

UNIVERSITÉ DE NANTES

U.F.R. d'ODONTOLOGIE

Thèse de doctorat

Ecole Doctorale de Chimie - Biologie

Discipline : Ingénierie tissulaire osseuse

Spécialité : Biomatériaux

Présentée et soutenue publiquement par

Marco Antonio LOPEZ HEREDIA

Bioactivité d'implants en titane poreux
produits par prototypage rapide

Le 21 janvier 2008
devant le jury ci-dessous

Président :

M Guy Daculsi, PhD

Directeur de recherche INSERM U791 (France)

Rapporteurs :

Mme Maryam Tabriziam, PhD, MBA

Professeure à McGill University (Canada)

M Joop Wolke, PhD

Professeur à l'Université de Radboud (Pays-Bas)

Examineurs :

M Michel Dorget, PhD

Responsable département matériaux CTTM (France)

M Pierre Layrolle, PhD

Directeur de recherche INSERM U791 (France)

M Pierre Weiss, PhD, DDS

Professeur de l'Université de Nantes (France)

Directeur de thèse :

M Pierre Layrolle, PhD

Directeur de recherche INSERM U791 (France)

Avant-Propos

Par délibération, en date du 6 décembre 1972,
le conseil de la Faculté de Chirurgie Dentaire a
arrêté que les opinions émises dans les
dissertations qui lui seront présentées doivent
être considérées comme propre à leurs auteurs
et qu'il n'entend leur donner aucune
approbation, ni improbation.

Throughout human history, as our species has faced the frightening, terrorizing fact that we do not know who we are, or where we are going in this ocean of chaos, it has been the authorities -the political, the religious, the educational authorities - who attempted to comfort us by giving us order, rules, regulations, informing - forming in our minds - their view of reality. To think for yourself you must question authority and learn how to put yourself in a state of vulnerable open-mindedness, chaotic, confused vulnerability to inform yourself.

Timothy Leary

VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

Cette thèse a conduit aux publications et présentations suivantes :

Publications

Bone Growth in Rapid Prototyped Porous Titanium Implants. M.A. Lopez-Heredia, E. Goyenvalle, E. Aguado, P. Pilet, C. Leroux, M. Dorget, P. Weiss and P. Layrolle. *Journal of Biomedical Materials Research Part A (Accepté, sous press, disponible par Early View)*

An electrodeposition method of calcium phosphate coatings on titanium alloy. M.A. Lopez-Heredia, P. Weiss and P. Layrolle. *J Mater Sci: Mater Med* **18** 2007, p 381-390.

RF Plasma treatments on Ti samples for bioactivity enhancement. M.A. Lopez-Heredia, G. Legeay, C. Gaillard, and P. Layrolle. *Biomaterials* **29(17)** 2008, p 2608 - 2615.

Rapid prototyped porous titanium scaffolds coated with calcium phosphate. M.A. Lopez-Heredia, J. Sohier, C. Gaillard, S. Quillard, M. Dorget, and P. Layrolle. *Acta Biomaterialia* (Soumis avec corrections après révision)

Présentations orales dans des conférences internationales

(* = avec mémoires des congrès)

Bioceramics 18. Kyoto, Japan, dates 2005.*

Bone growth in porous titanium implants made by rapid prototyping. M.A. Lopez-Heredia, E. Goyenvalle, E. Aguado, C. Leroux, M. Dorget, P. Layrolle.

ESB 2006. Nantes, France 2006.

Bone Growth in Rapid Prototyped Porous Titanium Implants. M.A. Lopez-Heredia, E. Goyenvalle, E. Aguado, P. Weiss, C. Leroux, M. Dorget, P. Layrolle.

Bioceramics 19. Chengdu, China 2006.*

Calcium Phosphate Coatings on Titanium via an Electrodeposition Method M.A. Lopez-Heredia, P. Weiss and P. Layrolle

MetFoam 2007. Montreal, Canada 2007.*

Rapid Prototyped Porous Titanium Implants. M.A. Lopez-Heredia, E. Goyenvalle, E. Aguado, P. Pilet, C. Leroux, M. Dorget, P. Weiss and P. Layrolle.

ESB 2007. Brighton, UK 2007.

Calcium phosphate precipitation on titanium induced by RF plasma treatments. M.A. Lopez-Heredia, G. Legeay, P. Pilet, J. Hamon, P. Weiss and P. Layrolle.

Bioceramics 20. Nantes, France 2007.*

■ *Calcium phosphate coated rapid prototyped porous titanium scaffolds* M.A. Lopez-Heredia, B. Fellah, P. Pilet, C. Leroux, M. Dorget, P. Weiss, J. Sohier and P. Layrolle.

Posters présentés dans des conférences internationales

ESB 2006. Nantes, France 2006.

Electrodeposition of Calcium Phosphate Coatings on Titanium Implants. M.A. Lopez-Heredia, P. Weiss, P. Layrolle

Autres contributions en collaboration

Publications

Osteoblastic cell behaviour on different titanium implants surfaces. L. Le Guehennec, M.A. Lopez-Heredia, B. Enkel, P. Weiss, Y. Amouriq and P. Layrolle. *Acta Biomaterialia* 4(3) 2008, p. 535-543.

Histomorphometric Analysis of the Osseointegration of Four different Implant Surfaces in the Femoral Epiphyses of Rabbits. L. Le Guehennec, E. Goyenvalle, M.A. Lopez-Heredia, P. Weiss, Y. Amouriq and P. Layrolle. *Clinical Oral Implants Research* (Accepté, sous press).

Osteoblastic cell behaviour on nanostructured metal implants. L. Le Guehennec, F. Martin, M.A. Lopez-Heredia, G. Louarn, P. Weiss, Y. Amouriq J. Cousty and P. Layrolle. *Nanomedicine* 3(1) 2008, p. 61-71.

Conférences internationales

(* = avec mémoires des congrès)

ESB 2006. Nantes, France 2006.

Osteoblastic cell behaviours on different titanium implant surfaces. L. Le Guehennec, M.A. Lopez-Heredia, P. Weiss, Y. Amouriq, P. Layrolle.

Bioceramics 20. Nantes, France 2007*

Histomorphometric Evaluation of Bone Response to Different Titanium Implant Surfaces L. Le Guehennec, E. Goyenvalle, M.A. Lopez-Heredia, P. Weiss, Y. Amouriq and P. Layrolle

Liste des abréviations

PR : Prototypage rapide

Ti CP : Titane commercialement pur

Ti6Al4V : Alliage de titane contenant 6 % d'aluminium et 4 % de vanadium

CoCrMo : Alliage du cobalt, chrome et Molybdène

PCa : Phosphate de calcium

ApC : Apatite carbonatée

HA : Hydroxyapatite

OCP : Phosphate octacalcique

TCP : Phosphate tricalcique

CPS : Solution supersaturée qui contient des ions de calcium et de phosphate

j : densité de courant, mA/cm²

E : Module d'élasticité, module de Young

σ_y : Résistance à la contrainte mécanique

FEM : Modelage par éléments finis (sigles en anglais)

CAD : Design assisté par ordinateur (sigles en anglais)

DLF : formage direct par laser (sigles en anglais)

RF : Radio fréquence

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre 1. Généralités sur les implants en titane et leurs traitements de surface bioactifs	4
1.1. Le tissu osseux	5
1.2. Le titane	10
1.3. Les implants en titane poreux	13
1.3.1 Les différents types de porosité et les méthodes de fabrication du titane poreux	14
1.4. Traitements de surface bioactifs	16
1.4.1 Les revêtements phosphocalciques	17
1.4.2. Les méthodes de fabrication des revêtements bioactifs	19
1.4.3. L'Electrodéposition	19
1.5 Le Titane poreux comme matrice pour l'ingénierie tissulaire osseuse	20
1.6 Conclusions	22
Objectifs de la thèse	23
Chapitre 2. Fabrication d'implants en titane macroporeux par prototypage rapide, caractérisation des propriétés mécaniques et biofonctionnalité	24
Introduction	25
Discussion	29
Chapitre 3. Traitements de surface bioactifs sur implants en titane	32
Introduction	33
Discussion	38
Chapitre 4. L'association de cellules souches et de matrices en titane poreux pour l'ingénierie tissulaire osseuse	43
Introduction	44
Discussion	47
Discussion Générale	50
Conclusion Générale	54
Références bibliographiques	56
Liste de figures	74
Liste de tableaux	76

Introduction générale

Le titane et ses alliages sont largement utilisés pour la fabrication de prothèses orthopédiques et d'implants dentaires. Néanmoins, les propriétés mécaniques du titane sont très élevées par rapport à celles du tissu osseux. L'utilisation de structures poreuses en titane permet une diminution du module de Young, plus proche de celui de l'os, et dans un même temps l'ancrage de l'implant au squelette. Afin de permettre la repousse osseuse dans la structure poreuse de l'implant, la taille des pores doit être comprise entre 100 et 800 μm . Une structure avec une porosité interconnectée dans les trois dimensions est également nécessaire à l'invasion des fluides biologiques, des cellules et des tissus. Les propriétés de surface des implants sont également importantes puisqu'elles conditionnent les interactions avec le milieu biologique. Certains traitements de surface bioactifs, comme les revêtements en phosphates de calcium, peuvent créer des caractéristiques favorables à une accélération de la repousse osseuse et à une meilleure fixation biologique de l'implant au squelette. Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse, l'utilisation de matrices poreuses en titane comme supports pour la culture de cellules souches mésenchymateuses permet d'envisager des applications sous charge corporelle. L'objectif de cette thèse est la fabrication de matrices en titane répondant à ce cahier des charges.

Dans un premier chapitre bibliographique, nous analyserons la structure du tissu osseux et ses caractéristiques. Ensuite, nous verrons les matériaux utilisés pour remplacer ce tissu et nous nous focaliserons sur le titane en décrivant ses propriétés biologiques et mécaniques. Nous constaterons que les propriétés mécaniques du titane sont trop importantes par rapport à l'application de remplacement du tissu osseux et nous proposerons d'introduire la porosité afin de réduire cette différence. Les différentes méthodes de fabrication d'implants en titane poreux seront décrites. Nous listerons les approches récentes de traitements de surface visant à améliorer la bioactivité du titane et en particulier les revêtements en phosphates de calcium. Enfin, nous aborderons les travaux de la littérature visant à associer des matrices poreuses en titane et des cellules souches mésenchymateuses pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse.

Dans un deuxième chapitre, nous introduirons une nouvelle approche de fabrication des implants en titane macroporeux qui utilise des outils de prototypage rapide et le procédé de la cire perdue. Nous verrons les étapes du procédé et la caractérisation des implants obtenus avec une approche métallurgique et mécanique. Nous évaluerons la modification du matériel après fabrication et son comportement sous compression. Nous nous intéresserons également à la biofonctionnalité du matériel en évaluant la repousse osseuse dans un défaut fémoral de

taille critique chez le lapin. Nous verrons l'effet de la taille du pore et du délai d'implantation sur la repousse osseuse et le contact os/implant.

La troisième partie présentera deux modifications des surfaces possibles pour rendre le titane plus bioactif. La première se réalise en utilisant un revêtement du phosphate de calcium par une méthode d'électrodéposition dans un électrolyte aqueux contenant des ions phosphate et calcium. Nous explorerons l'effet qu'auront les différents paramètres d'électrodéposition sur la formation du revêtement en phosphate de calcium sur la surface du titane. La deuxième modification de surface est un traitement plasma par radio fréquence. Ce traitement plasma a été appliqué à des surfaces de titane avec ou sans un traitement à la soude sous différentes atmosphères. L'effet de ce traitement sur la capacité de la surface à former un revêtement du phosphate de calcium après une immersion dans une solution saturée sera étudié.

Dans le dernier chapitre de cette thèse, nous démontrerons la faisabilité d'obtenir par électrodéposition un revêtement uniforme en phosphate de calcium sur la surface du titane macroporeux fabriqué par prototypage rapide. Nous analyserons la composition et l'adhérence au substrat métallique de ces revêtements. L'association de telles matrices avec des cellules souches mésenchymateuses de rat sera également évalué *in vitro* et *in vivo*. Nous observerons, à l'aide de techniques histologiques, le comportement de l'ensemble matrices-cellules après implantation subcutanée chez le rat.

Chapitre 1

If knowledge can create problems, it is not through ignorance that we can solve them.

Isaac Asimov

Généralités sur les implants en titane et leurs traitements de surface bioactifs

1.1. Le tissu osseux

Le squelette est un système formé par un peu plus de 200 os [1]. Les fonctions principales du squelette sont de fournir une structure de support et de protection pour les organes, de permettre la locomotion et les mouvements, de stocker des ions minéraux pour l'homéostasie et de protéger les cellules souches dans la moelle [2].

Le tissu osseux est capable de se réparer et de remodeler sa micro et sa macro structure. Cela est possible grâce au délicat équilibre entre le procédé d'ostéogenèse (formation de l'os) et d'ostéoclasie (suppression de l'os) [3]. La croissance des os s'effectue par l'action de deux types de cellules : les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les ostéoblastes produisent la matrice extracellulaire osseuse composée de fibres de collagène qui sont minéralisées par des cristaux de phosphate du calcium [4]. Les ostéoclastes détruisent cette matrice et libèrent les éléments constitutifs dans le sang [2, 3]. La croissance et la cicatrisation des os se font par l'action conjuguée des mécanismes d'ostéogenèse et d'ostéoclasie, qui correspondent au remodelage du tissu osseux [5]. En cas de fracture, les ostéoblastes produisent la matrice osseuse qui sera dégradée par les ostéoclastes. L'os peut s'adapter à une situation mécanique nouvelle en modifiant l'équilibre entre l'ostéogenèse et l'ostéoclasie. Ces procédés répondent à des changements sur les efforts dynamiques et statiques qui suivent les vecteurs de forces. Si une charge plus importante que la physiologique est appliquée, l'équilibre s'incline vers une activité plus ostéogénique. Si cette charge est en dessous de la valeur physiologique, l'équilibre bascule vers une activité ostéoclastique. Cet équilibre est décrit par la loi de Wolff [6] : «les contraintes mécaniques sont responsables de l'architecture de l'os. L'os a une résistance mécanique maximale pour une masse minimale ». Cependant, le tissu osseux a une capacité de réparation très limitée quand il est exposé à des lésions mécaniques, chimiques ou métaboliques sévères [7, 8]. Dans ces cas, la balance entre l'ostéogenèse et l'ostéoclasie n'est pas équilibrée et le tissu osseux n'a pas la capacité de se régénérer.

Les structures et les niveaux hiérarchiques que nous pouvons trouver dans le tissu osseux (Figure 1.1.1) sont les suivants [2, 9] :

- 1) La macrostructure : l'os cortical et l'os trabéculaire
- 2) La microstructure (10 à 500 μm) : les systèmes haversiens, les ostéons, les trabécules simples
- 3) La sub-microstructure (1 à 10 μm) : Les lamelles

- 4) La nanostructure (~ 100 nm à 1 μ m) : Fibres de collagène minéralisées par des nanocristaux d'apatite phosphocalcique.
- 5) La sub-nanostructure (< 100 nm) : la structure moléculaire des éléments constitutants comme le minéral, le collagène et les protéines organiques et non collagéniques.

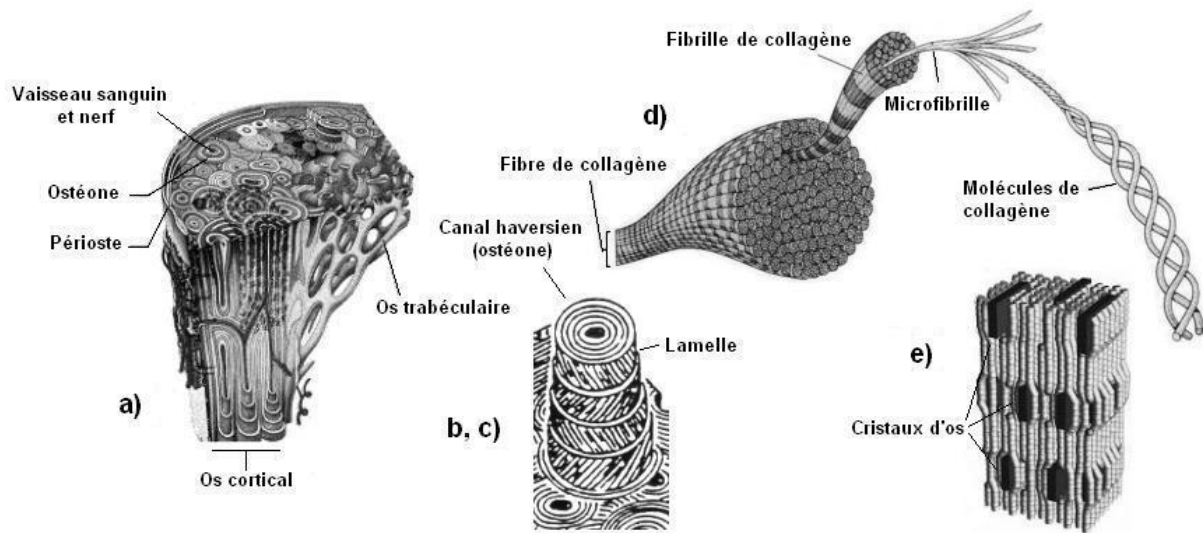


Figure 1.1.1. Organisation hiérarchique de l'os. (a) L'os cortical et l'os trabéculaire. (b) Ostéons avec systèmes haversiens. (c) Lamelles. (d) Fibres de collagène obtenues à partir de fibrilles de collagène. (e) Cristaux de minéral osseux, molécules de collagène et protéines non collagéniques.

D'après [2, 9]. Source des images de : www.medes.fr, www.engin.umich.edu, www.theses.ulaval.ca, www.bnl.gov

Cette structure hiérarchiquement organisée est hétérogène et anisotrope. L'os cortical possède des pores qui contiennent des cellules vivantes (ostéocytes) et des conduits pour les vaisseaux sanguins qui amènent les nutriments aux cellules. L'os trabéculaire des os plats et de la cavité médullaire des os longs contient la moelle osseuse. La moelle osseuse est composée de cellules souches hématopoïétiques, capables de se différencier en différents types cellulaires, et de cellules stromales, qui servent à la multiplication et différenciation des cellules souches mésenchymateuses.

L'os cortical et l'os trabéculaire sont caractérisés par un certain niveau de porosité/densité (Figure 1.1.2). La microstructure produite par l'os trabéculaire est composée des arrangements irréguliers de lamelles. La microstructure de l'os cortical est composée de lamelles régulières et cylindriques orientées parallèlement à l'axe biomécanique principal. Le matériau de l'os trabéculaire est métaboliquement plus actif grâce à la présence de la moelle

osseuse. Ce type d'os est remodelé plus fréquemment, ce qui nous permet de dire qu'il est plus « jeune » que l'os cortical même s'ils sont composés du même matériel.

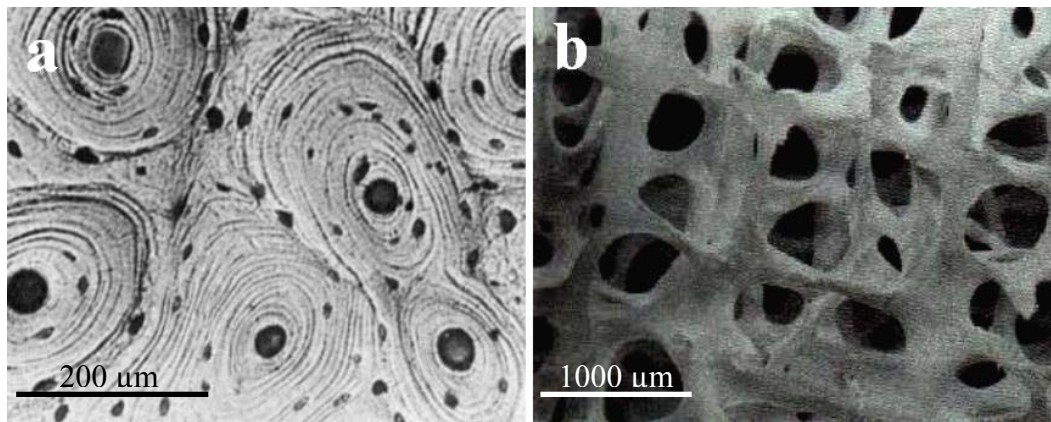


Figure 1.1.2. Microstructure de (a) l'os cortical et (b) de l'os trabéculaire.

Source des images : www.feppd.org, www.medstudents.com.br

Aux niveaux microstructuraux, les fibres de collagène minéralisées forment des arrangements plats de 3 à 7 μm de largeur nommées lamelles. Ces feuillets de fibres de collagène minéralisées s'enroulent en couches concentriques, de 3 à 8 lamelles, autour d'un canal central pour former un ostéon ou un système haversien [3] (Figure 1.1.2a). L'ostéon est un cylindre de 200-250 μm de diamètre dans une direction parallèle à l'axe longitudinal de l'os. Lorsque la structure des fibres de collagène est moins marquée et où il n'est pas possible de distinguer un patron structurel, on dit que le tissu est composé d'os tissé [10] (Figure 1.1.3). Dans l'os lamellaire, les lamelles de largeur de 3 à 7 μm [2] sont orientées perpendiculairement à la surface externe des os et unies au tissu de l'os tissé. Elles forment des empilements de grosses couches concentriques autour de l'axe central des os longs (Figure 1.1.3). L'os trabéculaire est formé d'un réseau de barres et de plaques interconnectées qui forment les trabécules [11]. Dans l'os trabéculaire, l'arrangement et l'orientation des fibres de collagène sur la lamelle ne sont pas connues. L'idée la plus acceptée pour l'arrangement des fibres de collagène d'un ostéon est qu'elles sont parallèles dans chaque lamelle avec un changement d'orientation d'une lamelle à l'autre, comme dans une structure hélicoïdale. Les lamelles adjacentes ont des orientations différentes, soit transversales ou longitudinales. Une autre hypothèse est que l'arrangement des fibres de collagène dans une lamelle est très entrelacé sans une orientation préférentielle [2]. L'épaisseur trabéculaire peut aller de 90 à 500 μm [12, 13]. L'épaisseur trabéculaire moyenne mesurée sur des vertèbres d'hommes âgés est de 140 μm [14]. Dans la structure trabéculaire la taille et la densité des

trabécules sont importantes car elles détermineront les propriétés mécaniques de l'os trabéculaire. Dans le cas des femmes européennes, la valeur moyenne de la densité trabéculaire est de 176.10 mg/mm^3 [15].

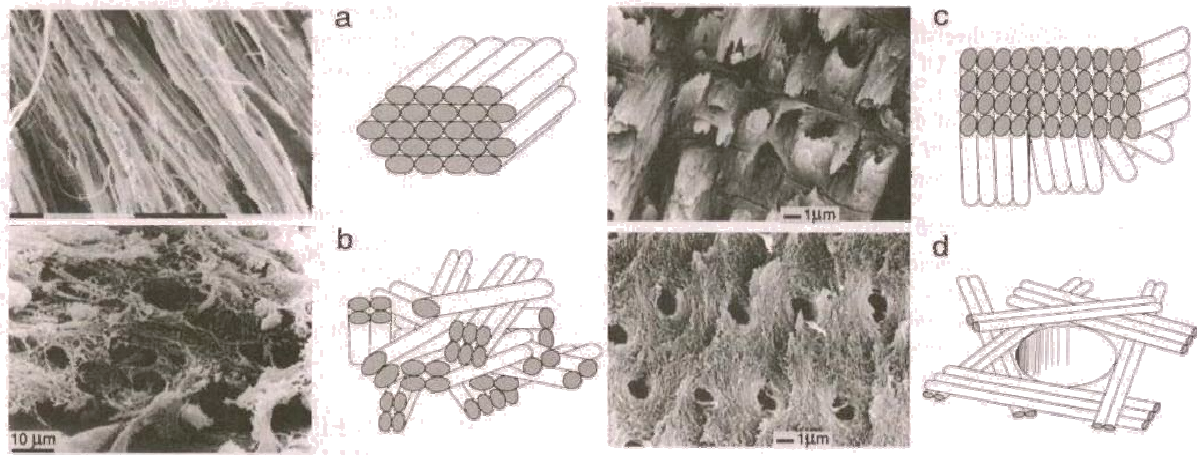


Figure 1.1.3. Types d'arrangements dans l'orientation pour les fibrilles de collagène. (a) parallèle, (b) tissé, (c) contreplaqué et (d) radial. [10]

Source d'image: www.rpi.edu

Au niveau nanostructurel, les fibres de collagène (de quelques centaines de nanomètres à $1 \mu\text{m}$), entourées et infiltrées par le minéral du phosphate de calcium, sont les structures les plus prééminentes. Au niveau sub-nanostructurel les trois matériaux principaux sont les cristaux d'apatite, le collagène et les protéines non collagéniques. Les cristaux d'apatite de l'os se trouvent dans des espaces entre les fibres individuelles de collagène. Ces fibres limitent la croissance des cristaux minéraux et obligent ces cristaux à être discrets et discontinus (Figure 1.1.4). Ces cristaux croissent avec une orientation spécifique : l'axe « c » des cristaux est parallèle aux axes longitudinaux des fibres individuelles de collagène. L'épaisseur des cristaux est de 2 - 3 nm. Le composant principal de la matrice organique est le collagène de type I. Les molécules de collagène secrétées par les ostéoblastes, cellules dont la fonction est de produire du tissu conjonctif organique, s'assemblent en lamelles avec une structure tertiaire spécifique. Cette structure des fibres de collagènes présente une périodicité de 67 nm et des espaces de 40 nm entre les extrêmes des molécules (Figure 1.1.4).

Le tissu osseux est un composite organo-minéral de structure complexe. La matrice de collagène et les cristaux minéraux travaillent ensemble pour donner à l'os des propriétés mécaniques élevées. Les protéines organiques non collagéniques, incluant les

phosphoprotéines, comme l'ostéopontine, la sialoprotéine, l'ostéonectine et l'ostéocalcine, peuvent réguler la taille, l'orientation et la densité cristalline des dépôts minéraux.

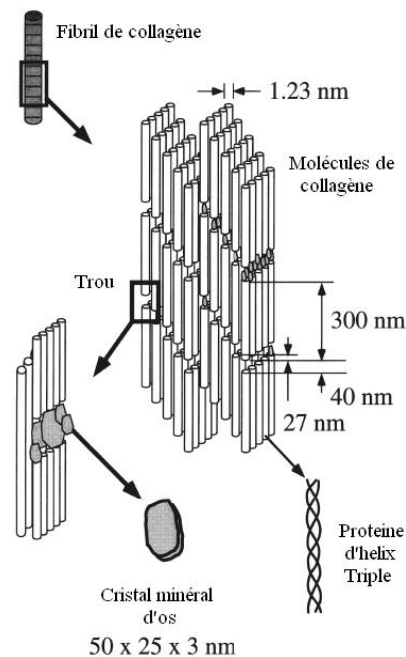


Figure 1.1.4. Assemblage des fibres et des monofibres de collagène ainsi que les cristaux de minéral osseux. Leur patron périodique est le résultat de la présence d'un espace adjacent (40 nm) et des régions superposées (27 nm) de molécules assemblées. [2]

Les propriétés mécaniques de l'os changent en fonction de ces différents niveaux structuraux [2, 9, 16, 17]. Le module de Young est une propriété importante car elle nous indique la déformation d'un matériau par rapport à la force appliquée. Ce module, pour des os longs sous tension est de 14 à 20 GPa (échantillon humide, propriété macrostructurale), pour des échantillons corticaux en microflexion ce module est de 5.4 GPa (échantillons humides, propriété microstructurale). La résistance en compression des os est autour de 195 MPa et de 135 MPa en tension [18]. La technique de nanoindentation permet de mesurer le module de Young des lamelles dans les ostéons qui est d'environ 22 GPa (échantillons secs, propriété submicrostructurale) [2]. De façon générale, plusieurs valeurs du module de Young pour l'os ont été mesurées : 10–30 GPa [19-21], 15-30 GPa [5], 0.09 – 18.6 GPa [22], 11.5 –17 GPa [23]. Nous pouvons prendre une valeur moyenne de 17.1 GPa pour l'os cortical et l'intervalle de 1-14 GPa pour l'os trabéculaire [17].

1.2. Le titane

Le titane est le neuvième élément le plus abondant sur la croûte terrestre. Le titane et ses alliages forment une couche de TiO_2 sur leur surface (passivation). Cette couche de passivation donne au titane sa résistance à la corrosion y compris dans un environnement biologique. Ainsi le titane est biocompatible et largement utilisé dans la fabrication de prothèses orthopédiques et d'implants dentaires. Les fluides corporels sont des solutions salines avec un pH de 7.4 qui contiennent différents aminoacides et autres molécules biologiques face auxquelles le titane est complètement immunisé (Figure. 1.2.1). Cette couche de passivation possède naturellement une épaisseur de quelques nanomètres mais peut être développée par différentes méthodes comme l'anodisation, les traitements alcalins ou une oxydation chimique ou thermique [24-26].

Le titane présente un rapport élevé de résistance mécanique/densité. Il a une contrainte mécanique similaire à celle de l'acier inox 316L mais avec 60% de sa densité ; 4.5 g/cm^3 pour le titane et 8.0 g/cm^3 pour l'acier. Par rapport au Vitallium® (alliage CoCrMo), le titane est presque deux fois plus léger, 4.5 g/cm^3 vs. 9.2 g/cm^3 . Le module d'élasticité du titane est autour de 110 GPa, sa résistance à la fatigue est autour de 275 MPa (10^6 cycles) et sa résistance à la rupture est de 545 MPa. (Tableau 1.2.1). Une longue durée à la fatigue est une caractéristique importante pour les prothèses et implants métalliques. Une personne entre 20 et 30 ans, avec une espérance de vie entre 70 et 80 ans, aura l'équivalent d'approximativement 10^8 cycles de charge tout au long de sa durée de vie [27]. Les propriétés mécaniques du titane sont supérieures à celles de n'importe quel autre métal utilisé dans la fabrication d'implants.

Le module d'élasticité du titane étant très supérieur à celui de l'os, des forces de cisaillement à l'interface os/titane limitent la durée de vie clinique des implants. Comme le titane présente une résistance au cisaillement faible, il est moins utilisé que d'autres métaux pour la fabrication de vis ou de plaques de fixation d'ostéosynthèse ou dans des applications similaires.

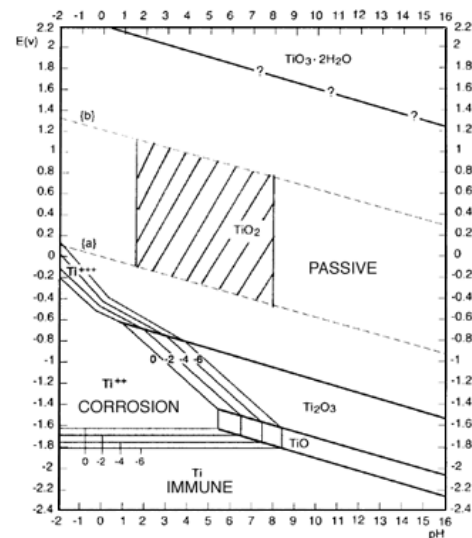
Tableau 1.2.1. Propriétés mécaniques des métaux utilisés pour la fabrication d'implants orthopédiques et dentaires comparées à celles de l'os [5, 22, 23, 28, 29]

Matériel	Densité (g/cm ³)	E (GPa)	Fatigue (MPa, 1x10 ⁷ cycles)	σ_y (MPa)
Os T	2	2	--	136
Os C	2	17	--	193
Ti6Al4V	4.5	110	600	830
Titane G2	4.5	110	275	545
Tantalum	16.6	186	400	380
CoCrMo	9.2	210	310	517
Acier 316L	7.93	190	276	331

Les premières tentatives pour fabriquer des implants en titane datent des années 30 [30]. On a pu remarquer que le titane réagissait facilement avec l'oxygène. L'oxygène est diffusé rapidement dans le titane et l'oxygène dissous fragilise le métal. La forge et la coulée du titane doivent être réalisées dans une atmosphère inerte ou sous vide. De plus, dans le cas de la forge, toute opération doit être réalisée au-dessous de 925 °C.

Le titane est un matériau allotropique qui cristallise dans une structure hexagonale compacte (hcp, α -Ti) jusqu'à 885 °C. Au-dessus de cette température il se transforme en une structure cubique centrée aux corps (bcc, β -Ti). Les principaux alliages de titane incorporent un ou plusieurs des éléments suivants : le tantale, le vanadium, le molybdène, le niobium, le zirconium, l'hafnium, l'étain, l'aluminium, le nickel, le palladium, et/ou le ruthénium. Parmi tous ces alliages de titane, le plus utilisé pour la fabrication des implants articulés est le Ti6Al4V [31].

Figure 1.2.1. Diagramme de Pourbaix pour le système Ti-H₂O. Les lignes hachurées indiquent la région des conditions physiologiques trouvées dans le corps humain.



Le Tableau 1.2.2 donne la composition chimique du Ti6Al4V et celle du titane pur grade 2 et la Table 1.2.3 leurs propriétés mécaniques. Les différences que nous pouvons voir entre les propriétés mécaniques pour les différents grades du titane pur sont liées au contenu en oxygène et en fer.

Table 1.2.2. Composition chimique (% masse) du Ti6Al4V et Ti CP G2

Elément	Ti CP G2 ^a	Ti6Al4V ^b
Azote	0.03	0.05 max.
Carbone	0.08	0.08 max.
Hydrogène	0.015	0.012 max.
Fer	0.3	0.25 max.
Oxygène	0.25	0.13 max.
Aluminium	---	5.50 – 6.50
Vanadium	---	3.50 – 4.50
Titane	Balance	Balance
Autres	0.1 max.	0.1 max.

a. ASTM F67; b. ASTM, F136

Le Ti6Al4V est unique car il combine des propriétés mécaniques élevées et une facilité d'usinage qui permet de fabriquer des pièces complexes. De plus, l'expérience de la production et de la disponibilité commerciale autour de cet alliage lui confèrent une utilisation économique fiable. Grâce à ces propriétés, le Ti6Al4V est devenu l'alliage standard pour la fabrication de prothèses orthopédiques. Le titane pur est utilisé pour des applications nécessitant une haute résistance à la corrosion au cours desquelles les contraintes mécaniques ne seront pas très importantes. Il est plus largement utilisé dans la fabrication d'implants dentaires.

Table 1.2.3. Propriétés mécaniques du Ti6Al4V et du Ti CP G2.

	Résistance maximum, R _m min. (MPa)	Limite d'élasticité, R _p (0,2%) min. (MPa)	Allongement, min. %	Striction, min. %
Ti CP G2 ^a	345	275	20	30
Ti6Al4V ^b	860	795	10	25

a. ASTM F67; b. ASTM, F136

Les implants en titane peuvent subir différents traitements de surface afin d'éviter l'encapsulation fibreuse de l'implant et ainsi augmenter le contact avec l'os (ostéointégration). La surface du titane (couche de TiO_2) peut être modifiée par différents traitements [32-34] afin d'augmenter sa rugosité et/ou de modifier sa composition chimique afin de créer des interactions fortes et durables pour une intégration avec le tissu osseux. Cependant, les caractéristiques spécifiques de rugosité et de texture ne sont pas encore définies précisément. La composition chimique de surface conditionne les interactions avec les fluides biologiques, les cellules et permet d'améliorer l'apposition osseuse [32].

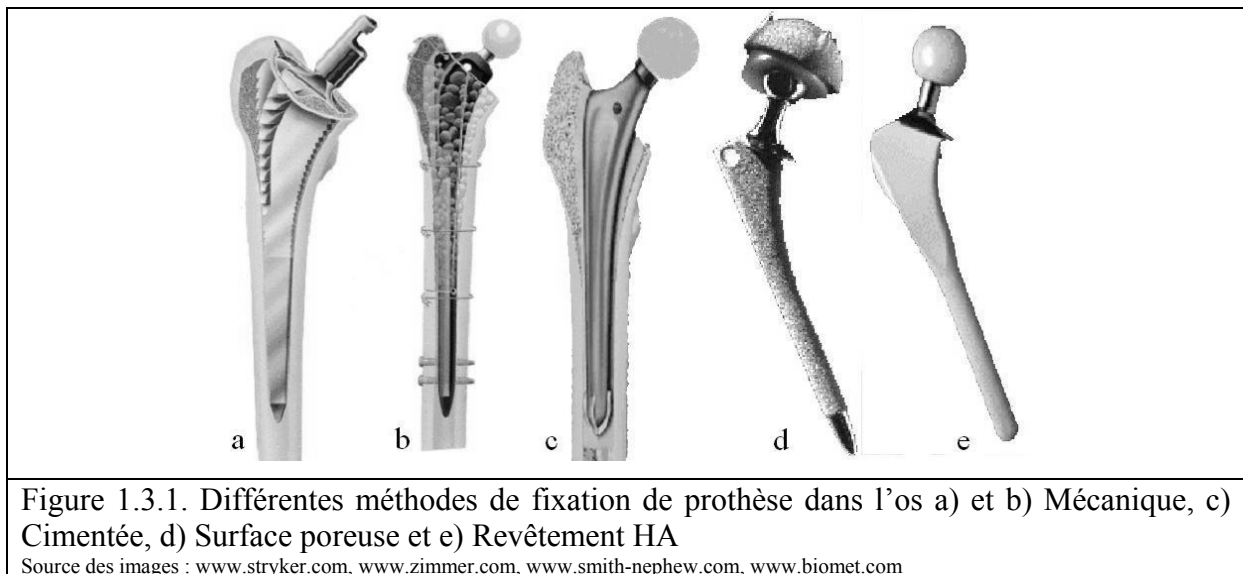
1.3. Les implants en titane poreux

Le titane et ses alliages sont largement utilisés pour diverses applications médicales grâce à ces propriétés : excellente résistance à la corrosion, biocompatibilité, bonnes propriétés mécaniques (Résistance mécanique, à la fatigue, à la fracture, raideur, basse densité, rigidité [35]. Même si le Ti6Al4V est le standard auquel tous les autres alliages en titane sont comparés, ses propriétés mécaniques restent très élevées par rapport à celles de l'os.

Le succès d'un implant dépend de plusieurs facteurs : les propriétés mécaniques du matériel, son design, sa biocompatibilité, le patient et la technique chirurgicale utilisée [30]. Aujourd'hui les hautes propriétés mécaniques ne sont plus synonymes d'une bonne performance, il faut aussi considérer la fixation de l'implant au tissu osseux et son comportement face à celui-ci [36].

Un faible module d'élasticité permet de réduire les forces de cisaillement à l'interface os-implant, qui ne sont pas favorables à la fixation de l'implant sur une longue durée. Cette diminution des propriétés mécaniques peut être obtenue en utilisant des matériaux poreux. Un implant poreux doit présenter une porosité interconnectée pour permettre le transport des fluides corporels et établir une croissance osseuse vers l'intérieur de l'implant [37]. Cette croissance osseuse au sein de l'implant poreux permet une redistribution des contraintes mécaniques sur une plus grande surface. L'implant poreux doit en même temps supporter des charges physiques à long terme et être manipulé pendant la procédure chirurgicale. Une des questions posées avec l'utilisation d'implants poreux est celle de la durée de vie de ces derniers car leur propriétés de résistance à la fatigue seront aussi diminuées selon leur porosité et leur design [38, 39]. Un équilibre entre tous ces paramètres doit donc être trouvé.

L'étude de l'utilisation des matériaux poreux pour des applications biomédicales a commencé dans les années 1970 [40]. La première méthode connue pour fixer des implants au squelette a été la fixation mécanique *via* des vis ou en utilisant des ciments de polyméthylmétacrylate ou PMMA (Figure 1.3.1).



Les deux premiers avantages de l'utilisation du titane poreux sont l'ostéointégration et la réduction du module d'élasticité (110 GPa pour le titane solide). Comme nous l'avons mentionné auparavant un haut module d'élasticité peut créer un cisaillement qui peut générer une résorption de l'os à l'interface. Si cette perte d'os est très importante, la fixation de l'implant peut être mise en péril.

1.3.1 Les différents types de porosité et les méthodes de fabrication du titane poreux

Les différentes méthodes de fabrication généreront en général deux types de porosité : une porosité fermée et/ou une porosité ouverte avec la possibilité de créer des gradients de porosité ou non dans la structure [36]. Dans la porosité fermée, les pores ne sont pas liés les uns aux autres et ne permettent pas la perméabilité. Dans le cas de la porosité ouverte, il s'agit du contraire d'une structure interconnectée où les fluides corporels peuvent circuler dans les trois dimensions (3D).

Les méthodes pour obtenir une porosité fermée comprennent l'injection de gaz [41-43] et la torche à plasma [44-46]. Pour l'obtention d'une porosité ouverte il est principalement utilisé le frittage de poudres [47, 48] le frittage de fibres [49], les générateurs d'espace [50, 51], la réplique de structures en plastique [52], l'électrodécharge [53-56], la déposition chimique de vapeurs [57-59] et le prototypage rapide [60-64].

La méthode de la torche à plasma et celle de générateurs d'espace peuvent produire des porosités ouvertes ou fermées [45, 51]. La torche à plasma reste très utilisée pour revêtir des surfaces solides [44] mais génère une porosité irrégulière et de faible interconnectivité.

La méthode du prototypage rapide emploie des outils informatiques pour fabriquer des structures en 3D en utilisant par exemple l'impression de fibres, le frittage de poudres par un faisceau laser ou le frittage de poudres par un faisceau d'électrons [20, 60-66].

L'utilisation de ces matériaux poreux est possible dans les cages intravertébrales, les prothèses de la hanche, les prothèses du genou et les implants dentaires. En utilisant ces diverses méthodes, la taille des pores peut varier de 50 à 800 μm et la porosité de 20 à 90%.

La technique de prototypage rapide permet d'avoir une porosité ouverte, interconnectée et contrôlée (Figure 1.3.2). Ce contrôle peut éviter les endroits où il y aura une concentration de contraintes. Nous pouvons parler de ces méthodes de prototypage rapide comme de méthodes directes ou indirectes.

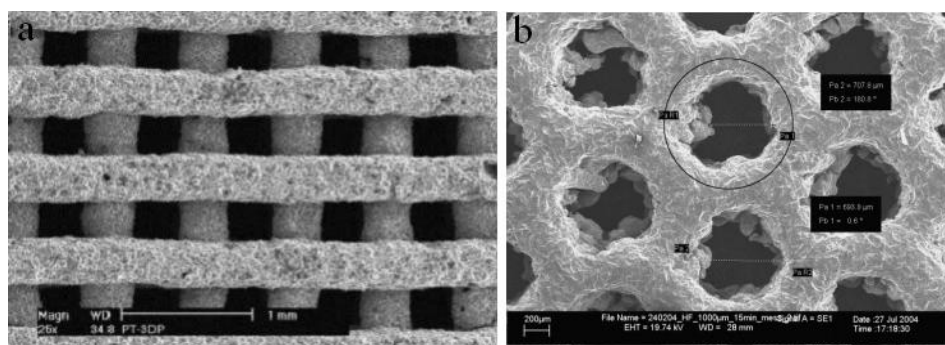


Figure 1.3.2 Différentes structures obtenues par des méthodes du prototypage rapide. a) Impression de fibres [62] et b) Frittage de poudres par un faisceau [63].

Dans les méthodes directes, la pièce à obtenir est conçue à l'aide de logiciels qui permettent de générer un modèle virtuel et en utilisant des stations d'usinage contrôlées par ordinateur pour passer directement à la fabrication de la pièce métallique. Dans les méthodes indirectes, la pièce à obtenir est aussi conçue à l'aide de logiciels qui permettent de générer un modèle virtuel mais cette étape est suivie de la création d'un modèle en cire en utilisant une machine de prototypage rapide, reliée à un ordinateur. La pièce en cire est utilisée pour créer un moule en céramique (négatif) qui permettra l'obtention de la pièce métallique finale par coulée de titane en fusion. Cette procédure est connue sous le nom de la cire perdue.

Les propriétés mécaniques des implants poreux peuvent être améliorées par le design de la porosité, par la taille et la forme du pore et par des traitements après la fabrication de ceux-ci. Quand la méthode de fabrication utilise le frittage de poudres pour créer cette structure, il peut y avoir une réduction de résistance à la fatigue aux joints de grains. Cette discontinuité dans la géométrie du matériau conduit à une concentration des contraintes aux joints de grains et à la diminution des propriétés mécaniques. Ce facteur est une mesure de la non-uniformité des efforts présents dans certaines régions. Quand une discontinuité est présente il peut y avoir une génération d'efforts biaxial ou triaxial, même si l'application de la charge porte sur une seule direction [67]. Etant donné que les implants seront utilisés dans le corps humain, une corrosion trop importante peut aussi diminuer sa résistance à la fatigue et peut libérer des éléments présents dans le matériel, ce qui pourrait causer une réponse toxique.

1.4. Les traitements de surface bioactifs

Le concept de bioactivité est appliqué à un matériau qui réagit avec l'environnement corporel et est capable de générer une réponse biologique positive [5]. Dans le cas des applications dentaires et orthopédiques, la bioactivité d'un matériau est illustrée par sa capacité à induire la précipitation d'une apatite biologique à sa surface après implantation. Cette couche d'apatite carbonatée incorpore des protéines et sert de substrat pour l'adhésion et la prolifération de cellules ostéoblastiques produisant la matrice extracellulaire osseuse. Ce processus conduit à la formation d'une liaison chimique entre le matériau bioactif et le tissu osseux. Cependant, les métaux comme le titane et ses alliages sont généralement bioinertes. Ils ne forment pas une union directe avec l'os. Un tissu fibreux se place entre l'implant et l'os. L'absence de fixation biologique de la prothèse au squelette limite sa durée de vie.

1.4.1 Les revêtements phosphocalciques

Comme nous l'avons déjà abordé, le point principal à franchir pour les implants est le succès de ceux-ci à long terme. Dans le cas du titane, nous avons vu qu'une structure poreuse peut améliorer la fixation biomécanique des implants au squelette. Si nous utilisons un revêtement avec une composition proche de celle du minéral osseux, il est possible d'améliorer sa fixation biologique en créant une interface intime entre l'os et l'implant. En effet, les revêtements de phosphates de calcium présentent des propriétés de bioactivité et d'ostéoconduction. Après implantation, le revêtement libère des ions phosphate et calcium qui vont saturer les fluides biologiques de la zone péri-implantaire et précipiter à la surface de l'implant une apatite biologique (bioactivité). Cette couche d'apatite biologique permet la colonisation de cellules ostéoblastes qui vont produire une matrice collagénique minéralisée remodelée en un tissu osseux mature sous l'action de cellules ostéoclastes. L'apposition directe de tissu osseux à la surface de l'implant revêtu lui confère des propriétés d'ostéoconduction (Figure 1.4.1). Les principaux phosphates de calcium qui sont utilisés dans le revêtement de prothèses et d'implants sont regroupés dans le tableau 1.4.1. Thermodynamiquement, l'hydroxyapatite est le composé le plus stable à température corporelle et avec des pH compris entre 5 et 8 [68].

