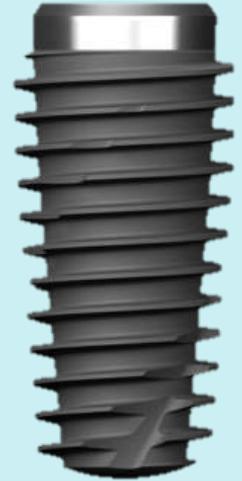


# ÉVALUATION DE L'ATTACHE CELLULAIRE SUR DEUX TYPES DE SURFACES IMPLANTAIRES



Tutrice : Géraldine Rohman

Membres de l'équipe : Nadine Belfihadj, Yana Petrosyan, Heyem Neche, Merouane Benabdellaziz, Yousra Abouhali , Sarah Bensaïbi

# Organisation du projet

- Recherche bibliographique
  - Appropriation de la problématique ;
  - Mise en évidence des paramètres influents.
- Organisation des essais expérimentaux
  - Analyse de la possibilité d'organiser des essais expérimentaux au sein du laboratoire **CSPBAT** ;
  - Mise en place d'un procédé expérimental ;
  - Sollicitation des représentants du groupe **LYRA** GROUP pour la préparation et l'envoi des échantillons.
- Réalisation des essais
  - Réception des échantillons ;
  - Programmation des créneaux au laboratoire ;
  - Analyse des résultats et comparaison avec d'autres études.

# I. PROBLÉMATIQUE

# I. Problématique

## 1. Péri-implantite dentaire :

La péri-implantite est une pathologie survenant dans les tissus autour des implants dentaires, caractérisée par une inflammation de la muqueuse péri-implantaire et une perte progressive de l'os de soutien.



*Figure 1.* Signes cliniques d'une péri-implantite se manifestant par une BOP (positive bleeding on probing) et une perte tissulaire visible.

19 bactéries parodontopathogènes qui rentrent en jeu<sup>1</sup> :

- *Pseudomonas aeruginosa*, *S. Oralis*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*...
- Organismes fongiques (champignons) : *Candida albicans*, *Candida boidinii*, *Penicillium spp.*, *Rhadorula laryngis*, *Paelicomycetes spp.*, etc.



Facteur de virulence élevé



Infections, destruction tissulaire

# I. Problématique

## 2. Facteurs qui influencent la microflore<sup>1</sup> :

- Liés au patient :

Hygiène bucco-dentaire, présence de dents et leur état parodontal, facteurs de risque...

- Liés au chirurgien dentiste :

Débridement mécanique de la poche péri-implantaire et/ou utilisation d'anti-biotiques, corps étrangers (reste de ciment de scellement).

- Liés à l'implant :

État de surface implantaire : fonctionnalisation de la surface, rugosité.

L'implant Lyra → contrôle de l'attachement des bactéries en modifiant la RUGOSITÉ

# I. Problématique

## 3. Caractéristiques de l'implant Lyra iBone S :

### *Matériau :*

Les implants sont en titane T60, classe IV

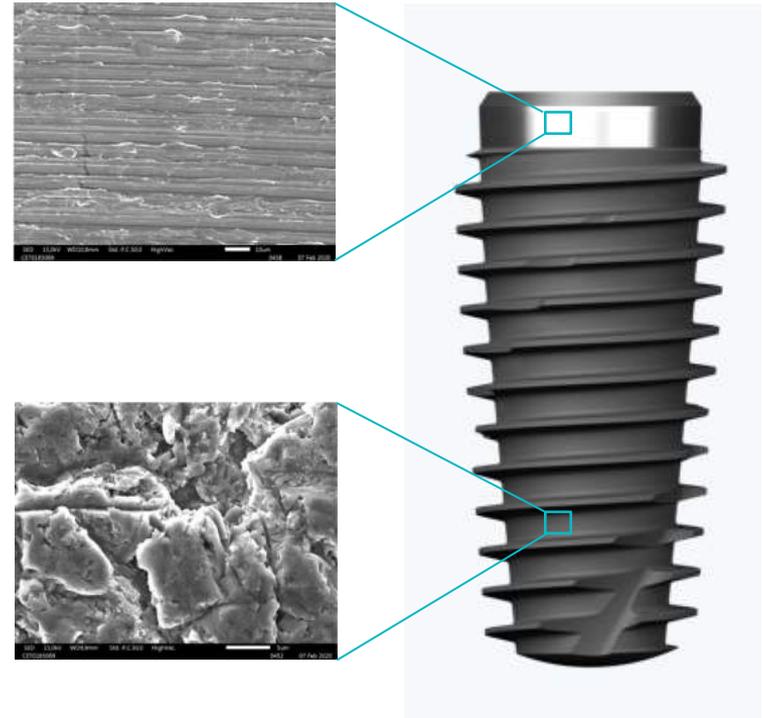
### *État de surface :*

**Le col :** rugosité réduite ( $Ra < 0.6 \mu m$ ) sur 1-1.5 mm obtenue par usinage

→ La surface assez lisse pour ne pas attacher des bactéries et assez rugueuse pour l'ostéo-intégration lente et/ou pour l'attache de la muqueuse dans le cas de perte osseuse.

