

UNIVERSITE DE LIMOGES

École Doctorale Sciences et Ingénierie en Matériaux,

Mécanique, Energétique et Aéronautique

Faculté des Sciences et Techniques

Laboratoire Science des Procédés Céramiques et de Traitements de Surface

Thèse N° [76-2010]

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Spécialité : Matériaux Céramiques et Traitements de Surface

Présentée par

Nathalie DOUARD

ÉLABORATION ET FONCTIONNALISATION DE BIOCERAMIQUES PHOSPHOCALCIQUES

Thèse dirigée par Eric CHAMPION

Co-direction : Roxana CHOTARD-GHODSNIA

Soutenue le 8 décembre 2010 devant la commission d'examen

Président Mme. D. CHULIA _____ Université de Limoges
Examineur

Rapporteurs : Mme K. ANSELME _____ Université de Haute Alsace
M. D. BERNACHE-ASSOLLANT _____ Ecole Nat. Sup. des Mines de Saint-Etienne

Examineurs : M. E. CHAMPION _____ Université de Limoges
Mme. R. CHOTARD-GHODSNIA _____ Université de Limoges
M. M. DESCAMPS _____ Université de Valenciennes et du Hainaut Cambrésis

Remerciements

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à Eric Champion et Roxana Chotard-Ghodsnia pour m'avoir accueillie au laboratoire SPCTS et m'avoir confiée ce travail de recherche. Je vous remercie pour votre patience et pour les nombreux conseils et connaissances scientifiques que vous m'avez fait partager. J'ai énormément appris à vos côtés. Je ne saurais également remercier Chantal Damia pour sa participation active à ce travail, sa disponibilité et son aide tout au long de ces trois années.

Je souhaite remercier Madame Dominique Chulia qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse. J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Didier Bernache-Assollant ainsi qu'à Madame Karine Anselme pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant d'être rapporteurs de mon mémoire de thèse. Je souhaite exprimer ma sincère gratitude à Michel Descamps pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

J'aimerais ensuite adresser mes remerciements aux personnes qui ont contribué à cette thèse et avec qui travailler fut un réel plaisir. Un grand merci donc à Pierre Carles, Maggy Colas, Solange Degot, Etienne Laborde, Olivier Masson et Gilles Trolliard. Merci également à Adolfo Lopez, Patricia Pascaud et Alexandre Petit qui, au cours de leur passage au laboratoire, m'ont permis de mener à bien une partie de ce travail.

Au cours de cette thèse, j'ai eu le privilège de partir à Bayreuth, en Allemagne, afin de réaliser des essais de culture cellulaire. *Ich möchte mich beim Prof. Günter Ziegler bedanken, da er mich so freundlich in seinem Labor, die Friedrich-Baur-Forschungsinstitut für Biomaterialien, empfangen hat. Ich bedanke Ulrike, Rainer, Alexandra, Franzi, Matthias und Suzanne um mich die Zell Kultur gelernt haben. Das war eine sehr bereichernde Erfahrung und ich habe viel gelernt. Ich möchte mich noch bei Ihnen und dem Gesamten Team für den überaus herzlichen Empfang bedanken. Vielen Danke auch an Teresa, Christine und Alex für die super WG!*

Ces travaux de thèse n'auraient pas été aussi agréables sans l'aide de toute l'équipe et la bonne humeur qui règne au sein du laboratoire. Un grand Merci donc à Bernadette, Christine, David, Emilie, Florent, Frédéric, Gaëtan, Guillaume DV, Guillaume L, Hiva, Isabelle, Jérémy, Lucie, Marina, Martine, Mathieu, Micka P, Micka L, Petra, Rémy, Sabrina, Sirine, Sylvie...

Mon histoire dans la grande aventure des biomatériaux n'aurait jamais démarrée sans les précieux conseils de Roland Mathieu. Merci, je n'aurais pas eu l'occasion de te le dire. J'ai aussi eu le plaisir de rencontrer et de travailler avec Alain Aaron, directeur de Fournitures Hospitalières Industries. De précieuses rencontres qui m'ont aidée à trouver ma voie.

Mes pensées vont également à mes parents, à Camille ainsi qu'à toute ma famille qui, bien que vivant « au bout du monde », ont toujours été près de moi ! Merci pour tout !

Enfin, je remercie du fond du coeur Benoît qui m'a supportée (dans tous les sens du terme !) au cours de ces années de travail...

Sommaire

Introduction1

Chapitre I

Synthèse bibliographique5

I.1. LE TISSU OSSEUX9

I.1.1. Fonctions et architecture des os9

I.1.2. La matrice extracellulaire osseuse12

I.1.3. Les cellules osseuses13

I.1.4. Le remodelage osseux15

I.2. LES PHOSPHATES DE CALCIUM EN SUBSTITUTION OSSEUSE19

I.2.1. Intérêt biologique de l'HA et du β -TCP19

I.2.2. Interactions céramiques bioactives - tissu osseux20

I.2.3. Applications en chirurgie réparatrice21

I.2.4. Intérêt des substitutions dans les phosphates de calcium22

I.3. LES SUBSTITUTIONS DANS LES PHOSPHATES DE CALCIUM23

I.3.1. Substitutions dans l'hydroxyapatite23

I.3.2. Substitutions dans le phosphate tricalcique β 25

I.3.3. Intérêt biologique de la substitution de silicium35

I.3.4. Conclusion36

I.4. FONCTIONNALISATION DE SURFACE37

I.4.1. Intérêt biologique du greffage38

I.4.2. Fonctionnalisation de surface par silanisation41

I.4.3. Autres procédés de fonctionnalisation de surface49

I.5. CONCLUSION52

Chapitre II

Techniques expérimentales55

II.1. ÉLABORATION DES MATERIAUX59

II.1.1. Synthèse des poudres59

II.1.2. Densification des matériaux62

II.2. CARACTERISATION DES MATERIAUX63

II.2.1. Caractérisation des poudres63

II.2.2. Caractérisation des produits frittés68

II.3. ÉTUDE DES CERAMIQUES EN MILIEU ACELLULAIRE ET CELLULAIRE	71
II.3.1. Étude des transformations chimiques de surface en milieu SBF.....	71
II.3.2. Étude de la dégradation des matériaux.....	73
II.3.3. Techniques de culture cellulaire	74
II.3.4. Étude de la cytocompatibilité	78
II.3.5. Étude de la différenciation ostéogénique	80
II.3.6. Étude de la minéralisation	87

Chapitre III

Élaboration de matériaux à base de phosphate tricalcique β.....	89
III.1. SYNTHÈSE PAR PRECIPITATION EN VOIE AQUEUSE.....	93
III.1.1. Généralités sur la synthèse du β -TCP.....	93
III.1.2. Paramètres de synthèse	95
III.2. CARACTERISATION DES POUDRES.....	98
III.2.1. Composition chimique des poudres.....	98
III.2.2. Morphologie et caractéristiques physiques des poudres brutes.....	116
III.2.3. Comportement thermique des poudres	118
III.3. FRITTAGE DES POUDRES	124
III.3.1. Traitement thermique préalable.....	124
III.3.2. Étude dilatométrique.....	126
III.3.3. Frittage des poudres.....	128
III.3.4. Microstructure des matériaux frittés.....	129
III.3.5. Analyse structurale des matériaux frittés.....	133
III.4. DISCUSSION GENERALE.....	137
III.4.1. Localisation du silicium.....	137
III.4.2. Synthèse des poudres en présence de silicium	140
III.4.3. Frittage des poudres.....	145

Chapitre IV

Étude des céramiques en milieu acellulaire et cellulaire	147
IV.1. COMPORTEMENT DES MATERIAUX EN FLUIDE BIOLOGIQUE SIMULE	151
IV.1.1. Étude de la dégradation des céramiques à base de β -TCP et de silicium.....	152
IV.1.2. Comportement des céramiques en milieu SBF	153
IV.1.3. Discussion.....	158

IV.2. ÉVALUATION BIOLOGIQUE EN MILIEU CELLULAIRE.....	161
IV.2.1. Évaluation de la cytocompatibilité des matériaux.....	161
IV.2.2. Évaluation de la différenciation ostéogénique	165
IV.2.3. Évaluation de la biominéralisation	169
IV.3. CONCLUSION GENERALE SUR LES ESSAIS BIOLOGIQUES	174

Chapitre V

Étude préliminaire du greffage d'organo-alkoxysilane à la surface

d'hydroxyapatite silicatée	177
V.1. PRESENTATION DE L'ETUDE	181
V.1.1. Présentation des matériaux de l'étude	181
V.1.2. Protocole de greffage.....	182
V.2. CARACTERISATION DES POUDRES AVANT GREFFAGE	188
V.2.1. Caractérisation des poudres calcinées.....	188
V.2.2. Étude de l'équilibre de dissolution des poudres	190
V.2.3. Conclusion	194
V.3. CARACTERISATION DES ORGANO-ALKOXSILANES	195
V.3.1. Préparation des molécules pour l'étape de greffage	195
V.3.2. Caractérisation spectroscopique des molécules.....	197
V.4. CARACTERISATION DU GREFFAGE.....	200
V.4.1. Morphologie des poudres après greffage	200
V.4.2. Analyse thermogravimétrique	201
V.4.3. Analyse élémentaire du carbone.....	210
V.4.4. Analyses spectroscopiques.....	211
V.5. DISCUSSION	213
Conclusion générale	217
Références Bibliographiques	221

Introduction

L'os est un tissu vivant en perpétuel renouvellement. Le maintien de la masse osseuse à l'âge adulte est assuré grâce à l'activité simultanée de deux lignées cellulaires : les ostéoblastes et les ostéoclastes. Dans le cas de larges pertes de substances osseuses, lors par exemple de maladie telle que l'ostéoporose ou suite à une exérèse tumorale, le mécanisme naturel de renouvellement n'est plus suffisant. Un apport de matière extérieure devient alors indispensable pour traiter le traumatisme. Les matériaux d'origine biologique ont connu une utilisation très large pour la reconstitution de défauts osseux. Cependant, les allogreffes présentent des risques de rejet. L'autogreffe, quant à elle, ne déclenche pas de réaction inflammatoire, mais elle nécessite un second site opératoire.

Les progrès réalisés dans le domaine des matériaux ont permis de pallier ces inconvénients grâce au développement de greffons synthétiques biocompatibles (polymère, alliage métallique, céramique, verre...). Parmi eux, les biocéramiques à base de phosphate tricalcique β ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ou d'hydroxyapatite phosphocalcique ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) se sont imposées depuis plusieurs années comme substituts osseux de choix en chirurgie réparatrice. Ces céramiques ostéoconductrices accueillent la repousse osseuse par invasion vasculaire et cellulaire, mais leur faible bioactivité constitue une limite à une intégration rapide de l'implant dans l'organisme hôte. Afin d'améliorer les propriétés biologiques des substituts osseux phosphocalciques, l'une des méthodes consiste à modifier leur composition chimique

pour se rapprocher de celle de la partie minérale de l'os. De telles modifications peuvent affecter la chimie et la structure des phosphates de calcium et donc avoir une influence sur le comportement biologique du matériau.

L'élément silicium (Si), naturellement présent dans l'os, est localisé en forte concentration au début de la minéralisation osseuse. Cet élément semble jouer un rôle important sur la formation osseuse et la calcification [CAR70; CAR72]. Aussi, depuis quelques années, un intérêt croissant est porté sur le dopage des phosphates de calcium par le silicium. La synthèse d'hydroxyapatite silicatée (de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$) est à l'heure actuelle maîtrisée [PAL08] et les évaluations biologiques indiquent une amélioration de la bioactivité à l'issue du dopage [SIL10]. Il apparaît alors intéressant d'étudier également l'incorporation du silicium dans le phosphate tricalcique β pour améliorer sa bioactivité.

