12b) et 2.6 (figure 4.12c) respectivement. Cette augmentation de l'élongation de la cellule par rapport à la surface de contrôle valide l'alignement de la cellule dans la direction des X observé sur la surface.

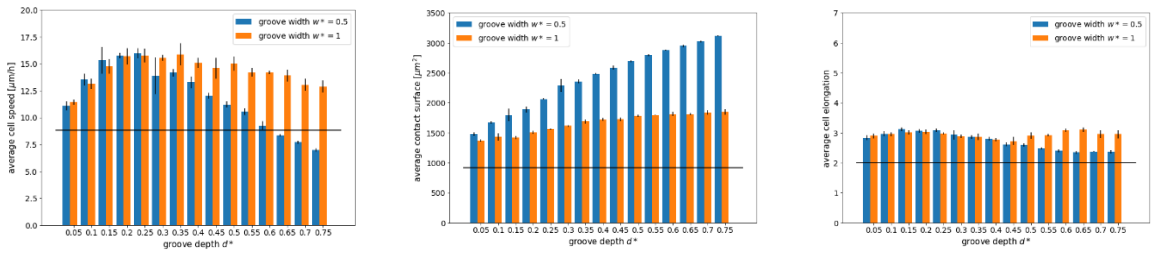


(a) *(b)* *(c)*

Figure 4.12 : Simulations de la migration cellulaire sur une surface avec rainures parallèles à la direction de migration (w=0.5 et d*=0.25). Chaque figure montre les résultats de 10 simulations. La ligne en pointillée représente la valeur moyenne du paramètre étudié pour la surface de contrôle. (a) Trajectoire de la cellule dans le plan (X-Y). (b) Evolution de la surface de contact. (c) Évolution de l'élongation* $\frac{a}{c}$.

Plusieurs simulations ont été menées pour différentes valeurs de *d** et deux valeurs distinctes de *w**. Les résultats sont présentés dans la figure 4.13, avec la ligne noire représentant la valeur du paramètre étudié pour la surface de contrôle.

Pour *w**=0.5, on observe une augmentation de la vitesse de 11.1 µm/h (± 0.4) à 16 µm/h (± 0.5) (figure 4.13a). Après avoir atteint cette valeur maximale, la vitesse de migration diminue jusqu'à 6.9 µm/h (± 0.16) à *d**=0.75. Pour *w**=1, le même comportement est observé, avec une vitesse maximale à 15.7 µm/h (± 0.6) à *d**=0.25 et une diminution jusqu'à 12.9 µm/h (± 0.56) à *d**=0.75. En termes de surface de contact (figure 4.13b), une augmentation de celle-ci est observée pour les deux valeurs de *w**, correspondant à une augmentation de l'aire de la surface, de 1482 µm² (± 27) pour *d**=0.05 à 3115 µm² (± 11) pour *d**=0.75 dans le cas de *w**=0.5, et de 1371 µm² (± 19) pour *d**=0.05 à 1846 µm² (± 45) pour *d**=0.75 dans le cas de *w**=1. En termes d'élongation (figure 4.13c), les valeurs observées sont significativement plus importantes que celles obtenues dans le cas de la surface de contrôle. Pour *w**=0.5, une faible diminution initiale est observée de 2.83 (± 0.08) pour *d**=0.05 à 3.12 (± 0.07) pour *d**=0.15, suivi ensuite par une diminution jusqu'à 2.4 (± 0.05) pour *d**=0.6. Dans le cas de *w**=1, l'élongation diminue légèrement jusqu'à 3.03 (± 0.07) pour *d**=0.15. Une faible augmentation est aussi mesurée à partir de *d**=0.5 jusqu'à 3.11 (± 0.08) pour *d**=0.65. L'ensemble de ces résultats montrent que l'augmentation de la profondeur *d** ainsi que de la largeur *w** des rainures affecte le comportement cellulaire, en l'améliorant ou en l'inhibant.



(a) *(b)* *(c)*

Figure 4.13 : (a) Évolution de la vitesse de migration. (b) Évolution de la surface de contact. (c) Évolution de l'élongation $\frac{a}{c}$. *La ligne noire représente la valeur du paramètre étudié pour la surface de contrôle.*

4.2.3.4. Surface à rainures perpendiculaires

Pour la surface à rainures perpendiculaires à la direction $\vec{p}$ de migration, les rainures sont définies par une largeur normalisée w^* =0.5 et une profondeur normalisée d^*=0.15.

La cellule au repos s'aligne avec les rainures (figure 4.14a et 4.14b). Lorsque la migration démarre, le comportement cellulaire observé est différent de celui observé pour la surface de contrôle et la surface avec rainures parallèles à la direction de migration (figure 4.14c).

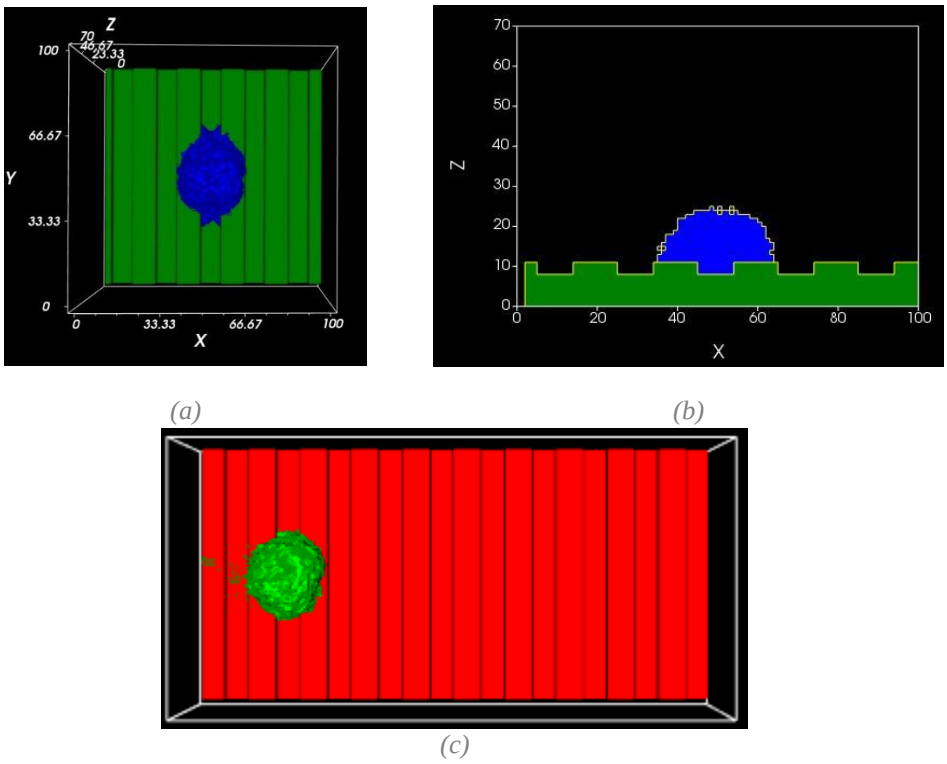
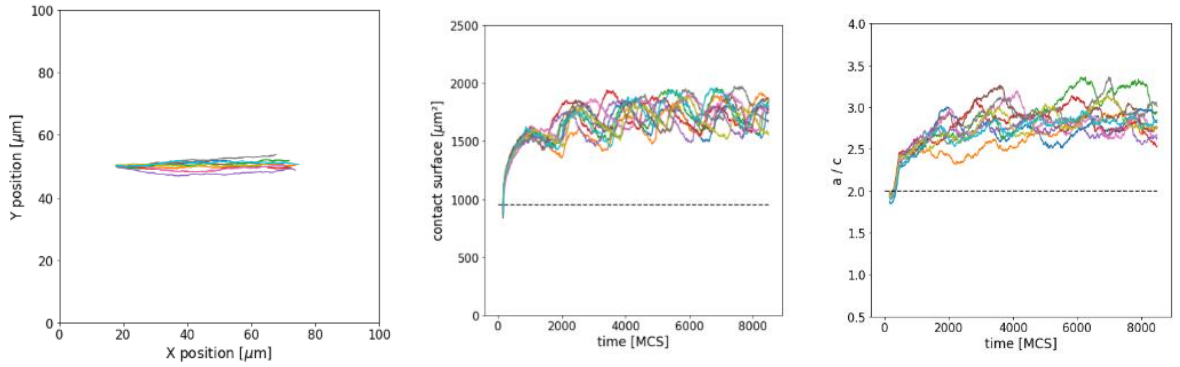


Figure 4.14 : Morphologie de la cellule au repos sur une surface avec des rainures perpendiculaires (w=1 et d*=0.15) à la direction de migration dans le plan (X-Y) (a) et (X-Z) (b) et en mouvement dans le plan (X-Y) à t=2000 MCS (c).*

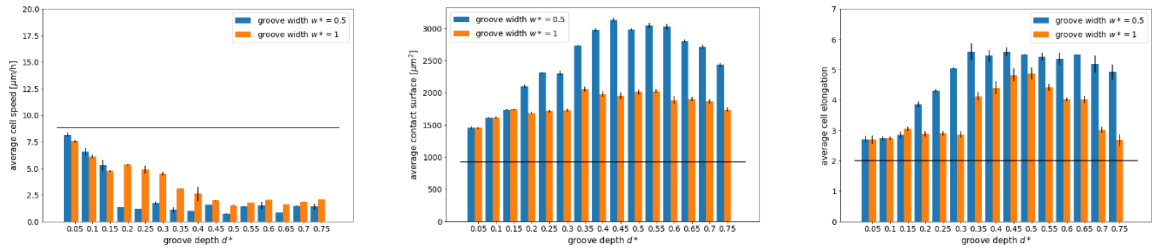
En termes de trajectoire (figure 4.15a), la cellule conserve une trajectoire rectiligne sur la surface. Cependant, le mouvement est discontinu à cause du passage de la cellule d'une rainure à une autre. Ce même comportement est observable pour l'évolution de la surface de contact (figure 4.15b) qui présente un profil sinusoïdal autour de la valeur de 1600 µm². Le même profil est obtenu pour l'élongation a/c (figure 4.15c) autour de la valeur de 2.6.



(a) *(b)* *(c)*

Figure 4.15 : Simulations de la migration cellulaire sur une surface avec rainures perpendiculaires à la direction de migration p (w=1 et d*=0.15). Chaque figure montre les résultats de 10 simulations. La ligne en pointillée représente la valeur du paramètre étudié sur la surface de contrôle (R*=0). (a) Trajectoire de la cellule dans le plan (X-Y). (b) Évolution de la surface de contact. (c) Évolution de l'élongation* $\frac{a}{c}$.

Plusieurs simulations ont été menées pour différentes valeurs de *d** (de 0.05 à 0.75) et deux valeurs de *w** (0.5 et 1) (figure 4.16). L'évolution de la vitesse de migration sur la figure 4.16a montre une diminution de celle-ci avec l'augmentation de *d** pour les deux valeurs de *w**. Pour *w**=0.5, l'augmentation de *d** de 0.05 à 0.75 entraine une diminution de la vitesse de migration de 8.2 µm/h (± 0.7) à 2.3 µm/h (± 0.9). Au-delà de *d**=0.15, la cellule n'arrive pas à démarrer sa migration. Pour *w**=1, on observe diminution de la vitesse de 8.2 µm/h (± 0.4) à 1.9 µm/h (± 0.3). De la même manière, au-delà de *d**=0.4, la cellule ne démarre pas sa migration. Comparée à la migration cellulaire sur la surface de contrôle, la vitesse de migration observée ici est significativement plus faible. De plus, les vitesses observées pour *w**=1 sont généralement plus élevées que celles obtenues avec *w**=0.5. Cela confirme la difficulté de la cellule à se déplacer sur la surface dans la direction p perpendiculaire à l'orientation des rainures, car plus d'énergie est requise. En termes de morphologie (figure 4.16b), à faible *d** (≤ 0.1), la cellule arrive à migrer sur la surface en changeant constamment de forme lors de son passage d'une rainure à l'autre. Cependant, au-delà de *d**=0.15 pour *w**=0.5 et *d**=0.35 pour *w**=1, la cellule acquiert de manière permanente la forme de la rainure et arrête de migrer. Cette modification de morphologie a des effets sur la surface de contact qui augmente de 1400 µm² (± 99) pour *d**=0.05 à 3034 µm² (± 24) pour *d**=0.45 dans le cas de *w**=0.5. Une diminution est alors observée à partir de cette valeur jusqu'à *d**=0.75. Dans le cas de *w**=1, une augmentation de la surface de contact est aussi observée jusqu'à 2214 µm² (± 29) pour *d**=0.35, suivie par une légère diminution. L'arrêt de l'augmentation de la surface de contact coïncide avec l'arrêt de la migration de la cellule, au moment où celle-ci se retrouve emprisonnée au sein d'une rainure. Enfin, l'élongation de la cellule a/c suit le même comportement que la surface de contact (figure 4.16c). En effet, pour *w**=0.5, une augmentation est enregistrée jusqu'à *d**= 0.35 avec une valeur d'élongation de 5.6 (± 0.2), suivie par une faible diminution atteignant la valeur de 4.92 (± 0.24) pour *d**=0.75. De la même manière, pour *w**=1, l'élongation augmente jusqu'à atteindre un maximum de 4.84 (± 0.25) pour *d**=0.45, suivie par une diminution jusqu'à la valeur de 2.68 (± 0.56) pour *d**=0.75. Il est à noter qu'un phénomène de fragmentation cellulaire est observée- au-delà de *d**=0.5 pour *w*=0.5*, et au-delà de *d**=0.65 pour *w*=0.5*.



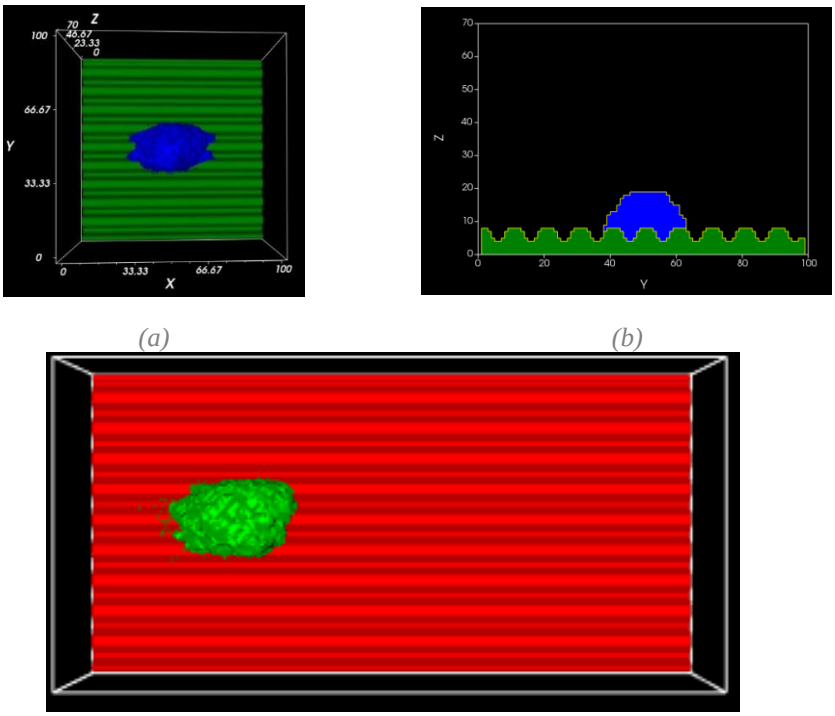
(a) (b) (c)

*Figure 4.16 : Migration cellulaire sur une surface rainurée orientée dans le sens des X selon différentes valeurs de w*et d*. (a) Évolution de la vitesse de migration. (b) Évolution de la surface de contact. (c) Évolution de l'élongation $\frac{a}{c}$. La ligne noire représente la valeur du paramètre étudié sur la surface de contrôle.*

4.2.3.5. Surface à rainures sinusoïdale

Nous analysons ici surface avec des rainures sinusoïdales parallèles à la direction de migration $\vec{p}$. Chaque rainure sinusoïdale est définie par une longueur d'onde normalisée λ*=0.5 et une amplitude normalisée A*=0.25 (suivant l'équation (12)).

La figure 4.17 présente la morphologie de la cellule au repos sur la surface sinusoïdale (figures 4.17a et 4.17b). La cellule s'aligne le long des rainures comme observé dans les configurations précédentes. Cet alignement est aussi observé lors de la mise en mouvement de la cellule (figure 4.17c).



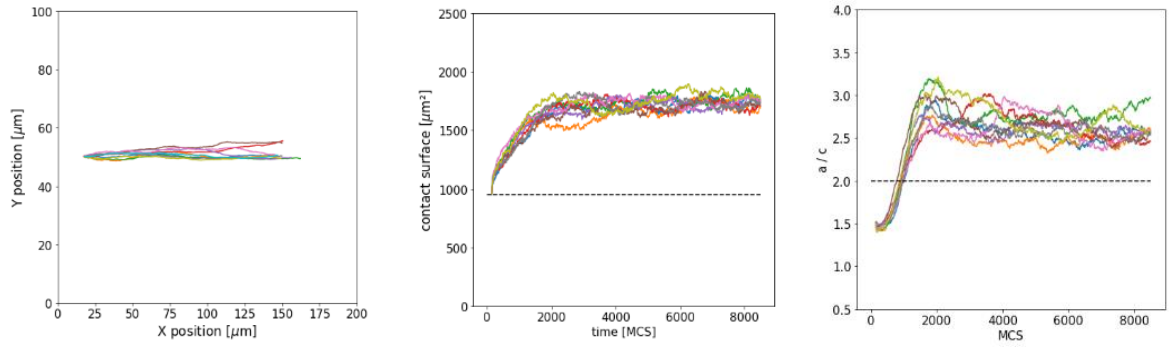
(a) (b)

(c)

Figure 4.17 : Morphologie de la cellule au repos sur une surface avec des rainures sinusoïdales parallèles à la direction de migration p (λ=0.5 et A*=0.25) dans le plan (X-Y) (a) et (Y-Z) (b) et en mouvement dans le plan (X-Y) à t=2000 MCS (c).*

Les résultats obtenus pour une cellule en mouvement sont similaires à ceux de la surface à rainures parallèles. L'ensemble des trajectoires suivent une trajectoire rectiligne, avec une vitesse de

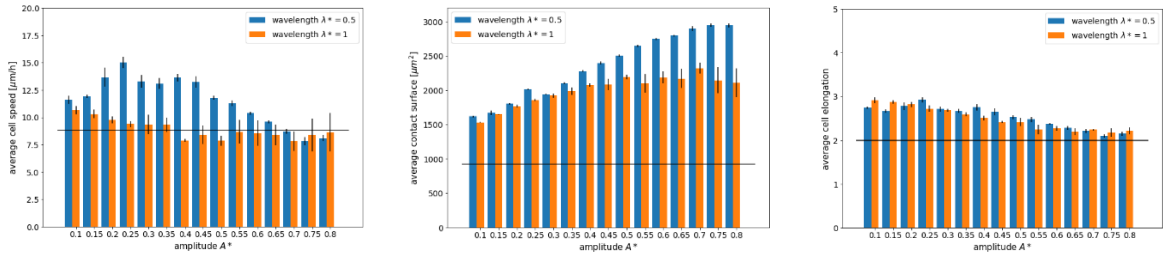
migration de 11.8 µm/h (± 0.5) (figure 4.18a), supérieure à celle obtenue dans le cas de la surface de contrôle. En termes de surface de contact (figure 4.18b), celle-ci affiche une période transitoire d'environ 2000 MCS jusqu'à atteindre la valeur de 1720 µm². De même, on observe aussi une période transitoire pour l'élongation $\frac{a}{c}$ de même durée jusqu'à la valeur moyenne de 2.4 (figure 4.18c), moins élevée que celle obtenue dans le cas de la surface à rainures parallèles à dimensions équivalentes (λ* =*w** et *A**=*d**).



(a) *(b)* *(c)*

Figure 4.18 : Simulations de la migration cellulaire sur une surface à rainures sinusoïdales parallèles à la direction de migration p (w=0.5 et d*=0.15). Chaque figure montre les résultats de 10 simulations. La ligne en pointillée représente la valeur du paramètre étudié sur la surface lisse (R*=0). (a) Trajectoire de la cellule dans le plan (X-Y). (b) Évolution de la surface de contact. (c) Évolution de l'élongation $\frac{a}{c}$.*

Afin de déterminer l'influence de l'amplitude et de la longueur d'onde des rainures sinusoïdales, plusieurs simulations ont été menées pour différentes valeurs de *A** (de 0.1 à 0.8) et deux valeurs de λ* (0.5 et 1). Les résultats des simulations sont présentés au sein de la figure 4.19.



(a) *(b)* *(c)*

*Figure 4.19 : Migration cellulaire sur une surface rainurée orientée dans le sens des Y selon différentes valeurs de w*et d*. (a) Évolution de la vitesse de migration. (b) Évolution de la surface de contact. (c) Évolution de l'élongation $\frac{a}{c}$. La ligne noire représente la valeur du paramètre étudié sur la surface de contrôle.*

Concernant la vitesse de migration (figure 4.19a), les résultats sont similaires à ceux obtenus pour la surface avec rainures parallèles à dimensions équivalentes (λ* =*w** et *A**=*d**). Dans le cas de λ*=0.5, une augmentation initiale de la vitesse de 11.6 µm/h (± 0.4) à 15 µm/h (± 0.5) est observée pour *A** allant de 0.1 à 0.25, respectivement. Après avoir atteint la valeur maximale, une diminution a lieu jusqu'à 8.1 µm/h (± 0.3) pour *d**=0.8. Si on compare avec les résultats de la surface de contrôle, la vitesse de migration observée est supérieure pour *A** allant de 0.1 à 0.7. Dans le cas de λ*=1, une diminution est observée pour *A** allant de 0.1 à 0.4, allant de 10.6 µm/h (± 0.4) à 7.9 µm/h (± 0.14). Aucune différence significative est observée pour *A** allant de 0.45 à 0.8. Contrairement à λ*=0.5, la

vitesse de migration est seulement supérieure à celle observée sur la surface de contrôle pour A^* allant de 0.1 à 0.35. En termes de morphologie cellulaire (figure 4.19c), on observe une élongation significative de la cellule dans la direction des rainures, avec une augmentation de l'enveloppe externe de la cellule. Une faible diminution est observée pour les deux valeurs de λ^*, allant de 2.92 (± 0.05) à 2.14 (± 0.05) pour A^*=0.8 dans le cas de λ^*=0.5 ; et allant de 2.75 (± 0.03) à 2.14 (± 0.05) dans le cas de λ^*=0.5. Si l'élongation ici est plus forte que celle observée sur la surface de contrôle due à l'orientation de la surface, celle-ci se révèle être moins élevé que sur les surfaces rainurées à dimensions équivalentes ($\lambda^*=w^*$ et $A^*=d^*$). En termes de surface de contact (figure 4.19b), une augmentation est observée pour les deux valeurs de λ^*, atteignant 2947 µm² (± 29) pour A^*=0.3 dans le cas de λ^*=0.5 et 2188 µm² (± 87) pour A^*=0.55 dans le cas de λ^*=1. Au-delà de ces valeurs, aucune différence significative n'a été trouvée pour les deux valeurs de λ^*.

4.2.4. Pertinence du modèle

Dans cette section nous avons proposé un modèle CP 3D phénoménologique afin d'analyser l'influence de la topographie de la surface sur la motilité cellulaire. En particulier, nous avons quantifié les effets de la topographie sur la vitesse de migration, la surface de contact et la morphologie cellulaire.

Dans le cas d'une topographie aléatoire, l'effet de la topographie, en plus d'augmenter la surface de contact, engendre une inhibition du mouvement, due aux obstacles créés par les élévations aléatoires de la surface, dépensant ainsi plus d'énergie. Ce résultat peut être comparé à l'étude de Han et al [62], où une diminution de la vitesse de migration est observée sur une surface rugueuse comparée à une surface lisse. Cependant, la rugosité dans cette étude se situe à l'échelle nanoscopique, contrairement à notre cas où elle se situe à l'échelle microscopique. Néanmoins, on peut supposer que de fortes variations d'élévations sur une longueur d'onde très faible (de l'ordre du pixel, donc du µm) semblent avoir pour conséquence d'inhiber la motilité cellulaire.

La distribution de la topographie sur la surface joue un rôle important. Dans le cas de la surface avec rainures parallèles à la direction de migration, l'influence des rainures augmente avec leur profondeur. Ainsi, pour une profondeur de rainure égale allant du quart à la moitié du diamètre de la cellule, la vitesse de migration observée, ainsi que l'élongation de la cellule sont plus grandes que ce qui est observé sur la surface lisse. Cependant, pour une profondeur dépassant $0.5*D$, la surface commence à afficher des propriétés inhibitrices en termes de motilité.

La largeur des rainures joue aussi un rôle significatif. Pour une largeur de rainure égale à la dimension de la cellule ($w \sim D$), on observe que l'effet favorable de la surface est moins fort par rapport à une largeur de rainure de l'ordre de la moitié de la dimension de la cellule ($w \sim 0.5.D$). Ceci rejoint les résultats d'études expérimentales, tel que l'étude de Cheng et al [60] sur la migration cellulaire au sein de surfaces structurées.

Concernant l'influence de l'orientation de la surface via l'orientation des rainures dans le cas parallèle et perpendiculaire à la direction de migration, une influence significative a été observée. Les surfaces orientées perpendiculairement présente un effet inhibant sur la migration, cet effet évolue sur w^* et d^*. En effet, l'augmentation de d^* ne fait qu'accentuer l'effet inhibant de la surface pour une orientation perpendiculaire. Au contraire, l'augmentation de w^* de 0.5 à 1 diminue l'influence de la surface pour cette orientation. Ces résultats sont en accord avec d'autres études de la littérature, telles que l'étude de Cheng et al [60] ou l'étude de Dalton et al [34].

L'analyse de la distribution de la topographie s'est faite aussi en analysant la migration cellulaire sur des rainures sinusoïdales. L'ensemble des résultats montre qu'à dimensions équivalentes, la surface sinusoïdale agit de la même manière que la surface rainurée, mais avec une influence plus faible. Ces résultats sont validés par l'étude expérimentale de Cheng et al [60] où l'on observe aussi une vitesse de

migration plus faible ainsi qu'une élongation, plus faible le long de surfaces sinusoïdales comparée aux surfaces rainurées. Cela peut s'expliquer par une surface de contact plus faible ainsi qu'une distribution de surfaces différentes, enlevant la discontinuité des rainures. On peut donc supposer que les cellules seront moins sensibles à l'orientation sur ce type de surface.

Enfin, l'influence de la topographie sur la motilité cellulaire est modulée par l'adhésion de la cellule à la surface via le paramètre J_{CS}. La plus faible valeur de J_{CS} (i.e J_{CS} =1.10^{-15}kg/s² définissant une adhésion maximale sur la plage de valeur prise) donne la meilleure vitesse de migration avec la plus grande surface de contact sur la surface de contrôle. Cependant, en présence de topographie aléatoire, l'augmentation initiale de la vitesse de migration (pour J_{CS} <15.10^{-15} kg/s²) avec la diminution de la surface de contact montre une diminution de l'influence de la surface sur la migration. Tout ceci met en avant le paramètre J_{CS} comme facteur important qui définit la sensibilité de la cellule à la surface en modulant la surface de contact entre la cellule et la surface. En plus d'être validé par des résultats expérimentaux montrant une plus grande surface de contact sur les surfaces présentant une plus grande adhésion [63]–[65], ceci montre une fois de plus que la cellule s'adapte à son environnement et aux contraintes géométriques selon le principe de minimisation de l'énergie.

En conclusion, les résultats obtenus sur ces surfaces sont en accord avec les résultats de la littérature. Cela nous permet donc de valider notre modèle et de l'utiliser pour tester l'ensemble des surfaces réelles présentées dans le chapitre 2.

4.3. Implémentation du modèle CP pour des surfaces obtenues par FA SLM

4.3.1. Modification du modèle CP

Afin de pouvoir utiliser le modèle CP présenté en section 4.2 dans le cadre de surfaces obtenues par FA SLM, des modifications sont apportées au terme $H_{motilité}$. En effet, dans le cas de surfaces réelles, on souhaite observer le comportement aléatoire de la cellule en termes de motilité sans une direction de migration fixée au préalable. Le terme $H_{motilité}$ devient donc :

$$\Delta H_{motilité} = \sum_{\sigma} \lambda_M \left(\frac{\vec{p} + \vec{v}}{\|\vec{p} + \vec{v}\|} \right) . \overrightarrow{\delta_r} \tag{4.13}$$

Avec :

$$\vec{p} = \sum_{x_M \in \Omega_M} (x_M - x_{CM}) \tag{4.14}$$

où x_M représente la position du site d'un point de la membrane de la cellule, x_{CM} représente la position du site du centre de masse de la cellule. $\Delta H_{motilité}$ décrit deux effets distincts : le mouvement aléatoire de la cellule, via le paramètre $\vec{p}$ et la persistance, via le vecteur vitesse $\vec{v}$.

4.3.2. Configuration du modèle

4.3.2.1. Paramètres du modèle

Afin de s'adapter à l'échelle des surfaces, des modifications ont été apportées au niveau des valeurs de paramètres CP. Le lattice a la forme d'un parallélépipède de dimensions 200 µm x 200 µm x 80 pixels avec des conditions aux limites fixes. Chaque site est défini par un voxel cubique de dimension

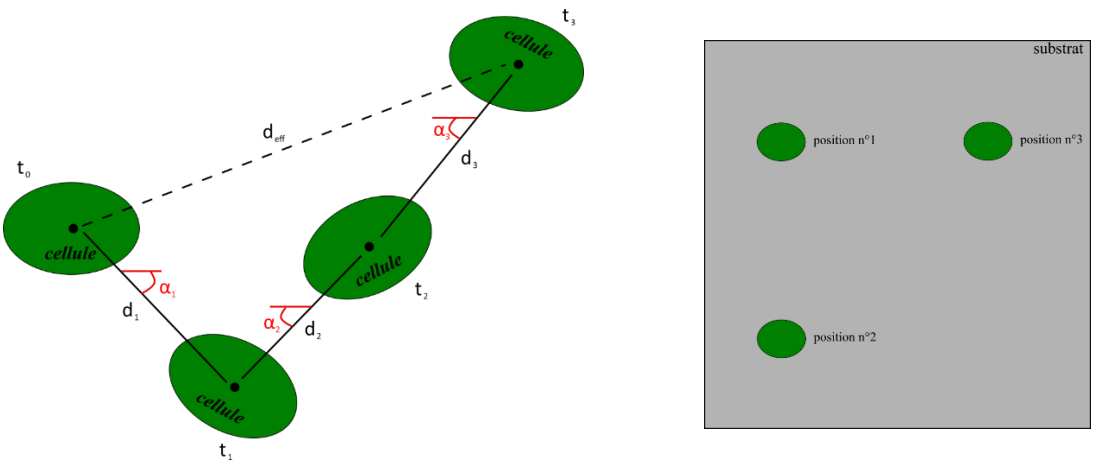
2 µm x 2 µm x 2 µm et la cellule est définie par un hémisphère de rayon 20 µm. Le volume initial de la cellule ainsi que sa surface initiale ont été définies à 4000 µm^3 et 2000 µm² respectivement afin de respecter l'échelle de 8 µm^3 par voxel. Le paramètre λ_M est fixé à 4 x 10^{-18} kg/s²m^3. Le reste des paramètres CP sont identiques à la configuration précédente (tableau 4.1). Un MCS est défini à 10 secondes et le temps de simulation est de 8500 MCS, soit environ 24h. Toutes les simulations ont été répétées 50 fois afin d'obtenir des données consistantes et reproduisibles. Par ailleurs, les simulations ont été réalisées sous le logiciel open source Compucell3D, et un script python a été développé afin d'incorporer la version modifiée de $\Delta H_{motilité}$, ainsi que pour spécifier les caractéristiques cellulaires et les données de surface. L'ensemble des paramètres CP utilisés lors des simulations sont définis dans le tableau 4.3.

Description	Symbole	Valeur	Unité
Pas	t	8500	MCS
Température	T	15 x 10^{-27}	kg m²/s²
Domaine lattice	Ω	200 x 200 x 80	pixels
Volume cible **Surface cible**	$V_{\sigma,0}$ $S_{\sigma,0}$	4 x 10^3 2 x 10^3	µm^3 µm^2
Lambda volume	λ_V	50 x 10^{-9}	kg/s²m^3
Lambda surface	λ_S	15 x 10^{-3}	kg/s²m²
Lambda motilité	λ_M	4 x 10^{-18}	kg/s²m^3
Adhésion cellule/medium	J_{CM}	15 x 10^{-15}	kg/s²
Adhésion cellule/surface	J_{CS}	1 x 10^{-15}	kg/s²
Vecteur polarisation	$\vec{p}$	-	-

Tableau 4.3 : Liste des paramètres CP.

4.3.2.2. Paramètres d'évaluation

Le déplacement de la cellule est décrit via deux paramètres : un paramètre de distance efficace D_f et un paramètre de distance totale D_t (figure 4.20a). La distance efficace D_f est définie comme la distance entre la position finale et la position initiale de la cellule. Cependant, le déplacement étant aléatoire sur la surface, ce paramètre ne permet pas de représenter avec précision la capacité de la cellule à migrer sur la surface. Donc la distance totale D_t, est définie comme la somme des distances parcourues par la cellule tous les 10 MCS. De plus, un paramètre représentant l'orientation du déplacement de la cellule α_t tous les 10 MCS est calculé. Afin de prendre en compte l'influence de l'hétérogénéité topographique des surfaces sur le déplacement cellulaire, pour chaque surface 3 positions initiales de la cellule ont été testées (figure 4.20b).



(a) (b)

Figure 4.20 : (a) Représentation graphique du déplacement efficace Df , du déplacement total Dt et de l'orientation du déplacement αt (b) Description des différentes positions initiales de simulation.

La surface de contact entre la cellule et la surface est décrite via deux paramètres : la surface de contact effective S_{CE} et la surface de contact projetée S_{CP}. La surface de contact effective est définie comme l'aire de la cellule en contact avec la surface. La surface de contact projetée est définie comme l'aire de la cellule dans le plan XY (figure 4.21). Enfin, la morphologie de la cellule est caractérisée via le paramètre $\frac{a}{c}$ (section 4.2.2.1).

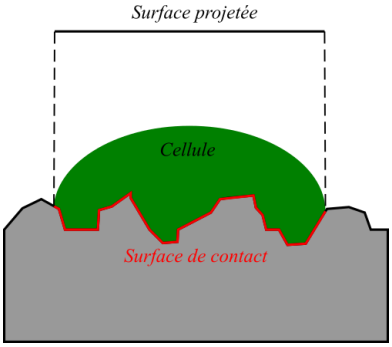


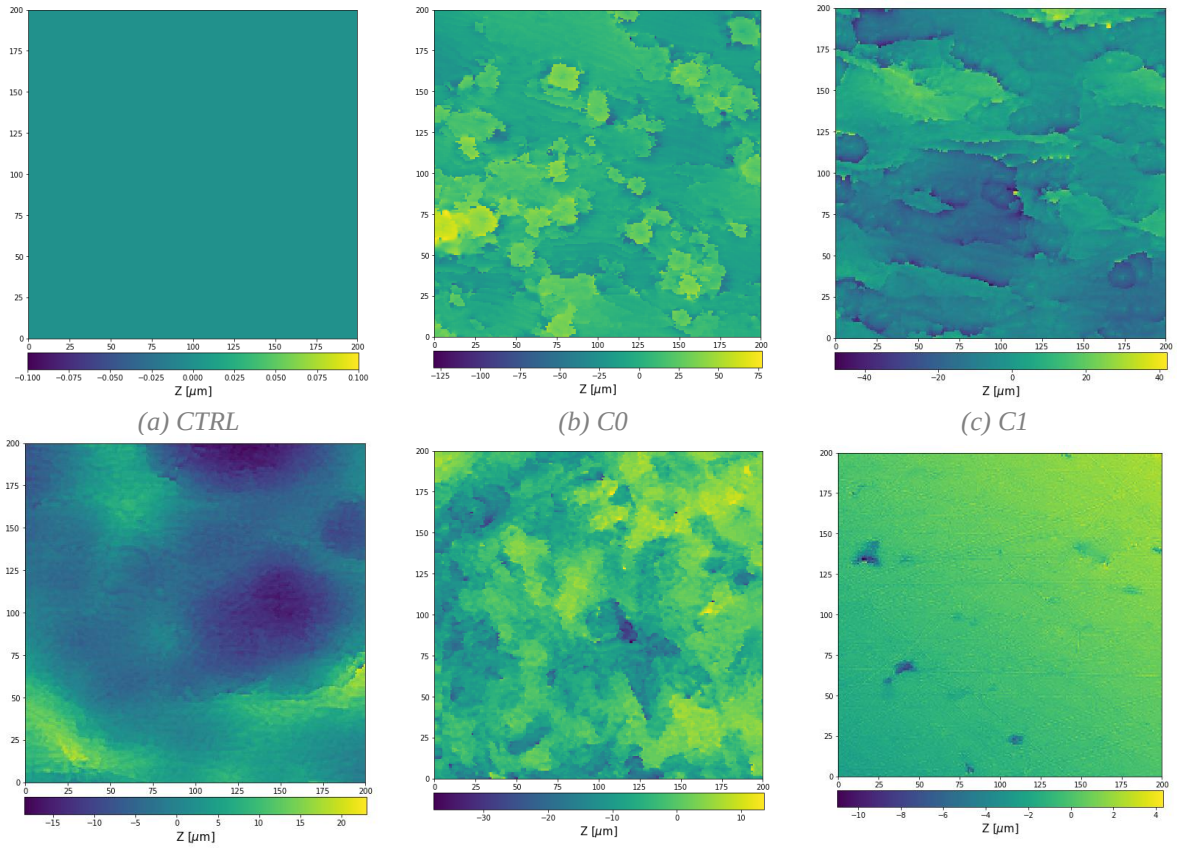
Figure 4.21 : Représentation des surfaces de contact effective SCE et projetée SCP.

4.3.2.3. Surfaces analysées

Nous analysons ici six surfaces, dont cinq sont obtenues par FA SLM (figure 4.22) comme présenté dans le chapitre 2. Nous rappelons leurs caractéristiques :

- CTRL : La surface de contrôle (section 4.2.2.2) (figure 4.22a) ;
- C0 : surface brute (90B) obtenue directement en sortie de fabrication (figure 4.22b) ;
- C1 : surface 90B attaquée chimiquement par une solution 3% HF et 20% HNO3 pour une durée de 5 minutes (figure 4.22c) ;
- C2 : surface 90B attaquée chimiquement par une solution 3% HF et 10% HNO3 pour une durée de 30 minutes (figure 4.22d) ;
- C3 : surface 90B sablée avec du sable F060 (figure 4.22e) ;
- C4 : surface 90B polie via un papier abrasif (figure 4.22f).