**Le corps :** rugosité normale ( $1.2 < Ra < 1.7 \mu m$ ) obtenue par sablage à l'oxyde de titane ( $TiO_2$ )

→ La surface est rugueuse pour permettre l'ostéo-intégration active

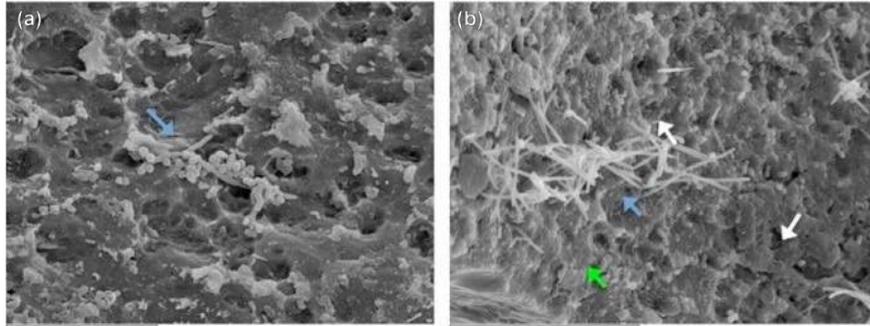


*Figure 4.* Différence de rugosité sur le col et le corps de l'implant hybride Lyra iBone S.

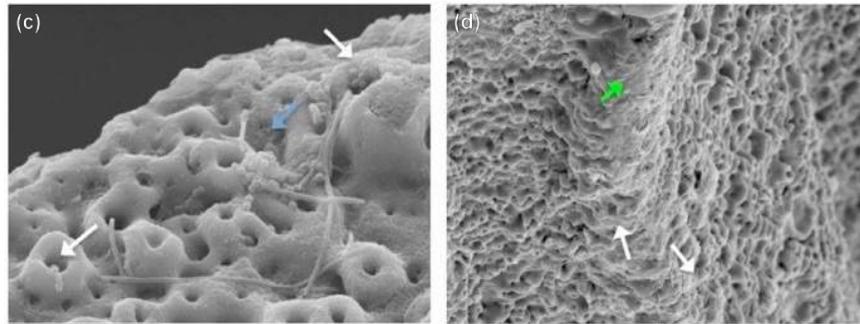
# I. Problématique

## 4. Facteurs influençant l'attachement bactérien

Biofilm sur une surface avec une rugosité minimale



Biofilm sur une surface avec une rugosité modérée



L'attachement des bactéries dépend de plusieurs facteurs :

- **Milieu** : le pH, la T°, les protéines de la salive, la durée de contact, etc. <sup>5</sup>
- **Type des micro-organismes** : la paroi, le métabolisme. <sup>6</sup>
- **L'état de surface** : géométrie, propriétés physico-chimiques. <sup>5</sup>

*Figure 5.* Images obtenues au MEB de biofilms développés pendant 96 heures sur des implants dentaires entiers. <sup>6</sup>

# I. Problématique

## 5. Analyse statistique des micro-organismes

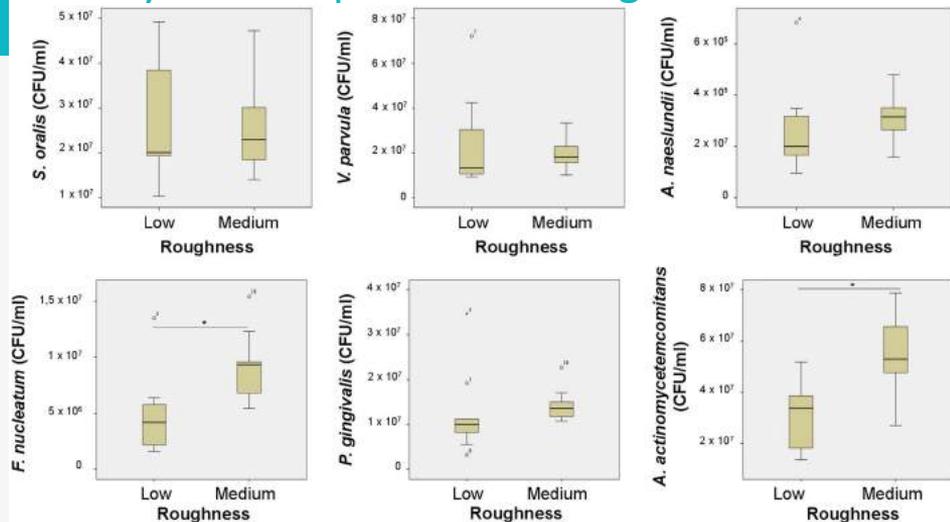


Figure 6. Distribution des données après l'analyse statistique du nombre de bactéries exprimées en unité formant des colonies/ml (UFC/ml) sur des implants dentaires entiers avec différentes surfaces de rugosité. <sup>6</sup>