Afin d'appréhender l'influence du silicium sur le comportement biologique du β -TCP différentes méthodes d'investigation sont disponibles. Les premiers phénomènes régissant l'intégration d'un implant (dissolution, précipitation, échanges ioniques) peuvent être reproduits *in vitro* en immergeant les matériaux dans des solutions acellulaires mimant les fluides biologiques. Après implantation d'un substitut osseux, une cascade d'événements biologiques a lieu. Aussi, de nombreux modèles de culture *in vitro* ont été développés afin d'évaluer la capacité d'un matériau à induire une réponse cellulaire spécifique. Le comportement des cellules étant influencé par les propriétés chimiques et physiques des matériaux, il convient de contrôler la composition, l'état de surface et la microstructure des céramiques élaborées avant de les tester *in vitro*.

La progression dans la connaissance des phénomènes biologiques régissant la biointégration des implants a amené à associer des éléments biologiques aux greffons synthétiques. Cette stratégie récente s'inscrit dans le cadre de l'ingénierie tissulaire. Elle consiste à développer des matériaux hybrides élaborés à partir de cellules humaines pour remplacer des tissus défaillants. Afin d'induire une réponse biologique spécifique, il est également envisageable de fonctionnaliser un biomatériau en lui associant des biomolécules (peptide, protéine, facteur de croissance...) stimulant une réponse cellulaire spécifique. Grâce aux recherches menées sur cette nouvelle génération de biomatériaux, la médecine réparatrice évolue ainsi vers la médecine régénérative. L'une des voies actuellement étudiée s'oriente vers le greffage covalent de biomolécules à la surface d'implants *via* un procédé de silanisation.

L'incorporation de silicium dans les phosphates de calcium doit de plus conduire à la formation de liaisons Si-O qui seraient favorable à cette technique.

Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans ce contexte. La synthèse bibliographique, décrite au premier chapitre, rappelle les principaux constituants des os ainsi que leurs fonctions au cours du remodelage osseux. Après avoir présenté les biocéramiques phosphocalciques utilisées en chirurgie réparatrice, l'intérêt des modifications de composition chimique (substitutions ioniques) sur leur comportement biologique est développé. Enfin, une dernière partie expose l'état de l'art concernant la fonctionnalisation de surface.

Le second chapitre détaille les méthodes et techniques expérimentales mises en œuvre au cours des travaux présentés.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude de l'élaboration de matériaux à base de phosphate tricalcique β et de silicium, depuis la synthèse des poudres jusqu'à leur frittage. Les résultats expérimentaux s'attachent à décrire la nature et la localisation des phases chimiques en présence dans les céramiques. Un des objectifs de cette partie est également d'estimer si le silicium s'incorpore dans la structure cristalline du phosphate tricalcique β .

Le quatrième chapitre a pour objectif d'évaluer l'influence du silicium sur le comportement du phosphate tricalcique β en milieu acellulaire et cellulaire. Le comportement des matériaux est étudié grâce à des essais d'immersion dans des solutions simulant les fluides biologiques et à travers des travaux de culture cellulaire *in vitro* faisant appel à différentes lignées de cellules ostéoblastiques.

Enfin, le dernier chapitre de ce manuscrit présente une première approche de la fonctionnalisation de surface de poudre, menée sur de l'hydroxyapatite silicatée, dans l'optique de proposer un protocole de silanisation et d'identifier les facteurs susceptibles d'influencer ce processus.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

La synthèse bibliographique de ce manuscrit s'articule en quatre parties. Les principaux constituants du tissu osseux ainsi que son processus de renouvellement seront détaillés dans un premier temps avant de présenter les matériaux à base de phosphates de calcium utilisés en chirurgie réparatrice. La troisième partie de ce chapitre expose les nombreuses substitutions ioniques rencontrées dans les phosphates de calcium et aborde plus particulièrement l'intérêt biologique de l'incorporation du silicium dans ces matériaux. Toujours dans le but d'améliorer les propriétés biologiques des biocéramiques, la dernière partie constitue une mise au point sur le procédé récent de fonctionnalisation de surface.

I.1. Le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé constitué de cellules dispersées dans une matrice osseuse : la matrice extracellulaire. La première partie de ce paragraphe est destinée à décrire l'architecture des os ainsi que leurs fonctions. Dans un second temps, les principaux constituants de la matrice extracellulaire seront présentés avant de préciser les différentes cellules coexistant dans le tissu osseux. Ces cellules participent au remodelage osseux, phénomène qui sera détaillé dans une quatrième partie.

I.1.1. Fonctions et architecture des os

L'os humain est, avec les dents, le tissu le plus dur de l'organisme. De taille et de forme diverses, les os, dont le nombre se situe entre 208 et 214, forment ensemble le squelette humain. Les os ont essentiellement une fonction de soutien corporel et de protection des organes, l'os crânien par exemple protège le cerveau. En contact entre eux par les articulations, les os constituent les points d'attaches des muscles et des tendons impliqués dans la locomotion. Les os ont également une fonction métabolique. Le tissu osseux est un tissu vivant constamment remodelé, ce qui entraîne la libération ou le stockage de sels minéraux. Ainsi, le tissu osseux d'un adulte renferme 1 100 g de calcium (soit 99 % du calcium total de l'organisme) et environ 600 g de phosphore (soit 85 % du phosphore total de l'organisme). En outre, en abritant la moelle osseuse rouge, où se forment les cellules sanguines, et la moelle osseuse jaune, qui renferme un tissu adipeux de réserve, les os possèdent une fonction hématopoïétique.

La forme des os est très variée, elle dépend de leur fonction et de leur situation dans le corps. C'est ainsi qu'ils sont classés selon cinq catégories (Figure I-1) :

- Les os longs, tels que le fémur, le radius ou le tibia, sont composés d'un corps (la diaphyse) et de deux extrémités (les épiphyses) (Figure I-2). Diaphyse et épiphyse sont reliées par une zone qui est le siège de la croissance osseuse, la métaphyse. La diaphyse est bordée d'os cortical délimitant une cavité centrale, appelée canal médullaire, remplie de moelle osseuse jaune lipidique. Les épiphyses sont constituées d'une

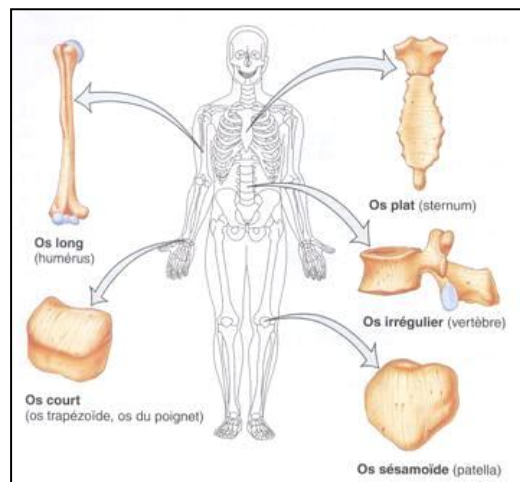


Figure I-1 : Classification des os [TOR07]

couche d'os compact contenant de l'os spongieux rempli de moelle osseuse rouge.

- Les os plats, tels que l'os pariétal ou le sternum, sont composés de deux couches d'os compact enfermant une couche de tissu osseux spongieux.
- Les os courts, comme la rotule ou les os du poignet, sont composés d'un noyau d'os spongieux entouré d'une fine couche d'os compact. La forme des os courts peut être arrondie, pyramidale, ovoïde ou cubique.
- Les os irréguliers, par exemple le sphénoïde ou le bassin, n'appartiennent à aucune des catégories citées ci-dessus à cause de leurs formes très irrégulières. Ils comportent des quantités variables de tissu osseux spongieux et compact.
- Les os sésamoïdes, apparaissent dans certains tendons soumis à des contraintes physiques considérables, tels ceux de la paume des mains et de la plante des pieds. Ils ne sont pas toujours ossifiés.

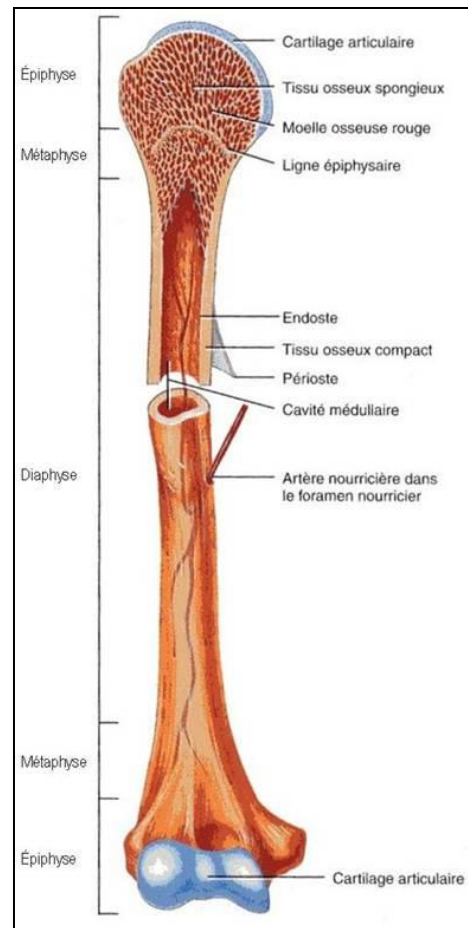


Figure I-2 : Coupe partielle d'un os long [TOR07]

La Figure I-2 présente une coupe partielle d'un os long. Excepté au niveau des surfaces articulaires, où se trouvent les cartilages, les os sont entourés par le périoste, constitué d'une couche externe de tissu conjonctif et d'une couche interne contenant les cellules ostéoprogénitrices assurant la croissance des os en épaisseur. Le canal médullaire des os longs est bordé par l'endoste, constituée d'une petite quantité de tissu conjonctif et d'une couche unique de cellules ostéoprogénitrices. L'os est donc un ensemble de tissus conjonctifs spécialisés, constitué de cellules dispersées dans une matrice osseuse.

De nombreux espaces séparent la matrice osseuse des cellules. Certains de ces espaces fournissent un accès aux vaisseaux sanguins qui approvisionnent les cellules osseuses en nutriments. D'autres servent au stockage de la moelle osseuse rouge. La taille et la répartition de ces espaces déterminent les régions composées de tissu osseux compact et celles composées de tissu osseux spongieux (Figure I-3). Le tissu osseux compact ou cortical est situé en périphérie des os. Il est composé d'unités appelées ostéones ou systèmes de Havers.

Chaque unité est formée de plusieurs couches de lamelles osseuses disposées concentriquement autour du canal de Havers qui contient les vaisseaux sanguins et les nerfs. Cette disposition confère à l'os compact un maximum de résistance. Le tissu osseux spongieux ou trabéculaire constitue la partie interne de l'os situé sous le tissu cortical. Beaucoup moins dense que le tissu cortical, il est constitué d'un réseau tridimensionnel de lamelles osseuses, ou trabécules osseuses. L'orientation de ces trabécules suit les lignes de forces auxquelles l'os est soumis car les cellules qui les fabriquent ont la capacité de percevoir ces forces. Cette architecture particulière délimite un système d'espaces intercommunicants, site de stockage de la moelle osseuse rouge.