Les paramètres de rugosité et de mouillabilité de chaque surface sont listés dans le tableau 4.4. Les surfaces de C0 à C4 sont caractérisées par l'altitude z de chaque point. Les valeurs de z pour chaque surface sont collectées et importées dans notre modèle CP.



(a) CTRL *(b) C0* *(c) C1*

(d) C2 *(e) C3* *(f) C4*

Figure 4.22 : Images des six surfaces étudiées. La légende en couleur représente l'altitude z de chaque point de la surface.

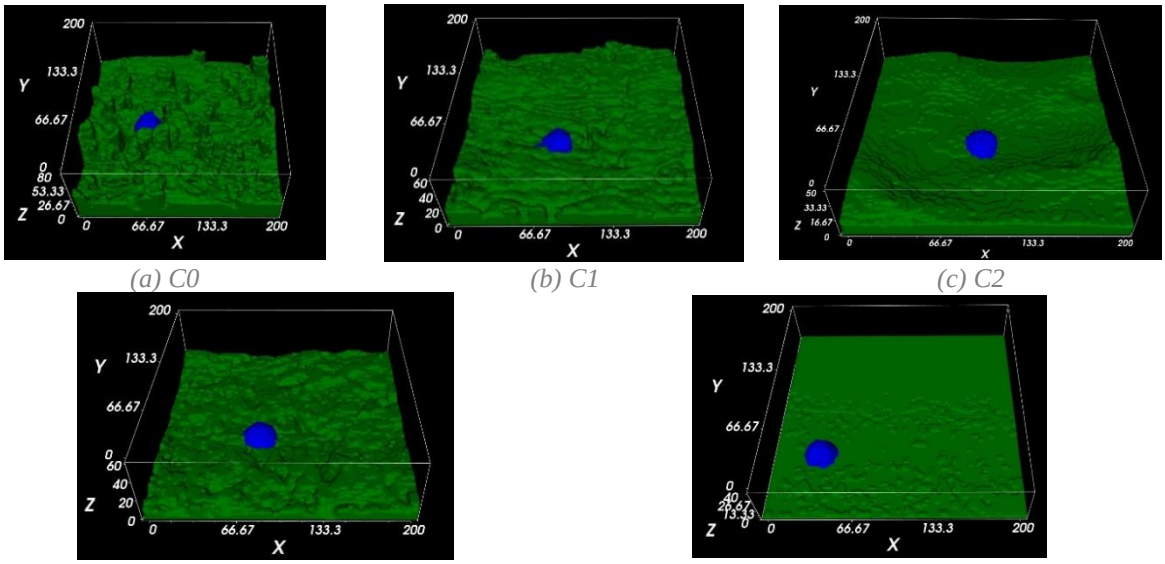
	Sa (µm)	St (µm)	Sdr	Str	Sal	θ_{eau} (°)
C0	15.3 (± 1.2)	121 (± 9.6)	3.2 (± 0.17)	0.7 (± 0.2)	36.2 (± 8.2)	95 (± 3.6)
C1	12.1 (± 2.8)	111 (± 13.3)	1.99 (± 0.21)	0.36 (± 0.17)	48 (± 15)	64 (± 8.4)
C2	5.9 (± 0.7)	43.9 (± 4.8)	1.26 (± 0.09)	0.77 (± 0.12)	103.5 (± 32)	75.5 (± 5.5)
C3	8.3 (± 0.4)	76 (± 1.6)	1.26 (± 0.02)	0.65 (± 0.24)	137 (± 16.9)	91.1 (± 6.5)
C4	0.9 (± 0.2)	10.1 (± 1.1)	1.02 (± 0.01)	0.51 (± 0.12)	233.4 (± 45)	75 (± 6)

Tableau 4.4 : Paramètres de rugosité et de mouillabilité des différentes surfaces

4.3.3. Résultats

4.3.3.1. Morphologie cellulaire

La figure 4.23 montre des clichés de simulation pour les différentes surfaces à t = 8500 MCS à partir de la position 1. La morphologie cellulaire varie en fonction de la surface car la cellule s'adapte à son environnement en minimisant l'énergie dépensée.

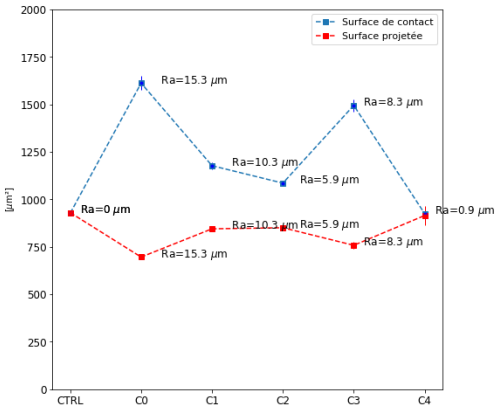


(a) C0 (b) C1 (c) C2

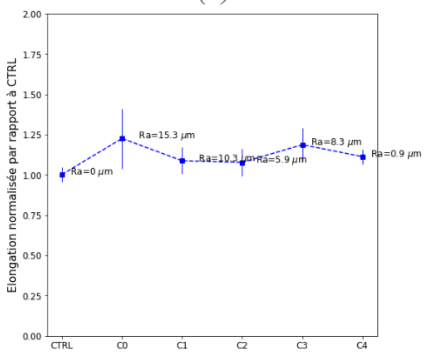
(d) C3 (e) C4

Figure 4.23 : Simulation de la motilité cellulaire sur les six surfaces. Les images sont prises à t=8500 MCS

Une analyse de l'interface cellule/surface a été réalisée via le calcul des valeurs moyennes des surfaces de contact et projetée (figure 4.24a) ainsi que des valeurs moyennes de l'élongation de la cellule (figure 4.24b).



(a)



(b)

Figure 4.24 : (a) Surface de contact et projetée pour les six surfaces analysées. (b) Élongation normalisée par rapport à la surface CTRL pour les six surfaces. Pour chaque valeur, la rugosité Ra est indiquée.

La surface CTRL ainsi que la surface C4 présentent une surface de contact efficace S_{CE} quasiment égale à la surface projetée S_{CP}, leurs valeurs étant respectivement de 929.9 µm² (± 4.3) et 924.8 µm² (± 6) (figure 4.24a). Ce résultat s'explique par la très faible présence (pour C4) ou l'absence de rugosité. En termes de morphologie, la cellule garde une forme hémisphérique sur les deux surfaces (figure 4.24b).

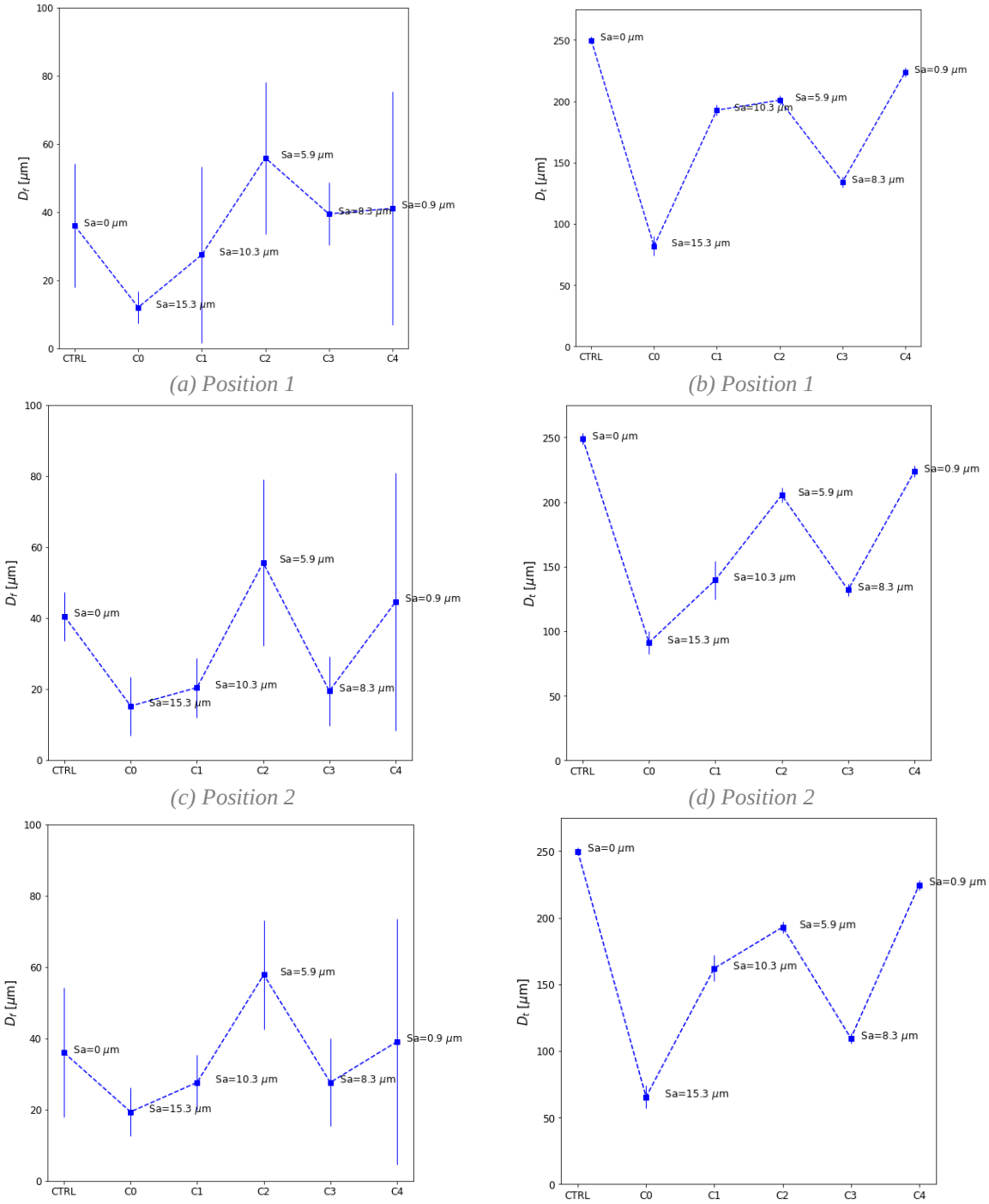
En termes de morphologie sur C1 et C2, la cellule conserve une forme hémisphérique pour ces 2 surfaces, avec aucune différence significative en termes d'élongation (figure 4.24b). La plus grande surface projetée est observée sur les surfaces C1 et C2, avec des valeurs respectives de 844.7 µm² (± 8.3) et 850.5 µm² (± 9) pour S_{CP} et de 1177.1 µm² (± 17.1) et 1085.3 µm² (± 5.3) pour S_{CE} (figure 4.24a). Le but de l'attaque chimique étant de diminuer la rugosité et d'homogénéiser la surface, cet aspect semble donc avoir un effet sur l'interface entre la cellule et la surface, avec une augmentation de l'étalement cellulaire (surface projetée). Du point de vue expérimental, l'étalement de la cellule est corrélé à son adhésion [65], les liens adhésifs se formant sur la frontière externe de la cellule. Ainsi, la surface de contact d'adhésion augmente avec l'étalement cellulaire. Au sein de notre modèle, la surface de contact définie est la frontière entre la cellule et la surface, et diminue avec l'augmentation de l'étalement. Le résultat obtenu est donc contraire à la littérature. Cependant, en considérant la surface d'adhésion réelle (corrélée au périmètre de la surface projetée), on peut donc supposer une meilleure adhésion sur les surfaces C1 et C2.

Dans le cas de C3, on observe une surface projetée S_{CP} plus faible que pour la surface CTRL, avec une valeur de 757.9 µm² (± 16.6), tandis que la surface de contact efficace S_{CE} est plus grande, avec une valeur de 1494.6 µm² (± 32) (figure 4.24a). On observe que la cellule montre une forme compacte avec une réduction de S_{CP}, montrant la difficulté de la cellule à se déplacer sur cette surface. Ce résultat se reflète aussi dans les valeurs de l'élongation qui sont proches de ceux obtenus pour la surface CTRL, même s'ils sont significativement supérieurs figure 4.24b).

Dans le cas de la surface C0, on observe une surface de contact S_{CE} de 1611.9 µm² (± 37.1) et une surface projetée S_{CP} de 696.1 µm² (± 7.4) (figure 4.24a). On obtient donc une surface de contact presque deux fois supérieure à ce qui est observée sur la surface CTRL. Cette valeur peut être expliquée par le fait que l'adhésion se fait non seulement via la surface sous-jacente (comme on l'observe sur les autres surfaces), mais aussi via la surface latérale créée par les particules de poudres. On peut donc supposer que la présence de cette surface latérale augmente l'adhésion de la cellule malgré le faible étalement. La présence de ces particules influence aussi la morphologie de la cellule, qui se fixe dans les interstices entre les particules. Cet effet se traduit par une élongation importante de la cellule mais sans différence significative par rapport à CTRL (figure 4.24b).

4.3.3.2. Déplacement cellulaire

Dans un premier temps, la motilité cellulaire sur les différentes surfaces est étudiée en termes de déplacement cellulaire avec le calcul des paramètres D_t et D_f. La figure 4.25 montre les résultats de D_f et de D_t pour chaque surface et chaque position initiale de la cellule (figure 4.21b). Pour chaque valeur de D_f et D_t la valeur de la rugosité moyenne *Sa* de la surface correspondante est indiquée. Les résultats de D_f montrent des variations significatives selon les surfaces et les positions et des observations similaires ont été faites pour D_t.



(a) Position 1 *(b) Position 1*

(c) Position 2 *(d) Position 2*

(e) Position 3 *(f) Position 3*

Figure 4.25 : (a, c, e) Distance efficace D_f, (b, d, f) Distance totale D_t.

Dans le cas de la surface CTRL, la cellule présente une distance efficace *Df* variant entre 35.9 µm (± 18.2) et 40.5 µm (± 7) avec aucune différence significative entre les positions initiales (figure 4.25a, c, e). Les grandes valeurs de l'écart-type montrent que la cellule migre de manière aléatoire sur la surface. En termes de D_t, on observe une valeur autour de 249.9 µm (± 2.9) avec aucune différence significative entre les positions initiales (figure 4.25b, d, f). L'absence de différence significative entre les simulations indépendamment des surfaces confirme la répétabilité du comportement cellulaire sur la surface CTRL. De plus, à partir de D_t, on obtient une vitesse moyenne autour de 10 µm/h, en accord avec la littérature et nos résultats précédents (section 4.2.3.1).

Pour la surface C0 on trouve le D_t le plus faible, indépendamment de la position initiale, variant de 65.3 µm (± 8.4) à 91 µm (± 8.8) (figure 4.25b, d, f), soit entre 26% et 36% de la valeur de D_t observé sur la surface CTRL. En termes de distance efficace D_f, il se situe autour de 18.2 µm (± 41.2) (figure 4.25a, c, e). On observe une différence significative par rapport à la surface CTRL pour les positions initiales 1 et 2. De plus, le faible écart-type observé par rapport à CTRL montre que la cellule parcourt la même distance dans chaque configuration, malgré la nature aléatoire du mouvement cellulaire. Couplé à la distance totale, on peut donc en déduire que la cellule se déplace peu sur cette surface, et va plutôt rester fixée au voisinage des particules.

Concernant la surface C1, les déplacements observés sont plus élevés que pour C0 mais moins élevés que sur CTRL, avec une variation significativement selon la position initiale de la cellule. En position 1, on obtient un D_t de 192.7 µm (± 15) et un D_f de 27.4 µm (± 25.9) (figure 4.25a, b), tandis qu'en position 2, on obtient un D_t de 139.5 µm (± 15) et un D_f de 20.4 µm (± 8.4) (figure 4.25c, d). Enfin, en position 3, on obtient un D_t de 161.5 µm (± 9.7) et un D_f de 27.6 µm (± 7.6) (figure 4.25e, f). Contrairement à D_t, aucune différence significative n'a été observée pour D_f pour les différentes positions initiales et on se situe entre 55% et 77% des valeurs de D_t obtenues pour CTRL. Ces variations au niveau des résultats reflètent l'hétérogénéité de la surface et la différence de comportement en fonction de la position initiale de la cellule.

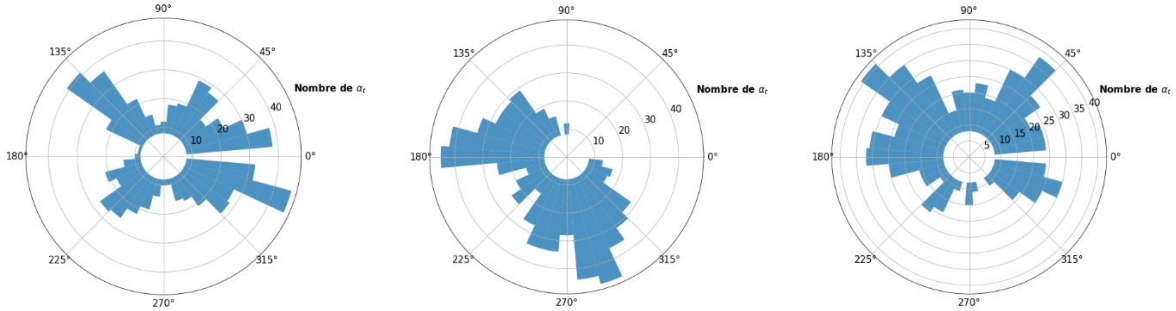
Pour ce qui est de la surface C2, les résultats montrent que D_t est globalement plus important par rapport à C0, C1 et C3, avec cependant une faible influence de la position initiale. Le même constat peut être fait pour D_f. En effet, pour l'ensemble des positions, on obtient un D_t moyen autour de 200 µm (figure 4.25b, d, f) et un D_f autour de 55.9 µm (figure 4.25a, c, e). Le D_t observé sur C2 est légèrement inférieur par rapport à CTRL (atteignant 80% du la valeur du D_t sur C4) et aucune différence significative n'est observée pour le D_f par rapport à CTRL. On obtient donc une homogénéité du comportement migratoire sur C2 avec un déplacement cellulaire proche du déplacement observé sur CTRL et C4.

Ce type de comportement se retrouve aussi sur C3. Le déplacement observé est significativement plus faible que dans le cas des surfaces CTRL, C1 et C2, avec un D_t variant de 109.4 µm (± 3.8) à 133.9 µm (± 4.5) (figure 4.25b, d, f) et un D_f variant 19.4 µm (± 9.8) à 39.4 µm (± 9.2) (figure 4.25a, c, e). Similairement à C1, on observe des différences significatives selon la position de la cellule. Néanmoins, la distance totale D_t est globalement de 43% à 55% de la valeur de D_t sur la surface CTRL.

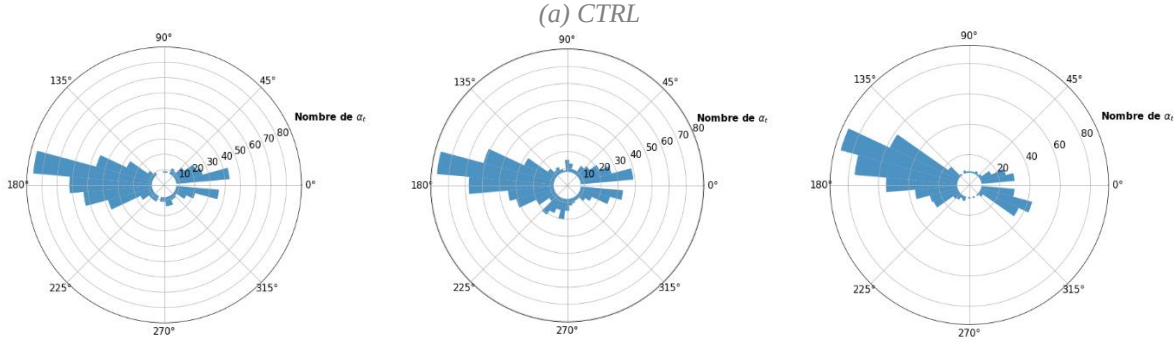
Enfin, sur la surface C4 la cellule présente un comportement proche de la surface CTRL, avec un D_t moyen de 223.5 µm (± 4.5) (figure 4.25b, d, f) et un D_f moyen de 44.5 µm (± 36.3) (figure 4.25a, c, e) et ce indépendamment la position initiale. Comparé à la surface CTRL, on se situe à 89% de sa valeur de D_t, et le fort écart-type observé pour D_f montre un déplacement aléatoire de la cellule sur la surface.

4.3.3.3. Orientation de déplacement

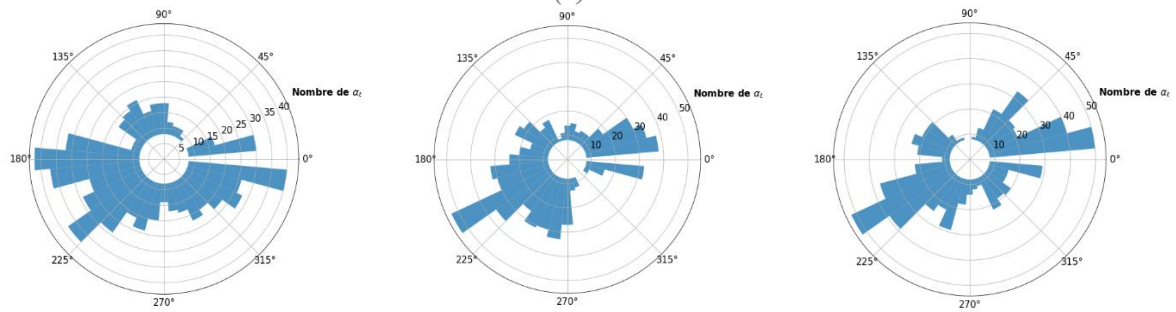
La surface joue aussi un rôle sur la direction de migration de la cellule qui est mesurée via le paramètre α_t. Pour chaque surface, les mesures des α_t pour trois simulations aléatoires ont été prises, puis regroupées au sein d'un graphique où les α_t sont regroupées par tranche de 10°. Les résultats sont présentés au sein de la figure 4.26.



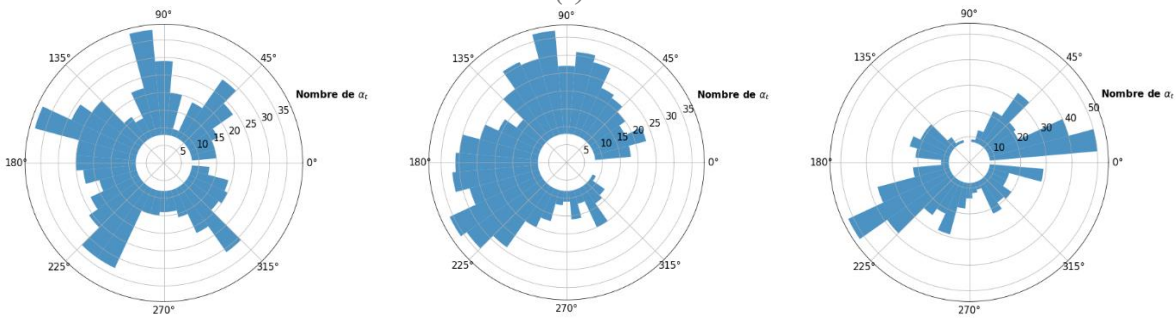
(a) CTRL



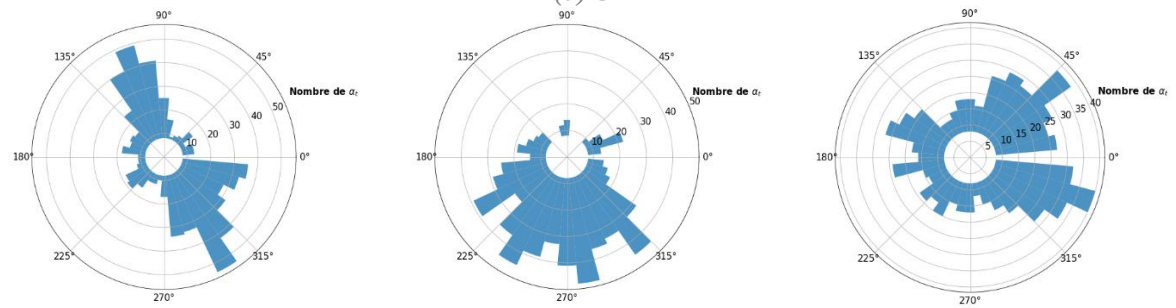
(b) C0



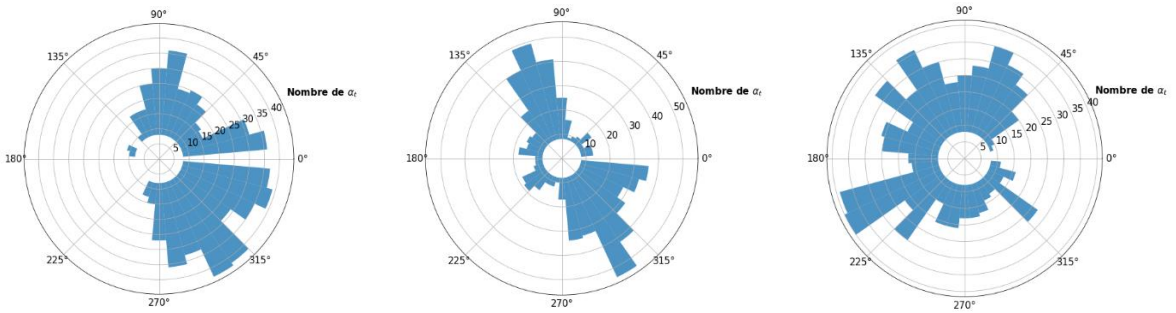
(c) C1



(d) C2



(e) C3



(f) C4

Figure 4.26 : Répartition des orientations de migration α_t tout le long de la simulation en fonction des surfaces. Les résultats affichés correspondent à trois simulations différentes pour chaque surface, en position 1.

Les résultats obtenus pour la surface CTRL (figure 4.26a) montrent des orientations partielles selon toutes les directions. On peut donc supposer que la cellule n'affiche aucune direction préférentielle sur C0. La même conclusion peut être faite pour les surfaces C2, C3 et C4 (figure 4.26d, e, f).

Concernant la surface C0, on observe un grand nombre d'orientation partielle α_t dans la plage de valeur [150° - 200°], et ce pour l'ensemble des simulations en position 1 (figure 4.26b). En observant l'état de surface pour la position 1, cette plage d'orientation correspond à des zones sans particules. Couplé au faible déplacement de la cellule sur C0, on peut donc supposer que cette direction préférentielle est due à la présence des particules, n'autorisant le mouvement que dans certaines directions. Ces mêmes observations sont retrouvées en position 2 et 3. Ainsi, on peut supposer que ces orientations vont dépendre des particules à proximité.

Les résultats de la section 2.3 du chapitre 2 montrent que la surface C1 présente une anisotropie topographique. Sur les données d'altitude surface de C1 (figure 4.22c), cette anisotropie se traduit par orientation de la surface selon la direction ~ [-10° - 160°]. Qualitativement, si des orientations semblent ressortir de la migration sur les intervalles [180° - 225°] et [0° - 45°] (figure 4.26c), aucune ne semble suivre les angles de -10° et 160°. On peut donc supposer que la topographie locale autour de la cellule est prédominante devant l'anisotropie globale de la surface.

4.3.4. Discussion

L'application des données 3D des surfaces SLM au modèle CP unicellulaire nous a permis de mettre en avant l'influence des différents états de surfaces sur la motilité cellulaire. On définit la surface CTRL comme surface de référence. Une migration longue est définie arbitrairement par $D_t > 0.5 * D_{t,\,Ref}$ (avec $D_{t,\,Ref}$ la distance totale sur la surface CTRL) tandis qu'une migration courte est définie par $D_t \leq 0.5 * D_{t,\,Ref}$.

La surface C0 donne la plus faible motilité avec la cellule au voisinage des particules. La migration au sein de cette surface est courte, voire inexistante car elle se stoppe au niveau des particules. En effet, la cellule présente une adhésion préférentielle au niveau des particules, se retrouvant piégée entre celles-ci. Ces observations sont en accord avec les observations de la morphologie des hMSCs sur la surface C0 (section 3.3), celles adhérant préférentiellement au voisinage des particules plutôt que sur les zones de la surface sans particules. Cette adhésion préférentielle au voisinage d'une zone de plus grande adhésion disponible est aussi observée dans la littérature avec comme exemple l'étude de Arcizet et al [66] sur la motilité cellulaire au sein de microstructures 3D composées de piliers. Nos essais expérimentaux ont montré une surface projetée significativement plus faible que les autres surfaces, avec une valeur d'environ 2203 µm², et une élongation moyenne autour de 2.5 (figure 3.25 au sein de la section 3.3). Bien que la surface projetée simulée soit plus faible et qu'aucune élongation n'ait été

observée sur la cellule, on obtient bien néanmoins la valeur de surface projetée la plus faible sur C0 numériquement. On peut ajouter que les particules dans notre modèle ne sont pas sphériques, mais plutôt cylindriques voir coniques dû au scan vertical de la surface par laser. Cette différence va avoir un impact sur les différences de comportements que l'on observe sur les essais expérimentaux. Cependant, le niveau de détails des surfaces est suffisant pour assumer la faible (voir absente) motilité cellulaire sur cette surface.

Les résultats montrent l'existence d'une relation entre Ra et D_t, avec l'augmentation de D_t suivant la diminution de Ra. Cependant, chaque surface étant différente topographiquement, la réduction de la surface à Ra n'est pas forcément pertinente. Afin de faire une comparaison efficace de l'état de surface, une première comparaison peut être faite entre C0, C1, C2 et CTRL (ou C4), celles-ci correspondant aux mêmes topographies de surfaces, mais atténuées grâce à l'attaque chimique. L'atténuation de l'amplitude de topographie suit le sens suivant : C0 → C1 → C2 → CTRL (ou C4). Suivant ce sens, on observe bien une augmentation de la distance de migration et de la dispersion avec l'atténuation de la topographie, suivi par une diminution de la surface de contact. De plus, à partir de la surface C2, on se situe dans la cadre de la migration longue tandis que pour C1 et C0, on se situe dans le cadre de la migration courte. L'atténuation de la surface a aussi un effet sur la direction de migration, avec l'influence la plus forte sur la surface C1, et aucune orientation particulière au niveau de C2. Dans ce cas, on peut donc supposer que l'attaque chimique effectuée sur la surface C0 permet théoriquement (sous l'hypothèse que l'adhésion local ne soit pas affectée) d'améliorer la motilité de la cellule, avec la topographie C2 présentant la meilleure motilité (en excluant C4 et CTRL). En termes de données morphologiques, les résultats numériques suivent la même tendance que les résultats expérimentaux. Les plus grandes surfaces projetées sont mesurées pour C1, C2 et C4, avec pour valeur 5207 µm², 7978 µm² et 8604 µm² (figure 3.25 au sein de la section 3.3). De la même manière que C0, les résultats numériques suivent la même tendance, avec cependant des résultats plus faibles. Cette différence vient principalement de la non prise en compte de dynamiques internes permettant de maximiser l'étalement de la cellule. L'élongation cellulaire suit la même logique avec les résultats numériques et expérimentaux s'alignent sur une absence de différence significative entre C1, C2 et C4.

Une autre comparaison peut être faite entre C0, C3, et CTRL (ou C4). La surface C0 a été sablée afin d'homogénéiser la surface et enlever les particules présentes à la surface, donnant la surface C3. La comparaison de C0 et C3 montre une amélioration de la motilité avec un plus grand D_t. De plus, aucune orientation spécifique de migration ne semble ressortir. Cependant, comparée à CTRL (ou C4), la motilité de la cellule est faible, étant dans le cas d'une migration courte avec une faible dispersion. En termes de morphologie, des différences significatives sont observées entre les résultats numériques et les résultats expérimentaux. Les résultats numériques montrent une surface projetée plus grande que la surface C0, avec une morphologie hémisphérique et aucune élongation. Les résultats expérimentaux montrent une faible surface projetée, avec une valeur d'environ 3060 µm² (figure 3.25 au sein de la section 3.3) avec une forme en fil et une forte élongation atteignant la valeur de 3.35. Cette différence montre que d'autres aspects, autre que la topographie à l'échelle microscopique, interviennent au sein de l'environnement cellulaire. Une des raisons de cette différence est la présence de topographie submicroscopique non prise en compte dans le modèle numérique à cause d'un problème d'échelle. D'autres mécanismes intracellulaires peuvent aussi intervenir, venant altérer la nature et la morphologie de la cellule.

4.4. Conclusions

Le modèle de migration proposé ici a pour but d'étudier la motilité cellulaire selon différents types de topographies. En effet, la motilité cellulaire se définit comme étant la capacité de la cellule à se déplacer sur un substrat solide et elle intervient au sein de nombreux phénomènes biologiques, tel

que la migration cellulaire durant la cicatrisation, la migration cellulaire de tumeurs métastases, ou le remodelage du tissu. La compréhension des facteurs du micro-environnement gouvernant la motilité cellulaire est un aspect critique pour les biomatériaux non-cellularisés afin de permettre une invasion cellulaire rapide. Cela passe non seulement par l'attachement des cellules à la surface, mais aussi par leur déplacement le long de cette dernière. Nous avons donc décidé d'étudier ce dernier point selon les propriétés surfaciques.

Pour cela, nous avons adopté un modèle CP phénoménologique reposant le comportement cellulaire sur le principe de minimisation de l'énergie de la cellule et de son environnement. Au sein du modèle, la cellule est considérée comme une entité homogène, fusionnant ainsi le cytoplasme (dont le comportement élastique est régi par le paramètre λ_V), la membrane (dont le comportement élastique est régit par le paramètre λ_S). Les interactions avec l'environnement extérieur sont régies par des termes énergétiques d'adhésions tels que J_{CS} (énergie d'adhésion entre la cellule et la surface) et J_{CM} (énergie d'adhésion entre la cellule et le médium). Enfin, le mouvement cellulaire est défini par une énergie de motilité fournie à la cellule sous la forme d'un terme de motilité λ_M.

Les résultats ont montré qu'un comportement cellulaire reposant sur le principe de minimisation de l'énergie permet de reproduire des comportements cellulaires de motilité, en particulier selon la topographie de la surface. L'étude des surfaces créées numériquement a montré l'importance de facteurs tels que les dimensions de la surface, l'orientation par rapport à la migration et l'énergie d'adhésion sur la migration cellulaire. La comparaison par rapport aux données expérimentales de la littérature a permis de valider les différents comportements observés ainsi que de mettre en évidence des différences significatives entre le modèle et l'expérience dues à des facteurs externes et internes non prises en compte. Cependant, les résultats permettent de justifier la validité de ce modèle phénoménologique sur l'influence géométrique de la topographie.

Références

[1] E. G. Rens et L. Edelstein-Keshet, « From Energy to Cellular Force in the Cellular Potts Model », *bioRxiv*, p. 601781, avr. 2019, doi: 10.1101/601781.

[2] D. Buser *et al.*, « Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface », *J. Dent. Res.*, vol. 83, nº 7, p. 529-533, juill. 2004, doi: 10.1177/154405910408300704.

[3] K. Anselme *et al.*, « The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour », *Biomaterials*, vol. 21, nº 15, p. 1567-1577, août 2000, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00042-9.

[4] L. Feller, Y. Jadwat, R. A. G. Khammissa, R. Meyerov, I. Schechter, et J. Lemmer, « Cellular Responses Evoked by Different Surface Characteristics of Intraosseous Titanium Implants », *BioMed Research International*, 2015. https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/171945/ (consulté le avr. 05, 2018).

[5] D. E. Discher, P. Janmey, et Y.-L. Wang, « Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate », *Science*, vol. 310, nº 5751, p. 1139-1143, nov. 2005, doi: 10.1126/science.1116995.

[6] C. M. Lo, H. B. Wang, M. Dembo, et Y. L. Wang, « Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. », *Biophys J*, vol. 79, nº 1, p. 144-152, juill. 2000.

[7] S. Tanaka, « Simulation Frameworks for Morphogenetic Problems », *Computation*, vol. 3, nº 2, p. 197-221, avr. 2015, doi: 10.3390/computation3020197.

[8] F. Milde, G. Tauriello, H. Haberkern, et P. Koumoutsakos, « SEM++: A particle model of cellular growth, signaling and migration », *Comp. Part. Mech.*, vol. 1, nº 2, p. 211-227, juin 2014, doi: 10.1007/s40571-014-0017-4.

[9] J. J. Muñoz, K. Barrett, et M. Miodownik, « A deformation gradient decomposition method for the analysis of the mechanics of morphogenesis », *Journal of Biomechanics*, vol. 40, nº 6, p. 1372-1380, janv. 2007, doi: 10.1016/j.jbiomech.2006.05.006.

[10] V. S. Cheong, G. W. Blunn, M. J. Coathup, et P. Fromme, « A novel adaptive algorithm for 3D finite element analysis to model extracortical bone growth », *Comput Methods Biomech Biomed Engin*, vol. 21, nº 2, p. 129-138, févr. 2018, doi: 10.1080/10255842.2018.1425997.

[11] E. K. Rodriguez, A. Hoger, et A. D. McCulloch, « Stress-dependent finite growth in soft elastic tissues », *Journal of Biomechanics*, vol. 27, nº 4, p. 455-467, avr. 1994, doi: 10.1016/0021-9290(94)90021-3.

[12] R. Dillon et H. G. Othmer, « A Mathematical Model for Outgrowth and Spatial Patterning of the Vertebrate Limb Bud », *Journal of Theoretical Biology*, vol. 197, nº 3, p. 295-330, avr. 1999, doi: 10.1006/jtbi.1998.0876.

[13] R. Allena, « Cell Migration with Multiple Pseudopodia: Temporal and Spatial Sensing Models », *Bull Math Biol*, vol. 75, nº 2, p. 288-316, févr. 2013, doi: 10.1007/s11538-012-9806-1.

[14] R. Allena et D. Aubry, « 'Run-and-tumble' or 'look-and-run'? A mechanical model to explore the behavior of a migrating amoeboid cell », *Journal of Theoretical Biology*, vol. 306, p. 15-31, août 2012, doi: 10.1016/j.jtbi.2012.03.041.

[15] M.-C. Kim, Y. R. Silberberg, R. Abeyaratne, R. D. Kamm, et H. H. Asada, « Computational modeling of three-dimensional ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration », *PNAS*, vol. 115, nº 3, p. E390-E399, janv. 2018, doi: 10.1073/pnas.1717230115.