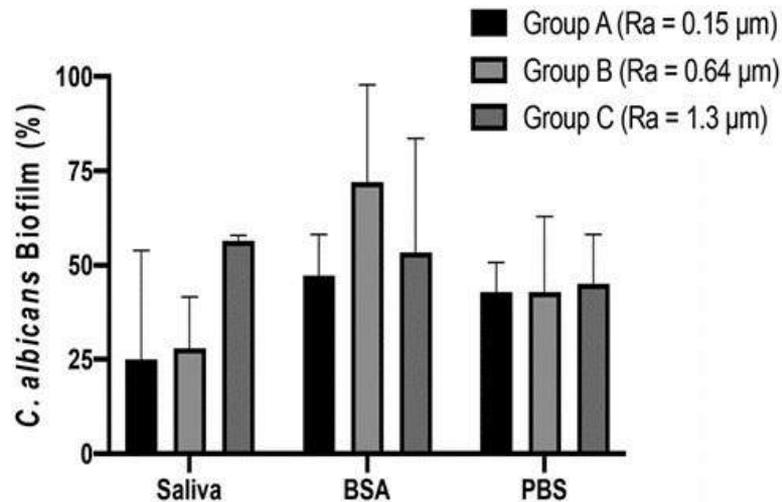


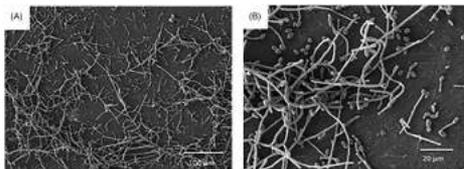
Figure 7. Influence de la pellicule salivaire sur la formation du biofilm de *C. albicans*. Des disques de titane de rugosité différente ont été pré-enduits de PBS, de BSA ou de salive humaine et incubés avec *C. albicans* pendant 24h. <sup>5</sup>

→ L'attache bactérienne dépend de la **rugosité** selon le **type de bactéries**, la **salive** et le **pH** du milieu.

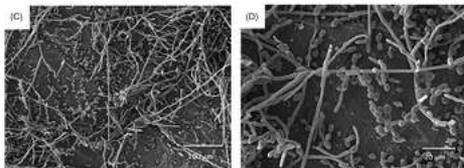
# I. Problématique

## 5. Analyse statistique des micro-organismes

Rugosité Ra = 0,15 um



Rugosité Ra = 0,64 um



Rugosité Ra = 1,30 um

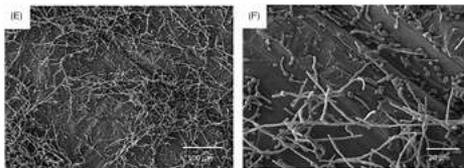


Figure 8. Micrographies au MEB sur différentes rugosités montrant la formation de biofilms. <sup>5</sup>

	Groupe A (lisse)	Groupe B (minimalement approximatif)	Groupe C (modérément approximatif)
Rugosité Ra (mm)	0,15 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,05 <sup>a</sup>
Angle de contact (°)	Eau	74,5 ± 10,2	86,2 ± 10,0 <sup>b</sup>
	Diiodométhane	55,9 ± 4,2	62,8 ± 7,1
Énergie libre de surface (mJ/m <sup>2</sup> )	39,4 ± 6,3	31,8 ± 6,5 <sup>c</sup>	46,1 ± 7,2 <sup>aborder</sup>
[Composant de dispersion/composant polaire]	[30.91/8.45]	[27.04/4.67]	[31.19/14.88]

Figure 9. Variation de l'angle de contact et l'énergie libre de surface en fonction de Ra. <sup>5</sup>

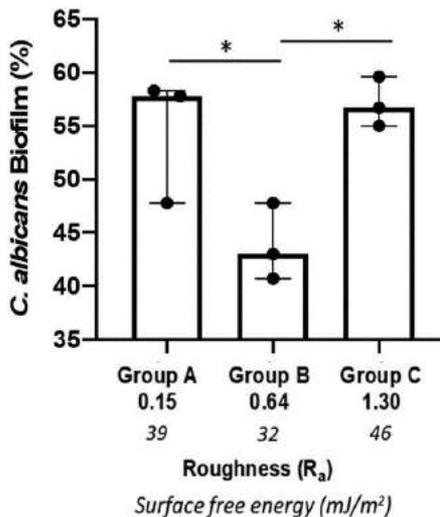


Figure 10. Quantité de formation de biofilm (%) sur des disques de titane d'énergie de surface croissante et de rugosité différente. <sup>5</sup>

# I. Problématique

## 6. Approche adaptée pour l'étude

La mouillabilité (l'angle de contact) et l'énergie de la surface



Influencent l'attachement des bactéries



Ça va nous donner une idée sur l'attachement cellulaire et l'ostéo-intégration de l'implant et par conséquent son efficacité contre les péri-implantites

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

## II. Matériel et méthodes

### 1. Matériel :

- Échantillons sous forme cylindrique (lisses et rugueux) usinés par Lyra ;
- Salive complète naturelle (non filtrée) ;
- Goniomètre pour mesure l'angle de contact ;
- Microscope Électronique à Balayage Hitachi (TM-3000).

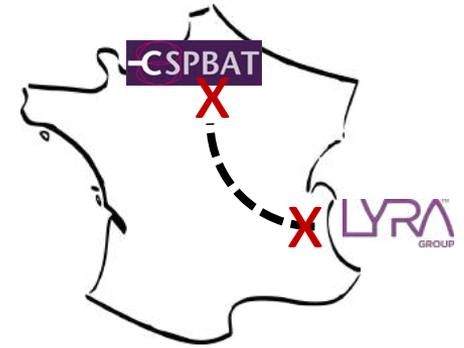


Figure 11. Échantillons avant préparation.

## II. Matériel et méthodes

### 2. Préparation des échantillons :

#### 2.1. Nettoyage :

Nettoyage par ultrason à T° ambiante :

- Acétone pendant 5 minutes
- Cyclohexane pendant 5 minutes
- Propanol pendant 5 minutes
- Lavage à l'eau distillée pendant 5 minutes

Séchage à l'étuve à T=50°C pendant 24 heures



Figure 12. Solutions utilisées et nettoyeur ultrason.



Figure 13. Étuve utilisée pour l'incubation des échantillons.

## II. Matériel et méthodes

### 2. Préparation des échantillons :

#### 2.2. Incubation dans la salive :

Les échantillons ont été incubés dans de la salive complète non filtrée pendant des durées différentes.