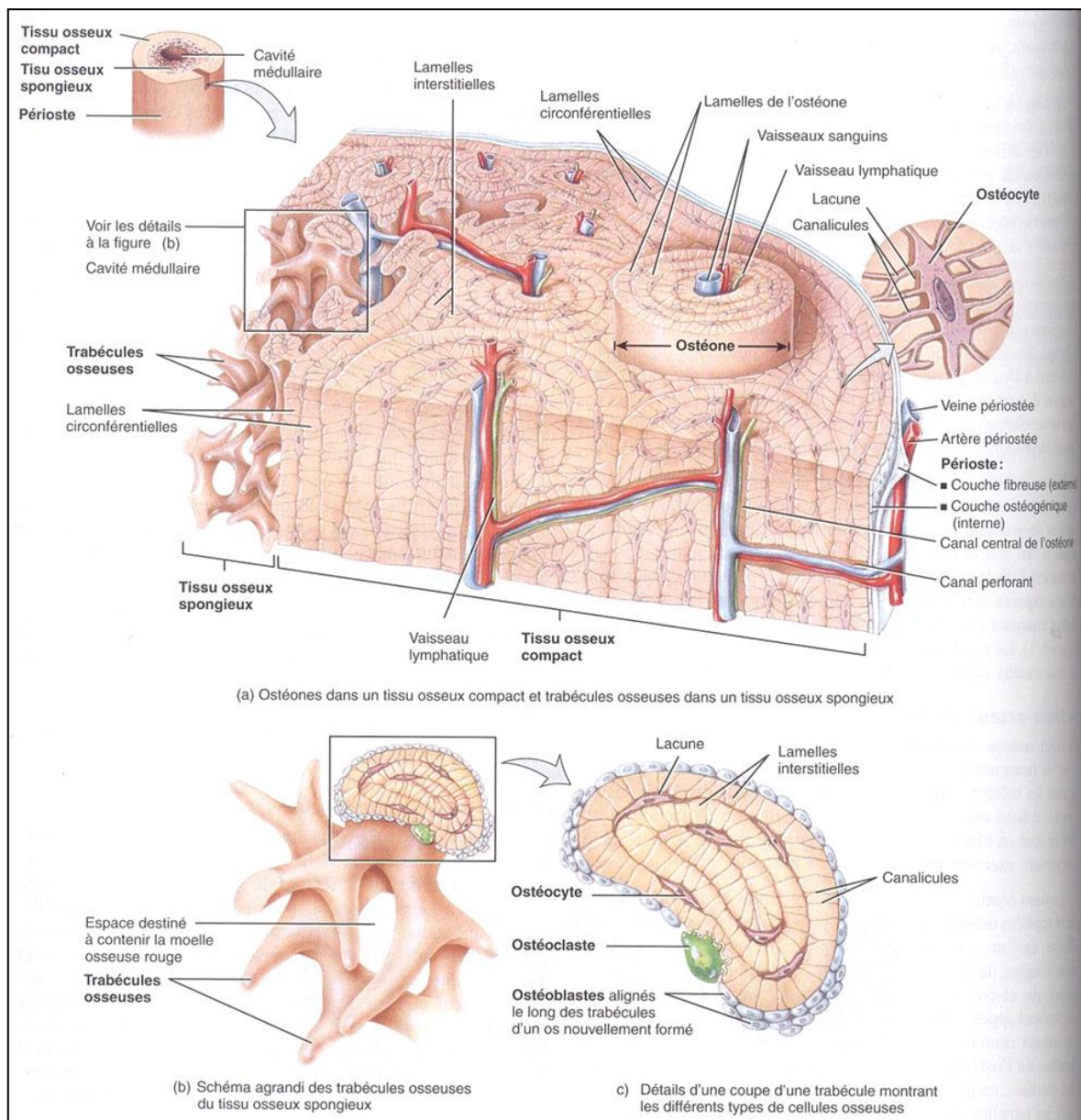


Figure I-3 : Histologie du tissu osseux compact et spongieux [TOR07]

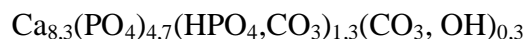
I.1.2. La matrice extracellulaire osseuse

I.1.2.a. La phase organique de la matrice extracellulaire

La matrice organique, quasi exclusivement composée de fibres de collagène de type I, constitue la substance protéinique de l'os. Représentant environ 90 % du poids de la matrice organique de l'os sec, le collagène est une glycoprotéine fibreuse, rigide, en forme de tresse à trois brins, qui confère à l'os sa flexibilité. La partie organique du tissu osseux contient par ailleurs de nombreuses protéines non collagéniques telles que les glycoprotéines (ostéonectine, ostéopontine, sialoprotéine, fibronectine), les protéines contenant des résidus d'acide glutamique carboxylé (ostéocalcine), les phosphoprotéines, les phospholipides, les protéoglycanes et les facteurs de croissance. Beaucoup de ces protéines (l'ostéopontine, la sialoprotéine, la fibronectine...) possèdent une séquence peptidique Arginine (ARG) - Glycine (GLY) - Acide Aspartique (ASP), communément appelée « RGD ». Cette séquence RGD se lie spécifiquement à des récepteurs membranaires appelés intégrines [RUO87]. Ainsi, l'adhésion des cellules osseuses à la matrice est facilitée [ANS00]. En plus de promouvoir l'adhésion cellulaire, ces protéines favorisent également la migration des cellules [THI85].

I.1.2.b. La phase minérale de la matrice extracellulaire

La partie minérale de l'os est essentiellement constituée de phosphate de calcium dont la composition chimique est proche de l'hydroxyapatite phosphocalcique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Le tissu calcifié peut se définir comme une apatite mal cristallisée, déficiente en calcium et partiellement substituée par des ions hydrogénophosphate (HPO_4^{2-}) et carbonate (CO_3^{2-}). L'os naturel contient, de plus, de nombreux ions en substitution, tels les ions sodium, potassium, fluorure, magnésium, strontium et chlorure [HOL95]. La composition chimique de l'os dépend du type d'os et de son âge : par exemple, la teneur en ions carbonate augmente avec l'âge [TAR02]. Une des formules chimiques de la partie minérale de l'os proposée dans la littérature est la suivante [ELL94] :



D'un point de vue morphologique, les cristaux d'apatite osseuse se présentent sous forme d'aiguilles d'une centaine d'ångströms de longueur [FRA96] et sont situés de façon périodique dans la matrice collagénique [LAN96]. L'axe le plus long des aiguilles d'apatite est aligné parallèlement aux fibres de collagène, ce qui confère à l'os sa solidité. Du fait de cette architecture, l'interface entre les composants minéraux et organiques est très étendue :

chez un adulte, elle est de l'ordre de 400 000 à 500 000 m². Une telle particularité explique la rapidité des échanges calciques dans le tissu osseux et favorise la dissolution du minéral osseux lors de l'activité ostéoclastique.

I.1.3. Les cellules osseuses

Dans le tissu osseux, deux lignées cellulaires coexistent (Figure I-4) :

- la lignée hématopoïétique qui conduit à la formation des cellules sanguines et des ostéoclastes ;
- la lignée mésenchymateuse qui génère, entre autre, la formation des ostéoblastes.

Tandis que les ostéoclastes contribuent à la résorption du tissu osseux ancien, les ostéoblastes assurent la synthèse de la matrice osseuse nouvelle. Ces cellules agissent de manière coordonnée lors du remodelage osseux. La source principale des cellules ostéoprogénitrices est la moelle osseuse.

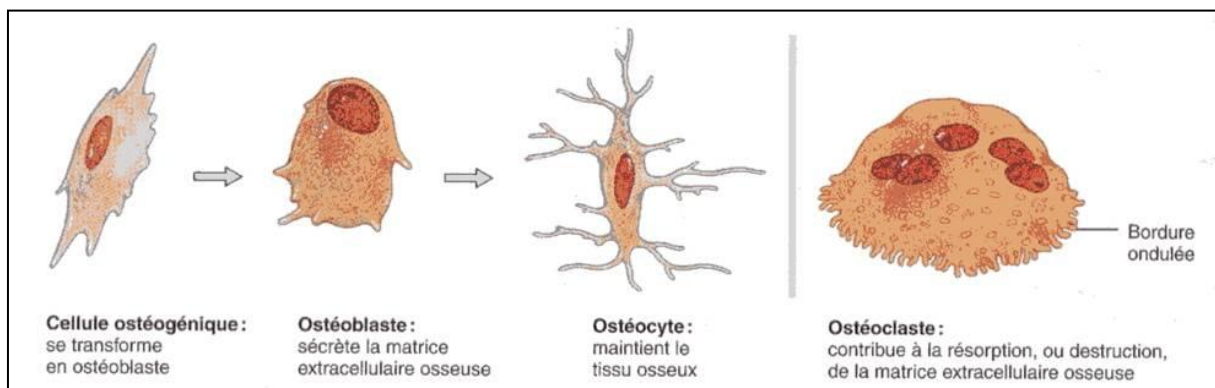


Figure I-4 : Les différentes cellules osseuses [TOR07]

I.1.3.a. Les cellules ostéoblastiques

Les cellules de la lignée ostéoblastique sont issues de cellules souches non spécialisées dérivées du mésenchyme. Ces cellules souches se multiplient par mitose et conduisent à la formation des préostéoblastes, cellules allongées situées au contact des ostéoblastes matures. Elles peuvent se différencier en ostéoblastes dont la fonction est, d'une part, de synthétiser les constituants organiques de la matrice extracellulaire (MEC) et, d'autre part, d'initier la calcification. L'ostéoblaste mature est une cellule mononucléée de 20 à 50 µm de diamètre, alignée perpendiculairement le long de la matrice osseuse qu'elle synthétise. Après déposition de la MEC par les ostéoblastes, trois possibilités sont envisageables :

- à mesure que les ostéoblastes s'entourent de MEC, ils restent prisonniers de leurs sécrétions et se transforment en ostéocytes. Ces cellules fusiformes sont les principales cellules du tissu osseux constitué. Elles sont reliées entre elles et avec les cellules de la surface osseuse par des extensions de la membrane cytoplasmique. Elles maintiennent les activités cellulaires quotidiennes du tissu osseux, par exemple ses échanges de nutriments et de déchets avec le sang.
- d'autres ostéoblastes deviennent progressivement aplatis et forment une couche de cellules bordantes tapissant les surfaces osseuses, leur activité métabolique est alors très réduite.
- enfin, les ostéoblastes peuvent mourir par mort cellulaire programmée ou « apoptose ».

I.1.3.b. La différenciation ostéoblastique

Les cellules souches mésenchymateuses peuvent se différencier en chondroblastes, ostéoblastes ou adipocytes. La différenciation vers l'une ou l'autre voie implique l'expression de facteur de transcription. Pour la différenciation ostéoblastique, il s'agit de l'expression de Cbfa1 / Runx2 [YAM00; PRA03]. La différenciation ostéoblastique se caractérise, *in vitro*, par une succession d'étapes au cours desquelles, différents marqueurs phénotypiques sont exprimés (Figure I-5).

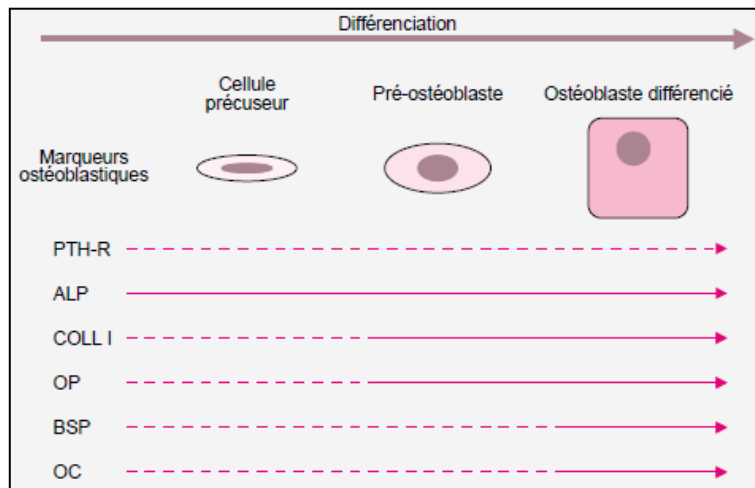


Figure I-5 : Principaux marqueurs exprimés au cours de la différenciation de l'ostéoblaste (- - - : faible expression, — : forte expression) [MAR01-a]

Les cellules de la lignée ostéoblastique se caractérisent par une activité en phosphatase alcaline (ALP pour *Alkaline Phosphatase*) élevée. Cette glycoprotéine, exprimée au cours du développement osseux, est impliquée dans le processus de minéralisation. Elle constitue le premier marqueur de la différenciation ostéoblastique. Il s'en suit alors une phase de

maturation cellulaire durant laquelle sont exprimés des gènes associés à la production de matrice extracellulaire : ALP, collagène de type I (COLL I), ostéopontine (OP), fibronectine [AUB01]. L'ostéopontine est une phosphoglycoprotéine comportant une séquence adhésive RGD. Elle intervient dans la phase d'ancrage des ostéoblastes à la matrice osseuse minéralisée. Lorsque les ostéoblastes sont différenciés, elles expriment des marqueurs associés à la minéralisation de la matrice osseuse : sialoprotéine osseuse (BSP) et ostéocalcine (OC).