[16] A. G. Fletcher, M. Osterfield, R. E. Baker, et S. Y. Shvartsman, « Vertex Models of Epithelial Morphogenesis », *Biophys J*, vol. 106, nº 11, p. 2291-2304, juin 2014, doi: 10.1016/j.bpj.2013.11.4498.

[17] T. Hiraiwa, F.-L. Wen, T. Shibata, et E. Kuranaga, « Mathematical Modeling of Tissue Folding and Asymmetric Tissue Flow during Epithelial Morphogenesis », *Symmetry*, vol. 11, nº 1, Art. nº 1, janv. 2019, doi: 10.3390/sym11010113.

[18] M. Czajkowski, D. Bi, M. L. Manning, et M. C. Marchetti, « Hydrodynamics of shape-driven rigidity transitions in motile tissues », *Soft Matter*, vol. 14, nº 27, p. 5628-5642, juill. 2018, doi: 10.1039/C8SM00446C.

[19] J. Mathur, B. Sarker, et A. Pathak, « Predicting Collective Migration of Cell Populations Defined by Varying Repolarization Dynamics », *Biophysical Journal*, vol. 115, nº 12, p. 2474-2485, déc. 2018, doi: 10.1016/j.bpj.2018.11.013.

[20] A. Merzouki, O. Malaspinas, A. Trushko, A. Roux, et B. Chopard, « Influence of cell mechanics and proliferation on the buckling of simulated tissues using a vertex model », *Natural Computing*, 2017, doi: 10.1007/s11047-017-9629-y.
[21] K. A. Rejniak, « An immersed boundary framework for modelling the growth of individual cells: an application to the early tumour development », *J. Theor. Biol.*, vol. 247, nº 1, p. 186-204, juill. 2007, doi: 10.1016/j.jtbi.2007.02.019.
[22] N. Sepúlveda, L. Petitjean, O. Cochet, E. Grasland-Mongrain, P. Silberzan, et V. Hakim, « Collective Cell Motion in an Epithelial Sheet Can Be Quantitatively Described by a Stochastic Interacting Particle Model », *PLoS Comput Biol*, vol. 9, nº 3, mars 2013, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002944.
[23] H. Hatzikirou, G. Breier, et A. Deutsch, « Cellular Automaton ModelingCellular automaton (CA)modeling, tumor invasionof Tumor Invasion », in *Encyclopedia of Complexity and Systems Science*, R. A. Meyers, Éd. New York, NY: Springer, 2009, p. 913-922.
[24] T. Alarcón, H. M. Byrne, et P. K. Maini, « A cellular automaton model for tumour growth in inhomogeneous environment », *J. Theor. Biol.*, vol. 225, nº 2, p. 257-274, nov. 2003, doi: 10.1016/s0022-5193(03)00244-3.
[25] P. V. Liedekerke, J. Neitsch, T. Johann, K. Alessandri, P. Nassoy, et D. Drasdo, « Quantitative cell-based model predicts mechanical stress response of growing tumor spheroids over various growth conditions and cell lines », *PLOS Computational Biology*, vol. 15, nº 3, p. e1006273, mars 2019, doi: 10.1371/journal.pcbi.1006273.
[26] T. J. Newman, « Modeling multicellular systems using subcellular elements », *Math Biosci Eng*, vol. 2, nº 3, p. 613-624, juill. 2005.
[27] M. Tarama, K. Mori, et R. Yamamoto, « Mechanochemical subcellular-element model of crawling cells », 2019.
[28] F. Graner et J. A. Glazier, « Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended Potts model », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 69, nº 13, p. 2013-2016, sept. 1992, doi: 10.1103/PhysRevLett.69.2013.
[29] I. Niculescu, J. Textor, et R. J. de Boer, « Crawling and Gliding: A Computational Model for Shape-Driven Cell Migration », *PLOS Computational Biology*, vol. 11, nº 10, p. e1004280, oct. 2015, doi: 10.1371/journal.pcbi.1004280.
[30] S. E. M. Boas et R. M. H. Merks, « Tip cell overtaking occurs as a side effect of sprouting in computational models of angiogenesis », *BMC Syst Biol*, vol. 9, p. 86, nov. 2015, doi: 10.1186/s12918-015-0230-7.
[31] J. A. Glazier et F. Graner, « Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells », *Phys. Rev. E*, vol. 47, nº 3, p. 2128-2154, mars 1993, doi: 10.1103/PhysRevE.47.2128.
[32] J. F. Li et J. Lowengrub, « The Effects of Cell Compressibility, Motility and Contact Inhibition on the Growth of Tumor Cell Clusters using the Cellular Potts Model », *J Theor Biol*, vol. 343, p. 79-91, févr. 2014, doi: 10.1016/j.jtbi.2013.10.008.
[33] A. Shirinifard, J. S. Gens, B. L. Zaitlen, N. J. Popławski, M. Swat, et J. A. Glazier, « 3D Multi-Cell Simulation of Tumor Growth and Angiogenesis », *PLOS ONE*, vol. 4, nº 10, p. e7190, oct. 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0007190.
[34] M. Scianna, L. Preziosi, et K. Wolf, « A Cellular Potts Model simulating cell migration on and in matrix environments », *Math Biosci Eng*, vol. 10, nº 1, p. 235-261, févr. 2013.
[35] R. Allena, M. Scianna, et L. Preziosi, « A Cellular Potts Model of single cell migration in presence of durotaxis », *Mathematical Biosciences*, vol. 275, nº Supplement C, p. 57-70, mai 2016, doi: 10.1016/j.mbs.2016.02.011.
[36] R. F. M. van Oers, E. G. Rens, D. J. LaValley, C. A. Reinhart-King, et R. M. H. Merks, « Mechanical Cell-Matrix Feedback Explains Pairwise and Collective Endothelial Cell Behavior In Vitro », *PLOS Computational Biology*, vol. 10, nº 8, p. e1003774, août 2014, doi: 10.1371/journal.pcbi.1003774.
[37] A. J. Kabla, « Collective cell migration: leadership, invasion and segregation », *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 9, nº 77, p. 3268-3278, déc. 2012, doi: 10.1098/rsif.2012.0448.

[38] S. Turner et J. A. Sherratt, « Intercellular adhesion and cancer invasion: a discrete simulation using the extended Potts model », *J. Theor. Biol.*, vol. 216, nº 1, p. 85-100, mai 2002, doi: 10.1006/jtbi.2001.2522.
[39] A. F. M. Marée, V. A. Grieneisen, et L. Edelstein-Keshet, « How Cells Integrate Complex Stimuli: The Effect of Feedback from Phosphoinositides and Cell Shape on Cell Polarization and Motility », *PLOS Computational Biology*, vol. 8, nº 3, p. e1002402, mars 2012, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002402.
[40] H. Wear, « Modeling the Mammalian Ovary: A Cell-based Computational Model of Early Ovarian Development in Mice and Preliminary Data for A Model of Folliculogenesis in Rhesus Monkeys. », *undefined*, 2016. /paper/Modeling-the-Mammalian-Ovary%3A-A-Cell-based-Model-of-Wear/f3b5bdcac85d048d39990d37b56e472cdd1b282a (consulté le déc. 03, 2020).
[41] A. Voss-Böhme, « Multi-Scale Modeling in Morphogenesis: A Critical Analysis of the Cellular Potts Model », *PLoS One*, vol. 7, nº 9, sept. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0042852.
[42] R. Magno, V. A. Grieneisen, et A. F. Marée, « The biophysical nature of cells: potential cell behaviours revealed by analytical and computational studies of cell surface mechanics », *BMC Biophys*, vol. 8, mai 2015, doi: 10.1186/s13628-015-0022-x.
[43] Hirashima Tsuyoshi, Rens Elisabeth G., et Merks Roeland M. H., « Cellular Potts modeling of complex multicellular behaviors in tissue morphogenesis », *Development, Growth & Differentiation*, vol. 59, nº 5, p. 329-339, juin 2017, doi: 10.1111/dgd.12358.
[44] L. E. Scott, L. A. Griggs, V. Narayanan, D. E. Conway, C. A. Lemmon, et S. H. Weinberg, « A hybrid model of intercellular tension and cell–matrix mechanical interactions in a multicellular geometry », *Biomech Model Mechanobiol*, mars 2020, doi: 10.1007/s10237-020-01321-8.
[45] C. A. Lemmon et L. H. Romer, « A Predictive Model of Cell Traction Forces Based on Cell Geometry », *Biophys J*, vol. 99, nº 9, p. L78-L80, nov. 2010, doi: 10.1016/j.bpj.2010.09.024.
[46] J. P. Spatz et B. Geiger, « Molecular engineering of cellular environments: cell adhesion to nano-digital surfaces », *Methods Cell Biol.*, vol. 83, p. 89-111, 2007, doi: 10.1016/S0091-679X(07)83005-6.
[47] D. E. Ingber, « Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development », *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 50, nº 2-3, p. 255-266, 2006, doi: 10.1387/ijdb.052044di.
[48] M. Théry *et al.*, « Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, nº 52, p. 19771-19776, déc. 2006, doi: 10.1073/pnas.0609267103.
[49] M. Théry *et al.*, « The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis », *Nat. Cell Biol.*, vol. 7, nº 10, p. 947-953, oct. 2005, doi: 10.1038/ncb1307.
[50] M. Théry, A. Pépin, E. Dressaire, Y. Chen, et M. Bornens, « Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment », *Cell Motility*, vol. 63, nº 6, p. 341-355, 2006, doi: 10.1002/cm.20126.
[51] B. Vianay, J. Käfer, E. Planus, M. Block, F. Graner, et H. Guillou, « Single cells spreading on a protein lattice adopt an energy minimizing shape », *Phys Rev Lett*, vol. 105, nº 12, p. 128101, sept. 2010, doi: 10.1103/PhysRevLett.105.128101.
[52] P. J. Albert et U. S. Schwarz, « Dynamics of Cell Ensembles on Adhesive Micropatterns: Bridging the Gap between Single Cell Spreading and Collective Cell Migration », *PLOS Computational Biology*, vol. 12, nº 4, p. e1004863, avr. 2016, doi: 10.1371/journal.pcbi.1004863.
[53] S. R. K. Vedula *et al.*, « Emerging modes of collective cell migration induced by geometrical constraints », *PNAS*, vol. 109, nº 32, p. 12974-12979, août 2012, doi: 10.1073/pnas.1119313109.
[54] K. Doxzen *et al.*, « Guidance of collective cell migration by substrate geometry », *Integr Biol (Camb)*, vol. 5, nº 8, p. 1026-1035, août 2013, doi: 10.1039/c3ib40054a.
[55] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, et J. Darnell, « Cell-Matrix Adhesion », *Molecular Cell Biology. 4th edition*, 2000, Consulté le: déc. 03, 2020. [En ligne]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21539/.
[56] M. Scianna, « An extended Cellular Potts Model analyzing a wound healing assay », *Comput. Biol. Med.*, vol. 62, p. 33-54, juill. 2015, doi: 10.1016/j.compbiomed.2015.04.009.
[57] A. L. Bauer, T. L. Jackson, et Y. Jiang, « Topography of Extracellular Matrix Mediates Vascular Morphogenesis and Migration Speeds in Angiogenesis », *PLOS Computational Biology*, vol. 5, nº 7, p. e1000445, juill. 2009, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000445.

[58] M. D. Guillemette *et al.*, « Surface topography induces 3D self-orientation of cells and extracellular matrix resulting in improved tissue function », *Int Bio (Cam)*, vol. 1, nº 2, p. 196-204, févr. 2009, doi: 10.1039/b820208g.
[59] T.-H. Wu, C.-H. Li, M.-J. Tang, J.-I. Liang, C.-H. Chen, et M.-L. Yeh, « Migration speed and directionality switch of normal epithelial cells after TGF-β1-induced EMT (tEMT) on micro-structured polydimethylsiloxane (PDMS) substrates with variations in stiffness and topographic patterning », *Cell Commun. Adhes.*, vol. 20, nº 5, p. 115-126, oct. 2013, doi: 10.3109/15419061.2013.833194.
[60] D. Cheng, R. K. Jayne, A. Tamborini, J. Eyckmans, A. E. White, et C. S. Chen, « Studies of 3D directed cell migration enabled by direct laser writing of curved wave topography », *Biofabrication*, vol. 11, nº 2, p. 021001, févr. 2019, doi: 10.1088/1758-5090/ab047f.
[61] J. I. Rosales-Leal *et al.*, « Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 365, nº 1, p. 222-229, août 2010, doi: 10.1016/j.colsurfa.2009.12.017.
[62] J. Han, N. V. Menon, Y. Kang, et S.-Y. Tee, « An in vitro study on the collective tumor cell migration on nanoroughened poly(dimethylsiloxane) surfaces », *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, nº 8, p. 1565-1572, févr. 2015, doi: 10.1039/C4TB01783H.
[63] L. Ponsonnet *et al.*, « Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour », *Materials Science and Engineering: C*, vol. 23, nº 4, p. 551-560, juin 2003, doi: 10.1016/S0928-4931(03)00033-X.
[64] A. Ranella, M. Barberoglou, S. Bakogianni, C. Fotakis, et E. Stratakis, « Tuning cell adhesion by controlling the roughness and wettability of 3D micro/nano silicon structures », *Acta Biomaterialia*, vol. 6, nº 7, p. 2711-2720, juill. 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.01.016.
[65] N. D. Gallant, K. E. Michael, et A. J. García, « Cell Adhesion Strengthening: Contributions of Adhesive Area, Integrin Binding, and Focal Adhesion Assembly », *Mol Biol Cell*, vol. 16, nº 9, p. 4329-4340, sept. 2005, doi: 10.1091/mbc.E05-02-0170.
[66] D. Arcizet *et al.*, « Contact-controlled amoeboid motility induces dynamic cell trapping in 3D-microstructured surfaces », *Soft Matter*, vol. 8, nº 5, p. 1473-1481, janv. 2012, doi: 10.1039/C1SM05615H.

Chapitre 5 : Effet de la rugosité sur la prolifération cellulaire : étude numérique

Sommaire

5.1. Implémentation du modèle CP 167
5.1.1. Modèle CP 167
5.1.1.1. La méthode CP 167
5.1.1.2. Hamiltonien d'adhésion 167
5.1.1.3. Hamiltonien de cohésion 167
5.1.1.4. Hamiltonien de motilité 168
5.1.1.5. Hamiltonien d'extension 168
5.1.1.6. Hamiltonien d'orientation 170
5.1.2. Implémentation de la prolifération 171
5.2. Résultats 172
5.2.1. Paramètres du modèle 172
5.2.2.1. Analyse de l'énergie de contact avec l'extérieur 173
5.2.2.2. Analyse de la rigidité cellulaire 175
5.2.2.3. Analyse de la motilité cellulaire 177
5.2.2.4. Analyse de l'extension cellulaire 179
5.2.2. Etude de surface de référence 180
5.2.3.1. Surface avec une topographie aléatoire 180
5.2.3.2. Surface rainurée : influence de la profondeur 182
5.2.3.3. Surface rainurée : influence de la largeur 184
5.2.3. Etude de surfaces SLM 186
5.2.4.1. Configuration de simulation 186
5.2.4.2. Résultats des différentes surfaces 187
5.3. Discussion 192
5.3.1. Apport du modèle CP multicellulaire 192
5.3.2. Validation et limitations du modèle 193
5.4. Conclusion 194
Références 195

Ce chapitre présente un modèle numérique de prolifération cellulaire, basé sur la méthode CP, prenant en compte l'influence de la rugosité.

5.1. Implémentation du modèle CP

5.1.1. Modèle CP

5.1.1.1. La méthode CP

Le modèle de prolifération s'appuie sur celui développé pour la migration unicellulaire (chapitre 4) et sur les travaux de Kabla et al [1] et de Li et al [2] sur la prolifération de cellules cancéreuses. Le domaine de simulation Ω est composé d'un réseau maillé en 2D de *m* site identiques. Chaque site est défini par un centroïde $x_i \in \mathbb{R}^2$ et par un label prenant la forme d'une valeur entière $\sigma(x_i) \in N$. Chaque site voisin à x_i est identifié par x_i'. Chaque sous-groupe σ est associé à un type τ : τ=E pour l'extérieur, τ =C pour les cellules. A chaque pas de Monte Carlo (MCS), le modèle réalise un calcul énergétique de la tentative de copie d'un index x_i à son voisin x_i' aléatoirement. Cette tentative génère une différence nette énergétique ΔH entre l'état avant copie et l'état après copie, suivant l'équation (2) du chapitre 4. La validation de cette copie se fait selon une fonction d'acceptation de Boltzmann, définie par l'équation (3) dans le chapitre 4.

Dans le cas de la prolifération, nous considérons cinq fonctions cellulaires, chacune décrite via un Hamiltonien : l'énergie d'adhésion $H_{adhésion}$ entre les cellules et leur environnement (i.e. substrat, médium ou cellule), l'énergie due à l'extension de la cellule $H_{extension}$, l'énergie due à l'alignement avec l'orientation de la surface $H_{orientation}$, l'énergie de cohésion $H_{cohésion}$ interne à chaque cellule et l'énergie $H_{motilité}$ liée à la motilité cellulaire.

5.1.1.2. Hamiltonien d'adhésion

L'Hamiltonien d'adhésion a été défini dans l'équation (5) au sein du chapitre 4. Dans le cas spécifique de la prolifération, le terme $J_{\sigma,\sigma'}$ peut avoir deux formes différentes :

- J_{CE} représentant l'adhésion entre les cellules et l'environnement, constitué par la surface et le médium.
- J_{CC} représentant l'adhésion entre les cellules. Afin de favoriser les interactions entre les cellules et l'extérieur de la population (composé d'une combinaison entre le médium et le substrat), on définit $J_{CC} > J_{CE}$.

5.1.1.3. Hamiltonien de cohésion

Contrairement au cas unicellulaire où les variations de surface et de volume étaient prises en compte, dans le cas de la prolifération seules les variations de surface sont calculées via l'Hamiltonien $\Delta H_{cohésion}$:

$$H_{cohésion} = \sum_{\sigma} \lambda_S (S_\sigma - S_{\sigma,0})^2 \tag{5.1}$$

Avec λ_S la rigidité de la cellule, S_σ et $S_{\sigma,0}$ la surface actuelle et cible de chaque cellule respectivement. $S_{\sigma,0}$ varie durant les différentes phases du cycle cellulaire, cet aspect qui sera décrit plus en détail dans la section 5.1.2.

5.1.1.4. Hamiltonien de motilité

Afin de prendre en compte la persistance du mouvement de chaque cellule, ainsi que l'énergie allouée à chaque cellule pour lui permettre de se déplacer, un terme de motilité $H_{motilité}$ est défini par :

$$H_{motilité} = \sum_{\sigma} -\lambda_M . \left(\frac{\vec{p} + \overrightarrow{v_\sigma}}{\|\vec{p} + \overrightarrow{v_\sigma}\|} \right) . \overrightarrow{\delta_{r_\sigma}} \tag{5.2}$$

avec λ_M le coefficient de motilité, $\overrightarrow{v_\sigma}$ le vecteur vitesse de la cellule σ, $\vec{p}$ le vecteur polarisation et $\overrightarrow{\delta_r}$ le déplacement du centre de masse (CM) de la cellule σ créé par la tentative de copie. La cellule conserve un mouvement aléatoire et en jouant sur λ_M, la probabilité d'acceptation est modifiée, avec un impact sur la vitesse moyenne ainsi que sur la direction de la cellule. Une étude de migration collective a été réalisée via ce terme dans l'annexe A.2.4. Dans le cadre de la seule prolifération, le vecteur polarisation est généralement pris nul ($\vec{p}$ =0).

5.1.1.5. Hamiltonien d'extension

Lors du déplacement d'une cellule, celle-ci va sentir son environnement et se déplacer selon la nature de celui-ci. Cette détection de l'environnement est réalisée par des extensions cytoplasmiques de différentes natures (filopode, pseudopode…). La prise en compte de la topographie dans notre modèle repose donc sur ce comportement, ainsi que sur d'autres études modélisant les interactions entre la cellule et le substrat [3], [4]. Au sein de notre modèle, nous supposons que pour pouvoir adhérer sur un site, la cellule va appliquer une déformation à sa membrane afin de pouvoir adhérer au site du substrat (MEC + surface). Cette déformation engendre une force associée dépendante de la forme de la cellule ainsi que de la topographie de la surface ; la cellule répond à cette force en adaptant sa morphologie.

On suppose que la MEC ainsi que la surface constituent une seule et même entité sous la forme d'un solide indéformable. En supposant qu'un élément i d'une cellule σ ($i \in \Omega_\sigma$ l'ensemble des sites composant la cellule σ) tire sur les autres éléments $j \in \Omega_\sigma$ de la même cellule avec une force proportionnelle à la distance d_{ij}, on est capable d'obtenir la force $\vec{F}_{\sigma,i}$ (force d'extension de la cellule σ estimée au site i) au niveau de chaque élément $i \in \Omega_\sigma$, sous la forme :

$$\vec{F}_{\sigma,i} = \begin{bmatrix} F_{\sigma,i,x} \\ F_{\sigma,i,y} \end{bmatrix} \tag{5.3}$$

Avec, $F_{\sigma,i,x}$ la composante selon X de $\vec{F}_{\sigma,i}$ et $F_{\sigma,i,y}$ la composante selon Y de $\vec{F}_{\sigma,i}$, prenant respectivement la forme de :

$$F_{\sigma,i,x} = \mu . \left(1 + K_\mu . |z_i - \bar{z}|\right) . \sum_j d_{ij,x} \quad avec \quad d_{ij,x} = x_i - x_j \tag{5.4}$$

x_k étant la composante selon X d'un site k ∈ Ω_σ quelconque.

et,

$$F_{\sigma,i,y} = \mu . \left(1 + K_\mu . |z_i - \bar{z}|\right) . \sum_j d_{ij,y} \quad avec \quad d_{ij,y} = y_i - y_j \tag{5.5}$$

y_k étant la position selon l'axe Y d'un site $k \in \Omega_\sigma$ quelconque.

où μ représente la tension de la membrane par unité de longueur, K_μ un coefficient d'élasticité de la membrane selon l'axe Z, z_i l'altitude de site i et $\bar{z}$ l'altitude moyenne de la cellule σ (calculé par la moyenne des altitudes des sites composant la cellule). Dans le cas où le site *i* appartient à l'extérieur (τ=E), $\vec{F}_{\sigma,i} = \vec{0}$. Les résultantes de ces forces sont orientées vers le centroïde de la cellule et elles sont proportionnelles à la distance du centroïde. Afin de pouvoir prendre en compte la 3ème dimension au niveau du site *i*, le calcul de la force à chaque élément a été modifiée afin de prendre en compte l'élévation *z*, via le terme $\left(1 + K_\mu.|z_i - \bar{z}|\right)$. Dans la suite de l'étude, le terme de force d'extension $\vec{F}_{\sigma,i}$ appliqué à un site quelconque *i* d'une cellule quelconque σ sera nommé $\vec{F}_\sigma$. La figure 5.1 montre le champ de $\vec{F}_\sigma$ pour deux configurations de surfaces : sans topographie (figure 5.1a et b) et topographie aléatoire (figure 5.1c et d).

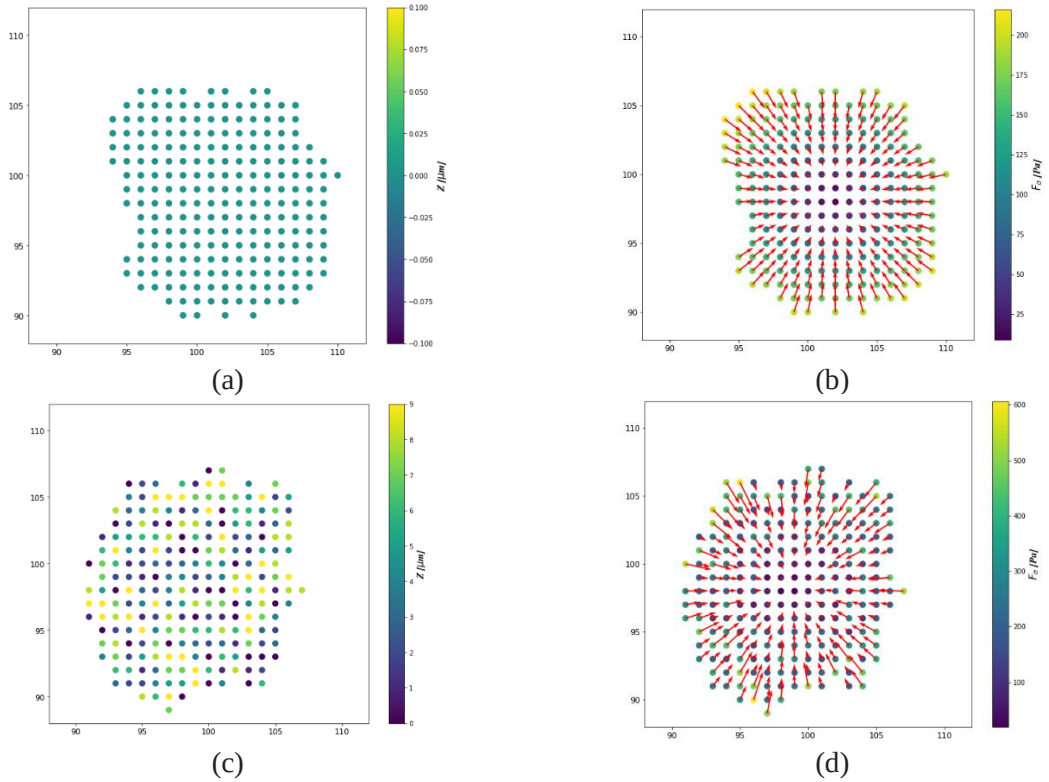


Figure 5.1 : Distribution des forces d'extension à deux cas : cellule sur une surface sans topographie (a et b) et cellule sur une surface avec une topographie aléatoire (c et d). (a) et (c) montrent les sites composant la cellule avec leurs élévations ; (b) et (d) donne l'estimation des forces d'extension $\overrightarrow{F_\sigma}$ au niveau de chaque site de la cellule.

Les forces d'extension ainsi engendrées afin d'adhérer à un site sont alors calculées et prennent la forme d'une force compressive. De ce fait, la copie de pixel est donc pénalisée par l'augmentation de la variation d'élévation. Cet hamiltonien $H_{extension}$ prend la forme suivante :

$$H_{extension} = \sum_x \sum_{x'} \left[g(x,x').\lambda_e.\left(\vec{x} - \vec{x'}\right).\overrightarrow{F_{\sigma(x),x}} \right] \tag{5.6}$$

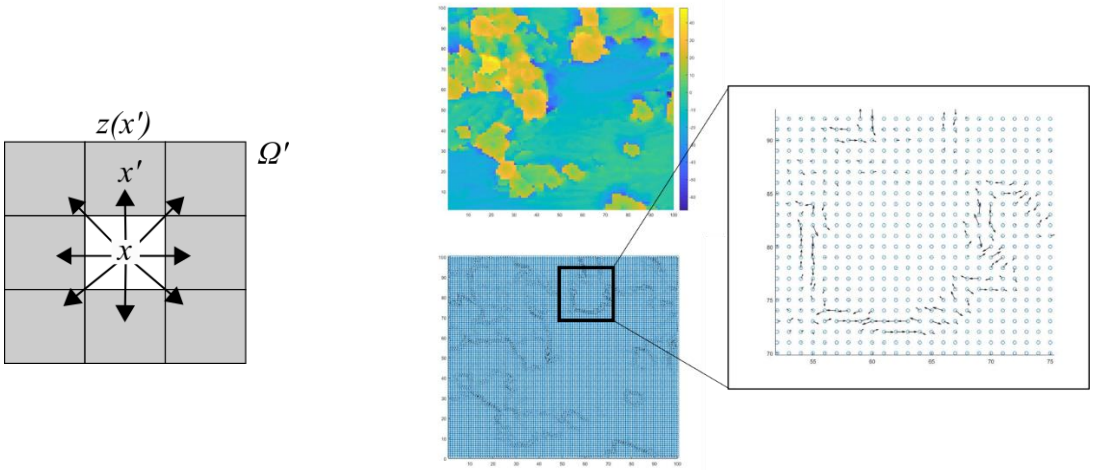
Avec

$$g(x,x') = \begin{cases} -1 & en\ extension \\ 1 & en\ rétraction \end{cases} \tag{5.7}$$

$\vec{x} - \vec{x'}$ représente la direction de la copie (qui est donc opposée à la direction de création du pixel), λ_e définit un module mécanique, et $\overrightarrow{F_{\sigma(x),x}}$ définit la force générée lors de l'extension de la cellule vers du site *x* où la tentative de copie d'index est appliquée.

5.1.1.6. Hamiltonien d'orientation

La carte de la polarisation de la surface est réalisée afin de pouvoir prendre en compte la capacité d'une cellule à percevoir son environnement et adapter son comportement.



(a) *(b)*

Figure 5.2 : Démarche afin de déterminer l'orientation locale de la surface. (a) Calcul de l'orientation de la surface au niveau d'un site x. (b) Carte des vecteurs orientation d'une surface.

Pour cela, on calcule un vecteur orientation $\vec{p}_{x,0}$ en chaque site *x* de la surface via une comparaison de proche en proche (voir la figure 5.2a), sous la forme :

$$\overrightarrow{p_{x,0}} = \sum_{x' \in \Omega'} |z(x') - z(x)|.\left(\vec{x} - \vec{x'}\right) \tag{5.8}$$

Avec *Ω'* l'espace des sites voisins à *x*, *x'* un site voisin quelconque de *x*, *z(x)* l'altitude du site *x* et *z(x')* l'altitude du site *x'*. A partir de ce vecteur $\overrightarrow{p_{x,0}}$, on obtient le vecteur polarisation $\overrightarrow{p_x}$ via une rotation de 90°.

$$\overrightarrow{p_x} = \begin{bmatrix} cos\left(\frac{\pi}{2}\right) & -sin\left(\frac{\pi}{2}\right) \\ sin\left(\frac{\pi}{2}\right) & cos\left(\frac{\pi}{2}\right) \end{bmatrix} . \overrightarrow{p_{x,0}} \tag{5.9}$$

Ce vecteur $\overrightarrow{p_x}$ est alors injecté dans un terme énergétique $H_{orientation}$ qui va comparer la direction de copie $\vec{x} - \vec{x'}$ à la direction de polarisation $\overrightarrow{p_x}$ du site *x* :

$$H_{orientation} = \sum_{x,x'} \lambda_o . \left(\vec{x} - \vec{x'}\right) . \overrightarrow{p_x} \tag{5.10}$$

Avec λ_o un coefficient d'orientation, représentant la sensibilité du modèle à l'orientation locale de la surface. Les données d'élévation *z* utilisées au sein du modèle sont importées de données de surfaces réelles obtenues par scans profilométriques (voir le chapitre 2).

5.1.2. Implémentation de la prolifération

La prolifération cellulaire est régie par le cycle de vie cellulaire, composé de deux phases majeures : l'interphase et la mitose. L'interphase se décompose en 3 sous-phases : (i) la phase G1 où la cellule croît et prépare la synthèse de l'ADN, (ii) la phase S où la cellule synthétise de l'ADN et (iii) la phase G2 où la cellule continue de croître et se prépare à la mitose [5]. Une quatrième phase existe, la phase M de mitose qui consiste en la création de deux cellules filles identiques à la cellule mère d'origine. Après cette phase, une phase G0 à lieu pendant laquelle la cellule devient inactive [5].

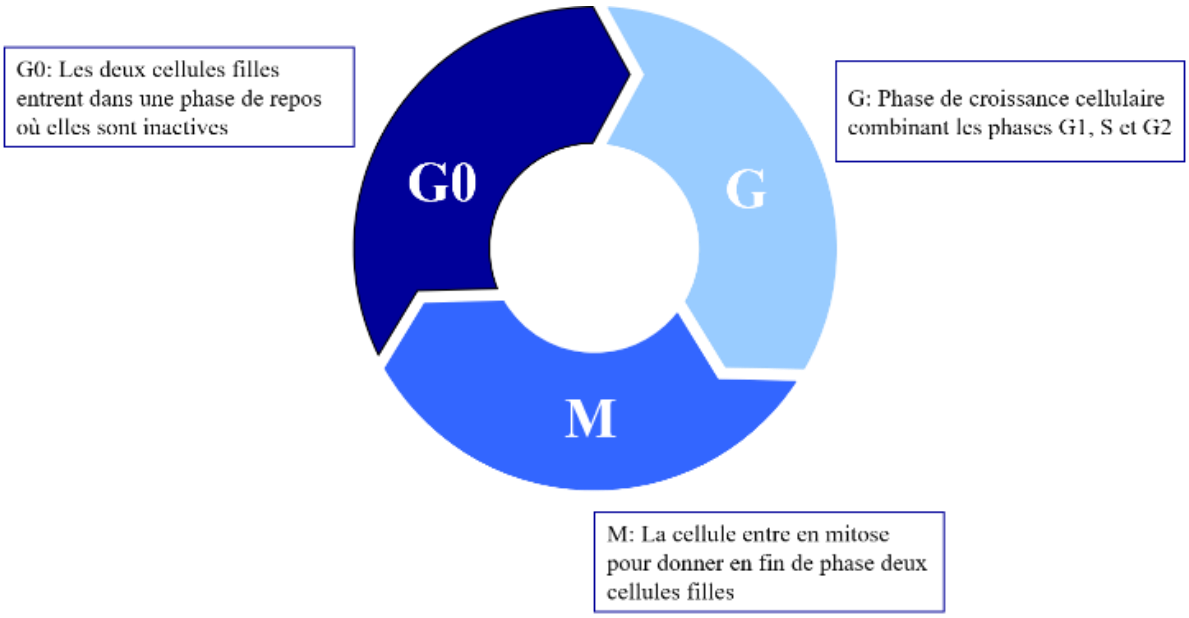


Figure 5.3 : Cycle cellulaire modifié modélisé au sein de notre modèle.

Pour notre modèle, le cycle cellulaire est approximé par deux phases principales : la croissance de la cellule (G1) et la mitose (M) (figure 5.3). Durant les phases de croissances G1 et G2, les cellules augmentent leurs volumes en produisant des macromolécules et des organelles, en se préparant à la duplication de l'ADN et la mitose. Dans notre modèle, ce phénomène est décrit par une augmentation incrémentale des surfaces S_σ et $S_{\sigma,0}$ et un timer (adaptée du modèle de Li et al [2]) (figure 5.4). Après un pas de prolifération φ, le ratio entre la surface cible et la surface actuelle est calculé et une probabilité $P_{croissance}$ est définie à partir de ce ratio :

$$P_{croissance}\left(\frac{S_{\sigma,0}}{S_\sigma}\right) = \begin{cases} 0.5, & S_\sigma > S_{\sigma,0} \\ 5.5 - 5 * \dfrac{S_\sigma}{S_{\sigma,0}}, & 1 \leq \dfrac{S_{\sigma,0}}{S_\sigma} \leq 1.1 \\ 0, & autrement \end{cases} \tag{5.11}$$

Ainsi, la croissance est défavorisée dans le cas où la surface de la cellule est inférieure à la surface cible, signe que la cellule σ est compressée et que donc elle ne peut pas croître. Une fois la probabilité acceptée, la surface est augmentée de 5 pixels par rapport à la surface cible initiale et φ revient à sa valeur initiale. Cette augmentation de 5 pixels garantit une augmentation n'affectant pas le comportement de la cellule σ.

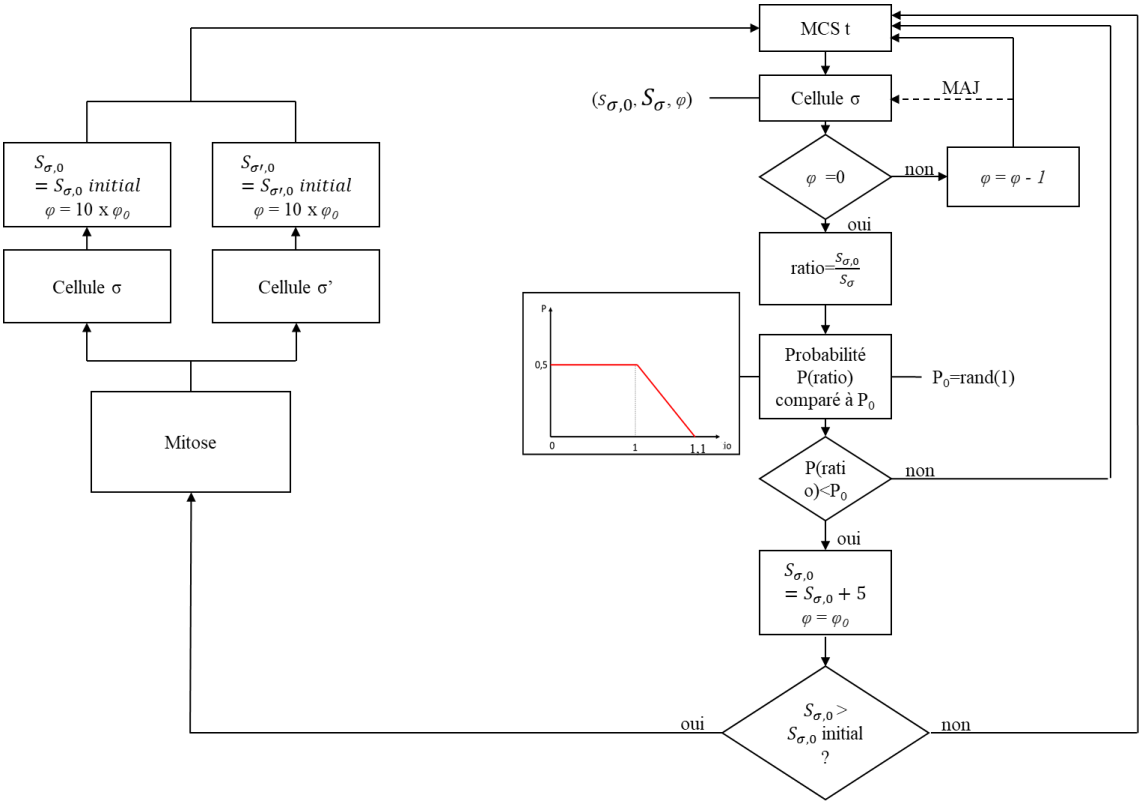


Figure 5.4 : Description de l'algorithme de croissance cellulaire et de mitose. $S_{\sigma,0,initial}$ définit la surface cible défini à l'état initial dans le modèle ; φ_0 définit le pas de prolifération à l'état initial dans le modèle

Une fois que la cellule σ a atteint une surface supérieure ou égale à deux fois la surface initiale, la croissance s'arrête et la mitose démarre. La mitose est ici modélisée par une division de la cellule en deux cellules σ et σ' de surface égale, selon l'axe d'orientation de la cellule σ. Cet axe d'orientation est obtenu en approximant la cellule par une ellipse et en calculant l'orientation de son grand axe. Enfin, le pas de prolifération des deux cellules est défini à dix fois sa valeur initiale afin de modéliser la phase G0 de repos des cellules.