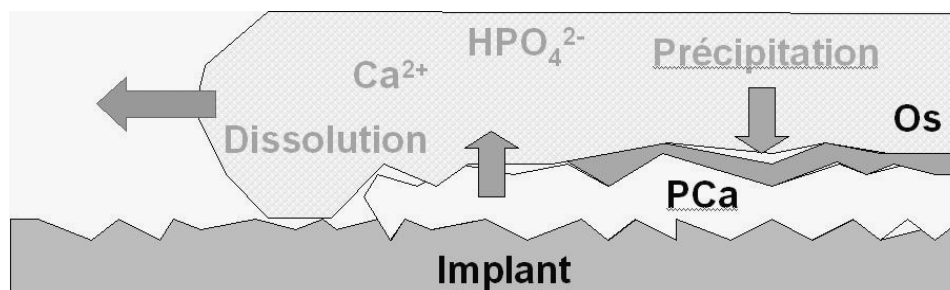


Figure 1.4.1. Bioactivité et ostéoconduction de revêtements de phosphate de calcium (PCa) sur implants en titane (Ti)

Table 1.4.1. Principaux phosphates de calcium utilisés pour le revêtement de prothèses et d'implants métalliques [22].

Nom	Formule	Ca/P
Phosphate Octacalcique, OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
Phosphate Tricalcique, TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
Hydroxyapatite, HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$	1.67
Apatite Carbonatée, ApC	Type A: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{CO}_3)$ Type B: $\text{Ca}_7(\text{CO}_3)_6 \cdot (\text{OH})_2$ $\text{Ca}_{10-x/2}[(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x] \cdot [(\text{OH})_{2-2y}(\text{CO}_3)_y]$	≥ 1.67

La Figure 1.4.2 montre la structure cristalline de l'hydroxyapatite (HA). L'apatite carbonatée (ApC) présente une composition chimique plus proche de celle du minéral osseux que l'HA [69]. L'ApC est aussi plus soluble que l'hydroxyapatite. Comme le carbonate inhibe la croissance cristalline, les ApC présentent généralement des cristaux de tailles inférieures au micromètre comparables à celles des cristaux composant le minéral osseux [70].

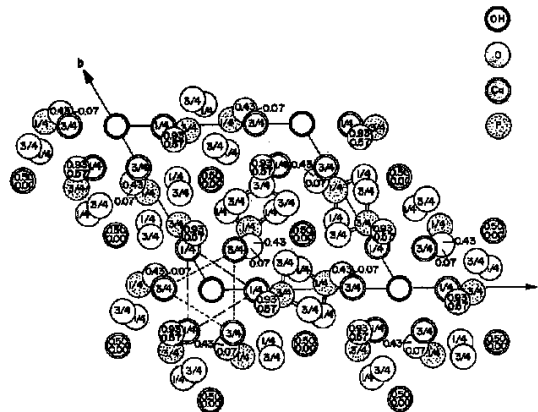


Figure 1.4.2. Structure cristalline de l'hydroxyapatite projetée sur plan basal c [22]

Depuis plusieurs années, les céramiques de phosphate de calcium sont utilisées comme matériaux de comblement osseux dans les domaines orthopédique et dentaire. Or, ces matériaux céramiques sont fragiles comparés aux implants métalliques. Ces matériaux sont donc appliqués sous forme de revêtement à des matériaux mécaniquement résistants qui peuvent soutenir la charge corporelle.

La technique de revêtement des prothèses la plus utilisée est la projection d'HA par torche à plasma. Les premiers cas d'utilisation clinique des revêtements HA datent du milieu des années 1980 [71, 72]. Il a été prouvé expérimentalement et cliniquement que les revêtements de phosphate de calcium ont des propriétés ostéoconductrices. Il a été également prouvé qu'un implant revêtu se fixera mieux au tissu osseux qu'un implant non-revêtu [73]. Dans ces applications cliniques, il est essentiel que l'interface HA/métal soit suffisamment résistante pour permettre son implantation dans le tissu osseux. Sun [74] rapporte que les propriétés mécaniques pour les revêtements d'HA par projection plasma sont de 22–29 MPa au cisaillement, et d'un minimum de 51 MPa à la tension. Il est également primordial de

contrôler la cinétique de dissolution et l'homogénéité du revêtement phosphocalcique dans les fluides biologiques afin de privilégier une interface os/métal plutôt qu'une interface os/revêtement/métal. A cause de températures élevées pendant le procédé, les revêtements par torche à plasma présentent des compositions hétérogènes. Il en résulte une dissolution préférentielle de la phase amorphe et le détachement de particules d'HA du revêtement.

1.4.2. Les méthodes de fabrication de revêtements bioactifs

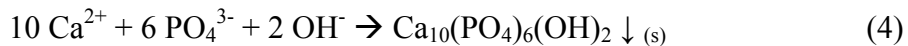
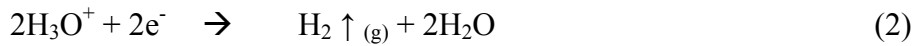
La principale méthode de revêtement des surfaces métalliques est la torche à plasma. Néanmoins, ces revêtements présentent des points défavorables tel que le mélange de phases, la tendance à se casser lorsque l'épaisseur augmente, l'impossibilité de revêtir des structures poreuses et l'affectation des propriétés du substrat [75, 76]. Certains travaux ont toutefois étudié des revêtements de HA obtenus par la torche à plasma [77-79]. En raison de ces points défavorables, des méthodes alternatives pour revêtir les surfaces métalliques ont été proposées. A titre d'exemple, nous pouvons citer la méthode sol-gel [80, 81], le revêtement par compaction à chaud [82, 83], les procédés biomimétiques [33, 34, 82-85], l'électrophorèse [86], l'électrospray [87-89] et l'électrodéposition [90-96].

L'électrodéposition est une méthode qui nécessite un équipement simple et qui n'affecte pas les propriétés du substrat. Les phases minérales sont déposées sur le métal aux températures ambiantes et à partir de solutions sursaturées. Ces revêtements peuvent offrir un avantage significatif pour l'intégration des implants dans le tissu osseux [73, 97].

1.4.3. L'Electrodéposition.

L'électrodéposition est un procédé dans lequel un courant (ou un voltage) est appliqué entre deux électrodes (l'anode et la cathode). Afin de permettre le transfert de courant/voltage entre les deux électrodes, un électrolyte est utilisé. Cet électrolyte est une solution qui contient des ions parmi lesquels certains vont permettre le transfert de courant et d'autres vont réagir avec la surface de l'électrode. Dans le cas de l'électrodéposition de phosphate de calcium, l'électrolyte contient généralement un sel de phosphate et un sel de calcium. La solution peut être tamponnée et concentrée à la limite de précipitation de l'Hydroxyapatite [92-94, 98].

Dans le cas de l'utilisation du titane comme cathode, de l'hydrogène et des ions hydroxyles sont produits sur la surface du titane. Ceci entraîne une augmentation de pH à la surface du titane conduisant l'électrolyte à précipiter du phosphate de calcium selon les équations suivantes :



La réduction de l'eau produira également du gaz d'hydrogène à la surface de la cathode en titane [92, 94]. Le dégagement du gaz d'hydrogène sur la cathode peut perturber la déposition du revêtement du phosphate de calcium. Afin d'évacuer le gaz d'hydrogène de la cathode et d'améliorer l'uniformité du revêtement, l'électrolyte est agité [99] et en même temps il peut être soumis au vide [95]. Il a été démontré que la température de l'électrolyte a un effet sur la qualité du revêtement. Une augmentation de la température facilite le transport des ions et la croissance du revêtement [93] ainsi, les revêtements deviennent plus épais. Un autre paramètre qui a son importance sur le revêtement est le courant. De hautes densités de courant (valeur mA/cm^2) améliorent le transport ionique tout en produisant plus d'hydrogène. Un dernier paramètre à prendre en compte est le temps. Plus le temps d'électrodéposition est long, plus les réactions sur la cathode seront importantes [92].

En comparaison avec le procédé par torche à plasma, l'électrodéposition utilise des solutions aqueuses et des températures proches des conditions physiologiques. Cette méthode permet la déposition de revêtements ayant des compositions et des cristallinités proches de celles du minéral osseux, mais également de contrôler d'une meilleure façon la composition et la structure des revêtements. Ceci rend donc possible la déposition de différents types de phosphate de calcium selon les conditions de l'électrodéposition [73, 92, 95, 98, 100]. De plus, ce procédé devrait également permettre de revêtir des géométries complexes ou poreuses.

1.5 Le Titane poreux comme matrice pour l'ingénierie tissulaire osseuse

Dans les paragraphes précédents, nous avons exploré les raisons de l'utilisation du titane poreux et des revêtements du phosphate de calcium pour des applications orthopédiques ou

dentaires. Dans cette partie, nous nous intéresserons à l'apport des cellules souches mésenchymateuses aux matrices en titane poreux afin d'apporter à ces implants des propriétés d'ostéogenèse et d'ostéoinduction.

L'utilisation de substituts osseux est désignée par trois paramètres qui sont cruciaux [101]: les actions des ostéoblastes pour former la matrice extracellulaire osseuse, une structure de support appropriée et des facteurs biologiques qui produisent le bon stimulus. L'idée d'utiliser des cellules associées à une matrice fait partie de la recherche pour un substitut osseux idéal [102]. Cette approche consiste à apporter des cellules pour générer le tissu osseux sur l'implant avant l'implantation et améliorer ainsi sa formation une fois implanté. L'adhésion des cellules est similaire sur des matériaux lisses, rugueux ou revêtus du phosphate de calcium [103, 104]. Cependant, les propriétés ostéogéniques des cellules cultivées sur des matrices revêtues de phosphate de calcium sont plus favorables après une implantation subcutanée chez le rat en comparaison avec le titane non revêtu [102, 105-110]. D'où l'intérêt d'associer le titane avec un revêtement en phosphate de calcium. D'autres études ont utilisé des revêtements comme le collagène de type I, III, du peptide RGD ou de la matrice extra cellulaire [111-113].

Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse, la source des cellules, leur nombre, les conditions de culture, l'environnement et la matrice sur laquelle elles sont cultivées sont des paramètres qui influencent fortement l'ostéogenèse [102, 112]. Un point positif de son utilisation est l'accélération de la minéralisation sur les implants. Cette accélération peut améliorer la formation osseuse au contact de l'implant [114].

Dans un premier temps, les cellules vont s'attacher de façon similaire, indépendamment de la surface de la matrice, mais cet état aura un effet sur la façon dont elles vont s'étaler, sur leur morphologie et sur leur capacité à se différencier en ostéoblastes [103, 104]. Le tissu osseux se remodèle constamment mais dans le cas de l'ostéoporose où dans des régions irradiées ce remodelage est limité. Après l'irradiation, la vascularisation, le supplément sanguin et les cellules sont endommagées et mettent en péril l'intégrité et la capacité de cicatrisation [115]. Les hautes doses de radiation causent un environnement hypoxique, hypocellulaire et hypovasculaire [116]. L'utilisation des cellules associées à des matrices synthétiques a prouvé son utilité pour le remodelage osseux [117, 118] et peut être considéré comme améliorant les

capacités de récupération de l'os irradié [119]. Enfin, la combinaison des cellules avec un support adéquat peut surpasser les désavantages liés à la greffe d'os autologue [120-122]

1.6 Conclusions

Le tissu osseux présente une hiérarchie structurelle par l'association de fibres de collagène et de cristaux d'apatite carbonatée qui lui confèrent des propriétés mécaniques élevées. Malgré cela, il peut arriver que ce tissu soit endommagé et que son remplacement soit nécessaire. Dans toute la gamme des biomatériaux, les matériaux métalliques présentent un bon compromis entre leurs propriétés mécaniques et leur inactivité biologique. Néanmoins, ses propriétés mécaniques sont très élevées par rapport à celles de l'os et leur bioinertie n'est pas satisfaisante. L'utilisation de titane poreux permet de modifier les propriétés mécaniques des matériaux métalliques. Les nouvelles techniques informatiques en combinaison avec des procédés de fabrication souples peuvent faciliter le contrôle de l'architecture des implants tout en gardant des propriétés mécaniques adéquates. Afin d'améliorer leur bioactivité, ces implants en titane poreux pourraient être revêtus de phosphate de calcium (hydroxyapatite). Pour la réalisation de ces revêtements, plusieurs méthodes sont disponibles. La méthode d'électrodéposition permet de ne pas affecter les propriétés du substrat et de contrôler la phase phosphocalcique déposée. Enfin, l'association de cellules souches mésenchymateuses à ces matrices en titane poreuses et bioactives permettrait d'apporter des propriétés d'ostéogenèse et d'ostéoinduction dans des zones sous contraintes biomécaniques.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les objectifs de cette thèse sont :

- 1.- La mise en forme des implants en titane poreux par une méthode basée sur le prototypage rapide.
- 2.- l'évaluation de la biofonctionnalité d'implants en titane poreux dans un modèle de défauts osseux de taille critique chez le lapin.
- 3.- Le développement de revêtements bioactifs en phosphates de calcium sur des implants en titane par un procédé d'électrodéposition et immersion.
- 4.- L'association de cellules ostéoprogénitrices, de matrices en titane et de revêtements bioactifs pour l'ingénierie tissulaire osseuse.

Chapitre 2

In theory, theory and practice are the same. In practice, they are different.

Anonymous

Fabrication d'implants en titane macroporeux par prototypage rapide : propriétés mécaniques et biofonctionnalité

Article 1: M.A. Lopez-Heredia, E. Goyenvalle, E. Aguado, P. Pilet, C. Leroux, M. Dorget, P. Weiss and P. Layrolle. **Bone Growth in Rapid Prototyped Porous Titanium Implants.** *J. Biomed. Mater. Res. Part A* (Accepté, disponible électroniquement par visualisation avancée)

Chapitre 2. Introduction

Le titane et ses alliages sont largement utilisés dans la fabrication d'implants orthopédiques et dentaires. En effet, les implants en titane possèdent une haute résistance à la fatigue et une excellente résistance à la corrosion dans les fluides biologiques ce qui les rend biocompatibles [22, 36, 123, 124]. Malgré ces points favorables, il existe une différence importante entre le module d'élasticité du titane ($E = 100-110$ GPa) et celui de l'os cortical ($E = 5-27$ GPa). Cette différence donne lieu à un effet de cisaillement à l'interface os-implant. [22, 47]. Cet effet de cisaillement se traduit par une résorption de l'os qui affecte principalement la performance de l'implant sur une longue durée [22]. La modélisation par éléments finis (FEM) a montré qu'en contrôlant la porosité du matériel il est possible de contrôler ses propriétés mécaniques [125-127]. En utilisant un implant en titane poreux, il est alors possible d'approcher les propriétés mécaniques de l'os, notamment au niveau de la résistance en compression et du module d'élasticité. De plus, une structure en titane poreux peut faciliter la repousse osseuse et la fixation biomécanique des implants au squelette [128].

Les implants en titane poreux ont été fabriqués par différents procédés [129]. Des groupes de recherche ont obtenu avec succès une performance biologique et clinique de prothèses avec un revêtement poreux. On peut citer par exemple, la fabrication d'une surface en titane poreux par la projection par torche à plasma [36, 44, 130, 131]. Il a été montré que ces surfaces poreuses améliorent la biomécanique et la fixation au niveau de l'interface os-implant [132, 133]. Des implants en titane poreux ont été récemment fabriqués par projection par torche plasma et usinage. Ces implants présentaient une porosité d'environ 40% faiblement interconnectée et une résistance en compression de l'ordre de 85 MPa. Ici, le module d'élasticité a eu une valeur moyenne de 4.7 GPa [45]. Afin d'améliorer leur ostéointégration, ces implants en titane poreux ont été traités chimiquement par la soude et thermiquement. Ces traitements produisent une surface bioactive qui favorise la précipitation d'une apatite *in vitro* et *in vivo*. Cette couche d'apatite sert de substrat aux cellules ostéoblastiques qui produisent la matrice extracellulaire osseuse améliorant ainsi l'apposition osseuse au contact et la repousse osseuse au cœur de l'implant. Cependant, ce procédé ne permet pas de contrôler avec précision la porosité de l'implant, ni la taille des pores, ni leurs interconnexions. De plus, une étape d'usinage est nécessaire pour obtenir la forme souhaitée de l'implant.

Actuellement, les nouveaux développements informatiques et le prototypage rapide rendent possible la fabrication d'implants anatomiques avec un contrôle de l'architecture interne et de la porosité [134-136]. En utilisant la conception assistée par ordinateur, la modélisation par éléments finis et les techniques du prototypage rapide, il est possible d'envisager de contrôler la forme de l'implant, sa porosité interne et de s'approcher des propriétés biomécaniques du squelette. Des matrices en titane poreux ont été récemment produites à l'aide des techniques de prototypage rapide [62, 63, 137, 138]. Dans un de ces procédés, les pièces en titane sont imprimées avec une seringue et en utilisant une barbotine de titane. Les fibres déposées de la pièce en titane sont ensuite frittées à 1250 °C. Selon les paramètres utilisés, il a été possible d'obtenir des porosités entre 50-75% et des tailles de pores interconnectés entre 250-480 μm . Toutefois, cette méthode de fabrication nécessite l'utilisation de l'usinage pour obtenir la forme désirée pour des implants médicaux. En utilisant la technique de fusion par laser de poudre de titane, des implants de structures complexes en trois dimensions ont été produits [63, 138]. Cette opération est réalisée dans une atmosphère protectrice d'argon et en utilisant un laser Nd:G qui permet de fondre de façon locale la poudre de titane et de construire les implants. Néanmoins, cette technique de fabrication utilise des équipements coûteux et les propriétés de fatigue aux joints de grains ne sont pas garanties pour une utilisation médicale. Ces implants en titane poreux fabriqués par prototypage rapide sont particulièrement intéressants comme matrices pour l'ingénierie tissulaire. Certaines études rapportent l'utilisation de telles matrices en titane poreux pour la culture de cellules ostéoblastiques [63]. De tels implants faits sur mesure, présentant une porosité interconnectée et des propriétés mécaniques élevées pourraient être utilisés en chirurgie reconstructrice de zones portantes du squelette.

Dans ce chapitre, nous présentons une nouvelle technique pour produire des implants en titane poreux en utilisant le prototypage rapide. Notre méthode de fabrication rend possible le contrôle précis de la géométrie de l'implant et de son architecture interne. L'objectif de cette étude est de caractériser des implants en titane poreux avec des géométries reproductibles et une porosité contrôlée. Deux types d'implants, l'un avec des pores de 800 μm et l'autre avec des pores de 1200 μm , sont fabriqués à partir d'empreintes en cire produites par prototypage rapide. Ces empreintes sont ensuite remplies par un matériau réfractaire puis la cire est éliminée par chauffage à haute température. Du titane en fusion est coulé sous vide dans le moule réfractaire. Après nettoyage par sablage et mordancage à l'acide, les pièces en titane

ont été caractérisées par microscanner, microscopie électronique à balayage, métallographie, diffraction des rayons-X. Les implants cylindriques en titane poreux avec des pores de 800 ou 1200 μm de diamètre sont implantés dans des défauts osseux de taille critique, de 6 mm de diamètre, dans la partie fémorale distale du lapin pour des périodes de 3 et 8 semaines. La repousse osseuse et le contact os-implants sont mesurés via des techniques histomorphométriques.

M.A. Lopez-Heredia, E. Goyenvallée, E. Aguado, P. Pilet, C. Leroux, M. Dorget, P. Weiss and P. Layrolle. **Bone Growth in Rapid Prototyped Porous Titanium Implants.** *J. Biomed. Mater. Res. Part A* (Accepté, disponible électroniquement par visualisation avancée)

Bone growth in rapid prototyped porous titanium implants

M.A. Lopez-Heredia,¹ E. Goyenvallée,² E. Aguado,^{2,3} P. Pilet,¹ C. Leroux,⁴
 M. Dorget,⁴ P. Weiss,¹ P. Layrolle¹

¹INSERM, U791, Laboratoire d'ingénierie ostéoarticulaire et dentaire, Faculté de chirurgie dentaire, Université de Nantes, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes, France

²UPSP, Biologie et Biomatériaux du Tissu Osseux-Chirurgie Expérimentale, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes-BP 40706 - 44307 Nantes Cedex 03, France

³INSERM, EM0335, Remodelage osseux et Biomatériaux, LHEA, Faculté de Médecine, 1 rue Haute de Reculée, 49045 Angers, France

⁴Centre de Transfert de Technologies du Mans, 20 rue Thalès de Milet, 72000 Le Mans, France

Received 25 September 2006; revised 19 January 2007; accepted 4 April 2007

Published online 00 Month 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.a.31468

Abstract: Two porous titanium implants with a pore size diameter of 800 and 1200 μm (Ti800 and Ti1200) and an interconnected network were manufactured using rapid prototyping. Their dimensions and structure matched those of the computer assisted design. The porosity of the implants was around 60%. Their compressive strength and Young's modulus were around 80 MPa and 2.7 GPa, respectively. These values are comparable to those of cortical bone. The implants were implanted bilaterally in the femoral epiphysis of 15 New Zealand White rabbits. After 3 and 8 weeks, abundant bone formation was found inside the rapid prototyped porous titanium implants. For the Ti1200 implants, bone ingrowth was ($23.9 \pm 3.5\%$) and ($10.3 \pm 2.8\%$), respectively. A significant statistical differ-

ence ($p < 0.05$) was found for bone ingrowth in the Ti1200 between the two delays. The percentage of bone directly apposed on titanium was ($35.8 \pm 5.4\%$) and ($30.5 \pm 5.0\%$). No significant difference was found for bone-implant contact between the different time periods and pore sizes. This work demonstrates that manufacturing macroporous titanium implants with controlled shape and porosity using a rapid prototyping method is possible and that this technique is a good candidate for orthopedic and maxillofacial applications. © 2007 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res* 00A: 000–000, 2007

Key words: rapid prototyping; porous titanium; bone ingrowth; bone apposition

INTRODUCTION

Titanium and its alloys are widely used for manufacturing orthopedic and dental implants because of their excellent mechanical and biological properties. For instance, titanium implants exhibit high strength and excellent fatigue behavior, corrosion resistance to body fluids, biocompatibility, and even recently reported bioactivity.^{1–4} However, the considerable mismatch between Young's modulus of titanium ($E = 100$ – 110 GPa) and that of cortical bone ($E = 5$ – 27 GPa) creates a stress-shielding effect at the bone/

implant interface.^{3,5} This stress shielding effect results in bone resorption significantly affecting the long-term performance of the implants.³ Finite element modeling (FEM) has shown that both the strength and Young's modulus of a metal may be controlled by its porosity.^{6–8} It ought, therefore, to be possible to match the strength and elastic modulus of bone by using porous titanium implants. Furthermore, a porous titanium structure may facilitate bone tissue ingrowth and the biomechanical anchorage of implants to the skeleton.⁹

Porous titanium implants have been manufactured using a variety of processes.¹⁰ Some groups have successfully reported the biological and clinical performance of porous coated prostheses, for example beaded titanium surface and plasma-sprayed titanium.^{2,11–13} These porous surfaces improve the biomechanics and fixation at the bone/implant interface.^{14,15} Kokubo's group has recently reported the manufacture of porous titanium with 40% porosity

Correspondence to: P. Layrolle; e-mail: pierre.layrolle@nantes.inserm.fr

Contract grant sponsors: French Ministry of Research, Regional Council of the Pays de la Loire, CONACyT

© 2007 Wiley Periodicals, Inc.

and compression yield strength of 85 MPa using a plasma-sprayed method.¹⁶ Porous titanium was subsequently machined into cylindrical implants and chemically and thermally treated to provide it with a bioactive surface. It has been shown that the porous bioactive titanium enhanced bone ingrowth and apposition. However, these conventional manufacturing methods do not make possible precise control of the porosity, such as pore size and interconnectivity and further machining is required for manufacturing net shaped implants.

Nowadays, new developments in computer engineering and rapid prototyping methods open up the possibility of manufacturing anatomical implants with controlled internal architecture and porosity.^{17–19} By using computer-aided design, the FEM approach and rapid prototyping technique, it could be possible to imaging controlling both the net shape and internal porosity of implants to match the biomechanics of the skeleton. Porous titanium alloy scaffolds have been recently prepared with the help of rapid prototyping techniques.^{20–23} In one of this process, titanium parts are printed by pushing titanium slurry through a nozzle. The fiber deposited titanium part was then sintered at 1250°C. Depending on the processing parameters, the porous titanium scaffolds had porosity ranging from 50 to 75% and interconnected pores of 250–480 μm . Nevertheless, this manufacturing method also necessitates machining in order to obtain the desired net shape for medical implants. Titanium implants having complex three-dimensional (3D) geometries and porosities have been directly produced by using direct laser forming (DLF) of titanium powder.^{21,23} The processing was carried out in an argon atmosphere using an Nd:G laser which locally melted the titanium powder, building up the implants. However, this laser sintering technique requires expensive equipment. The rapid prototyped titanium implants were subsequently tested as scaffolds for osteoblastic cells,²¹ opening up new avenues in bone tissue engineering. These customized, high strength, and biocompatible porous titanium scaffolds combined with the patient's own cells could be used in bone reconstructive surgery under load-bearing conditions.^{18–20,24}

We describe here a new method for producing porous titanium implants by means of rapid prototyping. Our manufacturing method makes possible precise control of both the geometry of the implant and its internal architecture. The aim of this study was to characterize porous titanium implants with reproducible geometries and controlled porosity. Two types of porous titanium implants, with pore size of 800 and 1200 μm , were implanted in critical-sized defects measuring 6 mm in the distal femoral condyles of rabbits for 3 and 8 weeks. Bone ingrowth

and bone implant contact were measured using histomorphometrical techniques.

MATERIALS AND METHODS

Manufacturing the porous titanium implants

Implants with interconnected pores of 800 and 1200 μm were designed (Fig. 1) using computer assisted design (CAD) software (CATIA, INCAT USA). Cylindrical wax patterns 6.2 mm in diameter and 10 mm in height were produced by a rapid prototyping machine (MM2, Solid-scape). This machine uses an inkjet plotter technology to generate the 3D wax patterns from the files generated by using the CAD software. After obtaining the wax patterns a pouring system was added to them and the whole was subsequently embedded into a refractory material (Titavest, J. Morita Europe GmbH). Next, refractory moulds containing the wax patterns were burned at 512°C to burn out the wax, and finally sintered at 990°C, obtaining a cavity with the desired shape. At the end of sintering

F1

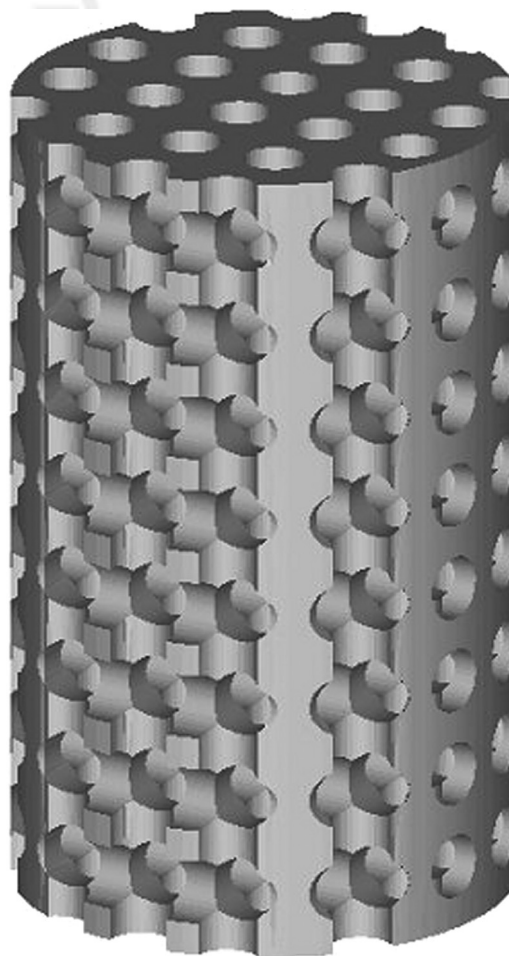


Figure 1. Computer-assisted design (CAD) of the porous titanium imp with interconnected 800 μm diameter pores (Ti800). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

AQ1

the mould was maintained at this temperature prior to pouring titanium to reduce thermal shock effects. Mould was introduced in a furnace (Doromatic Schütz-Dental GmbH), and an ingot of titanium (grade 2) was subsequently melted by using an electric current under a protective atmosphere of argon. The liquid titanium was rapidly poured into the moulds to obtain metallic replicas. Once the mould had been filled with titanium, it was quenched in a cold-water bath. The mould was broken and excess refractory material inside the porous titanium cylinders was removed by grit-blasting (Sanduret 3K, Rosfrei). The grit-blasting was done using biphasic calcium phosphate (BCP) ceramic particles measuring between 100 and 200 μm . The BCP grit-blasting procedure allowed the preparation of a rough and clean titanium surface.²⁵ The BCP particles were prepared by isostatic compaction of calcium deficient apatite powder at 1500 bars, sintering at 1250°C for 5 h, crushing, and sieving in the 100–200 μm range. Porous titanium cylinders were finally etched in a mixture of acids consisting of nitric acid (HNO_3 50%, 6 mL), fluorhydric acid (HF 40%, 3 mL), and water (991 mL) and then thoroughly rinsed in demineralized water. The samples were ultrasonically cleaned in acetone, ethanol, and demineralized water and dried in the air at 90°C overnight.

Characterization of the porous titanium implants

About 50 samples were prepared according to the methods described before. All the samples were characterized after BCP grit-blasting, acid etching, and cleaning. The size and weight of these 50 samples were accurately measured and averaged. The overall porosity was calculated using the following formula:

$$\text{Porosity} = [1 - (W_{\text{exp.}}/W_{\text{theo.}})] \times 100$$

where $W_{\text{exp.}}$ and $W_{\text{theo.}}$ are the experimental and theoretical weight, respectively. The theoretical weight was calculated from the expected volume, porosity, and density of solid titanium ($d = 4.5 \text{ g/cm}^3$).

Three-dimensional micro computed tomography (μCT , SkyScan 1072) of porous titanium cylinders was performed to control both the porosity and presence of possible voids on the titanium struts. An X-ray source was kept constant at 100 kV and 10 mA (10 W). A 1-mm aluminium filter was used during the scanning. Series of 2D radiographic projections at different viewing angles, ranging from 0° to 180°, with a rotational step of 0.45°, were recorded. The 3D implant structure was reconstructed from the 2D projections using software (Nrecon, SkyScan).

The surface roughness was measured after blasting and acid etching (SJ-201M, Mitutoyo). Scanning electron microscopy (SEM, Leo 1450VP) was performed on the samples. The pore diameters were directly measured on the SEM image. About 50 measurements of the pore diameter were averaged. Energy dispersive analysis for X-Ray (EDX, Oxford Instruments) was performed at a working distance of 15 mm and 15 kV to distinguish the elements present at the surface. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS, Leybold LHS 12) was also used to analyze the chemical composition of the surface and interior of 3 samples.

The Mg $K\alpha$ source was operated at 120 W, 12 kV, and a pressure of 5×10^{-8} Torr. XPS data and analysis (SpecLab data system) were performed at the University of Nantes CNRS. The porous titanium samples were also analyzed by X-ray diffraction (XRD, PW1830 Philips) using $K\alpha$ copper radiation in continuous mode. XRD made it possible to determine the titanium alpha and beta phases according to the JCPDS cards numbers 44-1294 and 44-1288, respectively.

Mechanical testing of the porous titanium implants

The compression strengths of the implants were measured using a mechanical test bench (ReNew SMA, MTS Systems Corp.). The compression tests were performed at a crosshead speed of 0.6 mm/min. Five samples of each pore size were used to perform the tests. The 0.2%-offset yield strength and the elastic modulus were calculated for each test and averaged.

Animal study

The porous titanium implants were individually double packed and steam sterilised at 121°C for 20 min. All animal handling and surgical procedures were conducted according to European Community guidelines for the care and use of laboratory animals (DE 86/609/CEE). The protocol of the study was approved by the local animal care and safety committee. Fifteen adult female New Zealand White rabbits, weighing between 3.5 and 3.75 kg, were purchased from a professional breeder (Charles River Laboratories, France). The animals were housed in individual cages with access to food pellets and water. They were placed in quarantine for at least 10 days prior to surgery. General anaesthesia was performed using an intramuscular injection of a mixture of Ketamine (35 mg/kg, Imagene 1000, Merial, Lyon, France) and Xylazine (5 mg/kg, Rompun, Laboratoire Bayer Pharma, Puteaux, France). The limbs were shaved, the skin was disinfected with iodine solution and the animal was sterile draped. A longitudinal incision was made to expose the distal lateral femoral condyle. A cylindrical defect (6-mm diameter $\times$ 10 mm) was drilled at the junction between the femoral epiphysis and metaphysis using a motor-driven drill (Aesculap, Tuttlingen, Germany) and successive burs of 2, 4, and 6 mm in diameter. During drilling, the site was irrigated using a sterile saline solution. Bone debris was removed by saline irrigation and the defects were packed with sterile gauze until bleeding subsided. The cylindrical porous titanium implant was then press-fitted into the femoral defect. The subcutaneous tissue and skin were closed in different layers using degradable sutures (Safil 3.0, B. Braun Laboratory, France). The surgical site was finally covered with an adhesive bandage. Both femurs were operated, porous titanium implants with pore size of 800 and 1200 μm were implanted in the right and left femoral defects, respectively. Six implants per group were implanted for each time period of 3 and 8 weeks (12 rabbits). To show that the defects were critical size, 6 femoral defects (3 rabbits) were left empty and used as controls for a delay of

8 weeks. No prophylactic, antibacterial, or antiinflammatory treatments were administered after surgery. At the end of the time period, the animals were anaesthetised and killed by intracardiac overdose of sodium pentobarbital. The distal femoral condyles were immediately dissected and fixed in a buffered 10% formaldehyde solution for a period of 7 days. To localize the implant, frontal pictures of the condyles were taken using a classic X-Ray.

Histology

After fixation, the nondecalcified bone samples were dehydrated in a series of ethanol solutions (70–100%) for periods of 3 days and then in acetone for 2 days. The samples were impregnated in methylmethacrylate for 6 days and then embedded in a poly methylmethacrylate resin. Blocks were then cut in the middle of the trochlea using a circular diamond saw (Leica SP1600). Thin slices of ~ 60 μm were cut from the blocks and ground to a thickness of 20–40 μm using a polishing machine (Buehler Metaserv 2000) and SiC 4000 paper. Each section was then stained using Movat's pentachrome²⁶ and mounted on glass lames. Microscopic observations of the histological sections were made using a transmitted light microscope (Axioplan 2, Zeiss) combined with a digital camera (Cannon Power Shot G6, Canon).

Histomorphometry

The second part of the sectioned block showing the implant in the trabecular region was used for histomorphometrical analysis. The blocks were polished using SiC 4000 paper and sputtered with gold-palladium (Denton Vacuum Desk III). Contiguous high-resolution SEM images of the entire implant, at a magnification of 30 $\times$, were acquired using backscattered electrons at 15 kV (LEO 1450VP, Zeiss). Quantitative evaluation of the titanium implant, mineralized bone, and nonmineralized tissue surfaces in the defect was performed using an image analysis system (Leica Quantimet 4) with a custom-made programme. Each surface was identified according to its level of grey color. Total bone ingrowth was expressed as a percentage using the surface of bone inside the defect divided by the total surface of the defect minus the surface of the titanium implant. The bone implant contact was expressed as a percentage of bone in direct contact with the implant surface. The centripetal bone ingrowth was determined in the defect from the outside to the middle of the implant using a custom-made programme. In short, the surfaces of the bone, titanium, and nonmineralized tissue were automatically measured according to their level of grey color inside concentric circles decreasing by 2 pixels. Six

implants per group (Ti800 or Ti1200) and implantation time (3 and 8 weeks) were used in this study. For each implant, two sections surrounded by trabecular bone were examined giving a sufficient quantity of data ($n = 12$) for statistical analysis.

Statistical analysis

All data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). The data were statistically analyzed using a Student's *t* test of the independent groups. The effect of the time periods and pore size was analyzed.

RESULTS

Manufacture and characterization of rapid prototyped porous titanium implants

The CAD design of the porous titanium implants is shown in Figure 1. A regular array of interconnected pores with a diameter of 800 or 1200 μm was designed in order to allow bone ingrowth. The implants have a theoretical porosity of 60% for both pore sizes of 800 and 1200 μm . The cylinders had a nominal diameter of 6.2 mm and length of 10 mm. About 50 porous titanium implants were produced by rapid prototyping. As shown in Table I, the dimensions and pore sizes of the rapid prototyped objects were close to the theoretical values with good accuracy and reproducibility. The overall porosities obtained for the implants were similar to the theoretical value of 60%. The diameters of the pores in the Ti800 and Ti1200 samples were also similar to those expected from the design. Figure 2 shows μCT images of the rapid prototyped porous titanium implant. Both the dimensions and internal structure were reproduced according to the CAD design. The cross-section image shows that there were no voids or bubbles within the titanium struts [Fig. 2(b)]. Generally speaking, for both implants the different pore sizes appeared well-interconnected and reproducible (Figs. 2 and 3). However, the internal network was sometimes packed with material because of the casting procedure. SEM images [Fig. 3(a,b)] show the excellent reproducibility in terms of pore diameter and internal structure. At high magnifications, the surface appeared rough resulting from the BCP grit blasting and acid etching steps [Fig.

T1

F2

F3

TABLE I
Physical and Mechanical Properties of the Rapid Prototyped Porous Titanium Implants

Implants	Diameter (mm)	Height (mm)	Weight (g)	Porosity (%)	Pore Size (μm)	σ_y (MPa)	E(GPa)
Theoretical	6.2	10.0	0.546	60	800 – 1200	–	–
Ti800	6.10 $\pm$ 0.04	9.76 $\pm$ 0.34	0.521 $\pm$ 0.07	59.73 $\pm$ 5.2	805 $\pm$ 27.8	81.93 $\pm$ 21.3	2.76 $\pm$ 0.7
Ti1200	6.18 $\pm$ 0.08	10.16 $\pm$ 0.05	0.564 $\pm$ 0.03	59.08 $\pm$ 2.4	1142 $\pm$ 9.4	83.05 $\pm$ 27.2	2.6 $\pm$ 1.0

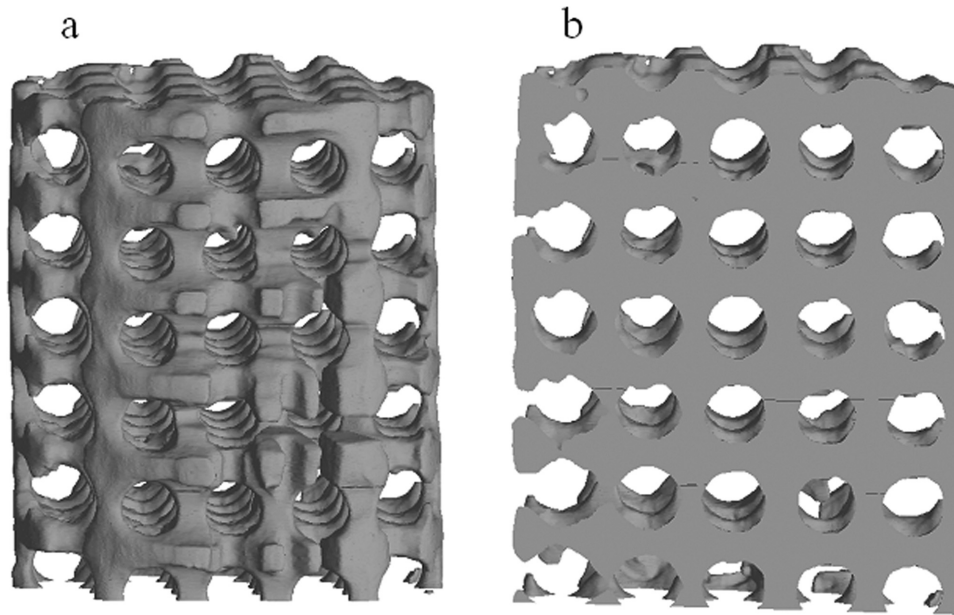


Figure 2. Micro-computed tomography (μ CT) of the rapid prototyped porous titanium implants showing (a) the whole implant and (b) the cross-sectioned implant.

3(c)]. After the BCP grit blasting and acid etching, the roughness was found to be around 2.02 ± 0.10 and $1.64 \pm 0.14 \mu\text{m}$, respectively. The EDX analysis [Fig. 3(d)] did not show any element other than titanium, oxygen, and carbon, like the initial titanium material. These results were confirmed by XPS in

which the only elements present were Ti at 4.9% atm, O 32.3% atm, and C 62.7% atm. The presence of carbon resulted of the contamination of the atmosphere and/or the plastic container. As the manufacturing process involves melting and quenching of titanium, some beta phases could be retained.²⁷ The

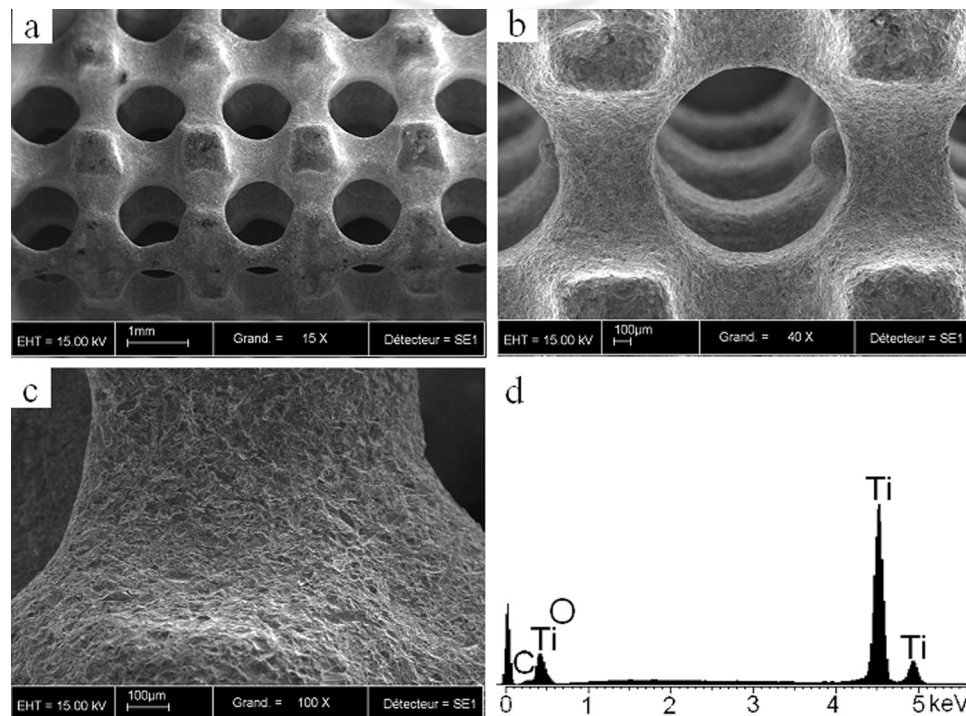


Figure 3. SEM micrographs and EDX analysis of the rapid prototyped porous titanium implant. (a, b) Note the regular and interconnected $800 \mu\text{m}$ diameter pores, (c) the micro-roughness of the surface obtained by BCP grit-blasting and acid etching and (d) the EDX spectra showing titanium peaks.

XRD analysis (data not shown) indicated that the initial titanium material and the rapid prototyped porous titanium implants were essentially composed of alpha titanium. Metallographic observations (data not shown) corroborated this result, where only alpha phase was observed. In the case of the rapid prototyped porous titanium implants, a columnar structure was observed in the regions that were near the walls of the refractory mould due to the cooling gradient.

The compressive tests performed on the implants showed a typical strength-strain curve for porous metals under compression, with an initial deformation, a plateau region (collapse of the pores) and an inflection upward corresponding to compression. The average yield strength and Young's modulus for the implants were around 80 MPa and 2.7 GPa, respectively (Table I). Considering the porosity of 60%, these mechanical properties are high. Furthermore, Young's Modulus for these porous titanium implants is much lower than for dense titanium ($E_{Ti} = 105$ GPa) and more comparable to those of cortical bone ($E_{bone} = 5\text{--}27$ GPa).^{3,5}

Animal study

All 15 rabbits tolerated well the surgical procedure and remained in good health without post-operative complications. After euthanasia, the femoral condyles appeared normal with no signs of inflammatory or foreign body reactions around the implants. No infection at the operative site or dislocation of the implants was observed on dissection. As shown in the radiography (Fig. 4), the porous titanium implants were stable and remained in good contact with the surrounding bone tissue. The nondecalcified samples were cross-sectioned in the middle of the femoral trochlea. Figure 5 shows representative BSEM images of cross-sectioned implants in the femoral epiphysis defects. Titanium struts are shown in white while mineralized trabecular bone and non-mineralized tissue are grey and black, respectively. In these pictures, the original 6 mm defects are represented by a circle. Newly formed bone within the defects appeared a little lighter than the surrounding bone tissue. After 3 and 8 weeks, bone growth was observed in both rapid prototyped Ti800 and Ti1200 implants. More mineralized bone was observed at the periphery than in the middle of the implants. Bone had grown inside the porosity and in between the struts of the rapid prototyped implants. A relatively smaller amount of bone was observed at 8 weeks than at 3 weeks in both groups of implants. Those qualitative results were corroborated by the histomorphometry data.

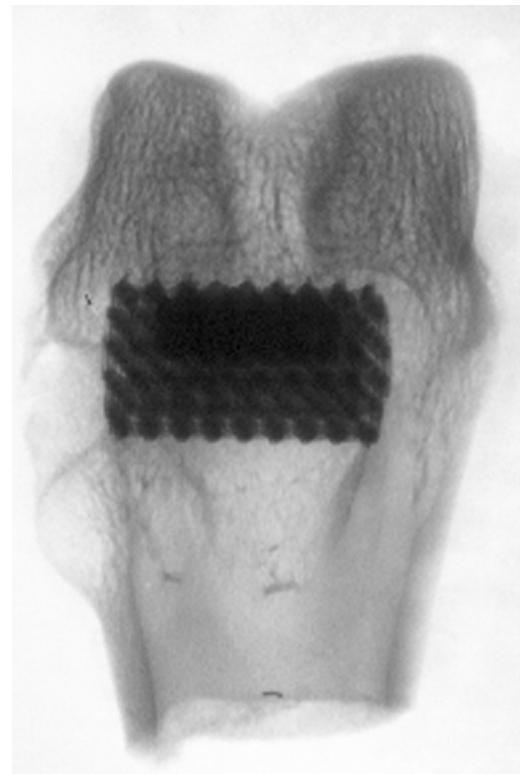


Figure 4. X-ray of the porous titanium cylinder (Ti800) implanted for 8 weeks in the femoral epiphysis of rabbits. The dashed line indicates the position of the cross-section.