I.1.3.c. Les cellules ostéoclastiques

Les précurseurs des ostéoclastes sont des cellules souches hématopoïétiques de la lignée monocyte/macrophage avec le CFU-GM (*Granulocyte and Macrophages Colony Forming cells*) comme premier précurseur identifié. Les ostéoclastes matures sont des cellules géantes (20 à 100 µm de diamètre), plurinucléées (Figure I-4). La morphologie des ostéoclastes se caractérise par une bordure en brosse formée par des extensions « en doigts » de la membrane cytoplasmique. La fonction de la bordure en brosse est la destruction de l'os. Ils sécrètent des enzymes lysosomiales et des acides qui digèrent les protéines et les minéraux de la matière osseuse sous-jacente, formant ainsi des « lacunes de Howship ». Les ostéoclastes sont très mobiles, ils se déplacent sur les travées osseuses et à l'intérieur des lacunes de résorption qu'ils créent.

I.1.4. Le remodelage osseux

Les os commencent à se former avant la naissance. La masse globale osseuse augmente jusqu'à la vie adulte et les os continuent de se renouveler par la suite. Le remodelage est un processus continu par lequel du nouveau tissu osseux remplace l'ancien, assurant ainsi un maintien de la masse osseuse au cours de la vie adulte. En tout temps, 3 à 5 % de la masse osseuse totale du corps est en cours de remaniement [DAV07]. Le taux de renouvellement du tissu osseux compact est d'environ 4 % par an, et celui du tissu osseux spongieux d'environ 20 %. Le processus de remodelage osseux s'effectue grâce à des unités fonctionnelles de remodelage gouvernées par l'action couplée des ostéoblastes et des ostéoclastes. L'os est ainsi formé de millions d'unités fonctionnelles de remodelage mobiles progressant dans le tissu osseux. Un cycle de remodelage dure environ quatre mois chez l'adulte, la phase de formation étant plus longue que celle de résorption. Ce cycle de remodelage, illustré à la Figure I-6a, est divisé en quatre étapes distinctes et fait intervenir de nombreux facteurs de croissances.

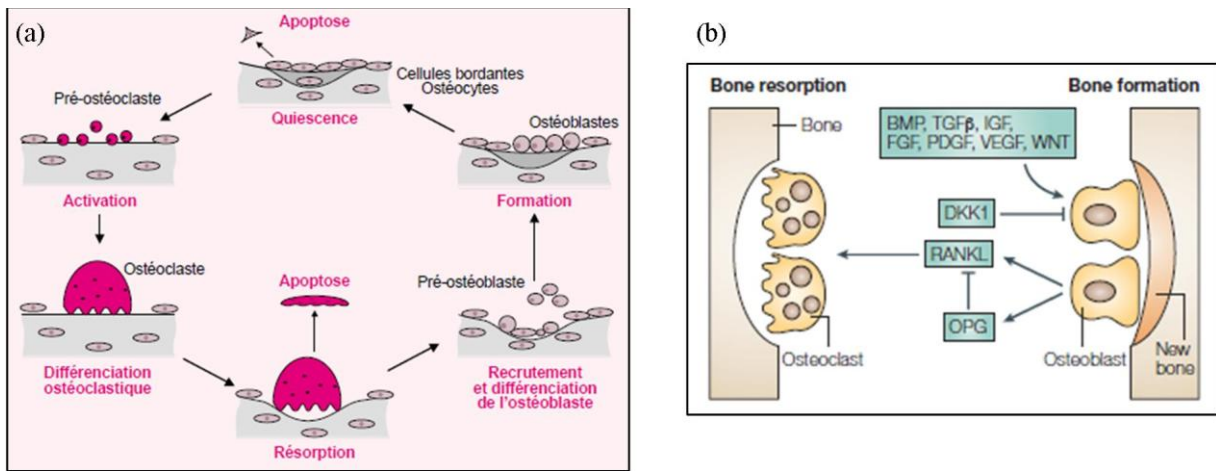


Figure I-6 : (a) Illustration du cycle de remodelage osseux [MAR01-a] et (b) rôle des ostéoblastes et ostéoclastes durant le remodelage osseux [LOG05]

I.1.4.a. Phase d'activation

Lors de la phase d'activation, des préostéoclastes fusionnent pour former les ostéoclastes. La surface osseuse est normalement recouverte de cellules bordantes qui empêchent l'accès des ostéoclastes à la MEC. Sous l'action d'une stimulation hormonale, ces cellules bordantes se rétractent et libèrent l'accès aux ostéoclastes néoformés qui peuvent ainsi adhérer à la matrice osseuse.

Les ostéoblastes sont indispensables au processus de différenciation des ostéoclastes (Figure I-6b). En effet, les cellules stromales ostéoblastiques expriment la protéine RANK-L (*Receptor Activator of Nuclear factor-κB Ligand*) qui stimule l'ostéoclastogénèse en se liant à son récepteur, la protéine RANK, situé à la surface des précurseurs ostéoclastiques. À l'inverse, l'ostéoprotégérine (OPG), facteur soluble également produit par les ostéoblastes, agit comme un antagoniste de RANK-L, et empêche la différenciation ostéoclastique [SIM97; KHO01]. La production de RANK-L et d'OPG par les cellules stromales ostéoblastiques est sous la dépendance des hormones et des cytokines qui contrôlent la résorption osseuse.

I.1.4.b. Phase de résorption

Chaque ostéoclaste devenu actif se fixe aux protéines de la matrice osseuse (fibronectine, ostéopontine, collagène I, sialoprotéine) par des intégrines, initiant alors la phase de résorption. Cet ancrage à la surface osseuse délimite un compartiment de résorption. La partie minérale de l'os est dissoute par des ions H^+ sécrétés par des pompes à protons situées au niveau de la bordure en brosse des ostéoclastes. Cette acidité favorise la dissolution du cristal d'apatite qui libère des sels minéraux (calcium, phosphore), permettant la mise à nu de la

matrice organique, et provoque l'activation enzymatique. C'est également au niveau de la bordure en brosse que le contenu enzymatique des ostéoclastes est déversé. Ces enzymes (phosphatases acides, métalloprotéinases et cathepsines) sont destinées à digérer les constituants organiques de la MEC.

I.1.4.c. Phase de réversion ou d'inversion

Lorsque les ostéoclastes ont achevé la formation d'une lacune de résorption, ils meurent par apoptose et sont remplacés par des macrophages qui lissent le fond de la lacune. La surface osseuse libérée par les ostéoclastes, qui correspond au fond de la lacune de Howship est appelée ligne cémentante. Elle est riche en éléments telle que l'ostéopontine qui activerait les ostéoblastes. Au bout d'une à deux semaines, cette phase aboutit au recrutement des cellules ostéoprogénitrices dans la moelle osseuse.

I.1.4.d. Phase de formation

A l'issue de la résorption osseuse, les cellules ostéoprogénitrices viennent tapisser le fond de la lacune de Howship, au niveau de la ligne cémentante puis se divisent et se différencient en ostéoblastes. Ces ostéoblastes sécrètent d'abord une nouvelle matrice collagénique, non minéralisée, appelée tissu ostéoïde, qui vient combler la lacune de résorption. Cette matrice est structurée par les fibres de collagène où les protéines non collagéniques sont intriquées. La vitesse d'apposition de la matrice par les ostéoblastes est de 2 à 3 μm par jour. De nombreux facteurs de croissance, sécrétés par les ostéoblastes et stockés dans la matrice osseuse, sont relargués sous forme active pour stimuler la production de cette matrice. Leur nom et leur rôle sont précisés dans le paragraphe suivant.

Dans un second temps, les ostéoblastes matures contrôlent la minéralisation du tissu néoformé par dépôt de cristaux d'apatite phosphocalcique, en régulant les concentrations locales en ions calcium Ca^{2+} et phosphate PO_4^{3-} . Le calcium et le phosphate du milieu extracellulaire se lient au niveau du cytoplasme de la cellule ostéoblastique et sont transférés sur le site de minéralisation *via* les ostéoblastes. Le produit de la réaction est un complexe phosphocalcique éliminé vers la matrice osseuse sous forme de cristaux d'apatite biologique dans les espaces interfibrillaires du collagène. L'expression de phosphatase alcaline (ALP), enzyme synthétisée par les ostéoblastes, est, à ce stade de la formation osseuse, un marqueur important puisqu'elle hydrolyse les esters phosphoriques inhibiteurs de la minéralisation.

A l'issue de la minéralisation, une partie des ostéoblastes meurt par apoptose, l'autre partie devient des ostéocytes inclus dans la matrice osseuse et des cellules bordantes qui recouvrent la surface de l'os à l'état quiescent (*cf.* paragraphe I.1.3.a).

I.1.4.e. Les facteurs de croissances impliqués lors du remodelage osseux

Les facteurs de croissance sont des protéines sécrétées par des cellules, qui agissent de manière spécifique sur une ou plusieurs cellules cibles. Reconnus par des récepteurs membranaires spécifiques, ils agissent sur la division cellulaire, la synthèse de matrice, la différenciation des tissus... Présents en petites quantités dans la MEC, les facteurs de croissance jouent un rôle important dans le processus de reconstruction osseuse et sont parfois indispensables à la différenciation et à la survie des cellules osseuses (Figure I-6b).

Le facteur de croissance **TGF β** (*Transforming Growth Factor β*), localisé dans plusieurs tissus et notamment dans l'os, influence de nombreuses activités cellulaires (croissance, différenciation, synthèse de MEC... etc.) [LIE02]. Fortement impliqué au cours du processus de repousse osseuse, il stimule la formation des ostéoblastes et inhibe celle des ostéoclastes [BON90]. Les **BMPs** (*Bone Morphogenic Proteins*), de la famille des polypeptides TGF β , sont impliquées lors de la croissance cellulaire et de la formation osseuse. *In vivo*, des propriétés ostéoinductrices leur ont été attribuées [WOZ02]. Les BMPs, en particulier BMP-2, 4 et 7, sont connues pour stimuler la différenciation des cellules mésenchymateuses [SCH99]. Dans l'os, l'une des plus importantes BMPs est la BMP-2 qui active le facteur de transcription spécifique des ostéoblastes, le Cbfa1 [YAM00]. D'autres facteurs de croissance, tels que les **IGF** (*Insulin Growth Factor*) ou les **PDGF** (*Platelet Derived Growth Factor*) stimulent également la différenciation et la prolifération des ostéoblastes.

L'angiogénèse correspond au mécanisme de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Il a été démontré, ces dernières années, l'importance de ce processus pour assurer le maintien du tissu osseux et garantir la guérison d'une fracture [FRI95; HAU01; CAR03; BRA06]. Le **FGF** (*Fibroblast Growth Factor*) est un facteur de croissance qui induit le processus d'angiogénèse. Il possède de plus un effet mitogénique sur les cellules mésenchymateuses et les ostéoblastes [WAN96; CAR03]. Le facteur de croissance angiogénique **VEFG** (*Vascular Endothelial Growth Factor*), qui assure la survie, la migration et la prolifération de cellules endothéliales, semble également être impliqué dans le processus de repousse osseuse [STR02].

I.2. Les phosphates de calcium en substitution osseuse

Selon D. F. Williams, un biomatériau est un matériau non vivant, utilisé dans un dispositif médical et destiné à interagir avec les systèmes biologiques [WIL87]. Pour être toléré par l'organisme, un biomatériau doit répondre à de nombreux critères et doit en particulier être biocompatible et ne pas déclencher de réaction toxique. De nombreux matériaux répondent à ces contraintes : métaux, alliages, polymères, verres, céramiques... Ils sont utilisés sous différentes formes et dans de nombreux domaines : ophtalmologie, stomatologie, chirurgie orthopédique, urologie, cardiovasculaire... Les céramiques à base de phosphate de calcium constituent, à l'heure actuelle, des substituts osseux de choix en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale. Par leur composition chimique, elles sont très proches de la partie minérale de l'os. Les phosphates de calcium habituellement rencontrés dans ces céramiques sont :

- L'hydroxyapatite phosphocalcique (HA) : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
- Le phosphate tricalcique β (β -TCP) : $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- Un mélange de ces deux composés, constituant un matériau biphasé β -TCP/HA

I.2.1. Intérêt biologique de l'HA et du β -TCP

L'HA et le β -TCP sont des matériaux biocompatibles, c'est-à-dire, qu'ils sont capables de remplir leur fonction sans effets indésirables sur l'environnement biologique dans lequel ils sont appelés à fonctionner. Après implantation ils ne donnent lieu à aucune réaction immunologique ou toxique pour les tissus. Ce sont des matériaux bioactifs, des réactions biologiques spécifiques ont lieu entre le biomatériau et l'organisme (cellules et fluides biologiques), réactions qui ne se réduisent pas à une simple encapsulation de l'implant. Rapidement entourées par les cellules osseuses, ils possèdent d'excellentes qualités de liaison au tissu osseux [JAR81]. Egalement ostéoconducteurs, ils ont la propriété de recevoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire, à partir du tissu osseux receveur. Aucun tissu fibreux ne s'interpose entre la céramique et l'os qui se lie directement à la surface de l'implant de phosphate de calcium. Ces interactions, entre les phosphates de calcium et le milieu vivant, restent néanmoins passives. Les céramiques phosphocalciques ne sont généralement pas ostéoinductrices, elles n'ont pas la capacité d'induire la formation de matière osseuse en site extra osseux.