5.2. Résultats

5.2.1. Paramètres du modèle

Dans cette partie, les paramètres CP ont été étudiés afin de déterminer leur influence sur la prolifération cellulaire. Le lattice est un carré de dimensions 500 µm x 500 µm avec des conditions aux limites fixes (i.e. les frontières délimitant l'environnement sont considérées comme des murs infranchissables). Chaque site définit un carré de dimension 2.5 µm x 2.5 µm et chaque cellule a une forme initiale d'un cube de 15 pixels, formant une surface cible de 225 pixels, soit 1405 µm². La température T est fixée à 2.5 x 10^{-27} kg/m²s² ; J_{CE} et J_{CC} sont égaux à 4 x 10^{-15} kg/s² et 5 x 10^{-15} kg/s² respectivement ; λ_S est fixé à 1 x 10^{-3} kg/s²m² et λ_M est fixé à 0.125 x 10^{-18} kg/s²m³ ; les paramètres de détection de la topographie μ , K_μ, λ_F et λ_o prennent respectivement 1 Pa/µm, 0.25 µm^{-1}, 0.01 kg/s².Pa.m et 20 kg/s².m afin de garantir la détection de la rugosité par la cellule. Un MCS est égal à 4 min et le temps de simulation est de 3000 MCS, soit environ 7 jours. L'ensemble des paramètres du modèle sont définis dans le tableau 5.1. Une étude de sensibilité a été réalisée afin de choisir les paramètres et de le comparer au modèle unicellulaire 3D du chapitre 4 ; les résultats sont présentés au sein de l'annexe A.2.

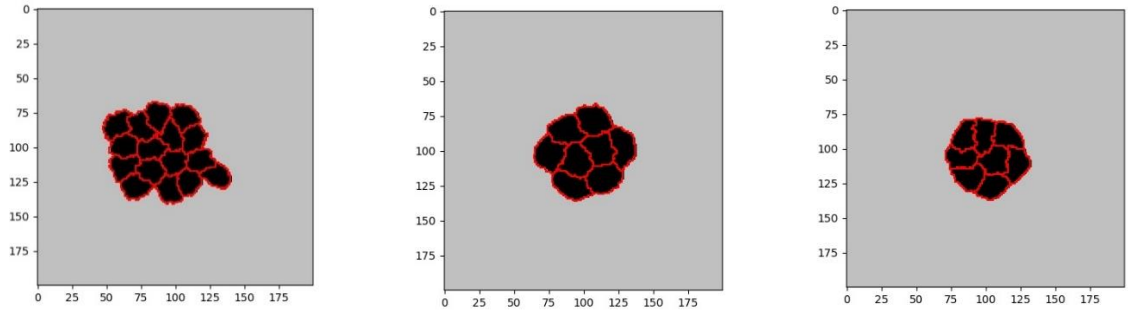
Description	Symbole	Valeur	Unité
Pas	t	3000	MCS
Température	T	2.5 x 10^{-27}	kg m²/s²
Domaine lattice	Ω	200 x 200	pixel
Surface cible à l'état initial	$S_{\sigma,0}$	225 (1405)	pixel (µm²)
Lambda surface	λ_S	50 x 10^{-9}	kg/s²m³
Lambda motilité	λ_M	0.125 x 10^{-18}	kg/s²m³
Lambda extension	λ_e	0.01	kg/s².Pa.m
Lambda orientation	λ_o	20	kg/s².m
Adhésion cellule/cellule	J_{CC}	5 x 10^{-15}	kg/s²
Adhésion cellule/extérieur	J_{CE}	4 x 10^{-15}	kg/s²
Force unitaire	μ	1	Pa. µm^{-1}
Coefficient d'élévation	K_μ	0.25	µm^{-1}
Pas de prolifération	φ	10	-

Table 5.1 : Paramètres du modèle CP

Afin de caractériser la prolifération cellulaire, les paramètres suivants sont mesurés : le nombre de cellules ; l'aire de la population de cellules. Dans le cas d'une surface avec une topographie structurée (rainure…), la morphologie de la population est aussi mesurée via son élongation, calculée via l'approximation de la population par une ellipse et l'estimation du petit axe et du grand axe.

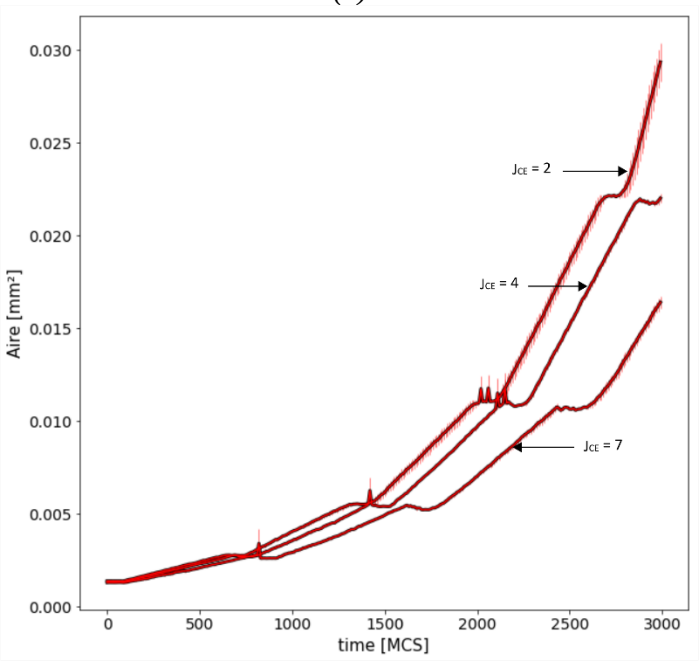
5.2.1.1. Analyse de l'énergie de contact avec l'extérieur

La figure 5.5 montre la morphologie (a) et l'aire de la population de cellules (b) pour trois différents paramètres d'adhésion à l'extérieur (J_{CE} =2, 4 et 7 kg.s^{-2}) sous la forme de courbes de moyennes et d'écart-types obtenues pour 10 simulations. Les résultats montrent que les cellules présentant le J_{CE} le plus faible croîssent plus rapidement que les autres. La montée en escalier observée sur les courbes de croissance vient de la phase G0 de 100 MCS appliquée aux cellules après la phase de de mitose. La littérature nous dit qu'un MEC riche avec une meilleur absorption du substrat améliore la réponse cellulaire, dont la prolifération [6]. Au sein de notre modèle, une meilleure communication entre la cellule et l'extérieur se traduit par un J_{CE} plus faible, favorisant énergétiquement la croissance cellulaire avec une réduction de la compression des cellules.



(i) J_{CE}=2 *(ii) J_{CE} =4* *(iii) J_{CE} =7*

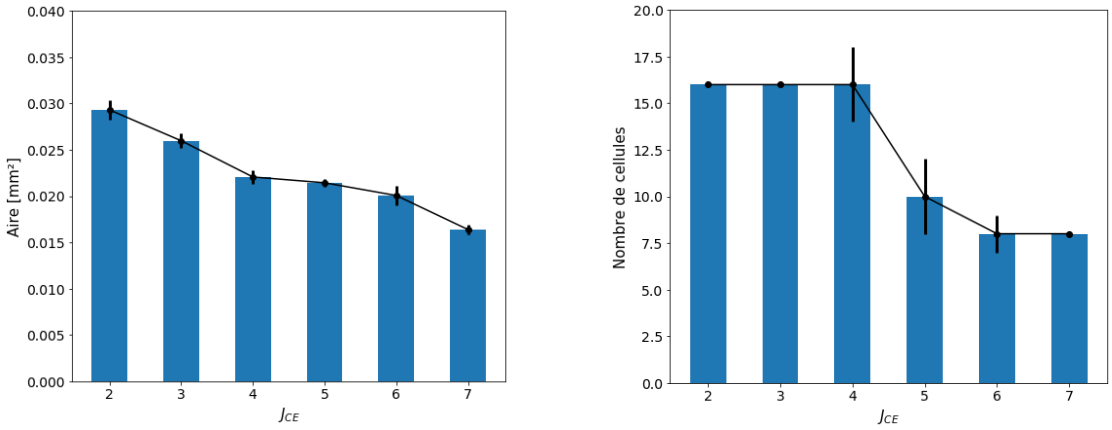
(a)



(b)

Figure 5.5 : Résultats des simulations de prolifération cellulaire pour différentes valeurs de J_{CE}. (a) Morphologie de la population de cellules selon les différentes valeurs de J_{CE} à t=3000 MCS. (b) Courbes de croissance cellulaire sur une période de 3000 MCS pour différentes valeurs de J_{CE}.

Les résultats présentés dans la figure 5.6 vont dans ce sens, avec le plus faible J_{CE} engendrant la plus forte croissance cellulaire en aire ainsi qu'en nombre de cellules. On peut ajouter que cette observation est soutenue par la figure 5.5.a.i, avec le cluster de cellules affichant une forme plus « éclatée » à faible J_{CE} tandis qu'une forme circulaire est observée pour des valeurs importantes de J_{CE}.



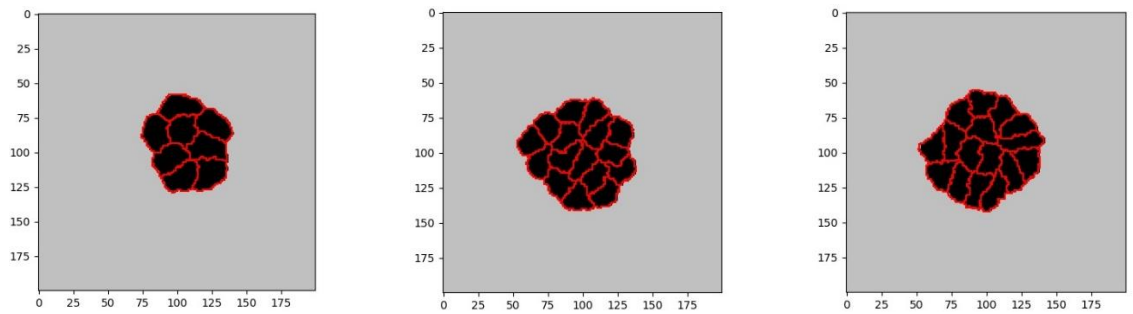
(a) *(b)*

Figure 5.6 : Evolution de la prolifération cellulaire selon J_{CE}. (a) Aire totale de la population de cellule à t=3000 MCS. (b) Nombre de cellules à t=3000 MCS.

Ces résultats montrent que l'énergie d'adhésion J_{CE} agit comme une énergie compressive qui, en fonction de sa valeur, favorise ou non la prolifération cellulaire.

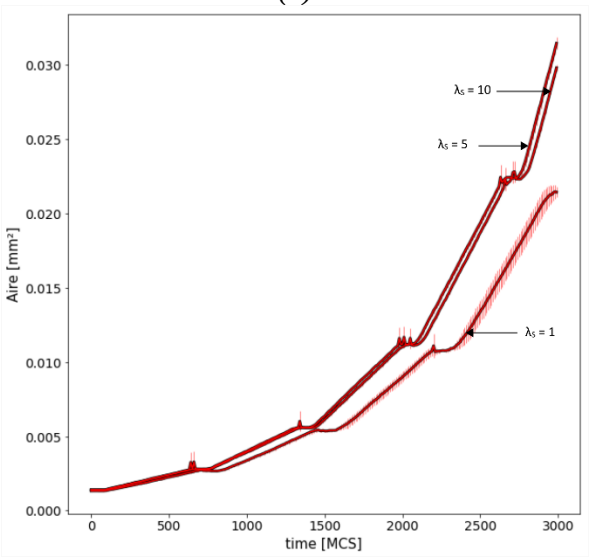
5.2.1.2. Analyse de la rigidité cellulaire

Les résultats présentés dans la figure 5.7 donnent l'évolution de la morphologie de la population de cellules ainsi que les courbes de croissance pour trois différentes valeurs de rigidité cellulaires (λ_S =1, 5 et 10 10^{-9} kg/s²m³). Les résultats montrent une prolifération cellulaire plus faible pour les clusters de cellules ayant un faible λ_S par rapport à ceux présentant un grand λ_S. De plus, une plus grande variation de l'aire est observée pour un plus faible λ_S. En termes de morphologie, la population de cellules garde une forme circulaire quel que soit la valeur de λ_S.



(i) λ_S=1 *(ii) λ_S =5* *(iii) λ_S =10*

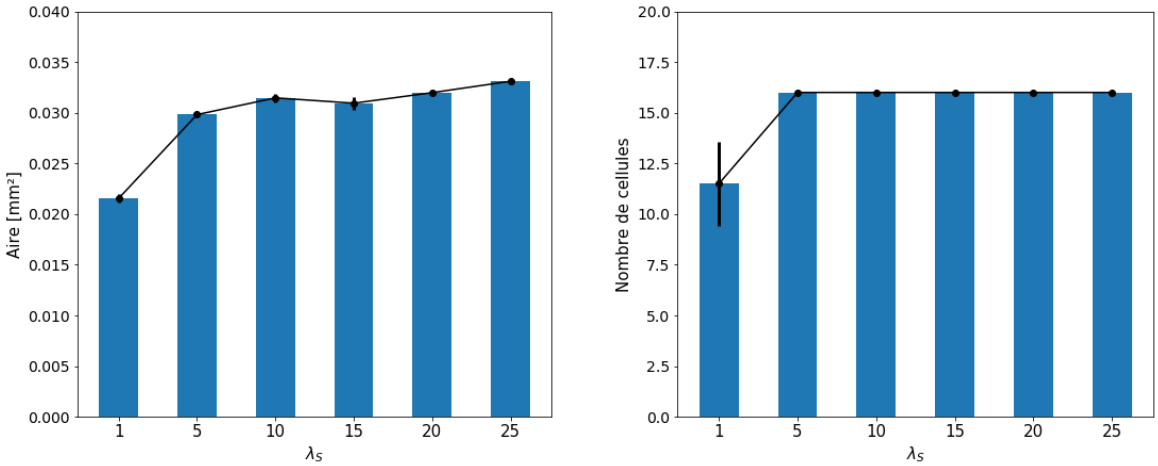
(a)



(b)

Figure 5.7 : Résultats des simulations de prolifération cellulaire pour différentes valeurs de λ_S. (a) Morphologie de la population de cellules selon les différentes valeurs de λ_S à t=3000 MCS. (b) Courbes de croissance cellulaire sur une période de 3000 MCS pour différentes valeurs de λ_S

On retrouve les mêmes résultats sur la figure 5.8, avec un plus grand λ_S donnant une aire de cluster plus importante ainsi qu'un nombre de cellules plus élevé. D'un point de vue expérimental, bien que de nombreuses études ont montré l'effet bénéfique d'une forte rigidité du substrat sur la prolifération cellulaire, l'influence de la rigidité de la cellule elle-même n'est pas quelque chose de vraiment étudié à ma connaissance. Cependant, des modèles de tumeurs ont montré une prolifération moins importante lorsque la population de cellules est soumise à une compression. Au sein de notre modèle, les cellules avec un plus grand λ_S sont moins soumises à la compression et vont donc suivre plus précisément leur aire cible, permettant la mise en place de la mitose. Ce phénomène fut aussi étudié par J. Li et al [2] et ils arrivèrent au même conclusion. On peut aussi ajouter que le terme de cohésion cellulaire, géré par la rigidité cellulaire λ_S, est le terme d'ordre 1 au sein du modèle CP car il est responsable du maintien à une aire constante de la cellule. Ainsi, ce terme prend le pas sur l'ensemble des autres comportements cellulaires.

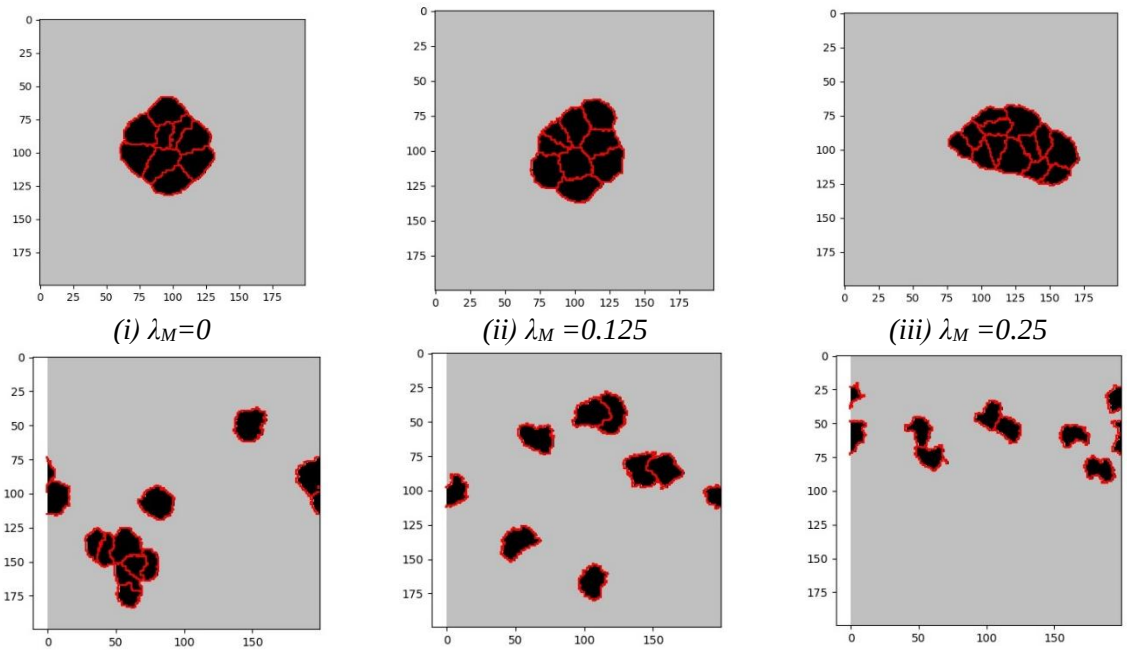


(a) *(b)*

Figure 5.8 : Evolution de la prolifération cellulaire selon la rigidité cellulaire λ_S. (a) Aire totale de la population de cellule à t=3000 MCS. (b) Nombre de cellules à t=3000 MCS.

5.2.1.3. Analyse de la motilité cellulaire

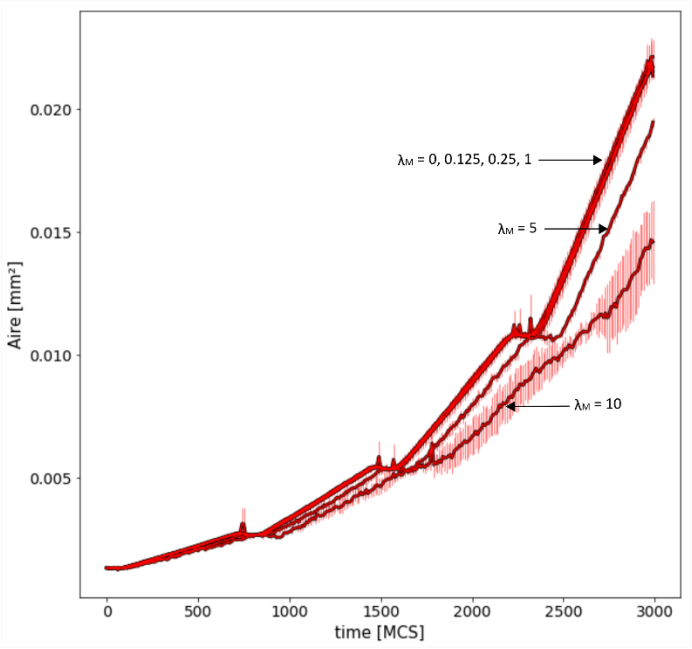
Les résultats présentés dans la figure 5.9a ainsi que dans la figure 5.9b montrent l'évolution de la morphologie de la population de cellules ainsi que la courbe de croissance cellulaire pour différentes valeurs de motilité cellulaire (λ_M =0, 0.125, 0.25, 1, 5, 10 10^{-18} kg/s²m³). Les résultats montrent une absence d'incidence de la motilité cellulaire pour une faible valeur de λ_M (λ_M <1). Cependant, pour des valeurs de grandes valeurs de λ_M (λ_M ≥1), on observe une baisse de la croissance cellulaire avec un éclatement de la population.



(i) λ_M=0 *(ii) λ_M =0.125* *(iii) λ_M =0.25*

(iv) λ_M=1 *(v) λ_M =5* *(vi) λ_M =10*

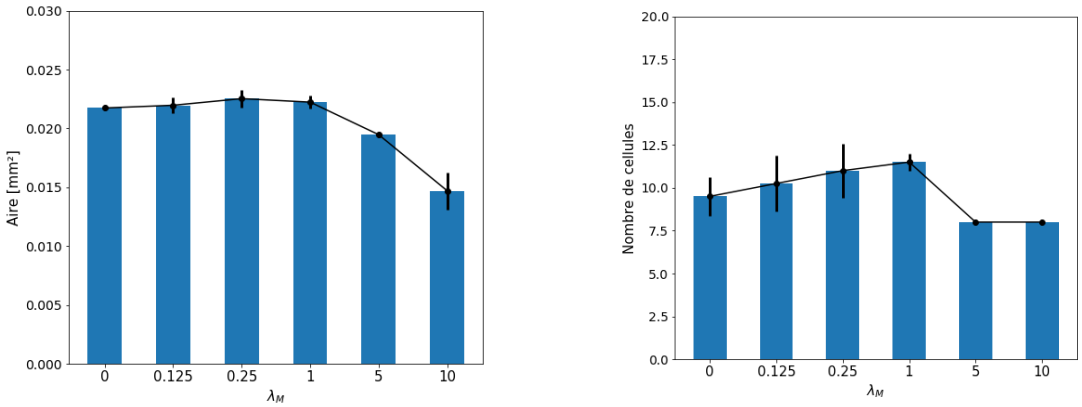
(a)



(b)

Figure 5.9 : Résultats des simulations de prolifération cellulaire pour différentes valeurs de λ_M. (a) Morphologie de la population de cellules selon les différentes valeurs de λ_M à t=3000 MCS. (b) Courbes de croissance cellulaire sur une période de 3000 MCS pour différentes valeurs de λ_M

La figure 5.10 valide ces observations, avec notamment une diminution du nombre de cellules. Cependant, avant cette diminution, une augmentation du nombre de cellules est observée par rapport à λ_M =0 malgré aucune différence significative au niveau de la surface totale. En supposant que l'on se situe au moment où les cellules entrent en mitose, on suppose qu'un plus grand λ_M favorise le phénomène de mitose.



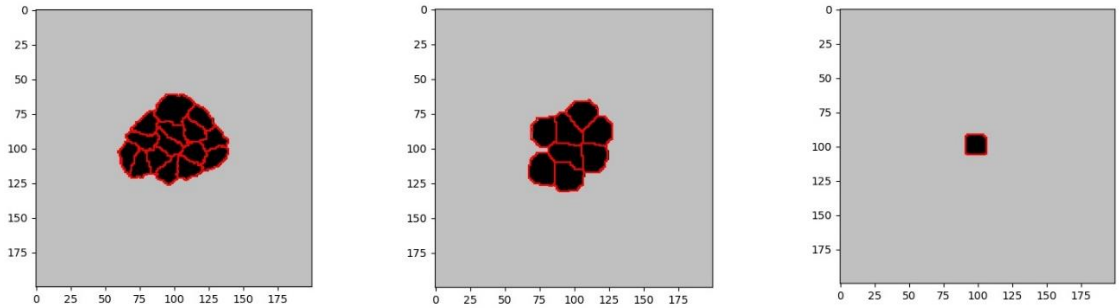
(a) *(b)*

Figure 5.10 : Evolution de la prolifération cellulaire selon λ_M. (a) Aire totale de la population de cellule à t=3000 MCS. (b) Nombre de cellules à t=3000 MCS.

En accord avec J. Li et al [2], on pourrait supposer que, lorsque la motilité est faible, les cellules sont plus en contact les unes avec les autres, induisant une compétitivité ainsi qu'une compression à l'intérieur de la population. Au contraire, les cellules ayant une forte motilité se retrouveraient diffusées, avec donc moins de compétition afin de pouvoir croître. Cependant, notre modèle montre que cela n'est pas le cas, avec une prolifération plus importante sur les cellules les moins mobiles.

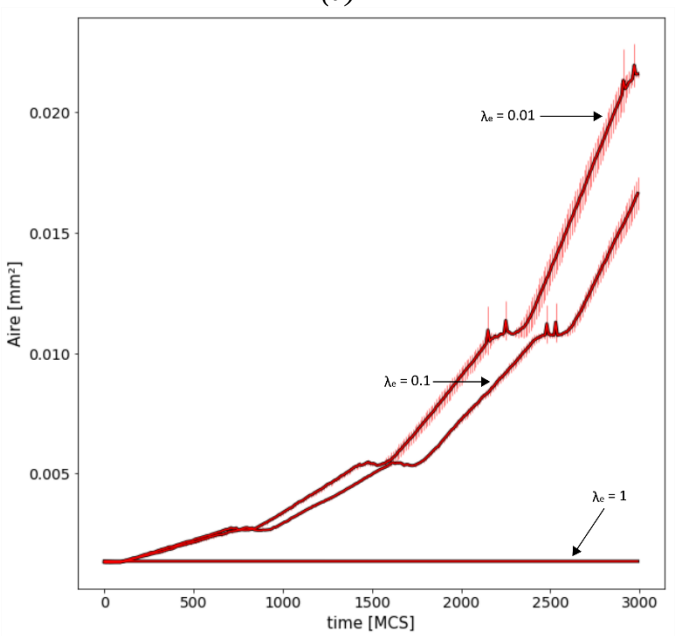
5.2.1.4. Analyse de l'extension cellulaire

La figure 5.11 présente la morphologie (a) et les courbes de croissance (b) de la population de cellules pour différentes valeurs de λ_e (λ_e =0.01, 0.1 et 1). En termes de morphologie, le cluster de cellules garde une forme circulaire à faible valeur de λ_e (λ_e =0.01). Cependant, à plus grande valeur de λ_e (λ_e =0.1), la population adopte une forme plus rigide avec des frontières linéaires entre les cellules. Ces formes adoptées ne sont pas naturelles et témoignent d'une limite énergétique importante du système. Pour une grande valeur de λ_e (λ_e =1), le système est fixe avec aucun mouvement cellulaire ainsi qu'une prolifération. Ces résultats sont validés par les différentes courbes de croissance, montrant une croissance importante pour les clusters affichant un λ_e faible.



(a) λ_e =0.01 *(b) λ_e =0.1* *(c) λ_e =1*

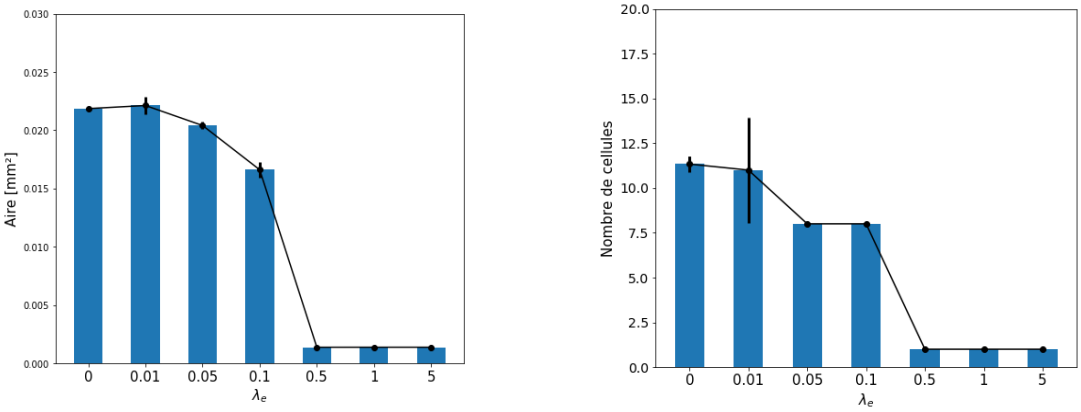
(a)



(b)

Figure 5.11 : Résultats des simulations de prolifération cellulaire pour différentes valeurs de λ_e. (a) Morphologie de la population de cellules selon les différentes valeurs de λ_e à t=3000 MCS. (b) Courbes de croissance cellulaire sur une période de 3000 MCS pour différentes valeurs de λ_e

Les résultats présentés au sein de la figure 5.12 valident les observations précédentes, avec notamment une baisse de l'aire du cluster (a) ainsi que du nombre de cellules (b) en fonction de λ_e. Le paramètre λ_e peut donc être défini comme la capacité d'extension cytoplasmique de la cellule, définie par la création de filopodes et de lamellipodes. Une grande valeur de λ_e inhibe l'extension cytoplasmique de la cellule, réduisant sa capacité à adhérer au substrat. Dans le cas d'un λ_e faible (λ_e~0.01), l'extension cytoplasmique est favorisée, favorisant une adhésion avec l'environnement et donc la prolifération cellulaire.



(a) *(b)*

Figure 5.12 : Evolution de la prolifération cellulaire selon λ_e. (a) Aire totale de la population de cellule à t=3000 MCS. (b) Nombre de cellules à t=3000 MCS.

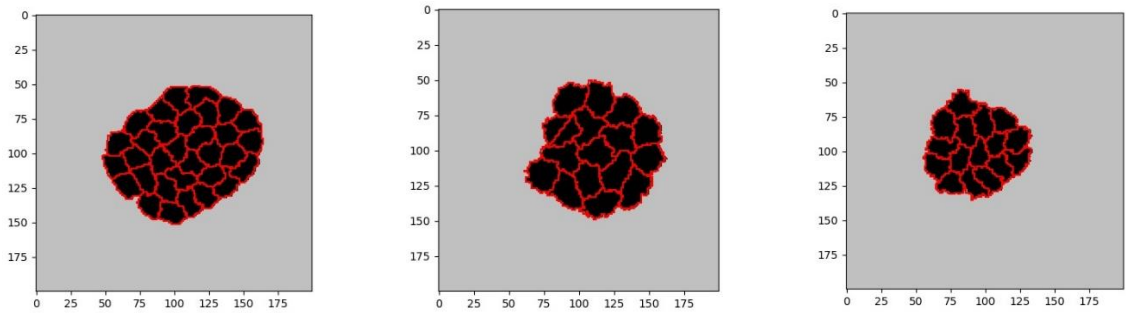
5.2.2. Etude de surface de référence

Au sein de cette partie, la prolifération cellulaire a été testée sur différentes topographies de surface. La configuration de simulation suit celle définie au sein de la section 5.2.2, i.e. un lattice prend la forme d'un carré de longueur 500 µm x 500 µm avec une population initiale composée d'une seule cellule qui prolifère. Seul le temps de simulation a été modifié, pour atteindre une durée totale de 4000 MCS, correspondant à une durée d'environ 11 jours. Les paramètres CP sont ceux définis au sein du tableau 5.1.

5.2.2.1. Surface avec une topographie aléatoire

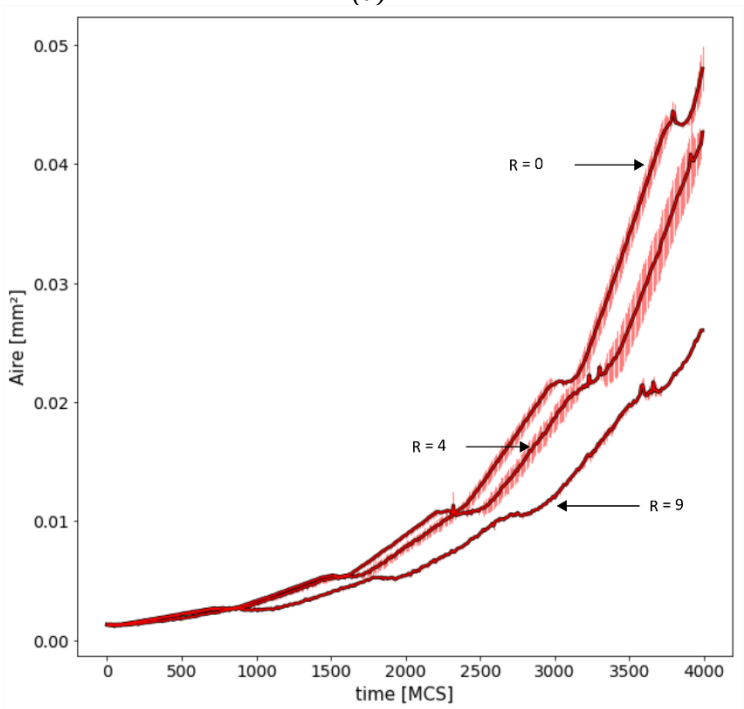
Une étude de la prolifération cellulaire sur une surface avec topographie aléatoire a été réalisée. Cette surface est définie selon l'équation (4.9) définie dans la section 4.2.2.2, prenant aléatoirement une valeur d'altitude dans l'intervalle [0 ; R] avec R l'altitude maximale.

La figure 5.13 présente la morphologie prise par la population de cellules (a) ainsi que l'évolution de son aire (b) en fonction des différentes valeurs de R. Les résultats montrent que la population est d'autant plus importante que la valeur de R est faible, signe qu'une grande rugosité a pour effet de diminuer la croissance cellulaire.



(i) R=0 µm *(ii) R=4 µm* *(iii) R=9 µm*

(a)



(b)

Figure 5.13 : Résultats des simulations de prolifération cellulaire pour différentes valeurs de R. (a) Morphologie de la population de cellules selon les différentes valeurs de R à t=4000 MCS. (b) Courbes de croissance cellulaire pour différentes valeurs de R.

La figure 5.14 montre l'évolution de cette croissance cellulaire pour différentes valeurs de R. L'augmentation de R coïncide avec la diminution de l'aire totale du cluster (figure 5.14a) ainsi que du nombre total de cellules composant le cluster (figure 5.14b). Aucune élongation spécifique n'est observée pour les différentes valeurs de R (figure 5.14c). En termes de courbes de croissance, l'écart-type de l'aire du cluster diminue avec l'augmentation de la valeur de R. Cela montre une compression plus forte exercée sur le cluster.

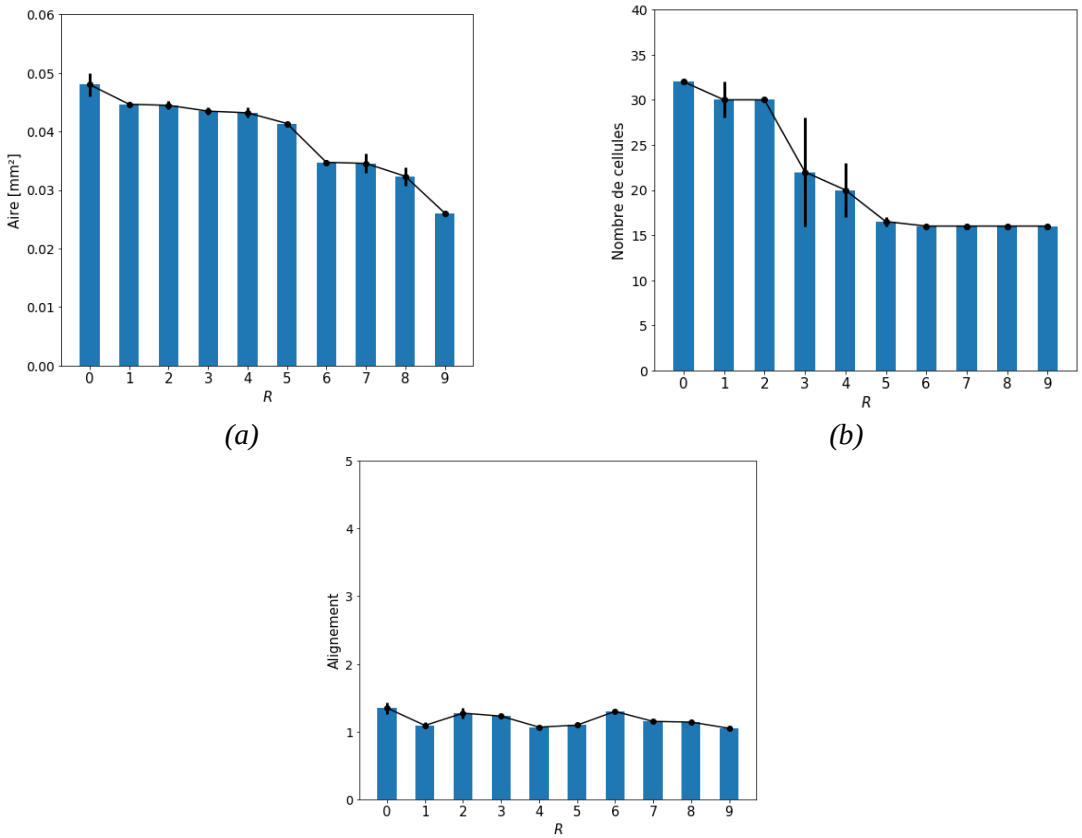


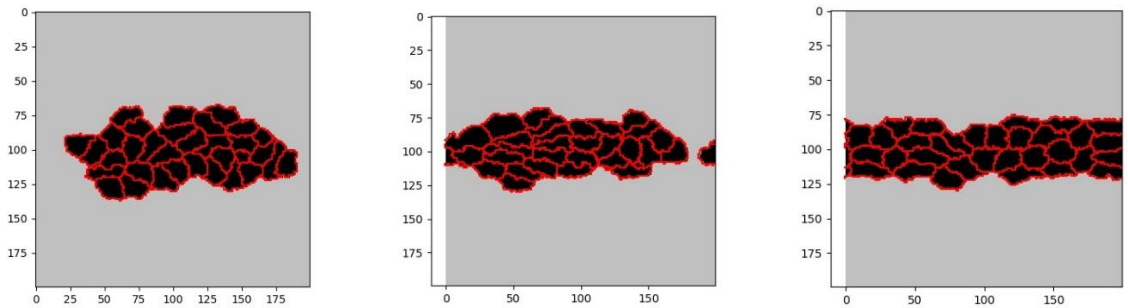
Figure 5.14 : Evolution de la prolifération cellulaire sur une surface aléatoirement rugueuse suivant une augmentation du paramètre R (en µm). (a) Aire totale de la population de cellule à t=4000 MCS. (b) Nombre de cellules à 4000 MCS. (c) Elongation de la population de cellule à t=4000 MCS.