DURÉE D'INCUBATION	TYPE DE SURFACE	Groupes d'échantillons
Non incubé	Lisse	Nu-L
	Rugueuse	Nu-R
~1 seconde	Lisse	T0-L
	Rugueuse	T0-R
24 heures à 37°C	Lisse	T24-L
	Rugueuse	T24-R



Figure 14. Différents groupes d'échantillons.

## II. Matériel et méthodes

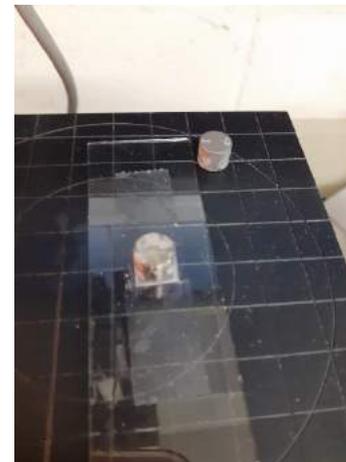
### 3. Mesures :

#### 3.1. Angle de contact :

L'angle de contact a été mesuré avec un goniomètre :

- Une goutte de 2  $\mu\text{l}$  est déposée sur la surface de l'échantillon.
- On attend 5 secondes pour figer l'image et mesurer l'angle de contact.

La mesure a été faite sur 3 échantillons de chaque groupe, sur chaque échantillon a répété la mesure sur 3 points



*Figure 15.* Porte échantillon (à gauche) et appareil de mesure de l'angle de contact (à droite).

## II. Matériel et méthodes

### 3. Mesures :

#### 3.2. Microscope Électronique à Balayage :

Pour l'observation au MEB, on a sélectionné un échantillon de chaque groupe.

Fixation du biofilm :

- Incubation dans du Formaldéhyde pendant 30 minutes à 4°C.
- Rinçage au PBS.
- Rinçage des échantillons 3 fois à l'eau pure.



Figure 16. Échantillons après fixation au formaldéhyde.

## II. Matériel et méthodes

### 3. Mesures :

#### 3.2. Microscope Électronique à Balayage :

Observation des surfaces au MEB avec un grossissement de 300, 800 et 2500.



Figure 17. MEB Hitachi TM-3000)

# III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

# III. Résultats et discussion

## 1. Résultat de l'angle de contact

DURÉE D'INCUBATION	Non incubé	~1 seconde	24 heures
Lisse ( $R_a < 0.6 \mu\text{m}$ )	$66,57^\circ \pm 6,44$	$29,07^\circ \pm 5,37$	$19,6^\circ \pm 2,13$
Rugueux ( $1.2 < R_a < 1.7 \mu\text{m}$ )	$50,62^\circ \pm 4,4$	$32,64^\circ \pm 1,51$	$9,16^\circ \pm 2,63$

$R_a \nearrow \rightarrow$  angle de contact  $\searrow \rightarrow$  la surface est plus hydrophile

Temps d'incubation  $\nearrow \rightarrow$  angle de contact  $\searrow \rightarrow$  la surface est plus hydrophile

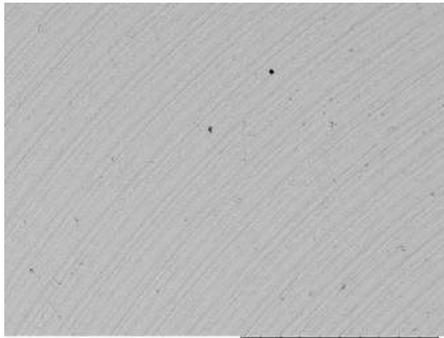
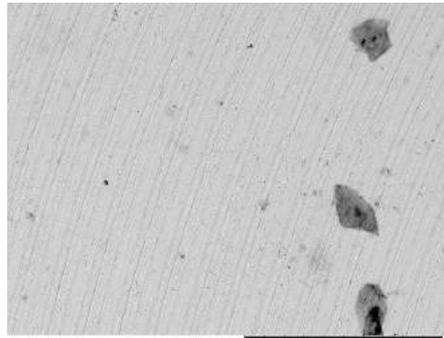
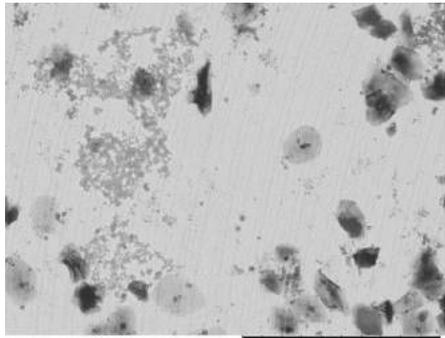
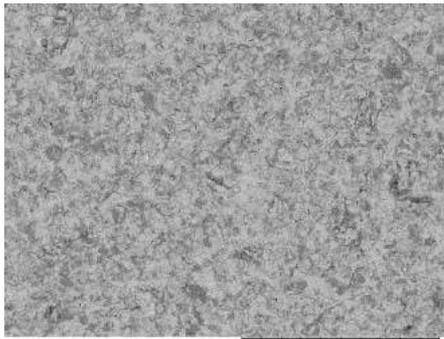
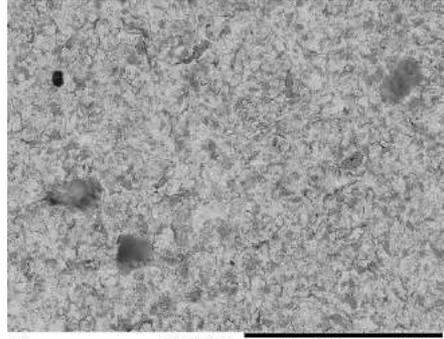
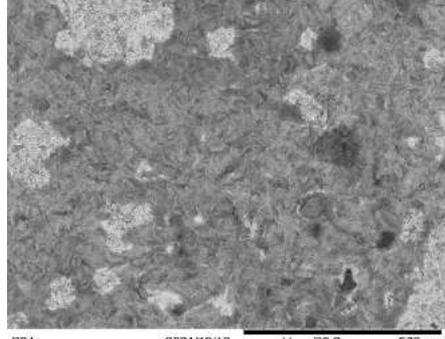
# III. Résultats et discussion