Après implantation, ces céramiques peuvent être dégradées à des degrés divers. Les propriétés chimiques des phosphates de calcium, donc leur comportement, sont directement fonction de

leur composition et de leur structure. En général, la solubilité des phosphates de calcium augmente lorsque le rapport molaire Ca/P du composé diminue [ELL94]. Ainsi, le β -TCP caractérisé par un rapport molaire Ca/P de 1,500 est entièrement biorésorbable, alors que l'HA (Ca/P = 1,667) ne l'est que de manière superficielle. La synthèse de matériaux biphasés β -TCP/HA possède l'avantage d'obtenir des matériaux dont la résorption et la colonisation osseuse peuvent être contrôlées [DAC98].

I.2.2. Interactions céramiques bioactives - tissu osseux

Après implantation de matériaux céramiques bioactifs, tels l'hydroxyapatite ou le phosphate tricalcique β , une cascade d'événements schématisée à la Figure I-7 se produit, aboutissant à l'intégration de l'implant.

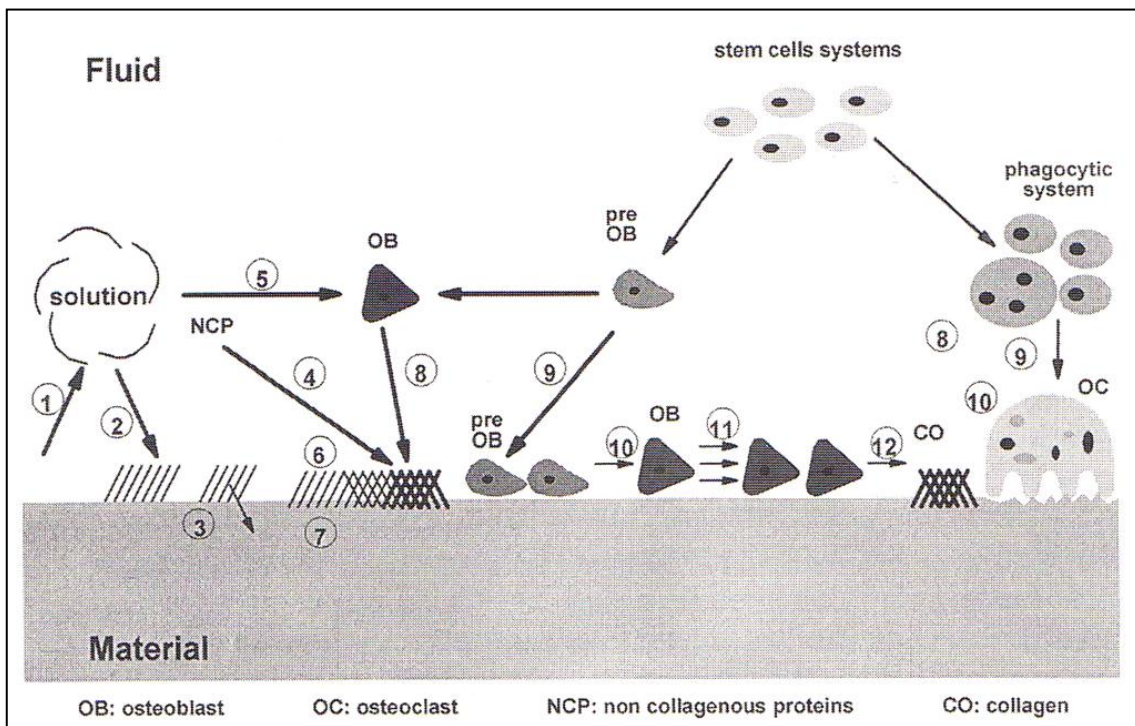


Figure I-7 : Schéma illustrant les événements ayant lieu à l'interface entre une céramique bioactive et le milieu biologique environnant [DUC93]

Très rapidement, des mécanismes physicochimiques s'installent. La surface de la céramique se met tout d'abord à l'équilibre chimique avec les fluides biologique environnants, entraînant sa dissolution (1). Une couche d'apatite carbonatée, analogue au minéral osseux, vient alors précipiter à la surface de l'implant à partir des fluides biologiques sursaturés (2) [DAC90]. En effet, le changement de sursaturation à proximité de la surface du substrat céramique et la présence de groupements OH de surface attirant les ions calcium entraînent la précipitation de

l'apatite carbonatée. Des échanges ioniques ont alors lieu à l'interface entre la céramique et la couche d'apatite néoformée (3). Les fluides biologiques sont riches en protéines non collagéniques qui viennent s'adsorber à la surface de cette couche précipitée (4). Ces protéines adhésives (ostéopontine, sialoprotéine) favorisent l'attachement des cellules ostéoblastiques à la surface du matériau (8). En parallèle, les ions calcium environnants (provenant de la dissolution de la céramique et des fluides biologiques) ont un effet chimiotactique sur les ostéoblastes, ils stimulent leur mobilité vers la céramique (5 et 8).

Les événements postérieurs présentent une analogie avec ceux intervenant au cours du remodelage osseux. Après adhésion (9), différenciation (10) et prolifération (11) des ostéoblastes et ostéoclastes, les cellules ostéoblastiques synthétisent la matrice extracellulaire sur la couche apatitique précipitée (6 et 7) et à la surface du matériau nu (12). A moyen terme, le matériau est dégradé par les cellules ostéoclastiques ainsi que par le milieu biologique. Associé à l'ostéoformation, un équilibre de résorption/apposition s'installe. La réhabilitation osseuse de l'implant se fait de manière périphérique, centripète mais surtout lente. Pour de petits implants placés en site osseux, la pénétration après quatre mois d'implantation est seulement de 1,6 mm de profondeur pour l'HA et 2,3 mm pour le β -TCP.

I.2.3. Applications en chirurgie réparatrice

L'hydroxyapatite est employée pour le comblement osseux sous forme de granules ou de pièces macroporeuses. Par exemple, elle est utilisée sous forme de pièce sphérique macroporeuse comme implant oculaire. En otorhinolaryngologie, l'HA convient pour la réalisation de prothèse de reconstruction ossiculaire. Ainsi, les trois os de l'oreille (marteau, enclume et étrier) peuvent être remplacés. Elle est également largement utilisée en orthopédie, sous forme de dépôt obtenu par projection plasma pour le recouvrement de prothèses articulaires métalliques [HEN91].

En raison de sa dégradation rapide, le phosphate tricalcique β est, quant à lui, contre indiqué comme matériau d'implant durable. Il est utilisé sous forme de granules ou de blocs macroporeux comme substitut du tissu osseux lorsqu'une régénération osseuse est particulièrement souhaitée. En odontologie, le β -TCP permet de combler des défauts liés à des pertes parodontales ou de réparer des fissures du palais. Utilisé sous forme de coin, le β -TCP permet une réparation des fractures du plateau tibial. Il est également très utilisé en association avec l'HA pour la complémentarité de leurs caractéristiques physicochimiques.

Un seul frein à leur utilisation plus large réside dans leurs faibles propriétés mécaniques qui limitent une implantation à des régions exemptes de sollicitations mécaniques.

I.2.4. Intérêt des substitutions dans les phosphates de calcium

Les biocéramiques en phosphates de calcium ont fait leurs preuves en chirurgie réparatrice. Toujours dans le but d'améliorer leurs propriétés biologiques *in vivo*, de nouvelles perspectives de développement sont actuellement à l'état de recherche.

Une caractéristique importante des apatites est leur capacité à admettre un grand nombre d'ions en substitution. Cette propriété du réseau apatitique permet d'envisager la synthèse de nouveaux matériaux pour diverses applications et dans des domaines variés. Bien que la composition chimique des phosphates de calcium, tel l'hydroxyapatite, soit très proche des apatites biologiques naturelles, la bioactivité de ces matériaux reste relativement limitée. Une manière d'augmenter les propriétés biologiques de ces apatites pourrait être d'ajuster leur composition chimique à celle de l'os *via* des substitutions au sein du réseau apatitique. En effet, l'incorporation de différents ions dans la structure apatitique influence les propriétés physicochimiques. Par exemple, la substitution des ions hydroxyde OH⁻ par les ions carbonate CO₃⁻ dans l'HA, conduit à des composés plus solubles que l'hydroxyapatite non substituée [DOI98]. Une mise au point bibliographique sur cette voie d'amélioration des phosphates de calcium fait l'objet du paragraphe I.3.

Les recherches actuelles sur les substituts osseux s'orientent également vers l'amélioration de leur biointégration selon une stratégie s'inscrivant dans le concept de l'ingénierie tissulaire. Cette spécialité récente a pour but de développer des substituts biologiques incluant des éléments vivants, qui vont restaurer, maintenir ou améliorer la fonction des tissus humains [HAR00]. Cette technique consiste à associer une matrice (synthétique ou naturelle), des cellules (autologues ou non) et éventuellement des facteurs bioactifs conduisant ainsi à un « matériau hybride ». Les domaines d'applications de l'ingénierie tissulaire sont très larges : les muscles, les os, les vaisseaux sanguins, la peau... Dans le cas des os, le biomatériau constitué d'une matrice d'HA et de cellules ostéoprogénitrices peut induire la formation de tissu osseux même après implantation en site extra osseux [ANS99]. L'apport local de ces cellules au biomatériau a pour but d'initier et soutenir la formation osseuse et la vascularisation au sein de l'implant [DAW08; GRE09].

Pour stimuler une réponse biologique spécifique, il est également envisageable d'associer un biomatériau à des biomolécules (protéine, peptide, facteur de croissance...), dont le rôle sur l'adhésion et/ou la prolifération cellulaire est connu. La conception du matériau ostéoinducteur passe ici par une fonctionnalisation de sa surface par adsorption ou greffage de la biomolécule sur le matériau. Le paragraphe I.4 s'attache à présenter l'état de l'art concernant cette technique.

I.3. Les substitutions dans les phosphates de calcium

L'élément silicium (Si), qui représente 0,05 % de la masse corporelle, joue un rôle important sur la solidité des tissus de l'organisme et en particulier des os. L'étude d'E. M. Carlisle montrant que le silicium est impliqué au tout début du processus de minéralisation [CAR70] a suscité beaucoup d'intérêt dans le domaine de la recherche en chirurgie réparatrice. I. D. Xynos et coll. ont montré que la dissolution de verres bioactifs engendrait un produit ionique riche en silicium. Ce produit serait responsable de l'augmentation, de 155 % par rapport au matériau contrôle, de la prolifération de cellules ostéoblastiques [XYN00]. Pour la même raison, le taux de prolifération et de différenciation de cellules ostéoblastiques est supérieur sur des matériaux frittés de α -CaSiO₃ et β -CaSiO₃ que sur du β -TCP [NI07]. Ces observations ont amené à développer la recherche sur le dopage des phosphates de calcium avec l'élément silicium afin d'améliorer les propriétés biologiques de ces substituts osseux.

Les substitutions rencontrées dans l'hydroxyapatite ont déjà fait l'objet d'une mise au point bibliographique détaillée par M. Palard [PAL07]. Cette partie aborde essentiellement le cas de l'hydroxyapatite silicatée avant d'exposer les substitutions possibles dans le phosphate tricalcique β . Enfin sera détaillé l'intérêt biologique de la substitution de silicium.