Histomorphometry study

The quantity of mineralized bone growth inside the porous titanium implants after 3 and 8 weeks is illustrated in Figure 6. For the Ti800 implants ($n = 12$), bone ingrowth was $(18.1 \pm 2.5)\%$ and $(14.2 \pm 3.2)\%$ after implantation for 3 and 8 weeks, respectively. For the Ti1200 implants ($n = 12$), bone ingrowth was $(23.9 \pm 3.5)\%$ and $(10.3 \pm 2.8)\%$ after 3 and 8 weeks, respectively. There were no significant statistical differences ($p < 0.05$) for the percentage of bone growth between the two types of implant, Ti800 and Ti1200. The only significant statistical difference was noted by comparing bone growth data from the Ti1200 implanted for 3 weeks with those at 8 weeks. Figure 7 shows the bone-implant contact measured for Ti800 and Ti1200 samples after 3 and 8 weeks. For the Ti800, the percentage of bone in contact with the titanium surface was $(22.7 \pm 3.7)\%$ and $(31.1 \pm 4.4)\%$ after 3 and 8 weeks respectively. For Ti1200, the percentage of bone directly apposed on titanium was $(35.8 \pm 5.4)\%$ and $(30.5 \pm 5.0)\%$ after 3 and 8 weeks, respectively. There were no significant statistical difference between these groups and thus, a similar quantity of bone in contact with the titanium surface, $\sim 30\%$, was observed. Figure 8 shows the percentage of

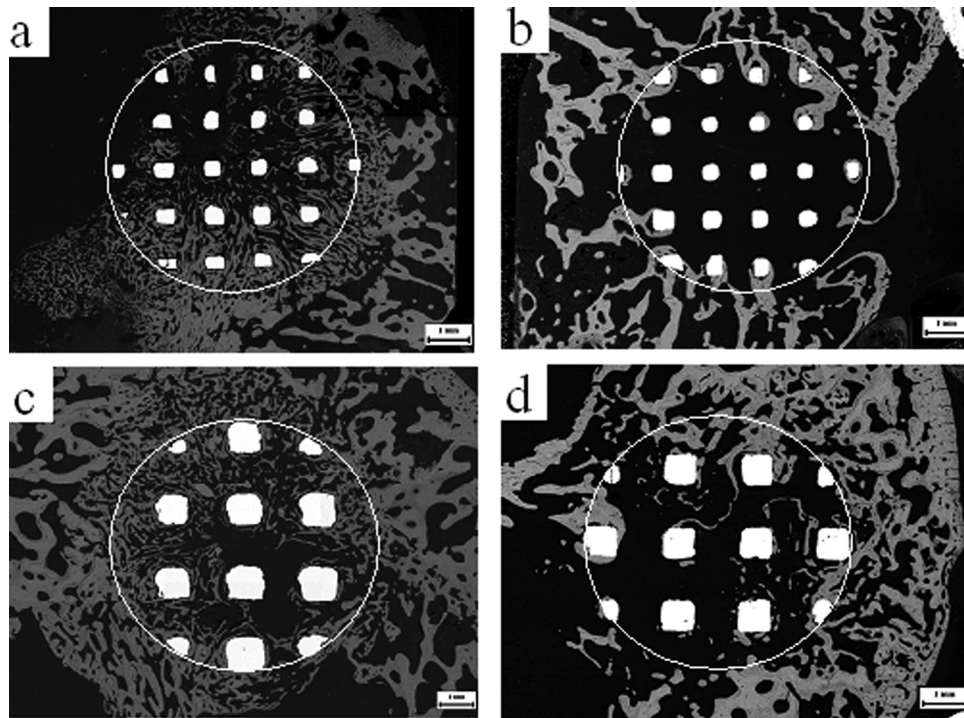


Figure 5. BSEM micrographs of the cross section of the rapid prototyped porous titanium implants implanted in the femoral epiphysis of rabbits for 3 and 8 weeks. (a) Rapid prototyped porous titanium implant with 800 μm pore size (Ti800) after 3 weeks of implantation, (b) Rapid prototyped porous titanium implant with 800 μm pore size (Ti800) after 8 weeks of implantation, (c) Rapid prototyped porous titanium implant with 1200 μm pore size (Ti1200) after 3 weeks of implantation and (d) Rapid prototyped porous titanium implant with 1200 μm pore size (Ti1200) after 8 weeks of implantation.

bone in the defects in relation to the distance from the border to the centre. For the empty defects after 8 weeks, a maximum of 10% of bone ingrowth was reached at a distance of 0.8 mm from the external diameter. At distances of more than 1.5 mm, no bone was detected in the empty defects. These results corroborate that the 6 mm defects in the

femoral condyles of rabbits were critical and could not heal during the 8-week period. On the other hand, both the amount of bone and the penetration depth were much greater in the defects filled with the porous titanium implants than in the empty defects. The bone growth followed an approximate logarithmic curve with a greater amount of bone in

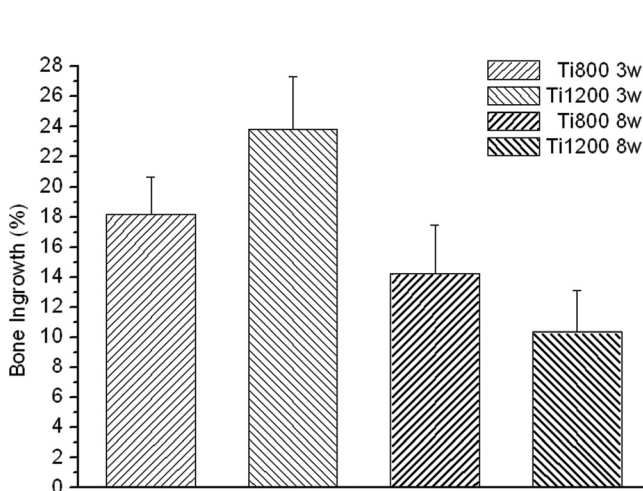


Figure 6. Bone growth inside the rapid prototyped porous titanium implants (Ti800 and Ti1200) after implantation in the femoral epiphysis of rabbits for 3 and 8 weeks.

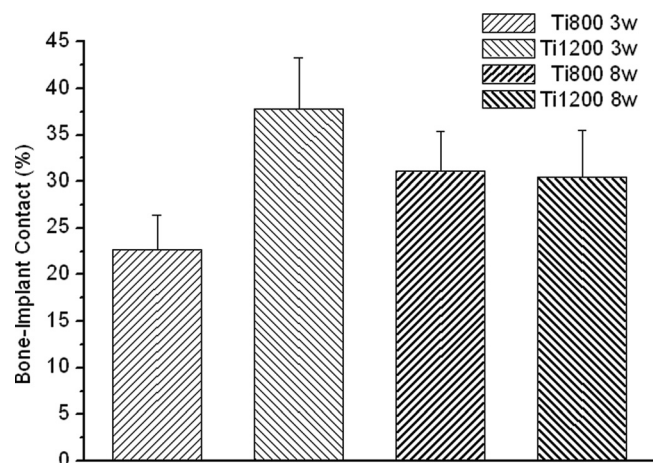


Figure 7. Bone-implant contact of the rapid prototyped porous titanium implants (Ti800 and Ti1200) after implantation in the femoral epiphysis of rabbits for 3 and 8 weeks.

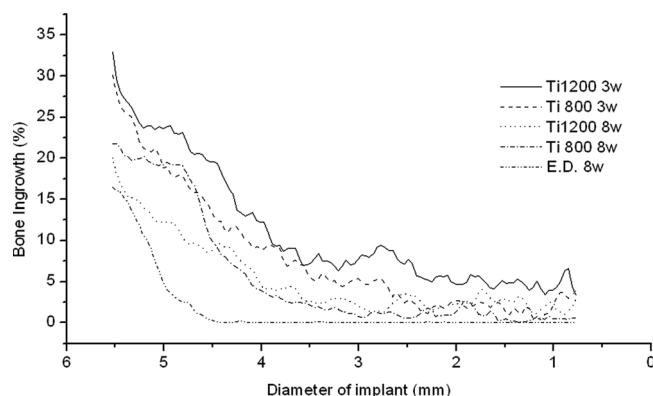


Figure 8. Bone ingrowth in relation to the diameter from the outside to the centre of the rapid prototyped implants with the different pore sizes (Ti800 and Ti1200) and implantation times of 3 and 8 weeks. Bone growth in the empty defects (ED) after implantation for 8 weeks is shown for comparison.

the outer than inner diameters. In both pore sizes, 10% bone ingrowth was found at a penetration distance of 1.5 mm reaching stationary behavior for a penetration distance of more than 2.5 mm. As previously observed, the amount of bone was greater after 3 weeks than after 8 weeks of implantation.

DISCUSSION

Porous titanium implants with designed structures were made using rapid prototyping. The geometry of the implants was well reproduced from the CAD design with excellent accuracy and reproducibility. The implants were designed with an overall porosity of 60% and interconnected pores in 3 dimensions with diameters of 800 and 1200 μm to allow bone ingrowth. The titanium implants had compressive yield strength of around 82 MPa and an elastic modulus of 2.7 GPa, which are closer to those of cortical bone ($\sigma_y = 80\text{--}120$ MPa, $E = 5\text{--}27$ GPa). Compared to the solid material, the mechanical values obtained here are low, but they were high enough to resist handling and loading during the implantation, as already observed by others.^{16,28} One of the current concerns regarding the design of implants is matching the elastic modulus of bone to limit the stress-shielding effect at the bone/implant interface.^{2,3} The low elastic modulus for the porous titanium implants obtained here would certainly reduce the stress-shielding effect under load-bearing applications.

Porous titanium implants have been produced by using powder sintering, plasma-spraying, plotting machines, and DLF of titanium powder.^{10,16,20–22,24,29,30} In these previous studies, as in ours, modulation of pore size, porosity, and mechanical properties is the

aim of the research. Depending on the processing method, the porosity of titanium ranged from 40 to 75% while the compressive strength was in the 160–85 MPa range.

This study showed that bone had grown inside the porous titanium implants providing the implant with a biological fixation on to the skeleton. We did not observe any difference between bone ingrowths for the two sizes of pores Ti800 and Ti1200. This may be explained by the rather large pore diameters used in this study. It has been shown that a minimal pore size of 100 μm is required for allowing body fluid penetration, cell invasion, and bone tissue ingrowth.³¹ Nevertheless, most of the implants biologically tested for bone ingrowth have no reproducible pore structure or sizes.² Biomaterials produced by powder metallurgy approaches do not have a completely interconnected structure, and their pore sizes can be in a wide range.^{5,28,31–33} The porous titanium implants made here do have a reproducible porous architecture and may be used to model bone tissue ingrowth following preferential directions to adapt to biochemical forces. However, our current process does not make it possible to manufacture porous titanium implants with pore sizes smaller than 600 μm . The limiting step is related to the filling of the mould with liquid titanium, but this could be improved using centrifuge casting.^{34,35} We observed that bone ingrowths occurred from the periphery towards the centre and that the penetration depth of bone was higher at 3 weeks than at 8 weeks. This higher bone ingrowth at the early implantation time resulted from the bone healing process. Bone overgrowth is normally observed in the early stages with the production of woven bone. Later, this over production of bone is remodeled by osteoclast and osteoblast cells into a mechanically strong bone according to Wolff's law.³⁶ In our study, similar bone remodeling could take place inside the porous titanium implants. On the other hand, a limited amount of bone was measured, mainly at the periphery of the empty 6 mm defects. These results indicate that a critical-sized bone defect was used and that the porous titanium implants were favorable to bone ingrowth. Furthermore, the titanium implants were cleaned by blasting and etching prior to implantation. These treatments applied to the implants were fast and simple. The surfaces were free of chemical contaminants and presented a roughness that might encourage cell adhesion. As a result, the bone-implant contact values were around 30% and there was no significant difference between the two pore sizes or implantation periods. The bone apposition on to the implants could be greatly enhanced by an osteoconductive surface. This could be achieved by applying a calcium phosphate coating on to the titanium or by chemical treatments that would lead to bioactivity *in vivo*.³⁷ Some works have been carried out to study the effect of surface

treatments on porous materials.^{38–40} Habibovic et al.³⁰ studied porous titanium implants coated and uncoated with octacalcium phosphate with a porosity of 79% in adult Dutch milk goats. The coated implants performed better than the uncoated. The bone contacts after 12 weeks were 31 and 26%, respectively. By using a similar animal model as here, Takemoto et al.¹⁶ have measured the bone growth and bone-implant contact in alkali-treated porous titanium implants or not. After an implantation time of 8 weeks, they found bone ingrowth of $(15.2 \pm 4.9)\%$ and a bone-implant contact of $(17.7 \pm 4.9)\%$ on the alkali-treated implants, for the nontreated implants these quantities were lower, $(9.8 \pm 4.2)\%$ and $(10.2 \pm 2.6)\%$, respectively. In the present study, we have observed comparable values for bone ingrowth while the bone contact values were higher than previously reported for the nontreated implants. Both, the different methods of preparation and histomorphometry analysis might explain the mismatch between the studies. Nevertheless, it is clear that osteoconductive treatments have a positive effect on the bioactivity of implants. In our case, this is shown by sustained osteointegration through the implantation period. The quantity of bone ingrowth and bone-implant contact were comparable to those reported elsewhere but they may still be improved with osteoconductive and bioactive calcium phosphate coatings.

CONCLUSION

The titanium implants with a controlled porous structure and good mechanical and biological properties were produced using a rapid prototyping method. These implants allowed bone ingrowth and apposition in critical-sized bone defects in rabbits. This new manufacturing method opens up the possibility of reconstructing complex-shaped and large bone defects under load-bearing applications. Even if only two pore sizes were evaluated, this method permits to combine different pore sizes to obtain a graded implant with an anatomical shape and their biological properties could be improved by including the patient's own bone marrow cells or a calcium phosphate coating on it.

The authors are also grateful to the CTTM. Mr Lopez-Heredia thank Mr. Hamon for his invaluable help.

References

- Brettle J. A survey of the literature on metallic surgical implants. *Injury* 1970;2:26–39.
- Ryan G, Pandit A, Apatsidis DP. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. *Biomaterials* 2006;27:2651–2670.
- Park JB, Lakes RS. *Biomaterials: An Introduction*. New York: Plenum; 1992. 394 pp.
- Fujibayashi S, Neo M, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials* 2004;25:443–450.
- Thieme M, Wieters KP, Bergner F, Scharnweber D, Worch H, Ndop J, Kim TJ, Grill W. Titanium powder sintering for preparation of a porous functionally graded material destined for orthopaedic implants. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12:225–231.
- Shen H, Oppenheimer SM, Dunand DC, Brinson LC. Numerical modeling of pore size and distribution in foamed titanium. *Mech Mater* 2006;38:933–944.
- Werner CML, Jacob HAC, Ramseier LE, Favre P, Exner GU. Uncemented short-length diaphyseal segmental replacement prosthesis fixation—Finite element analysis and long-term results. *J Orthop Res* 2005;23:1065–1072.
- Shen H, Brinson LC. Finite element modeling of porous titanium. *Int J Solids Struct* 2007;44:320–335.
- Li JP, Li SH, Van Blitterswijk CA, de Groot K. A novel porous Ti6Al4V: Characterization and cell attachment. *J Biomed Mater Res A* 2005;73:223–233.
- Dunand DC. Processing of titanium foams. *Adv Eng Mater* 2004;6:369–376.
- Reclaru L, Eschler P-Y, Lerf R, Blatter A. Electrochemical corrosion and metal ion release from Co-Cr-Mo prosthesis with titanium plasma spray coating. *Biomaterials* 2005;26:4747–4756.
- Petsatodes GE, Christoforides JE, Papadopoulos PP, Christodoulou AG, Karataglis D, Pournaras JD. Primary total-hip arthroplasty with the autophor 900-S fully porous coated stem in young patients: Seven to seventeen years of follow-up. *J Arthroplasty* 2005;20:436–442.
- Moskal JT, Jordan L, Brown TE. The porous-coated anatomic total hip prosthesis: 11- to 13-year results. *J Arthroplasty* 2004;19:837–844.
- Kendrick JB, II, Noble PC, Tullos HS. Distal stem design and the torsional stability of cementless femoral stems. *J Arthroplasty* 1995;10:463–469.
- Mow CS, Wiedel JD. Revision total knee arthroplasty using the porous-coated anatomic revision prosthesis: Six- to twelve-year results. *J Arthroplasty* 1998;13:681–686.
- Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Suzuki J, Kokubo T, Nakamura T. Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. *Biomaterials* 2005;26:6014–6023.
- Wehmoller M, Eufinger H, Kruse D, Massberg W. CAD by processing of computed tomography data and CAM of individually designed prostheses. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1995;24(1, Part 2):90–97.
- Guyuron B, Ross RJ. Computer-generated model surgery. An exacting approach to complex craniomaxillofacial disharmonies. *J Craniomaxillofac Surg* 1989;17:101–104.
- Singare S, Dichen L, Bingheng L, Yanpu L, Zhenyu G, Yaxiong L. Design and fabrication of custom mandible titanium tray based on rapid prototyping. *Med Eng Phys* 2004;26:671–676.
- Li JP, de Wijn JR, Van Blitterswijk CA, de Groot K. Porous Ti6Al4V scaffold directly fabricating by rapid prototyping: Preparation and in vitro experiment. *Biomaterials* 2006;27:1223–1235.
- Hollander DA, von Walter M, Wirtz T, Sellei R, Schmidt-Rohlfing B, Paar O, Erli HJ. Structural, mechanical and in vitro characterization of individually structured Ti-6Al-4V produced by direct laser forming. *Biomaterials* 2006;27:955–963.
- Wehmöller M, Weihe S, Rasche C, Scherer P, Eufinger H. CAD/CAM-prefabricated titanium implants for large skull defects-clinical experience with 166 patients from 1994 to

2000. In: Lemke HU, Inamura K, Doi K, Farman AG, Vannier MW, Reiber JHC, editors. CARS 2004; Chicago, USA: Elsevier B.V. pp 667–672.
23. Osakada K, Shiomi M. Flexible manufacturing of metallic products by selective laser melting of powder. *Int J Mach Tool Des Res* 2006;46:1188–1193.
 24. St-Pierre JP, Gauthier M, Lefebvre LP, Tabrizian M. Three-dimensional growth of differentiating MC3T3-E1 pre-osteoblasts on porous titanium scaffolds. *Biomaterials* 2005;26:7319–7328.
 25. Citeau A, Guicheux J, Vinatier C, Layrolle P, Nguyen TP, Pilet P, Daculsi G. In vitro biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid blasting. *Biomaterials* 2005;26:157–165.
 26. Russell HK, Jr. A modification of Movat's pentachrome stain. *Arch Pathol* 1972;94:187–191.
 27. S. Malinov S, Sha W, Guo Z, Tang CC, Long AE. Synchrotron X-ray diffraction study of the phase transformations in titanium alloys. *Mater Char* 2002;48:279–295.
 28. Wen CE, Mabuchi M, Yamada Y, Shimojima K, Chino Y, Asahina T. Processing of biocompatible porous Ti and Mg. *Scr Mater* 2001;45:1147–1153.
 29. Bram M, Laptev A, Buchkremer HP, Stöver D. Application of powder metallurgy for the production of highly porous functional parts with open porosity. In: Nie JF, Barnett M, editors. *Materials Forum*, Melbourne, Australia, December 2005. pp 119–122.
 30. Habibovic P, Li J, van der Valk CM, Meijer G, Layrolle P, van Blitterswijk CA, de Groot K. Biological performance of uncoated and octacalcium phosphate-coated Ti6Al4V. *Biomaterials* 2005;26:23–36.
 31. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005;26:5474–5491.
 32. Kim HM, Kokubo T, Fujibayashi S, Nishiguchi S, Nakamura T. Bioactive macroporous titanium surface layer on titanium substrate. *J Biomed Mater Res* 2000;52:553–557.
 33. Kienapfel H, Sprey C, Wilke A, Griss P. Implant fixation by bone ingrowth. *J Arthroplasty* 1999;14:355–368.
 34. Ping WS, Rong LD, Jie GJ, Yun LC, Qing SY, Zhi FH. Numerical simulation of microstructure evolution of Ti-6Al-4V alloy in vertical centrifugal casting. *Mater Sci Eng A* 2006;426:240–249.
 35. Watanabe K, Miyakawa O, Takada Y, Okuno O, Okabe T. Casting behavior of titanium alloys in a centrifugal casting machine. *Biomaterials* 2003;24:1737–1743.
 36. Frost HM. A 2003 update of bone physiology and Wolff's Law for clinicians. *Angle Orthod* 2004;74:3–15.
 37. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 2006;27:2907–2915.
 38. Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Suzuki J, Matsushita T, Kokubo T, Nakamura T. Osteoinductive porous titanium implants: Effect of sodium removal by dilute HCl treatment. *Biomaterials* 2006;27:2682–2691.
 39. Sul YT, Johansson C, Byon E, Albrektsson T. The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive titanium implants. *Biomaterials* 2005;26:6720–6730.
 40. Spoerke ED, Murray NG, Li H, Brinson LC, Dunand DC, Stupp SI. A bioactive titanium foam scaffold for bone repair. *Acta Biomater* 2005;1:523–533.

Author Proof

Chapitre 2. Discussion

Des implants en titane poreux avec des structures définies ont été fabriqués par prototypage rapide. La géométrie des implants a été bien reproduite par rapport au modèle réalisé par conception assistée par ordinateur (CAD), avec une bonne précision et une bonne reproductibilité. Les implants ont été conçus avec une porosité générale de 60 % et des pores, interconnectés en trois dimensions avec un diamètre de 800 et 1200 μm afin de permettre la repousse osseuse. Ces implants ont eu une valeur de résistance à la contrainte mécanique autour de 82 MPa et un module d'élasticité de 2.7 GPa, ce qui est proche des valeurs de l'os cortical ($\sigma_y = 80\text{-}120$ MPa, $E = 5\text{-}27$ GPa). Si on le compare au titane solide, les propriétés mécaniques obtenues dans notre cas sont beaucoup plus faibles, mais elles restent suffisantes pour des applications sous charge corporelle en orthopédie ou en chirurgie dentaire [45, 139].

Comme nous l'avons décrit dans le Chapitre I, un des problèmes actuels des implants massifs en titane est l'effet du cisaillement à l'interface os-implant [36, 124]. Il a été montré par modélisation par éléments finis que des implants en titane poreux présentent un module d'élasticité plus proche de celui de l'os. Cette diminution du module de Young pourrait certainement réduire l'effet de cisaillement à l'interface os-implant. Des implants poreux en titane ont été fabriqués par différentes méthodes. On peut citer le frittage de poudres, la projection par torche plasma, l'extrusion à travers une aiguille d'une barbotine de titane, la fusion de poudre par laser (DLF) [45, 50, 52, 62, 63, 129, 137, 140]. Dans ces différents procédés, la difficulté est le contrôle de la géométrie et de la porosité des implants tout en conservant des propriétés mécaniques suffisantes pour des applications sous charge corporelle. Selon la méthode de fabrication, la porosité du titane varie de 40 à 75 % et la contrainte mécanique de 160 à 80 MPa. Cependant, la plupart des implants en titane poreux fabriqués par ces méthodes ne possèdent pas une structure de pore ou une taille de pore reproductibles [36]. Les implants en titane produits par la métallurgie des poudres ne présentent pas une structure complètement interconnectée, et la taille de leurs pores peuvent être compris dans une échelle assez large [37, 46, 47, 139, 141].

Cette étude a montré que la repousse osseuse s'effectue au sein de la structure poreuse du titane. Le tissu osseux cicatrise au cœur de l'implant en titane permettant ainsi une fixation biologique au squelette. Nous n'avons observé aucune différence de repousse osseuse entre

les deux tailles de pores, 800 ou 1200 μm . Cela s'explique probablement par la taille des pores relativement grande utilisés dans cette étude. Il a été précédemment montré que la taille des pores doit être comprise entre 100 et 600 μm pour permettre la perméabilité des fluides biologiques, l'invasion cellulaire, la repousse osseuse et la vascularisation [37]. A ce jour, notre procédé ne permet pas l'obtention de titane poreux ayant des pores de diamètre inférieur à 600 μm . Cette limitation est liée au remplissage du moule avec du titane liquide. Cependant, cette méthode de fabrication reste perfectible et pourrait être améliorée par la coulée de titane sous force centrifuge [142, 143]. Le procédé actuel permet toutefois de contrôler précisément la porosité dans les 3 dimensions en créant des gradients de pores ou en fermant certains axes pour ajuster la structure interne des implants aux contraintes mécaniques de l'application visée.

Nous avons observé que la repousse osseuse s'effectuait de la périphérie de l'implant vers le centre. La profondeur de pénétration de l'os était plus importante à 3 semaines qu'à 8 semaines (5,5 mm avec 5 % de repousse osseuse *versus* 4,5 mm avec 2,5% de repousse osseuse). Cette repousse osseuse plus abondante initialement résulte de la production d'un tissu osseux immature. Ce tissu de cicatrisation est ensuite remodelé par l'action concertée des cellules ostéoclastiques et ostéoblastiques en un os plus résistant mécaniquement selon la loi de Wolff [144]. Nous pensons que dans notre étude, un remodelage osseux similaire aurait pu avoir eu lieu dans les implants poreux en titane.

Dans le groupe contrôle correspondant aux défauts de 6 mm laissés vides, la repousse osseuse était limitée à la périphérie, 0% de repousse osseuse à 1,5 mm de pénétration. Par contre, la repousse osseuse avait pénétré beaucoup plus profondément dans les implants en titane. Ce résultat indique que nous avons utilisé une taille critique pour le défaut osseux et que les implants en titane poreux favorisent la cicatrisation osseuse par un effet d'échafaudage. De plus, les implants en titane poreux présentaient une surface micro rugueuse qui peut encourager l'adhésion cellulaire. Les résultats indiquent une valeur de contact os-implant autour de 30%. Nous n'avons pas observé de différence significative pour d'apposition osseuse entre les deux tailles de pores utilisées ou les deux délais d'implantation. L'apposition de l'os sur les implants peut être améliorée par une surface ostéoconductrice comme les revêtements de phosphate de calcium ou par des traitements chimiques qui peuvent rendre la surface bioactive *in vivo* [85]. Quelques travaux ont été réalisés pour étudier l'effet de ces

traitements de surface sur les matériaux poreux [41, 145, 146]. Habibovic *et al* [52] ont étudié la repousse osseuse dans des implants en titane de porosité élevée (80%) revêtus et non revêtus avec du phosphate octocalcique chez la chèvre. Dans cette étude, les implants revêtus montrent de meilleurs résultats que ceux non revêtus. Le contact osseux après 12 semaines a été de 31 et 26 %, respectivement. En utilisant un même modèle animal que celui présenté ici, Takemoto *et al* [45] ont mesuré la repousse osseuse et le contact os-implant sur des implants en titane poreux traités ou non avec de la soude. Après une période d'implantation de 8 semaines, ils ont trouvé une valeur de repousse osseuse de 15.2 ± 4.9 % et une valeur de contact os-implant de 17.7 ± 4.9 % sur les implants traités avec de la soude. Dans le cas des implants non traités, les valeurs ont été plus basses, 9.8 ± 4.2 % et 10.2 ± 2.6 %, respectivement. Dans l'étude présentée ici, nous avons observé des valeurs comparables pour la repousse osseuse alors que nos valeurs de contact os-implant sont plus élevées que pour celles mentionnées antérieurement pour les implants non traités. Cette différence peut être expliquée par les différentes méthodes de préparation des échantillons et par une méthode différente d'analyse histomorphométrique.

Il serait intéressant d'évaluer la repousse osseuse et le contact os-implant dans ce même modèle avec des implants en titane poreux bioactifs, par exemple, revêtus de phosphate de calcium. Des mesures biomécaniques permettraient également de démontrer un meilleur ancrage des implants en titane poreux revêtus de phosphate de calcium par rapport à des implants non poreux ou non revêtus.

Chapitre 3

The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existing.

Albert Einstein

Traitements de surface bioactifs sur implants en titane

Article 2: M.A. Lopez-Heredia, G. Legeay, C. Gaillard, and P. Layrolle. **Radio frequency plasma treatments on Ti samples for bioactivity enhancement.** *Acta Biomaterialia* (Soumis avec corrections après révision)

Article 3: M.A. Lopez-Heredia, P. Weiss and P. Layrolle. **An electrodeposition method of calcium phosphate coatings on titanium alloy.** *J Mater Sci: Mater Med* 18 2007, p 381-390

Chapitre 3. Introduction

Le titane est très utilisé pour des applications orthopédiques et dentaires grâce à ses propriétés mécaniques et sa biocompatibilité mais il ne possède pas de bioactivité pour permettre une apposition directe du tissu osseux [5, 22]. Le titane et ses alliages présentent une couche de passivation de TiO_2 d'une épaisseur de quelques nanomètres [24, 25, 147]. Cette couche lui confère sa biocompatibilité. Si le titane est traité chimiquement et/ou thermiquement [145, 148-150] ou revêtu avec du phosphate de calcium (PCa) [52, 151] sa bioactivité et son ostéoconduction peuvent être améliorées [34, 152]. Les PCa sont des matériaux bioactifs. Grâce à des processus de dissolution-précipitation ces matériaux forment une union directe avec le tissu osseux [122]. Toutefois, ces matériaux demeurent fragiles et ne peuvent pas être utilisés pour des applications sous charge, au contraire du titane. Plusieurs méthodes de revêtement du PCa ont été appliquées au titane comme la projection d'hydroxyapatite par torche à plasma, l'électrodéposition et la précipitation biomimétique [52, 153, 154]. Ces techniques cherchent à combiner la haute résistance du titane avec la bioactivité et l'ostéoconductivité du phosphate de calcium [155-159]. La méthode de la torche à plasma peut créer des revêtements d'hydroxyapatite d'une épaisseur de 40 à 50 μm . Ces revêtements sont largement utilisés dans des cas cliniques pour la fixation biologique de prothèses orthopédiques non cimentées. Néanmoins, les hautes températures de cette méthode peuvent affecter la structure du titane et l'homogénéité du revêtement d'hydroxyapatite [160-162]. Nonobstant, les traitements plasma sont très utilisés pour modifier les propriétés tribologiques des surfaces [163-166]. La surface du titane peut être modifiée par des procédés d'implantation ionique [164-170]. Mändl *et al* [171, 172] ont utilisé une technique d'implantation d'oxygène par plasma afin de créer une couche de rutile en surface des implants en titane. Ils ont démontré que cette technique pouvait améliorer la biocompatibilité, le contact os/implant et l'ancrage mécanique pour les échantillons traités. Dans ce chapitre, nous avons étudié deux méthodes visant à améliorer la bioactivité du titane: l'effet du traitement par plasma radio fréquence dans différents gaz et l'électrodéposition de revêtements de phosphate de calcium.

La formation de revêtements du PCa sur les surfaces en titane peut être réalisée par un procédé biomimétique. Cette méthode de revêtement consiste à immerger les implants dans des solutions physiologiques sursaturées de type 'simulated body fluids' (SBF) [52, 84]. Les propriétés physico-chimiques de la surface sont primordiales pour induire la nucléation

hétérogène et la croissance de revêtements de PCa à partir de ces solutions [85, 173]. Le traitement plasma par Radio Fréquence (RF) permet d'introduire sur la surface des groupes chimiques pouvant augmenter la mouillabilité et ainsi favoriser la précipitation de PCa. Cette méthode utilise des champs électriques à haute fréquences entre deux électrodes pour générer un plasma gazeux. Les espèces radicalaires et ioniques générés par ce plasma peuvent réagir avec l'oxyde de titane. Ces modifications chimiques de la surface peuvent affecter la vitesse de nucléation de cristaux de PCa sur le titane et ainsi améliorer sa bioactivité *in vitro* aussi bien qu'*in vivo*.

L'électrodéposition de PCa sur le titane est réalisée à partir de solutions sursaturées aux températures ambiantes. Un courant électrique est appliqué entre l'implant en titane et une contre électrode afin d'accélérer la précipitation de PCA sur la surface en titane. Ban *et al* [93] ont étudié l'effet de la température et le temps de déposition sur des éprouvettes en titane immergées dans une solution physiologique (SBF) sous un voltage de -2 V contre une électrode saturée de calomel (SCE). Ils ont également étudié la microstructure des revêtements obtenus avec des températures entre 52 et $92\text{ }^{\circ}\text{C}$ et deux densités de courant (1.3 et 12.9 mA/cm^2) dans une solution SBF sans les ions Mg^{2+} , K^{+} et HCO_3^{-} [94]. L'étude de la régulation morphologique et la croissance cristalline des revêtements sur le titane a été étudiée en utilisant des températures entre 90 et $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, des densités de courant variant de 5 à 25 mA/cm^2 , un temps de déposition de 10 à 120 minutes et dans une solution sans ions Mg^{2+} , K^{+} et HCO_3^{-} [92]. Rößler *et al* [98] ont réalisé des études en utilisant un électrolyte de CaCl_2 et de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ et avec des densités de courant entre -0.5 à -10 mA/cm^2 avec une durée de 5 secondes à 60 minutes. L'effet de la pression sur le processus d'électrodéposition a été aussi étudié [95, 100, 174].

Dans un premier article, nous avons étudié l'effet des traitements plasma de RF sur la précipitation de cristaux de PCa par immersion dans une solution supersaturée de PCa (CPS). Les surfaces ont été caractérisées après un traitement alcalin et un traitement plasma de RF sous différentes atmosphères. La bioactivité a été évaluée en mesurant l'uniformité, l'épaisseur, la composition et la cristallinité des revêtements obtenus après immersion de ces surfaces dans une solution CPS.

Dans un second article, nous avons recherché les conditions optimales pour obtenir des revêtements de PCa sur le titane par électrodéposition. L'effet de la température de

l'électrolyte, la densité de courant, le temps de déposition et les concentrations des ions Mg^{2+} et HCO_3^- dans la solution CPS ont été étudiés.

Les surfaces et/ou les revêtements de PCa ont été analysés en utilisant la Microscopie Electronique à Balayage (SEM), l'Analyse d'Energie Dispersée des Rayons-X (EDX), la Diffraction de Rayons X (XRD), la Microscopie à Force Atomique (AFM) et la Microscopie de Photoélectrons de Rayons-X (XPS).

M.A. Lopez-Heredia, G. Legeay, C. Gaillard, and P. Layrolle. **Radio frequency plasma treatments on Ti samples for bioactivity enhancement.** *Acta Biomaterialia* (Soumis avec corrections après révision)

Radio frequency plasma treatments on titanium for enhancement of bioactivity

M.A. Lopez-Heredia¹, G. Legeay², C. Gaillard³, and P. Layrolle^{1,*}

¹ INSERM, U791, Laboratoire d'Ingénierie Ostéoarticulaire et Dentaire, Faculté de chirurgie dentaire, Université de Nantes, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes, France.

² Centre de Transfert de Technologies du Mans, 20 Rue Thalès de Milet, 72000 Le Mans, France.

³ INRA, Laboratoire de Microscopie, Plateforme RIO BIBS, Biopolymères, Interactions, Assemblages, Rue de la Géraudière, 44316 Nantes, France.

*** Corresponding author:** Prof. Pierre Layrolle, Inserm U791, Nantes

Tel: +33 2 40 41 29 20 ext. 2178; Fax: +33 2 40 08 37 12;

E-mail: pierre.layrolle@univ-nantes.fr

Abbreviated title for headline: RF Plasma treatments on Ti

Original Manuscript submitted to the journal: Acta Biomaterialia

Date of submission: December 3, 2007

Revised manuscript: April 14, 2008

Abstract

Titanium and its alloys, when treated in alkali solutions, are able to form calcium phosphate coatings on their surface after immersion in supersaturated solutions. In this study, the surfaces of titanium alloy discs were modified by an alkali treatment and a radio frequency (RF) plasma procedure (150 W and 13.56 MHz) in N₂, CO₂ or N₂/O₂ (80/20 %) atmospheres. After the alkali treatment, AFM showed differences in the surface roughness of the samples. XPS analyses indicated that the chemical composition of the surfaces changed after the different alkali and RF plasma treatments. The contact angles were also modified, making the original titanium surface more hydrophilic $\sim 5^\circ$. Immersion in a supersaturated calcium phosphate (CPS) solution was used to evaluate the bioactivity of the RF plasma-treated samples *in vitro*. Alkali-treated samples gave more homogeneous and thick coatings than those without alkali treatment. The use of RF plasma treatments enhanced the bioactivity of the samples, in particular for treatments performed in N₂ or N₂/O₂ atmospheres. EDX analysis indicated that coatings had Ca/P ratios between the values of octacalcium phosphate and hydroxyapatite. XRD confirmed the presence of these two phases in most of the coatings. This study shows that an RF plasma treatment enhanced the bioactivity of titanium surfaces.

Keywords: Titanium; radio frequency plasma; bioactivity; calcium phosphate coating.

1. Introduction

Titanium is mechanically and chemically suitable for being used in orthopedic devices or dental implants, but it lacks the bioactivity needed for bonding to bone tissue [1, 2]. Different surface treatments have been developed to improve the bioactivity and osteoconductivity of titanium implants [3, 4]. For instance, osteoconductive calcium phosphate (CaP) coatings have been applied to titanium by several methods such as plasma spraying, electrochemical methods and biomimetic precipitation [5-7]. The biomimetic method allows the deposition of CaP coatings on titanium surfaces after immersion of samples in simulated body fluids [7, 8]. This ability to deposit CaP coatings on titanium is related to the physical and chemical properties of the surface [9, 10]. Several physical, chemical and/or heat treatments have been used for the purpose of enhancing the precipitation of CaP, and hence the bioactivity of titanium implants [11]. Plasma treatments, such as energetic ion implantation, are well used to modify the surface tribological properties of titanium [12-15]. By using high energy plasma, ions can be introduced into a titanium surface and/or coatings can be prepared by modifying the properties of the target surface [13, 15-19]. Mändl *et al* [20, 21] used a plasma immersion ion implantation technique to create a rutile surface layer by introducing oxygen. They showed that this technique was capable of improving the biocompatibility and bone implant contact of the titanium treated samples, as measured by a pull-out test of the implants from the site of implantation. Radio Frequency (RF) plasma treatment is a low-temperature plasma technique that uses a high radio frequency electric field between two electrodes to generate ionized gas plasma. RF plasma treatments modify the immediate surface region, i.e. less than 10 – 50 nm. We hypothesize that the RF plasma treatment may modify surface composition by introducing chemical groups on to the titanium, increase surface wettability, and hence encourage the heterogeneous nucleation and growth of CaP

crystals from supersaturated solutions. This surface modification may enhance the bioactivity of titanium implants both *in vitro* and *in vivo*.

The aim of this work was to study the effects of RF plasma treatments on the precipitation of CaP crystals by immersion in a supersaturated CaP solution (CPS). After alkali and RF plasma treatments in different atmospheres, the titanium surfaces were analyzed by means of Scanning Electron Microscopy (SEM), Atomic Force Microscopy (AFM), Energy Dispersive X-Ray analysis (EDX), X-ray Diffraction (XRD) and X-Ray Photoelectron Microscopy (XPS). Bioactivity was evaluated by measuring the uniformity of the coating, thickness and composition, and crystallinity after immersion in CPS solution.

2. Materials and Methods

2.1. Titanium discs

Titanium alloy discs (Ti6Al4V, ALTA Industries, France) measuring 15 mm in diameter and 1 mm thick machined from a bar were used to perform the experiments. The discs were ultrasonically cleaned in acetone, ethanol and demineralized water for 15 minutes and dried in a furnace at 90 °C overnight. Two groups of discs were used. The first group had a chemical treatment in NaOH 5 M for 24 h at 60 °C (TiNa) and for the second group no-NaOH treatment was performed at all (Ti).

2.2. RF Plasma treatments

After cleaning and NaOH treatments, two discs from each group were then subjected to an RF plasma treatment in a capacitively-coupled plasma configuration (PM1820, Bronson, USA) in N₂, CO₂ or N₂/O₂ (80/20%) atmospheres with operating conditions of 150 W, 13.56 MHz, 10 eV and 0.5 Torr. for a period of 10 minutes. After this treatment, the sample temperature was

approximately 100 °C. Two discs from each group did not receive RF plasma treatment at all for comparison purposes within their groups.

2.3. Calcium Phosphate Solution (CPS)

The bioactivity of the treated titanium was measured by immersing the samples in a CPS solution. The CPS solution was prepared by dissolving given amounts of NaCl (8 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.59 g; 4 mM), and $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.36 g; 2 mM) (VWR, France), in demineralized water and buffered at pH 7.4 with Tris (hydroxymethyl amino methane) (6.05 g, 50 mM) and drops of HCl 1 M. Each sample was immersed in 50 ml of CPS and kept in an incubator at 37 °C for 15 days. The solution was changed every 2 days. After immersion, samples were delicately rinsed with water and air-dried, before being characterized. The ability of the treated titanium surfaces to precipitate a CaP coating was determined by measuring the uniformity and thickness of the coatings.

2.4. Characterization of the surfaces

The surface roughness of the samples was measured using a mechanical profilometer (SJ-201M, Mitutoyo). Lengths of 0.8 mm were measured five times to obtain a sampling length of 4 mm. Surface roughness was measured 3 times on each sample. Atomic force microscopy (AFM) was also used to characterize the microtopography of the samples with or without alkali treatment. AFM images were acquired in air using an Autoprobe CP Park Scientific Instrument (Sunnyvale, CA). AFM images were recorded using tapping mode and conventional pyramidal silicon nitride cantilevers obtained from Digital Instruments (Santa Barbara, CA). All the tapping mode images (both amplitude and topography images) were acquired at a stable scanning force of around 100 nN. The contact angles (Digidrop, GBX) were measured in dynamic mode, using demineralized

water. After the RF treatments, three measurements taken a few minutes apart were performed per sample. Contact angles were also measured after 24 hours and 7 days on the different samples. The contact angle values did not differ significantly over time. The composition of the surface was analyzed with X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS, Leybold LHS 12), using an Mg source at 12 kV, 10 mA (120 W) and an operating pressure of 2×10^{-8} mbar. XPS was performed at the University of Nantes IMN-CNRS, and the data was analyzed with a SpecLab data system. Scanning electron microscopy (SEM, Leo 1450VP), Energy Dispersive X-Ray analysis (EDX, Oxford Instruments) and X-Ray Diffraction analysis (XRD, PW1830 Philips), were performed in order to characterize the composition and crystallinity of the titanium surfaces before and after immersion in CPS.

The uniformity of the CaP coatings was measured using back-scattered electron microscopy (BSEM) images and image processing software (Adobe Photoshop, Adobe Systems Inc.). The uniformity of the coating was determined from 6 images of each sample and expressed as a percentage. The thickness of the coatings was measured using the Eddy current method (Surfix, Phynix). Before measuring the thickness, the probe was calibrated by measuring a sample without coating and calibrated plastic films on this reference. Coating thickness was averaged using 5 measures per sample.

3. Results

After alkali treatment, the Ti6Al4V discs turned green in color, with diffraction fringes indicating thickening of the titanium oxide layer, as previously observed [4, 9]. Fig. 1 shows the microstructure and microanalysis of the Ti6Al4V discs with and without alkali treatment, TiNa and Ti, respectively. Prior to alkali treatment, the surface presented machining marks whereas it was covered in an oxide layer after the treatment. EDX spectra demonstrated the presence of

sodium after alkali treatment. Table 1 presents the surface roughness and contact angle values measured for the samples after the different conditions. The average surface roughness (R_a) values remained around $0.6\ \mu\text{m}$ independent of the different conditions (alkali and/or RF plasma treatments). However, when considering microscopic roughness using AFM (Fig. 2), the microstructure changed after the alkali-treatment (TiNa). The surface roughness measured by AFM for Ti and TiNa was on average 2 and 8 nm, respectively (Fig. 2f). The bulk composition of the samples with (TiNa) or without alkali treatment (Ti) did not change, as shown in the XRD spectra for the samples (Fig. 3). When comparing the two XRD spectra, both the intensity and position of the diffraction lines were similar and typical of alpha-beta Ti6Al4V titanium alloy (JCPDS cards 00-044-1288 and 00-044-1294). By comparing surface composition (Table 2), XPS analysis indicated the presence of sodium, an increase in oxygen and a decrease in carbon contamination after the alkali treatment (TiNa). As reported in Table 1, the alkali treatment drastically decreased the contact angle value of the titanium, making the surface more hydrophilic.

Samples were also treated with RF plasma in N_2 , CO_2 and N_2/O_2 atmospheres. As expected, the average surface roughness was not affected by these treatments and remained around $0.6\ \mu\text{m}$ (Table 1). However, the contact angle values significantly decreased from 67° to 5° , 15° and 18° after RF treatment of Ti samples in N_2 , CO_2 and N_2/O_2 atmospheres, respectively. Similarly, TiNa samples had lower contact angle values after plasma treatment than before, suggesting that hydrophilic groups had been introduced on to the surfaces. XPS analysis corroborated these results, as the surface composition changed after the different treatments (Table 2). When Ti samples were treated with RF plasma, the amount of carbon decreased and the oxygen and titanium increased on the surface. Semi-quantitative XPS analysis indicated the opposite for the TiNa samples with an increase in carbon and a decrease in oxygen and titanium. XPS spectra

(Fig. 4 and 5) revealed that the chemical composition of the surface had changed in relation to the RF plasma treatments. Fig. 4 shows the Ti2p, O1s and C1s curves for the Ti samples. Peaks for Ti2p located at 458 and 464 eV corresponded to the TiO₂ oxide layer. There were no detectable changes in the chemical environment of the titanium after the different RF plasma treatments. The O1s peaks located at 530 and 532 eV were attributed to O-Ti chemical bonds in TiO₂ and O-C in organic compounds, respectively. Once again, there were no major differences in peak positions and intensities for oxygen between the groups. We noticed only a slight shift to low energy and a lower intensity of the C-O peak for samples treated in an N₂ atmosphere. This shift in peak position suggested a change in the chemical environment of the oxygen. The peaks for the C1s curves at 284, 286 and 288 eV were assigned to C-H, C-O and C=O chemical bonds, respectively. The C=O peak at 288 eV diminished after RF plasma treatment in N₂/O₂ and N₂, while it was higher after treatment in a CO₂ atmosphere in comparison to the untreated titanium surface. Fig. 5 shows the Ti2p, Na1s, O1s and C1s spectra for the TiNa samples. Here, carbon was more abundant after the RF plasma treatment. As previously observed, the Ti2p peaks located at 457, 458 and 464 eV corresponding to Ti-O in the TiO₂ oxide layer were detected. No differences in either the position or the intensities of these peaks could be observed after the different plasma treatments. The peak for Na1s located at 1072 eV was observed in all alkali and RF plasma-treated groups. The peaks for C1s were centered at 285, 286 and 289 eV and corresponded to C-H, C-O and C=O, respectively. We observed an increase in the C-O peak located at 286 eV in the RF plasma-treated samples in comparison to TiNa. There were, however, no significant differences in the position and intensity of the O1s peaks between the different sample groups.