## 2. Observations au MEB (x300)

Non incubé

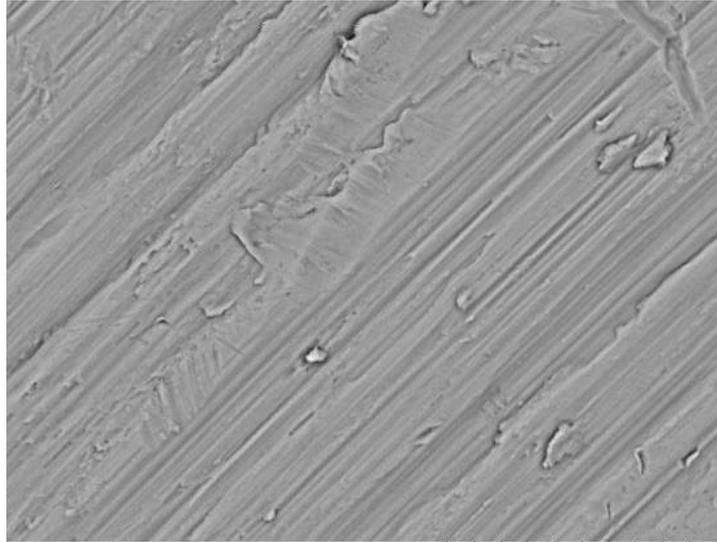
~1 seconde

24 heures

<p>Lisse (<math>R_a &lt; 0.6 \mu\text{m}</math>)</p>	 <p>L Nu 2021/12/16 H D8.6 300 um Lisse Temoir nu</p>	 <p>L0 2021/12/16 H D8.5 300 um LT=0</p>	 <p>L24 2021/12/16 H D8.5 300 um LT=24</p>
<p>Rugueux (<math>1.2 &lt; R_a &lt; 1.7 \mu\text{m}</math>)</p>	 <p>2021/12/16 H D8.6 300 um</p>	 <p>R0 2021/12/16 H D8.6 300 um RT=0</p>	 <p>R24 2021/12/16 H D8.6 300 um RT=24</p>

# III. Résultats et discussion

## 2. Observations au MEB (x2500)

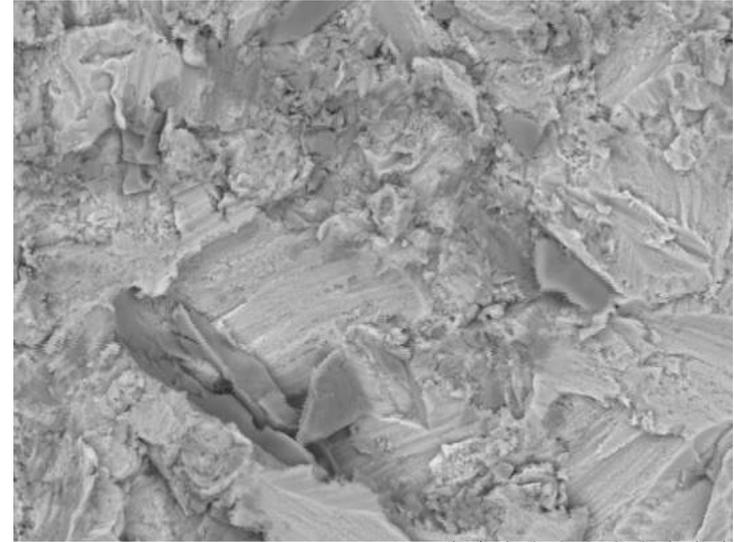


LNu 2021/12/16 H D6.6 30 um

Lisse Temoin nu

Lisse ( $Ra < 0.6 \mu m$ )

Traces d'usinage au niveau de la surface lisse.

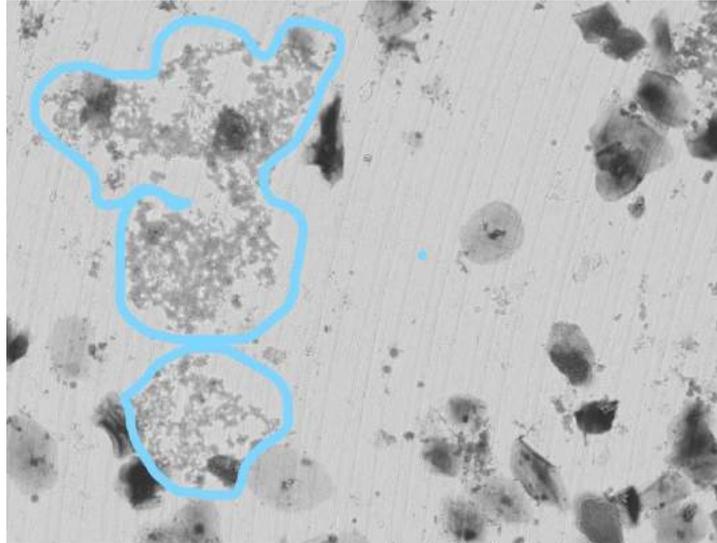


2021/12/16 H D6.6 30 um

Rugueux ( $1.2 < Ra < 1.7 \mu m$ )