I.3.1. Substitutions dans l'hydroxyapatite

I.3.1.a. Données cristallographiques

L'hydroxyapatite appartient à la famille cristallographique des apatites qui présentent la formulation générique $Me_{10}(XO_4)_6Y_2$ où Me représente un cation divalent, XO_4 un groupement anionique trivalent et Y un anion monovalent. De formule chimique $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, l'hydroxyapatite phosphocalcique stœchiométrique cristallise dans le système hexagonal avec comme groupe d'espace P63/m. Les paramètres cristallographiques a et c de la maille ont pour valeurs respectives 9,432 Å et 6,881 Å, conduisant à une maille de volume 530,14 Å³ [KAY64].

La structure de l'HA consiste en un empilement hexagonal de groupements phosphates qui définit deux types de tunnels, parallèles à l'axe c (Figure I-8). Le premier type de tunnel est occupé par des ions calcium, notés CaI. Au nombre de quatre par maille, ils sont entourés de neuf atomes d'oxygène issus des groupements phosphate. Le second type de tunnel, bordé par des atomes d'oxygène et par des ions calcium notés CaII, est occupé par les ions hydroxyde.

De coordinence 7, les ions calcium CaII sont entourés de six atomes d'oxygène provenant des tétraèdres de phosphate et du groupement hydroxyde.

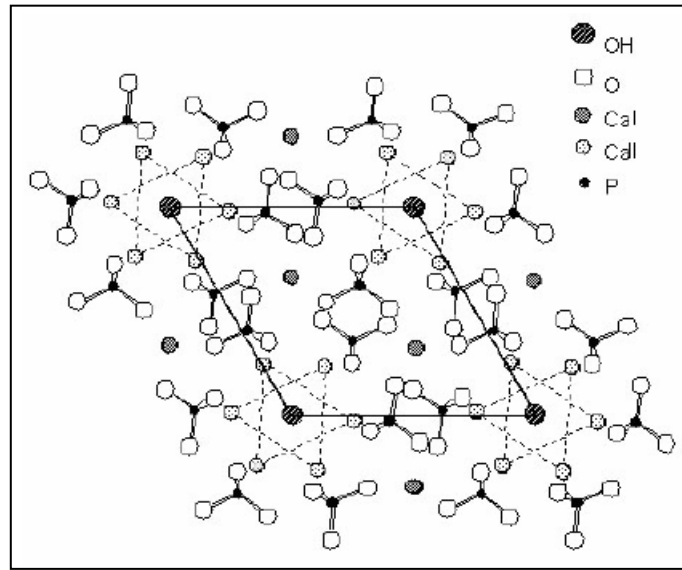


Figure I-8 : Projections de la structure de l'hydroxyapatite sur le plan (001) [KAY64]

I.3.1.b. L'hydroxyapatite silicatée

La structure apatitique peut accueillir un grand nombre d'ions différents en substitution. Dans le cas de l'hydroxyapatite phosphocalcique, chaque groupement ionique peut être substitué par un autre groupement ionique de même valence ou de valence différente. Le Tableau I-1 répertorie des exemples de substitutions en rapport avec les éléments présents dans la phase minérale de l'os.

Différents travaux traitent de la substitution des ions phosphate (PO_4^{3-}) par des ions silicate (SiO_4^{4-}) dans l'hydroxyapatite [GIB99; ARC04; VAL05; THI06-b; PAL07; PAL08]. La synthèse ainsi que la caractérisation d'hydroxyapatite silicatée (Si-HA) sont, à l'heure actuelle, bien établies. Le procédé de synthèse le plus couramment employé est la synthèse par précipitation en voie aqueuse, avec, comme précurseur de silicium, le tétraacétate de silicium ($\text{Si}(\text{OCOCH}_3)_4$) ou le tétraéthylorthosilicate ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$).

La substitution de PO_4^{3-} par SiO_4^{4-} engendre un déséquilibre de charge dû à la différence de valence de ces deux groupements. Pour assurer la neutralité de la structure cristalline, ce déséquilibre doit être compensé par des défauts ioniques. La synthèse de Si-HA repose sur l'hypothèse que les groupements silicate viennent se substituer aux groupements phosphate entraînant la création de lacunes (\square) sur les sites hydroxyde OH. La formule chimique théorique qui en découle est $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x-\square_x}$ avec $0 \leq x \leq 2$ [GIB99].

Tableau I-1 : Exemples de substitutions dans la structure apatitique [PAL07]

Substitution	Formule chimique théorique
Site Ca²⁺	
Mg ²⁺	Ca _{10-x} Mg _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂
Zn ²⁺	Ca _{10-x} ZnPO ₄) ₆ (OH) ₂
Sr ²⁺	Ca _{10-x} SrPO ₄) ₆ (OH) ₂
Ag ⁺	Ca _{10-x} AgPO ₄) ₆ (OH) _{2-x}
Site PO₄³⁻	
CO ₃ ²⁻	Ca _{10-x} (PO ₄) _{6-x} (CO ₃) _x (OH) _{2-x}
SiO ₄ ⁴⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) _{6-x} (SiO ₄) _x (OH) _{2-x}
HPO ₄ ²⁻	Ca _{10-x} (PO ₄) _{6-x} (HPO ₄) _x (OH) _{2-x}
Site OH	
F ⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} F _{2x}
Cl ⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} Cl _{2x}
CO ₃ ²⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} (CO ₃) _x
Mixte	Ca _{10-x+u} □ _{x-u} (PO ₄) _{6-x} (CO ₃) _x (OH) _{2-x+2u-2y} (CO ₃) _y □ _{x-2u+y}

I.3.2. Substitutions dans le phosphate tricalcique β

Il existe trois variétés allotropiques de phosphate tricalcique de formule chimique Ca₃(PO₄)₂. Le β-TCP, qui cristallise dans le système rhomboédrique, est stable jusqu'à 1150°C. A cette température, a lieu la transformation allotropique β → α du phosphate tricalcique. Cette transformation est accompagnée d'une augmentation du volume de la maille de 7 %. Cette expansion est liée à la différence de densité entre la variété β (d = 3,07) et la variété α (d = 2,86) du TCP. La variété α du TCP cristallise dans le système monoclinique, et est stable pour des températures comprises entre 1150°C et 1450°C [MAT77]. Une troisième forme allotropique, $\bar{\alpha}$ cristallise entre 1450°C et 1510°C dans le système triclinique. Cette phase est stable jusqu'à une température comprise entre 1740°C et 1800°C, température de fusion du phosphate tricalcique [KRE67].

I.3.2.a. Données cristallographiques du phosphate tricalcique β

Le phosphate tricalcique β cristallise dans le système rhomboédrique avec, pour groupe d'espace, R_{3c}. Exprimés dans le système hexagonal, les paramètres de maille du β-TCP sont a = b = 10,4352 Å et c = 37,4029 Å [YAS03].

La structure du β-TCP peut être décrite à partir de celle du vanadate de baryum Ba₃(VO₄)₂ [ELL94]. La maille hexagonale de Ba₃(VO₄)₂ est constituée de douze colonnes identiques de

la forme (...)VO₄ Ba Ba Ba VO₄(...) et édifiées selon l'axe c. Chaque colonne est entourée de six autres colonnes dans une configuration hexagonale. A cause du faible rayon ionique du calcium Ca²⁺ par rapport au baryum Ba²⁺ (respectivement 0,99 Å et 1,35 Å), le nombre d'atomes d'oxygène coordonnés dans la structure du β-TCP doit être diminué.

La maille hexagonale du phosphate tricalcique β est représentée sur la Figure I-9. Les douze colonnes identiques de la maille équivalente de Ba₃(VO₄)₂ sont réparties en trois colonnes de type A et neuf colonnes de type B au sein de la maille du β-TCP [DIC74; ELL94]. Chaque colonne de type A est entourée par six colonnes de type B et chaque colonne de type B par deux de type A et 4 de type B.

Les motifs de ces deux colonnes sont exposés à la Figure I-9a. Les colonnes de type B restent similaires à celles édifiant la maille de Ba₃(VO₄)₂, les modifications concernent les colonnes de type A. La différence majeure entre la maille de Ba₃(VO₄)₂ et celle de Ca₃(PO₄)₂ est que le nombre de motifs par maille diminue, Z passe de 24 à 21. Cette modification a pour conséquence la perte de la moitié des ions dans chaque colonne de type A (soit 3 Ca et 2 PO₄).

Dans la maille du β-TCP, les ions phosphore sont répartis sur trois sites cristallographiques différents et sont tous en coordinence 4 avec des atomes d'oxygène. La colonne A perd deux groupements phosphate par rapport à la colonne B, elle ne contient donc plus que deux PO₄.

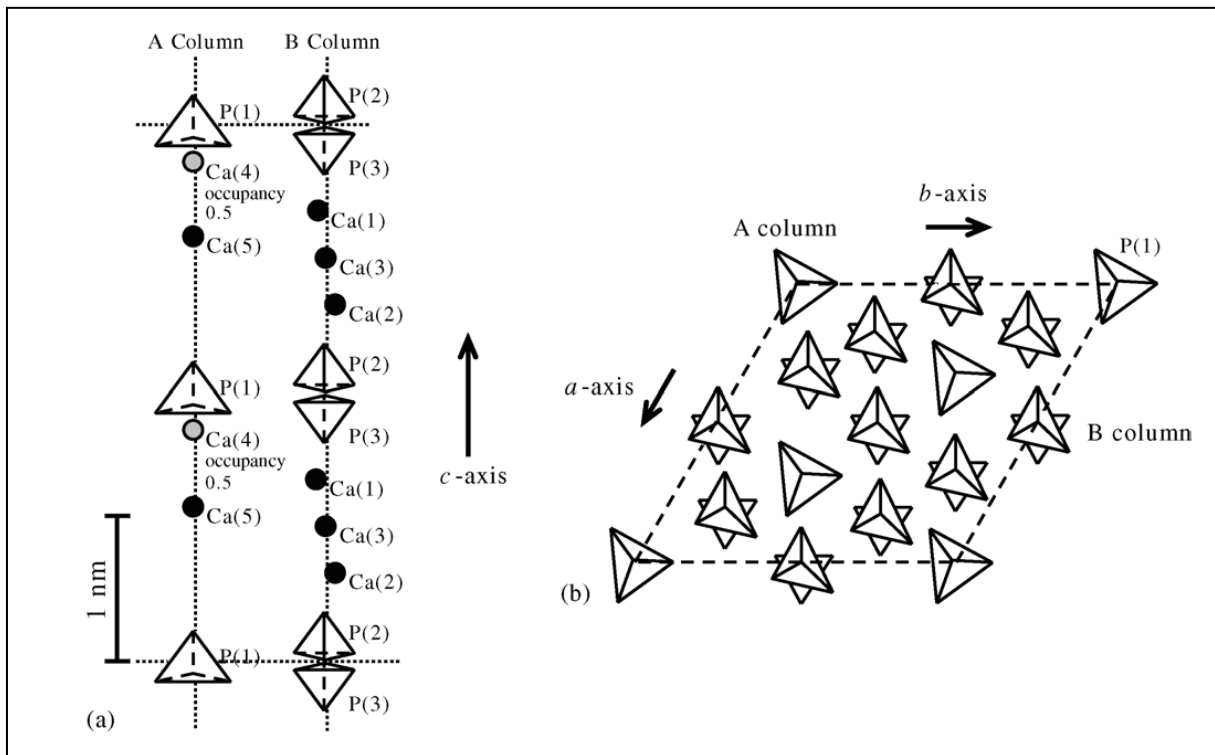


Figure I-9 : (a) Configuration des colonnes A et B et (b) arrangement de ces colonnes au sein de la maille de β-TCP [NAK06]

Les ions calcium sont répartis sur cinq sites cristallographiques : trois sites sur la colonne B et deux sites sur la colonne A. Quatre d'entre eux sont complètement remplis, alors que, pour respecter l'équilibre des charges, le taux d'occupation du site Ca(4) de la colonne A est proche de 0,5 [YAS03]. La colonne de type A ne contient donc plus que trois calcium au lieu des six originaux. Les cations calcium sont tous en coordinence avec des atomes d'oxygène dont le nombre varie d'un site à l'autre (coordinence 7 pour Ca(1), 8 pour Ca(2) et Ca(3), 3 pour Ca(4) et 6 pour Ca(5)).