Bioactivity was assayed after the different treatments by soaking the titanium samples in supersaturated calcium phosphate solution (CPS). In all cases, SEM observation at high

magnification showed a coating with a flake-like morphology. Ti samples after RF plasma treatment and immersion in the CPS solution are shown in Fig. 6. For the Ti samples, the uniformity of the coatings was in the following order, from least to most: Ti, Ti+N₂/O₂, Ti+N₂ and Ti+CO₂. These observations were corroborated by measuring the uniformity and thickness of the coatings (Table 3). The CO₂ RF plasma treatment produced the most uniform, but thinnest, CaP coatings on the Ti samples. Fig. 7 presents the TiNa samples after immersion in the CPS solution. At this point, it can be seen that there was an evident benefit from the alkali treatment on the titanium. All the TiNa samples formed a homogeneous and thick CaP coating, regardless of the atmosphere used during the RF plasma treatment. These observations were confirmed by XRD analysis (Fig. 8 and 9) of titanium (Ti) and alkali-treated titanium (TiNa) after the different RF plasma treatments and immersion in CPS for 15 days. On both the Ti and TiNa substrates, poorly crystallized apatite was observed. The diffraction lines were typical of HA (JCPDS 009-0432). Corroborating the uniformity and thickness measurements (Table 3), XRD patterns indicated the presence of titanium substrate (JCPDS 044-1294 and 044-1288) in all samples without alkali and with RF plasma treatment (Fig. 8). The relative intensity of the HA and titanium peaks was higher for samples treated in CO₂ gas than for others. Fig. 9 did not show the peaks of titanium substrate but only those of the CaP coating as all the TiNa samples were fully covered with a thick coating. In addition to HA peaks, the XRD patterns in both the CO₂ and N₂/O₂ groups revealed the presence of an OCP phase (JCPDS 026-1056) with the 100% I/I₀ peak located at 4.8° in 2theta. As shown in Table 3, the Ca/P ratios measured by EDX were between those of OCP (1.33) and stoichiometric HA (1.67). These low Ca/P ratios indicate that a calcium deficient apatite (CDA), and in some cases OCP, had formed on the titanium substrates.

4. Discussion

Both the RF plasma and alkali treatments were shown to be effective for enhancing the bioactivity of titanium as evidenced by the formation of a uniform and thick CaP coating after immersion in a CPS solution (Fig. 6 and 7). There are numerous physical and chemical surface properties that encourage the heterogeneous nucleation of CaP nuclei on titanium [3, 22-24]. As previously reported by others, the alkali treatment makes the surface more hydrophilic [25]. We also found that the alkali treatment decreased the contact angle value, and thus increased the hydrophilicity of the titanium surface. It has been shown that surface hydrophilicity encourages heterogeneous nucleation of CaP nuclei on titanium [23, 24]. In the present study, we noticed that the CaP coatings were more uniform and thick on the alkali-treated titanium than on the less hydrophilic untreated Ti (Table 3, Fig. 6 and 7). The RF plasma treatments also reduced the contact angle values of the Ti and TiNa substrates by a significant amount, been more drastically reduced for the Ti samples (Table 1). Consequently, the CaP coatings were more uniform and thick on those substrates. The present results corroborated previous reports about the positive effect of surface energy on heterogeneous nucleation [23, 24]. Another factor that can influence nucleation is chemical groups on the surface. Chemical groups such as OH, COOH and NH₂ on the surface have been shown to encourage the chelating of Ca²⁺ and HPO₄²⁻ ions, and thus enhance the heterogeneous nucleation of CaP.

Using the RF plasma technique produced energy of around 10 eV. This energy was not sufficient to produce major ion implantation on the titanium surface. The gas RF plasma behaves more like a gas discharge, forming radicals and ionized species. These reactive species are considered unstable and will rapidly evolve along different routes. The radicals may recombine between themselves or react with the atmosphere (air, oxygen, carbon dioxide) in the chamber, forming stable chemical groups. These reactive species may collide with the titanium surface, thus

modifying the surface composition, which basically affects the oxygen and carbon bonds at the surface. As observed by Tereshko *et al.* [18, 19] the bombardment of solid surfaces by low-energy ions leads to nonlinear oscillations of atoms, resulting in new metastable and long-lived structures in the crystal lattice. This modification could be due to recombination after collision of ionized or radical species produced in tenuous gas plasma [18, 26, 27]. In its natural state, the external TiO₂ layer contains some carbon contaminations [13, 28]. The XPS results indicated that the RF plasma treatments had a positive effect on removing the presence of carbon contamination on the surface of the Ti samples. For the Ti samples, oxygen was more present after RF plasma treatments, suggesting oxidation of aliphatic carbon contaminants into hydroxyl and carboxyl groups (Table 2). This tendency was also observed with the Ti peak for the RF samples treated in N₂. When Ti is treated with RF plasma in N₂ or N₂/O₂, the area under the curve of C=O was reduced (Fig. 4), as well as the carbon content on the surface. This decrease in carbon contaminants on the titanium after RF plasma treatment in N₂ or N₂/O₂ atmospheres may be due to the generation of volatile species containing carbon and nitrogen or oxygen (e.g. HCN, CH₃CN).

With regard to the TiNa samples, Kokubo has shown that the alkali treatment introduces OH groups and produces a sodium titanate hydrogel on the titanium [29]. Takadama *et al.* [30] also reported the presence of sodium using the XPS technique after alkali treatment. The alkali treatment has been reported to be favorable for heterogeneous nucleation of CaP and to play an important role in the bioactivity of titanium [4, 9, 11, 29]. During the immersion, the release of OH by ionic exchange between Na and Ca increases the pH at the surface of the titanium, precipitating CaP from the supersaturated solution. In this study, non-uniform coatings and crystal growth were observed for the titanium samples without alkali treatment (Fig. 6). Nevertheless, the RF plasma treatments had a synergetic effect with the alkali treatment on the

heterogeneous nucleation of CaP, as evidenced by coating uniformity and thickness (Table 3). Both the XRD patterns (Fig. 8 and 9) and the Ca/P ratios measured by EDX analysis (Table 3) indicated that OCP-HA mixtures had precipitated on the alkali-treated samples, while OCP was more abundant on non alkali-treated titanium. OCP is considered to be a precursor of HA and usually precipitates at lower pH, Ca and P concentrations than HA [31]. It has been shown previously that the CPS solution usually encourages the precipitation of OCP on non alkali-treated titanium [32]. In the case of the alkali-treated titanium samples, the release of OH⁻ ions should increase the pH of the solution at the surface/in the vicinity of the titanium samples, and thus lead to a mixture of OCP/HA.

The chemical composition of the surfaces changed after alkali and RF plasma treatments (Table 2, Fig. 5). The C1s peaks of the TiNa samples with RF plasma treatments were similar, and carbon content was more present on the surfaces. These results suggest that carbon contamination may remain entrapped in the sodium titanate hydrogel, increasing after plasma treatments. The increase in carbon content may result from a partial dehydration of the sodium titanate hydrogel due to its interaction with reactive species in the gas plasma phase. The O1s curves for the TiNa samples corroborated these observations. The oxygen peak related to OH⁻ groups in the sodium titanate hydrogel seemed more abundant after RF plasma treatments (Fig. 5). These OH groups may increase the pH of the CPS solution in the vicinity of the titanium surface, encouraging the precipitation of CaP. The RF plasma treatments may also introduce chemical polar groups, such as carbonyl, ester, hydroxyl and carboxyl. These chemical groups could chelate Ca²⁺ or bond to HPO₄²⁻, and thus help heterogeneous nucleation of CaP [33].

5. Conclusion

This study shows that an RF plasma treatment is a beneficial step in the preparation of bioactive titanium surfaces. The effect of RF plasma treatments could be that they clean the surface, decrease the contact angle and introduce chemical groups that may encourage heterogeneous nucleation of CaP, and thus the bioactivity of titanium.

Acknowledgements

The authors would like to thank both the French Department of Research and the Regional Council of the Pays de la Loire for their financial support of this research project. The authors are also grateful to Mr Pilet, Mr Hamon and Mr Fernandez for their invaluable technical help. Mr Lopez-Heredia would like to thank the CONACyT for his PhD fellowship. We greatly acknowledge Ms. Kirsty Snaith for grammar and syntactic corrections made to the manuscript.

References

1. Park JB, Lakes RS. Biomaterials : an introduction. New York: Plenum Press; 1992.
2. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Biomaterials science: An Introduction to Materials in Medicine: Academic Press; 1996.
3. Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. Dent. Mater. 2007;23(7):844-854.
4. Kokubo T, Miyaji F, Kim H-M, Nakamura T. Spontaneous Formation of Bonelike Apatite Layer on Chemically Treated Titanium Metals. J. Am. Ceram. Soc. 1996;79(4):1127-1129.
5. Limin Sun CCB, Karlis A. Gross, Ahmet Kucuk,. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: A review. J. Biomed. Mater. Res. 2001;58(5):570-592.
6. Lopez-Heredia M, Weiss P, Layrolle P. An electrodeposition method of calcium phosphate coatings on titanium alloy. J. Mater. Sci. - Mater. Med. 2007;18(2):381-390.
7. Habibovic P, Li J, van der Valk CM, Meijer G, Layrolle P, van Blitterswijk CA, et al. Biological performance of uncoated and octacalcium phosphate-coated Ti6Al4V. Biomaterials 2005;26(1):23-36.
8. Yan W-Q, Nakamura T, Kawanabe K, Nishigochi S, Oka M, Kokubo T. Apatite layer-coated titanium for use as bone bonding implants. Biomaterials 1997;18(17):1185-1190.
9. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? Biomaterials 2006;27(15):2907-2915.
10. Escobedo JC, Ortiz JC, Almanza JM, Cortes DA. Hydroxyapatite coating on a cobalt base alloy by investment casting. Scripta Mater. 2006;54(9):1611-1615.

11. Kokubo T, Kim H-M, Miyaji F, Takadama H, Miyazaki T. Ceramic-metal and ceramic-polymer composites prepared by a biomimetic process. *Composites Part A. Appl. Sci. Manufact.* 1999;30(4):405-409.
12. El-Hossary FM, Negm NZ, Khalil SM, Raaif M. Effect of continuous and cyclic Rf plasma processing time on titanium surface. *Appl. Surf. Sci.* 2005;239(2):142-153.
13. Hohl F, Berndt H, Mayr P, Stock H-R. Implantation of N²⁺, O⁺ and CO⁺ ions into titanium and Ti-6Al-4V. *Surf. Coat. Technol.* 1995;74-75(Part 2):765-769.
14. Alonso F, Arizaga A, Quainton S, Ugarte JJ, Viviente JL, Onate JJ. Mechanical properties and structure of Ti-6Al-4V alloy implanted with different light ions. *Surf. Coat. Technol.* 1995;74-75(Part 2):986-992.
15. Alonso F, Rinner M, Loinaz A, Onate JJ, Ensinger W, Rauschenbach B. Characterization of Ti-6Al-4V modified by nitrogen plasma immersion ion implantation. *Surf. Coat. Technol.* 1997;93(2-3):305-308.
16. van der Wal E, Vredenberg AM, Ter Brugge PJ, Wolke JGC, Jansen JA. The in vitro behavior of as-prepared and pre-immersed RF-sputtered calcium phosphate thin films in a rat bone marrow cell model. *Biomaterials* 2006;27(8):1333-1340.
17. Koniger A, Ensinger W, Hammerl C, Hochbauer T, Schrag G, Hartmann J, et al. Investigation of plasma immersion ion implanted niobium oxide and titanium nitride films by nanohardness measurement. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B.* 1996;120(1-4):282-285.
18. Tereshko IV, Abidzina VV, Elkin IE, Tereshko AM, Glushchenko VV, Stoye S. Formation of nanostructures in metals by low-energy ion irradiation. *Surf. Coat. Technol.* 2007;201(19-20):8552-8556.

19. Tereshko I, Abidzina V, Tereshko A, Elkin I. Nanostructural evolution of steel and titanium alloys exposed to glow-discharge plasma. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 2007;261(1-2):678-681.
20. Mandl S, Krause D, Thorwarth G, Sader R, Zeilhofer F, Horch HH, et al. Plasma immersion ion implantation treatment of medical implants. Surf. Coat. Technol. 2001;142-144:1046-1050.
21. Mandl S, Rauschenbach B. Improving the biocompatibility of medical implants with plasma immersion ion implantation. Surf. Coat. Technol. 2002;156(1-3):276-283.
22. Das K, Bose S, Bandyopadhyay A. Surface modifications and cell-materials interactions with anodized Ti. Acta Biomaterialia 2007;3(4):573-585.
23. Liu Q, Ding J, Mante FK, Wunder SL, Baran GR. The role of surface functional groups in calcium phosphate nucleation on titanium foil: a self-assembled monolayer technique. Biomaterials 2002;23(15):3103-3111.
24. Lu X, Leng Y. Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. Biomaterials 2005;26(10):1097-1108.
25. Lim YJ, Oshida Y, Andres CJ, Barco MT. Surface characterizations of variously treated titanium materials. Int. J. Oral. Maxillofac. Implants. 2001;16(3):333-342.
26. Abidzina V, Deliloglu-Gurhan I, Ozdal-Kurt F, Sen BH, Tereshko I, Elkin I, et al. Cell adhesion study of the titanium alloys exposed to glow discharge. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B. 2007;261(1-2):624-626.
27. Jun J, Shin J-H, Dhayal M. Surface state of TiO₂ treated with low ion energy plasma. Appl. Sur. Sci. 2006;252(10):3871-3877.
28. Lausmaa J. Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena. Biomaterials 1996;81(3):343-361.

29. Kokubo T. Formation of biologically active bone-like apatite on metals and polymers by a biomimetic process. *Thermochim. Acta.* 1996;280-281:479-490.
30. Takadama H, Kim H-M, Kokubo T, Nakamura T. XPS study of the process of apatite formation on bioactive Ti-6Al-4V alloy in simulated body fluid. *Sci. Tech. Adv. Mater.* 2001;2(2):389-396.
31. Elliott JC. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Amsterdam. Elsevier; 1994.
32. Barrere F, Layrolle P, Van Blitterswijk CA, De Groot K. Biomimetic coatings on titanium: a crystal growth study of octacalcium phosphate. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2001;12(6):529-534.
33. Barrere F, Snel MME, van Blitterswijk CA, de Groot K, Layrolle P. Nano-scale study of the nucleation and growth of calcium phosphate coating on titanium implants. *Biomaterials* 2004;25(14):2901-10.

Tables

Table 1. Roughness and contact angles of samples.

Sample	Ti	Ti+N ₂	Ti+CO ₂	Ti+N ₂ /O ₂	TiNa	TiNa+N ₂	TiNa+CO ₂	TiNa+N ₂ /O ₂
Roughness (μm)	0.6 ± 0.07	0.57 ± 0.13	0.6 ± 0.05	0.53 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.54 ± 0.05	0.66 ± 0.15	0.46 ± 0.07
Contact angle (°)	67 ± 4	5 ± 1	15 ± 9	18 ± 10	9 ± 1	5.6 ± 1	4 ± 1	5 ± 1

Table 2. Chemical composition of the surface of the samples in atm. %.

	Ti	Ti+N ₂	Ti+CO ₂	Ti+N ₂ /O ₂	TiNa	TiNa+N ₂	TiNa+CO ₂	TiNa+N ₂ /CO ₂
Na	---	---	---	---	3.8	3.0	3.1	2.9
Ti	11.9	19.5	17.1	17.3	16.6	14.3	13.7	16.5
O	53.3	78.6	79.5	79.4	60.5	53.2	52.4	49.9
C	34.8	1.9	3.4	3.3	19.1	29.5	30.8	30.7

---: Do not apply.

Table 3. Uniformity, Thickness and Ca/P ratio of the CaP coatings after immersion.

Sample	Ti	Ti+N ₂	Ti+CO ₂	Ti+N ₂ /O ₂	TiNa	TiNa+N ₂	TiNa+CO ₂	TiNa+N ₂ /O ₂
Uniformity (%)	13 ± 2	39 ± 2.5	81 ± 5.5	28 ± 1.1	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Thickness (µm)	77 ± 37 ^b	80 ± 16 ^b	42 ± 4 ^b	105 ± 17 ^b	47 ± 10	68 ± 14	49 ± 5	80 ± 18
Ca/P ^c	1.57 ± 0.01	1.69 ± 0.22	1.55 ± 0.01	1.67 ± 0.31	1.57 ± 0.02	1.61 ± 0.01	1.53 ± 0.01	1.54 ± 0.06

a: Fully covered samples. b: Notice the inhomogeneity of the coating. c: atom. Ca/P ratio determined by EDX analyses

Figure Captions

Figure 1. SEM images and EDX spectra of the Ti6Al4V sample a, c) as received and b, d) after alkali treatment.

Figure 2. AFM images of Ti sample (a, c) and TiNa sample (b, d). Their surface roughness distribution (e) and a line scan of height profile (f) are shown.

Figure 3. XRD patterns of the Ti6Al4V sample a) as received and b) after alkali treatment.

Figure 4. XPS deconvoluted spectra (eV) for the Ti2p, O1s and C1s of the Ti6Al4V sample without alkali treatment (Ti) and with or without the different RF plasma treatments.

Figure 5. XPS deconvoluted spectra (eV) for the Ti2p, Na1s, O1s and C1s of the Ti6Al4V sample with the alkali treatment (TiNa) and without or with the different RF plasma treatments.

Figure 6. SEM images of the titanium samples after immersion in CPS for 15 days a) without alkali treatment (Ti) and with RF plasma treatments in b) N₂, c) CO₂ and d) N₂/O₂.

Figure 7. SEM images of the titanium samples after immersion in CPS a) after alkali treatment (TiNa) and with RF plasma treatments in b) N₂, c) CO₂ and d) N₂/O₂.

Figure 8. XRD patterns of the titanium samples after immersion in CPS for 15 days a) without alkali treatment (Ti) and with RF plasma treatments in b) N₂, c) CO₂ and d) N₂/O₂.

Figure 9. XRD patterns of the titanium samples after immersion in CPS for 15 days a) after alkali treatment (TiNa) and with RF plasma treatments in b) N₂, c) CO₂ and d) N₂/O₂.

Figure 1

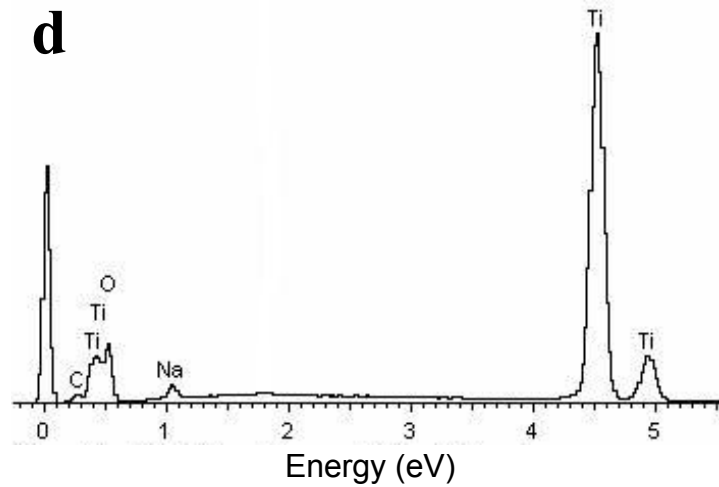
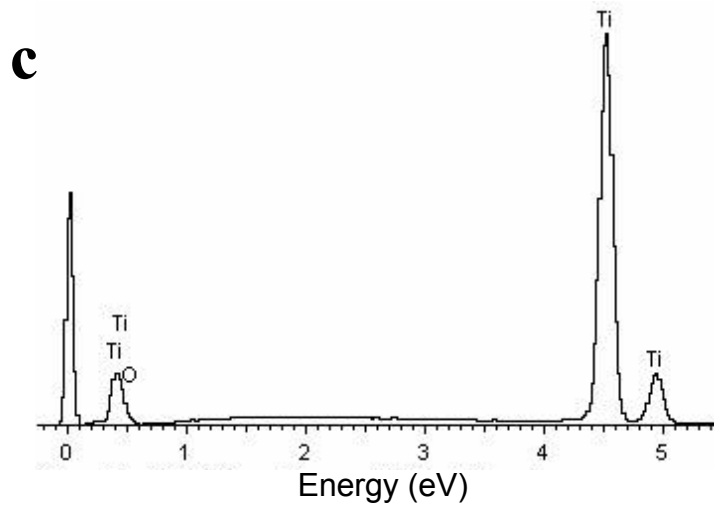
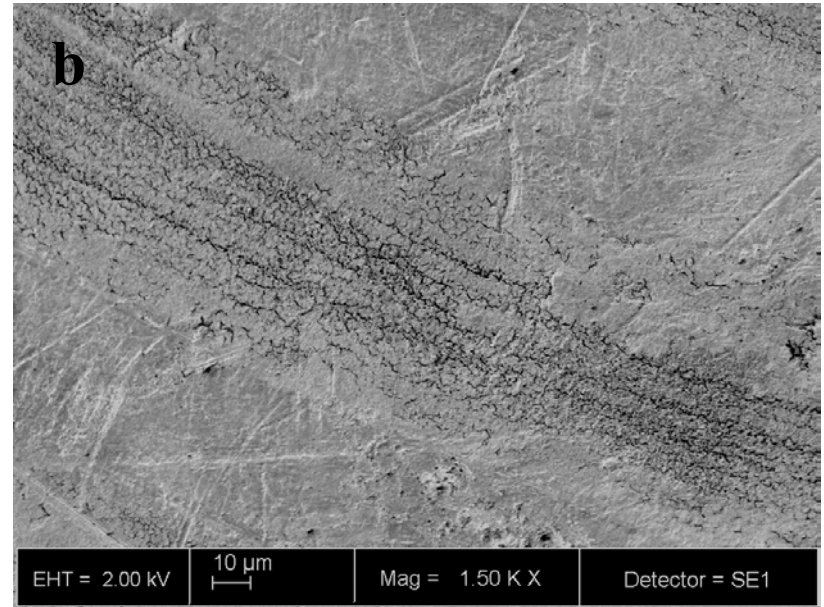
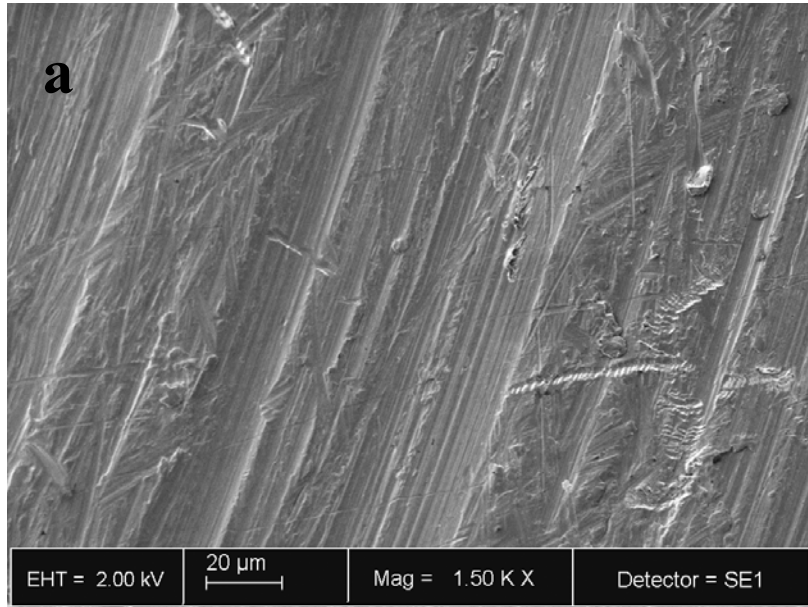