En comparant par rapport aux résultats observés pour le modèle unicellulaire, une corrélation semble exister entre la motilité cellulaire et la prolifération cellulaire. On suppose donc que ces deux mécanismes cellulaires sont affectés de la même manière par la rugosité, avec une inhibition de la migration ainsi que la prolifération cellulaire sur ce type de surface. Cela met donc en avant l'effet inhibant de l'amplitude de la rugosité.

5.2.2.2. Surface rainurée : influence de la profondeur

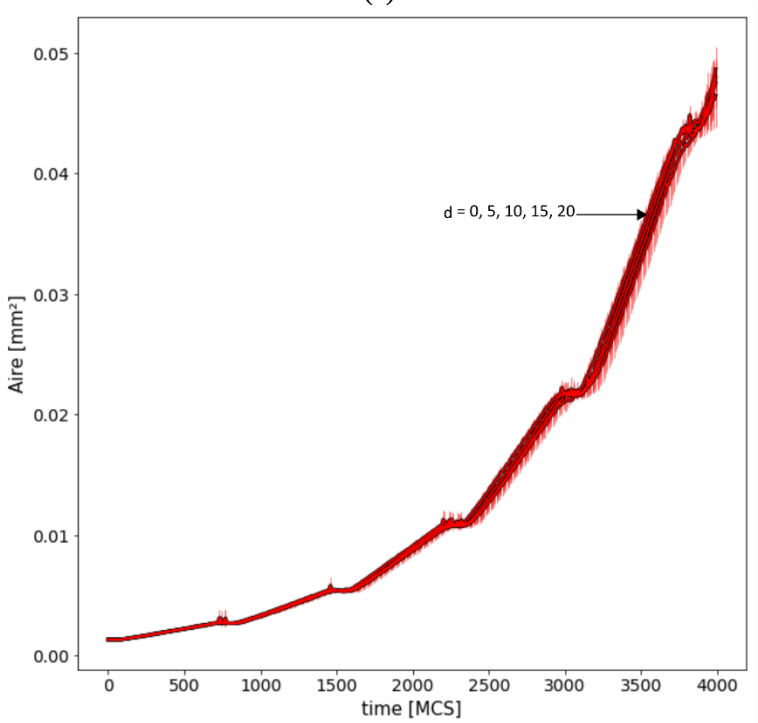
Une étude de prolifération sur une surface rainurée a été réalisée. Cette surface suit l'équation (4.10) et (4.11) définie dans la section 4.2.2.2, avec une rainure définie par sa largeur *w* et sa profondeur *d*. Au sein de cette partie, la largeur *w* a été fixée à 20 µm et 4 différentes valeurs de profondeur *d* ont été choisies : 5, 10, 15, et 20 µm. Pour chaque surface, les simulations ont été appliquées sur des rainures orientée à 0° ainsi qu'à 90°. De plus, une simulation de référence avec une surface sans topographie (i.e. *d*=0) a aussi été réalisée.

La figure 5.15 montre l'évolution de la morphologie de la population (a) ainsi que les courbes de croissances (b) pour différentes valeurs de d (5, 10, 20 µm). En termes de courbes de croissance, aucune différence significative n'a été observée pour les différentes valeurs de d. Cependant, des différences significatives sont observées en termes de morphologie du cluster de cellules. En effet, une élongation des cellules avec les rainures est observée pour les trois valeurs de d. Cette élongation augmente avec la profondeur des rainures, avec les cellules s'alignant avec les rainures selon l'augmentation des rainures.



(i) d=5 μm (ii) d=10 μm (iii) d=20 μm

(a)



(b)

Figure 5.15 : Résultats des simulations de prolifération cellulaire pour différentes valeurs de d. (a) Morphologie de la population de cellules selon les différentes valeurs de d à t=4000 MCS. (b) Courbes de croissance cellulaire pour différentes valeurs de d

La figure 5.16 montre l'évolution de la prolifération au sein de la population de cellules, sous la forme de l'aire du cluster (a), du nombre de cellules qui composent le cluster (b) ainsi que l' élongation du cluster (c). En termes de croissance, les résultats rejoignent les résultats précédents avec aucune différence significative en termes d'aire de population ainsi qu'en termes de nombre de cellules. Cependant, une augmentation d'élongation est observée avec une profondeur d jusqu'à 15. Cet arrêt d'élongation est dû à l'environnement de simulation, avec les cellules arrivant aux limites du cadre selon l'axe x, ne donnant aux cellules que la migration selon y.

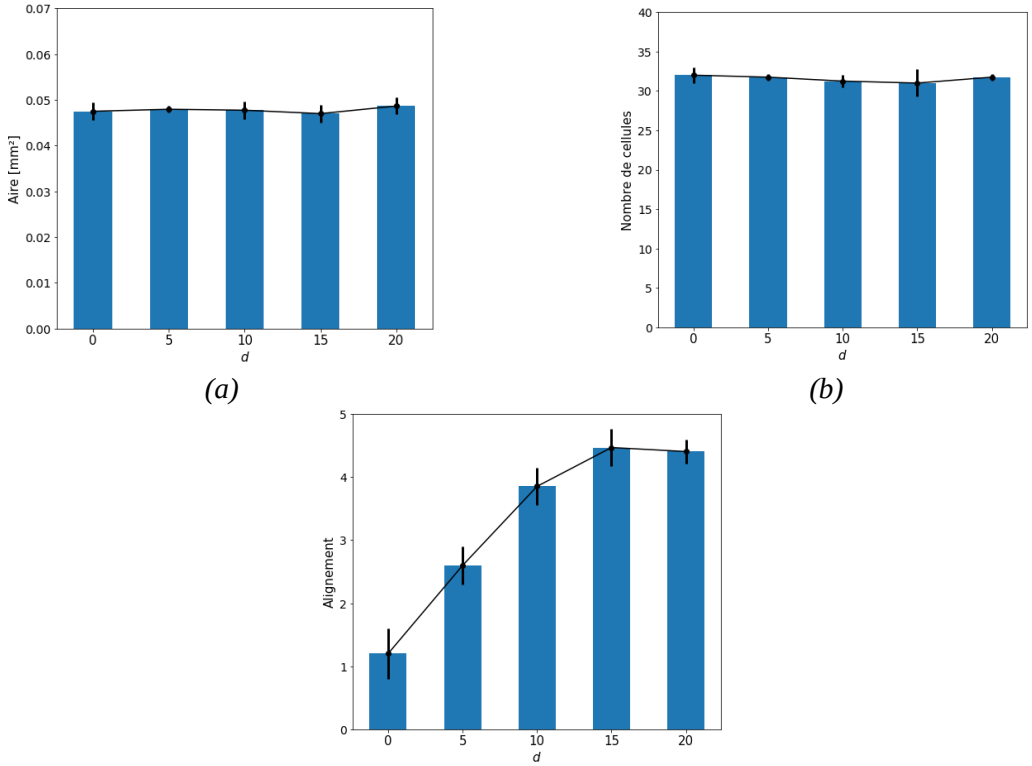
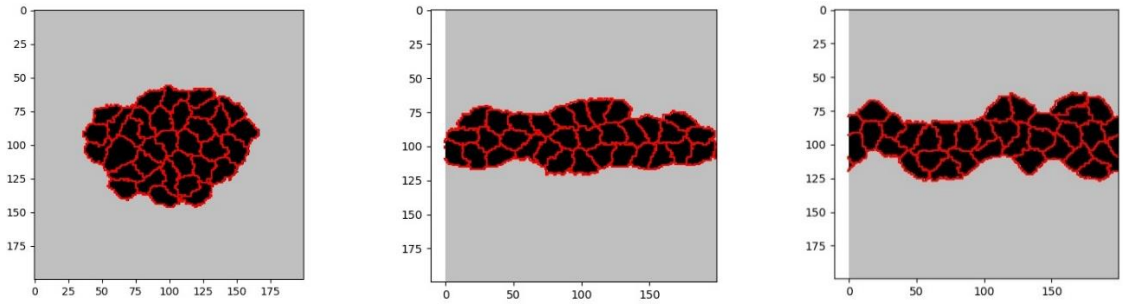


Figure 5.16 : Evolution de la prolifération cellulaire sur une surface rainurée en fonction de d (en µm). (a) Aire totale de la population de cellule à t=4000 MCS. (b) Nombre de cellules à 4000 MCS. (c) Elongation de la population de cellule à t=4000 MCS.

5.2.2.3. Surface rainurée : influence de la largeur

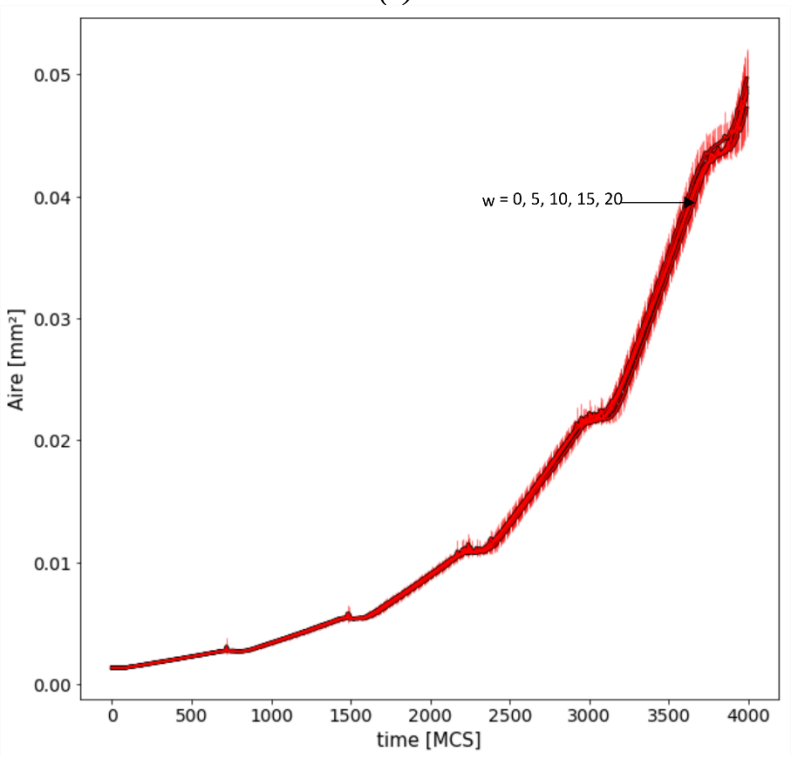
De la même manière que la section précédente, une étude de prolifération sur une surface rainurée a été réalisée, en faisant varier la largeur des rainures *w*. La profondeur *d* a été fixée à 10 µm et 4 différentes valeurs de largeur *w* ont été choisies : 5, 10, 15, 20 µm. De plus, une simulation de référence avec une surface sans topographie (i.e. *d*=0) a aussi été réalisée.

La figure 5.17 montre l'évolution de la morphologie de la population de cellules (a) ainsi que les courbes de croissances (b) pour différentes valeurs de w (5, 10, 20 µm). En termes de courbes de croissance, on obtient un comportement proche de celui qui a été observé avec une profondeur variable avec aucune différence significative en termes d'évolution de l'aire de cluster de cellules. Cependant, la morphologie diffère selon les valeurs de w. Pour w=5 µm, donc inférieure à la dimension de la cellule, la population affiche une forme semi circulaire, reflétant une faible influence des rainures sur la population. Cependant, pour w=10, donc du même ordre de grandeur que la cellule, la population de cellules s'aligne avec les rainures, avec une prolifération dans le sens des cellules. Pour w=20 µm, donc supérieur à la dimension de la cellule, la population de cellule se regroupe au sein d'une rainure, s'alignant donc avec la surface. Cependant, durant la croissance de la population, on observe des zones où les cellules se regroupent afin de franchir la rainure, aboutissant à une élongation moins importante ainsi qu'à la morphologie observée au sein de la figure 5.17.iii.



(i) w=5 µm *(ii) w=10 µm* *(iii) d=20 µm*

(a)



(b)

Figure 5.17 : Résultats des simulations de prolifération cellulaire pour différentes valeurs de w. (a) Morphologie de la population de cellules en fonction de w à t=4000 MCS. (b) Courbes de croissance cellulaire pour différentes valeurs de w.

La figure 5.18 montre l'évolution de la prolifération au sein du cluster, sous la forme de l'aire du cluster (a), du nombre de cellules qui composent le cluster (b) ainsi que l'élongation du cluster (c). En termes de croissance, les résultats rejoignent les résultats précédents avec aucune différence significative en termes de l'aire de cluster ainsi qu'en termes de nombre de cellules. En termes d'élongation, on remarque bien l'augmentation de l'élongation de la population avec la surface jusqu'à la valeur de w=15 µm où aucune différence significative n'est observée par la suite. Si cet arrêt d'élongation peut être dû à l'environnement de simulation, cette observation rejoint aussi l'hypothèse d'une élongation moins importante avec l'augmentation de la largeur des rainures au-delà de la dimension des cellules.

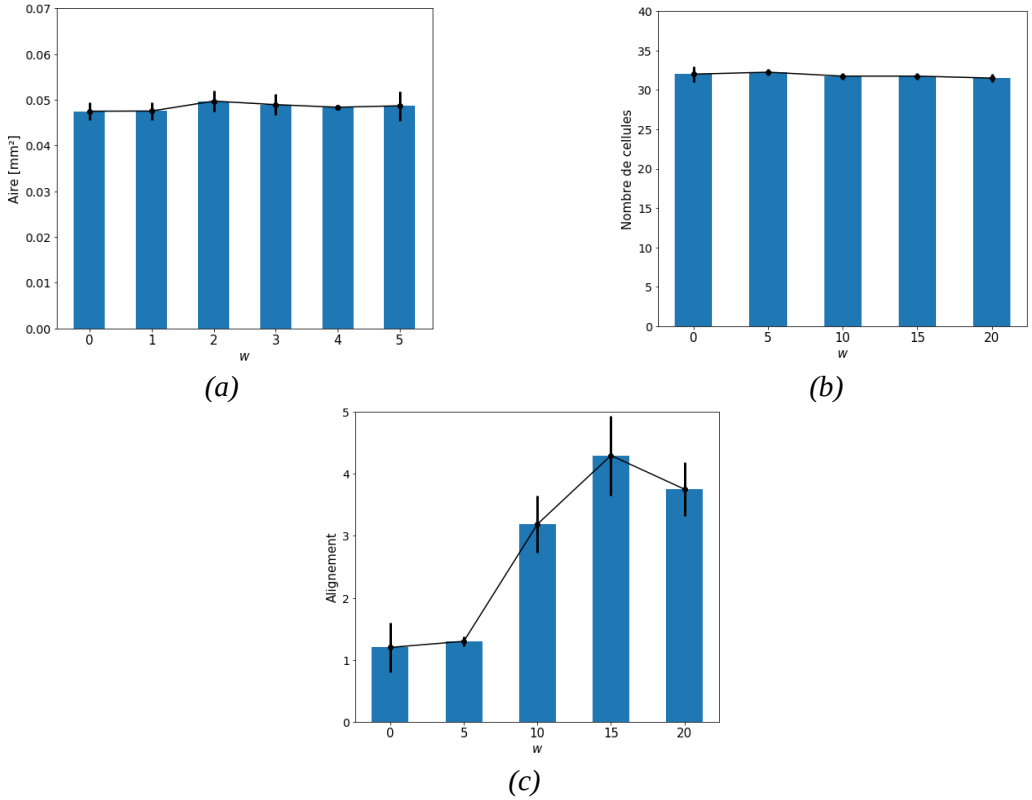


Figure 5.18 : Evolution de la prolifération cellulaire sur une surface rainurée en fonction de w. (a) Aire totale de la population de cellule à t=4000 MCS. (b) Nombre de cellules à 4000 MCS. (c) Elongation de la population de cellule à t=4000 MCS.

Les résultats obtenus numériquement sur la surface rainurée rejoignent les observations faites au sein de l'étude de la littérature de Braber et al [7] de prolifération de cellules sur des structures rainurées microscopiques, de dimensions proches de celles simulées. Les résultats montrent peu de différences significatives en termes de proliférations entre les différentes géométries de rainures. Au contraire, dans le cadre d'études de surfaces structurées à l'échelle nanoscopiques [8]–[10], une influence significative des dimensions des rainures est observée sur la croissance cellulaire. On peut donc supposer qu'à l'échelle microscopique, les rainures agissent comme une contrainte géométrique et la population de cellules s'adapte à cette contrainte géométrique afin de pouvoir proliférer.

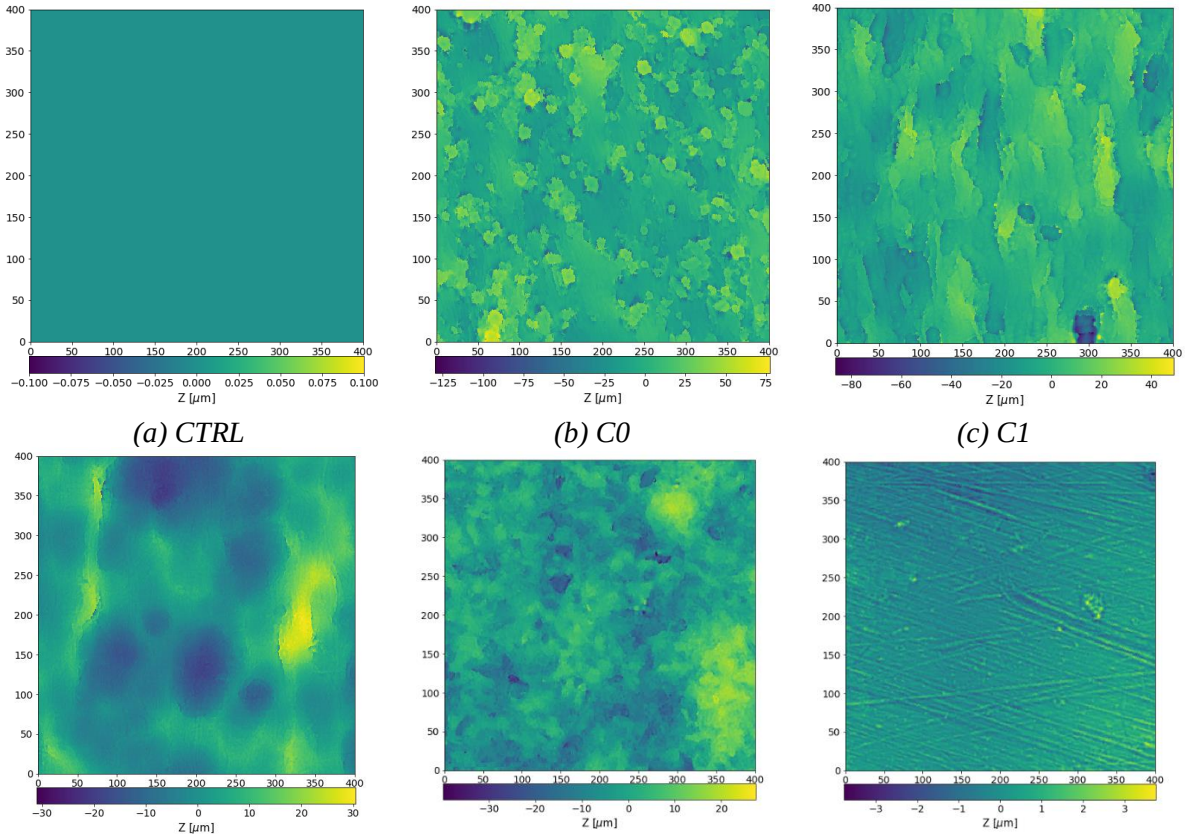
5.2.3. Etude de surfaces SLM

5.2.3.1. Configuration de simulation

Notre modèle a pour but de comprendre la prolifération de hMSCs sur les différentes surfaces fabriquées par FA SLM. La configuration de simulation est celle définie dans la section 5.2.3. Cependant, quelques changements ont été apportés. Le lattice a pour forme d'un carré de longueur 1 mm x 1 mm ; la population initiale est composée de 9 cellules formant un carré de 3 cellules de côté ; la durée de simulation est de 4000 MCS, correspondant à une durée d'environ 11 jours. Les paramètres CP sont ceux listés dans le tableau 5.1.

Les surfaces étudiées reprennent les données profilométriques de la section 4.3.3 (voir figures 4.22) sur une aire plus grande de 1 mm² (dans le plan X-Y) (voir figure 5.19). Afin de prendre en compte

les hétérogénéités éventuelles, trois scans profilométriques ont été réalisés pour chaque surface et chacun de ces scans a été simulé 5 fois.



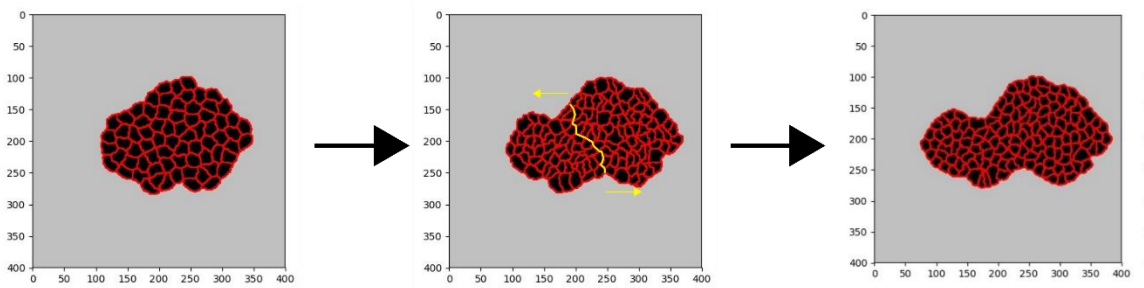
(a) CTRL *(b) C0* *(c) C1*

(d) C2 *(e) C3* *(f) C4*

Figure 5.19 : Morphologie de référence pour chaque surface étudiée. Chaque pixel des images correspond à un carré de côté 2.5 µm.

5.2.3.2. Résultats des différentes surfaces

La surface CTRL montre une prolifération qui affecte la morphologie de la population. En effet, celle-ci affiche une forme allongée différente de la forme circulaire reflétant habituellement une minimisation de l'énergie. Cette forme s'explique par la synchronisation de la mitose au sein de la population (figure 5.20). En effet, la prolifération cellulaire démarre au même moment pour l'ensemble des cellules, avec donc une synchronisation de la mitose avec les cellules filles créées poussant les unes sur les autres pour revenir à un état d'équilibre.



Avant la mitose Durant la mitose Après la mitose

Figure 5.20 : Déformation de la population cellulaire due à la mitose

Ce phénomène ne semble être observé que lorsque le cluster atteint une certaine taille ainsi que pour des cellules composées d'un grand nombre d'éléments. L'insertion d'un terme aléatoire permettrait de remédier à cet aspect. Cependant, la prolifération cellulaire au sein de l'étude in vitro se fait selon des paliers, signe que la mitose se passe au même moment au sein du cluster.

La figure 5.21 montre la morphologie de la population de cellules sur les différentes surfaces à t= 4000 MCS. Le cluster de cellules sur la surface C0 (figure 5.21b) montre une forme allongée orientée dans la direction Y. On peut ajouter que le cluster semble croître préférentiellement dans la direction de la surface, présentant moins de particules le long de cette direction. Par rapport aux résultats expérimentaux (figure 3.33 section 3.3.3), on observe aussi un alignement de la population de hMSCs avec la surface. Cependant, la prolifération se déroule en trois dimensions avec la formation de multiples couches, non modélisables au sein de notre modèle. La surface C1 montre une croissance initiale perpendiculaire à l'orientation de la surface, suivie par une croissance dans toutes les directions (figure 5.21c). Ce type de croissance est contraire à ce que l'on peut anticiper, et peut s'expliquer par le fait que localement, la surface apparaît comme plane. Les cellules ne semblent pas sentir l'orientation de la surface, aboutissant à un déplacement selon un minimum de rugosité local. Expérimentalement, la population de hMSCs à J4 a acquis la forme d'une ellipse orientée dans le sens de la surface (figure 3.33 section 3.3.3). Cela vient donc contredire les résultats obtenus numériquement. La surface C2 et C3 affichent un cluster de cellules de la forme circulaire tout le long de la croissance cellulaire (figure 5.21d et 5.21e). Tout comme la surface C1, on observe des zones aplaties au niveau de la zone externe du cluster, coïncidant avec les élévations de surface observée. Ces formes circulaires peuvent être retrouvées expérimentalement à J4 sur la figure 3.33 (section 3.3.3), bien que la population de cellules ne soit pas monocouche. La population de cellules sur la surface C4 affiche une forme non circulaire (figure 5.21f). En effet, tout comme sur la surface CTRL, la synchronisation de la mitose sur la surface génère la forme observée. Cependant, la forme observée est significativement différente de la forme de la population à J4 dans la figure 3.33 (section 3.3.3), où l'on observe une forme plus ou moins circulaire.

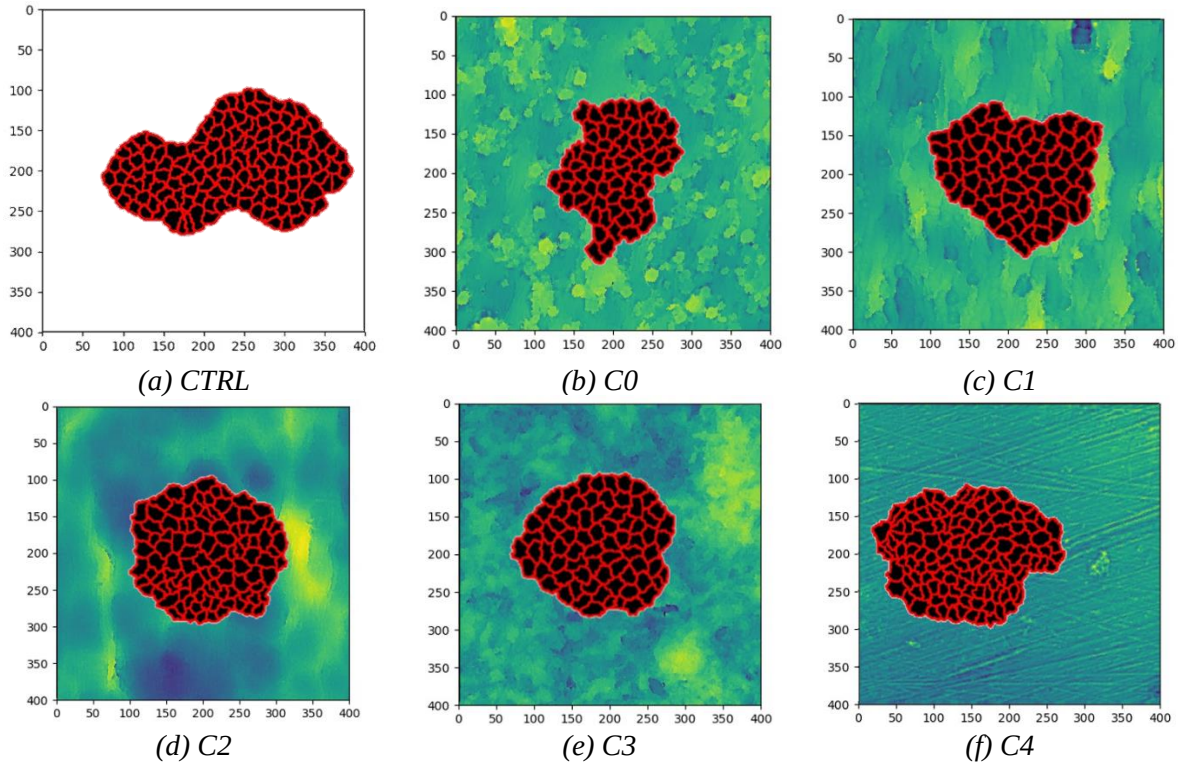


Figure 5.21 : Morphologie pris par la population de cellules selon les différentes surfaces après un temps de simulation de 4000 MCS

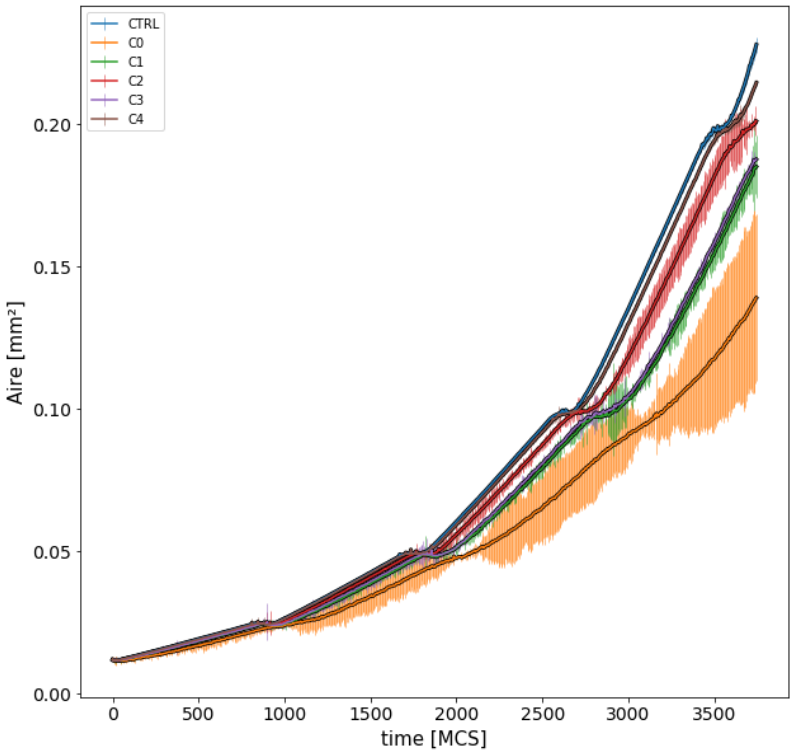
La figure 5.22 décrit l'évolution de l'aire du cluster ainsi que du nombre de cellules composant le cluster pour une durée de 4000 MCS selon les différentes surfaces.

Les résultats observés pour la surface C0 montrent que les cellules prolifèrent à la surface malgré la présence de rugosité de grande amplitude. Cependant, la courbe de croissance est la plus faible en termes d'aires ainsi que de nombre de cellules, avec une forte variabilité au niveau des résultats. Cette variabilité a pour origine l'état de surface de C0, avec une répartition hétérogène des particules à la surface. Cette hétérogénéité se voit particulièrement en termes de nombre de cellules, avec de fortes variations entre les différents échantillons de C0 à chaque étape de doublement de population. D'un point de vue général, en comparant par rapport à la surface CTRL, on observe une plus grande durée de la phase transitoire de doublement, signe que les mitoses des cellules composant le cluster n'arrivent pas au même moment. Ceci vient donc appuyer l'hypothèse d'une prolifération en monocouche difficile sur la surface C0.

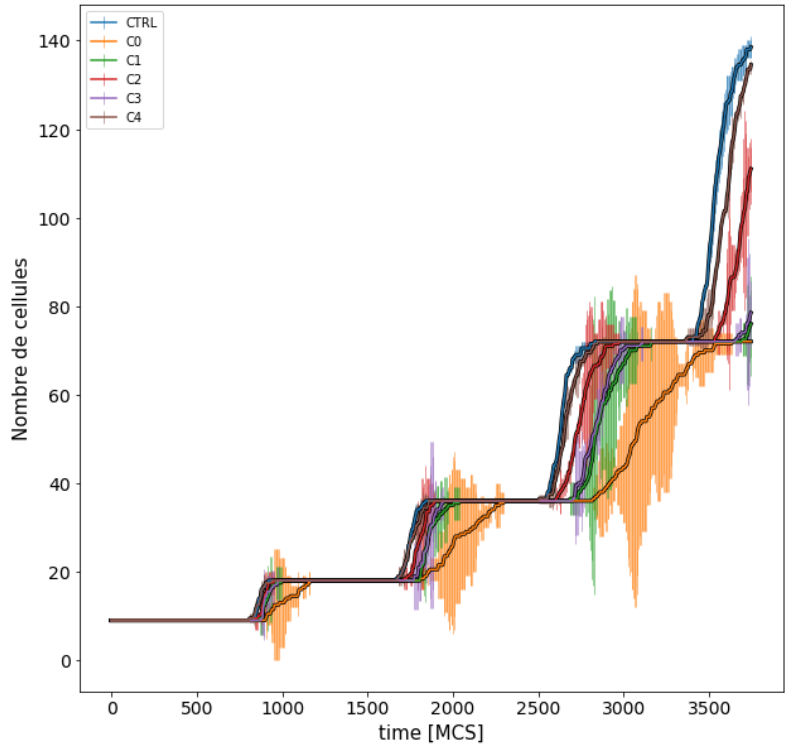
Les résultats de C1 et C3 montrent la présence de prolifération et des similarités concernant l'évolution de l'aire du cluster ainsi que du nombre de cellules composant le cluster. En étudiant l'évolution de nombre de cellules, la phase transitoire de doublement de population semble être plus longue que celle observée sur la surface contrôle, en particulier pour C1. Combiné à la plus lente croissance de l'aire du cluster et en comparant par rapport à la surface contrôle, on peut donc supposer que la rugosité agit comme un frein à la croissance cellulaire.

La surface C4 est définie par une surface polie où la rugosité à l'échelle microscopique fut retirée. En comparant par rapport à la surface contrôle, de légères baisses en termes d'aires de cluster ainsi qu'en termes de nombre de cellules sont observées. Bien que plus compacte, la morphologie du cluster ne montre pas de différence significative. Tout ceci montre une influence de la rugosité sur la prolifération cellulaire, même pour une rugosité submicroscopique. Cette influence semble provenir de la non consistance des traces du polissage à la surface.

En considérant la surface CTRL et C4 comme des surfaces de référence, C2 donne les meilleurs résultats en termes de prolifération cellulaire. En termes de courbes de croissance, l'aire du cluster de cellules est proche de celle observée sur la surface CTRL. Il en va de même pour la courbe de doublement de population, qui suit la courbe contrôle avec un certain retard. La rugosité présente à la surface a pour effet de ralentir la croissance du cluster.



(a)



(b)

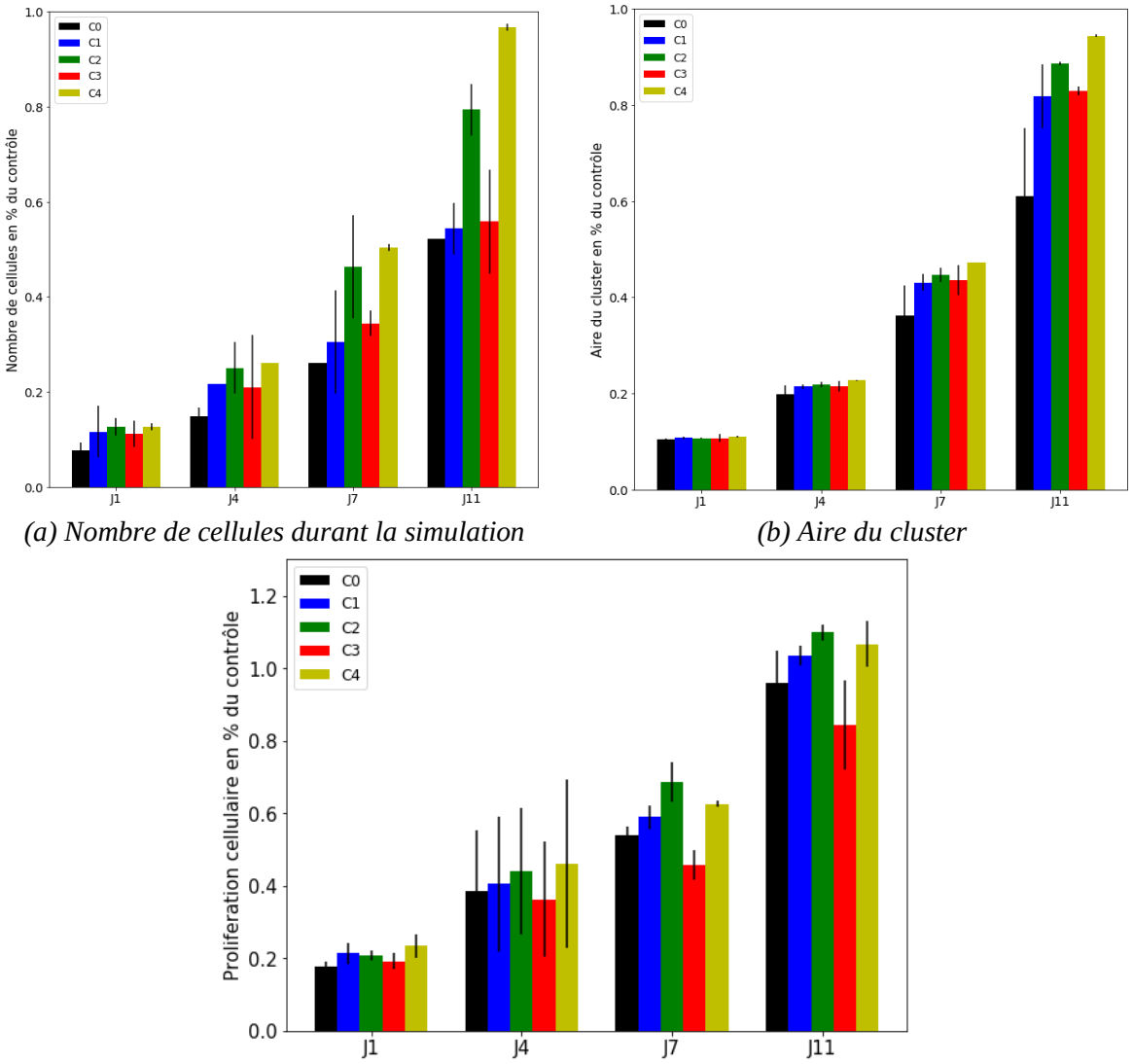
Figure 5.22 : Evolution de la prolifération cellulaire sur les six différentes surfaces. (a) Courbe de croissance de l'aire du cluster de cellules pour les six différentes surfaces. (b) Courbe de l'évolution du double de population pour les six différentes surfaces.

Les résultats montrent l'influence significative de la topographie de le surface sur la prolifération cellulaire, similairement aux résultats obtenus pour la motilité cellulaire. En effet, l'étude de l'influence géométrique de la rugosité à l'échelle microscopique sur la motilité cellulaire a montré

de meilleurs résultats en termes de dispersion ainsi que d'expansion cellulaire (i.e. surface projetée) sur les surfaces les moins rugueuses. Si les résultats de la prolifération cellulaire ne montrent pas d'influence significative de la motilité cellulaire, on observe en revanche une augmentation de la prolifération avec une diminution de l'amplitude de la rugosité de surface et une augmentation de la longueur d'onde de la surface. Néanmoins, ces résultats ne s'appliquent qu'aux surfaces que l'on a testées numériquement.