I.3.2.b. Les substitutions d'intérêt biologique dans le phosphate tricalcique β

De nombreuses études, plus ou moins complètes, relatent l'incorporation d'ions divers dans la structure du β -TCP et pour différents objectifs. Ce paragraphe s'attache à aborder, de manière plus détaillée que dans le cas de l'HA, les différentes substitutions ioniques d'intérêt biologique. L'ensemble des substitutions évoquées dans ce paragraphe est répertorié, selon la valence des ions étudiés, dans le Tableau I-2.

Tableau I-2 : Exemples de substitutions dans la structure du phosphate tricalcique β

Ions en substitution		Formule chimique théorique	Sites de substitution	Références
Monovalent	Na ⁺		Ca(4) et lacunes de la colonne A	[YOS05; YOS06; MAT09-b]
	K ⁺		Ca(4) et lacunes de la colonne A	
Divalent	Mg ²⁺	(Ca _{1-x} Mg _x) ₃ (PO ₄) ₂	Ca(5) et Ca(4)	[CLE89; FAM94; END05]
	Zn ²⁺	Ca _{(9-x)/3} Zn _{x/3} (PO ₄) ₂	Ca(5) et Ca(4)	[BIG97; ZOU08]
	Mn ²⁺	(Ca _{3-x} Mn _x)(PO ₄) ₂	Ca(5)	[MAY08; SOP09]
	Sr ²⁺		Ca(4)	[BIG97]
Mixte	Ag ⁺ et Zn ²⁺		Ca(4) et lacune de la colonne A pour Ag ⁺ et Ca(5) pour Zn ²⁺ et Cu ²⁺	[MAT09-a]
	Ag ⁺ et Cu ²⁺			
	Sr ²⁺ et Mg ²⁺	Ca _{3-x} (SrMg) _x (PO ₄) ₂	Ca(1, 2, 3, 4) pour Sr ²⁺ et Ca(5) pour Mg ²⁺	[KAN10]
	Zn ²⁺ et Mg ²⁺			[XUE08]

➤ Substitution de cation monovalent

Dans la littérature, hormis les travaux de l'équipe de K. Yoshida, peu de substitutions de cation monovalent dans le β -TCP sont rapportées. K. Yoshida et coll. présentent dans plusieurs articles l'influence de l'ajout d'ions **sodium** (Na⁺) et **potassium** (K⁺) sur la stabilité thermique, la structure cristalline et les propriétés mécaniques du β -TCP [YOS05; YOS06; MAT09-b]. Les synthèses sont réalisées par voie solide à l'aide de précurseurs métalliques en

proportions variant de 0 à 16 % molaire. Quel que soit l'ion incorporé, un changement de valeur des paramètres de maille a et c s'opère à partir de 9 % molaire, teneur qui pourrait correspondre au maximum de substitution d'ion monovalent dans le β -TCP. K. Yoshida et coll. suggèrent que les ions monovalents (M^+) se substituent aux sites Ca(4) et s'insèrent sur les lacunes de la colonne A du β -TCP selon le mécanisme de compensation de charge suivant : $Ca_{Ca}^x = M_{Ca}^o + M_{V_{Ca}}^+$.

D'un point de vue biologique, les ions sodium et potassium sont présents dans l'os naturel [LIN98] et l'incorporation de 2 % molaire d'ions Na^+ ou K^+ permet d'améliorer les propriétés mécaniques du β -TCP [YOS05].

➤ Substitution de cation divalent

La substitution de **magnésium** (Mg^{2+}) dans le phosphate tricalcique β a été très largement abordée à travers l'étude du minéral whitlockite de formule $Ca_{18,19}Mg_{1,17}Fe_{0,83}H_{1,62}(PO_4)_{14}$ [CAL75]. Plusieurs travaux traitent de la synthèse de β -TCP dopé avec des teneurs en magnésium allant de 1 à 16 % molaire [CLE89; FAM94; END05]. La température de transformation $\beta \rightarrow \alpha$ augmente de 1150°C sans magnésium à 1540°C pour un dopage à 8 % molaire. Au-delà de 8 % molaire, le β -TCP coexiste avec une phase liquide qui se forme entre 1175°C et 1600°C selon la teneur en magnésium, comme prévu par le diagramme de phase $Ca_3(PO_4)_2 - Mg_3(PO_4)_2$ établi par J. Ando [AND58] et affiné par R. Enderle et coll. [END05] (respectivement Figure I-10a et b). Le β -TCP peut accepter dans sa structure jusqu'à 14 % molaire d'ion magnésium. Au-delà de cette valeur, une phase secondaire de composition variable $(Ca, Mg)_3(PO_4)_4$ appelée Stanfieldite apparaît [CLE89; END05].

La substitution des ions Mg^{2+} dans le β -TCP se fait sur les sites de calcium. La formule chimique qui en découle est $(Ca_{1-x}Mg_x)_3(PO_4)_2$ (TCMP), avec x la teneur en magnésium. L'incorporation des ions Mg^{2+} dans le β -TCP semble se faire en deux temps : substitution progressive et complète dans les sites Ca(5), jusqu'à une teneur en magnésium de 9,5 % molaire, puis, substitution dans les sites Ca(4) jusqu'à atteindre la limite de solubilité du magnésium dans le β -TCP, soit 14 % molaire. Le système devient ensuite biphasé lorsque les deux sites Ca(4) et Ca(5) sont totalement occupés par les ions Mg^{2+} [CLE89; END05].

La substitution de l'ion calcium Ca(5)²⁺ (rayon ionique 0,99 Å) par de petits cations tels Mg^{2+} (rayon ionique 0,65 Å) semble facile à accomplir. Ce site Ca(5) présente la particularité d'être dans un environnement octaédrique et de ne partager aucune arête avec les groupements phosphate PO_4 . Les liaisons Ca-O de ce site, comprises entre 2,238 et

2,287 Å [DIC74], sont relativement courtes par rapport à celles du composé CaO (2,404 Å), ce qui génère des contraintes dans le polyèdre Ca(5)O₆. I. Mayer et coll. suggèrent que l'incorporation de cations divalents de faible rayon ionique sur ce site relaxe les contraintes du polyèdre Ca(5)O₆ conduisant à une stabilisation de la structure β-TCP [MAY09]. De plus, L. W. Schroeder montre qu'avec l'addition de magnésium, les angles O-Mg(5)-O approchent la valeur de 90°, l'environnement tend vers une configuration octaédrique idéale [SCH77], ce qui expliquerait la stabilisation de la variété β du TCP après addition de magnésium.

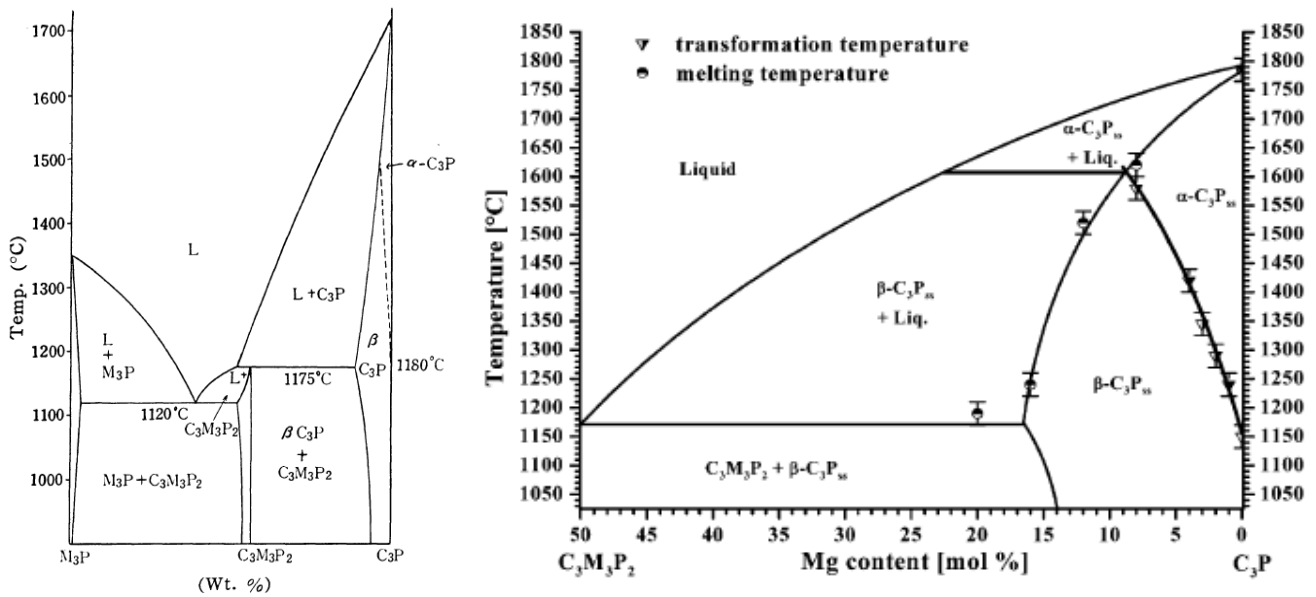


Figure I-10 : Diagramme de phase du système Ca₃(PO₄)₂ (C₃P) - Mg₃(PO₄)₂ (M₃P), gauche d'après [AND58] et droite d'après [END05]

L'ajout d'un additif comme le magnésium au cours de la synthèse du TCP permet donc d'augmenter la température de transformation allotropique β → α du TCP. Le β-TCP ainsi dopé peut alors être densifié à des températures plus élevées tout en évitant les microfissures générées par l'augmentation de volume due à l'apparition de la phase α-TCP.

D'un point de vue biologique, les ions magnésium sont présents dans les tissus : ils constituent 0,5 % en masse de l'os mature et de 0,4 à 1 % de l'os nouvellement formé. M. S. Sader et coll. ont étudié, *in vitro*, le comportement du β-TCP dopé au magnésium [SAD09]. Après 24h d'incubation, la densité de cellules ostéoblastiques à la surface des matériaux dopés est plus importante que sur du β-TCP pur commercial. La biocompatibilité du β-TCP dopé au magnésium a également été démontrée à l'aide de cellules fibroblastiques [RYA99].

D'autres cations divalents ont fait l'objet d'études, moins complètes, de substitution dans le β -TCP. C'est le cas du **zinc** (Zn^{2+}), lui aussi connu comme bioélément et présent dans l'os à hauteur de 0,02 % massique. A. Bigi et coll. ont étudié son incorporation dans le phosphate tricalcique β par calcination à 1000°C d'un mélange de β -TCP et de $\alpha\text{-Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ dans différentes proportions [BIG97]. La poudre est monophasée jusqu'à une teneur en zinc de 20 % molaire. L'ajout de zinc a pour conséquence la diminution du volume de la maille de β -TCP, ce qui conforte l'idée de la substitution de Zn^{2+} (rayon ionique = 0,74 Å) sur des sites Ca^{2+} . Suite à la coprécipitation d'un phosphate de calcium amorphe contenant du zinc, C. Zou et coll. ont confirmé la substitution de Zn^{2+} sur Ca^{2+} par Spectroscopie de Photoélectron X (XPS pour *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) et Diffraction des Rayons X (DRX) et proposent la formule chimique suivante $\text{Ca}_{(9-x)/3}\text{Zn}_{x/3}(\text{PO}_4)_2$ [ZOU08]. A. Cuneyt Tas et coll. ont étudié le comportement de cellules ostéoblastiques sur des échantillons de β -TCP dopés avec différentes teneurs en zinc [CUN07]. Les résultats de la viabilité cellulaire et de l'activité des phosphatases alcalines (ALP) sont significativement supérieurs sur l'échantillon contenant 4100 ppm de zinc que sur le β -TCP pur.