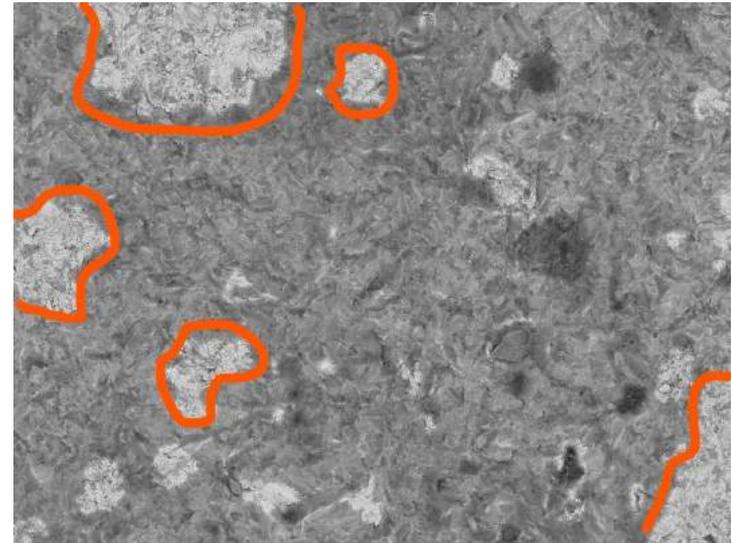
# III. Résultats et discussion

## 2. Observations au MEB (x300)



L24  
L T=24  
2021/12/16 H D6.5 300 um

Lisse ( $Ra < 0.6 \mu m$ )



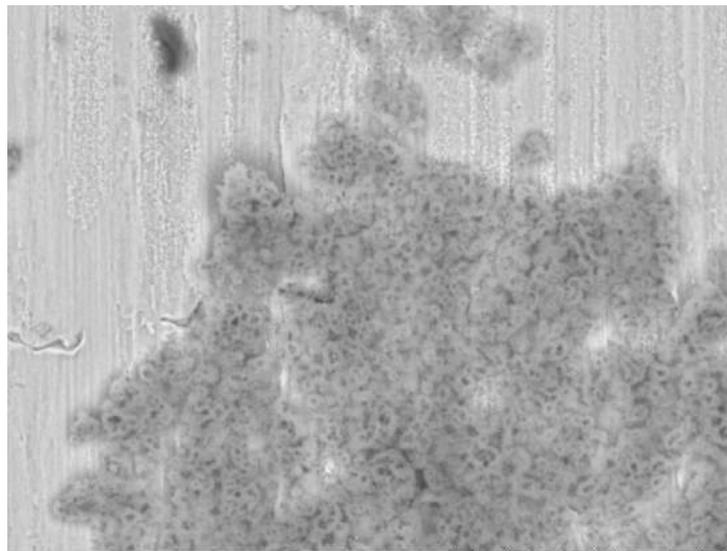
R24  
R T=24  
2021/12/16 H D6.6 300 um

Rugueux ( $1.2 < Ra < 1.7 \mu m$ )

Observation d'un biofilm bactérien sur les échantillons qui ont été incubés pendant 24 heures.  
Plus développé sur la surface rugueuse que sur la surface lisse.

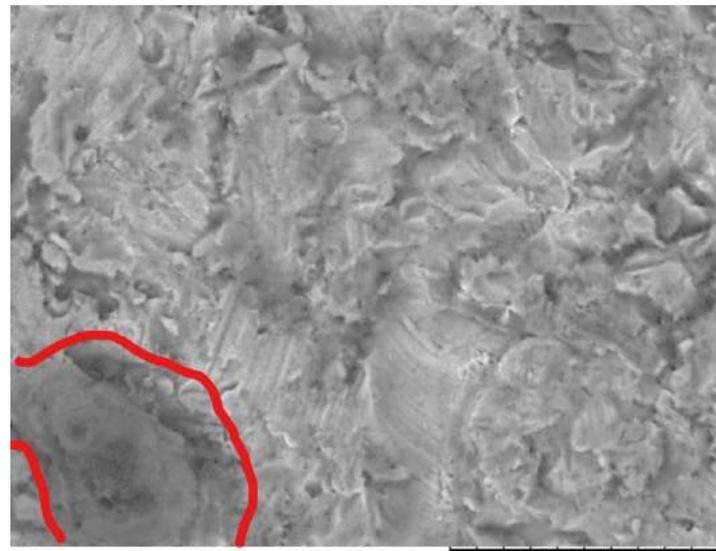
# III. Résultats et discussion

## 2. Observations au MEB (x2500)



L24  
LT=24

Lisse ( $Ra < 0.6 \mu m$ )



R24  
R T=24

Rugueux ( $1.2 < Ra < 1.7 \mu m$ )