Figure 2

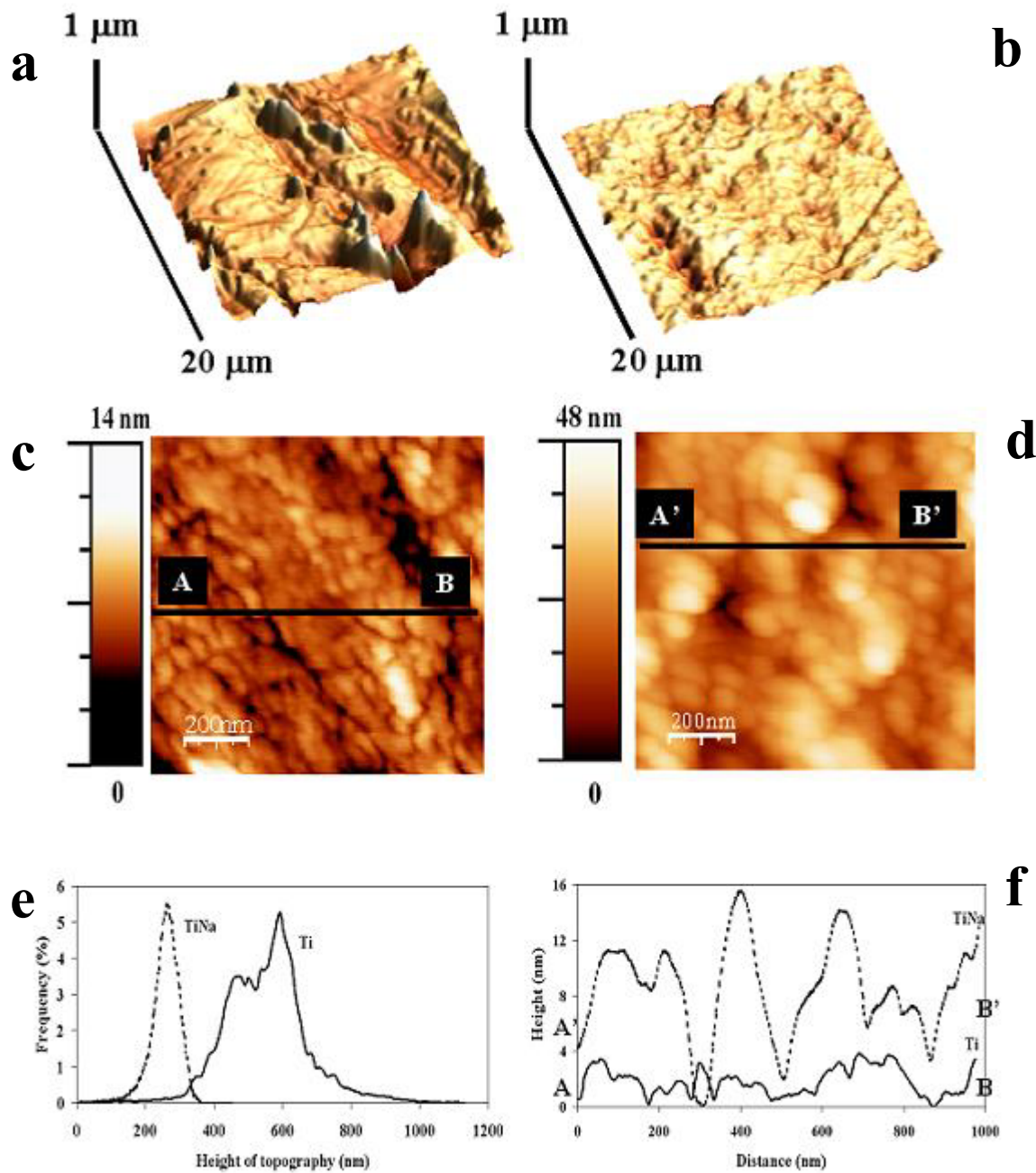


Figure 3

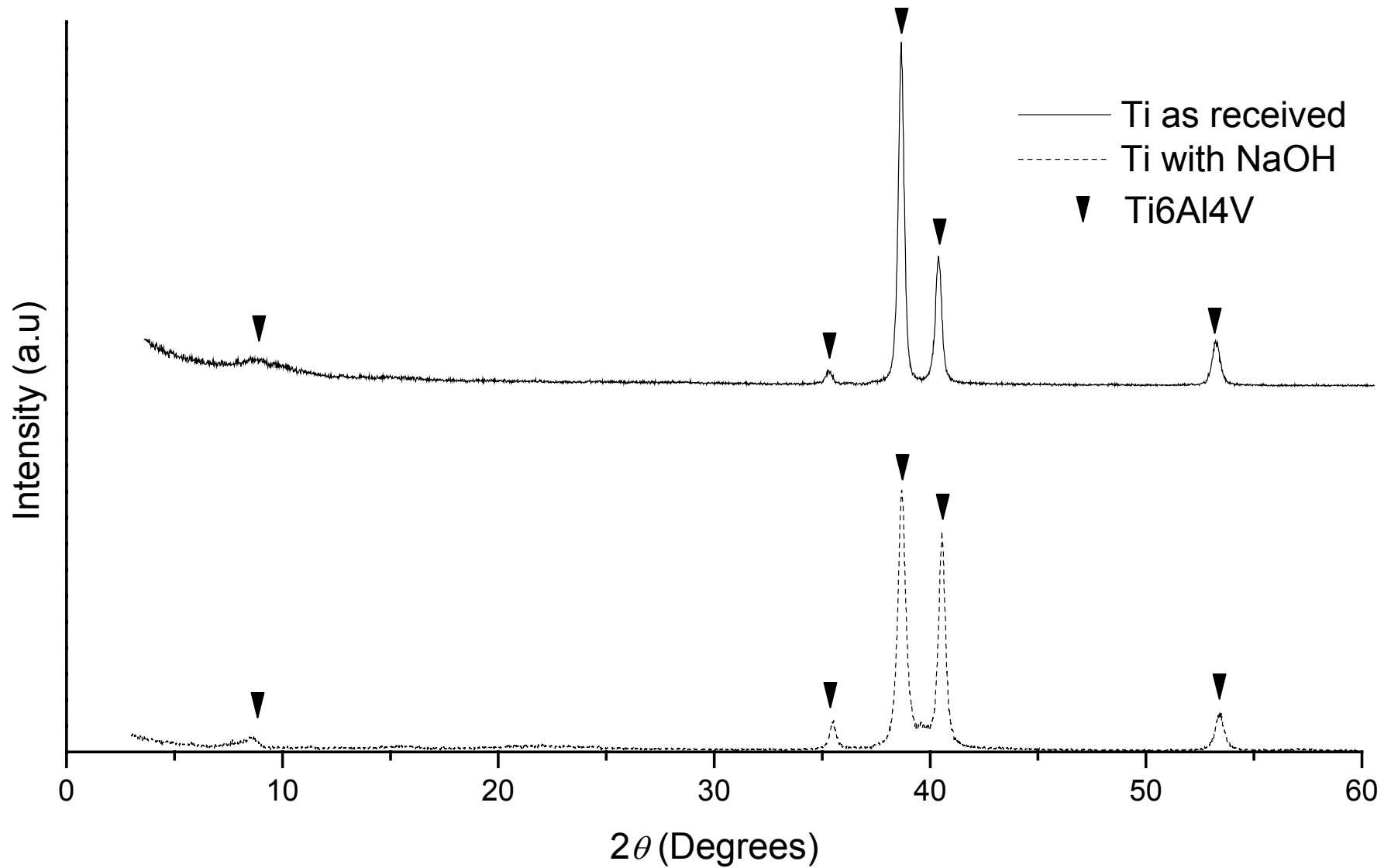


Figure 4

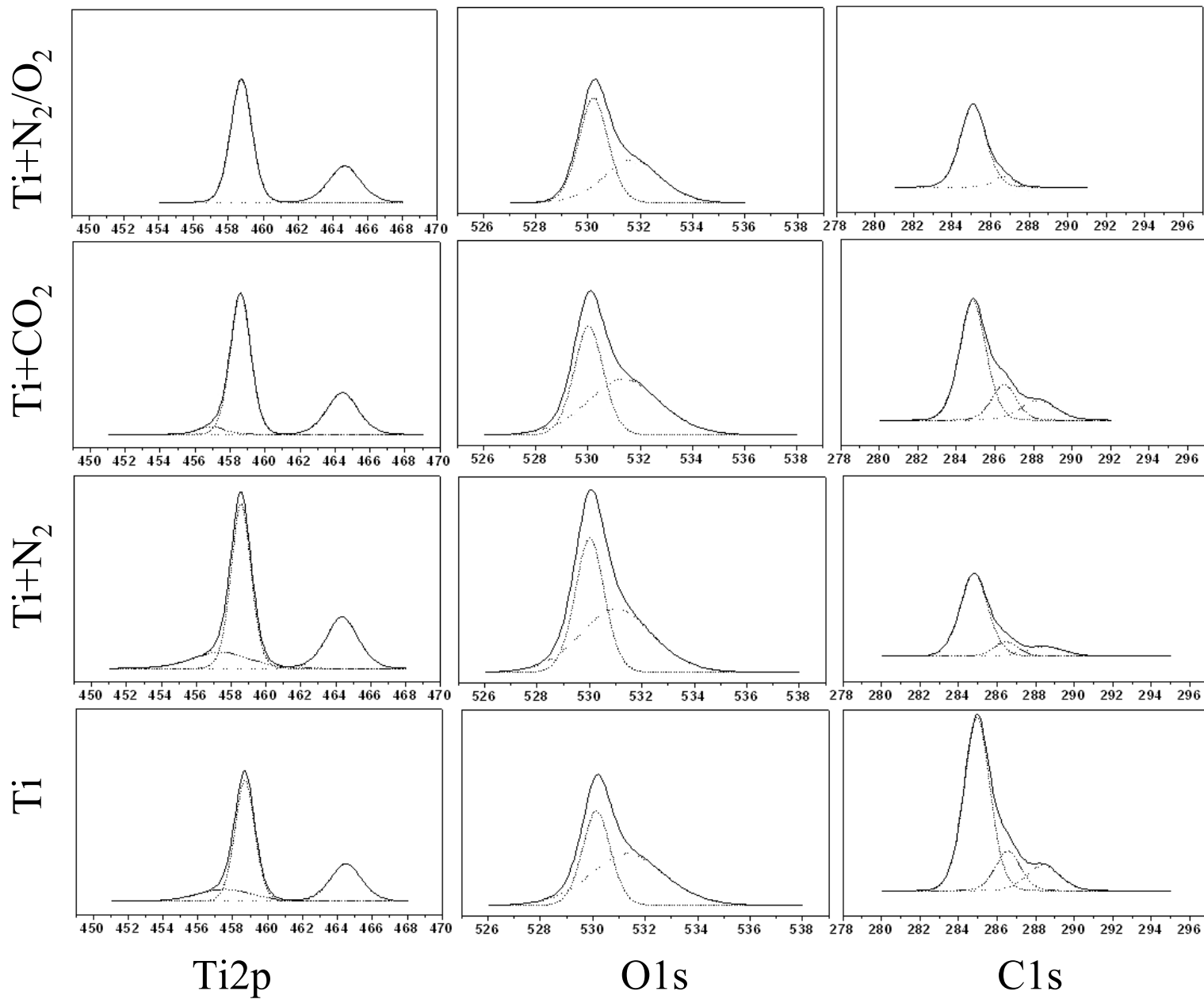


Figure 5

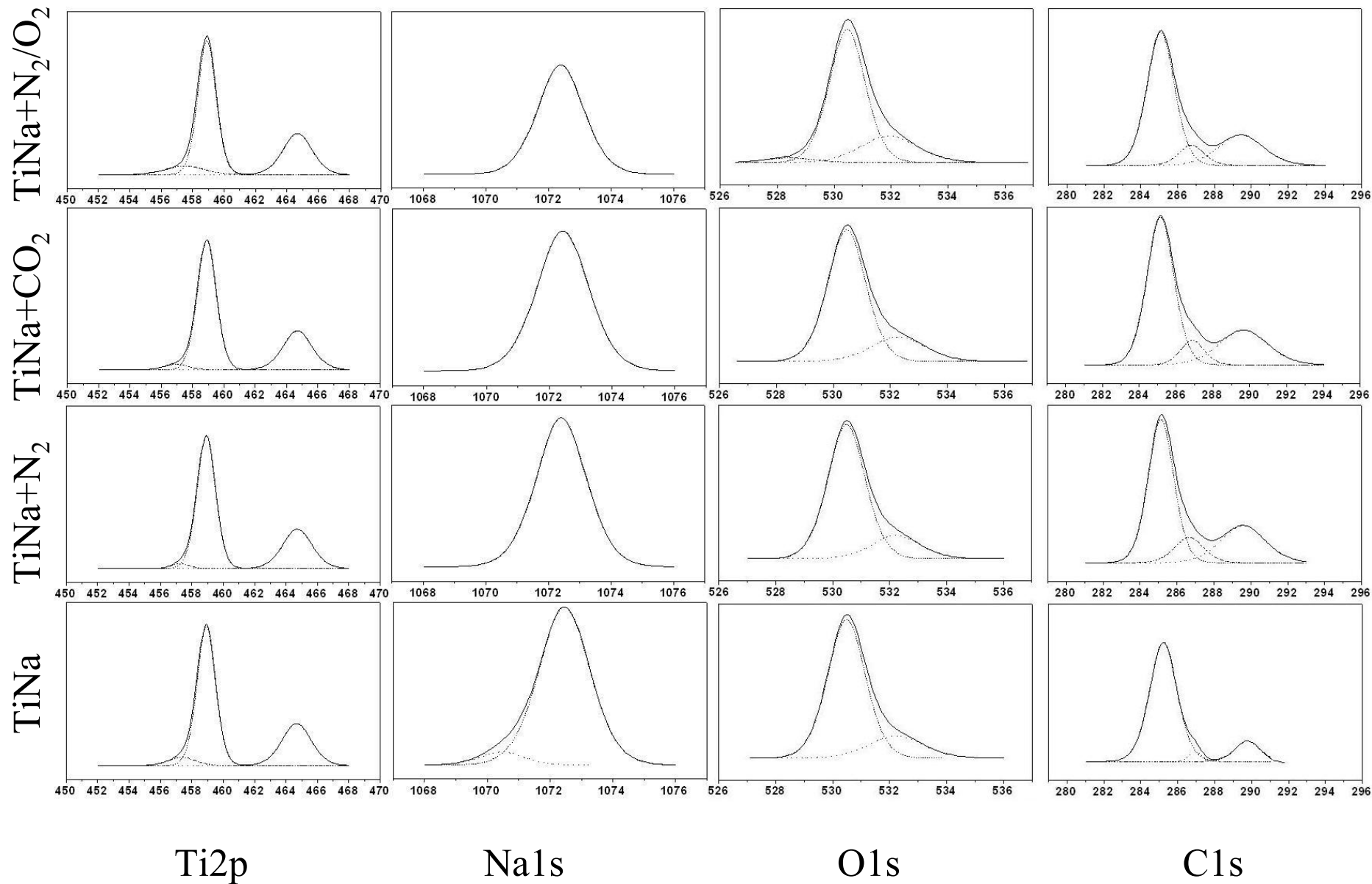


Figure 6

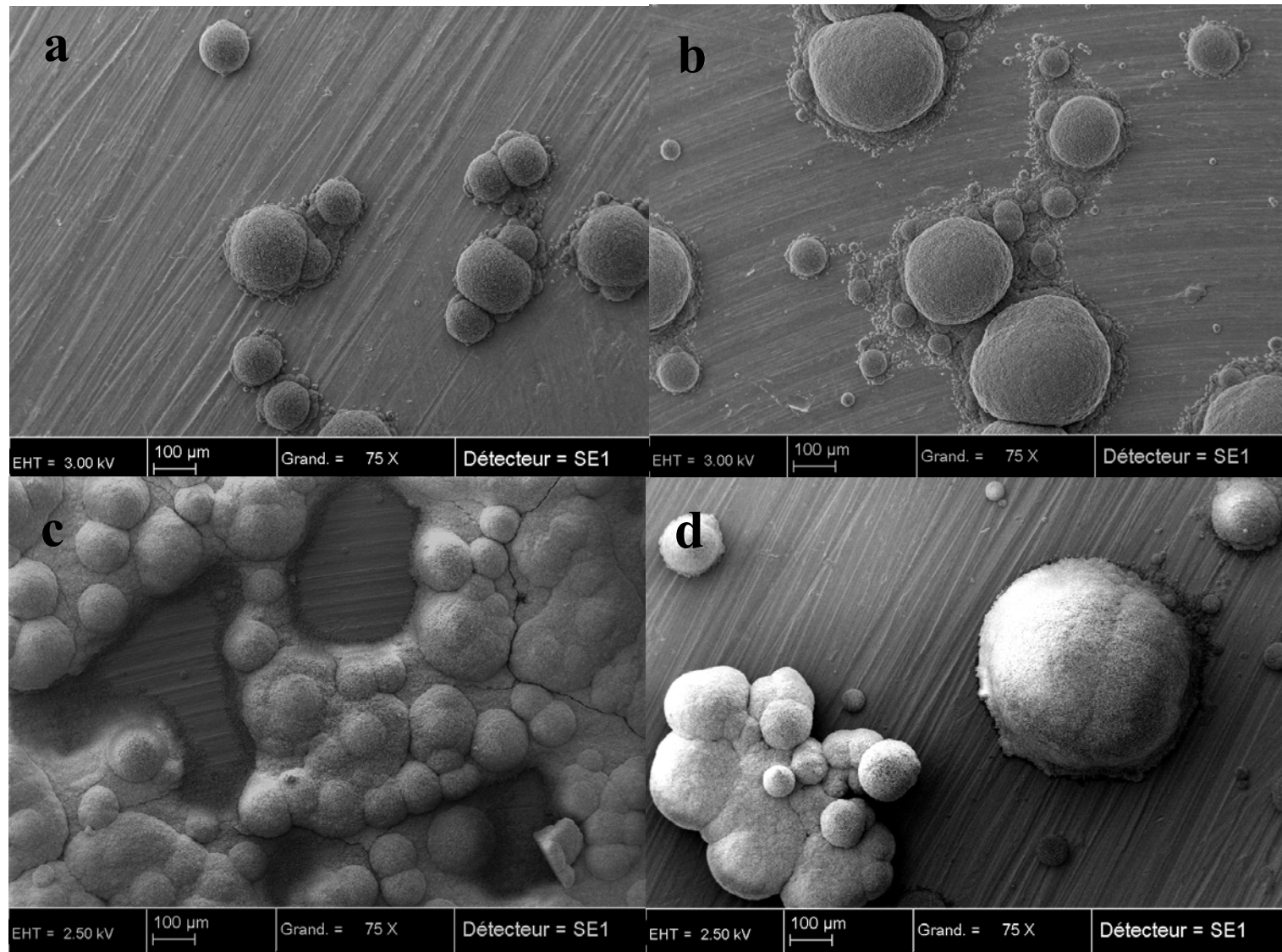


Figure 7

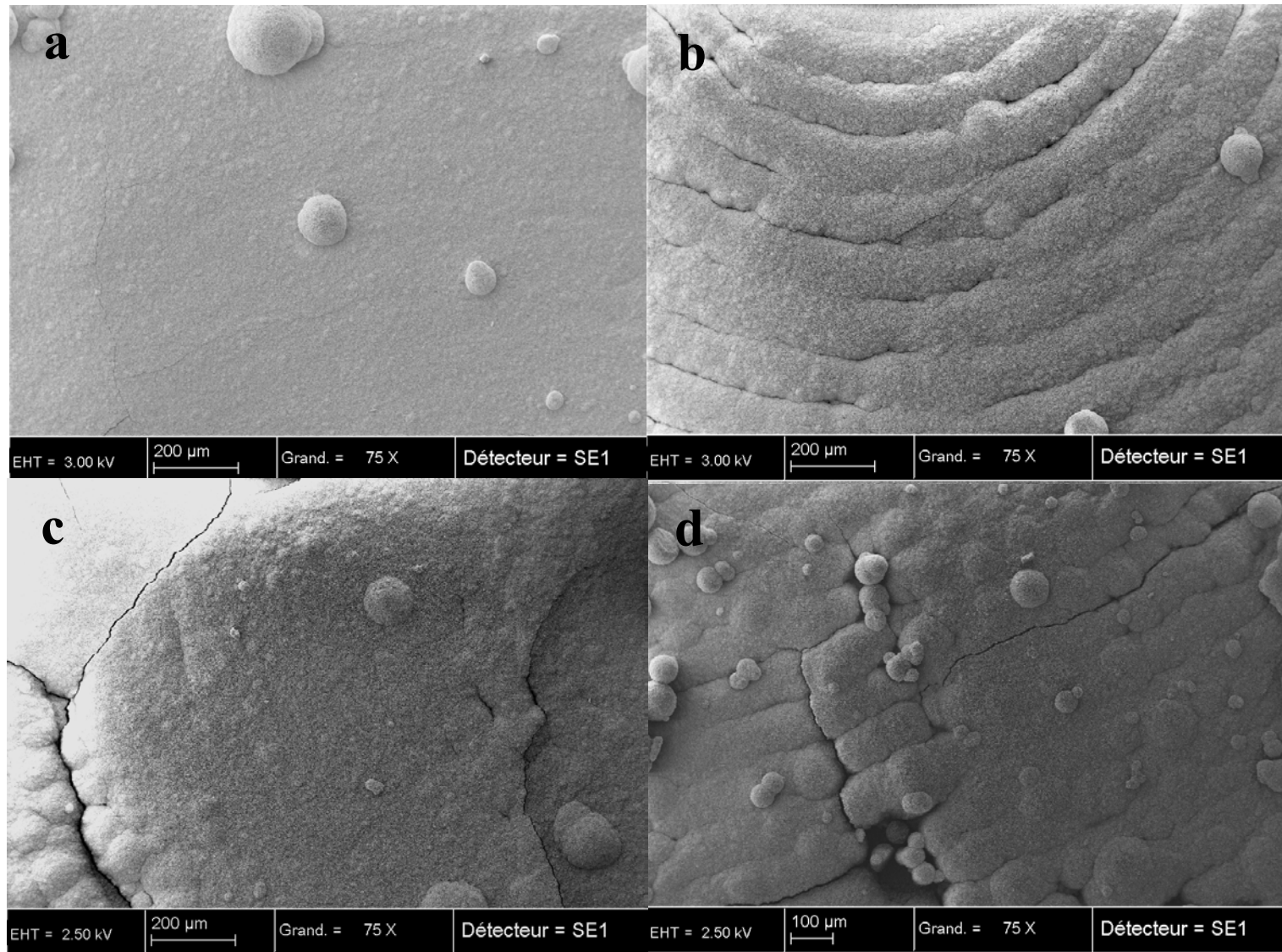


Figure 8

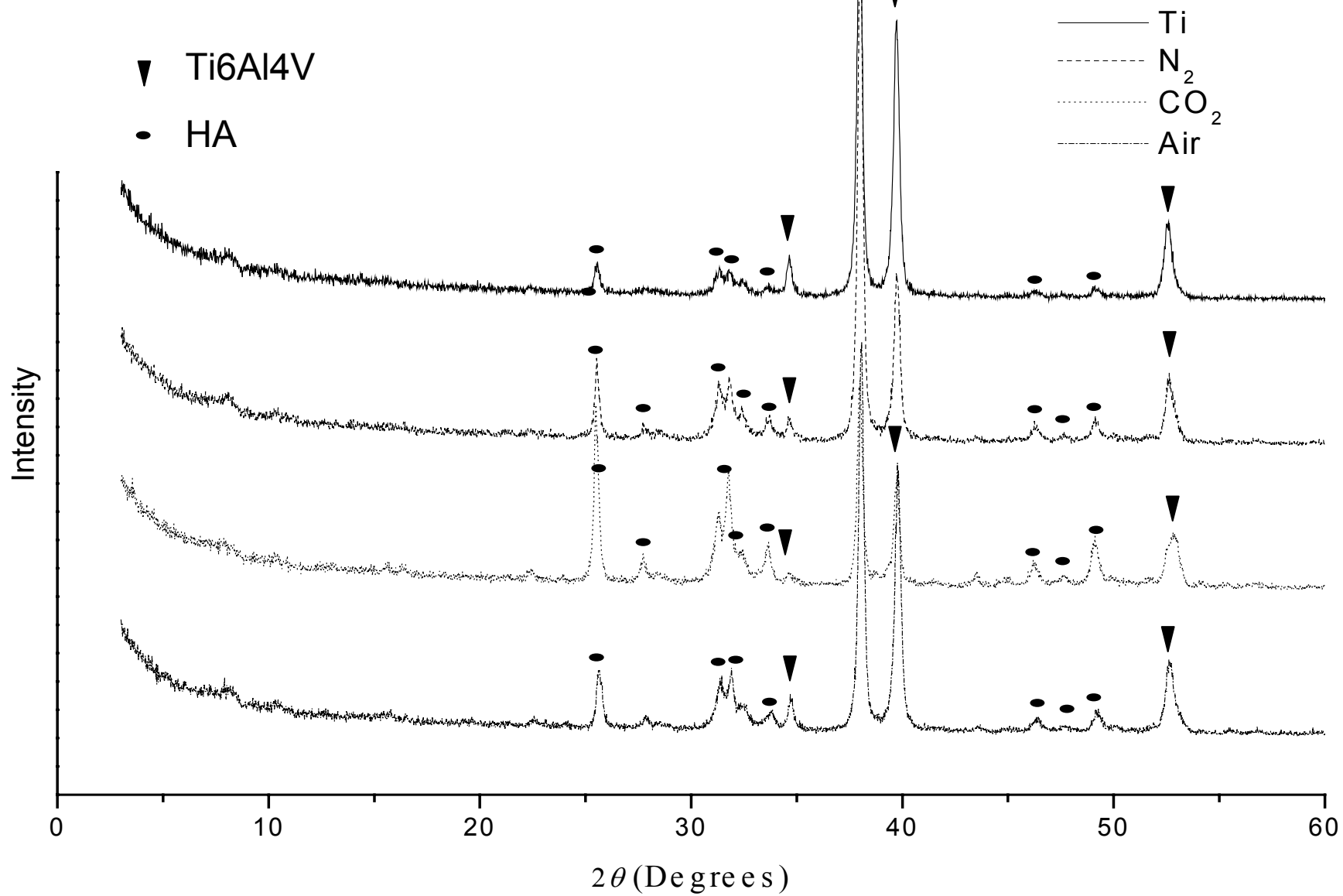
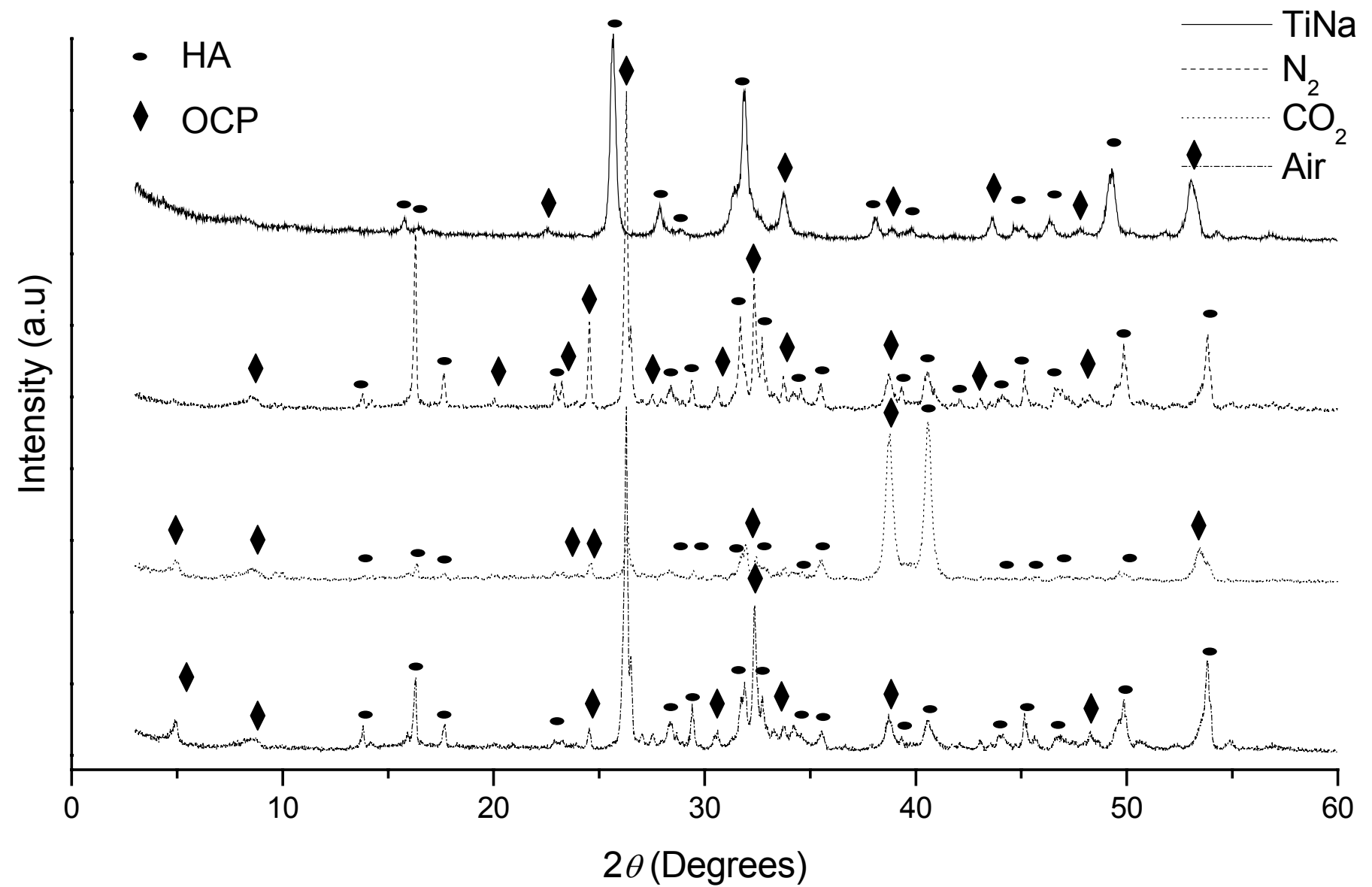


Figure 9



M.A. Lopez-Heredia, P. Weiss and P. Layrolle. **An electrodeposition method of calcium phosphate coatings on titanium alloy.** *J Mater Sci: Mater Med* 18 2007, p 381-390

An electrodeposition method of calcium phosphate coatings on titanium alloy

Marco Antonio Lopez-Heredia · P. Weiss · P. Layrolle

Received: 15 June 2006 / Accepted: 19 September 2006
© Springer Science + Business Media, LLC 2007

Abstract Calcium phosphates coatings were deposited onto titanium alloy discs via an electrodeposition method. Titanium alloy discs were blasted with calcium phosphate particles, then etched in a mixture of nitric and fluoric acids and rinsed in demineralized water. The titanium alloy disc (cathode) and platinum mesh (anode) were immersed in a supersaturated calcium phosphate electrolyte buffered at pH 7.4 and connected to a current generator. The microstructure, chemical composition and crystallinity of the electrodeposited coatings were studied as function of time 10–120 min, temperature 25–80°C, current density 8–120 mA/cm², magnesium and hydrogen carbonate amounts (0.1–1 mM). Uniform calcium phosphate coatings were obtained in 30 min but coating thickness increased with deposition time. Raising the temperature of electrolyte resulted in more uniform coatings as ionic mobility increased. Low current density was preferable due to hydrogen gas evolving at the cathode, which disturbed the deposition of calcium phosphate crystals on titanium. The amounts of magnesium and hydrogen carbonate ions affected both the homogeneity and morphology of the coatings. This study showed that the electrodeposition method is efficient for coating titanium with osteoconductive calcium phosphate layers.

1 Introduction

Titanium and its alloys are amply used for manufacturing orthopedic prostheses and dental implants due to excellent

mechanical properties and biocompatibility [1, 2]. All grades of titanium and its alloys exhibit a layer of TiO₂ with a thickness of few nanometers [3–5]. This titanium oxide layer is responsible for giving chemical stability and thus, biocompatibility. Although titanium is biocompatible, it is not bioactive unless chemically treated with alkali [6–8] or coated with calcium phosphate [9, 10]. Titanium implants are therefore not in direct contact with bone and often encapsulated by a thin layer of fibrous tissue. Calcium phosphate (Ca-P) ceramics are bioactive through a dissolution-reprecipitation process forming a direct bond with bone tissue [11]. However, the mechanical properties of Ca-P ceramics are very weak and these materials could not be used under load bearing applications like titanium implants. Several coating methods have therefore been developed for combining the high strength of titanium with the bioactivity and osteoconductivity of calcium phosphate [12–16]. Hydroxyapatite coatings, 40–50 μm thick, have been applied on titanium implants by using plasma-spray and are successfully used in clinical practice for improving the initial healing and long term stability of orthopedic hip prostheses. However, the plasma-spray method takes place at extremely high temperature possibly affecting the structure of titanium and the homogeneity of the hydroxyapatite coating [17–19]. Furthermore, the plasma spray coating method does not allow the incorporation of bioactive molecules within the Ca-P layer [20]. These bioactive molecules like bone morphogenetic proteins or antibiotics could enhance bone healing or prevent local infection around prostheses [21, 22]. Electrodeposition of calcium phosphate coatings on titanium is an alternative process that uses aqueous solutions at low temperatures, which cannot affect the structure of the implant and which can be applied to complex shapes. Ban *et al.* [23] have studied the effect of temperature and deposition time on

M. A. Lopez-Heredia (✉) · P. Weiss · P. Layrolle
Inserm U791, Laboratory for Osteoarticular and Dental Tissue
Engineering, Faculty of Dental Surgery, University of Nantes,
1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes, France
e-mail: marco.lopez-heredia@univ-nantes.fr

electrodeposited coatings using titanium plates as working electrodes in a simulated body fluid (SBF) and a voltage of -2 V versus a saturated Calomel electrode (SCE). In another work, the same group removed Mg^{2+} , K^{+} and HCO_3^{-} ions from SBF and investigated the microstructure of coatings obtained within a temperature range of 52 – 92°C using two current densities of 1.3 and 12.9 mA/cm^2 [24]. Higher temperature ranges of 90 – 200°C have also been used with current densities of 5 – 25 mA/cm^2 and deposition times of 10 – 120 min to study the morphological regulation and crystal growth of calcium phosphate coatings on titanium using a SBF solution without the $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KCl and NaHCO_3 [25]. Rößler *et al.* [26] performed studies using an electrolyte consisting of CaCl_2 and $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, at 36°C and current densities ranging from -0.5 to -10 mA/cm^2 for 5 s to 60 min. The effect of pressure on the electrodeposition process has also been studied [27–29]. The aim of this work is to study the effect of a super saturated electrolyte solution at different temperatures, current densities, time of deposition and various Mg^{2+} and HCO_3^{-} ion concentrations. The Ca-P coatings on titanium alloy (Ti6Al4V) were analyzed by using scanning electron microscopy (SEM) energy dispersive analysis for X-Ray (EDX) and X-Ray diffraction (XRD).

2 Materials and methods

2.1 Sample preparation

Ti6Al4V titanium discs, 15 mm in diameter $\times$ 1 mm in thickness, were used. Before electrodeposition, the titanium alloy discs were grit blasted (Sanduret 3 K, Rosfrei) using biphasic calcium phosphate ceramic particles with a size of 200 – 400 μm (Biomatlante, France). Samples were then etched in a mixture of acids consisting of nitric acid (HNO_3 50%, 6 ml), fluorydric acid (HF 40%, 3 ml) and water (991 ml). The samples were ultrasonically cleaned in demineralized water and dried. The surface roughness (SJ-201M, Mitutoyo) and the dynamic contact angle (Digidrop, GBX) of the titanium alloy discs were measured after blasting and acid etching.

2.2 Electrodeposition

The experimental set up used for the electrodeposition was a simple two-electrode cell configuration (Fig. 1). The working electrode was the titanium alloy disc and the counter electrode was a platinum mesh ($100 \times 70 \times 0.1$ mm, Advent Research Materials Ltd, UK). Both electrodes were immersed in a supersaturated electrolyte (SE) which was prepared by dissolving given amounts of reagent-grade chemicals NaCl , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 and $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, in demineralized water. The supersaturated electrolyte was buffered to pH 7.4 using Tris(hydroxymethyl amino methane) and drops of HCl 1M . Different concentra-

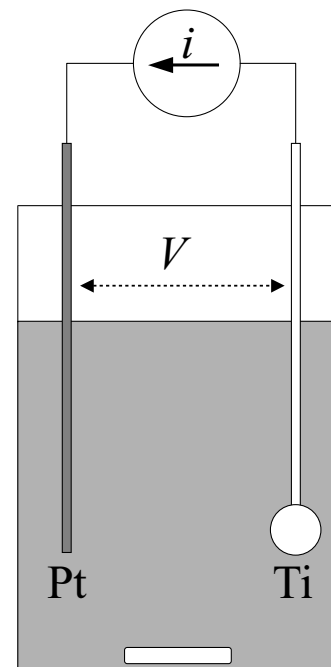


Fig. 1 Electrodeposition setup for calcium phosphate coating on titanium alloy

tions of Mg^{2+} and HCO_3^{-} ions ranging from 0.1 to 1 mM were investigated as shown in Table 1.

After dissolution of salts and buffering at pH 7.4 , the supersaturated solution was filtered through 0.22 μm top filter bottle (Millipore) and stored at 4°C . For electrodeposition, 250 ml of supersaturated solution was used in each experiment. The electrolyte was thermostated at 25 , 37 , 50 , 65 , 70 , 75 or 80°C and stirred at 250 rpm using a stirring-heating plate (Heidolph Instruments MR3003, Germany). A direct current power generator (Consort E861) was connected to the titanium alloy and platinum electrodes. Current density of 8 , 10 , 15 , 20 , 25 , 30 , 50 , 90 and 120 mA/cm^2 were applied between the electrodes for 10 , 20 , 30 , 60 and 120 min. After electrodeposition, titanium alloy discs were rinsed with demineralized water, dried and stored in multi-well culture dishes at room temperature. A minimum of 2 runs was performed for each experimental condition.

2.3 Characterization of the electrodeposited Ca-P coatings on titanium

Scanning electron microscopy (SEM, Leo 1450VP) was performed on the samples. For comparison purposes, the surfaces were examined at magnifications $\times 50$, $\times 250$, $\times 500$, $\times 1000$, $\times 2500$, $\times 5000$ and $\times 10000$. Energy dispersive X-Ray analysis (EDX, Oxford Instruments) was performed at 15 keV, working distance of 15 mm, magnification $\times 700$ and using a square window. The composition of electrodeposited calcium phosphate crystal was determined using

Table 1 Ion concentrations (mM) of the different saturated solutions with various quantities of Magnesium (M) and Hydrogenocarbonate (HC) used for electrodeposition of calcium phosphate coatings on titanium alloy

	Ion concentration (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Blood plasma	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27	1.0	0.5
SE ^a	140.9	—	—	4.0	144.9	—	2.0	—
SE M0.1	140.9	—	0.1	4.0	145.1	—	2.0	—
SE M0.5	140.9	—	0.5	4.0	145.9	—	2.0	—
SE M1.0	140.9	—	1.0	4.0	146.9	—	2.0	—
SE HC0.1	141.0	—	0.1	4.0	144.9	—	2.0	—
SE HC0.5	141.4	—	0.5	4.0	144.9	—	2.0	—
SE HC1.0	141.9	—	1.0	4.0	144.9	—	2.0	—
SE M0.1, HC0.1	141.0	—	0.1	4.0	145.1	0.1	2.0	—
SE M0.1, HC0.5	141.4	—	0.1	4.0	145.1	0.5	2.0	—
SE M0.1, HC1.0	141.9	—	0.1	4.0	145.1	1.0	2.0	—
SE M0.5, HC0.1	141.0	—	0.5	4.0	145.9	0.1	2.0	—
SE M0.5, HC0.5	141.4	—	0.5	4.0	145.9	0.5	2.0	—
SE M0.5, HC1.0	141.9	—	0.5	4.0	145.9	1.0	2.0	—
SE M1.0, HC0.1	141.0	—	1.0	4.0	146.9	0.1	2.0	—
SE M1.0, HC0.5	141.4	—	1.0	4.0	146.9	0.5	2.0	—
SE M1.0, HC1.0	141.9	—	1.0	4.0	146.9	1.0	2.0	—

^aThis solution is our standard supersaturated electrolyte (SE).

atomic Ca/P ratio measured by EDX. The homogeneity of calcium phosphate coating was assessed using the Ca/Ti ratio given by EDX spectra. Samples were analyzed by X-Ray diffraction (XRD, PW1830 Philips) using a K α copper radiation (40 kV, 30 mA) from 3 to 60 degrees in 2theta with a step of 0.02 degree.

3 Results

After blasting and etching, the titanium alloy discs had an average surface roughness of $1.64 \pm 0.14 \mu\text{m}$ and a contact angle of $99.5 \pm 2.29^\circ$ thus, being slightly hydrophobic. After electrodeposition, the surface roughness remained the same, $1.64 \pm 0.10 \mu\text{m}$, but the contact angle changed to $13.5 \pm 0.17^\circ$, hence modifying the surface into a hydrophilic one. In the first set of experiments, different current density and temperature were used. Coatings obtained under different electrodeposition conditions are shown in Fig. 2. At low current density and room temperature, calcium phosphate aggregates, several micrometers wide, were observed on titanium (Fig. 2(a)). Increasing the temperature to 50 or 70°C with the same current density resulted in more homogeneous calcium phosphate layers (Fig. 2(b), and (c)). However, an increase of current density resulted in thinner and less uniform calcium phosphate deposits even if high temperature was used (Fig. 2(d)).

This trend was corroborated by EDX analysis. As shown in Fig. 3(a)–(c), the intensity of calcium and phosphorus peaks increased comparatively to the intensity of titanium peaks while the temperature of the SE was augmented. As previ-

ously observed, the calcium phosphate layers were thinner and less homogenous for high current density and high temperature (Fig. 3(d)).

Figure 4(a) exhibited the Ca/Ti ratio for all electrodeposited calcium phosphate coatings on titanium alloy as function of current density and temperature. High Ca/Ti ratio corresponded to thick and homogeneous calcium phosphate coatings. This graph illustrates the optimal experimental conditions for getting thick and uniform calcium phosphate layers. These conditions were high temperature (*e.g.* 50–70°C) and low current density 10–20 mA/cm². Figure 4(b) exhibited the Ca/P ratio, which ranged from 1.10 to 2.06 depending on experimental conditions.

It appeared that high Ca/P ratio which are related to calcium-rich phases like hydroxyapatite (HA, Ca/P = 1.67) or AB-type substituted carbonated apatite were preferably obtained using high temperature and low current density. These findings were confirmed by the X-Ray diffraction patterns (Fig. 5). Again, the diffraction lines for HA were relatively higher at low current density and high temperature than in other conditions. In summary, for this first set of experiments, the electrodeposition of calcium phosphate coatings on the titanium surface was favored using low current densities, 10–20 mA/cm², and high temperatures, 50–70°C. Using these experimental conditions, coatings were uniform white and their thickness was estimated to be around 20 μm . Thickness of the obtained coatings via the electrodeposition method was estimated by comparing them to a standard obtained by using a biomimetic process described by Barrere *et al.* [30], in which the coating is obtained via a nucleation

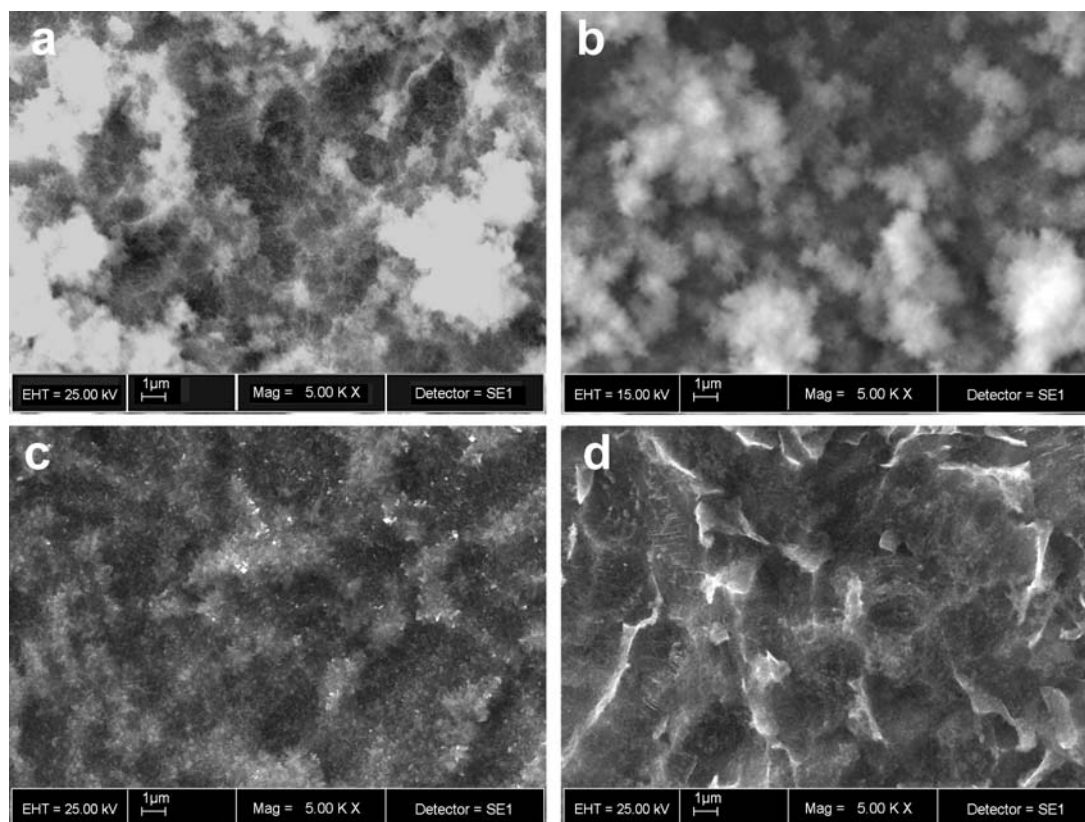


Fig. 2 SEM of electrodeposited calcium phosphate coatings on titanium alloy as function of temperature and current density for 30 min using a SE solution. (a) $T = 25^{\circ}\text{C}$, $j = 10 \text{ mA/cm}^2$, (b) $T = 50^{\circ}\text{C}$, $j = 10 \text{ mA/cm}^2$, (c) $T = 70^{\circ}\text{C}$, $j = 10 \text{ mA/cm}^2$ and (d) $T = 70^{\circ}\text{C}$, $j = 90 \text{ mA/cm}^2$

and precipitation from a solution whose pH is controlled by the injection of CO_2 to the solution. The colour of the coating and the intensity of the peaks of Ti, Ca and P obtained with EDX were used to evaluate in a qualitative way the thickness.

Table 2 gathers the Ca/Ti and Ca/P ratios obtained with increasing deposition time under the same conditions of temperature of 75°C and current density of 20 mA/cm^2 . As the electrodepositing time increased, the Ca/Ti ratio increased suggesting that the coating thickness and homogeneity were greater than after short delays. The chemical composition of the deposited calcium phosphate phase on titanium alloy evolved also with time as evidenced by the Ca/P ratio.

The effect of magnesium and carbonate was also studied in another set of experiments. Ion concentrations for Mg^{2+} and HCO_3^- in the supersaturated electrolyte were varied from 0.1 to 1 mM and combinations of those were tested (Table 1). Adding Mg^{2+} or HCO_3^- ions to the supersaturated solutions had an effect on the microstructure of coatings (Fig. 6). Calcium phosphate crystals had a needle-like shape in the presence of magnesium or carbonate.

Figure 7 gathers the EDX spectra of coating prepared with Mg^{2+} or HCO_3^- ions. The coating prepared using high amount of magnesium (SE M1.0) had the best uniformity and

thickness as evidenced by the relative intensity of Ca, P and Ti peaks (Fig. 7(b)). The addition of low amount of Mg^{2+} or HCO_3^- ions has led to similar homogeneity and thickness of coatings. These results have been corroborated by systematic measurements of Ca/Ti ratio (Fig. 8(a)).

The more homogeneous and thicker coatings were obtained with the combination of Mg^{2+} and HCO_3^- ions. Nevertheless, coatings were thinner and more heterogeneous using high concentration of Mg^{2+} and low concentration of HCO_3^- . The best coatings were obtained with a concentration of Mg^{2+} of 0.1 mM. In the case of the HCO_3^- , the higher the concentration, the thinner the coating was (Fig. 8). Regarding composition, Ca/P ratios were comprised between 1.62 and 1.88 for most the concentrations of Mg^{2+} and HCO_3^- . A low Ca/P ratio of 0.74 was solely noted for magnesium content of 0.1 mM.

The XRD patterns indicated that the coatings were composed of an apatitic phase with a low crystallinity (Fig. 9). Peaks of titanium were still visible but those of HA were relatively higher than in the previous set of experiment. In summary, magnesium and carbonate increased the uniformity and thickness of the electrodeposited calcium phosphate layers on titanium alloy.

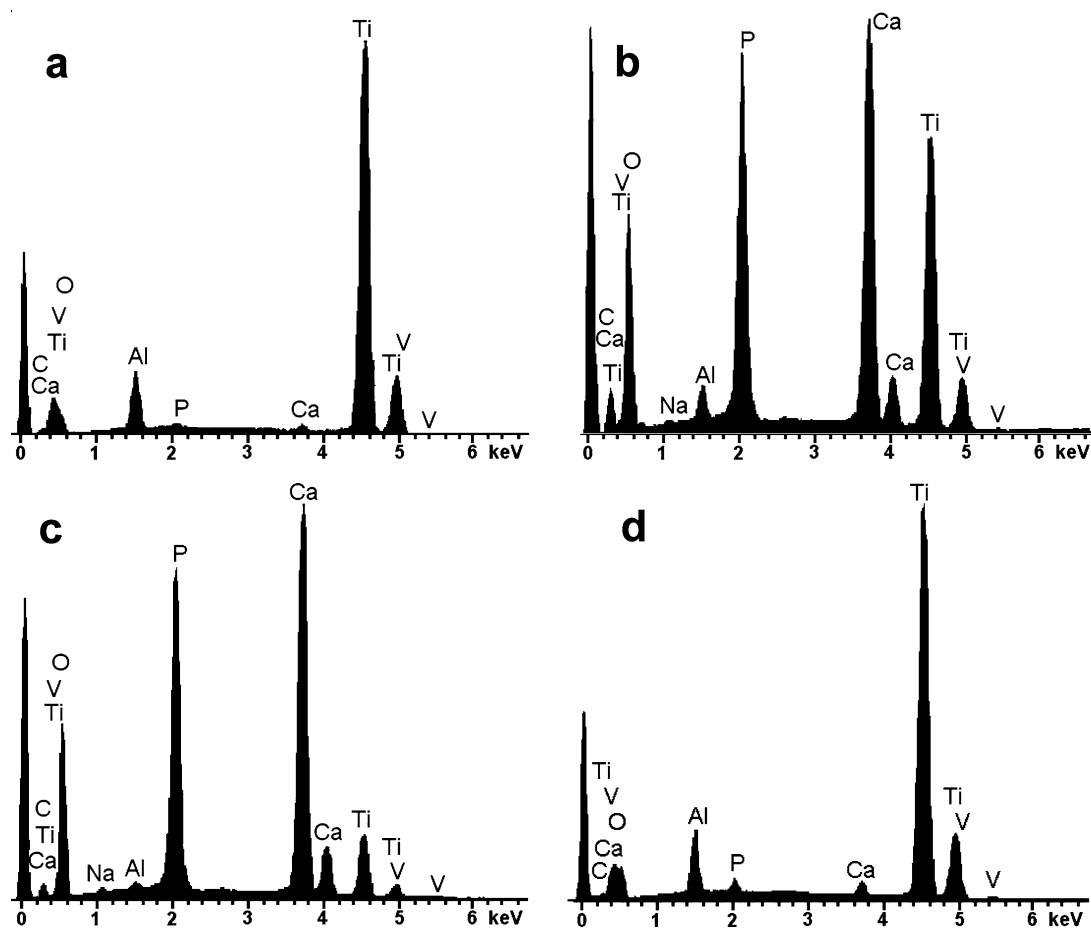


Fig. 3 EDX spectra of electrodeposited calcium phosphate coatings on titanium alloy as function of temperature and current density for 30 min using a SE solution. (a) $T = 25^{\circ}\text{C}$, $j = 10 \text{ mA/cm}^2$, (b) $T = 50^{\circ}\text{C}$, $j =$

10 mA/cm^2 , (c) $T = 70^{\circ}\text{C}$, $j = 10 \text{ mA/cm}^2$ and (d) $T = 70^{\circ}\text{C}$, $j = 90 \text{ mA/cm}^2$

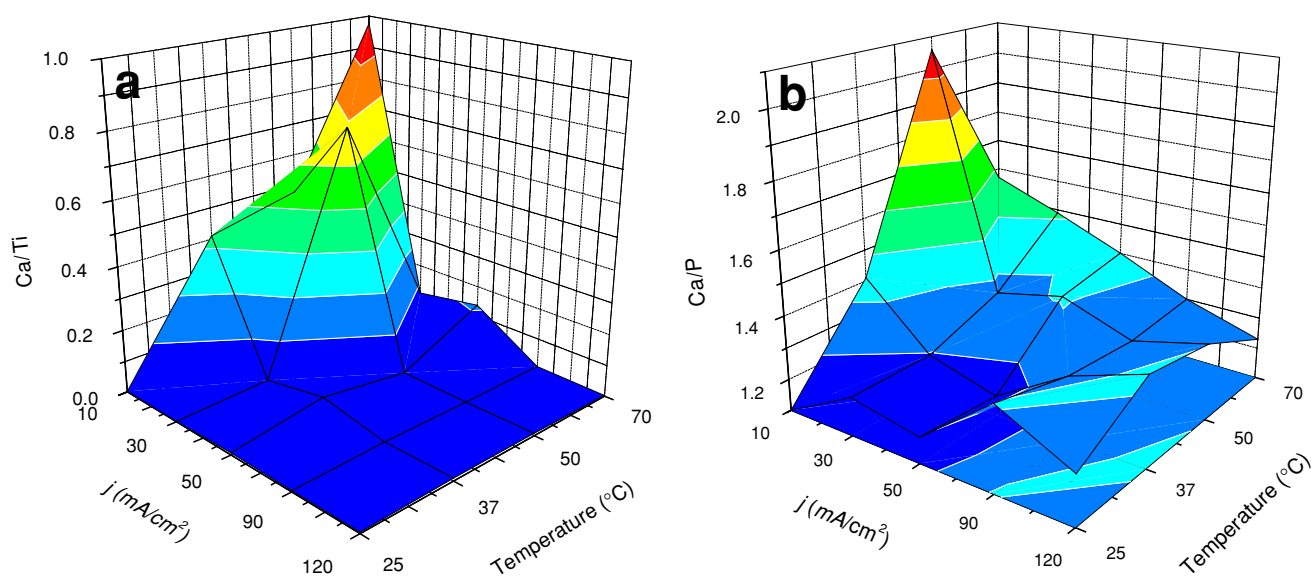
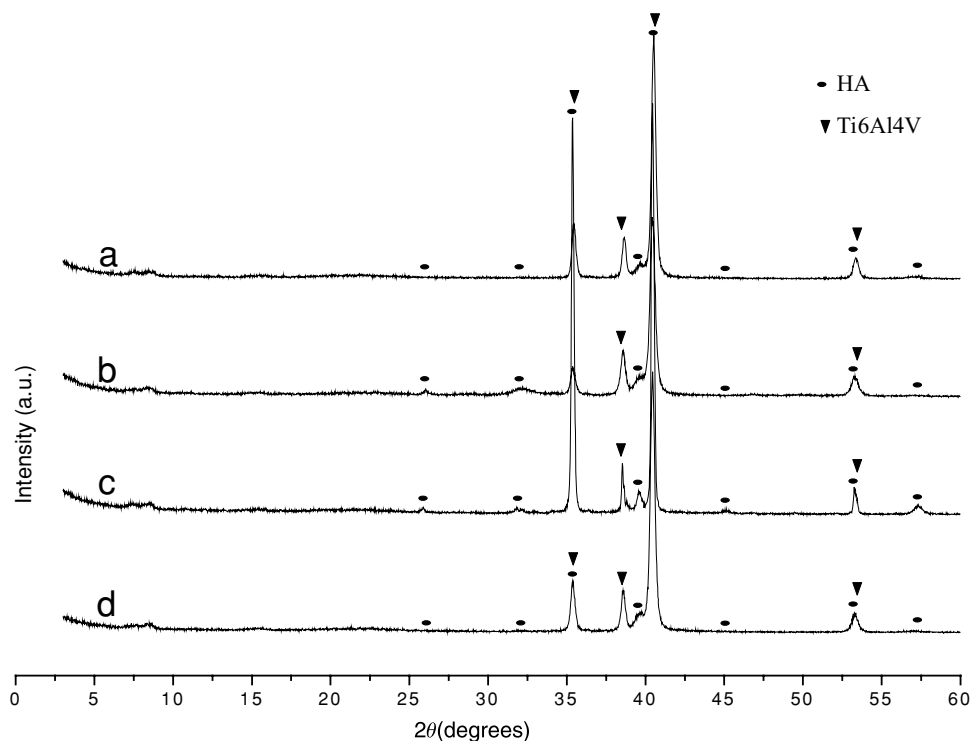


Fig. 4 Ca/Ti and Ca/P ratios measured by EDX for electrodeposited calcium phosphate coatings on titanium alloy as function of temperature and current density for 30 min using a SE solution

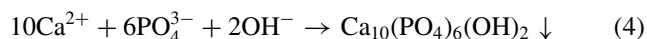
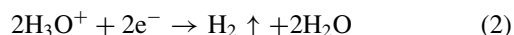
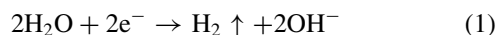
Table 2 Ca/Ti and Ca/P ratios of electrodeposited calcium phosphate coatings on titanium alloy as function of deposition time for a SE^a solution heated at 75°C and a current density of 20 mA/cm²

Time (min)	10	20	30	60	120
Ca/Ti	0.025 ± 0.001	0.038 ± 0.001	0.11 ± 0.002	0.68 ± 0.07	2.2 ± 0.12
Ca/P	1.64 ± 0.08	1.73 ± 0.04	1.58 ± 0.02	1.91 ± 0.03	1.96 ± 0.007

^aSee Table 1.**Fig. 5** X-ray diffraction patterns of electrodeposited calcium phosphate coatings on titanium alloy as function of temperature and current density for 30 min using a SE solution. (a) $T = 25^{\circ}\text{C}$, $j = 10 \text{ mA/cm}^2$, (b) $T = 50^{\circ}\text{C}$, $j = 10 \text{ mA/cm}^2$, (c) $T = 70^{\circ}\text{C}$, $j = 10 \text{ mA/cm}^2$ and (d) $T = 70^{\circ}\text{C}$, $j = 90 \text{ mA/cm}^2$ 

4 Discussion

Several experimental parameters have been investigated for coating titanium alloy with calcium phosphate by using electrochemistry. Supersaturated electrolytes buffered at pH 7.4 have been used for depositing apatite rather than other calcium phosphate phases. In this electrochemical process, both hydrogen gas and hydroxyl ions were produced on the titanium surface being the cathode. The production of hydroxyl ions at the surface of titanium raised locally the pH of the supersaturated electrolyte leading to the precipitation of calcium phosphate hydroxyapatite as following:



These reactions are considered to be the ones having a major effect on the formation of calcium phosphates because of their active role in controlling the pH and producing hydroxyl ions [31]. The augmentation of pH facilitates the growth of hydroxyapatite [31], which is related to the reduction of water. In this work, homogenous calcium phosphate layers were produced on titanium within a relatively short time, *e.g.* 30 min. As evidenced by XRD analysis (Figs. 5 and 9), the calcium phosphate coating had an apatite structure. Nevertheless, it is well known [23–25, 32, 33] that near the surface of the cathode the reduction of water produces hydrogen gas. The evolving of hydrogen gas at the cathode may disturb the deposition of calcium phosphate crystals on the titanium surface. The electrolyte was stirred at 250 rpm in order to help degassing hydrogen gas from the cathode and to improve the coating uniformity [34]. In this work, we noticed that increasing the temperature affected the uniformity of the coatings. An increase in temperature facilitated both the transport of ions [23] and the crystal growth of hydroxyapatite crystals leading to more uniform and thicker coatings. High current

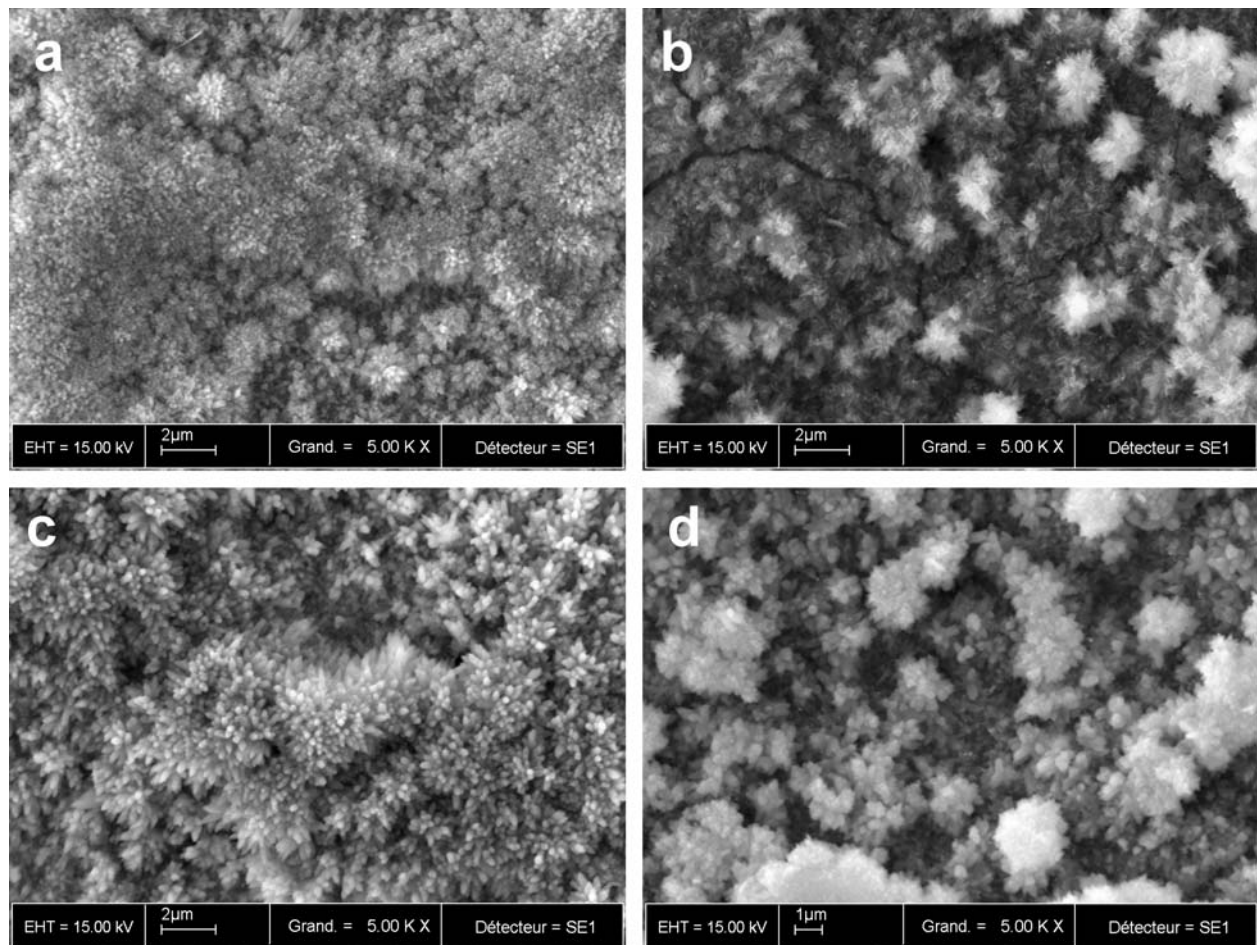
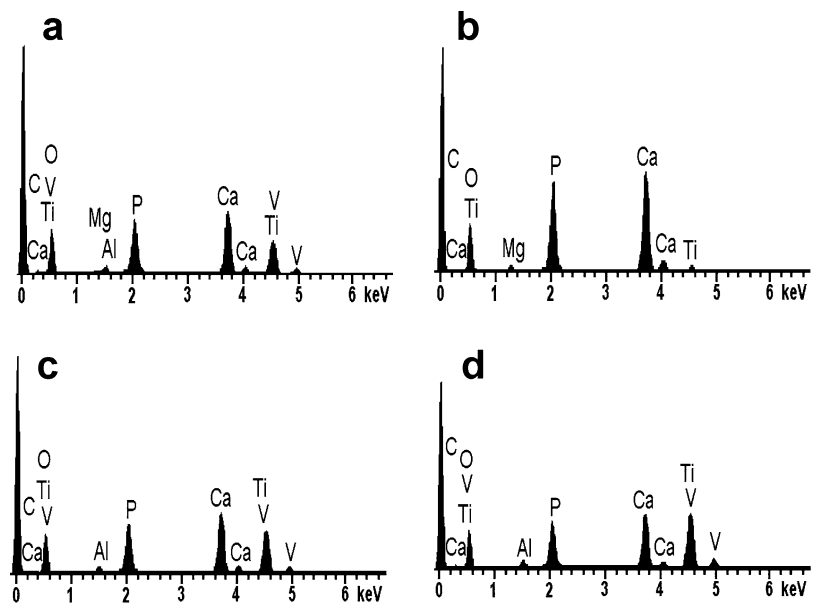


Fig. 6 SEM of electrodeposited calcium phosphate coatings on titanium alloy as function of magnesium and hydrogen carbonate content in the supersaturated electrolyte at 75°C and 20 mA/cm² for 30 min.