La figure 5.23 montre la comparaison entre les données numériques et les données expérimentales de prolifération cellulaire. Les données expérimentales mesurent l'activité métabolique de la population de cellules, dépendant donc du nombre de cellules présentes au sein de la population. Les données expérimentales correspondent aux résultats de prolifération des hMSCs en milieu de prolifération (figure 3.14 de la section 3.2.3.3). Afin de faciliter la comparaison, les résultats du pool 1 et du pool 2 ont été combinés et moyennés dans la figure 5.23c.

Ainsi, une première comparaison est faite entre les données expérimentales et l'évolution du nombre de cellules obtenu via le modèle numérique. Les données expérimentales semblent corréler avec les résultats numériques, avec un maximum de nombre de cellules obtenues pour C4 et C2. C0, C1 et C3 donnent des résultats similaires à J11 avec des valeurs se situant autour de 50% de la surface CTRL. Les résultats pour ces trois surfaces sont bien inférieurs à ce que l'on observe sur les données expérimentales et cette valeur de 50% révèle que l'on se situe probablement durant la phase de doublement de population. Pour avoir plus de précision, l'évolution de l'aire du cluster de cellules est étudiée. Les résultats sont bien plus proches des données expérimentales par rapport à l'évolution du nombre de cellules. Les maximums sont obtenus pour C4 et C1, comme observé expérimentalement. Ces maximums sont suivis par les surfaces C1 et C3 avec aucune différence significative. Comparé aux expériences, C3 présente des plus grandes valeurs expérimentalement, pouvant s'expliquer par la non prise en compte de rugosité submicroscopique présente à la surface, affectant probablement l'attachement au substrat (voir chapitre 2). C1 semble observer un comportement similaire à l'expérimental. Pour finir, les résultats numériques obtenus pour la surface C0 sont bien inférieurs à ce qui est observé sur les données expérimentales, avec ~ 40% de différences par rapport au contrôle sur les simulations tandis que cette différence est de l'ordre de moins de 10% en expérimental. Cette différence notable vient probablement de l'approche en monocouche prise dans le modèle numérique, tandis que de la prolifération en multicouche a été observé au microscope confocal sur la surface C0 (voir chapitre 3).



(a) Nombre de cellules durant la simulation

(b) Aire du cluster

(c) Résultats expérimentaux de la prolifération

Figure 5.23 : Comparaison entre les résultats numériques et les résultats expérimentaux selon les différentes surfaces.

Les résultats numériques semblent suivre le même comportement que les résultats expérimentaux. Cependant, le manque de validité des résultats expérimentaux ne permet pas de confirmer les résultats du modèle numérique.

5.3. Discussion

5.3.1. Apport du modèle CP multicellulaire

L'objectif de cette étude est de proposer un modèle numérique permettant de prendre en compte l'effet de la rugosité sur la prolifération cellulaire.

Une des premières observations faites à l'aide du modèle est l'apparition d'un comportement collectif lors de la prolifération. Les résultats ont montré que ce comportement collectif prend effet durant la mitose pour une population importante (cela est cependant spécifique au modèle) ainsi que pour des topographies de surface anisotropes. En effet, pour des topographies de surface affichant une

longueur d'onde proche des dimensions de la population, une réorganisation du cluster est observée avec un alignement selon la topographie de la surface. Cela s'observe aussi sur les surfaces SLM avec une adaptation de la morphologie de la population selon la rugosité présente. Cette précédente information permet d'en venir à l'autre apport du modèle numérique : la mise en évidence de l'influence significative géométrique de la rugosité ainsi que de l'orientation de la surface sur la prolifération cellulaire. Comme on l'a vu précédemment, la longueur d'onde à une influence significative sur la morphologie prise durant la prolifération cellulaire. Il en est de même pour l'amplitude de la rugosité, ainsi que pour sa répartition (i.e. anisotropie). Dans le cas d'une forte anisotropie, le modèle numérique montre que le cluster de cellules adapte sa morphologie afin de conserver son taux de prolifération. Cependant, dans le cas d'une rugosité sans aucune anisotropie, le cluster de cellules est incapable de conserver son taux de prolifération, aboutissant à une diminution de croissance cellulaire. Bien que n'étant pas le but de cette étude, le modèle numérique permet aussi de modéliser les paramètres internes de la cellules, tels que la rigidité cellulaire et la motilité intrinsèque de la cellule. Ces paramètres ont une influence plus ou moins importante sur la prolifération cellulaire, en montrant que des variations au niveau de la cellule se répercutent sur l'ensemble de la population. Enfin, l'un des plus grands avantages de ce type de modèle CP modifié est la possibilité d'incorporer des données de surfaces réelles au sein du modèle CP afin de voir l'influence de différentes rugosités sur la croissance cellulaire. Notre analyse a permis de mettre en lumière l'effet significatif de la surface brute C0 ainsi que l'efficacité des différents traitements de surface. Des disparités de résultats par rapport à l'approche expérimentale soulignent les limites du modèle. Cependant, les résultats obtenus permettent d'obtenir une tendance selon les différentes surfaces.

5.3.2. Validation et limitations du modèle

L'implémentation de l'influence géométrique de la rugosité sur différents processus cellulaires via un mécanisme mécanique de détection de topographie couplé à un mécanisme de détection d'orientation a permis de mettre en lumière les différents comportements de prolifération observés selon la surface étudiée.

Cependant, malgré tout ceci, notre modèle CP modifié n'est pas validé pour l'instant. Le premier point venant contredire la consistance du modèle est la prolifération des cellules sur la surface CTRL sans topographie. Si du point de vue quantitatif (aire, nombre de cellules…), les résultats suivent un comportement retrouvé expérimentalement, la forme obtenue est loin de la morphologie sphérique observée habituellement. On peut remarquer cette différence aussi pour les simulations des surfaces SLM. De plus, de nombreux points du modèle viennent limiter son champ d'application. La première limitation réside dans l'échelle de rugosité minimale prise en compte. En effet, le nombre d'éléments composant une cellule impose une restriction sur l'échelle de rugosité appliquée au modèle dans le plan (X-Y). Or, la littérature nous dit que les échelles submicroscopiques et nanoscopiques ont une influence significative sur la réponse cellulaire [11]–[15]. Notre échelle d'étude étant limitée au µm, on a donc une sous-estimation de l'influence de la rugosité, observée par exemple sur la surface C3 avec la non prise en compte d'une partie de la rugosité. Une deuxième limitation est la prise en compte de la rugosité d'un point de vue purement géométrique. En effet, l'influence de la rugosité sur la réponse cellulaire ne se limite pas seulement à la topographie, mais aussi à un aspect énergétique avec les forces d'adhésion de la cellule via l'adsorption de la surface, ainsi que les changements de propriétés chimiques apportés par la rugosité. Tous ces éléments jouent sur différents mécanismes cellulaires internes tels que l'adhésion de la cellule ou sa rigidité par exemple. Concernant l'adhésion cellulaire au substrat, nous avons supposé une adhésion totale entre la cellule et le substrat. Etant donnée l'influence de la topographie sur l'adhésion, cette hypothèse peut être objet de discussion. Pour notre étude, nous avons fait le choix de nous concentrer sur l'aspect géométrique seulement, que l'on a supposé prédominant au niveau d'étude microscopique que l'on considère. Enfin, une troisième limitation est l'approche monocouche en deux dimensions. Au sein de ce modèle, nous avons privilégié une approche en deux

dimensions afin de simplifier le modèle et de réduire les temps de calcul. Les caractéristiques 3D de la surface sont cependant perdues avec cette approche. Ceci est d'autant plus vrai dans le cas d'une surface présentant une forte rugosité, comme C0 par exemple, où la mise en place d'une prolifération en multicouche est observée. Cette différence entraîne une surévaluation de l'effet pénalisant de la rugosité sur certaines surfaces.

5.4. Conclusion

Le but de cette étude était de développer un modèle numérique permettant de prendre en compte l'effet de la rugosité sur la prolifération cellulaire. A partir de scans profilométriques, la rugosité de la surface a été importée au sein d'une modèle CP modifiée de prolifération cellulaire. Des paramètres énergétiques, sous la forme de fonctions hamiltoniens, permettent de prendre en compte l'effet des différences d'élévations créées par la rugosité sur l'adhésion de la cellule ainsi que sur son orientation.

Le modèle de prolifération cellulaire n'a pas pu être validé pour le moment. Cependant, il a permis de mettre en lumière l'influence significative de la géométrie de la rugosité sur la prolifération cellulaire, ainsi que de prédire dans une certaine mesure l'évolution de cette prolifération sur les surfaces C0, C1, C2, C3 et C4. Cette prédiction se limite cependant à de la rugosité à l'échelle de la cellule, et ne permet pas de prendre en compte directement toute rugosité à l'échelle submicroscopique et nanoscopique. Par ailleurs, la limitation à un aspect monocouche limite l'efficacité prédictive du modèle, surtout sur des surfaces où l'aspect 3D de la surface peut exacerber la création de multicouche.

On peut tout de même conclure que la présence d'une rugosité non structurée de même dimension que la cellule est à éviter afin de maximiser la prolifération cellulaire, d'où l'intérêt de topographies à l'échelle submicroscopiques afin d'améliorer le comportement cellulaire.

Références

[1] A. J. Kabla, « Collective cell migration: leadership, invasion and segregation », *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 9, nº 77, p. 3268-3278, déc. 2012, doi: 10.1098/rsif.2012.0448.

[2] J. F. Li et J. Lowengrub, « The Effects of Cell Compressibility, Motility and Contact Inhibition on the Growth of Tumor Cell Clusters using the Cellular Potts Model », *J Theor Biol*, vol. 343, p. 79-91, févr. 2014, doi: 10.1016/j.jtbi.2013.10.008.

[3] C. A. Lemmon et L. H. Romer, « A Predictive Model of Cell Traction Forces Based on Cell Geometry », *Biophys J*, vol. 99, nº 9, p. L78-L80, nov. 2010, doi: 10.1016/j.bpj.2010.09.024.

[4] R. F. M. van Oers, E. G. Rens, D. J. LaValley, C. A. Reinhart-King, et R. M. H. Merks, « Mechanical Cell-Matrix Feedback Explains Pairwise and Collective Endothelial Cell Behavior In Vitro », *PLOS Computational Biology*, vol. 10, nº 8, p. e1003774, août 2014, doi: 10.1371/journal.pcbi.1003774.

[5] G. A. Romar, T. S. Kupper, et S. J. Divito, « Research Techniques Made Simple: Techniques to Assess Cell Proliferation », *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 136, nº 1, p. e1-e7, janv. 2016, doi: 10.1016/j.jid.2015.11.020.

[6] E. Ngandu Mpoyi, M. Cantini, P. M. Reynolds, N. Gadegaard, M. J. Dalby, et M. Salmerón-Sánchez, « Protein Adsorption as a Key Mediator in the Nanotopographical Control of Cell Behavior », *ACS Nano*, vol. 10, nº 7, p. 6638-6647, juill. 2016, doi: 10.1021/acsnano.6b01649.

[7] E. T. den Braber, J. E. de Ruijter, H. T. J. Smits, L. A. Ginsel, A. F. von Recum, et J. A. Jansen, « Quantitative analysis of cell proliferation and orientation on substrata with uniform parallel surface micro-grooves », *Biomaterials*, vol. 17, nº 11, p. 1093-1099, juin 1996, doi: 10.1016/0142-9612(96)85910-2.

[8] A. Curtis et C. Wilkinson, « Topographical control of cells », *Biomaterials*, vol. 18, nº 24, p. 1573-1583, déc. 1997, doi: 10.1016/S0142-9612(97)00144-0.

[9] G. Abagnale *et al.*, « Surface Topography Guides Morphology and Spatial Patterning of Induced Pluripotent Stem Cell Colonies », *Stem Cell Reports*, vol. 9, nº 2, p. 654-666, août 2017, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.06.016.

[10] A.-S. Andersson, P. Olsson, U. Lidberg, et D. Sutherland, « The effects of continuous and discontinuous groove edges on cell shape and alignment », *Experimental Cell Research*, vol. 288, nº 1, p. 177-188, août 2003, doi: 10.1016/S0014-4827(03)00159-9.

[11] B. Bhushan, Y. C. Jung, et K. Koch, « Micro-, nano- and hierarchical structures for superhydrophobicity, self-cleaning and low adhesion », *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 367, nº 1894, p. 1631-1672, mai 2009, doi: 10.1098/rsta.2009.0014.

[12] A. Bourkoula *et al.*, « Roughness threshold for cell attachment and proliferation on plasma micro-nanotextured polymeric surfaces: the case of primary human skin fibroblasts and mouse immortalized 3T3 fibroblasts », *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 49, nº 30, p. 304002, 2016, doi: 10.1088/0022-3727/49/30/304002.

[13] A. B. Novaes, S. L. S. de Souza, R. R. M. de Barros, K. K. Y. Pereira, G. Iezzi, et A. Piattelli, « Influence of implant surfaces on osseointegration », *Braz Dent J*, vol. 21, nº 6, p. 471-481, 2010.

[14] W. Chen *et al.*, « Nanoroughened surfaces for efficient capture of circulating tumor cells without using capture antibodies », *ACS Nano*, vol. 7, nº 1, p. 566-575, janv. 2013, doi: 10.1021/nn304719q.

[15] S. R. Coyer *et al.*, « Nanopatterning reveals an ECM area threshold for focal adhesion assembly and force transmission that is regulated by integrin activation and cytoskeleton tension », *J. Cell. Sci.*, vol. 125, nº Pt 21, p. 5110-5123, nov. 2012, doi: 10.1242/jcs.108035.

Chapitre 6 : Conclusions et perspectives

Sommaire

6.1. Les résultats acquis 197
6.2. Les perspectives 198

6.1. Les résultats acquis

Le travail de thèse réalisé a pour objectif d'améliorer la compréhension de l'ostéointégration de surfaces de TA6V obtenues par fabrication additive SLM.

L'étude des états de surfaces obtenues par FA SLM a été réalisée et l'évolution de la rugosité en fonction de l'angle de fabrication d'éprouvettes SLM a été caractérisée. En plus de la rugosité, la mouillabilité a aussi été caractérisée à l'aide d'un banc de mouillabilité. Les résultats ont montré la présence de différents types de rugosité sur la surface selon la paramétrie machine et l'inclinaison de fabrication. Parmi ces différentes natures, la rugosité de type III, constituée de particules de poudres de TA6V non fondues enkystées dans la surface, est la rugosité la plus forte observée sur la surface SLM. Celle-ci évolue avec l'inclinaison, avec un maximum de particules à 90° (C0), et a une influence significative sur la mouillabilité des surfaces. Afin de faire disparaitre la rugosité de type III ainsi que de réduire la rugosité sur les surfaces SLM, deux traitements de surfaces ont été envisagés : le sablage et le polissage chimique. Le sablage a été étudié pour 3 différents types de sables avec pour paramètres de sortie la rugosité et la mouillabilité. Les résultats du sablage ont montré la disparition de la rugosité de type III pour une taille de sable supérieure ou égale à 200 µm. Cependant, la disparition de cette rugosité s'est accompagnée par l'apparition d'une rugosité submicroscopique importante combinée à une rugosité microscopique plus grande. La sablage F60 donne la plus faible rugosité de l'ensemble des sables (C3). Le polissage chimique a été étudié pour 3 différentes solutions de polissage ainsi que pour 5 différents temps d'immersion. Les paramètres de sortie ont été définis par la rugosité, la mouillabilité ainsi que la perte de matière. Les résultats du polissage chimique ont montré la disparition de la rugosité de type III pour l'ensemble des solutions de polissage de 5 min à 30 min, ainsi que l'exhibition de propriétés hydrophiles. En prenant la surface polie par papier abrasif comme référence (C4), la composition (10% HF, 10% HNO_3) est celle qui se rapproche le plus. Malgré ces excellents résultats en termes de rugosité et de mouillabilité, la composition (10% HF, 10% HNO_3) n'a pas été considérée due à la force de réaction et la trop grande perte de matière. Le groupe de paramètre (3% HF, 10% HNO_3, 30 min) (C2) donne la plus faible rugosité et des propriétés hydrophiles, malgré des pertes matières de l'ordre de 200 µm. Le groupe de paramètre (3% HF, 20% HNO_3, 10 min) (C1) donne la plus forte hydrophilicité et des pertes matières de l'ordre de 100 µm, malgré une forte rugosité ~9 µm.

La biocompatibilité des différentes surfaces (C0, C1, C2, C3 et C4) a été caractérisée via des tests de cytocompatibilité, référencés au sein de la norme ISO 10993-5. Les études de cytotoxicité ont permis de montrer l'absence de toxicité significative pour l'ensemble des matériaux. Les tests d'adhésions n'ont pas pu être menés à terme et les résultats actuels n'ont pas montré de différences nettes entre les différentes surfaces. De la même manière, les tests de prolifération n'ont pas non plus pu être menés à terme. Cependant, C3 semble montrer une prolifération moins efficace que sur les autres surfaces, montrant l'aspect inhibant de la rugosité à l'échelle submicroscopique. L'évaluation des propriétés ostéoinductrices des surfaces n'a pas pu être réalisée. L'étude de la morphologie cellulaire au microscope à fluorescence a apporté plus d'informations sur les comportements des hMSCs sur les surfaces. Les plus grands étalements cellulaires sont observés sur C4 et C2, signe de bonnes interactions entre les hMSCs et les surfaces. L'anisotropie de C1 a montré une influence directe sur l'orientation des hMSCs tandis que la surface C3 présente de mauvaises interactions avec les hMSCs. L'ensemble des résultats semble montrer que la rugosité est un facteur important déterminant la réponse cellulaire.

Au regard de ces observations, un modèle numérique visant à prédire l'effet de la rugosité sur le comportement cellulaire a été développé. Pour cela, deux approches ont été testées : (i) une étude unicellulaire de la migration cellulaire en trois dimensions en fonction de la topographie de la surface ; (ii) une étude de la prolifération cellulaire en deux dimensions en fonction de la topographie de la surface. Ces deux approches sont basées sur la méthode Cellular Potts, qui utilise le principe de minimisation de l'énergie de la cellule. Le modèle de migration met en avant l'influence significative des différents paramètres de la topographie sur la migration cellulaire, en particulier l'amplitude et la

fréquence spatiale semble jouer un rôle critique. Le modèle de prolifération basé sur la topographie de la surface montre des résultats similaires aux résultats expérimentaux, venant appuyer l'influence significative de la topographie sur la réponse cellulaire. Au regard des résultats numériques, l'aspect inhibiteur de la topographie est mis en avant dans le cas de topographie non structurée du même ordre de grandeur que la cellule. Cependant, d'autres observations expérimentales non retrouvées dans le modèle empêchent la validation de celui-ci dans sa forme actuelle.

6.2. Les perspectives

Les résultats expérimentaux et numériques obtenus dans cette thèse permettent donc une meilleure compréhension des interactions entre les cellules et la surface durant l'ostéointégration. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de prendre en compte les autres propriétés surfaciques, ainsi que d'analyser l'aspect ostéoinducteur des surfaces. Voici quelques propositions :

1. Finalisation des tests biologiques. Les tests biologiques de cytocompatibilité (adhésion et prolifération) n'ont pas pu être validés statistiquement à cause de l'utilisation de seulement deux pools de cellules. Afin de conclure l'étude de biocompatibilité, il est important de finaliser ces tests. Il est prévu d'obtenir les résultats d'ici la soutenance. L'autre source d'investigation a réalisé est la minéralisation des différentes surfaces afin de caractériser leur propriétés ostéoinducteur. Les tests au rouge Alizarin n'ont pas pu être réalisés due à la forte réactivité des surfaces. Il serait intéressant de déterminer un autre protocole afin de mesurer la présence de minéralisation.
2. Prise en compte de l'ensemble des angles de fabrication. Au sein de notre étude, nous nous sommes concentrés exclusivement sur des surfaces en « upskin ». Cependant, les surfaces en « downskin » sont connues pour afficher une rugosité beaucoup plus importante. Il serait intéressant de déterminer la réponse cellulaire sur ces surfaces, notamment par l'utilisation du modèle numérique à partir de scans. Il serait aussi intéressant de déterminer l'influence des différents traitements de surfaces sur celles-ci.
3. Limite du modèle numérique. Notre modèle numérique ne se limite qu'à l'aspect géométrique de la rugosité de surface. Il serait intéressant de prendre en compte les autres propriétés surfaciques, telles que l'adsorption de la surface ou sa rigidité. Une autre limite de notre modèle est l'aspect monocouche de la prolifération cellulaire. Or, nos observations expérimentales ont montré l'existence de prolifération en multicouche. Il serait intéressant de prendre cet aspect dans notre modèle.

Annexe A

Sommaire

A.1. Analyse préliminaire de la rugosité selon les paramètres de la machine SLM 201

A.1.1. Protocole expérimental. 201

A.1.2. Résultats 202

A.1.2.1. Clichés du microscope électronique à balayage 202

A.1.2.2. Effet des paramètres machine sur la rugosité de surface 203

A.1.2.3. Relation entre mouillabilité et rugosité de surface 205

A.2. Modèle CP multicellulaire 207

A.2.1. Diagramme de fonctionnement du modèle 207

A.2.2. Etude de sensibilité unicellulaire 208

A.2.2.1. Influence de l'adhésion J_{CE} 208

A.2.2.2. Influence de la température T et de la rigidité cellulaire λ_S 209

A.2.2.3. Influence de la motilité cellulaire λ_M 209

A.2.2.4. Influence du paramètre d'extension cellulaire λ_e 209

A.2.2.5. Influence du paramètre de détection d'orientation λ_O 210

A.2.3. Migration unicellulaire sur des surfaces de référence 210

A.2.3.1. Topographie aléatoirement rugueuse 211

A.2.3.1. Topographie en rainure orientée parallèle 212

A.2.3.2. Topographie en rainure orientée perpendiculaire 214

A.2.4. Modèle CP de migration collective 217

A.2.4.1. Modification du modèle CP 217

A.2.4.2. Simulation de la migration collective 218

Références 222

A.1. Analyse préliminaire de la rugosité selon les paramètres de la machine SLM

L'analyse a montré l'importance de la rugosité de type III sur les surfaces brutes SLM, engendrant de l'hydrophobicité et potentiellement obstacle aux comportements cellulaires. Il serait donc intéressant de déterminer si cette rugosité peut être modifiée par un changement des paramètres de fabrication. Plusieurs études ont analysé l'influence des paramètres de fabrication sur l'état de surface (voir le chapitre 1) [27], [33], [34]. Cependant, selon l'inclinaison de fabrication de la pièce, la rugosité de surface peut être contrôlée par les paramètres définissant les surfaces externes de la pièce. Ces surfaces définissent les frontières de chaque couche lasée. Dans ces études, seuls les paramètres de fabrication par défaut sont pris en compte ; la gestion de la stratégie de passage du laser n'est pas analysée. Cela rend la comparaison délicate et nécessite une étude complémentaire. L'étude présentée ici est une étude préliminaire, qualitative, de l'influence des paramètres du contour sur l'état de surface observé. Plus précisément, l'objectif est d'analyser l'influence des paramètres de fabrication des contours sur une surface 90B. Le choix de la surface 90B permet de se concentrer sur la rugosité de type III.

A.1.1. Protocole expérimental.

Des éprouvettes cylindriques de diamètre 11.2 mm et d'épaisseur 3 mm ont été fabriquées via la machine de FA SLM 280, par couche d'épaisseur 50 µm dans la direction z, donc verticalement, avec une distance de passage de 0.08 mm. Cette orientation a été choisie afin de minimiser la rugosité de type II. La fabrication de chaque couche suit la même méthodologie que ce qui a été décrit précédemment. La zone interne définissant le cœur de la couche est produite avec les paramètres par défaut de la machine, une puissance laser de 275 W et une vitesse de passage de 760 mm/s. La zone externe de la couche, définie par deux bords et un contour interne, est définie par des couples différents de puissance et de vitesse de passage, citées dans le tableau A.1. Il est noté qu'un couple optimal (puissance, vitesse) = (100 W, 350 mm/s) a déjà été élaboré pour optimiser les propriétés mécaniques et le comportement thermomécanique du bain de fusion. Au sein de cette étude, nous avons choisi de modifier ce couple en faisant varier de 50% ces deux paramètres afin de déterminer le comportement topographique de la surface (tableau A.1). L'ensemble des échantillons cylindriques a été fabriqué sur un plateau unique, avec des supports placés entre les échantillons et le plateau afin de faciliter le détachement des éprouvettes. Enfin, aucun post traitement thermique n'a été appliqué aux pièces (excepté un nettoyage) car il a été prouvé que la rugosité ainsi que les porosités externes n'étaient pas affectées par les traitements thermiques.

Pour chaque couple de paramètres, deux échantillons ont été fabriqués. Cela ne permet pas d'élaborer des données statistiquement significatives. Cependant, chaque échantillon comportant deux surfaces, le nombre de mesures effectuées par groupe est de quatre et donne ainsi une tendance.

	Puissance (W)	Vitesse (mm/s)	Densité énergétique (kJ/mm^3)
C1	50	175	71
C2	100	175	142
C3	150	175	214
C4	50	350	35
C5	100	350	71
C6	150	350	107
C7	50	525	23
C8	100	525	47
C9	150	525	71

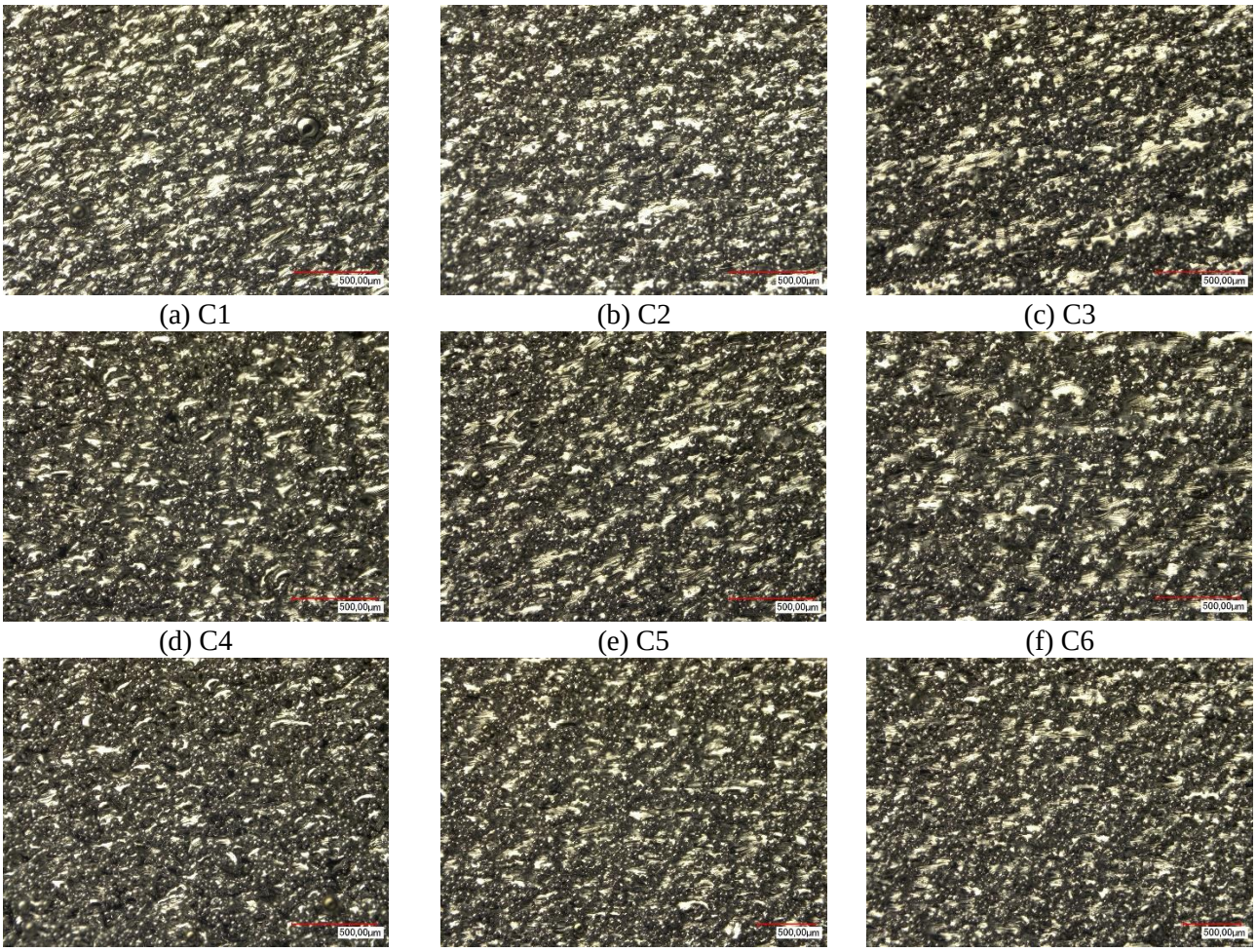
Tableau A.1 : Paramètres de fabrication de la frontière externe de l'échantillon

Les résultats sont analysés par les mesures de la rugosité et la mouillabilité des surfaces. Par ailleurs, des clichés des surfaces brutes sont pris à l'aide d'un microscope électronique à balayage. Les résultats ont été analysés statistiquement via un test de Kruskal Wallis, accompagné par un test de corrélation de Spearman. Pour chacun des deux tests, une hypothèse nulle est analysée et validée via un p-value *p* seuillé à 0.05.

A.1.2. Résultats

A.1.2.1. Clichés du microscope électronique à balayage

Les surfaces observées varient selon les paramètres de fabrication (figure A.1 et figure A.2). La surface de référence choisie est la surface C5, obtenue avec les paramètres par défaut pour une fabrication avec une épaisseur de couche de 50 µm. L'état de surface observé est comparable à celui observé sur les surfaces fabriquées avec une épaisseur de couche de 30 µm.



(a) C1 (b) C2 (c) C3

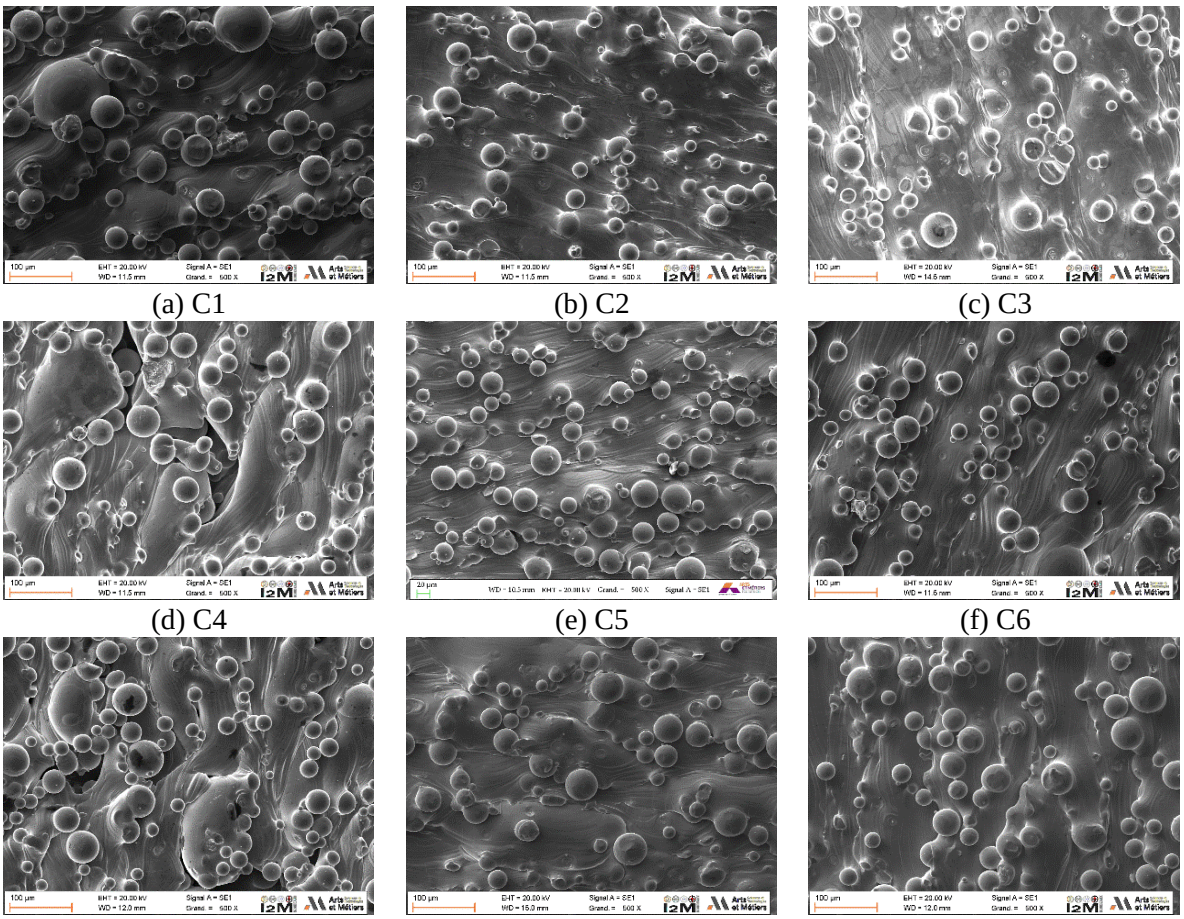
(d) C4 (e) C5 (f) C6

(g) C7 (h) C8 (i) C9

Figure A.1 : Etat de surface en fonction des différents paramètres de fabrication

Sur l'ensemble des morphologies analysées, les surfaces C1, C4 et C7 présentent les plus grandes hétérogénéités. En particulier, la figure A.1 montre que C4 et C7 présentent des creux au sein de la surface tandis que la surface C1, sous les particules, présente une surface accidentée. Cela laisse supposer une mauvaise jonction entre chacune des couches, liée à une densité énergétique trop faible (≤ 71 kJ/mm^3). C1 présente la même densité énergétique que la surface de référence C5, qui elle présente

une bonne jonction entre les couches. Cependant, la puissance ainsi que la vitesse associée à C1 sont deux fois plus faibles, ce qui peut expliquer une jonction moins stable due à des phénomènes thermomécaniques. De la même manière, C8 semble présenter des jonctions inter couches hétérogènes, probablement dues à une densité énergétique faible. Concernant la rugosité de type III, la densité de particules semble être plus importante visuellement (on semble observer moins de particules partiellement fusionnées dans la surface). Pour les surfaces présentant de fortes densités d'énergie (C2, C3 et C6), les images présentent des jonctions stables, avec des traces de cordons de fusion plus homogènes. La densité de particules semble être moins élevée, sans que cela ne puisse être prouvé. Cela peut venir d'un bain de fusion à température plus élevée, résultant en la fusion de plus de particules avoisinant le bain de fusion. Pour C3 produite avec la plus grande densité d'énergie, la surface semble présenter une meilleure homogénéité avec des jonctions uniformes selon une ligne ainsi que ce qui semble être une plus faible densité de particules. Enfin, concernant la surface C9 produite avec la plus grande puissance laser et la plus grande vitesse de passage tout en affichant la même densité énergétique que C5, on remarque la présence nette des jonctions entre chaque couche avec une topographie en forme de vague au niveau des jonctions entre chaque couche (similaire à ce que présente la figure A.2). On peut supposer que la forte puissance et vitesse affecte la forme du bain de fusion (latéralement), ce qui se reflète sur la topographie observée.



(a) C1 (b) C2 (c) C3

(d) C4 (e) C5 (f) C6

(g) C7 (h) C8 (i) C9

Figure A.2 : Etat de surface des différents paramètres de fabrication

A.1.2.2. Effet des paramètres machine sur la rugosité de surface

Les valeurs des paramètres de rugosité de chaque surface sont répertoriées au sein du tableau A.2. La première chose que l'on remarque est que les surfaces C4 et C7 présentent les plus grandes valeurs de rugosité (Sa, S_q, S_t et S_{dr}) avec un S_{sk} négatif, lié au creux présent dans la surface, alors que C2, C3 et C6

présentent de plus faibles valeurs (avec un S_{sk} positif) par comparaison avec la surface de référence C5. De plus, on observe que C1, C5, et C9 affichent des valeurs de rugosités similaires (avec un p>0.05 pour Sa, S_q et S_t). Une hypothèse peut être faite à partir de l'ensemble des résultats : plus la densité énergétique est élevée, plus l'amplitude de la rugosité diminue. Cependant, cette hypothèse ne peut pas être vérifiée ici.

	S_a	S_q	S_t	S_{sk}	S_{dr}
C1	14.7 (± 4.3)	19.2 (± 5.9)	145.6 (± 17)	1.59 (± 0.45)	2.78 (± 0.25)
C2	12.5 (± 1.1)	16.5 (± 1.8)	122.6 (± 10)	-0.071 (± 0.12)	3.11 (± 0.1)
C3	13.1 (± 2.3)	16.6 (± 3.1)	107.3 (± 9)	0.35 (± 0.2)	2.98 (± 0.12)
C4	22.1 (± 5.1)	33.7 (± 9.2)	187.5 (± 25)	-0.89 (± 0.3)	3.43 (± 0.26)
C5	15.1 (± 1.8)	19.2 (± 3.6)	134.3 (± 11)	0.26 (± 0.2)	3.15 (± 0.14)
C6	14.8 (± 1.6)	19 (± 2.8)	120.9 (± 9.5)	0.58 (± 0.24)	3.12 (± 0.11)
C7	19.3 (± 3.9)	23.9 (± 8.1)	149.9 (± 16)	-0.083 (± 0.17)	2.93 (± 0.15)
C8	12.1 (± 1.7)	15.8 (± 1.5)	115.3 (± 12)	0.39 (± 0.18)	2.72 (± 0.14)
C9	15.9 (± 2.5)	19.5 (± 2.9)	129.8 (± 10.6)	0.59 (± 0.16)	2.98 (± 0.09)

Tableau A.2 : Paramètres de rugosité en fonction des paramètres machine

La figure A.3 décrit les évolutions de S_a et S_t en fonction de la puissance du laser et de la vitesse de passage. Concernant l'influence de la puissance du laser, S_a et S_t montrent une diminution de la rugosité avec l'augmentation de la puissance ; l'influence n'est pas significative entre 100 W et 150 W (p<0.05) dans le cas de 175 mm/s et 350 mm/s. Dans le cas de la vitesse de 525 mm/s, après une diminution initiale à 100 W, on observe une augmentation de la rugosité à P=150 W. Concernant l'influence de la vitesse de passage, on observe un comportement différent : pour les puissances laser de 50W et 100W, on observe une augmentation de la rugosité jusqu'à 350 mm/s, suivie d'une diminution. Dans le cas d'une vitesse de passage de 525 mm/s, on observe une augmentation constante de la rugosité. On observe aussi que les plus grandes rugosités sont obtenues pour P=50 W.