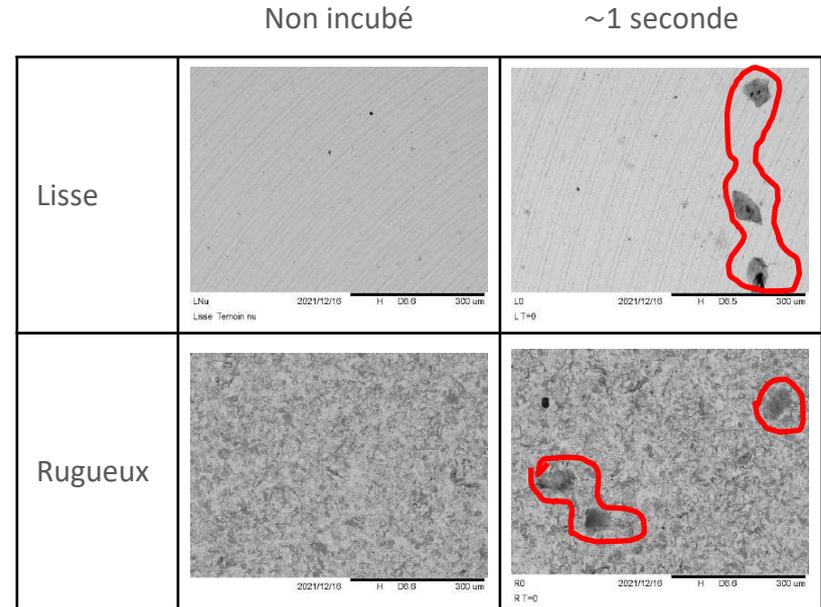
Sur la surface lisse on peut bien visualiser la structure des colonies bactériennes

Difficulté de visualiser la structure des colonies dans la surface rugueuse à cause des agglomérations, elles se trouvent en profondeur.

# III. Résultats et discussion

## 3. Comparaison des résultats obtenus avec la littérature

- Les surfaces des implants dentaires acquièrent un film de pellicule salivaire immédiatement après l'exposition à la cavité buccale. [Bürgers R. 2010](#)



- La présence de la salive augmente le caractère hydrophile de la surface (ce qui a été également observé dans la présente étude par des mesures d'angle de contact). [Bulard E., 2012](#)

Temps d'incubation ↗ → angle de contact ↘ → la surface est plus hydrophile

# III. Résultats et discussion

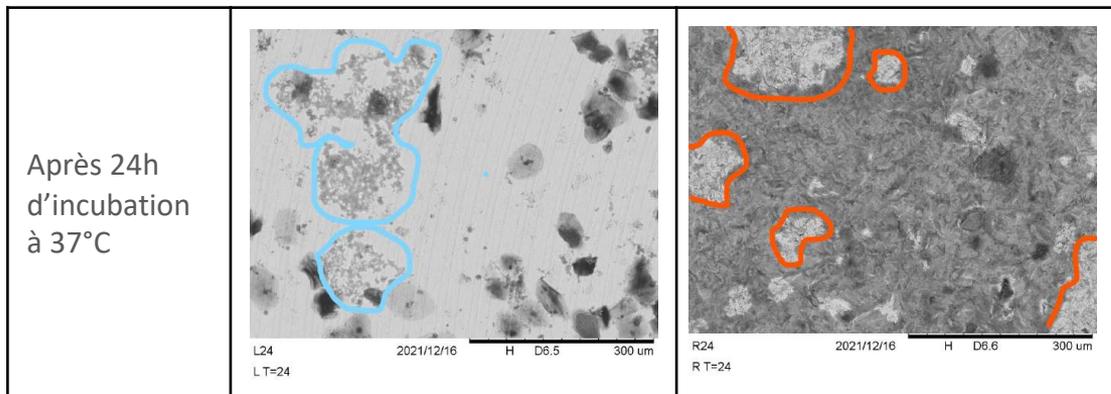
## 3. Comparaison des résultats obtenus avec la littérature

- Les surfaces de rugosité modérée accumulent plus de bactéries par rapport aux implants avec une rugosité minimale dans une structure de biofilm similaire. [Bermejo P. 2019](#)
- La surface rugueuse adsorbe plus de protéines pour l'initiation de formation de biofilm pendant les premières 24 heures. [Ferreira Ribeiro C., 2016](#)

Surface rugueuse → plus de surface spécifique → une quantité plus élevée de biofilm est adsorbée ou absorbée → plus de protéines présentes dans la salive qui vont adsorber à la surface → ce qui va permettre aux bactéries de s'attacher

Surface lisse

Surface rugueuse



# IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

## IV. Conclusions et perspectives

### Conclusions :

D'après les résultats obtenus, qui sont en concordance avec la littérature, on peut conclure que:

Après une durée d'incubation de 24 heures :

- La surface rugueuse est presque 2 fois plus hydrophile que la surface lisse.
- Les colonies des bactéries sur la surface rugueuse sont plus denses et plus développées que sur la surface lisse.

→ Le développement bactérien est moins important sur la surface lisse, ce qui va minimiser l'attachement bactérien et donc permet la prévention contre la péri-implantite.

L'implant hybride LYRA est très prometteur pour le succès d'implantologie dentaire: une partie lisse sur le col pour diminuer l'attachement bactérien et une partie rugueuse sur le corps qui donne l'espace hydrophile pour l'ostéointégration.