(a) $\text{Mg}^{2+} = 0.1 \text{ mM}$, (b) $\text{Mg}^{2+} = 1 \text{ mM}$, (c) $\text{HCO}_3^- = 0.1 \text{ mM}$ and (d) $\text{HCO}_3^- = 1 \text{ mM}$

Fig. 7 EDX spectra of electrodeposited calcium phosphate coatings on titanium alloy as function of magnesium and hydrogen carbonate content in the supersaturated electrolyte at 75°C and 20 mA/cm² for 30 min. (a) $\text{Mg}^{2+} = 0.1 \text{ mM}$, (b) $\text{Mg}^{2+} = 1 \text{ mM}$, (c) $\text{HCO}_3^- = 0.1 \text{ mM}$ and (d) $\text{HCO}_3^- = 1 \text{ mM}$



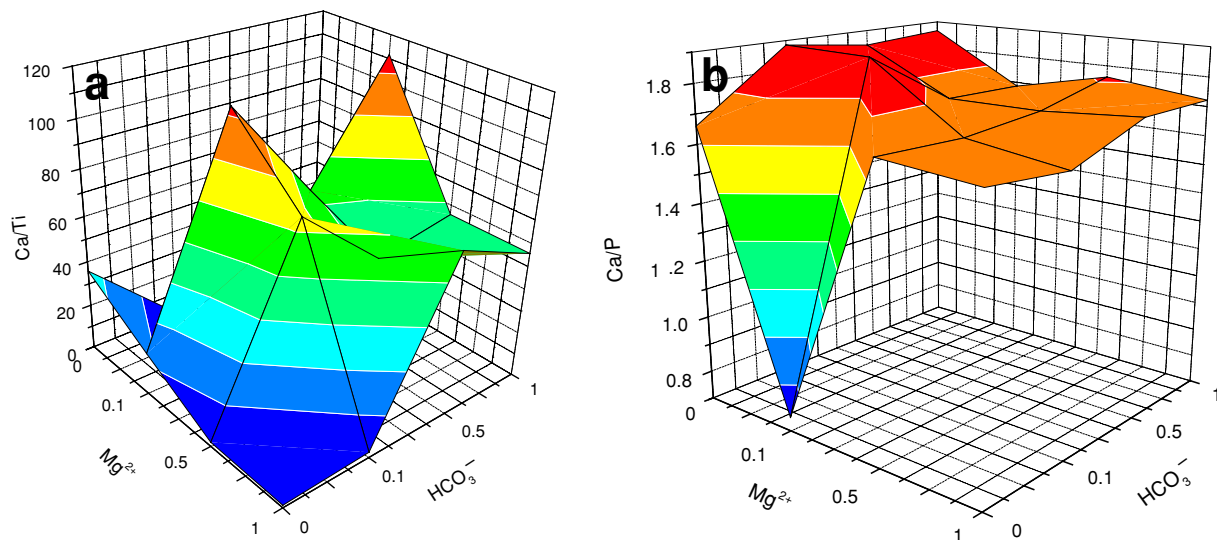
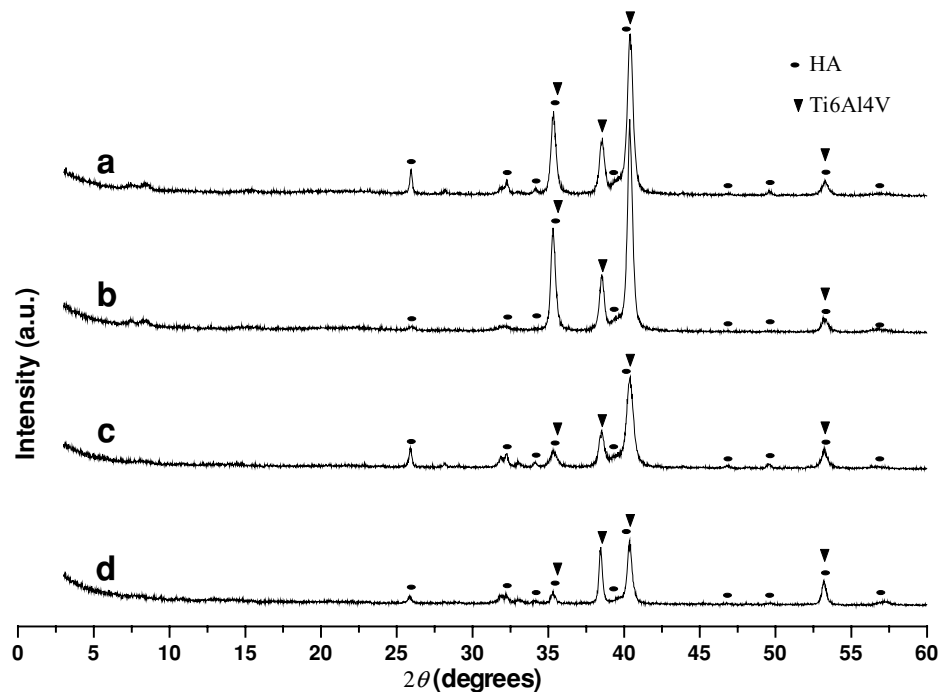


Fig. 8 Ca/Ti and Ca/P ratios measured by EDX for electrodeposited calcium phosphate coatings on titanium alloy as function of magnesium and hydrogen carbonate content ion supersaturated electrolyte for 30 min

Fig. 9 X-ray diffraction patterns of electrodeposited calcium phosphate coatings on titanium alloy as function of magnesium and hydrogen carbonate content in the supersaturated electrolyte at 75°C and 20 mA/cm² for 30 min. (a) Mg²⁺ = 0.1 mM, (b) Mg²⁺ = 1 mM, (c) HCO₃⁻ = 0.1 mM and (d) HCO₃⁻ = 1 mM



density enhances ions transport [24] but at the same time produces more hydrogen gas than at low density. In a general way, a sort of equilibrium between ions transport, apatite precipitation and hydrogen gas production was reached compromising current density with temperature. Indeed, the best homogenous calcium phosphate coatings were obtained with low current densities and high temperatures. These conditions favored the transport of ions and reduced the production of hydrogen. However, the current density affects the deposition time as at low current density the deposition of calcium phosphate requires more time. In our experiments, a

deposition time of 30 min seems to be good enough to form a homogenous calcium phosphate coating on titanium. Ban *et al.* [25] found that there is a relationship between, principally three parameters: Temperature, current density and time of current loading, and that mainly the temperature affected the precipitation and growth of crystals followed in a slightly dependency on the current density. Their findings are in good agreement with the present results. Furthermore, both temperature and pH affects the solubility of calcium phosphates. For a current density higher than 3 mA/cm² it has been reported that pH is higher than 7.4 at the titanium

cathode, a value which is appropriate for hydroxyapatite precipitation [35]. Lin *et al.* [33] reported an electrochemical method in which they performed the deposition under a controlled pulse current time to control the movement of calcium and phosphate ions. From our observations, we can establish that the factor that affected more the uniformity of the coating was the hydrogen gas production. The electrochemical pulsed method might be a good approach for getting uniform coatings on titanium. As the solubility of hydrogen gas depends on the temperature and pressure in the cell, Wang *et al.* [27] improved the electrodeposition process by performing it at low pressure. In this way, the hydrogen bubbles produced on titanium were more easily lifted up from the cathode surface. Kuo *et al.* [32] mentioned that at current densities between 10–20 mA/cm² OH[−] ion concentration is high enough to convert HPO₄^{2−} into PO₄^{3−}. Increasing the concentrations of Mg²⁺ and HCO₃[−] ions had an effect on the uniformity and thickness of coatings. It has been noticed that the magnesium and carbonate ions inhibit the crystal growth of hydroxyapatite and contribute to the kinetics formation of a homogeneous calcium phosphate film [30, 36, 37]. In addition, the content of CO₃^{2−} ions favors the precipitation of a carbonated apatite, which is thermodynamically more stable in water than pure hydroxyapatite [38]. Furthermore, it was found that treatments applied to the surface prior electrodeposition created a rough surface with hydrophobic properties. After electrodeposition, the surface of titanium covered by a calcium phosphate layer was hydrophilic and rough. Both roughness and surface energy are two parameters that are important for cell attachment [39]. Osteoblast attachment and spreading are greater on hydrophilic surfaces compared to hydrophobic surfaces [40]. Laurence *et al.* [40] found that reducing the contact angle of a titanium alloy contributes to a better suitability of it as a biomaterial since with these characteristics there is a better response of human fibroblast and osteoblast cells. Aparicio *et al.* [41] tested titanium surfaces with different roughness, obtained with different grit blasting and thermo chemical treatments, by cultivating human osteoblast cells on their samples. They found out that rough and bioactive surfaces with a hydrophilic behaviour stimulate the initial steps of cell adhesion.

5 Conclusion

Calcium phosphates coatings were deposited on a titanium alloy surface by an electrodeposition method within 30 min. Temperatures around 75°C, low current densities, low Mg²⁺ and HCO₃[−] concentrations favored the uniformity and thickness of coatings. These electrodeposited calcium phosphate coatings are expected to enhance bone tissue apposition and healing around titanium implants. Next efforts will be addressed to study the coatings obtained *in vitro* and *in*

vivo in a next series of experiments to compare in a same study the performance of this methodology only with cells and in a real organism. In the same way, the incorporation of antibiotics into the coatings could be studied.

Acknowledgments Both the French Ministry of research and the Regional Council of Pays de la Loire are acknowledged for their financial support of this research project. The authors are grateful to the CTM for measuring contact angles and surface energy of titanium samples. Mr. Lopez-Heredia would like to thank the CONACyT for his financial grant.

References

1. J. BRETTLE, *Injury* **2**(1) (1970) 26.
2. G. RYAN, A. PANDIT and D. P. APATSIDIS, *Biomaterials* **27**(13) (2006) 2651.
3. U. ROLANDER, L. MATTSSON, J. LAUSMAA and B. KASEMO, *Ultramicroscopy* **19**(4) (1986) 407.
4. C. LARSSON, P. THOMSEN, J. LAUSMAA, M. RODAHL, B. KASEMO and L. E. ERICSON, *Biomaterials* **15**(13) (1994) 1062.
5. J. LAUSMAA, *J. Electron. Spectrosc.* **81**(3) (1996) 343.
6. H. TAKADAMA, H.-M. KIM, T. KOKUBO and T. NAKAMURA, *Sci. Tech. Adv. Mater.* **2**(2) (2001) 389.
7. T. KOKUBO, H.-M. KIM and M. KAWASHITA, *Biomaterials* **24**(13) (2003) 2161.
8. M. TAKEMOTO, S. FUJIBAYASHI, M. NEO, J. SUZUKI, T. MATSUSHITA, T. KOKUBO and T. NAKAMURA, *Biomaterials* **27**(13) (2006) 2682.
9. P. HABIBOVIC, J. LI, C. M. VAN DER VALK, G. MEIJER, P. LAYROLLE, C. A. VAN BLITTERSWIJK and K. DE GROOT, *Biomaterials* **26**(1) (2005) 23.
10. E. GOYENVALLE, E. AGUADO, J.-M. NGUYEN, N. PASSUTI, L. LE GUEHENNEC, P. LAYROLLE and G. DACULSI, *Biomaterials* **27**(7) (2006) 1119.
11. G. DACULSI, O. MALARD and E. GOYENVALLE, *ITBM-RBM* **26**(3) (2005) 218.
12. C. X. WANG, Z. Q. CHEN, L. M. GUAN, M. WANG, Z. Y. LIU and P. L. WANG, *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. Sect. B: Beam Inter. Mater. Atoms* **179**(3) (2001) 364.
13. I.-S. LEE, D.-H. KIM, H.-E. KIM, Y.-C. JUNG and C.-H. HAN, *Biomaterials* **23**(2) (2002) 609.
14. B. FENG, J. Y. CHEN, S. K. QI, L. HE, J. Z. ZHAO and X. D. ZHANG, *Biomaterials* **23**(1) (2002) 173.
15. S. W. K. KWEH, K. A. KHOR and P. CHEANG, *Biomaterials* **23**(3) (2002) 775.
16. L. YAN, Y. LENG and L.-T. WENG, *Biomaterials* **24**(15) (2003) 2585.
17. H. C. GLEDHILL, I. G. TURNER and C. DOYLE, *Biomaterials* **22**(11) (2001) 1233.
18. Y. FU, A. W. BATCHELOR, Y. WANG and K. A. KHOR, *Wear* **217**(1) (1998) 132.
19. Y. FU, A. W. BATCHELOR and K. A. KHOR, *Wear* **230**(1) (1999) 98.
20. M. STIGTER, K. DE GROOT and P. LAYROLLE, *Biomaterials* **23**(20) (2002) 4143.
21. Y. LIU, K. DE GROOT and E. B. HUNZIKER, *Bone* **36**(5) (2005) 745.
22. M. STIGTER, J. BEZEMER, K. DE GROOT and P. LAYROLLE, *J. Control. Release* **99**(1) (2004) 127.
23. S. BAN and S. MARUNO, *Biomaterials* **16**(13) (1995) 977.

24. S. BAN and S. MARUNO, *Biomaterials* **19**(14) (1998) 1245.
25. S. BAN and J. HASEGAWA, *Biomaterials*. **23**(14) (2002) 2965.
26. S. ROSSLER, A. SEWING, M. STOLZEL, R. BORN, D. SCHARNWEBER, M. DARD and H. WORCH, *J. Biomed. Mater. Res. A* **64**(4) (2003) 655.
27. S.-H. WANG, W.-J. SHIH, W.-L. LI, M.-H. HON and M.-C. WANG, *J. Eur. Ceram. Soc.* **25**(14) (2005) 3287.
28. W.-J. SHIH, Y.-H. CHEN, S.-H. WANG, W.-L. LI, M.-H. HON and M.-C. WANG, *J. Cryst. Growth* **285**(4) (2005) 633.
29. S. BAN and S. MARUNO, *J. Biomed. Mater. Res.* **42**(3) (1998) 387.
30. F. BARRERE, P. LAYROLLE, C. A. VAN BLITTERSWIJK and K. DE GROOT, *Bone* **25**(2) (Suppl. 1) (1999) 107S.
31. X. LU and Y. LENG, *Biomaterials* **26**(10) (2005) 1097.
32. M. C. KUO and S. K. YEN, *Mat. Sci. Eng. C* **20** (1–2) (2002) 153.
33. S. LIN, R. Z. LEGEROS and J. P. LEGEROS, *J. Biomed. Mater. Res. A* **66**(4) (2003) 819.
34. X. HOU, X. LIU, J. XU, J. SHEN and X. LIU, *Mater. Lett.* **50** (2–3) (2001) 103.
35. J. M. ZHANG, C. J. LIN, Z. D. FENG and Z. W. TIAN, *J. Electroanal. Chem.* **452**(2) (1998) 235.
36. F. BARRERE, C. A. VAN BLITTERSWIJK, K. DE GROOT and P. LAYROLLE, *Biomaterials* **23**(10) (2002) 2211.
37. F. BARRERE, C. A. VAN BLITTERSWIJK, K. DE GROOT and P. LAYROLLE, *Biomaterials* **23**(9) (2002) 1921.
38. J.-H. PARK, D.-Y. LEE, K.-T. OH, Y.-K. LEE, K.-M. KIM and K.-N. KIM, *Mater. Lett.* In Press, Corrected Proof.
39. M. SVEHLA, P. MORBERG, W. BRUCE, B. ZICAT and W. R. WALSH, *J. Arthroplasty* **17**(3) (2002) 304.
40. J. LAWRENCE, L. HAO and H. R. CHEW, *Surf. Coat. Tech.* **200** (18–19) (2006) 5581.
41. C. APARICIO, F. J. GIL, J. A. PLANELL and E. ENGEL, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **13**(12) (2002) 1105.

Chapitre 3. Discussion

La technique plasma de RF utilisée a produit une énergie autour de 10 eV. Cette énergie n'est pas suffisante pour implanter de façon importante des ions sur la surface du titane. Le gaz de plasma se comporte plus comme une décharge gazeuse. Néanmoins, les gaz dans cet état sont composés de radicaux et d'espèces ionisées. Ces espèces réactives peuvent rentrer en collision avec la surface de titane modifiant ainsi sa composition. Comme il a été vu par Tereshko *et al* [167, 169] le bombardement des surfaces solides par des ions de basse énergie conduit à des oscillations non linéaires des atomes résultant dans la formation d'une nouvelle structure métastable et durable dans le réseau cristallin. Cette modification peut être due à une recombinaison de la structure après la collision des espèces ionisées ou radicales produites par le plasma de basse énergie [169, 175, 176]. En son état naturel, la couche externe de TiO₂ contient du carbone provenant de contaminations [24, 164]. Les résultats des analyses XPS ont indiqué un effet positif des traitements plasma de RF sur la surface des échantillons Ti pour diminuer fortement cette contamination de carbone à la surface. Pour les échantillons Ti, l'oxygène est plus présent après traitements plasma de RF, ce qui suggère une oxydation du carbone aliphatique provenant de la contamination en groupes hydroxyles et carboxyles (Tableau 2). Cette tendance a également été observée sur les composantes du pic Ti2p des échantillons ayant subis un traitement plasma de RF sous une atmosphère de N₂. Quand le Ti est traité avec du plasma de RF sous N₂ ou N₂/O₂ la région sous la courbe de C=O a été réduite (Fig 4) en corrélation avec la quantité de carbone. Cette diminution de la contamination du carbone sur le titane après les traitements plasma de RF sous des atmosphères de N₂ ou N₂/O₂ peut être liée à la génération d'espèces volatiles contenant du carbone, ainsi que de l'azote ou de l'oxygène (e.g. HCN, CH₃CN).

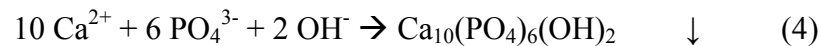
Pour les échantillons TiNa, Kokubo a montré que le traitement alcalin introduit des groupes OH et produit un hydrogel du titanate du sodium [33]. Takadama *et al* [148] ont également noté la présence de sodium, détectée par XPS après le traitement alcalin. Le traitement alcalin est favorable à la nucléation hétérogène de PCa et joue un rôle important dans la bioactivité du titane [33, 34, 85, 150]. Au cours de l'immersion, la libération de OH *via* des échanges ioniques entre le Na⁺ et le Ca²⁺ augmente le pH à la surface du titane. Cette augmentation locale du pH conduit à la précipitation de PCa sur la surface du titane à partir de la solution supersaturée.

Dans cette étude, des revêtements non uniformes et une croissance cristalline ont été observés pour les échantillons de titane sans traitement alcalin (Fig 6). Néanmoins, les traitements plasma de RF après traitement alcalin ont eu un effet favorable sur la nucléation hétérogène de PCa comme le montrent l'uniformité et l'épaisseur des revêtements obtenus (Tableau 3). La composition chimique des surfaces a été modifiée après les traitements alcalins et plasma de RF (Tableau 2, Fig 5). Les pics du C1s des échantillons TiNa ayant subis les traitements plasma étaient similaires. Toutefois, la quantité de carbone était plus importante sur les surfaces traitées par plasma RF. Ces résultats suggèrent que la contamination de carbone puisse rester emprisonnée dans l'hydrogel de titanate de sodium même après réaction chimique avec les espèces réactives générées par le plasma RF. L'augmentation de la quantité de carbone peut également résulter de la déshydratation partielle de l'hydrogel de titanate de sodium lors des traitements plasma RF. Les courbes de O1s pour le TiNa ont corroboré ces observations. Le pic d'oxygène qui est en relation avec les groupes OH⁻ dans l'hydrogel de titanate de sodium semble plus abondant après les traitements plasma de RF (Fig 5). Ces groupes OH peuvent augmenter le pH de la solution CPS aux environs de la surface de titane favorisant la précipitation de PCa. Les traitements plasma de RF peuvent aussi introduire des groupes chimiques polaires, comme le carbonyle, l'ester, l'hydroxyle et le carboxyle. Ces groupes chimiques pourraient complexer le Ca²⁺ ou se lier à l'HPO₄²⁻ et ainsi aider à la nucléation hétérogène de PCa [177]. Les traitements plasma de RF utilisés ont aussi démontré être une étape efficace dans l'amélioration de la bioactivité du titane, comme montré par la formation d'un revêtement de PCa uniforme et épais après immersion dans une solution CPS.

Certains paramètres ont été étudiés pour revêtir le titane et ses alliages avec du phosphate de calcium. Plusieurs propriétés physico-chimiques de surface favorisent la nucléation hétérogène des nuclei de PCa sur le titane [68, 152, 178, 179]. La rugosité et l'énergie de surface sont deux paramètres qui sont importants pour l'attachement cellulaire [180]. De plus, Il a été démontré que l'hydrophilicité de la surface favorise la nucléation hétérogène des nuclei de PCa sur le titane [68, 179]. Les traitements de sablage et de mordantage acide appliqués à la surface avant l'électrodéposition ont créé une surface rugueuse avec des propriétés hydrophobes. Après l'électrodéposition, la surface du titane a été couverte d'une couche de phosphate de calcium hydrophile et rugueuse. Il a été également montré que le traitement alcalin sur le titane rend la surface plus hydrophile [181]. Nous avons aussi observé que le traitement alcalin diminue l'angle de contact, ce qui augmente l'hydrophilicité de la surface de titane.

Un autre facteur qui peut influencer la nucléation est la présence de groupes chimiques à la surface. Pour les groupes chimiques comme le OH, le COOH et le NH₂ il a été démontré qu'ils peuvent se lier chimiquement avec les ions Ca²⁺ et HPO₄²⁻ présents dans la solution sursaturée et ainsi favoriser la nucléation hétérogène de PCa.

Dans le procédé électrochimique, le gaz d'hydrogène et les ions d'hydroxyle ont été produits sur la surface de titane (cathode). Les électrolytes supersaturés utilisés pour déposer le revêtement de PCa dans l'électrodéposition ont été tamponnés à pH 7.4. La production d'ions d'hydroxyle à la surface du titane a augmenté de façon locale le pH de l'électrolyte supersaturé créant une précipitation d'hydroxyapatite comme indiqué dans les équations suivantes :



Ces réactions sont considérées comme ayant un effet majeur sur la précipitation du phosphate de calcium par la production des ions hydroxyle et l'augmentation locale du pH en surface du titane [68]. Il est bien connu [92-94, 182, 183] que près de la surface de la cathode la réduction de l'eau produit du gaz hydrogène. Ce dégagement d'hydrogène peut perturber la déposition de cristaux du phosphate de calcium sur la surface du titane. L'agitation de l'électrolyte a pour objectif d'aider à l'évacuation du gaz hydrogène et à améliorer l'uniformité du revêtement [99]. Dans ce procédé d'électrodéposition, nous avons également noté qu'une augmentation de la température affecte l'uniformité des revêtements. En effet, l'augmentation de la température facilite le transport des ions et la croissance cristalline des cristaux d'hydroxyapatite [93] générant des revêtements plus uniformes et plus épais. Une haute densité de courant améliore également le transport des ions [94] mais en même temps elle produit plus de gaz d'hydrogène par rapport à une densité plus basse. Un équilibre entre le transport des ions, la précipitation d'apatite et la production de gaz d'hydrogène a été accomplie en équilibrant la densité de courant avec la température. Ban *et al* [92] ont trouvé qu'il y avait une relation entre ces trois paramètres : température, densité de courant et temps

d'application du courant. La température a affecté la précipitation et la croissance des cristaux mais le procédé d'électrodéposition reste peu dépendant de la densité du courant. Nos résultats concordent bien avec ces observations. De plus, la température et le pH affectent la solubilité des phosphates de calcium. Pour une densité de courant plus élevée que 3 mA/cm^2 il a été rapporté que le pH est supérieur à 7.4 sur la cathode de titane favorisant ainsi la précipitation de l'hydroxyapatite [184]. Lin *et al* [182] ont décrit une méthode électrochimique dans laquelle ils effectuent une déposition avec des pulsations de courant dans un certain intervalle de temps pour contrôler le mouvement des ions de phosphate et de calcium. D'après nos observations, nous pouvons établir que le facteur qui a affecté le plus l'uniformité du revêtement a été la production du gaz hydrogène. La méthode de l'électrodéposition par pulsations peut être une approche intéressante pour obtenir des revêtements uniformes sur le titane. Puisque la solubilité du gaz d'hydrogène dépend de la température et de la pression dans la cellule, Wang *et al* [95] ont amélioré la procédure d'électrodéposition en la réalisant à basse pression. De cette façon les bulles d'hydrogène produites sur le titane sont plus facilement enlevées de la surface de la cathode. Kuo *et al* [183] indiquent que pour les densités de courant entre $10\text{-}20 \text{ mA/cm}^2$ la concentration des ions OH^- est assez élevée pour convertir l' HPO_4^{2-} en PO_4^{3-} .

Le fait d'augmenter les concentrations des ions Mg^{2+} et HCO_3^- dans l'électrolyte a un effet sur l'uniformité et sur l'épaisseur du revêtement. Il a été constaté que les ions magnésium et carbonate inhibent la croissance cristalline de l'hydroxyapatite et contribuent à la cinétique de formation d'un film homogène du phosphate de calcium [70, 185, 186]. De plus, la quantité des ions CO_3^{2-} favorise la précipitation d'une apatite carbonatée, qui est thermodynamiquement plus stable dans l'eau que l'hydroxyapatite pure [187]. Pendant l'électrodéposition des revêtements homogènes ont été déposés sur le titane dans un temps relativement court, *e.g.* 30 min. Comme démontré, par diffraction des rayons X, le revêtement obtenu est composé d'une apatite phosphocalcique faiblement cristallisée. Manifestement, le revêtement de phosphate de calcium le plus homogène obtenu a été celui produit avec de basses densités de courant et de hautes températures. Ces conditions ont favorisé le transport des ions et ont réduit la production d'hydrogène. Or, le courant affecte le temps de déposition car à une basse densité de courant la déposition de phosphate de calcium a besoin de plus de temps. Lors de nos expériences, un temps de déposition de 30 minutes semble être suffisant pour obtenir un revêtement de phosphate de calcium homogène sur le titane.

Dans ce chapitre, nous avons montré diverses approches originales pour augmenter la bioactivité des implants en titane. Les traitements alcalins et plasma RF sous diverses atmosphères permettent d'augmenter la mouillabilité des surfaces. Le traitement plasma permet une diminution importante de la contamination en carbone. Ces traitements favorisent ainsi la nucléation hétérogène de phosphate de calcium à la surface du titane à partir de solutions sursaturées. L'électrodéposition permet également de revêtir des implants en titane d'une couche d'épaisseur uniforme d'environ 25 μm et composée d'une apatite carbonatée. Ces revêtements sont obtenus dans des conditions biomimétiques dans des temps relativement courts (30 min).

Chapitre 4

Madness is the ability to make fine distinctions on different kind of nonsense

Stanislaw Ulam

L'association de cellules souches et de matrices en titane poreux pour l'ingénierie tissulaire osseuse

Article 4 : M.A. Lopez-Heredia, J. Sohier, C. Gaillard, S. Quillard, M. Dorget, and P. Layrolle. **Rapid prototyped porous titanium coated with calcium phosphate as scaffold for bone tissue engineering.** *Biomaterials* 29(17) 2008, p 2608 - 2615

Chapitre 4. Introduction

Le titane est largement utilisé pour la fabrication de prothèses orthopédiques et d'implants dentaires. Néanmoins, sa performance clinique à long terme peut être mise en péril par des forces de cisaillement intervenant à l'interface os-implant [22]. Le titane poreux présente des propriétés mécaniques diminuées, par rapport au titane solide, et peut être une solution pour approcher les caractéristiques mécaniques du tissu osseux [129]. Plusieurs méthodes visant à créer une structure poreuse dans des implants en titane ont été étudiées et certaines appliquées cliniquement [22, 36, 129]. Le prototypage rapide (PR) est une nouvelle technique qui permet la fabrication de matériaux poreux avec une structure et une porosité contrôlée [62, 63].

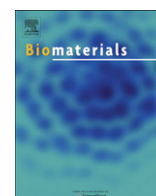
Les revêtements du phosphate de calcium (PCa) appliqués au titane ont montré une amélioration de l'apposition osseuse et de la fixation biologique [151]. Malgré cela, ces revêtements sont usuellement appliqués en utilisant la projection d'hydroxyapatite par torche à plasma à hautes températures. Ce procédé ne permet pas l'obtention de revêtements uniformes sur des implants poreux et conduit à des mélanges de phases de bioactivité différentes [152]. Nous avons développé récemment une méthode alternative pour revêtir des implants en titane d'un revêtement uniforme de PCa en utilisant des solutions physiologiques et une méthode électrochimique [154]. Cette méthode d'électrodéposition permet d'obtenir des revêtements ostéoconducteur qui conduisent à une apposition directe du tissu osseux sur la surface de l'implant en titane.

Dans certaines situations cliniques, il est cependant nécessaire d'apporter des propriétés ostéogéniques aux implants afin de promouvoir la cicatrisation osseuse [188]. Il a été montré que les cellules souches mésenchymales (CSM) provenant de la moelle osseuse,ensemencées et cultivées sur des structures poreuses de PCa dans des conditions ostéogéniques induisent la formation d'os nouveau *in vivo* [105-110]. Ces matériaux hybrides peuvent être une bonne alternative, dans un futur proche, à la transplantation d'os autologue [120]. Pour l'instant ils peuvent être utilisés dans la reconstruction de défauts osseux de grande taille, après la suppression chirurgicale des tumeurs dans une zone irradiée [117-119] ou dans les régions ostéoporotiques où le remodelage osseux est limité [115, 116]. Toutefois, les matériaux poreux céramiques ont de faibles propriétés mécaniques qui limitent leurs applications à des zones non portantes du squelette. Il a été montré que l'adhésion de cellules est similaire sur

des surfaces lisses, rugueuses ou revêtues du phosphate de calcium [103]. Les structures hybrides de CSM et de PCa ont démontrées de meilleures propriétés ostéogéniques en comparaison au titane après une implantation sous cutanée chez le rat [102, 106-108].

L'objectif de notre étude est d'évaluer les propriétés de biocompatibilité et d'ostéogénicité d'une structure en titane poreux produite par prototypage rapide, avec un revêtement de PCa obtenu par la méthode d'électrodéposition, en utilisant des cellules souches mésenchymateuses de rat (CSMR). Les structures en titane poreux revêtues avec de PCa ont été caractérisées grâce à la Tomographie assistée par ordinateur (μ CT), la Microscopie Electronique à Balayage (MEB), la Microscopie à Force Atomique (MFA), l'Analyse d'Energie dispersive de Rayons X (EDX) et la Spectroscopie de Raman (Raman). L'adhésion et la prolifération cellulaire des CSMR sur les structures en titane on été déterminés en utilisant le test du Bleu d'Alamar. Les structures hybrides ont été implantées durant quatre semaines sous la peau des rats syngéniques. A la fin de la période d'implantation, les explants ont été analysés par histologie.

M.A. Lopez-Heredia, J. Sohier, C. Gaillard, S. Quillard, M. Dorget, and P. Layrolle. **Rapid prototyped porous titanium coated with calcium phosphate as scaffold for bone tissue engineering.** *Biomaterials* 29 (17) 2008, p. 2608 - 2615.



Rapid prototyped porous titanium coated with calcium phosphate as a scaffold for bone tissue engineering

Marco A. Lopez-Heredia^a, Jerome Sohier^a, Cedric Gaillard^b, Sophie Quillard^a, Michel Dorget^c, Pierre Layrolle^{a,*}

^aINSERM, U791, Laboratoire d'ingénierie ostéoarticulaire et dentaire, Faculté de chirurgie dentaire, Université de Nantes, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes, France

^bCentre de Transfert de Technologies du Mans, 20 Rue Thalès de Milet, 72000 Le Mans, France

^cINRA, Laboratoire de Microscopie, Plateforme RIO BIBS, U.R. Biopolymères, Intéractions, Assemblages, Rue de la Géraudière, 44316 Nantes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 November 2007

Accepted 28 February 2008

Available online 20 March 2008

Keywords:

Titanium

Rapid prototyping

Scaffold

Electrodeposition

CaP coating

ABSTRACT

High strength porous scaffolds and mesenchymal stem cells are required for bone tissue engineering applications. Porous titanium scaffolds (TiS) with a regular array of interconnected pores of 1000 μm in diameter and a porosity of 50% were produced using a rapid prototyping technique. A calcium phosphate (CaP) coating was applied to these titanium (Ti) scaffolds with an electrodeposition method. Raman spectroscopy and energy dispersive X-ray analysis showed that the coating consisted of carbonated hydroxyapatite. Cross-sectioned observations by scanning electron microscopy indicated that the coating evenly covered the entire structure with a thickness of approximately 25 μm . The bonding strength of the coating to the substrate was evaluated to be around 25 MPa. Rat bone marrow cells (RBMC) were seeded and cultured on the Ti scaffolds with or without coating. The Alamar Blue assay provided a low initial cell attachment (40%) and cell numbers were similar on both the uncoated and coated Ti scaffolds after 3 days. The Ti scaffolds were subsequently implanted subcutaneously for 4 weeks in syngenic rats. Histology revealed the presence of a mineralized collagen tissue in contact with the implants, but no bone formation. This study demonstrated that porous Ti scaffolds with high strength and defined geometry may be evenly coated with CaP layers and cultured mesenchymal stem cells for bone tissue engineering.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Titanium is widely used for manufacturing orthopedic and dental devices under load bearing applications. However, their long term clinical performance may be compromised by the different mechanical properties exhibited by titanium when compared to those of bone, creating a stress shielding effect at the bone–implant interface [1]. Porous titanium presents diminished mechanical properties compared to the solid material and thus may address this issue by approaching its mechanical properties to those of bone [2]. Several methods to create a porous structure have been studied and some of them are applied clinically [1–3]. Rapid prototyping (RP) is a novel technique that allows the fabrication of porous materials with a well-defined structure and controlled porosity [4,5]. Calcium phosphate (CaP) coatings applied on titanium implants have been shown to enhance bone apposition and biological fixation [6]. However, these coatings are usually applied using high temperatures and line-of-sight processes such as plasma spraying, producing non-biomimetic and uneven CaP layers on

porous implants [7]. We have recently developed an alternative electrochemical method to coat titanium implants with even CaP coatings using physiological solutions by an electrodeposition method [8]. Although osteoconductive coatings enhance bone-implant contact, there are a number of clinical situations where osteogenic property is required to fill the gap between implant and host bone [9]. Mesenchymal stem cells (MSC) derived from bone marrow, seeded and cultured on porous CaP scaffolds under osteogenic conditions prompted *de novo* bone formation *in vivo* [10–13]. In the future, these hybrid constructs may be a good alternative to autologous bone transplantation [14]. For instance, they can be useful for the reconstruction of large bone defects after the ablation of tumors in irradiated area [15–17] or in osteoporotic regions where bone remodeling is limited [18,19]. However, porous CaP ceramic scaffolds have low mechanical strength preventing their use in load bearing indications. The attachment of cells is similar on soft, rough or calcium phosphate-coated materials [20]. Hybrid constructs of MSCs and CaP scaffolds have demonstrated better osteogenic properties compared to titanium after subcutaneous implantation in mice [10,21,22].

The aim of this study was to assess the biocompatibility and osteogenic property of rapid prototyped porous titanium with

* Corresponding author. Tel.: +33 2 40 41 29 20; fax: +33 2 40 08 37 12.

E-mail address: pierre.layrolle@nantes.inserm.fr (P. Layrolle).

electrodeposited CaP coating as scaffolds for rat bone marrow cells (RBMC). The CaP-coated porous titanium scaffolds were characterized by means of Microcomputer Tomography (μ CT), Scanning Electron Microscopy (SEM), Atomic Force Microscopy (AFM), Energy Dispersive X-ray analysis (EDX) and Raman spectroscopy (Raman). The attachment and proliferation of RBMC on these Ti scaffolds were determined using Alamar Blue Assay. Hybrid constructs were then implanted for 4 weeks under the skin of syngenic rats and analyzed by histology.

2. Materials and methods

2.1. Porous Ti scaffold fabrication

Porous titanium scaffolds (TiS) were built using a rapid prototyping technique and a cast investment process [23]. In short, porous discs of $15 \text{ } \varnothing \times 6 \text{ mm}$ with regular channels of pores $1000 \text{ }\mu\text{m}$ in size and 50% porosity were designed by using a computer assisted design (CAD) software (CATIA, INCAT Int. USA). Corresponding cylindrical wax patterns were printed using a rapid prototyping machine (MM2, Solidcape Inc.). Subsequently, these wax models were filled with a refractory material (Titavest, J. Morita Europe GmbH) to obtain a ceramic mould in which commercially pure titanium (c.p. Ti grade 2, Eukamed e.k.) was melted and poured under vacuum to finally obtain metallic replicas. The porous titanium scaffolds were cleaned by grit blasting using biphasic calcium phosphate particles (BCP, 200–400 μm , Biomatlante SAS, France), subsequently etched in a mixture of acids (6 ml HNO_3 50%, 3 ml HF 40% and 991 ml of water) and finally thoroughly rinsed in demineralized water. These procedures removed residual refractory and BCP grit blasting material from the titanium surface. BCP grit blasting and acid etching produced a rough surface on titanium that was beneficial for CaP coating adhesion and the attachment of cells. The samples were dried in a furnace at 90°C overnight and stored in sterile cell culture dishes (6 well-plates, Corning BV).

2.2. CaP coating of the Ti scaffolds

Prior to coating, the surface and porosity of TiS were determined using three-dimensional microcomputer tomography (μ CT, SkyScan 1072) and software (CT Analyzer 1.5.0.2). An X-ray source was kept constant at 100 kV and 10 mA (10 W). A 1 mm aluminium filter was used during the scanning. Series of 2D radiographic projections at different viewing angles, ranging from 0 to 180° , with a rotational step of 0.45° , were recorded. The 3D implant structure was reconstructed from the 2D projections using software (Nrecon, SkyScan). The surface was measured from five Ti scaffolds and averaged. For the electrochemical coating process, the Ti scaffold was used as the cathode and a platinum mesh (Pt) as a working electrode [8]. A supersaturated calcium phosphate solution (CPS) was used as the electrolyte and currents with densities of 10 and 20 mA/cm^2 were applied between the two electrodes for 30 min at 75°C . The electrolyte was prepared by dissolving given amounts of reagent-grade chemicals (VWR, France) NaCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 and $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, in demineralized water to obtain the ion concentration given in Table 1. The supersaturated electrolyte was buffered to pH 7.4 using tris(hydroxymethyl amino methane) and 1 M HCl. After coating, samples were rinsed with demineralized water and dried in cell culture dishes at 37°C .

2.3. Characterization of the CaP-coated porous Ti scaffolds

The CaP coating was characterized using a MicroRaman spectrometer (Jobin Yvon T64000) with a cooled CCD detector. The Raman spectra were obtained using an excitation wavelength of 514 nm. Scanning electron microscopy observation (SEM, Leo 1450VP) was performed on the samples. Energy dispersive X-ray (Oxford Instruments) was performed at 15 keV and a working distance of 15 mm. The atomic Ca/P ratio of the electrodeposited CaP coating was measured by EDX. In order to verify the evenness of the CaP coating, two Ti scaffolds were embedded in polymethylmethacrylate resin and subsequently cross-sectioned in the middle using a diamond saw (Leica SP1600). The thickness of the coating was measured using SEM images of the cross-sectioned Ti scaffold ($n=4$). The adhesion of the coating was tested on CaP-coated discs prepared in similar conditions as the Ti scaffolds. The coated discs were fixed to a platform and a die containing a double-faced tape (Nitto tape, Denko Co.) was applied onto the coating. The die was pulled out at a crosshead rate of 1 mm/min using a mechanical testing machine (TA HD plus 5022, Stable

micro systems). The bonding strength between the titanium disc without coating and the double-faced tape was determined and considered as the blank. Measurements were repeated with 5 samples and averaged.

The surfaces of titanium discs prepared in similar conditions (BCP grit blasting, acid etching, cleaning, electrodeposited CaP coating, drying) were observed by atomic force microscopy (AFM, Digital Instruments, Santa Barbara, CA). AFM images of uncoated (TiS) and coated (TiC) surfaces were recorded using tapping mode and conventional pyramidal silicon nitride cantilevers. All the tapping mode images (both amplitude and topography images) were acquired at a stable scanning force of around 100 nN . Analysis over a large area ($20 \times 20 \text{ }\mu\text{m}^2$) was used to obtain average surface roughness. Roughness in the nanometer range was determined from cross-sections taken along a horizontal line (A–B or A'–B') of high magnification images ($1 \times 1 \text{ }\mu\text{m}^2$) of TiS and TiC surfaces, respectively.

A finite element model (FEM) was created using CAD software (I-deas, Structural Dynamics Research Co.), and a second-degree parabolic hexaedral mesh (topology for the reconstruction surface) was used for the simulation of the model (Code Aster). Due to symmetry of the sample FEM was performed in a quarter of the cylinder. Boundary conditions applied to this quarter, in order to respect the symmetry conditions for the test, consisted in blocking all the freedom degrees in translation where nodes were in contact with the rest of the sample such that letting this happen (translation) will violate the symmetry conditions of the sample. In the same manner, all the degrees of freedom in rotation were also restricted where translation in the later situation was allowed. For example, if a node is blocked in the X direction, translation will be allowed in the Y and Z direction but in these directions rotation will be blocked while it will not be in X. For the mechanical testing of the porous titanium implants, axial compression was performed in static mode. Five samples were used to perform the tests ($n=5$). The data were measured using a mechanical test bench (ReNew SMA, MTS Systems Corp.). All the tests were performed at a cross-head speed of 0.6 mm/min . The 0.2%-offset yield strength and the elastic modulus were calculated for each sample and averaged.

2.4. Cell culturing of RBMC on the porous Ti scaffolds

Rat bone marrow cells (RBMC) were harvested from the femur of 4 week-old male syngenic rats (Lewis 1A, Elevage Janvier, France). The experimental protocol was approved by the local ethical committee for care and use of animals. The harvesting of rat bone marrow was performed as previously described in Ref. [24]. In brief, rats were placed under general anesthesia using isoflurane inhalation (Aer-rane, Baxter SA, France) and euthanized by an intracardiac injection of an overdose of sodium pentobarbital (Pentobarbital, Vetoquinol SA, France). The femurs were rapidly dissected, placed in warm alpha Minimum Essential Medium (α -MEM) (37°C) and transported under a laminar airflow cabinet. Femurs epiphyses were subsequently sectioned with large sterile scissors and the bone marrow flushed over a $70 \text{ }\mu\text{m}$ cell strainer using an 18G needle and 1 ml of α -MEM supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 100 UI/ml penicillin, $100 \text{ }\mu\text{g/ml}$ streptomycin and 2 mM L-glutamine. The resulting cells were plated in T75 cell culture flasks with 10 ml of supplemented α -MEM. The medium was refreshed after 3 days and then twice a week before attaining cell confluency. Cells were passaged with 0.05% trypsin/EDTA (a serine protease and ethylenediaminetetraacetic acid) to obtain the primary cells, and cryo-preserved in 50% supplemented α -MEM, 40% FBS and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO). For amplification, RBMC cells were thawed, plated, grown until confluent in α -MEM supplemented with 10% FBS, 100 UI/ml penicillin, $100 \text{ }\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 2 mM L-glutamine and then passaged. The uncoated (TiS) and CaP-coated (TiC) Ti scaffolds were individually double packaged and steam sterilized at 121°C for 20 min. RBMC were seeded on both Ti scaffolds using an initial cell density of 1×10^6 cells/scaffold or 4×10^4 cells/ cm^2 . Ultra low-attachment cell culture plates (Corning, France) were used to prevent cells from adhering to the plastic rather than to the titanium scaffolds. Cells were cultured in α -MEM culture medium supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine, $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ dexamethasone, 10 mM

Table 2

Physicochemical and mechanical properties of the porous Ti scaffolds with the electrodeposited calcium phosphate coating

		Theoretical	Experimental
Porous titanium scaffold	Diameter (mm)	15	15 ± 0.06
	Height (mm)	6	6.0 ± 0.19
	Porosity (%)	50	50.4 ± 4.7
	Pore size (μm)	1000	958 ± 49
	Surface area (cm^2)	–	25.2 ± 1.0
	Surface roughness (μm)	–	1.25 ± 0.25
	Compressive strength (MPa)	95	82.5 ± 24.3
	Elastic modulus (GPa)	12.5	2.7 ± 0.8
Ca/P coating	Ca/P	–	1.65 ± 0.17
	Thickness (μm)	–	25 ± 3
	Surface roughness (μm)	–	1.45 ± 0.15
	Bonding strength (MPa)	–	25.5 ± 0.9

Table 1

Ion concentrations of human blood plasma and supersaturated calcium phosphate (CPS) solution (mM)

	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	HCO_3^-	HPO_4^{2-}	SO_4^{2-}
Human blood plasma	142.0	5/0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
CPS	140.9	–	0.5	4.0	144.9	0.5	2.0	–

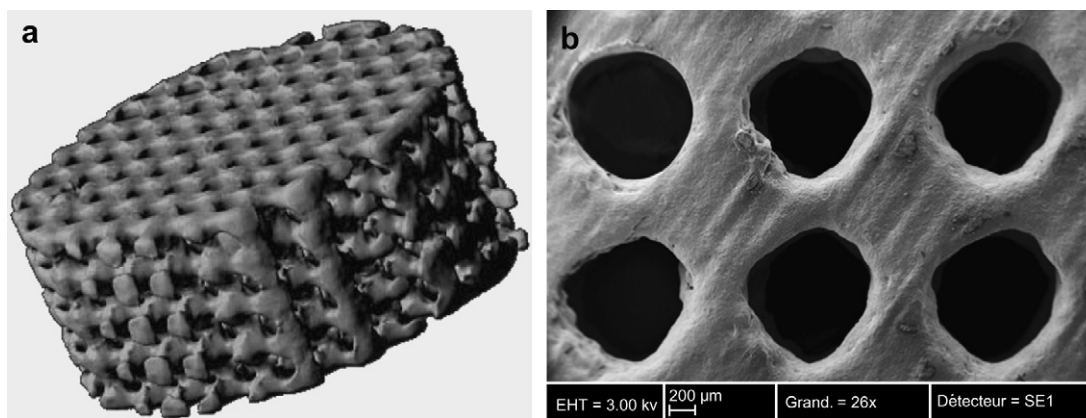


Fig. 1. Pictures of the rapid prototyped porous Ti scaffold (a) μ CT reconstruction and (b) SEM micrograph.

β -glycero phosphate and 0.2 mM ascorbic acid. After 1 or 3 days of culture, cell proliferation was measured using an Alamar blue assay ($n = 3$) (BioSource Europe). Statistical significance of the results was assessed using the student *t*-test. Different cells' densities were seeded in normal plastic wells to be used as standards for comparison.

For cell morphology observation, two samples of each group with cultured RBMC cells on uncoated and CaP-coated porous Ti scaffolds were fixed in a 2.5% glutaraldehyde solution. Subsequently, the Ti scaffolds were dehydrated in a series of ethanol baths and dried using a critical point dry system (CPD 03, Bal-Tec). Dried samples were sputtered by using a gold–palladium target (Denton Vacuum Desk III) and observed by SEM.

2.5. Subcutaneous implantation of the porous Ti scaffolds with RBMC cells

After a 3-day period of cell culture, the Ti scaffold samples were implanted into dorsal subcutaneous pouches of rats under general anesthesia (4% isoflurane inhalation). Two samples of each group were implanted per animal: uncoated porous Ti scaffolds (TiS), CaP-coated porous Ti scaffold (TiC), uncoated with cultured

RBMC cells (TiSR) and CaP-coated with cultured RBMC cells (TiCR). After 4 weeks of implantation, animals were sacrificed using an overdose of carbon dioxide gas and explants were dissected and immediately fixed in a buffered 10% formaldehyde solution.

2.6. Histology

Fixed samples were dehydrated in a series of ethanol solutions and embedded in polymethylmethacrylate resin. Blocks were cut in half (Leica SP1600) and histological sections of $\approx 100 \mu\text{m}$ were observed using polarized light microscopy (Zeiss Axioplan 2). Contiguous images of carbon sputtered blocks were acquired at $\times 70$ magnification using back-scattered electron microscopy (SEM, Leo 1450VP). EDX microanalyses were performed to detect Ca, P deposits and coatings.