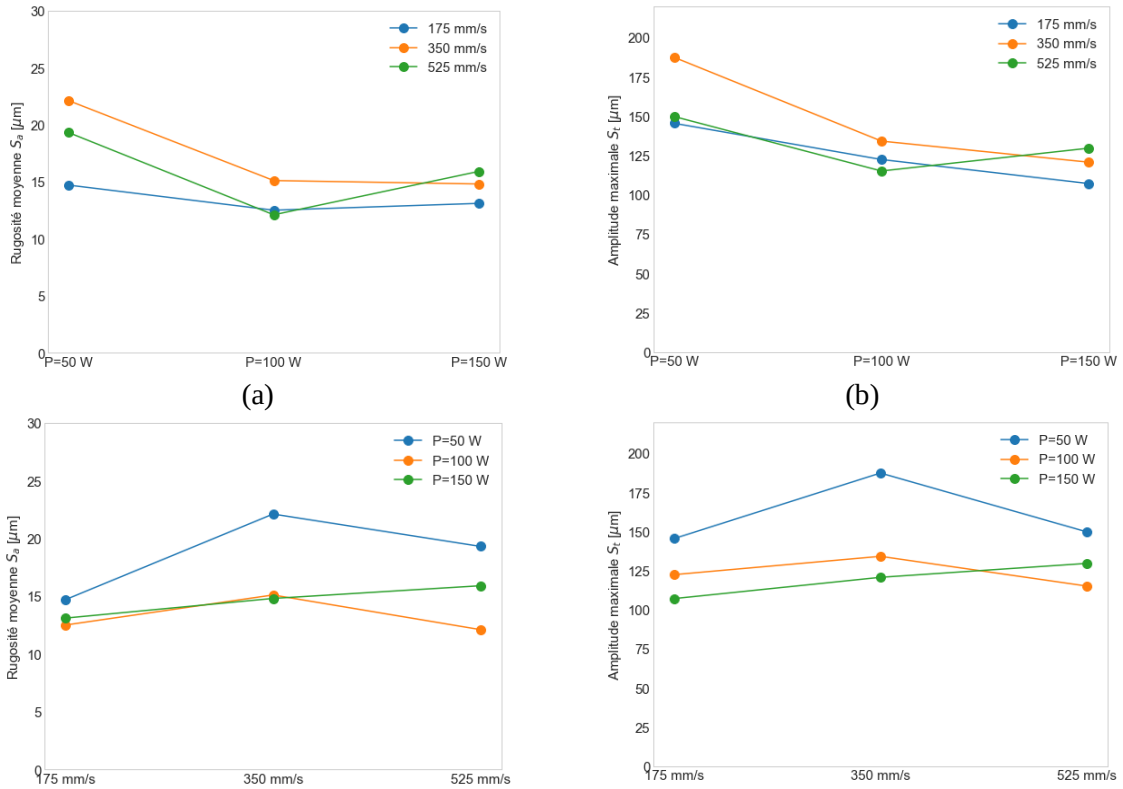


Figure A.3 : Evolution de S_a et S_t en fonction des différents paramètres de fabrication SLM. Les graphes représentent les valeurs moyennes des paramètres. (a) S_a en fonction de la puissance. (b) S_t en fonction de la puissance. (c) S_a en fonction de la vitesse de passage. (d) S_t en fonction de la vitesse de passage.

A.1.2.3. Relation entre mouillabilité et rugosité de surface

Les valeurs des angles de contact ainsi que de l'énergie de surface sont répertoriées au sein du tableau A.3. La surface C5 présente un angle de contact θ_{eau} légèrement plus faible et une énergie de surface Υ_{app} plus élevée que ceux obtenus sur 90B avec une épaisseur de couche de 30 µm. Les plus faibles θ_{eau}, et donc les plus grands Υ_{app}, sont observées pour les surfaces C1, C4 et C7 tandis que les plus grandes valeurs de θ_{eau} sont observées pour C3, C6, et C8. Contrairement à ce qui a pu être observé pour la rugosité, on observe une augmentation de θ_{eau} (et donc une diminution de Υ_{app}) en passant de C1 à C5 à C9. Si les plus faibles valeurs de θ_{eau} sur C5 et C7 peuvent être expliquées par les creux présents à la surface, on observe néanmoins une augmentation de θ_{eau} avec la puissance du laser.

	θ_{eau}	θ_{diiodo}	Υ_{app}
C1	84.1 (± 6.9)	37 (± 6.5)	52.2 (± 4.2)
C2	88.3 (± 3.1)	36.5 (± 3.5)	49.2 (± 3.1)
C3	93.4 (± 4.5)	40.8 (± 3.1)	44.5 (± 2.2)
C4	82.3 (± 7.7)	36 (±4.5)	54.9 (± 5.2)
C5	92.1 (± 4.5)	36.3 (±2.5)	49.5 (± 3.11)
C6	96.3 (± 3.24)	41.3 (±3.9)	44.8 (± 2.4)
C7	77.9 (± 4.02)	34.3 (± 5.3)	58.5 (± 3.11)
C8	96.3 (± 3.3)	35.8 (± 3.5)	44.4 (± 2.1)
C9	99.3 (± 3)	40 (± 2.2)	41.4 (± 1.8)

Tableau A.3 : Mesures de l'angle de contact et de l'énergie de surface en fonction des paramètres machine

Afin de vérifier cette hypothèse, θ_{eau} et Υ_{app} ont été tracés en fonction de la puissance laser et de la vitesse de passage sur la figure A.4. On observe une augmentation significative de θ_{eau}, accompagnée par une diminution significative de Υ_{app}, de 50 W à 150 W pour toutes les vitesses de passage. Aucune influence significative de la vitesse de passage ne semble ressortir. Ces résultats semblent donc supporter l'hypothèse de l'influence de la puissance du laser, bien que cette hypothèse ne soit pas validée ici.

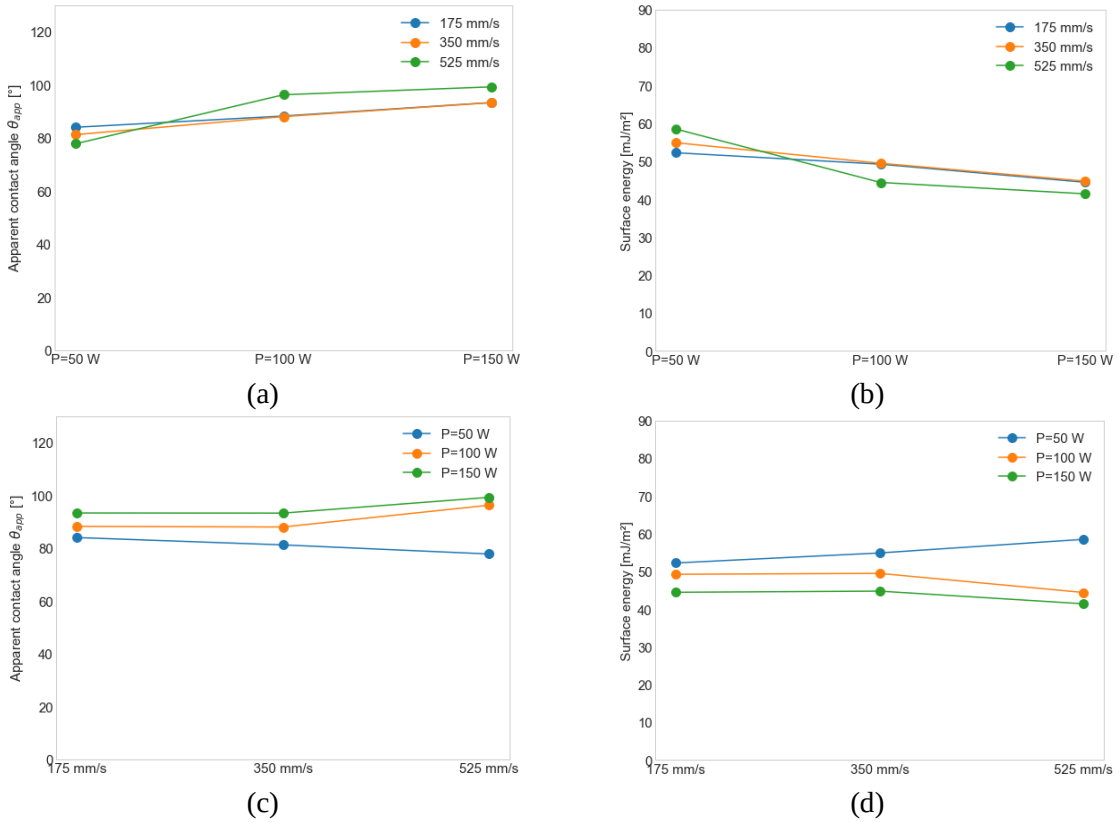


Figure A.4 : Evolution de θ_{app} et de Υ_{app} selon les différents paramètres de fabrication SLM. Les graphes représentent les valeurs moyennes des paramètres. (a) θ_{app} en fonction de la puissance. (b) Υ_{app} en fonction de la puissance. (c) θ_{app} en fonction de la vitesse de passage. (d) Υ_{app} en fonction de la vitesse de passage.

Cette étude a été réalisée sur des éprouvettes fabriquées avec des paramètres de fabrication entrainant ainsi une densité énergétique de 71 kJ/mm3 pour une épaisseur de couche de 0.05 mm contrairement à la valeur de 138.9 kJ/mm3 obtenue pour une épaisseur de couche de 0.03 mm (utilisée dans la phase principale de l'étude). Cette différence ne permet pas une comparaison directe avec les paramètres que l'on utilise dans notre étude mais les résultats obtenus nous renseignent sur l'évolution de la rugosité. Concernant la topographie de la surface, si l'on observe une évolution de l'état de surface avec les paramètres machine, aucune différence significative majeure ne semble ressortir quant à la densité de particules présentes à la surface. L'influence principale ressort sur la stabilité du bain de fusion, qui affecte les paramètres mécaniques et structuraux de la pièce. Ainsi, la rugosité qui nous intéresse ici étant celle de type III, une réduction de celle-ci par la modification des paramètres machine ne semble pas être possible au sein de l'intervalle de valeurs considéré. En termes de mouillabilité, les paramètres de fabrication semblent avoir une influence, la puissance du laser notamment, sans que ceci soit statistiquement prouvé. Malgré ces résultats, on remarque que changer les paramètres de contour et les stratégies de passage entraine potentiellement une modification de la structure du matériau au sein d'une partie spécifique de la couche. Notre étude se limitant à l'analyse de l'état de surface externe et non aux propriétés mécaniques de l'ensemble de la pièce (considérées d'ordre 1 lors de l'élaboration

d'une pièce), les paramètres retenus lors de l'élaboration des pièces resteront les paramètres supposés donner les meilleures performances mécaniques.

A.2. Modèle CP multicellulaire

A.2.1. Diagramme de fonctionnement du modèle

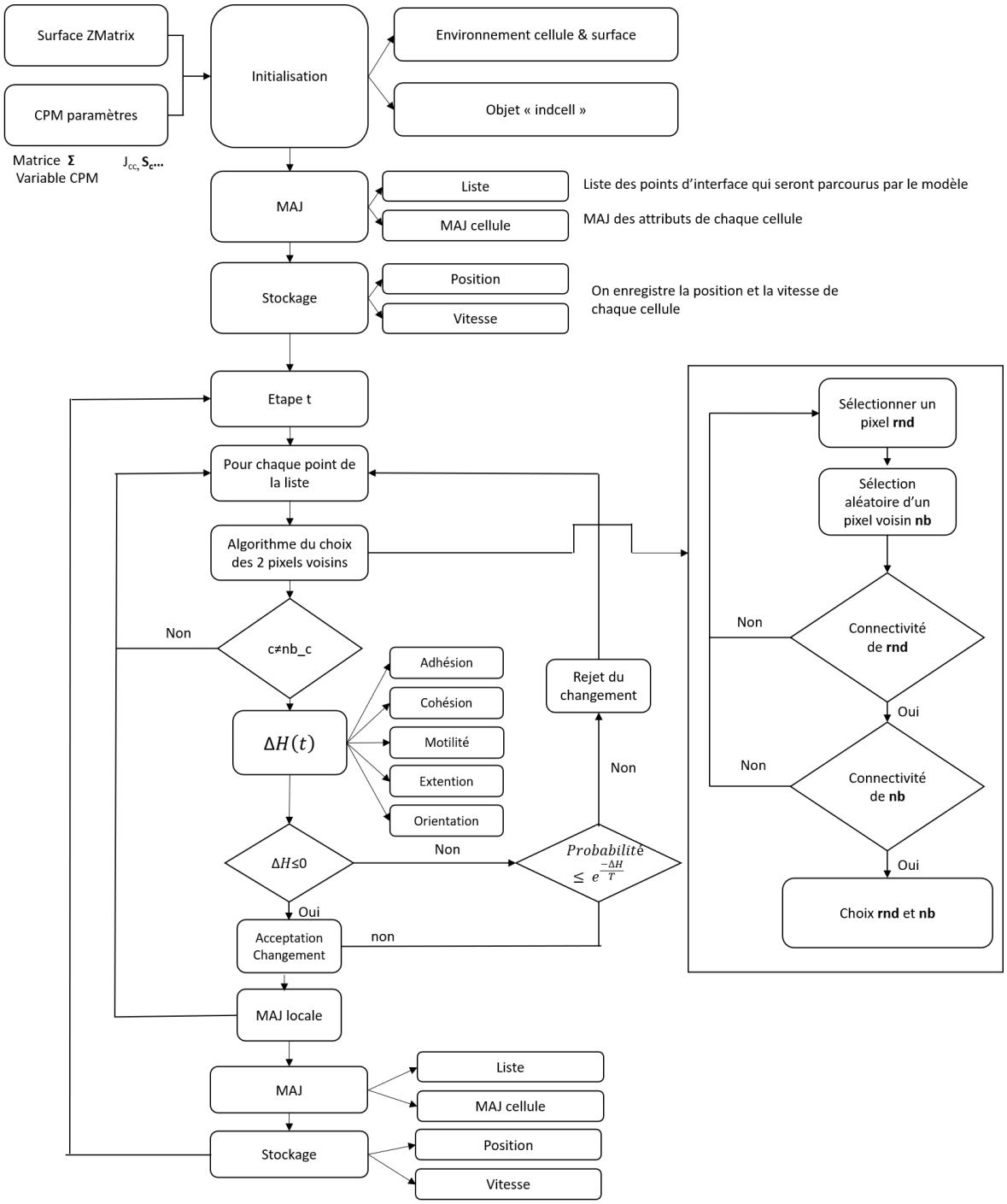


Figure A.5 : Diagramme de fonctionnement du modèle CP de prolifération

A.2.2. Etude de sensibilité unicellulaire

Une étude de sensibilité a été menée afin de choisir les valeurs de paramètres au sein du modèle.

Le lattice prend la forme d'un carré de longueur 150 pixels x 150 pixels avec des frontières non-périodiques. Chaque site définit un carré de dimension 2.5 µm x 2.5 µm et chaque cellule prend la forme initiale d'un carré de côté 15 pixels, soit un volume de 225 pixels. Le lattice initial est composé d'une cellule placée sur la moitié gauche de l'environnement, et laissée à migrer avec une polarisation dans le sens des x pour une durée de 2000 MCS. L'ensemble des paramètres du modèle sont définis dans le tableau A.4.

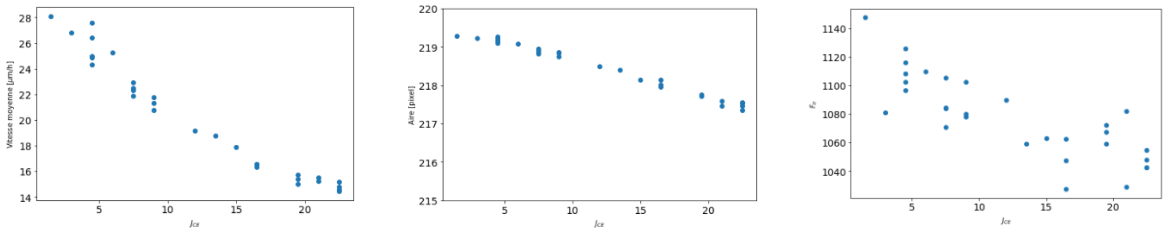
Description	Symbole	Valeur	Unité
Pas	t	2000	MCS
Température	T	2.5×10^{-27}	kg m²/s²
Domaine lattice	Ω	150 x 150	pixel
Surface cible	$S_{\sigma,0}$	225 (1405)	pixel (µm²)
Lambda surface	λ_S	50×10^{-9}	kg/s²m³
Lambda motilité	λ_M	0.125×10^{-18}	kg/s²m³
Lambda extension	λ_e	0.01	kg/s².Pa.m
Lambda orientation	λ_o	20	kg/s².m
Adhésion cellule/cellule	J_{CC}	5×10^{-15}	kg/s²
Adhésion cellule/extérieur	J_{CE}	4×10^{-15}	kg/s²
Force unitaire	μ	1	Pa. µm^{-1}
Coefficient d'élévation	K_μ	0.25	µm^{-1}
Pas de prolifération	φ	10	-

Tableau A.4 : Paramètres du modèle CP

Les paramètres de sortie du modèle se définissent par la distance parcourue, l'aire moyen de la cellule durant la simulation ainsi que la force maximale estimée sur la cellule durant la simulation.

A.2.2.1. Influence de l'adhésion J_{CE}.

L'adhésion de la cellule à l'extérieur prend la forme d'une énergie compressive appliquée sur la cellule, limitant la croissance de celle-ci vers l'extérieur. Cela se traduit par une diminution de la vitesse avec l'augmentation de J_{CE}. Au niveau de l'aire de la cellule, la diminution observée avec l'augmentation de J_{CE} vient conforter cette idée de compressibilité apportée par le médium, tout comme la diminution des forces d'extension.

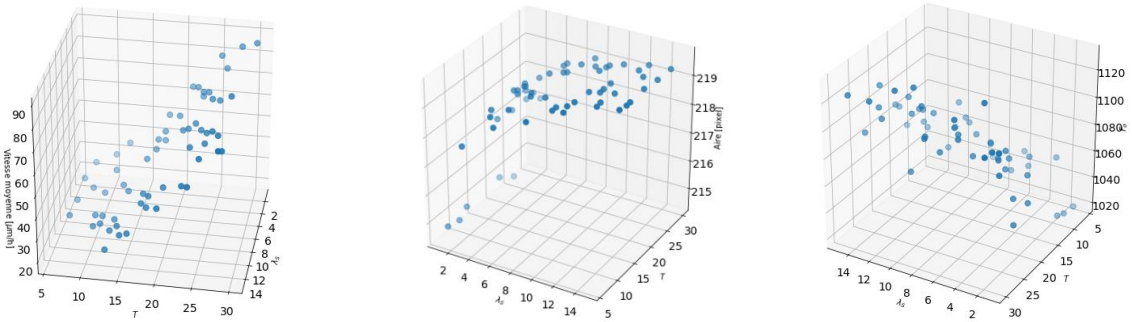


(a) *(b)* *(c)*

Figure A.6 : Influence de J_{CE} sur différentes propriétés cellulaires. (a) Vitesse moyenne de migration ; (b) Aire moyen de la cellule ; (c) Force d'extension moyen estimée.

A.2.2.2. Influence de la température T et de la rigidité cellulaire λ_S

En termes de température T, tout comme le modèle unicellulaire 3D, l'influence ici suit l'augmentation en T, avec une augmentation de la vitesse, une plus grande liberté sur l'aire, et une augmentation des forces d'extension estimées. La rigidité de la cellule va significativement influencer le comportement cellulaire et compose le terme énergétique le plus important de l'Hamiltonien global du système, celui-ci régissant la cohésion de la cellule. La rigidité représente donc au sein de notre modèle le degré de liberté accordé à la cellule pour pouvoir varier son volume (ici son aire) par rapport à un volume de référence (ici une aire de référence). De la même manière que dans le modèle unicellulaire 3D, une augmentation de cette rigidité s'accompagne d'une diminution de la vitesse de migration cellulaire, avec une aire plus proche de l'aire de référence, et donc une force d'extension plus forte.

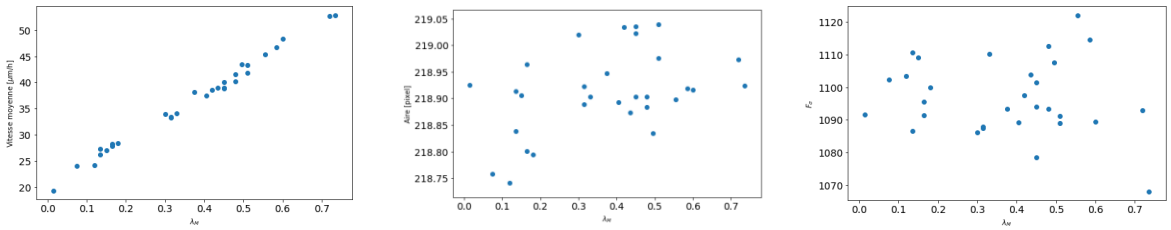


(a) *(b)* *(c)*

Figure A.7 : Influence de T et λ_S sur différentes propriétés cellulaires. (a) Vitesse moyenne de migration ; (b) Aire moyen de la cellule ; (c) Force d'extension moyen estimée.

A.2.2.3. Influence de la motilité cellulaire λ_M

La motilité représente l'énergie allouée à la cellule afin de permettre son mouvement. Ainsi, une augmentation de cette énergie doit avoir pour influence d'augmenter la motilité de la cellule et de réduire l'énergie dépensée. Cela se voit sur nos simulations avec une augmentation de la vitesse de migration avec l'augmentation de λ_M. Concernant l'aire et les forces d'extension estimées, bien que non démontrées statistiquement, une augmentation des deux paramètres semble être observée.

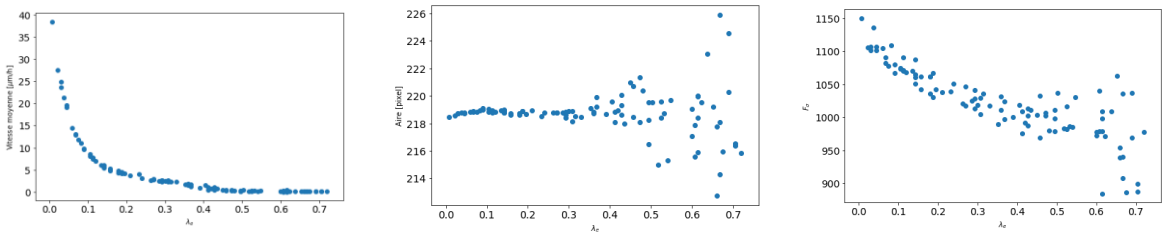


(a) *(b)* *(c)*

Figure A.8 : Influence de λ_M sur différentes propriétés cellulaires. (a) Vitesse moyenne de migration ; (b) Aire moyen de la cellule ; (c) Force d'extension moyen estimée.

A.2.2.4. Influence du paramètre d'extension cellulaire λ_e

Concernant l'hamiltonien d'extension cellulaire, l'étude a été réalisée sur une surface plane. Le paramètre λ_e a été varié de 0 à 0.8 avec un pas de 0.01.



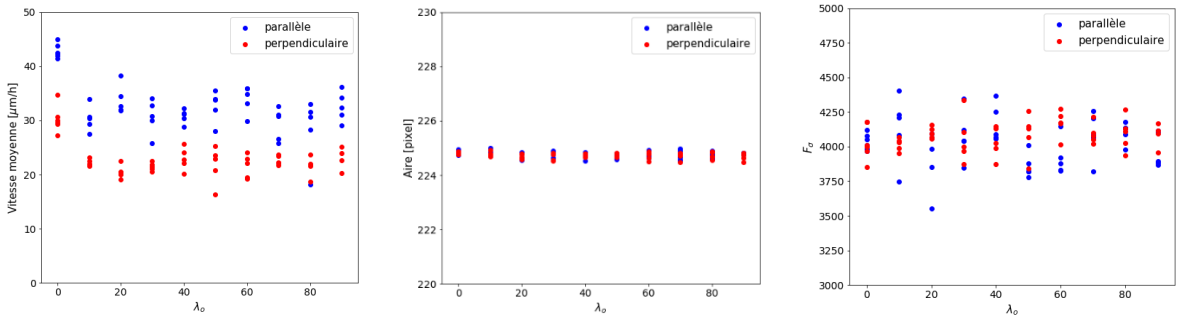
(a) *(b)* *(c)*

Figure A.9 : Influence de λ_e sur différentes propriétés cellulaires. (a) Vitesse moyenne de migration ; (b) Aire moyen de la cellule ; (c) Force d'extension moyen estimée.

En termes de forces d'extension, on observe une diminution de ces forces avec l'augmentation du paramètre λ_e. Cependant, cette diminution reflète une rigidification de la cellule, qui tente de diminuer la valeur maximale de ces forces de tractions en diminuant son aire. Ainsi, cette rigidification se traduit par une diminution significative de la vitesse de migration cellulaire. Comme le montre la figure, la valeur maximale de force d'extension obtenue correspond à la valeur minimale de force permettant le déplacement de la cellule. Au-dessus de cette valeur, la cellule ne peut pas bouger. Concernant l'évolution de l'aire de la surface, on remarque que celle-ci reste stable jusqu'à une valeur seuil où les valeurs d'aires commencent à fortement variées.

A.2.2.5. Influence du paramètre de détection d'orientation λ_O

Afin d'étudier l'influence de l'orientation, une surface rainurée a été modélisée (w=10 et d=10) avec une orientation parallèle (en orange) et perpendiculaire (en bleu) à la direction de migration.



(a) *(b)* *(c)*

Figure A.10 : Influence de λ_o sur différentes propriétés cellulaires. (a) Vitesse moyenne de migration ; (b) Aire moyen de la cellule ; (c) Force d'extension moyen estimée.

En termes de vitesse de migration, on observe une différence claire entre l'orientation parallèle et l'orientation perpendiculaire, et cela même pour un λ_O=0. Cependant, cette différence semble maximale pour λ_O=20. Concernant l'aire et les forces d'extension estimées, aucune différence significative ne semble être observée.

A.2.3. Migration unicellulaire sur des surfaces de référence

Dans le but de comparer le comportement migratoire du modèle CP modifié 2D au modèle de migration unicellulaire 3D présenté dans le chapitre 4, des simulations de migrations cellulaires sur différentes surfaces ont été réalisées.

Le lattice est un carré de dimensions 500 µm x 500 µm avec des conditions aux limites fixes (i.e. les frontières délimitant l'environnement sont considérées comme des murs infranchissables).

Chaque site définit un carré de dimension 2.5 µm x 2.5 µm et chaque cellule a une forme initiale d'un cube de 15 pixels, formant une surface cible de 225 pixels, soit 1405 µm². La température T est fixée à 2.5 x 10^{-27} kg/m²s² ; J_{CE} et J_{CC} sont égaux à 4 x 10^{-15} kg/s² et 5 x 10^{-15} kg/s² respectivement ; λ_S est fixé à 1 x 10^{-3} kg/s²m² et λ_M est fixé à 0.125 x 10^{-18} kg/s²m³ ; les paramètres de détection de la topographie μ , K_μ, λ_F et λ_o prennent respectivement 1 Pa/µm, 0.25 µm^{-1}, 0.01 kg/s².Pa.m et 20 kg/s².m afin de garantir la détection de la rugosité par la cellule. Un MCS est égal à 4 min et le temps de simulation est de 2000 MCS, soit environ 6 jours. A l'état initial, cinq cellules régulièrement espacées sont placées à gauche de l'environnement et elles sont mises en mouvement dans la direction $\vec{p}$ comme décrit via le terme $\Delta H_{motilité}$. Toutes les simulations ont été répétées 10 fois afin d'obtenir des données consistantes et reproduisibles. Tous les paramètres du modèle et leurs valeurs sont reportés dans le Tableau A.5.

Description	Symbole	Valeur	Unité
Pas	t	2000	MCS
Température	T	2.5 x 10^{-27}	kg m²/s²
Domaine lattice	Ω	200 x 200 (500 x 500)	pixel (µm)
Surface cible	$S_{\sigma,0}$	225 (1405)	pixel (µm²)
Lambda surface	λ_S	50 x 10^{-9}	kg/s²m³
Lambda motilité	λ_M	0.125 x 10^{-18}	kg/s²m³
Lambda extension	λ_e	0.01	kg/s².Pa.m
Lambda orientation	λo	20	kg/s².m
Adhésion cellule/cellule	J_{CC}	5 x 10^{-15}	kg/s²
Adhésion cellule/extérieur	J_{CE}	4 x 10^{-15}	kg/s²
Force unitaire	μ	1	Pa. µm^{-1}
Coefficient d'élévation	K_μ	0.25	µm^{-1}
Vecteur polarisation	$\vec{p}$	$\begin{bmatrix}1\\0\end{bmatrix}$	-

Tableau A.5 : Paramètres du modèle CP

A.2.3.1. Topographie aléatoirement rugueuse

La surface d'étude suit l'équation (4.9) définie dans la section 4.2.2.2, prenant aléatoirement une valeur d'altitude au sein d'un intervalle [0 ; R] avec R l'altitude maximale. La surface plane est définie par une surface sans topographie (théoriquement lisse).

Le figure A.11 présente les valeurs des vitesses moyennes de migration en fonction de la valeur de R. On observe bien une décroissance de la vitesse de migration par rapport à la surface plane, bien que les grands écart-types montrent une hétérogénéité au niveau de la migration.

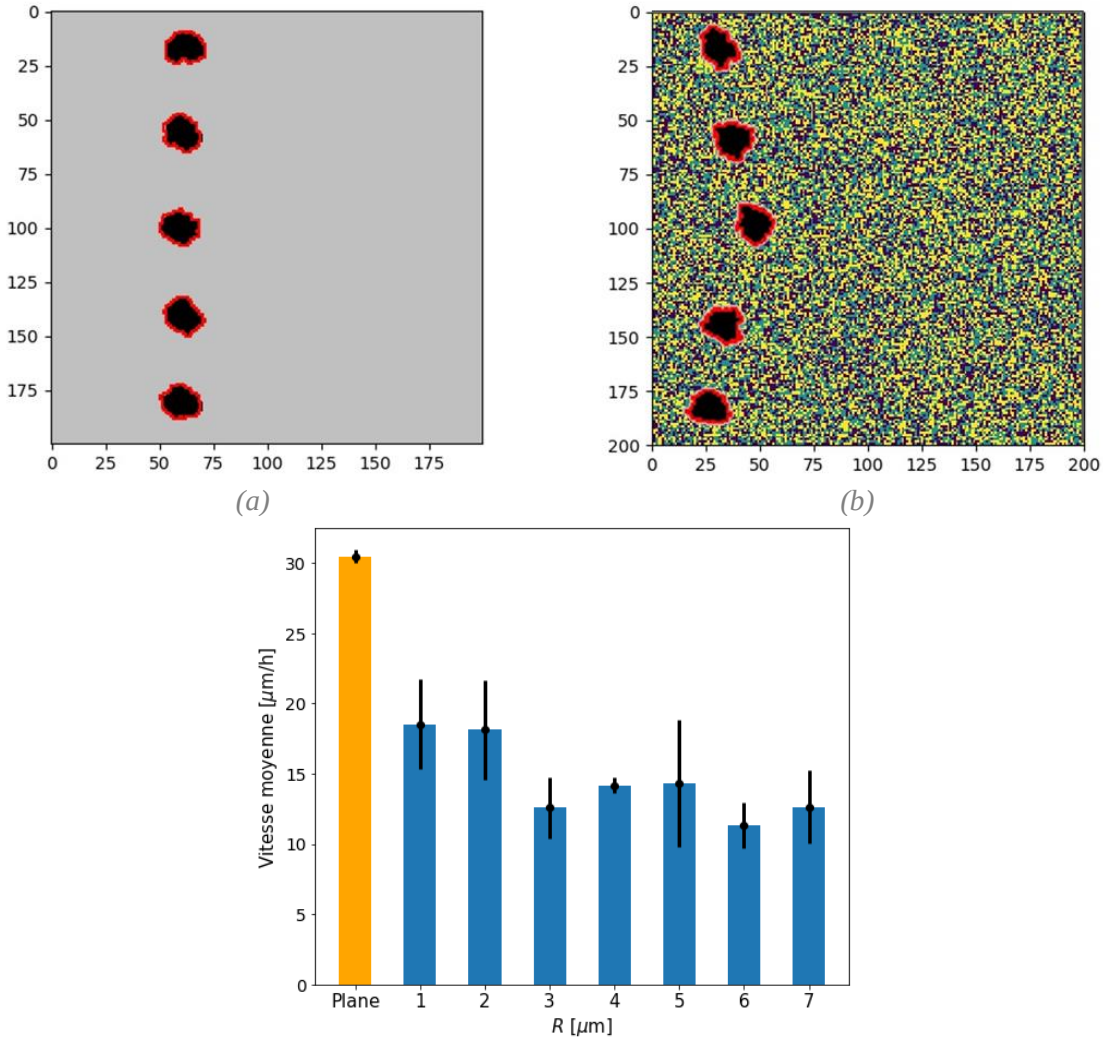
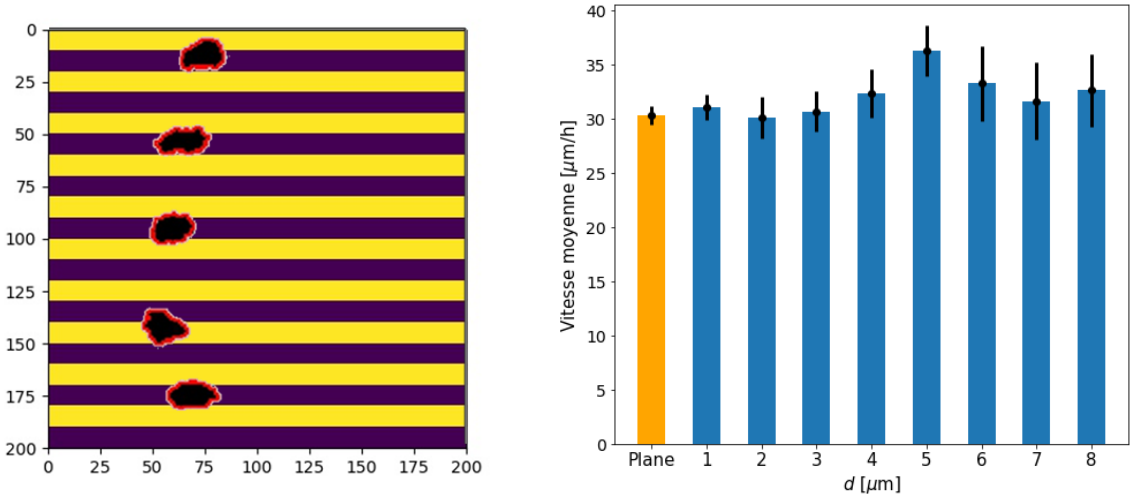


Figure A.11 : Résultats des simulations de migration sur une topographie aléatoirement rugueuse. (a) Simulation de migration a t=1500 MCS sur surface plane (R=0) ; (b) Simulation de migration a t=1500 MCS pour R=5 µm ; (c) Valeurs des vitesses moyennes de migration. La barre orange donne la valeur de la vitesse de migration sur la surface plane.

A.2.3.1. Topographie en rainure orientée parallèle

Cette surface suit l'équation (4.10) définie dans la section 4.2.2.2, avec une rainure définie par sa largeur *w* et sa profondeur *d*. La largeur de la rainure *w* est fixée à 20 µm et sa profondeur est variable. De plus, une simulation de référence avec une surface plane a aussi été réalisée.

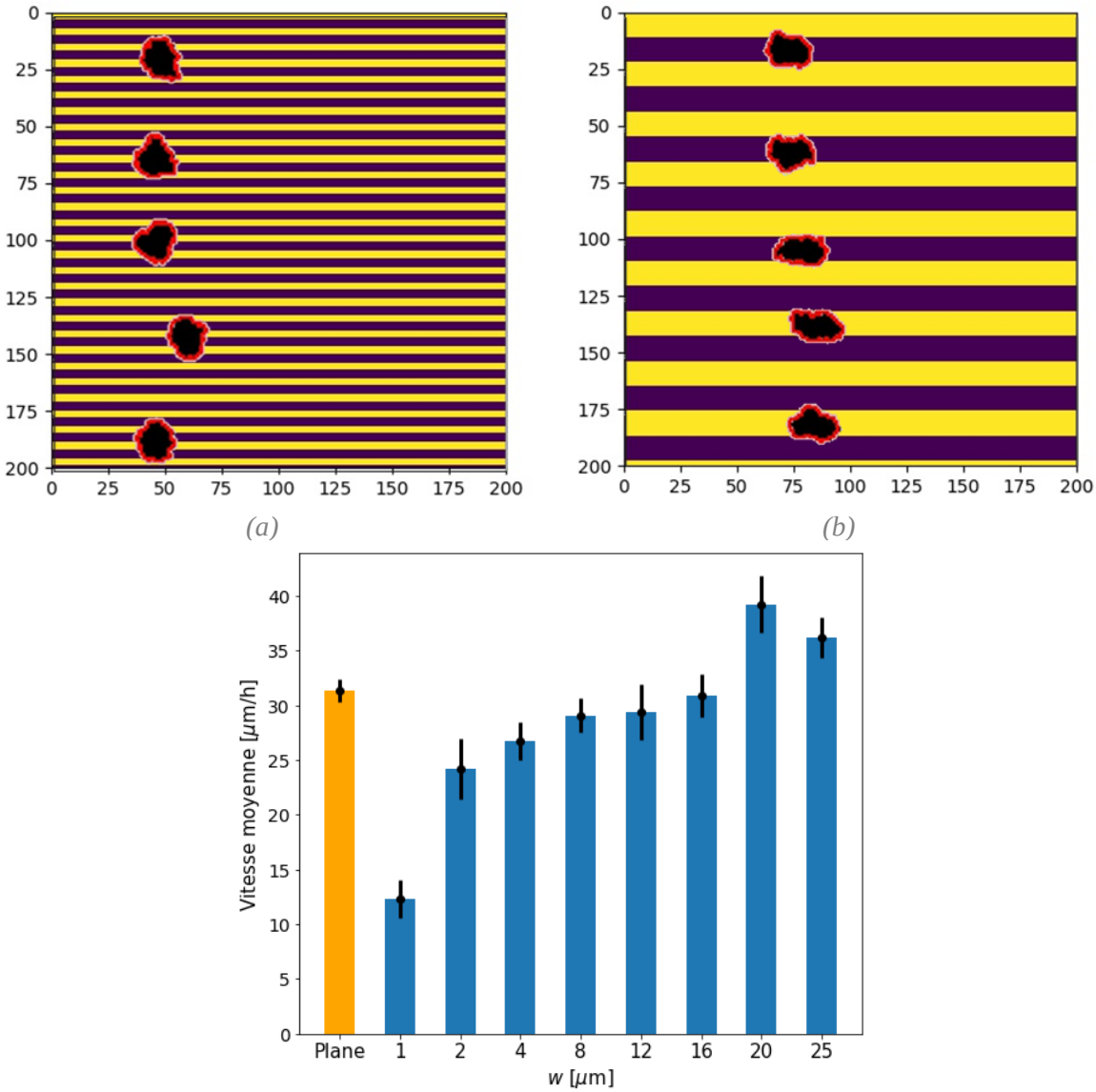
La figure A.12 présente les valeurs des vitesses moyennes de migration en fonction de la profondeur de rainure *d*. On observe l'augmentation de la vitesse de migration jusqu'à un maximum à *d*=5 µm, suivi par une légère diminution.