## IV. Conclusions et perspectives

### Limites de l'étude et perspectives :

- Tous les biofilms ne sont pas identiques, même s'ils sont produits par la même bactérie car elle peut produire des biofilms aux propriétés différentes en fonction des nutriments dont elle se nourrit . [Oliver Lieleg, 2020](#)
- Le caractère hydrophobe/hydrophile des bactéries est important pour l'interaction avec une surface lorsqu'elles sont seules en suspension et qui ne dépend plus de ce caractère lorsque des protéines sont adsorbés. Les protéines masquent les propriétés de la surface. [E. Bulard, 2012](#)

Dans notre cas : utilisation de la salive d'une seule personne

→ nécessité de randomiser l'étude + utilisation d'un nombre plus important d'échantillons

## IV. Conclusions et perspectives

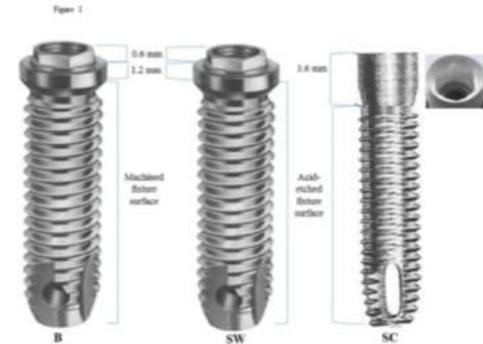
### Limites de l'étude et perspectives :

Evaluation après 25 ans la perte osseuse chez 22 patients recevant trois types d'implants<sup>10</sup> :

- Les implants avec le col usiné de 1,2 mm limitaient la perte osseuse à 1 mm, tandis que ceux avec le col usiné plus long présentaient une perte  $> 1,5$  mm après 25 ans de fonction.

→ Une longueur de col moindre permet d'améliorer l'ostéo-intégration.

Une longueur de col de 1,2 mm au lieu de 1,5 mm pourrait mieux prévenir la péri-implantite.



# REMERCIEMENTS

Nos remerciements les plus chers à notre tutrice Madame Geraldine ROHMAN.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à Madame Céline FALENTIN-DAUDRE, grâce à qui nous avons pu effectuer nos essais ainsi qu'à Monsieur Jean-Sébastien BAUMANN et Monsieur Benjamin PEYROT (du groupe LYRA)

# BIBLIOGRAPHIE

1. Barsotti et Exbrayat, Implants et bactéries buccales, dans Microbiologie en Odonto-Stomatologie, Chardin, Barsotti, Bonnaure-Mallet - édition Maloine, 2006.
2. de Araujo Nobre M, Mano Azul A, Rocha E, Malo P. Risk factors of peri-implant pathology. EurJ Oral Sci. 2015
3. Canullo L, Penarrocha-Oltra D, Covani U, Botticelli D, Serino G, Penarrocha M. Clinical and microbiological findings in patients with periimplantitis: a cross-sectional study. Clin Oral Implants Res. 2016
4. Derks J, Schaller D, Håkansson J, Wennström JL, Tomasi C, Berglundh T. Effectiveness of implant therapy analyzed in a Swedish population: prevalence of peri-implantitis. J Dent Res. 2016.
5. Mouhat Mathieu, Mouhat, Robert Moorehead, et Craig Murdoch. « In Vitro Candida Albicans Biofilm Formation on Different Titanium Surface Topographies ». Biomaterial Investigations in Dentistry 7, no 1, 2020
6. Bermejo, Patricia, María Carmen Sánchez, Arancha Llama-Palacios, Elena Figuera, David Herrera, et Mariano Sanz Alonso. « Biofilm Formation on Dental Implants with Different Surface Micro-topography: An in Vitro Study». Clinical Oral Implants Research 30, no 8 , 2019
7. Zetterqvist L, Feldman S, Rotter B, Vincenzi G, Wennström JL, Chierico A, Stach RM, KenealyJN. A prospective, multicenter, randomized controlled 5-year study of hybrid and fully etched implants for the incidence of peri-implantitis. J Periodontol. 2010
8. Spinato S, Bernardello F, Sassatelli P, Zaffe D. Hybrid and fully-etched surface implants in periodontally healthy patients: A comparative retrospective study on marginal bone loss. Clin Implant Dent Relat Res. août 2017
9. Lee SY, Piao CM, Koak JY, Kim SK, Kim YS, Ku Y, et al. A 3-year prospective radiographic evaluation of marginal bone level around different implant systems. J Oral Rehabil. juill 2010
10. Camarda AJ, Durand R, Benkarim M, Rompré PH, Guertin G, Ciaburro H. Prospective randomized clinical trial evaluating the effects of two different implant collar designs on peri-implant healing and functional osseointegration after 25 years. Clin Oral Implants Res.,2021
11. Berbel LO, Banczek EDP, Karoussis IK, Kotsakis GA, Costa I. Determinants of corrosion resistance of Ti-6Al-4V alloy dental implants in an In Vitro model of peri-implant inflammation [published correction appears in PLoS One., 2019

# BIBLIOGRAPHIE

12. Ferreira Ribeiro C, Cogo-Müller K, Franco GC, Silva-Concílio LR, Sampaio Campos M, de Mello Rode S, Claro Neves AC. Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study. *Arch Oral Biol*. 2016 Sep;69:33-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.05.006. Epub 2016
13. Marczynski M, Balzer BN, Jiang K, Lutz TM, Crouzier T, Lieleg O. Charged glycan residues critically contribute to the adsorption and lubricity of mucins. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020
14. Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, Handel G, Gosau M. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater*. 2010
15. BULARD E., L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire , UNIVERSITE PARIS-SUD ÉCOLE DOCTORALE : ED288 Ondes et Matière Laboratoire de l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay ISMO DISCIPLINE Physique THÈSE DE DOCTORAT, 2012
16. Cay S, Ozeke O, Ozcan F, Topaloglu S, Aras D. Wettability and roughness: Important determinants of bacterial adhesion and biofilm formation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2020