3. Results

As reported in Table 2, the titanium scaffolds were produced in a reproducible way with suitable accuracy and well-interconnected

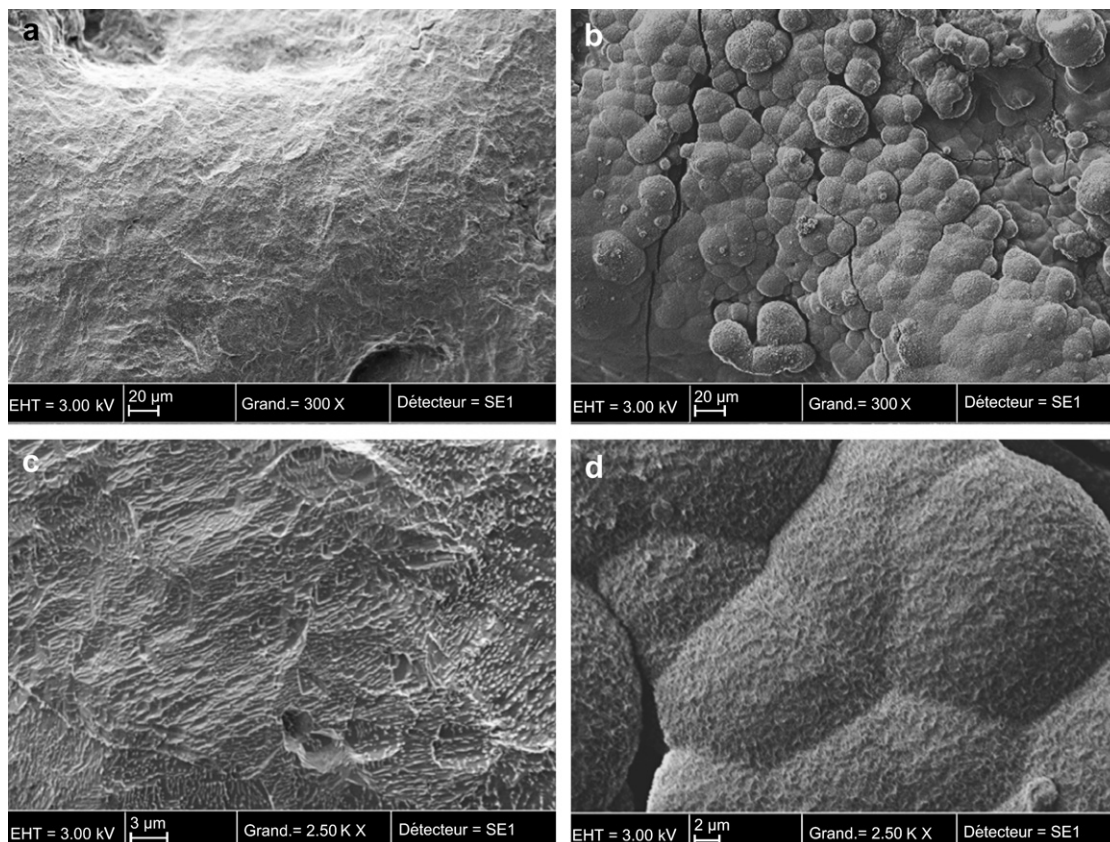


Fig. 2. SEM micrographs of the Ti scaffolds (a, c) after BCP blasting and acid etching (TiS) and (b, d) after CaP coating by electrodeposition (TiC).

pores. Fig. 1a shows the μ CT image of the Ti scaffold with a 3D array obtained by the RP process. The open porosity is emphasized in Fig. 1b. The Ti scaffolds had a porosity of $50.4 \pm 4.7\%$ and a pore size of $958 \pm 49 \mu\text{m}$, which were close to the design value of 50% and $1000 \mu\text{m}$ in the CAD model. The value of the surface area of the Ti scaffolds calculated using the μ CT and analysis software was $25.2 \pm 1.0 \text{ cm}^2$. As mentioned before, this value was used to perform the electrodeposition of CaP on the Ti scaffold given that this coating process is performed at a current density (mA/cm^2). The compressive strength of the Ti scaffold was $82.5 \pm 24.3 \text{ MPa}$. This experimental value was similar to the value of 95 MPa obtained by FEM. The experimental elastic modulus with a value of $2.7 \pm 0.8 \text{ MPa}$ was relatively low as compared to dense titanium ($100\text{--}110 \text{ GPa}$). FEM analysis predicted a value of 12.5 GPa for the porous Ti scaffolds. The difference between the FEM and the experimental elastic modulus may be due to a columnar grain structure (image not shown) that was present at the place the metallic piece came in contact with the refractory mould during the production process. This structure may create a stress concentration factor due to its shape and hence originate a brittle behavior delivering a lower elastic modulus. As shown in Fig. 2a and c, BCP grit blasting and acid etching treatments produced a rough surface with a macro

and micro texture. On the other hand, the porous TiS were homogeneously covered with a CaP coating after electrodeposition (Fig. 2b and d). The CaP coating was composed of globular deposits. A number of cracks could be observed in the coating but the underlying titanium substrate was not detected by EDX. No presence of elements different from the departing material or the CaP coating was observed by EDX analysis (data not shown). At high magnification, thin plate-like crystals measuring less than $1 \mu\text{m}$ in length were observed in the CaP coating (Fig. 2d). Fig. 3 shows the AFM analysis of the porous Ti scaffolds with or without the electrodeposited CaP coating. From the topographic images, it is obvious that after BCP grit blasting and acid etching, the Ti scaffold presented a rough morphology. Without coating (Fig. 3a), the roughness exhibited a higher heterogeneity that could be noted by the presence of a multimodal shape on the roughness curves and a high value of the full width at half maximum (FWHM). The average surface roughness (S_a) measured by AFM for the porous Ti scaffolds before coating was $1.25 \pm 0.25 \mu\text{m}$. After applying the electrodeposited CaP coating, the roughness curve had a more Gaussian-like shape (Fig. 3e), the average surface roughness (S_a) value was $1.45 \pm 0.15 \mu\text{m}$. As shown from the cross-sections in Fig. 3f, the starting surface contained small grains in the size range

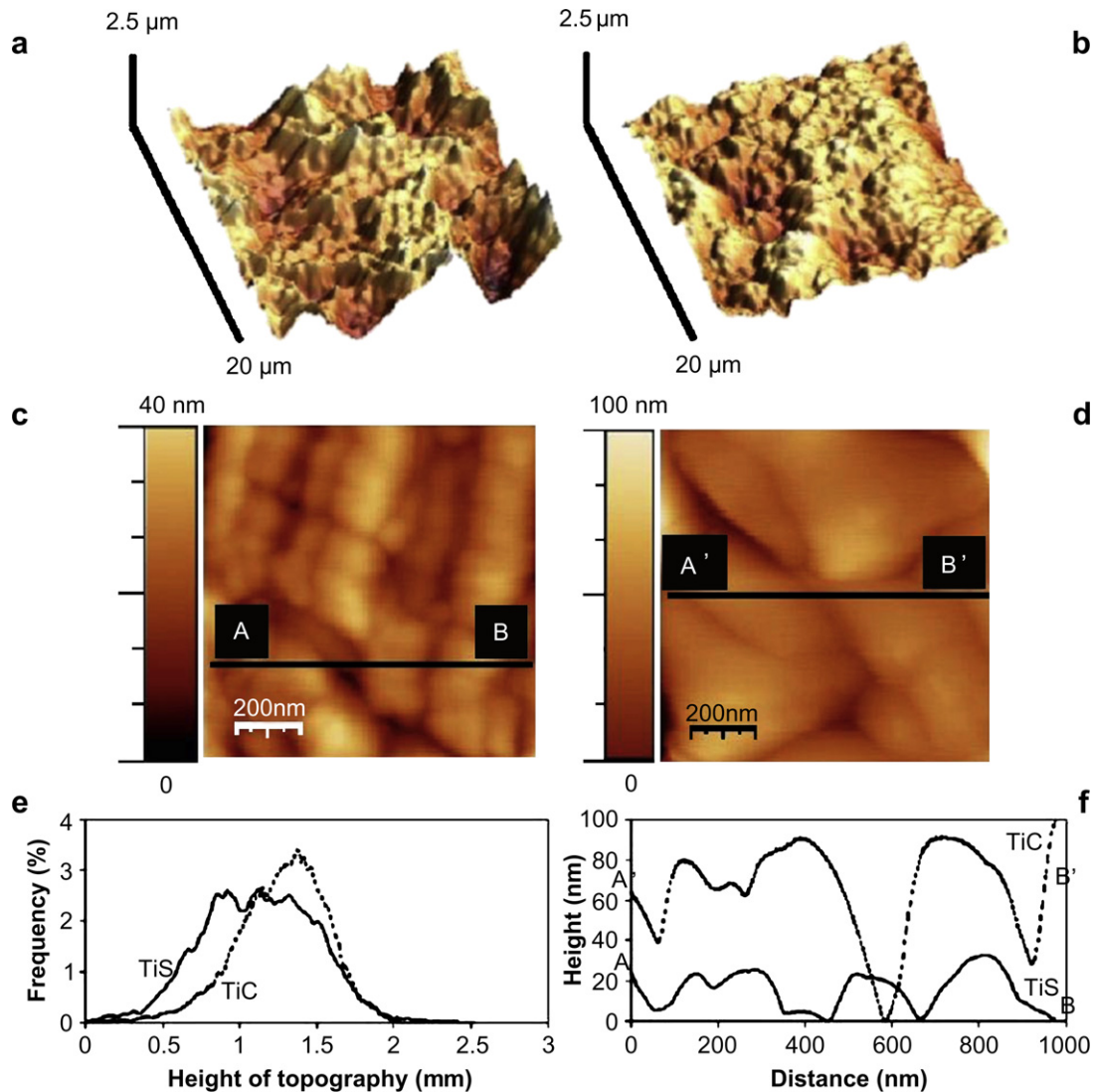


Fig. 3. AFM study of the rapid prototyped porous Ti scaffolds (a, c) after BCP blasting and acid etching (TiS) and (b, d) after CaP coating by electrodeposition (TiC) with (e) surface roughness curves and (f) cross-sections taken along the lines A–B and A'–B' located in (c) and (d), respectively.

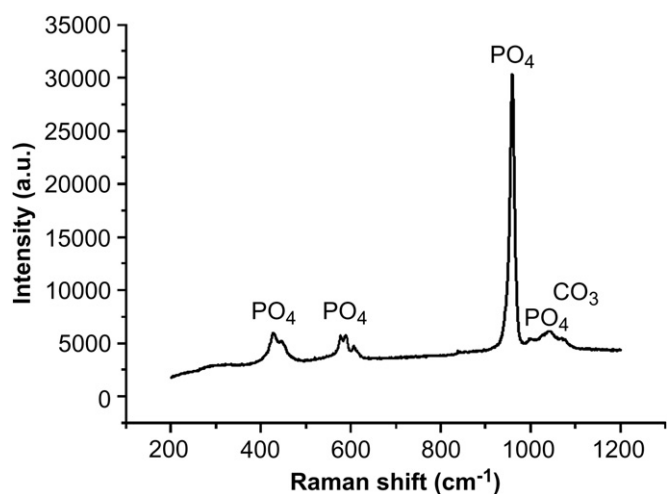


Fig. 4. Raman spectroscopy of the electrodeposited CaP coating on rapid prototyped porous Ti scaffold (TiC).

of 100–200 nm, whereas the final surface could be distinguished by the presence of larger grain sizes, about 300–500 nm in diameter. The coating was found to be formed of a calcium and phosphate with a Ca/P ratio of around 1.65, as calculated from the EDX analysis. Raman spectroscopy analysis (Fig. 4) indicated that the coating was composed of carbonated hydroxyapatite. Raman revealed peaks corresponding to PO_4 (ν_2 : 432 and 448; ν_4 : 577, 590 and 608; ν_1 : 959; ν_3 1029 and 1046 cm^{-1}) and CO_3 (ν_1 : 1072 cm^{-1}). As shown in Fig. 5, this electrodeposition method led to a CaP coating on the porous Ti scaffold on its entire surface. The cross-section view shows that the CaP coating was present in the center of the porous Ti scaffolds and that its thickness was approximately 25 μm (Fig. 5b). Regarding the bonding strength of the CaP coating to the titanium surface, it was calculated to be around 25.5 ± 0.9 MPa. Fig. 6 shows the number of cells after one and 3 days of culture. After seeding (1 day), the cell number for both Ti scaffolds was close to 4×10^5 , which accounts for 40% of the initial number of seeded cells (1×10^6 cells). This decrease in the cell number may be explained by a low seeding efficiency of the cells. After 3 days of culture, the cell number increased to a value similar to the initial cell number. Cells were attached and proliferated in a similar way on coated or uncoated scaffolds after 3 days, as no statistical differences were found. Fig. 7 shows SEM images of the cell attachment and their morphology for a Ti scaffold without coating

(Fig. 7a and c) and with a CaP coating (Fig. 7b and d). We noted that cells were attached and presented an elongated morphology with cytoplasmic extensions on the porous Ti scaffolds. However, cells were not at confluence after 3 days, probably due to the initial cellular seeding density (1×10^6 cells/scaffold or 4×10^4 cells/ cm^2). These constructs were implanted under the skin of rats for 4 weeks. Histological sections observed using polarized light microscopy revealed a fibrous tissue encapsulation with orientated collagen fibers (Fig. 8a and b). Further SEM observation of the samples (Fig. 8c and d) detected the presence of a CaP formation on the porous Ti samples without coating and without cells (TiS) as well as in samples with coating and with cells (TiCR). However, this CaP mineralization was thin and not present on the entire porous Ti scaffolds. In the case of the CaP-coated porous Ti samples with cultured cells, the mineralization did not contain osteocyte lacunae typically present in mineralized bone tissue. Similar results were obtained for the samples without CaP coating and with cultured cells (TiSR) as well as for the group consisting of porous Ti scaffolds with CaP coating and without cells (TiC).

4. Discussion

In order to achieve the goal of bone tissue reconstruction, scaffolds must meet specific requirements, such as an adequate amount of porosity and an adequate pore size [3]. By using the rapid prototyping method, here we produced porous Ti implants with a specific shape and pore size. These porous Ti scaffolds supported bone in-growth towards the center of the implants [23]. Other factors that influence bone tissue reconstruction are surface roughness and its composition [25]. The BCP blasting and acid etching methods applied to Ti scaffolds made it possible to obtain a rough surface, as determined by SEM and AFM analysis. Several groups have used the electrodeposition method to apply CaP coating on titanium [26–30]. However, few studies have reported CaP coatings on porous structures [31]. In the present study, the electrodeposition method successfully produced a homogeneous CaP coating on the entire surface of the porous Ti scaffolds. The coating was composed of a poorly crystallized carbonated apatite resembling the composition of bone mineral. When working with porous structures, the information concerning the surface of the sample is a hard parameter to obtain. Nevertheless, the surface area is important for electrodeposition at constant current density. Since Ca and P ions are consumed from the electrolyte to form the coating, the surface area of the porous Ti scaffold should be known for adjusting the volume of electrolyte or CPS solution. The electrodeposition process generates hydrogen gas at the cathode surface [28–30].

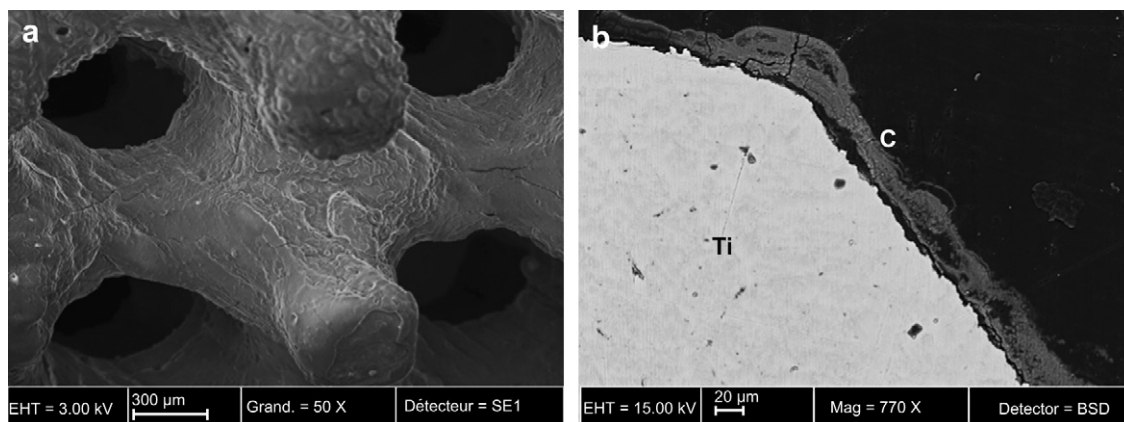


Fig. 5. SEM micrographs of the rapid prototyped Ti scaffold with CaP coating (TiC). (a) View of the CaP-coated surface and (b) cross-sectioned view of the center of the coated titanium scaffold. Ti: titanium scaffold, C: electrodeposited CaP coating.

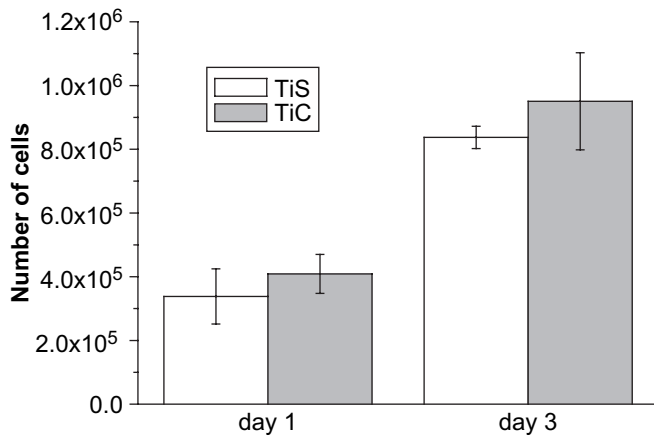


Fig. 6. Proliferation of rat bone marrow cells (RBMC) cultured for 1 and 3 days on the rapid prototyped Ti scaffolds without (TiS) and with CaP coating (TiC).

This production can alter the homogeneity of the CaP coating by creating degassing marks or by preventing the deposition to take place [31,32]. In our case, the electrodeposition process produced an even CaP coating of 25 μm in thickness on the entire porous Ti scaffold. This may result from a favorable combination of electrodeposition parameters, electrolyte volume, pore size and structure of the scaffold, which allowed for degassing of hydrogen without preventing the CaP deposition. The strength of substrate bonding is another important characteristic as CaP-coated implants are often press fitted into the bone. The adhesion strength of 25 MPa measured here is below the value of 51 MPa for plasma-sprayed HA coatings

in tension reported by Sun et al. [33], and is comparable to the values obtained by sol-gel methods but is lower than the loading stress on the hip joint during gait, <35 MPa [34]. Using scratch testing, a higher critical load (L_c) of 22 N has been reported for plasma-sprayed HA than biomimetic CaP coating of 7.5 N [27]. The lower bonding strength of coatings deposited from solutions might be compensated *in fine* by their favorable crystal composition and dissolution characteristics that allow for a direct apposition of bone tissue onto titanium. In addition, the CaP coating at the interior is protected against shear stress during implantation by the porous structure of the Ti scaffold. For bone tissue engineering, surface composition, porosity and an adequate pore size of scaffolds are necessary to facilitate cell seeding, attachment and proliferation as well as the diffusion throughout the whole structure of nutrients and tissues. It has been shown that CaP coating on titanium discs facilitated the adhesion and proliferation of MSC [22]. We found similar results in the present study. RBMC attached slightly more efficiently to the CaP-coated than uncoated porous Ti scaffolds after 1 day but proliferated at a similar rate on both scaffolds after 3 days. Pore size affects the number of cells attached and hence their proliferation, the bigger the pore size the longer it will take the cells to attach [35,36]. Nevertheless, we did not observe any ectopic bone formation after subcutaneous implantation in rats of porous Ti scaffolds coated with CaP and cultured RBMC. Considering the initial number of cells, the large surface area of the porous Ti scaffold and its three-dimensional structure, it is highly probable that the mineralized collagen observed after subcutis implantation was an initial stage of bone formation [37]. Hybrid constructs consisting of CaP-coated titanium with cultured MSC have previously shown *de novo* bone formation while implanted in the subcutis of nude mice [10,22]. The density of cells was significantly higher than in

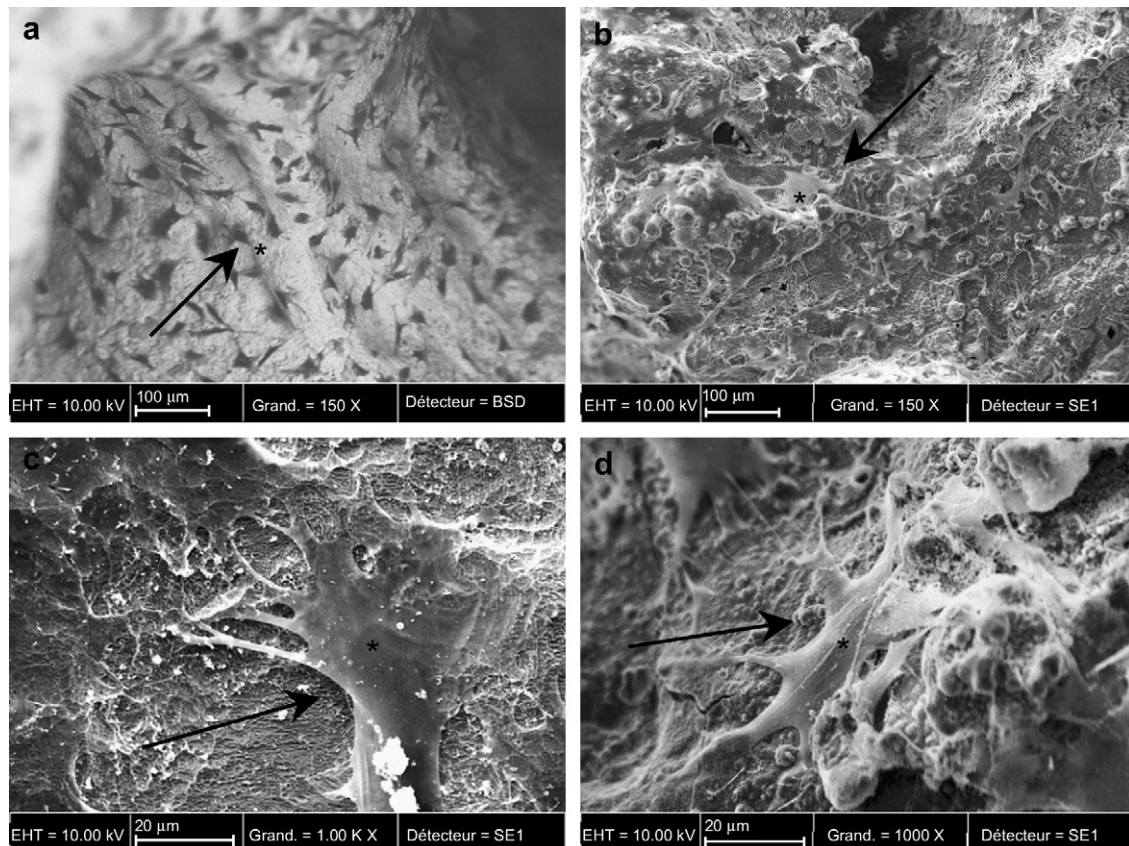


Fig. 7. SEM micrographs of (a, c) porous Ti scaffolds without CaP coating (TiS) loaded with rat bone marrow cells (RBMC) and (b, d) CaP-coated Ti scaffold loaded with RBMC and cultured for 3 days. Arrows and asterisk show RBMC spreading on the Ti scaffolds.

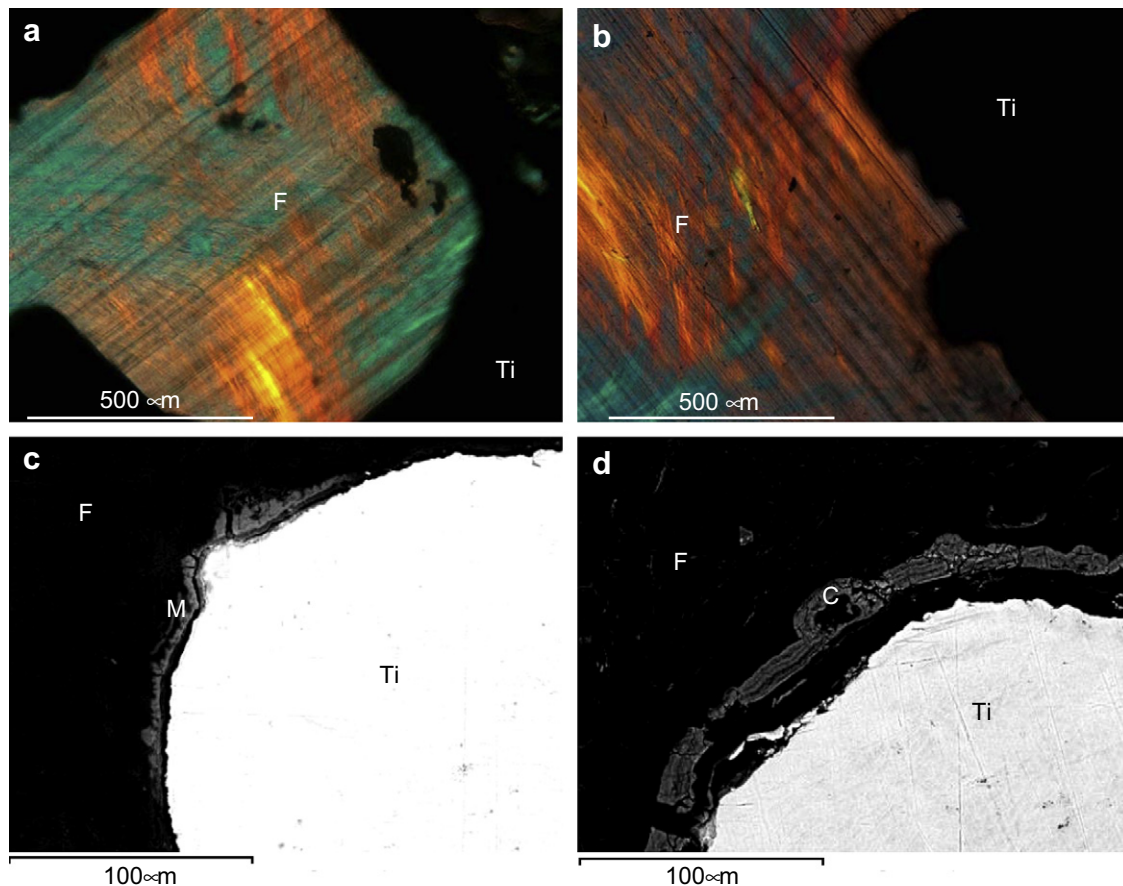


Fig. 8. Polarized light and BSEM micrographs of the rapid prototyped porous Ti scaffold after 4 weeks of subcutis implantation in rats. (a, c) Ti scaffold without CaP coating and without RBMC cells and (b, d) CaP-coated Ti scaffold cultured with RBMC for 3 days. Ti: titanium scaffold, C: electrodeposited CaP coating; M: mineralized tissue and F: fibrous tissue.

the present work (5×10^5 cells/cm² versus 4×10^4 cells/cm²). This high density produced an osteogenic sheet consisting of layers of cells and extracellular matrix after 7 days of culture. In addition, the culture periods were much longer than in the present study (7 versus 3 days) for a surface area 127 times smaller. Long culture periods after seeding have been shown to be more effective for final bone formation [38]. This study corroborates that the initial cell seeding number per surface area is extremely important so as to achieve a cellular layer on the scaffold. Cell–cell interactions and extracellular matrix encapsulation are a prerequisite for *de novo* bone formation. It has been shown that high cell densities have a major effect on bone formation [14]. Although bone formation could not be observed *in vivo*, we have shown that RBMC cells attached to and proliferated well on the porous Ti scaffolds (Fig. 7) indicate the suitability and biocompatibility of the scaffolds. These porous Ti scaffolds led to an even cell seeding and nutrient supply through the entire porous structure. The interconnected porosity should be favorable for cell proliferation and bone tissue regeneration, since it combines a porous structure and a bioactive CaP coating.

5. Conclusion

Customized porous titanium scaffolds were prepared by using a rapid prototyping method. The porous titanium scaffolds were evenly covered by a CaP coating using supersaturated solutions and electrodeposition. The coating consisted in carbonated hydroxyapatite and presented good adhesive properties to the Ti substrate. RBMC seeded on the Ti scaffolds proliferated and colonized

the entire porosity. After subcutaneous implantation, histology revealed the presence of mineralized collagen but not mature bone tissue. This study opens up the possibility of using high strength porous scaffolds with appropriate osteoconductive and osteogenic properties to reconstruct large skeletal parts in the maxillofacial and orthopedic fields.

Acknowledgements

The authors would like to thank both the French Ministry of Research and the Regional Council of the Pays de la Loire for providing financial support for this research project. The authors are also grateful to the CTM, Mr. Fellah, Mr. Pilet, Mr. Doulin and Ms. Leroux. Mr. Lopez-Heredia would like to thank the CONACyT for his Ph.D. fellowship.

References

- [1] Park JB, Lakes RS. Biomaterials: an introduction. New York: Plenum Press; 1992.
- [2] Dunand DC. Processing of titanium foams. *Adv Eng Mater* 2004;6(6):369–76.
- [3] Ryan G, Pandit A, Apatsidis DP. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. *Biomaterials* 2006;27(13):2651–70.
- [4] Li J, Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Wilson CE, de Wijn JR, et al. Biological performance in goats of a porous titanium alloy-biphasic calcium phosphate composite. *Biomaterials* 2007;28(29):4209–18.
- [5] Hollander DA, von Walter M, Wirtz T, Sellei R, Schmidt-Rohlfing B, Paar O, et al. Structural, mechanical and in vitro characterization of individually structured Ti-6Al-4V produced by direct laser forming. *Biomaterials* 2006;27(7):955–63.
- [6] Goyenvall E, Aguado E, Nguyen J-M, Passuti N, Le Guehennec L, Layrolle P, et al. Osteointegration of femoral stem prostheses with a bilayered calcium phosphate coating. *Biomaterials* 2006;27(7):1119–28.

- [7] Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007;23(7):844–54.
- [8] Lopez-Heredia MA, Weiss P, Layrolle P. An electrodeposition method of calcium phosphate coatings on titanium alloy. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18(2):381–90.
- [9] Pacaccio DJ, Stern SF. Demineralized bone matrix: basic science and clinical applications. *Clin Podiatr Med Surg* 2005;22(4):599–606.
- [10] Dekker RJ, de Bruijn JD, Stigter M, Barrere F, Layrolle P, van Blitterswijk CA. Bone tissue engineering on amorphous carbonated apatite and crystalline octacalcium phosphate-coated titanium discs. *Biomaterials* 2005;26(25):5231–9.
- [11] Ohgushi H, Okumura M, Tamai S, Shors EC, Caplan AI, Maeda M, et al. Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation in vitro mineralization by mesenchymal stem cells cultured on titanium scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1990;24(12):1563–70.
- [12] Maeda M, Hirose M, Ohgushi H, Kiritu T. In vitro mineralization by mesenchymal stem cells cultured on titanium scaffolds. *J Biochem (Tokyo)* 2007;141(5):729–36.
- [13] Fang D, Seo BM, Liu Y, Sonoyama W, Yamaza T, Zhang C, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells is an optimal approach for plastic surgery. *Stem Cells* 2007;25(4):1021–8.
- [14] Janssen FW, Oostra J, Oorschot Av, van Blitterswijk CA. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: in vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials* 2006;27(3):315–23.
- [15] Lerouxel E, Weiss P, Giumelli B, Moreau A, Pilet P, Guicheux J, et al. Injectable calcium phosphate scaffold and bone marrow graft for bone reconstruction in irradiated areas: an experimental study in rats. *Biomaterials* 2006;27(26):4566–72.
- [16] Malard O, Guicheux J, Bouler J-M, Gauthier O, Beauvillain de Montreuil C, Aguado E, et al. Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone* 2005;36(2):323–30.
- [17] Granstrom G. Placement of dental implants in irradiated bone: the case for using hyperbaric oxygen. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64(5):812–8.
- [18] Shao Z, Liu B, Liu Y, Liu W, Liu R, Peng Q, et al. Distraction osteogenesis in the irradiated rabbit mandible. *Plast Reconstr Surg* 2006;59(2):181–7.
- [19] Clark CL, Strider J, Hall C, Ferguson HW, Armstrong KL, Runner RR, et al. Distraction osteogenesis in irradiated rabbit mandibles with adjunctive hyperbaric oxygen therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64(4):589–93.
- [20] ter Brugge PJ, Jansen JA. Initial interaction of rat bone marrow cells with non-coated and calcium phosphate coated titanium substrates. *Biomaterials* 2002;23(15):3269–77.
- [21] Hartman EHM, Vehof JWM, Spauwen PHM, Jansen JA. Ectopic bone formation in rats: the importance of the carrier. *Biomaterials* 2005;26(14):1829–35.
- [22] Dekker RJ, De Bruijn JD, Van Den Brink I, Bovell YP, Layrolle P, Van Blitterswijk CA. Bone tissue engineering on calcium phosphate-coated titanium plates utilizing cultured rat bone marrow cells: a preliminary study. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9(12):859–63.
- [23] Lopez-Heredia MA, Goyenvalle E, Aguado E, Pilet P, Leroux C, Dorget M, et al. Bone growth in rapid prototyped porous titanium implants. *J Biomed Mater Res A* 2007.
- [24] Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 1988;254(2):317–30.
- [25] Siebers MC, ter Brugge PJ, Walboomers XF, Jansen JA. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials: a critical review. *Biomaterials* 2005;26(2):137–46.
- [26] Silva CC, Sombra ASB. Raman spectroscopy measurements of hydroxyapatite obtained by mechanical alloying. *J Phys Chem Solids* 2004;65(5):1031–3.
- [27] Wang J, Layrolle P, Stigter M, de Groot K. Biomimetic and electrolytic calcium phosphate coatings on titanium alloy: physicochemical characteristics and cell attachment. *Biomaterials* 2004;25(4):583–92.
- [28] Ban S, Hasegawa J. Morphological regulation and crystal growth of hydrothermal-electrochemically deposited apatite. *Biomaterials* 2002;23(14):2965–72.
- [29] Ban S, Maruno S. Morphology and microstructure of electrochemically deposited calcium phosphates in a modified simulated body fluid. *Biomaterials* 1998;19(14):1245–53.
- [30] Ban S, Maruno S. Effect of temperature on electrochemical deposition of calcium phosphate coatings in a simulated body fluid. *Biomaterials* 1995;16(13):977–81.
- [31] Zhang Q, Leng Y, Xin R. A comparative study of electrochemical deposition and biomimetic deposition of calcium phosphate on porous titanium. *Biomaterials* 2005;26(16):2857–65.
- [32] Wang S-H, Shih W-J, Li W-L, Hon M-H, Wang M-C. Morphology of calcium phosphate coatings deposited on a Ti–6Al–4V substrate by an electrolytic method under 80 Torr. *J Eur Ceram Soc* 2005;25(14):3287–92.
- [33] Sun L, Berndt CC, Gross KA, Kucuk A. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review. *J Biomed Mater Res* 2001;58:570–92.
- [34] Kuo MC, Yen SK. The process of electrochemical deposited hydroxyapatite coatings on biomedical titanium at room temperature. *Mater Sci Eng C* 2002;20(1–2):153–60.
- [35] O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen–GAG scaffolds. *Biomaterials* 2005;26(4):433–41.
- [36] Zeltinger J, Sherwood JK, Graham DA, Mueller R, Griffith LG. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. *Tissue Eng* 2001;7(5):557–72.
- [37] Eriksson C, Borner K, Nygren H, Ohlson K, Bexell U, Billerdahl N, et al. Studies by imaging TOF-SIMS of bone mineralization on porous titanium implants after 1 week in bone. *Appl Surf Sci* 2006;252(19):6757–60.
- [38] Vehof JWM, Spauwen PHM, Jansen JA. Bone formation in calcium–phosphate-coated titanium mesh. *Biomaterials* 2000;21(19):2003–9.

Chapitre 4. Discussion

Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse, les matrices doivent répondre à un cahier des charges concernant la porosité et la taille de pore par exemple [36]. En utilisant la méthode de prototypage rapide, des implants poreux avec une taille et une forme de pore spécifiques ont été produits. Ces matrices en titane poreux permettent la repousse osseuse vers le centre des implants [189]. La rugosité et la composition de surface des implants influencent fortement la cicatrisation du tissu osseux [190]. Le sablage des matrices par des particules de BCP et le mordantage acide ont permis l'obtention d'une surface rugueuse comme démontré par l'analyse MEB et AFM. Certaines équipes ont utilisé l'électrodéposition pour appliquer un revêtement de PCa sur le titane [92-94, 191, 192]. Néanmoins, peu de travaux ont concerné les structures poreuses [96].

Dans ce chapitre, nous avons montré que la méthode d'électrodéposition produit avec succès un revêtement uniforme de PCa sur la surface entière de la matrice en titane poreux. Le revêtement est composé d'une apatite carbonatée faiblement cristallisée dont sa composition chimique ressemble à celle du minéral osseux. Dans le procédé d'électrodéposition, la surface de l'implant en titane à revêtir est un paramètre important pour travailler à une densité de courant constant et utiliser un volume adéquat d'électrolyte CPS. Toutefois, dans le cas de structures poreuses, la surface de l'échantillon est difficile à obtenir. Nous avons utilisé la microtomographie X afin de déterminer la surface des implants en titane poreux. Bien que le procédé d'électrodéposition génère du gaz hydrogène à la surface de la cathode [92-96], nous avons obtenu un revêtement uniforme de PCa de 25 μm d'épaisseur sur la surface entière des matrices en titane poreux. Ceci peut résulter d'une combinaison favorable des paramètres d'électrodéposition comme le volume de l'électrolyte, la taille de pore et la structure de la matrice qui permettent un dégagement d'hydrogène sur une plus grande surface sans nuire à la formation du dépôt de PCa. La valeur de la force d'adhésion du revêtement au substrat est une autre caractéristique importante car ces implants sont généralement implantés dans le tissu osseux par pression. La force d'adhésion de 25 MPa trouvée ici est inférieure à la valeur de 51 MPa rapporté par Sun *et al* [74] pour des revêtements en HA obtenus par la torche à plasma. En utilisant un test de grattage, il a été trouvé qu'une charge critique (L_c) plus importante est obtenue pour un revêtement HA par torche à plasma, 22 N par rapport à la résistance mécanique d'un revêtement obtenu par un procédé biomimétique, 7.5 N [192]. La

valeur inférieure d'adhésion trouvée pour les revêtements déposés à partir de solutions peut être compensée par des caractéristiques de dissolution favorables qui permettent une apposition directe du tissu osseux sur le titane. De plus, le revêtement de PCa à l'intérieur de la matrice en titane poreux est protégé, par sa structure, contre les forces de cisaillement générées pendant l'implantation.

Dans l'ingénierie tissulaire osseuse, les matrices doivent présenter une composition de surface, une porosité et une taille de pore favorables à l'ensemencement, l'attachement et la prolifération de cellules. Les matrices doivent également permettre la diffusion de nutriments et l'invasion tissulaire et vasculaire à travers toute la structure. Il a été démontré que le revêtement de PCa sur les disques de titane facilite l'adhésion et la prolifération de CSM [107]. Dans cette étude nous avons trouvé des résultats similaires. Les CSM de rats ont adhéré plus efficacement à la matrice en titane poreux revêtu de PCa que sur celle non revêtue après un jour de culture. Cependant, la vitesse de prolifération a été similaire sur les deux matrices après trois jours de culture. La taille de pore a un effet sur le nombre de cellules attachées et en conséquence sur leur prolifération [193, 194]. Néanmoins, nous n'avons pas pu observer dans cette étude la formation d'os ectopique après l'implantation sous cutanée chez le rat des matrices en titane poreux revêtus de PCa et ensemencées avec des cellules souches mésenchymateuses. Des études précédentes ont montré la formation de tissu osseux minéralisé après implantation sous cutanée de disques de titane revêtus de PCa et cultivés avec des CSM [106, 107]. Dans ce cas, la densité cellulaire a été significativement supérieure à cette étude (5×10^5 cellules/cm² *versus* 4×10^4 cellules/cm²). Cette haute densité a produit après 7 jours de culture un tapis constitué de couches de cellules et de matrice extracellulaire sur la surface de l'implant. Dans notre étude, les cellules ne recouvraient pas totalement la surface de la matrice en titane poreux. De plus, les périodes de culture ont été plus longues que dans notre étude (7 jours au lieu de 3 jours) pour une surface 127 fois plus petite. Il a été démontré que de longues périodes de culture (7-15 jours) après ensemencement sont plus favorables à la formation de tissu osseux *in vivo* [195]. Cette étude corrobore que le nombre initial de cellules ensemencées par unité de surface de matrice est extrêmement important pour obtenir une couche cellulaire qui permettra l'ostéogénèse. Les interactions cellule-cellule et l'encapsulation par la matrice extracellulaire sont requises pour la formation d'os nouveau. Il a été montré que les hautes densités cellulaires ont un effet majeur sur la formation de l'os [120]. En tenant en compte du nombre initial de cellules, la valeur de surface grande de la

matrice en titane poreux et sa structure en trois dimensions, il est probable que le collagène minéralisé observé après l'implantation sous cutanée a été une étape initiale de la formation osseuse [26]. Même si la formation osseuse n'a pas pu être observé *in vivo*, nous avons montré que les CSM s'attachent et prolifèrent bien sur les matrices en titane poreux, ce qui confirme leur biocompatibilité.

Ces matrices en titane poreux ont permis l'ensemencement cellulaire uniforme et l'approvisionnement de nutriments à travers la structure poreuse. Cette porosité interconnectée devrait être favorable à la prolifération cellulaire et à la régénération du tissu osseux étant donné que la matrice associe une structure poreuse et un revêtement bioactif de PCa.

Discussion Générale

Les objectifs principaux pour les implants qui seront utilisés dans des applications dentaires ou orthopédiques sont de ne pas générer de réponses adverses, de s'intégrer au tissu osseux de façon rapide et fiable et de durer aussi longtemps que la durée de vie de la personne qui porte ces implants. Dans ce travail, nous avons étudié une nouvelle méthode de fabrication des implants en titane poreux par un procédé basé sur le prototypage rapide. Nous avons étudié la biofonctionnalité de ces implants en titane poreux dans des défauts de taille critique dans l'épiphyse fémorale du lapin. Nous avons également développé des revêtements bioactifs en phosphate de calcium sur des implants en titane par un procédé d'électrodéposition et par un procédé d'immersion. Finalement, nous avons associé des cellules ostéoprogénitrices à des matrices en titane avec des revêtements bioactifs du phosphate de calcium.

La conception par ordinateur et le prototypage rapide permettent l'obtention d'implants en titane de géométrie complexe, la modulation de la taille du pore, de la porosité et la modélisation des propriétés mécaniques. Nous avons montré qu'il était possible de diminuer les propriétés mécaniques des implants en titane ($\sigma_y = 82$ MPa et $E = 2.7$ GPa) par rapport au titane solide ($\sigma_y = 545 - 830$ MPa et $E = 110$ GPa) pour se rapprocher des valeurs de l'os cortical ($\sigma_y = 80-120$ MPa, $E = 5-27$ GPa). Un module d'élasticité bas peut réduire l'effet de cisaillement à l'interface os-implant. La géométrie des implants, ainsi que la structure et la taille du pore ont été bien reproduits par rapport au design réalisé par CAD, avec une bonne précision et une bonne reproductibilité. Une structure poreuse interconnectée en trois dimensions permet la pénétration des fluides biologiques, la colonisation cellulaire et la repousse osseuse. Nous avons observé une croissance osseuse à l'intérieur de la structure poreuse permettant ainsi une fixation biologique de l'implant au squelette. Cependant, nous avons observé que la repousse osseuse se fait de la périphérie de l'implant vers le centre et qu'elle est plus importante dans les premiers temps (dans les 3 premières semaines). Cette repousse osseuse plus importante est le résultat du processus de remodelage du tissu osseux. Une surproduction d'os immature est généralement observée dans les étapes initiales de la cicatrisation. Cette méthode peut permettre la combinaison des différentes tailles de pore pour fabriquer un implant avec un gradient progressif de porosité et avec une forme anatomique. Ce type d'implant permettrait d'étudier la repousse osseuse suivant certains axes anatomiques ou de déterminer la taille minimale des pores.

L'observation métallographique de l'implant a montré que la méthode de fabrication génère une structure cristalline en forme d'aiguilles près de la surface qui a été en contact avec le moule. L'observation MEB après la compression uniaxiale a révélé des fissures dans les colonnes qui pourraient être liées à une fracture fragile générée par la structure cristalline près de la surface ou par une présence d'oxygène plus élevée. Les conditions de coulée peuvent être modifiées pour améliorer les implants et pour pouvoir obtenir des tailles de pores, entre 200 et 500 μm . Par exemple, le fait d'approcher la température du moule à la température de coulée aura un effet sur la fluidité du matériel et sur la structure de l'implant près des parois du moule. Une coulée sous centrifugation peut aussi améliorer la qualité de la pièce. Un traitement thermique des implants en titane permettrait également de modifier la structure cristallographique. Une analyse du contenu d'oxygène peut nous permettre de savoir s'il y a eu une réaction entre le matériel réfractaire et la pièce métallique.

Le titane est bioinerte grâce à sa couche externe de TiO_2 , mais cette bioinertie n'est pas suffisante pour permettre une ostéointégration rapide. La surface des implants doit présenter des propriétés physico-chimiques favorables à la nucléation de phosphate de calcium et sur son interaction avec les cellules (attachement et prolifération). La rugosité, l'énergie de surface et la chimie de surface sont trois paramètres qui influenceront ces processus. L'ostéoconduction des implants peut être améliorée avec des revêtements bioactifs en phosphate de calcium. De plus, la culture de cellules souches mésenchymateuses sur ces matrices en titane poreux devrait permettre d'apporter des propriétaires d'ostéogénèse.

Les traitements appliqués dans ce travail ont modifié les propriétés de surface sans affecter les propriétés du substrat. De plus, ils ont été efficaces dans la bioactivation des surfaces de titane. Une surface rugueuse mais moins hydrophile qu'initialement a été produite par sablage au BCP et mordantage acide. Les traitements plasma de RF ont diminué fortement l'angle de contact, créant des surfaces très hydrophiles favorables à la nucléation hétérogène et à la croissance de revêtements de PCa à partir de solutions sursaturées. L'hydrophilicité de la surface pourrait également favoriser l'adhésion de cellules souches mésenchymateuses sur les matrices en titane. Les deux méthodes utilisées pour revêtir le titane avec du PCa sont applicables à des formes

complexes comme le titane poreux. Néanmoins, l'électrodéposition est un procédé plus rapide que le traitement d'immersion biomimétique, en considérant comme objectif l'obtention d'une couche d'apatite.

Nous avons montré dans le dernier chapitre que ces matrices en titane poreux revêtues de PCa permettent l'adhésion et la prolifération de cellules souches mésenchymateuses de rats. Cependant, nous n'avons pas observé de néoformation osseuse après implantation sous cutanée de ces matériaux hybrides. Le nombre de cellules par surface disponible, les conditions de culture et les propriétés de surface (rugosité, angle de contact, porosité) sont des paramètres à étudier pour permettre l'ostéogénèse. Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse, ces matrices en titane poreux présentant une forme anatomique, une porosité contrôlée et des propriétés mécaniques proches de celles du tissu osseux pourraient permettre de reconstruire des parties importantes du squelette.

Conclusion Générale

Ce travail a montré que la méthode du prototypage rapide est une alternative viable pour créer des implants en titane poreux de géométrie complexe et de structure interne contrôlée. La porosité a permis une diminution des propriétés mécaniques et notamment celle du module d'élasticité pour ce rapprocher de celles du tissu osseux. Les différentes étapes de fabrication n'ont pas eu d'effet négatif sur la composition et les propriétés des implants mais des améliorations de ce procédé sont encore possibles.