(a) *(b)*

Figure A.12 : Résultats des simulations de migration sur une surface rainurée avec une profondeur variable d. (a) Simulation de migration a t=1500 MCS ; (b) Valeurs des vitesses moyennes de migration. La barre orange donne la valeur de la vitesse de migration sur la surface plane.

Le groupe suivant de simulations fixe la profondeur *d* à 10 µm et fait varier la largeur de rainure *w*. La figure A.12 présente les valeurs des vitesses moyennes de migration en fonction de la largeur de rainure *w*. On observe une inhibition de la migration à faible valeur de *w* suivi par une favorisation de la migration passée *d*=20 µm.



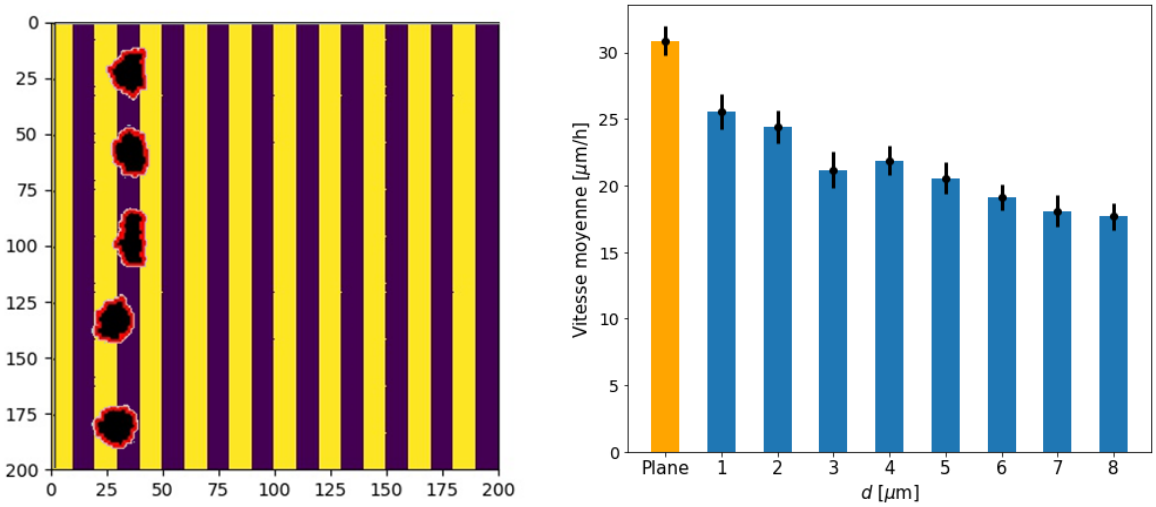
(c)

Figure A.13 : Résultats des simulations de migration sur une surface rainurée avec une largeur variable w. (a) Simulation de migration a t=1500 MCS pour w=4 µm ; (b) Simulation de migration a t=1500 MCS pour w=20 µm ; (c) Valeurs des vitesses moyennes de migration. La barre orange donne la valeur de la vitesse de migration sur la surface plane.

A.2.3.2. Topographie en rainure orientée perpendiculaire

Un groupe de simulations sur une surface rainurée perpendiculaire à la direction de migration est réalisé. Cette surface suit l'équation (4.11) définie dans la section 4.2.2.2, avec une rainure définie par sa largeur *w* et sa profondeur *d*. La largeur de la rainure *w* est fixée à 20 µm et sa profondeur est variable. De plus, une simulation de référence avec une surface plane a aussi été réalisée.

La figure A.14 présente les valeurs des vitesses moyennes de migration en fonction de la profondeur de rainure *d*. On retrouve bien une diminution de la vitesse de migration avec l'augmentation de *d*.



(a) *(b)*

Figure A.14 : Résultats des simulations de migration sur une surface rainurée avec une profondeur variable d. (a) Simulation de migration a t=1500 MCS ; (b) Valeurs des vitesses moyennes de migration. La barre orange donne la valeur de la vitesse de migration sur la surface plane.

Le groupe suivant de simulations fixe la profondeur *d* à 10 µm et fait varier la largeur de rainure *w*. La figure A.15 présente les valeurs des vitesses moyennes de migration en fonction de la largeur de rainure *w*. On observe une plus faible vitesse de migration par rapport à la surface plane. Cependant, l'augmentation de *w* semble diminuer cette inhibition.

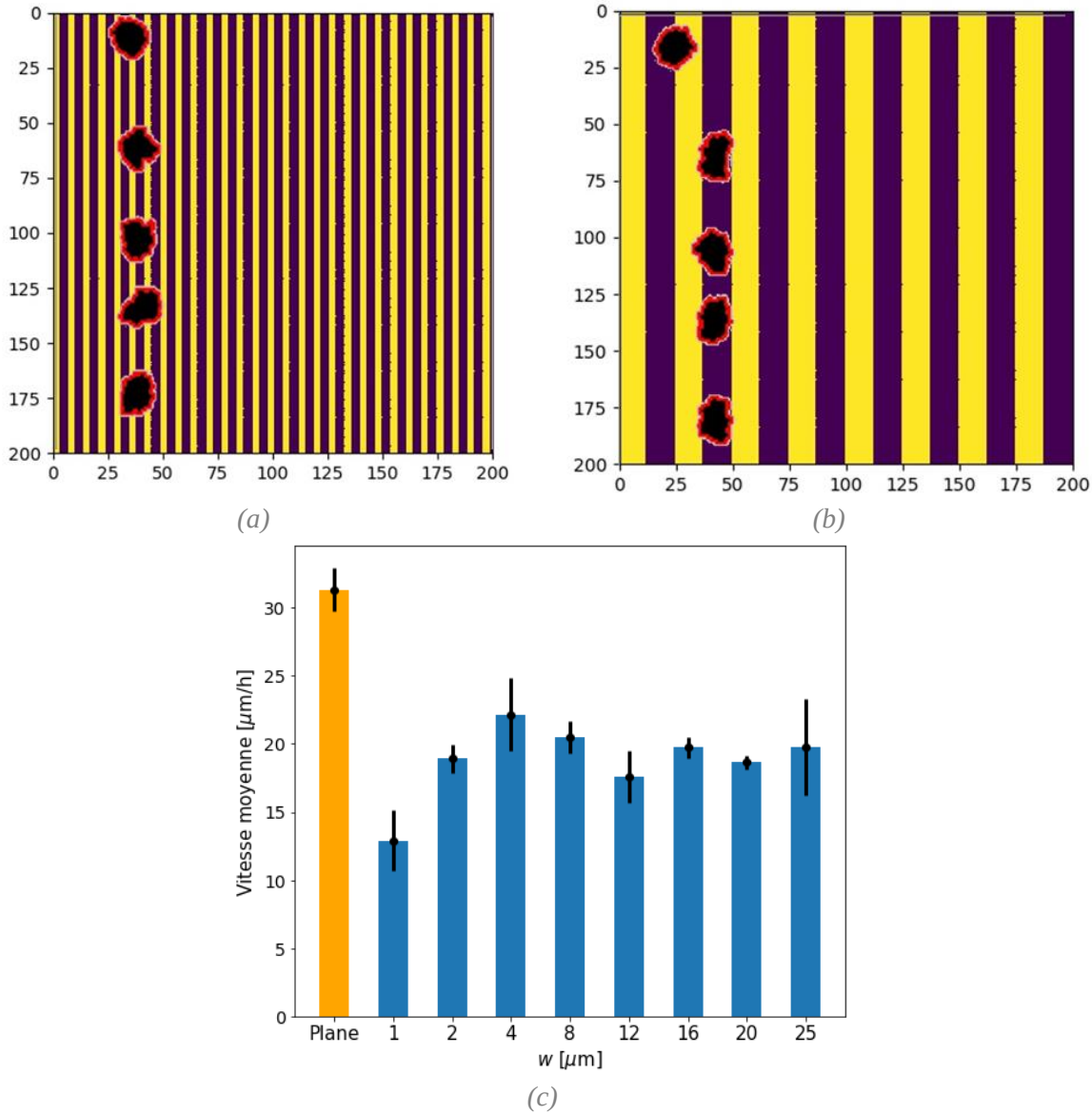


Figure A.15 : Résultats des simulations de migration sur une surface rainurée avec une largeur variable w. (a) Simulation de migration a t=1500 MCS pour w=4 µm ; (b) Simulation de migration a t=1500 MCS pour w=20 µm ; (c) Valeurs des vitesses moyennes de migration. La barre orange donne la valeur de la vitesse de migration sur la surface plane.

Globalement, les résultats obtenus évoluent de la même manière que ceux provenant du modèle de migration unicellulaire 3D (voir section 4.2.3). Cependant, les écarts observés sont beaucoup moins grands dans le cas du modèle 2D, créant une différence entre les résultats observés et ceux du modèle 3D du chapitre 4. Cela peut s'expliquer par l'approche adoptée. En effet, au sein du modèle de migration 3D, la topographie de la surface est représentée physiquement (en prenant l'exemple d'un mur, la cellule ne peut pas traverser le mur et doit le contourner). Au contraire, au sein de notre modèle 2D, la topographie prend la forme d'un seuil énergétique à passer (en reprenant l'exemple du mur, la cellule doit fournir une certaine énergie pour passer le mur. Cependant, l'intégration de l'aspect aléatoire dans le comportement de la cellule peut engendrer dans de rares cas le franchissement de cette barrière énergétique malgré une impossibilité physique).

A.2.4. Modèle CP de migration collective

Cette annexe décrit nos travaux sur la migration collective. Le modèle utilisé pour simuler la migration collective reprend celui du chapitre 5.

A.2.4.1. Modification du modèle CP

D'après la littérature, lors de la migration collective d'une population, des cellules dites « leaders » initient le mouvement de l'ensemble de la population, et différents modes de migration peuvent être créés selon les caractéristiques des cellules et de leur environnement [1]. Cela a été étudié par Rausch et al [2] qui montrent que la création de variations locales de courbure au niveau du périmètre de la population créées géométriquement avaient pour effet d'induire la création de cellules leaders. Cet aspect est repris dans notre modèle en créant deux types cellulaires : τ =F pour les cellules dites suiveuses et τ =L pour les cellules dites meneuses. L'énergie totale de la cellule repose toujours sur la modélisation de cinq mécanismes cellulaires, sous la forme :

$$H = H_{adhésion} + H_{cohésion} + H_{motilité} + H_{extension} + H_{orientation} \qquad \text{(A.1)}$$

Cependant, $H_{adhésion}$ et $H_{motilité}$ ont été modifiés afin de prendre en compte les deux types cellulaires.

Concernant $H_{adhésion}$, garde la même forme que celle défini pour le modèle de prolifération (voir section 2.2.1.1). Cependant, le terme $J_{\sigma,\sigma'}$ prend 5 formes différentes :

- J_{ME} représentant l'adhésion entre les cellules meneuses et l'extérieur
- J_{SE} représentant l'adhésion entre les cellules suiveuses et l'extérieur
- J_{MM} représentant l'adhésion entre les cellules meneuses
- J_{SS} représentant l'adhésion entre les cellules suiveuses
- J_{MS} représentant l'adhésion entre les cellules meneuses et les cellules suiveuses

Concernant la motilité cellulaire, la forme de $H_{motilité}$ reste la même (voir section 2.2.1.3). La différence entre les cellules meneuses et suiveuses est définie par le vecteur $\vec{p}$. Les cellules meneuses initient le mouvement de la population de cellule, et sont donc défini par le vecteur polarisation $\vec{p}$. Les cellules suiveuses vont être guidées pour les cellules meneuses, et vont donc être définies par un vecteur polarisation nulle ($\vec{p}$ =0). Afin de déterminer le vecteur polarisation des cellules meneuses, on a défini pour chaque cellule un paramètre de périmètre libre, correspondant à l'ensemble des pixels $i \in M$ en contact avec l'extérieur, M définissant l'espace des sites composant le périmètre de la cellule (figure A.16). Ainsi, en définissant $\overrightarrow{p_i}$ comme le vecteur entre le centroïde (COM) de la cellule et le site i, on définit alors $\vec{p}$ par :

$$\vec{p} = \sum_{i \in M} \overrightarrow{p_i} \qquad \text{(A.2)}$$

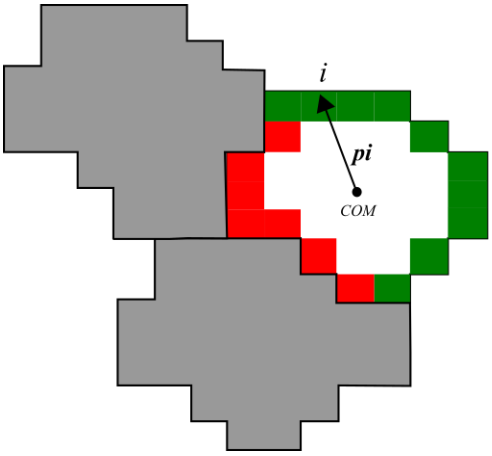


Figure A.16 : Calcul du vecteur polarisation.

Par ailleurs, afin de déterminer le moment où une cellule passe de type meneuse (τ=L) au type suiveuse (τ=F) (et inversement), on s'est défini un terme paramètre de contact r_S (pourcentage de périmètre cellulaire en contact avec le médium) définit entre 0 (complètement entourée de cellules) et 1 (en contact avec aucunes cellules). Ainsi, on s'est donc défini :

$$\tau = \begin{cases} F & si\ r_s \leq 0.5 \\ L & si\ r_s > 0.5 \end{cases} \qquad (2)$$

A.2.4.2. Simulation de la migration collective

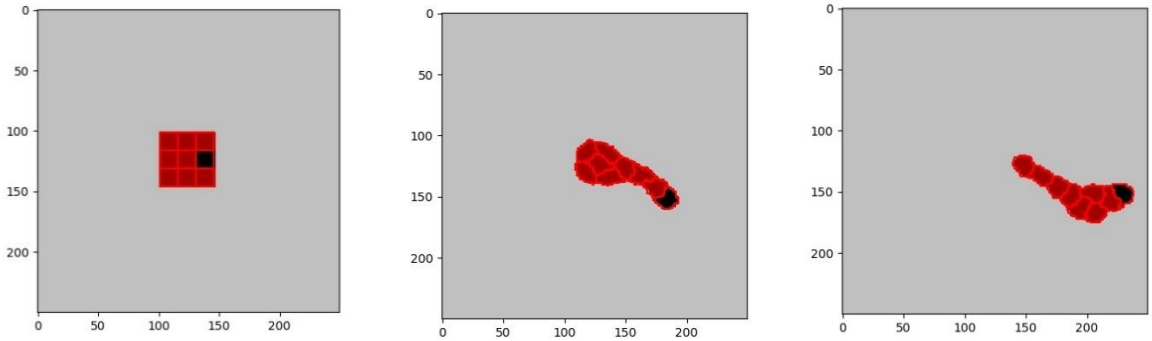
Les paramètres du modèle de migration collective sont définis dans le tableau A.7.

Description	Symbole	Valeur	Unité
Température	T	2.5×10^{-27}	kg m²/s²
Surface cible	$S_{\sigma,0}$	225 (1405)	pixel (µm²)
Lambda surface	λ_S	50×10^{-9}	kg/s²m³
Lambda motilité	λ_M	0.125×10^{-18}	kg/s²m³
Lambda extension	λ_e	0.01	kg/s².Pa.m
Lambda orientation	λo	20	kg/s².m
Adhésion meneuse/extérieur	J_{ME}	4×10^{-15}	kg/s²
Adhésion suiveuse/extérieur	J_{SE}	4×10^{-15}	kg/s²
Adhésion meneuse / meneuse	J_{MM}	5×10^{-15}	kg/s²
Adhésion suiveuse / suiveuse	J_{SS}	5×10^{-15}	kg/s²
Adhésion meneuse / suiveuse	J_{MS}	1×10^{-15}	kg/s²
Force unitaire	μ	1	Pa. µm^{-1}
Coefficient d'élévation	K_μ	0.25	µm^{-1}
Pas de prolifération	φ	10	-

Tableau A.7 : Paramètres du modèle CP.

Dans un premier temps, le comportement migratoire d'une population de cellules menée par une cellule meneuse a été étudié. Pour cela, un lattice carré est défini de dimensions 625 µm x 625 µm avec des conditions aux limites fixes (i.e. les frontières délimitant l'environnement sont considérées comme des murs infranchissables). Chaque site définit un carré de dimension 2.5 µm x 2.5 µm avec 1 MCS correspondant à 4 minutes. A l'état initial, une population de 9 cellules (8 suiveuses en rouge et une meneuse en noire dans la figure A.17) est placée au centre du lattice, puis est laissée à migrer pour 3000 MCS. L'algorithme de changement entre cellule meneuse et suiveuse (défini via r_s) est désactivé afin de garder une seule cellule meneuse.

La figure A.17 montre les résultats de la simulation sur une surface sans topographie. La population de cellules se réorganise avec des mouvements de rotation afin de suivre la cellule suiveuse durant la migration. De plus, les résultats de la simulation ont montré un détachement de la cellule meneuse dans le cas où le vecteur $\vec{p}$ est fixé dans une direction. Cela permet donc de supposer que la cellule meneuse s'adapte aussi aux cellules suiveuses afin de permettre la migration.



(a) t=0 MCS *(b) t=1500 MCS* *(c) t=3000 MCS*

Figure A.17 : Migration cellulaire créée par une cellule suiveuse.

Dans un deuxième temps, des essais de migration collective d'une population de cellules sur différentes surfaces ont été réalisés. Un lattice carré est défini de dimensions 1 mm x 1 mm est défini suivant les mêmes conditions que précédemment, avec un temps de simulation de 4000 MCS. Une population initiale de 4 cellules suiveuses est laissée à proliférer jusqu'à remplir un cercle de rayon 190 µm (phase 2, figure A.18). La prolifération est alors arrêtée et les cellules sont laissées à migrer sur la surface (phase 3, figure A.18). L'algorithme de changement entre cellule meneuse et suiveuse (défini via r_s) est activé afin d'initier la création de cellules suiveuses, et donc la migration.

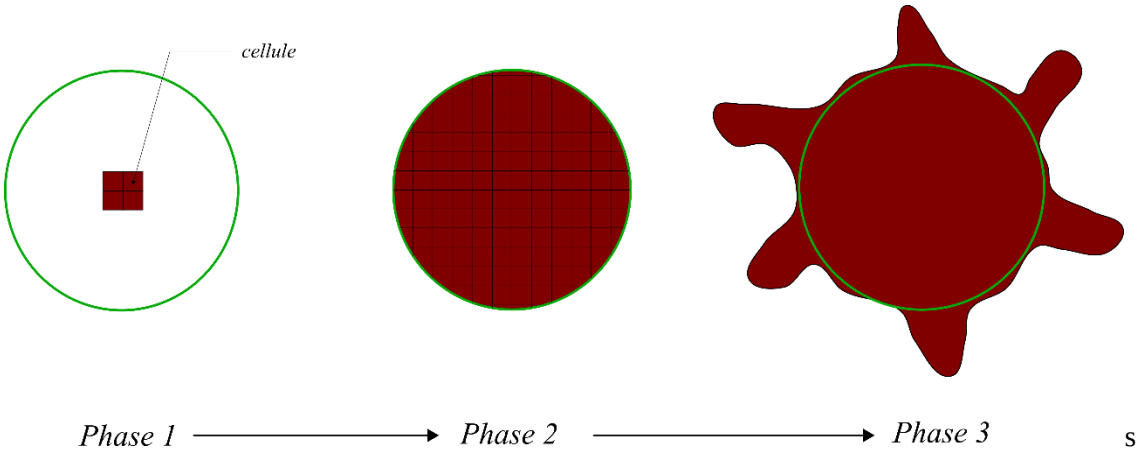
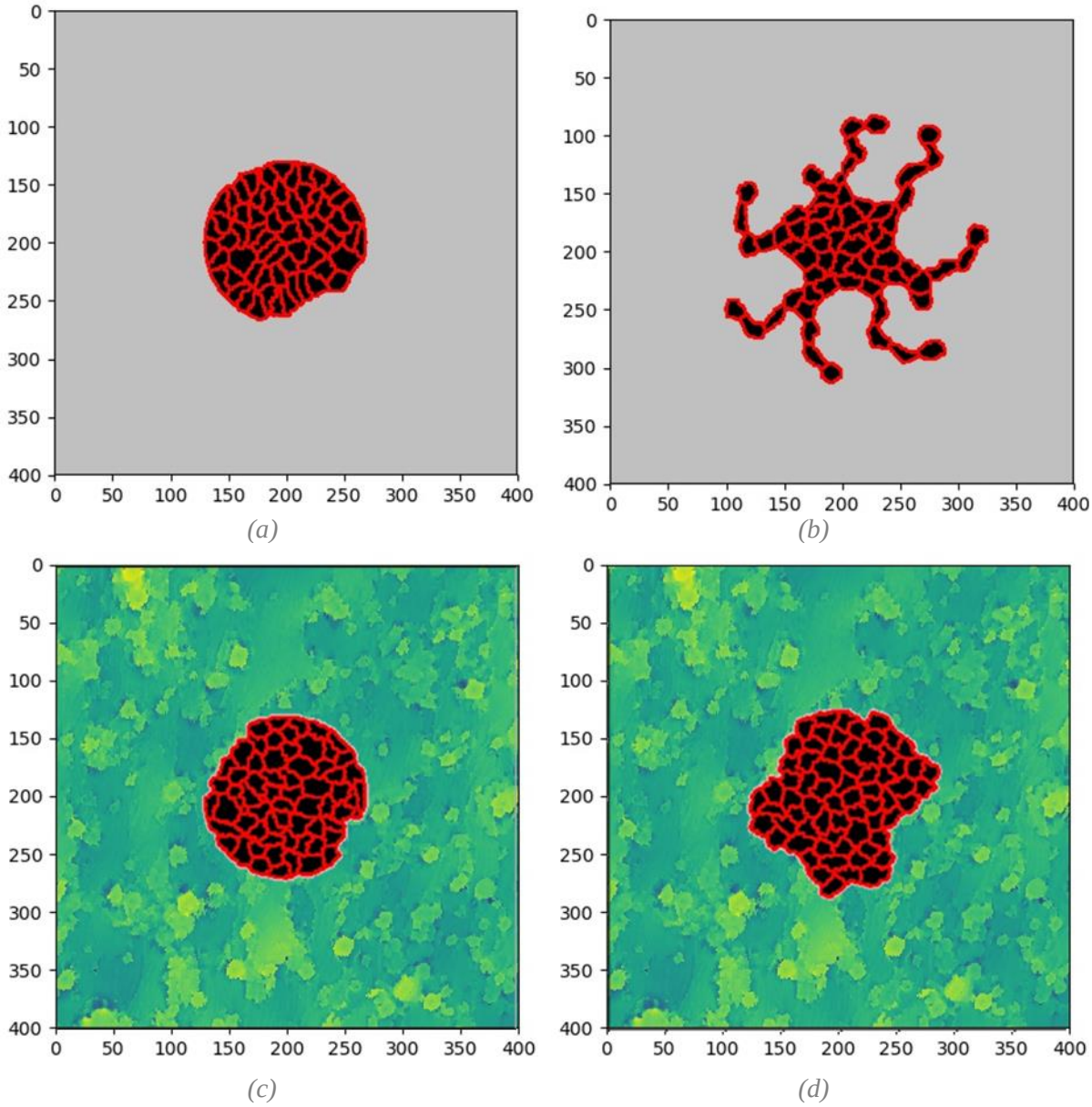


Figure A.18 : Description des différentes phases de simulation.

L'étude de la migration collective selon les différentes surfaces est toujours en cours. Cependant, les résultats préliminaires montrent une absence de migration collective en présence de rugosité, due à la méthodologie adoptée. La figure A.19 montre des exemples de simulation de migration collective sur la surface plane (surface sans topographie) et sur les surfaces C0, C1, et C2 (surfaces définies dans la section 5.2.4.1). Sur la surface plane (figure A.19a, b), on observe l'apparition de filaments de cellules, guidés par des cellules meneuses, migrant vers l'extérieur. De plus, des mouvements de rotations apparaissent au sein de la population. Sur les autres surfaces (figure A.19c-h), aucune migration n'est observée, malgré la présence de cellules meneuses et indépendamment de la valeur de la rugosité à la surface. On observe aussi aucun mouvement intercellulaire au sein de la population, mouvement essentiel à l'établissement d'un comportement collectif. On suppose que l'hétérogénéité de la surface perturbe le mouvement des cellules les unes par rapport aux autres. Cela vient donc empêcher l'établissement d'un mouvement collectif, et donc le déplacement des cellules meneuses.

Plus d'études doivent être menées afin d'étudier cet aspect.



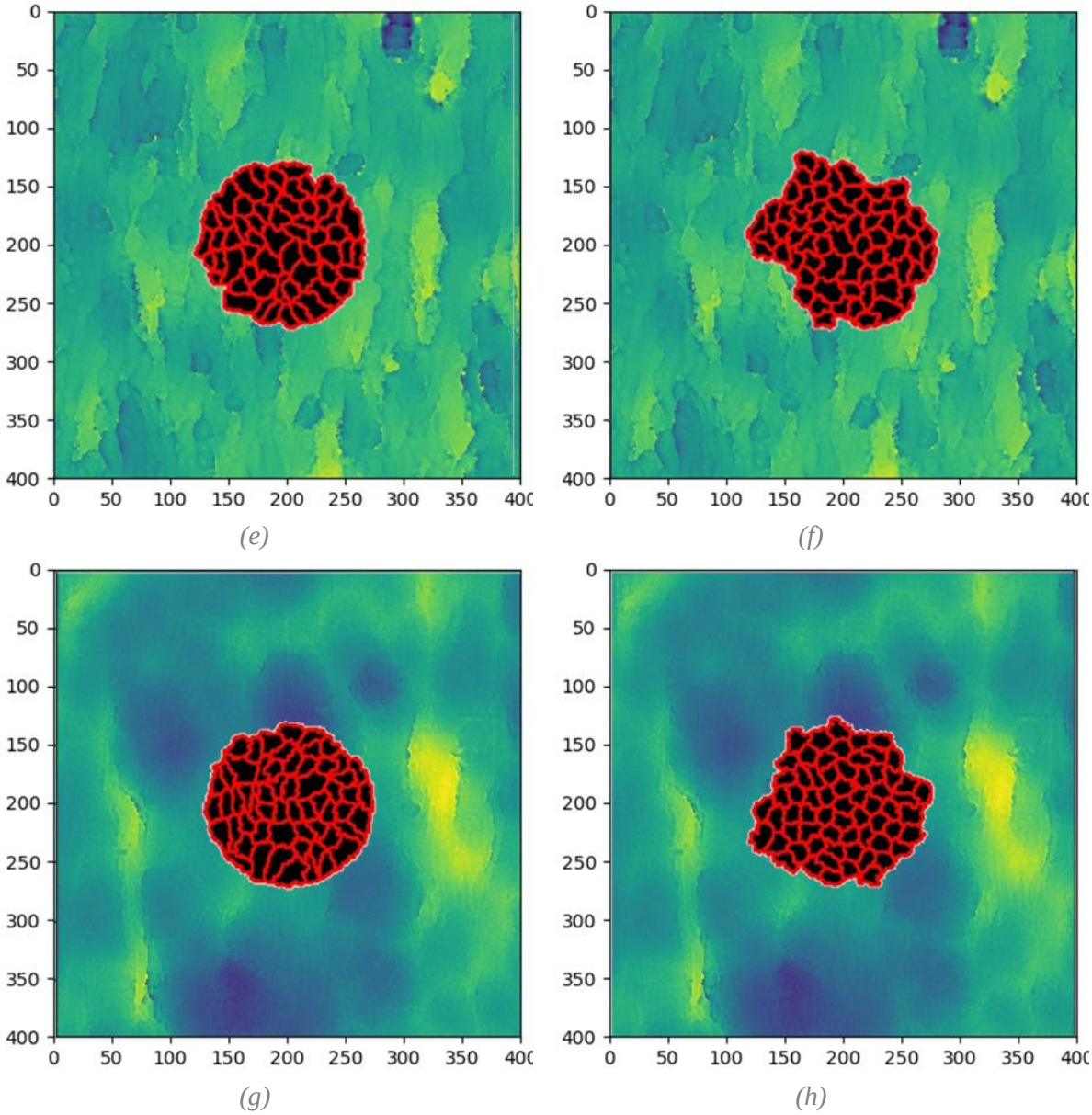


Figure A.19 : Résultats des simulations de migration collective selon les différentes surfaces. (a-b) ; surface plane ; (c-d) surface C0 ; (e-f) surface C1 ; (g-h) surface C2. La colonne de gauche donne l'état de la simulation en phase 2 et la colonne de droite donne l'état de la simulation à t=4000 MCS.

Références

[1] P. Rørth, « Fellow travellers: emergent properties of collective cell migration », *EMBO Rep*, vol. 13, n° 11, p. 984-991, nov. 2012, doi: 10.1038/embor.2012.149.

[2] S. Rausch *et al.*, « Polarizing cytoskeletal tension to induce leader cell formation during collective cell migration », *Biointerphases*, vol. 8, n° 1, p. 32, déc. 2013, doi: 10.1186/1559-4106-8-32.

Glossaire

OI Ostéointégration

MEC Matrice extracellulaire

hMSC Cellule mesenchymateuse humaine

UFR Unité fonctionnelle de remodelage

TA6V Ti-6Al-4V

SLA Sandblasted with Larged grits and Acid etched

FA Fabrication additive

CAO Conception assistée par ordinateur

SLM Selective Laser Melting (Fusion Laser Selective)

0B Surface brute fabriquée avec une inclinaison de 0°

10B Surface brute fabriquée avec une inclinaison de 10°

30B Surface brute fabriquée avec une inclinaison de 30°

60B Surface brute fabriquée avec une inclinaison de 60°

90B Surface brute fabriquée avec une inclinaison de 90°

S310 Surface brute fabriquée avec une inclinaison de 90° et attaquée chimiquement 3% HF 10% HNO_3

S320 Surface brute fabriquée avec une inclinaison de 90° et attaquée chimiquement 3% HF 20% HNO_3

S1010 Surface brute fabriquée avec une inclinaison de 90° et attaquée chimiquement 10% HF 10% HNO_3

P5 Surface polie par abrasion et attaquée chimiquement 3% HF 10% HNO_3 5 min

P10 Surface polie par abrasion et attaquée chimiquement 3% HF 10% HNO_3 10 min

P15 Surface polie par abrasion et attaquée chimiquement 3% HF 10% HNO_3 15 min

P20 Surface polie par abrasion et attaquée chimiquement 3% HF 10% HNO_3 20 min

P30 Surface polie par abrasion et attaquée chimiquement 3% HF 10% HNO_3 30 min

0AC Surface brute fabriquée avec une inclinaison de 0° et attaquée chimiquement 3% HF 10% HNO_3 30 min

30AC Surface brute fabriquée avec une inclinaison de 30° et attaquée chimiquement 3% HF 10% HNO_3 30 min

60AC Surface brute fabriquée avec une inclinaison de 60° et attaquée chimiquement 3% HF 10% HNO_3 30 min

90AC Surface brute fabriquée avec une inclinaison de 90° et attaquée chimiquement 3% HF 10% HNO_3 30 min

S20 Surface sablée avec un sable de type F20

S60 Surface sablée avec un sable de type F60

S360 Surface sablée avec un sable de type F360

C0 Surface brute fabriquée avec une inclinaison de 90°

C1 Surface brute fabriquée avec une inclinaison de 90° et attaquée chimiquement 3% HF 20% HNO_3 5 min

C2 Surface brute fabriquée avec une inclinaison de 90° et attaquée chimiquement 3% HF 10% HNO_3 30 min

C3 Surface sablée avec un sable de type F60

C4 Surface polie par abrasion

PTFE Polytetrafluoroethylene

BSA Bovine Serum Albumine

PFA Paraformaldehyde

CP Cellular Potts

MCS Monte Carlo Step

CTRL Surface numérique avec une élévation z=0 µm sur l'ensemble de la surface

Travaux produits durant la thèse

Publications scientifiques

T. Thenard, A. Catapano, M. Mesnard, et R. Allena, « A Cellular Potts energy-based approach to analyze the influence of the surface topography on single cell motility », *J. Theor. Biol.*, p. 110487, sept. 2020, doi: 10.1016/j.jtbi.2020.110487. (Article scientifique)

T. Thenard, A. Catapano, R. Allena, M. El May, N. Saintier, et M. Mesnard, « Topography and wettability characterization of surfaces manufactured by SLM and treated by chemical etching », *Mechanics of Advanced Materials and Structures*, 2020. (Article scientifique)

T. Thenard, R. Allena, A. Catapano, et M. Mesnard, « A discrete numerical approach to investigate the influence of the surface topological characteristics obtained by SLM on cell motility », *Congrès Français de Mécanique*, 2019. (Papier de conférence)

Conférences

T. Thenard, M. Mesnard, A. Catapano et R. Allena, « Analysis of surface roughness influence during collective cell migration », 25th Congress of the European Society of Biomechanics, 2019. (Oral)

T. Thenard, R. Allena, A. Catapano, et M. Mesnard, « A discrete numerical approach to investigate the influence of the surface topological characteristics obtained by SLM on cell motility », *Congrès Français de Mécanique*, 2019. (Oral)

T. Thenard, Y. Wang, M. Renard, M. Elmay, N. Saintier, C. Lemaire, R. Allena, A. Catapano, M. Mesnard, « Influence of chemical polishing on the biocompatibility of SLM-produced implants », International Symposium on Surface and Interface of Biomaterials, 2019. (Poster)

Influence de la rugosité de surfaces Ti-6Al-4V obtenues par fabrication additive SLM sur l'ostéointégration : Évaluation in vitro et in silico

L'ostéointégration définit la connexion entre l'os et l'implant et permet de garantir son bon fonctionnement. Cette connexion osseuse est régie, entre autres, par les propriétés surfaciques de l'implant, qui influencent la réponse cellulaire ainsi que la croissance osseuse. Parmi les différentes propriétés, la rugosité de la surface peut modifier de façon significative différents processus cellulaires (i.e. migration, adhésion, prolifération...) intervenant durant la croissance. La fabrication additive (FA) « Selective Laser Melting » (SLM) est un procédé innovant apportant de nombreux avantages dans le domaine biomédical. Cependant, les pièces obtenues par FA SLM présentent un état de surface très rugueux qui affecte la réponse cellulaire et l'ostéointégration. L'utilisation de ce procédé pour une application biomédicale nécessite donc de comprendre l'effet de la rugosité sur la biocompatibilité. Cette thèse présente une méthodologie expérimentale et numérique permettant d'évaluer l'influence de la rugosité de surfaces obtenues par FA SLM sur le comportement cellulaire. La rugosité et la mouillabilité d'éprouvettes SLM brutes ont été caractérisées par des observations au microscope, au profilomètre et au banc de mouillabilité. De plus, plusieurs traitements de surfaces (i.e. attaque chimique et sablage) ont été appliqués afin de rechercher une amélioration de la biocompatibilité des surfaces. Des tests biologiques de cytocompatibilité ainsi que l'analyse de la morphologie cellulaire ont permis de valider la biocompatibilité des surfaces SLM brutes et des surfaces modifiées. Cependant, les tests n'ont pas permis de mettre en évidence un traitement préférentiel des surfaces qui assure une amélioration significative de la biocompatibilité. Dans un deuxième temps, un modèle numérique discret de migration et prolifération cellulaires a été développé pour quantifier l'influence de la rugosité à l'échelle microscopique sur les activités cellulaires. Les résultats ont montré un rôle important des paramètres topographiques sur la migration ainsi que la prolifération cellulaire.

Influence of the roughness of Ti-6Al-4V surfaces obtained by additive manufacturing SLM on osseointegration: in vitro and in silico evaluation

Osseointegration defines the connection between the bone and the implant and it ensures the proper functioning of the implant. Such a connection is governed, among others, by the surface properties of the implant, which influence the cells response. Surface roughness can significantly modify different cellular processes (i.e. migration, adhesion, proliferation…) occurring during growth. Additive manufacturing (FA) "Selective Laser Melting" (SLM) is an innovative process bringing many advantages in the biomedical field. However, samples obtained by FA SLM exhibit a very rough surface which affects cellular response and osseointegration. Therefore, the use of this process for a biomedical application requires the understanding of the effects of roughness on biocompatibility. This thesis presents an experimental and numerical methodology allowing to evaluate the influence of roughness of surfaces obtained by FA SLM on the cellular behavior. The roughness and the wettability of raw SLM surfaces were characterized by microscopic, profilometer and wettability observations. In addition, several surface treatments (i.e. chemical etching and sandblasting) have been applied in order to seek an improvement in the biocompatibility of the surfaces. Biological cytocompatibility tests as well as analysis of cell morphology have validated the biocompatibility of raw SLM surfaces and modified surfaces. However, the tests did not show a preferential treatment of the surfaces which ensures a significant improvement in biocompatibility. In parallel, a discrete numerical model of cell migration and proliferation has been developed to quantify the influence of roughness at the microscopic scale on cellular activities. The results have shown an important role of topographic parameters on migration as well as cell proliferation.