Les traitements de surface étudiés ici se révèlent efficaces pour générer une surface bioactive sur les implants en titane. Les deux traitements évalués sont relativement rapides et ne détériorent pas le substrat métallique. Des propriétés adéquates de rugosité, d'angle de contact et de composition chimique, toutes trois importantes pour la nucléation du phosphate de calcium et pour l'attachement et la prolifération cellulaire, sont obtenues. Le procédé d'électrodéposition semble plus versatile dans l'obtention d'un revêtement de phosphate de calcium par le contrôle des différents paramètres du procédé (température, courant, temps d'électrodéposition) que les traitements plasma de radio fréquence. Ces deux procédés sont applicables à des structures poreuses.

L'association de cellules aux matrices métalliques est une approche intéressante pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Nous avons montré dans le dernier chapitre que les cellules souches mésenchymateuses adhèrent et prolifèrent sur la matrice en titane poreux. Par contre, le nombre de cellules par unité de surface de la matrice apparaît critique pour la néoformation de tissu osseux *in vivo*. La culture sous des conditions dynamiques pourrait être utilisée pour diminuer le temps de culture et pour commencer la différenciation et la production de tissu osseux de façon plus précoce.

Références

1. Tortora GJ, Anagnostakos NP. Principes d'anatomie et de physiologie. 2nd ed; 1994.
2. Rho J-Y, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics* 1998;20(2):92-102.
3. Hollinger J, Wong MEK. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 1996;82(6):594-606.
4. Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2003;35(9):1301-1305.
5. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine: Academic Press; 1996.
6. Wolff J. Das Gesetz der Transformation der Knochen. Berlin, Hirschwald 1892; Republished in English by Springer-Verlag. 1987.
7. Bauss F, Dempster DW. Effects of ibandronate on bone quality: Preclinical studies. *Bone* 2007;40(2):265-273.
8. Elbeshir EI. Spontaneous regeneration of the mandibular bone following hemimandibulectomy. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1990;28(2):128-130.
9. Nyman JS, Reyes M, Wang X. Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone. *Micron* 2005;36(7-8):566-582.
10. Weiner S, Wagner HD. The Material Bone: Structure-Mechanical Function Relations. *Annual Review of Materials Science* 1998;28:271-298.
11. Gibson LJ. The mechanical behaviour of cancellous bone. *Journal of Biomechanics* 1985;18(5):317-328.
12. Ryan TM, Krovitz GE. Trabecular bone ontogeny in the human proximal femur. *Journal of Human Evolution* 2006;51(6):591-602.
13. Diamant I, Shahar R, Masharawi Y, Gefen A. A method for patient-specific evaluation of vertebral cancellous bone strength: In vitro validation. *Clinical Biomechanics* 2007;22(3):282-291.
14. Sran MM, Boyd SK, Cooper DML, Khan KM, Zernicke RF, Oxland TR. Regional trabecular morphology assessed by micro-CT is correlated with failure of aged thoracic vertebrae under a posteroanterior load and may determine the site of fracture. *Bone* 2007;40(3):751-757.

15. Ward KA, Roy DK, Pye SR, O'Neill TW, Berry JL, Swarbrick CM, et al. Forearm bone geometry and mineral content in UK women of European and South-Asian origin. *Bone* 2007;41(1):117-121.
16. Rho JY, Zioupos P, Currey JD, Pharr GM. Microstructural elasticity and regional heterogeneity in human femoral bone of various ages examined by nano-indentation. *Journal of Biomechanics* 2002;35(2):189-198.
17. Rho J-Y, Tsui TY, Pharr GM. Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials* 1997;18(20):1325-1330.
18. Autefage A. The point of view of the veterinary surgeon: bone and fracture. *Injury* 2000;31 Suppl 3:C50-5.
19. Krishna BV, Bose S, Bandyopadhyay A. Low stiffness porous Ti structures for load-bearing implants. *Acta Biomaterialia* 2007;3(6):997-1006.
20. Xue W, Krishna BV, Bandyopadhyay A, Bose S. Processing and biocompatibility evaluation of laser processed porous titanium. *Acta Biomaterialia* 2007;3(6):1007-1018.
21. Ashman RB, Rho JY. Elastic modulus of trabecular bone material. *Journal of Biomechanics* 1988;21(3):177-181.
22. Park JB, Lakes RS. *Biomaterials : an introduction* 2nd ed. 2nd ed. New York: Plenum Press; 1992.
23. Gibson LJ, Ashby MF. *Cellular Solids: Structure and Properties*. 2nd Edition ed. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press; 1997.
24. Lausmaa J. Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*
Biomaterials 1996;81(3):343-361.
25. Larsson C, Thomsen P, Aronsson B-O, Rodahl M, Lausmaa J, Kasemo B, et al. Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. *Biomaterials* 1996;17(6):605-616.
26. Eriksson C, Borner K, Nygren H, Ohlson K, Bexell U, Billerdahl N, et al. Studies by imaging TOF-SIMS of bone mineralization on porous titanium implants after 1 week in bone. *Applied Surface Science*
Proceedings of the Fifteenth International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry, - SIMS XV 2006;252(19):6757-6760.
27. ASM. www.asminternational.org. In.

28. Boehlert CJ, Cowen CJ, Quast JP, Akahori T, Niinomi M. Fatigue and wear evaluation of Ti-Al-Nb alloys for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*;In Press, Corrected Proof.
29. Papakyriacou M, Mayer H, Pypen C, Plenk Jr H, Stanzl-Tschegg S. Effects of surface treatments on high cycle corrosion fatigue of metallic implant materials. *International Journal of Fatigue* 2000;22(10):873-886.
30. Bronzino JD. *The Biomedical Engineering Handbook*. 2nd Ed ed. Boca Raton, FL: CRC Press and IEEE Press; 2000.
31. Collings EW. *The physical metallurgy of titanium alloys*. Metals Park, OH: American Society for Metals; 1984.
32. Chiesa R, Giavaresi G, Fini M, Sandrini E, Giordano C, Bianchi A, et al. In vitro and in vivo performance of a novel surface treatment to enhance osseointegration of endosseous implants. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2007;103(6):745-756.
33. Kokubo T. Formation of biologically active bone-like apatite on metals and polymers by a biomimetic process. *Thermochimica Acta*
Vitrification, Transformation and Crystallization of Glasses 1996;280-281:479-490.
34. Kokubo T, Miyaji F, Kim H-M, Nakamura T. Spontaneous Formation of Bonelike Apatite Layer on Chemically Treated Titanium Metals. *Journal of the American Ceramic Society* 1996;79(4):1127-1129.
35. Niinomi M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2008;1(1):30-42.
36. Ryan G, Pandit A, Apatsidis DP. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. *Biomaterials* 2006;27(13):2651-2670.
37. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005;26(27):5474-5491.
38. Wolfarth D, Ducheyne P. Effect of porous coating geometry on interfacial stress under a shear load. *J Biomed Mater Res* 1993;27(12):1585-9.
39. Wolfarth D, Ducheyne P. Effect of a change in interfacial geometry on the fatigue strength of porous-coated Ti-6Al-4V. *J Biomed Mater Res* 1994;28(4):417-25.
40. Weber JN, White EW, Lebedzik J. New porous biomaterials by replication of echinoderm skeletal microstructures. *Nature* 1971;233(5318):337-9.
41. Spoerke ED, Murray NG, Li H, Brinson LC, Dunand DC, Stupp SI. A bioactive titanium foam scaffold for bone repair

Titanium with aligned, elongated pores for orthopedic tissue engineering applications. *Acta Biomater* 2005;1(5):523-33.

42. Spoerke ED, Murray NG, Li H, Brinson LC, Dunand DC, Stupp SI. Titanium with aligned, elongated pores for orthopedic tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A* 2007.

43. Murray NGD, Dunand DC. Effect of Initial Preform Porosity on Solid-State Foaming of Titanium. *Journal of Materials Research* 2006;21(6):1175-1188.

44. Reclaru L, Eschler P-Y, Lerf R, Blatter A. Electrochemical corrosion and metal ion release from Co-Cr-Mo prosthesis with titanium plasma spray coating. *Biomaterials* 2005;26(23):4747-4756.

45. Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Suzuki J, Kokubo T, Nakamura T. Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. *Biomaterials* 2005;26(30):6014-6023.

46. Kim HM, Kokubo T, Fujibayashi S, Nishiguchi S, Nakamura T. Bioactive macroporous titanium surface layer on titanium substrate. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000;52(3):553-557.

47. Thieme M, Wieters KP, Bergner F, Scharnweber D, Worch H, Ndop J, et al. Titanium powder sintering for preparation of a porous functionally graded material destined for orthopaedic implants. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12(3):225-31.

48. Nicula R, Luthen F, Stir M, Nebe B, Burkel E. Spark plasma sintering synthesis of porous nanocrystalline titanium alloys for biomedical applications. *Biomol Eng* 2007.

49. Zhang W, Frank Walboomers X, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials* 2006;27(33):5658-5668.

50. St-Pierre JP, Gauthier M, Lefebvre LP, Tabrizian M. Three-dimensional growth of differentiating MC3T3-E1 pre-osteoblasts on porous titanium scaffolds. *Biomaterials* 2005;26(35):7319-28.

51. Otsuki B, Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Kokubo T, Nakamura T. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: Three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. *Biomaterials* 2006;27(35):5892-5900.

52. Habibovic P, Li J, van der Valk CM, Meijer G, Layrolle P, van Blitterswijk CA, et al. Biological performance of uncoated and octacalcium phosphate-coated Ti6Al4V. *Biomaterials* 2005;26(1):23-36.

53. An YB, Lee WH. Synthesis of porous titanium implants by environmental-electro-discharge-sintering process. *Materials Chemistry and Physics* 2006;95(2-3):242-247.
54. An YB, Oh NH, Chun YW, Kim YH, Park JS, Choi KO, et al. Surface characteristics of porous titanium implants fabricated by environmental electro-discharge sintering of spherical Ti powders in a vacuum atmosphere. *Scripta Materialia* 2005;53(8):905-908.
55. Lifland MI, Kim DK, Okazaki K. Mechanical properties of a Ti-6Al-4V dental implant produced by electro-discharge compaction. *Clinical Materials* 1993;14(1):13-19.
56. Lifland MI, Okazaki K. Properties of titanium dental implants produced by electro-discharge compaction. *Clinical Materials* 1994;17(4):203-209.
57. Sevilla P, Aparicio C, Planell JA, Gil FJ. Comparison of the mechanical properties between tantalum and nickel-titanium foams implant materials for bone ingrowth applications. *Journal of Alloys and Compounds* 2007;439(1-2):67-73.
58. Dekker JP, Schoonman J. Vapor phase manufacture of porous TiN deposits on/in porous supports. *Nanostructured Materials* 1994;4(5):497-506.
59. Levine BR, Sporer S, Poggie RA, Della Valle CJ, Jacobs JJ. Experimental and clinical performance of porous tantalum in orthopedic surgery. *Biomaterials* 2006;27(27):4671-4681.
60. Li J, Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Wilson CE, de Wijn JR, et al. Biological performance in goats of a porous titanium alloy-biphasic calcium phosphate composite. *Biomaterials* 2007;28(29):4209-4218.
61. Li JP, Habibovic P, van den Doel M, Wilson CE, de Wijn JR, van Blitterswijk CA, et al. Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition. *Biomaterials* 2007;28(18):2810-2820.
62. Li JP, de Wijn JR, Van Blitterswijk CA, de Groot K. Porous Ti6Al4V scaffold directly fabricating by rapid prototyping: Preparation and in vitro experiment. *Biomaterials* 2006;27(8):1223-1235.
63. Hollander DA, von Walter M, Wirtz T, Sellei R, Schmidt-Rohlfing B, Paar O, et al. Structural, mechanical and in vitro characterization of individually structured Ti-6Al-4V produced by direct laser forming. *Biomaterials* 2006;27(7):955-963.
64. Ponader S, Vairaktaris E, Heintl P, Wilmowsky CV, Rottmair A, Korner C, et al. Effects of topographical surface modifications of electron beam melted Ti-6Al-4V titanium on human fetal osteoblasts. *J Biomed Mater Res A* 2007.
65. Cook SD, Georgette FS, Skinner HB, Haddad RJ, Jr. Fatigue properties of carbon- and porous-coated Ti-6Al-4V alloy. *J Biomed Mater Res* 1984;18(5):497-512.

66. Cook SD, Thongpreda N, Anderson RC, Haddad RJ, Jr. The effect of post-sintering heat treatments on the fatigue properties of porous coated Ti-6Al-4V alloy. *J Biomed Mater Res* 1988;22(4):287-302.
67. Dieter GE. Mechanical metallurgy (SI Metric Edition). New York: McGraw-Hill; 1988.
68. Lu X, Leng Y. Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. *Biomaterials* 2005;26(10):1097-1108.
69. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Ripamonti A, Roveri N, Romanello M, et al. Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone. *Journal of Inorganic Biochemistry* 1997;68(1):45-51.
70. BarrEre F, Layrolle P, van Blitterswijk CA, de Groot K. Biomimetic calcium phosphate coatings on Ti6Al4V: a crystal growth study of octacalcium phosphate and inhibition by Mg^{2+} and HCO_3^- . *Bone* 1999;25(2, Supplement 1):107S-111S.
71. Geesink RG. Experimental and clinical experience with hydroxyapatite-coated hip implants. *Orthopedics* 1989;12(9):1239-42.
72. Furlong R, Osborn J. Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings. *J Bone Joint Surg Br* 1991;73-B(5):741-745.
73. Wang H, Eliaz N, Xiang Z, Hsu H-P, Spector M, Hobbs LW. Early bone apposition in vivo on plasma-sprayed and electrochemically deposited hydroxyapatite coatings on titanium alloy. *Biomaterials* 2006;27(23):4192-4203.
74. Sun L, Berndt CC, Gross KA, Kucuk A. Material Fundamentals and Clinical Performance of Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coatings: A Review. *J Biomed Mater Res* 2001;58:570 - 592.
75. Lu Y-P, Xiao G-Y, Li S-T, Sun R-X, Li M-S. Microstructural inhomogeneity in plasma-sprayed hydroxyapatite coatings and effect of post-heat treatment. *Applied Surface Science* 2006;252(6):2412-2421.
76. Lusquinos F, De Carlos A, Pou J, Arias JL, Boutinguiza M, Leon B, et al. Calcium phosphate coatings obtained by Nd:YAG laser cladding: physicochemical and biologic properties. *J Biomed Mater Res A* 2003;64(4):630-7.
77. Yoshinari M, Oda Y, Ueki H, Yokose S. Immobilization of bisphosphonates on surface modified titanium. *Biomaterials* 2001;22(7):709-715.
78. Kajiwarra H, Yamaza T, Yoshinari M, Goto T, Iyama S, Atsuta I, et al. The bisphosphonate pamidronate on the surface of titanium stimulates bone formation around tibial implants in rats. *Biomaterials* 2005;26(6):581-587.

79. Peter B, Pioletti DP, Laib S, Bujoli B, Pilet P, Janvier P, et al. Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. *Bone* 2005;36(1):52-60.
80. Wang Y, Zhang S, Zeng X, Ma LL, Weng W, Yan W, et al. Osteoblastic cell response on fluoridated hydroxyapatite coatings. *Acta Biomaterialia* 2007;3(2):191-197.
81. Harle J, Kim H-W, Mordan N, Knowles JC, Salih V. Initial responses of human osteoblasts to sol-gel modified titanium with hydroxyapatite and titania composition. *Acta Biomaterialia* 2006;2(5):547-556.
82. Onoki T, Hashida T. New method for hydroxyapatite coating of titanium by the hydrothermal hot isostatic pressing technique. *Surface and Coatings Technology* 2006;200(24):6801-6807.
83. Onoki T, Hosoi K, Hashida T, Tanabe Y, Watanabe T, Yasuda E, et al. Effects of titanium surface modifications on bonding behavior of hydroxyapatite ceramics and titanium by hydrothermal hot-pressing. *Materials Science and Engineering: C*;In Press, Corrected Proof.
84. Yan W-Q, Nakamura T, Kawanabe K, Nishigochi S, Oka M, Kokubo T. Apatite layer-coated titanium for use as bone bonding implants. *Biomaterials* 1997;18(17):1185-1190.
85. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 2006;27(15):2907-2915.
86. Xiao XF, Liu RF. Effect of suspension stability on electrophoretic deposition of hydroxyapatite coatings. *Materials Letters* 2006;60(21-22):2627-2632.
87. Siebers MC, Walboomers XF, Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Jansen JA. Electrostatic spray deposition (ESD) of calcium phosphate coatings, an in vitro study with osteoblast-like cells. *Biomaterials* 2004;25(11):2019-2027.
88. Leeuwenburgh SCG, Heine MC, Wolke JGC, Pratsinis SE, Schoonman J, Jansen JA. Morphology of calcium phosphate coatings for biomedical applications deposited using Electrostatic Spray Deposition. *Thin Solid Films* 2006;503(1-2):69-78.
89. Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Siebers MC, Schoonman J, Jansen JA. In vitro and in vivo reactivity of porous, electrosprayed calcium phosphate coatings. *Biomaterials* 2006;27(18):3368-3378.
90. Park J-H, Lee Y-K, Kim K-M, Kim K-N. Bioactive calcium phosphate coating prepared on H₂O₂-treated titanium substrate by electrodeposition. *Surface and Coatings Technology* 2005;195(2-3):252-257.

91. Narayanan R, Dutta S, Seshadri SK. Hydroxy apatite coatings on Ti-6Al-4V from seashell. *Surface and Coatings Technology* 2006;200(16-17):4720-4730.
92. Ban S, Hasegawa J. Morphological regulation and crystal growth of hydrothermal-electrochemically deposited apatite. *Biomaterials* 2002;23(14):2965-72.
93. Ban S, Maruno S. Effect of temperature on electrochemical deposition of calcium phosphate coatings in a simulated body fluid. *Biomaterials* 1995;16(13):977-81.
94. Ban S, Maruno S. Morphology and microstructure of electrochemically deposited calcium phosphates in a modified simulated body fluid. *Biomaterials* 1998;19(14):1245-53.
95. Wang S-H, Shih W-J, Li W-L, Hon M-H, Wang M-C. Morphology of calcium phosphate coatings deposited on a Ti-6Al-4V substrate by an electrolytic method under 80 Torr. *Journal of the European Ceramic Society* 2005;25(14):3287-3292.
96. Zhang Q, Leng Y, Xin R. A comparative study of electrochemical deposition and biomimetic deposition of calcium phosphate on porous titanium. *Biomaterials* 2005;26(16):2857-2865.
97. Shirkhanzadeh M. Electrochemical fabrication of bioactive composite coatings on Ti6Al4V surgical alloy. *Materials Letters* 1992;14(1):27-30.
98. Rossler S, Sewing A, Stolzel M, Born R, Scharnweber D, Dard M, et al. Electrochemically assisted deposition of thin calcium phosphate coatings at near-physiological pH and temperature. *J Biomed Mater Res A* 2003;64(4):655-63.
99. Hou X, Liu X, Xu J, Shen J, Liu X. A self-optimizing electrodeposition process for fabrication of calcium phosphate coatings. *Materials Letters* 2001;50(2-3):103-107.
100. Shih W-J, Chen Y-H, Wang S-H, Li W-L, Hon M-H, Wang M-C. Effect of NaOH(aq) treatment on the phase transformation and morphology of calcium phosphate deposited by an electrolytic method. *Journal of Crystal Growth* 2005;285(4):633-641.
101. Attawia MA, Herbert KM, Laurencin CT. Osteoblast-like Cell Adherence and Migration Through Three-Dimensional Porous Polymer Matrices. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995;213(2):639-644.
102. Hartman EHM, Vehof JWM, Spauwen PHM, Jansen JA. Ectopic bone formation in rats: the importance of the carrier. *Biomaterials* 2005;26(14):1829-1835.
103. ter Brugge PJ, Jansen JA. Initial interaction of rat bone marrow cells with non-coated and calcium phosphate coated titanium substrates. *Biomaterials* 2002;23(15):3269-3277.
104. ter Brugge PJ, Wolke JG, Jansen JA. Effect of calcium phosphate coating crystallinity and implant surface roughness on differentiation of rat bone marrow cells. *J Biomed Mater Res* 2002;60(1):70-8.

105. Ohgushi H, Okumura M, Tamai S, Shors EC, Caplan AI, Maeda M, et al. Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation
In vitro mineralization by mesenchymal stem cells cultured on titanium scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1990;24(12):1563-70.
106. Dekker RJ, de Bruijn JD, Stigter M, Barrere F, Layrolle P, van Blitterswijk CA. Bone tissue engineering on amorphous carbonated apatite and crystalline octacalcium phosphate-coated titanium discs. *Biomaterials* 2005;26(25):5231-5239.
107. Dekker RJ, De Bruijn JD, Van Den Brink I, Bovell YP, Layrolle P, Van Blitterswijk CA. Bone tissue engineering on calcium phosphate-coated titanium plates utilizing cultured rat bone marrow cells: a preliminary study. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9(12):859-63.
108. de Bruijn JD, van den Brink I, Mendes S, Dekker R, Bovell YP, van Blitterswijk CA, et al. Bone induction by implants coated with cultured osteogenic bone marrow cells
Bone tissue engineering on calcium phosphate-coated titanium plates utilizing cultured rat bone marrow cells: a preliminary study. *Adv Dent Res* 1999;13(12):74-81.
109. Maeda M, Hirose M, Ohgushi H, Kirita T. In vitro mineralization by mesenchymal stem cells cultured on titanium scaffolds. *J Biochem (Tokyo)* 2007;141(5):729-36.
110. Fang D, Seo BM, Liu Y, Sonoyama W, Yamaza T, Zhang C, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells is an optimal approach for plastic surgery. *Stem Cells* 2007;25(4):1021-8.
111. Bernhardt R, van den Dolder J, Bierbaum S, Beutner R, Scharnweber D, Jansen J, et al. Osteoconductive modifications of Ti-implants in a goat defect model: characterization of bone growth with SR μ CT and histology. *Biomaterials* 2005;26(16):3009-3019.
112. Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG. Ectopic bone formation in rat marrow stromal cell/titanium fiber mesh scaffold constructs: Effect of initial cell phenotype. *Biomaterials* 2005;26(31):6208-6216.
113. Datta N, Holtorf HL, Sikavitsas VI, Jansen JA, Mikos AG. Effect of bone extracellular matrix synthesized in vitro on the osteoblastic differentiation of marrow stromal cells. *Biomaterials* 2005;26(9):971-977.
114. van den Dolder J, Farber E, Spauwen PHM, Jansen JA. Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2003;24(10):1745-1750.

115. Clark CL, Strider J, Hall C, Ferguson HW, Armstrong KL, Runner RR, et al. Distraction Osteogenesis in Irradiated Rabbit Mandibles With Adjunctive Hyperbaric Oxygen Therapy. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2006;64(4):589-593.
116. Shao Z, Liu B, Liu Y, Liu W, Liu R, Peng Q, et al. Distraction osteogenesis in the irradiated rabbit mandible. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 2006;59(2):181-187.
117. Lerouxel E, Weiss P, Giumelli B, Moreau A, Pilet P, Guicheux J, et al. Injectable calcium phosphate scaffold and bone marrow graft for bone reconstruction in irradiated areas: An experimental study in rats. *Biomaterials* 2006;27(26):4566-4572.
118. Malard O, Guicheux J, Bouler J-M, Gauthier O, Beauvillain de Montreuil C, Aguado E, et al. Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone* 2005;36(2):323-330.
119. Granstrom G. Placement of Dental Implants in Irradiated Bone: The Case for Using Hyperbaric Oxygen. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2006;64(5):812-818.
120. Janssen FW, Oostra J, Oorschot Av, van Blitterswijk CA. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: In vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials*
Biomaterials for Spinal Applications 2006;27(3):315-323.
121. Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology* 2003;22(1):81-91.
122. Daculsi G, Malard O, Goyenvallée E. Efficacité et performance des substituts osseux pour remplacer les allogreffes et autogreffes. *ITBM-RBM* 2005;26(3):218-222.
123. Fujibayashi S, Neo M, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials* 2004;25(3):443-50.
124. Brettle J. A survey of the literature on metallic surgical implants. *Injury* 1970;2(1):26-39.
125. Shen H, Brinson LC. Finite element modeling of porous titanium. *International Journal of Solids and Structures* 2007;44(1):320-335.
126. Shen H, Oppenheimer SM, Dunand DC, Brinson LC. Numerical modeling of pore size and distribution in foamed titanium. *Mechanics of Materials*
Advances in Disordered Materials 2006;38(8-10):933-944.
127. Werner CML, Jacob HAC, Ramseier LE, Favre P, Exner GU. Uncemented short-length diaphyseal segmental replacement prosthesis fixation--Finite element analysis and long-term results. *Journal of Orthopaedic Research* 2005;23(5):1065-1072.

128. Li JP, Li SH, Van Blitterswijk CA, de Groot K. A novel porous Ti6Al4V: characterization and cell attachment. *J Biomed Mater Res A* 2005;73(2):223-33.
129. Dunand DC. Processing of titanium foams. *Adv Eng Mater* 2004;6(6):369-376.
130. Petsatodes GE, Christoforides JE, Papadopoulos PP, Christodoulou AG, Karataglis D, Pournaras JD. Primary Total-Hip Arthroplasty With the Autophor 900-S Fully Porous Coated Stem in Young Patients: Seven to Seventeen Years of Follow-Up. *The Journal of Arthroplasty* 2005;20(4):436-442.
131. Moskal JT, Jordan L, Brown TE. The porous-coated anatomic total hip prosthesis: 11- to 13-year results. *The Journal of Arthroplasty* 2004;19(7):837-844.
132. Mow CS, Wiedel JD. Revision total knee arthroplasty using the porous-coated anatomic revision prosthesis: Six- to twelve-year results. *The Journal of Arthroplasty* 1998;13(6):681-686.
133. Kendrick II JB, Noble PC, Tullos HS. Distal stem design and the torsional stability of cementless femoral stems. *The Journal of Arthroplasty* 1995;10(4):463-469.
134. Wehmoller M, Eufinger H, Kruse D, Massberg W. CAD by processing of computed tomography data and CAM of individually designed prostheses. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1995;24(1 Pt 2):90-7.
135. Singare S, Dichen L, Bingheng L, Yanpu L, Zhenyu G, Yaxiong L. Design and fabrication of custom mandible titanium tray based on rapid prototyping. *Med Eng Phys* 2004;26(8):671-6.
136. Guyuron B, Ross RJ. Computer-generated model surgery. An exacting approach to complex craniomaxillofacial disharmonies. *J Craniomaxillofac Surg* 1989;17(3):101-4.
137. Wehmöller M, Weihe S, Rasche C, Scherer P, Eufinger H. CAD/CAM-prefabricated titanium implants for large skull defects—clinical experience with 166 patients from 1994 to 2000. In: Lemke HU, Inamura K, Doi K, Farman AG, Vannier MW, Reiber JHC, editors. *CARS 2004 - Computer Assisted Radiology and Surgery*. 18th International Congress and Exhibition; 2004; Chicago USA: Elsevier B.V.; 2004. p. 667-672.
138. Osakada K, Shiomi M. Flexible manufacturing of metallic products by selective laser melting of powder. *International Journal of Machine Tools and Manufacture* 1st International Conference on New Forming Technology 2006;46(11):1188-1193.
139. Wen CE, Mabuchi M, Yamada Y, Shimojima K, Chino Y, Asahina T. Processing of biocompatible porous Ti and Mg. *Scripta Mater* 2001;45(10):1147-1153.

140. Bram M, Laptev A, Buchkremer HP, Stöver D. Application of powder metallurgy for the production of highly porous functional parts with open porosity. In: Nie JF, Barnett M, editors. International Conferences on Advanced Materials Processing, ICAMP3; 2005 Dec; Melbourne, Australia: Institute of Materials Engineering Australasia Ltd; 2005. p. 119-122.
141. Kienapfel H, Sprey C, Wilke A, Griss P. Implant fixation by bone ingrowth. *The Journal of Arthroplasty* 1999;14(3):355-368.
142. Ping WS, Rong LD, Jie GJ, Yun LC, Qing SY, Zhi FH. Numerical simulation of microstructure evolution of Ti-6Al-4V alloy in vertical centrifugal casting. *Materials Science and Engineering: A* 2006;426(1-2):240-249.
143. Watanabe K, Miyakawa O, Takada Y, Okuno O, Okabe T. Casting behavior of titanium alloys in a centrifugal casting machine. *Biomaterials* 2003;24(10):1737-1743.
144. Frost HM. A 2003 update of bone physiology and Wolff's Law for clinicians. *Angle Orthod* 2004;74(1):3-15.
145. Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Suzuki J, Matsushita T, Kokubo T, et al. Osteoinductive porous titanium implants: effect of sodium removal by dilute HCl treatment. *Biomaterials* 2006;27(13):2682-91.
146. Sul YT, Johansson C, Byon E, Albrektsson T. The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive titanium implants. *Biomaterials* 2005;26(33):6720-30.
147. Rolander U, Mattsson L, Lausmaa J, Kasemo B. Anodic oxide films on titanium. *Ultramicroscopy* 1986;19(4):407.
148. Takadama H, Kim H-M, Kokubo T, Nakamura T. XPS study of the process of apatite formation on bioactive Ti-6Al-4V alloy in simulated body fluid. *Science and Technology of Advanced Materials* 2001;2(2):389-396.
149. Kokubo T, Kim H-M, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials Focus on Biomaterials Science in Asia* 2003;24(13):2161-2175.
150. Kokubo T, Kim H-M, Miyaji F, Takadama H, Miyazaki T. Ceramic-metal and ceramic-polymer composites prepared by a biomimetic process. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 1999;30(4):405-409.
151. Goyenvalle E, Aguado E, Nguyen J-M, Passuti N, Le Guehennec L, Layrolle P, et al. Osteointegration of femoral stem prostheses with a bilayered calcium phosphate coating. *Biomaterials* 2006;27(7):1119-1128.
152. Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials* 2007;23(7):844-854.

153. Limin Sun CCB, Karlis A. Gross, Ahmet Kucuk,. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: A review. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001;58(5):570-592.
154. Lopez-Heredia MA, Weiss P, Layrolle P. An electrodeposition method of calcium phosphate coatings on titanium alloy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2007;V18(2):381-390.
155. Wang CX, Chen ZQ, Guan LM, Wang M, Liu ZY, Wang PL. Fabrication and characterization of graded calcium phosphate coatings produced by ion beam sputtering/mixing deposition. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 2001;179(3):364-372.
156. Lee I-S, Kim D-H, Kim H-E, Jung Y-C, Han C-H. Biological performance of calcium phosphate films formed on commercially pure Ti by electron-beam evaporation. *Biomaterials* 2002;23(2):609-615.
157. Feng B, Chen JY, Qi SK, He L, Zhao JZ, Zhang XD. Carbonate apatite coating on titanium induced rapidly by precalcification. *Biomaterials* 2002;23(1):173-179.
158. Kweh SWK, Khor KA, Cheang P. An in vitro investigation of plasma sprayed hydroxyapatite (HA) coatings produced with flame-spheroidized feedstock. *Biomaterials* 2002;23(3):775-785.
159. Yan L, Leng Y, Weng L-T. Characterization of chemical inhomogeneity in plasma-sprayed hydroxyapatite coatings. *Biomaterials* 2003;24(15):2585-2592.
160. Gledhill HC, Turner IG, Doyle C. In vitro fatigue behaviour of vacuum plasma and detonation gun sprayed hydroxyapatite coatings. *Biomaterials* 2001;22(11):1233-40.
161. Fu Y, Batchelor AW, Khor KA. Fretting wear behavior of thermal sprayed hydroxyapatite coating lubricated with bovine albumin. *Wear* 1999;230(1):98-102.
162. Fu Y, Batchelor AW, Wang Y, Khor KA. Fretting wear behaviors of thermal sprayed hydroxyapatite (HA) coating under unlubricated conditions. *Wear* 1998;217(1):132-139.
163. El-Hossary FM, Negm NZ, Khalil SM, Raaif M. Effect of continuous and cyclic Rf plasma processing time on titanium surface. *Applied Surface Science* 2005;239(2):142-153.
164. Hohl F, Berndt H, Mayr P, Stock H-R. Implantation of N²⁺, O⁺ and CO⁺ ions into titanium and Ti-6Al-4V. *Surface and Coatings Technology*
Fourth International Conference on Plasma Surface Engineering Part 2 1995;74-75(Part 2):765-769.

165. Alonso F, Arizaga A, Quinton S, Ugarte JJ, Viviente JL, Onate JI. Mechanical properties and structure of Ti-6Al-4V alloy implanted with different light ions. *Surface and Coatings Technology*
Fourth International Conference on Plasma Surface Engineering Part 2 1995;74-75(Part 2):986-992.
166. Alonso F, Rinner M, Loinaz A, Onate JI, Ensinger W, Rauschenbach B. Characterization of Ti-6Al-4V modified by nitrogen plasma immersion ion implantation. *Surface and Coatings Technology*
3rd International Workshop on Plasma-Based Ion Implantation 1997;93(2-3):305-308.
167. Tereshko I, Abidzina V, Tereshko A, Elkin I. Nanostructural evolution of steel and titanium alloys exposed to glow-discharge plasma. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*
The Application of Accelerators in Research and Industry - Proceedings of the Nineteenth International Conference on The Application of Accelerators in Research and Industry, Nineteenth International Conference on The Application of Accelerators in Research and Industry 2007;261(1-2):678-681.
168. van der Wal E, Vredenberg AM, Ter Brugge PJ, Wolke JGC, Jansen JA. The in vitro behavior of as-prepared and pre-immersed RF-sputtered calcium phosphate thin films in a rat bone marrow cell model. *Biomaterials* 2006;27(8):1333-1340.
169. Tereshko IV, Abidzina VV, Elkin IE, Tereshko AM, Glushchenko VV, Stoye S. Formation of nanostructures in metals by low-energy ion irradiation. *Surface and Coatings Technology*
SMMIB 2005, 14th International Conference on Surface Modification of Materials by Ion Beams 2007;201(19-20):8552-8556.
170. Koniger A, Ensinger W, Hammerl C, Hochbauer T, Schrag G, Hartmann J, et al. Investigation of plasma immersion ion implanted niobium oxide and titanium nitride films by nanohardness measurement. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*
Proceedings of the E-MRS '96 Spring Meeting Symp. I on New Trends in Ion Beam Processing of Materials 1996;120(1-4):282-285.
171. Mandl S, Krause D, Thorwarth G, Sader R, Zeilhofer F, Horch HH, et al. Plasma immersion ion implantation treatment of medical implants. *Surface and Coatings Technology* 2001;142-144:1046-1050.

172. Mandl S, Rauschenbach B. Improving the biocompatibility of medical implants with plasma immersion ion implantation. *Surface and Coatings Technology* 2002;156(1-3):276-283.
173. Escobedo JC, Ortiz JC, Almanza JM, Cortes DA. Hydroxyapatite coating on a cobalt base alloy by investment casting. *Scripta Materialia* 2006;54(9):1611-1615.
174. Ban S, Maruno S. Hydrothermal-electrochemical deposition of hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998;42(3):387-395.
175. Abidzina V, Deliloglu-Gurhan I, Ozdal-Kurt F, Sen BH, Tereshko I, Elkin I, et al. Cell adhesion study of the titanium alloys exposed to glow discharge. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms The Application of Accelerators in Research and Industry - Proceedings of the Nineteenth International Conference on The Application of Accelerators in Research and Industry, Nineteenth International Conference on The Application of Accelerators in Research and Industry* 2007;261(1-2):624-626.
176. Jun J, Shin J-H, Dhayal M. Surface state of TiO₂ treated with low ion energy plasma. *Applied Surface Science* 2006;252(10):3871-3877.
177. Barrere F, Snel MME, van Blitterswijk CA, de Groot K, Layrolle P. Nano-scale study of the nucleation and growth of calcium phosphate coating on titanium implants. *Biomaterials* 2004;25(14):2901-2910.
178. Das K, Bose S, Bandyopadhyay A. Surface modifications and cell-materials interactions with anodized Ti. *Acta Biomaterialia* 2007;3(4):573-585.
179. Liu Q, Ding J, Mante FK, Wunder SL, Baran GR. The role of surface functional groups in calcium phosphate nucleation on titanium foil: a self-assembled monolayer technique. *Biomaterials* 2002;23(15):3103-3111.
180. Svehla M, Morberg P, Bruce W, Zicat B, Walsh WR. The effect of substrate roughness and hydroxyapatite coating thickness on implant shear strength. *The Journal of Arthroplasty* 2002;17(3):304-311.
181. Lim YJ, Oshida Y, Andres CJ, Barco MT. Surface characterizations of variously treated titanium materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16(3):333-42.
182. Lin S, LeGeros RZ, LeGeros JP. Adherent octacalciumphosphate coating on titanium alloy using modulated electrochemical deposition method. *J Biomed Mater Res A* 2003;66(4):819-28.

183. Kuo MC, Yen SK. The process of electrochemical deposited hydroxyapatite coatings on biomedical titanium at room temperature. *Materials Science and Engineering: C* 2002;20(1-2):153-160.
184. Zhang JM, Lin CJ, Feng ZD, Tian ZW. Mechanistic studies of electrodeposition for bioceramic coatings of calcium phosphates by an in situ pH-microsensor technique. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1998;452(2):235-240.
185. Barrere F, van Blitterswijk CA, de Groot K, Layrolle P. Nucleation of biomimetic Ca-P coatings on Ti6Al4V from a SBF x 5 solution: influence of magnesium. *Biomaterials* 2002;23(10):2211-2220.
186. Barrere F, van Blitterswijk CA, de Groot K, Layrolle P. Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBF x 5 solution. *Biomaterials* 2002;23(9):1921-1930.
187. Park J-H, Lee D-Y, Oh K-T, Lee Y-K, Kim K-M, Kim K-N. Bioactivity of calcium phosphate coatings prepared by electrodeposition in a modified simulated body fluid. *Materials Letters* 2006;60(21-22):2573-2577.
188. Pacaccio DJ, Stern SF. Demineralized Bone Matrix: Basic Science and Clinical Applications. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery Orthobiologics* 2005;22(4):599-606.
189. Lopez-Heredia MA, Goyenvallé E, Aguado E, Pilet P, Leroux C, Dorget M, et al. Bone growth in rapid prototyped porous titanium implants. *J Biomed Mater Res A* 2007.
190. Siebers MC, ter Brugge PJ, Walboomers XF, Jansen JA. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials* 2005;26(2):137-146.
191. Silva CC, Sombra ASB. Raman spectroscopy measurements of hydroxyapatite obtained by mechanical alloying. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 2004;65(5):1031-1033.
192. Wang J, Layrolle P, Stigter M, de Groot K. Biomimetic and electrolytic calcium phosphate coatings on titanium alloy: physicochemical characteristics and cell attachment. *Biomaterials* 2004;25(4):583-592.
193. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 2005;26(4):433-441.
194. Zeltinger J, Sherwood JK, Graham DA, Mueller R, Griffith LG. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. *Tissue Eng* 2001;7(5):557-72.

195. Vehof JWM, Spauwen PHM, Jansen JA. Bone formation in calcium-phosphate-coated titanium mesh. *Biomaterials* 2000;21(19):2003-2009.

Liste des figures

Figure 1.1.1 Organisation hiérarchique de l'os. (a) L'os cortical et l'os trabéculaire. (b) Ostéons avec systèmes haversiens. (c) Lamelles. (d) Fibres de collagène obtenues à partir de fibrilles de collagène. (e) Cristaux de minéral osseux, molécules de collagène et protéines non collagéniques.

D'après [2, 9]. Source des images de : www.medes.fr, www.engin.umich.edu, www.theses.ulaval.ca, www.bnl.gov

Figure 1.1.2. Microstructure de (a) l'os cortical et (b) de l'os trabéculaire.

Source des images : www.feppd.org, www.medstudents.com.br

Fig 1.1.3. Types d'arrangements dans l'orientation pour les fibrilles de collagène. (a) parallèle, (b) tissé, (c) contreplaqué et (d) radial. [7]

Source d'image: www.rpi.edu

Figure 1.1.4. Assemblage des fibres et des monofibres de collagène ainsi que les cristaux de minéral osseux. Leur patron périodique est le résultat de la présence d'un espace adjacent (40 nm) et des régions superposées (27 nm) de molécules assemblées. [2]

Figure 1.2.1. Diagramme de Pourbaix pour le système Ti-H₂O. Les lignes hachurées indiquent la région des conditions physiologiques trouvées dans le corps humain.

Figure 1.3.1. Différentes méthodes de fixation de prothèse dans l'os a) et b) Mécanique, c) Cimentée, d) Surface poreuse et e) Revêtement HA

Source des images : www.stryker.com, www.zimmer.com, www.smith-nephew.com, www.biomet.com

Figure 1.3.2. Différentes structures obtenues par des méthodes du prototypage rapide. a) Impression de fibres [52] et b) Frittage de poudres par un faisceau [53].

Figure 1.4.1. Bioactivité et ostéoconduction de revêtements de phosphate de calcium (PCa) sur implants en titane (Ti)

Figure 1.4.2. Structure cristalline de l'hydroxyapatite projetée sur plan basal c [16]

Liste des tableaux

Tableau 1.2.1. Propriétés mécaniques des métaux utilisés pour la fabrication d'implants orthopédiques et dentaires comparées à celle de l'os [4, 16, 17, 22, 23].

Table 1.2.2. Composition chimique (% masse) du Ti6Al4V et Ti CP G2.

Table 1.2.3. Propriétés mécaniques du Ti6Al4V et du Ti CP G2.

Table 1.4.1 Principaux phosphates de calcium utilisés pour le revêtement de prothèses et d'implants métalliques [16].

ABSTRACT

The actual efforts concerning the implants for orthopedic and dental applications are focused towards the fabrication of porous bioactive implants. We have developed a fabrication procedure to obtain titanium implants with a controlled porous structure and geometry by using rapid prototyping. Computer tools allow the design of the implants. The work presented in this thesis describes the fabrication of these implants by using a rapid prototyping method and the lostwax process. We have characterized the physicochemical, mechanical and biological properties of the porous titanium implants. The biofunctionality of these implants was specifically shown in critical size bone defects in rabbits. The porous structure allows bone growth towards the center of the titanium implants. We have also studied two surface treatments methods in order to improve the bioactivity of titanium. The first approach is an electrodeposition method to obtain a calcium phosphate coating on the porous titanium implants. The different parameters involved in this procedure (temperature, current, electrodeposition time) have been studied in relationship with the homogeneity, composition and thickness of the calcium phosphate coatings. The effect of radio frequency plasma treatments under different atmospheres and an alkali treatment have been studied in relationship with the ability of the surfaces to induce calcium phosphate precipitation from physiological solutions. Finally we stepped into the bone tissue engineering field by culturing rat mesenchymal stem cells on the porous titanium matrices with or without a carbonate apatite coating.

Keywords: Rapid prototyping; porous titanium; scaffold; bone tissue reconstruction; calcium phosphate; coatings; surface treatments; electrodeposition; radio frequency plasma; bioactivity.

RESUMEN

Los esfuerzos actuales en el área de los implantes para aplicaciones ortopédicas y dentales se dirige hacia la fabricación de implantes porosos bioactivos. Nosotros hemos desarrollado un proceso de fabricación de implantes de titanio con una geometría y una estructura porosa controlada por prototipaje rápido. El trabajo presentado en esta tesis describe la fabricación de estos implantes mediante un proceso de prototipaje rápido et le proceso de la cera perdida. Hemos caracterizado las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas de los implantes en titanio poroso. La biofuncionalidad de estos implantes fue demostrada mediante un defecto óseo de talla critica en un conejo. La estructura porosa permite un crecimiento óseo hacia el interior del implante. Igualmente, hemos estudiado dos métodos de tratamiento de superficies con el fin de mejorar la bioactividad del titanio. El primero hace uso de un proceso de electrodeposición de revestimientos de fosfato de calcio en los implantes en titanio poroso. Los diferentes parámetros de éste (temperatura, corriente, tiempo de electrodeposición) fueron estudiados con relación a la homogeneidad, la composición y el espesor del revestimiento. Los efectos de tratamientos plasma de radio frecuencia bajo diferentes atmósferas y un tratamiento alcalino, fueron estudiados con relación a la habilidad de las superficies para inducir la precipitación de fosfatos de calcio a partir de soluciones fisiológicas. Finalmente, abordamos el dominio de la ingeniería de tejido óseo mediante la cultura de células madre mesenchymales de rata sobre las matrices de titanio poroso revestidas o no de una capa de apatita carbonatada.

Palabras clave: Prototipaje rápido; titanio poroso; scaffold; reconstrucción de tejido óseo; fosfato de calcio; revestimiento; tratamientos de superficie; electrodeposición; plasma de radio frecuencia, bioactividades

Marco Antonio LOPEZ HEREDIA

Bioactivité d'implants en titane poreux produits par prototypage rapide

Thèse de Doctorat, Université de Nantes ; Janvier 2008

Nombre de pages: 80 Nombre de figures: 9 Nombre de tableau : 4

RESUME

Les efforts actuels dans le domaine des implants pour des applications orthopédiques et dentaires tendent à la fabrication d'implants poreux bioactifs. Nous avons développé un procédé de fabrication d'implants en titane ayant une géométrie et une structure poreuse contrôlées par prototypage rapide. Le design des implants s'effectue grâce à des outils informatiques. Le travail présenté dans cette thèse décrit la fabrication de ces implants par un procédé de prototypage rapide et de la cire perdue. Nous avons caractérisé les propriétés physico-chimiques, mécaniques et biologiques des implants en titane poreux. La biofonctionnalité de ces implants a été démontrée dans un défaut osseux de taille critique chez le lapin. La structure poreuse permet une repousse osseuse au sein des implants en titane. Nous avons également étudié deux méthodes de traitement de surface afin d'améliorer la bioactivité du titane. La première approche est un procédé d'électrodéposition de revêtements de phosphate de calcium sur le titane. Les différents paramètres propres à cette méthode (température, courant, temps d'électrodéposition) ont été étudiés en relation avec l'homogénéité, la composition et l'épaisseur des revêtements obtenus. L'effet des traitements plasma par radiofréquence sous différentes atmosphères et un traitement alcalin ont été étudiés en relation avec la capacité de ces surfaces à induire la précipitation de phosphates de calcium à partir de solutions physiologiques. Nous avons enfin abordé le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse en cultivant des cellules souches mésenchymateuses de rat sur ces matrices en titane poreux revêtues ou non d'une couche d'apatite carbonatée.

Discipline : Ingénierie tissulaire osseuse **Spécialité :** Biomatériaux

Mots clés : Prototypage rapide ; titane poreux ; scaffold ; reconstruction du tissu osseux; phosphate de calcium; revêtements ; traitements de surface ; électrodéposition ; plasma de radio fréquence ; bioactivité.