Le cation **manganèse** (Mn^{2+}) peut également se substituer au calcium du β -TCP. I. Mayer et coll., ont montré que le manganèse se substitue sur les sites Ca(5) et conduit à la formule chimique $\text{Ca}_{2,85}\text{Mn}_{0,15}(\text{PO}_4)_2$ [MAY08; SOP09]. Ce dopage a été étudié par voie solide [MAY08] et par voie sol-gel [SOP09]. Bien que cet ion semble être un médiateur de l'adhésion cellulaire en activant certaines intégrines [RET98; ARM00], aucun essai *in vitro* du β -TCP dopé au manganèse n'a encore été présenté.

Le β -TCP peut également accepter l'ion **strontium** (Sr^{2+}) dans sa structure. A. Bigi et coll. ont calciné à 1000°C un mélange de β -TCP et de $\alpha\text{-Sr}_3(\text{PO}_4)_2$ dans différentes proportions [BIG97]. Jusqu'à une teneur en strontium de 80 % molaire, la poudre cristallise dans la structure β -TCP et les paramètres de maille a et c augmentent de manière linéaire avec l'ajout de Sr^{2+} . Bien qu'aucune formule chimique ne soit proposée, l'ion Sr^{2+} se substituerait au calcium, préférentiellement sur les sites Ca(4) des colonnes de type A. Le grand rayon ionique de Sr^{2+} (1,13 Å) n'autoriserait pas sa substitution dans le polyèdre sous contrainte $\text{Ca}(5)\text{O}_6$. D'un point de vue biologique, le strontium est plus particulièrement présent dans les régions où le renouvellement métabolique est important. *In vitro*, il a été démontré que cet élément stimule la formation osseuse et inhibe sa résorption [MAR01-b], ce qui en fait un élément de choix pour le traitement de l'ostéoporose [REG05].

➤ Substitutions mixtes

Quelques études traitent de l'incorporation de plusieurs ions dans le β -TCP. C'est le cas de N. Matsumoto et coll. qui ont étudié le β -TCP dopé avec l'ion argent (Ag^+) et un ion supplémentaire divalent (zinc Zn^{2+} ou cuivre Cu^{2+}) [MAT09-b]. Les ions Zn^{2+} et Cu^{2+} se substitueraient complètement sur les sites Ca(5) jusqu'à une teneur de 9 % molaire tandis que l'ion Ag^+ occuperait les sites Ca(4) ainsi que les lacunes présentes dans la colonne de type A. Ce codopage confère au matériau une activité antibactérienne plus importante que celle observée sur le β -TCP pur ou le β -TCP contenant seulement Ag^+ .

Par coprécipitation en voie aqueuse, W. Xue et coll. ont synthétisé du β -TCP codopé aux ions Zn^{2+} et Mg^{2+} [XUE08]. Après un traitement thermique à 1100°C , le matériau n'est constitué, par diffraction de rayons X, que de β -TCP dont les raies caractéristiques sont décalées après ajout des dopants. Les auteurs en concluent que les ions sont substitués dans la structure. La présence de Mg^{2+} dans le β -TCP permet de diminuer la dissolution du matériau. Une étude *in vitro*, à l'aide de cellules ostéoblastiques, montre que la prolifération cellulaire et l'expression des phosphatases alcalines (ALP, cf. paragraphe I.1.3.b) augmentent significativement après le codopage.

Par un procédé de synthèse par voie aqueuse, S. Kannan et coll. ont préparé du β -TCP codopé au strontium et au magnésium, de formule théorique $\text{Ca}_{3-x}(\text{SrMg})_x(\text{PO}_4)_2$ [KAN10]. Après traitement thermique à 1000°C , seule la phase β -TCP est présente et ses paramètres de maille diminuent avec la teneur en dopant. Des affinements de structure ont permis de montrer que Sr^{2+} se localise préférentiellement sur les sites Ca(1, 2, 3, 4) tandis que Mg^{2+} se substitue sur les sites Ca(5). Le magnésium et le strontium semblent être appropriés pour lutter contre l'ostéoporose, cependant, aucun essai *in vitro* n'est encore présenté pour évaluer les bénéfices de ce codopage du β -TCP.

I.3.2.c. Le phosphate tricalcique silicaté

Il existe peu de données bibliographiques consacrées à l'incorporation de silicium dans la structure du phosphate tricalcique β . Les travaux d'E. S. Ghaith et coll. sur le β -TCP peuvent néanmoins être cités. Après irradiation d'un sol de silicium déposé par « *spin coating* » sur une pastille dense de β -TCP, des inclusions de phosphates de calcium amorphes riches en silicium se retrouvent enrobées dans une matrice de β -TCP [GHA06]. Partant d'une poudre de β -TCP, A. Bandyopadhyay et coll. ont préparé, *via* une réaction en voie solide, du β -TCP dopé avec des teneurs en silice SiO_2 variant de 0,25 à 5 % massique [BAN06]. Après frittage des poudres à 1250°C , ils n'observent aucun changement de phase. Suite à un traitement thermique à 800°C , M.

Kamitakahara et coll. ont également obtenu un composé unique de β -TCP après addition de 0,01 mole de tétraéthylorthosilicate (TEOS) [KAM08]. Pour des teneurs en silicium et des températures de calcination supérieures, le composé est constitué majoritairement de α -TCP avec parfois des traces de β -TCP. Ces différentes études ne présentent aucune formule chimique et la localisation du silicium dans les matériaux élaborés n'est pas précisée.

X. Wei et coll. ont étudié le codopage du β -TCP avec 10 mol.% de silicium et de zinc conduisant à la formule chimique théorique $\text{Ca}_{2,7}\text{Zn}_{0,3}(\text{P}_{0,9}\text{Si}_{0,1}\text{O}_4)_2$ [WEI05; WEI07-a]. A l'aide de la diffraction de neutrons, ils ont démontré que 9,2 % des sites de calcium sont occupés par des cations zinc, les sites Ca(5) l'étant totalement et les sites Ca(4) partiellement. Quant au silicium, il occupe 3,9 % des sites P et est localisé sur les sites P(1). Les auteurs suggèrent donc que l'incorporation du zinc favoriserait la substitution partielle du silicium sur les sites P(1). L'insertion de l'ion zinc dans le β -TCP, de plus petit rayon ionique que le calcium, « libérerait de l'espace » pour l'arrivée de l'ion silicium, plus gros que l'ion phosphore. Une étude complémentaire de ce matériau a montré que le silicium non incorporé dans la structure est localisé dans une phase amorphe [RAW08].

Hormis ces quelques études, la majorité des travaux sur le dopage du TCP avec du silicium concerne la phase α du TCP (Si- α -TCP). La variété α du TCP est un ciment phosphocalcique couramment employé comme matériau de comblement osseux. Son hydrolyse en milieu aqueux aboutit à une hydroxyapatite mal cristallisée et déficiente en calcium proche de la composition du minéral osseux. Le détail de ces travaux, procédés d'élaboration employés et détermination de la structure, fait l'objet de la suite de cette synthèse bibliographique.

➤ Procédés d'élaboration du Si- α -TCP

Plusieurs procédés d'élaboration de phosphate tricalcique α dopé au silicium ont été expérimentés. Des techniques de précipitation en voie aqueuse partant de silice sublimée [LAN99; SAY03; REI05; REI06; GIL09] ou de tétraéthylorthosilicate (TEOS) sont proposées [KAM08; MAS08]. Le pH de synthèse est généralement basique d'une valeur supérieure à 10, sauf dans l'étude de M. Kamitakahara et coll. [KAM08] dans laquelle il est fixé à 6. La température des réactions n'est pas contrôlée. Après synthèse, les poudres subissent un traitement thermique jusqu'à 550°C pour éliminer les résidus de synthèse (eau et nitrates), puis un frittage à une température comprise entre 1000 et 1250°C parfois suivi d'une trempe à l'air. Il est possible de produire une unique phase cristalline de Si- α -TCP en fixant le rapport Ca/(P+Si) à 1,50 et pour des teneurs en silicium variant entre 0,59 et 1,14 % massique [REI06]. Au contraire, si c'est le rapport Ca/P qui est fixé, l'addition de silicium rend le

système multiphasé [SAY03; REI05]. Par exemple, pour un rapport Ca/P fixé à 1,67, l'addition de silicium jusqu'à une teneur massique de 8 %, conduit à un matériau constitué majoritairement de α -TCP qui contiendrait une partie du silicium, d'HA, de β -TCP et d'une phase amorphe riche en éléments Si, Ca et P [SAY03].

Des études de synthèse par voie solide à des températures variant de 1000 à 1350°C et en utilisant comme précurseur de silicium de la silice amorphe sublimée ou un gel de silice sont également rapportées [CAM06; DOR07; MAS08]. Pour respecter la neutralité de la structure, les proportions des précurseurs sont calculées selon la formule $\text{Ca}_{3-x}(\text{PO}_4)_{2-2x}(\text{SiO}_4)_x$. Les matériaux issus de ces synthèses sont majoritairement constitués de α -TCP contenant des traces de HA ou de β -TCP.

Concernant la mise en forme de matériaux de Si- α -TCP, seuls M. Kamitakahara et coll. ont réalisé une rapide étude de comportement au frittage de compacts de poudre pré-calcinée à 800°C et contenant différentes proportions de silicium [KAM08]. Le frittage des matériaux débute aux environs de 1000°C et le retrait dilatométrique est plus important pour les échantillons contenant du silicium que pour l'échantillon n'en contenant pas. Le taux de densification augmente avec la teneur en silicium tandis que la taille des grains diminue.

➤ Résolution de la structure du Si- α -TCP

Dans la structure TCP, le silicium est supposé se substituer sur les sites cristallographiques du phosphore. La différence de valence des deux ions requiert la création de défauts ioniques pour maintenir la neutralité de la structure. Le mécanisme de compensation de charges reste difficile à déterminer à cause de la faible quantité de silicium ajouté. Pour tenter d'élucider la structure de Si- α -TCP, M. Sayer et coll. proposent deux mécanismes de compensation de charge [SAY03] :

- création d'une lacune de O^{2-} , ce qui conduirait à un composé de formule $\text{Ca}_3(\text{P}_{1-x}\text{Si}_x\text{O}_{4-x/2})_2$
- présence d'un excès de calcium Ca^{2+} induisant la formation de $\text{Ca}_{3+x}(\text{P}_{1-x}\text{Si}_x\text{O}_4)_2$.

D'après des calculs de type *ab initio*, ces deux mécanismes conduisent à un composé énergétiquement stable [YIN05]. Le premier mécanisme entraîne la formation du complexe Si_2O_7 dans la structure α -TCP. Lorsque la teneur en silicium augmente (à partir de 2 % massique environ), des répulsions entre ces complexes Si_2O_7 apparaîtraient, le mécanisme privilégié deviendrait alors celui impliquant un excès de calcium. L'étude par résonance magnétique nucléaire de P. Gillespie et coll. suggère que l'ajout de 0,82 % massique de silicium dans du α -TCP conduit à une structure de type Q^1 , c'est-à-dire à une structure possédant un atome d'oxygène pontant par tétraèdre. Une telle structure correspond à deux

groupements silicate partageant un atome d'oxygène, ce qui correspondrait à l'insertion du complexe Si_2O_7 [GIL09]. Cependant, les mécanismes de compensation de charges régissant la formation de $\text{Si-}\alpha\text{-TCP}$ sont encore incertains.

Dans tous les cas, l'ajout de silicium semble stabiliser la phase α du phosphate tricalcique [WEI05; REI06; MAS08]. X. Wei et coll. expliquent cette stabilisation d'un point de vue cristallographique [WEI05]. Le tétraèdre PO_4^{3-} dans la structure $\alpha\text{-TCP}$ occupe un volume de 180 \AA^3 alors qu'il n'est que de 168 \AA^3 dans le $\beta\text{-TCP}$. Sachant que Si^{4+} possède un rayon ionique plus grand que P^{5+} , $0,26 \text{ \AA}$ contre $0,17 \text{ \AA}$, son incorporation favoriserait la formation de la phase $\alpha\text{-TCP}$ qui offre un plus grand volume de substitution. Ces observations sont en accord avec le diagramme de phase du système $2\text{CaO},\text{SiO}_2\text{-}3\text{CaO},\text{P}_2\text{O}_5$ établi par R. W. Nurse et coll. et présenté sur la Figure I-11 [NUR59].

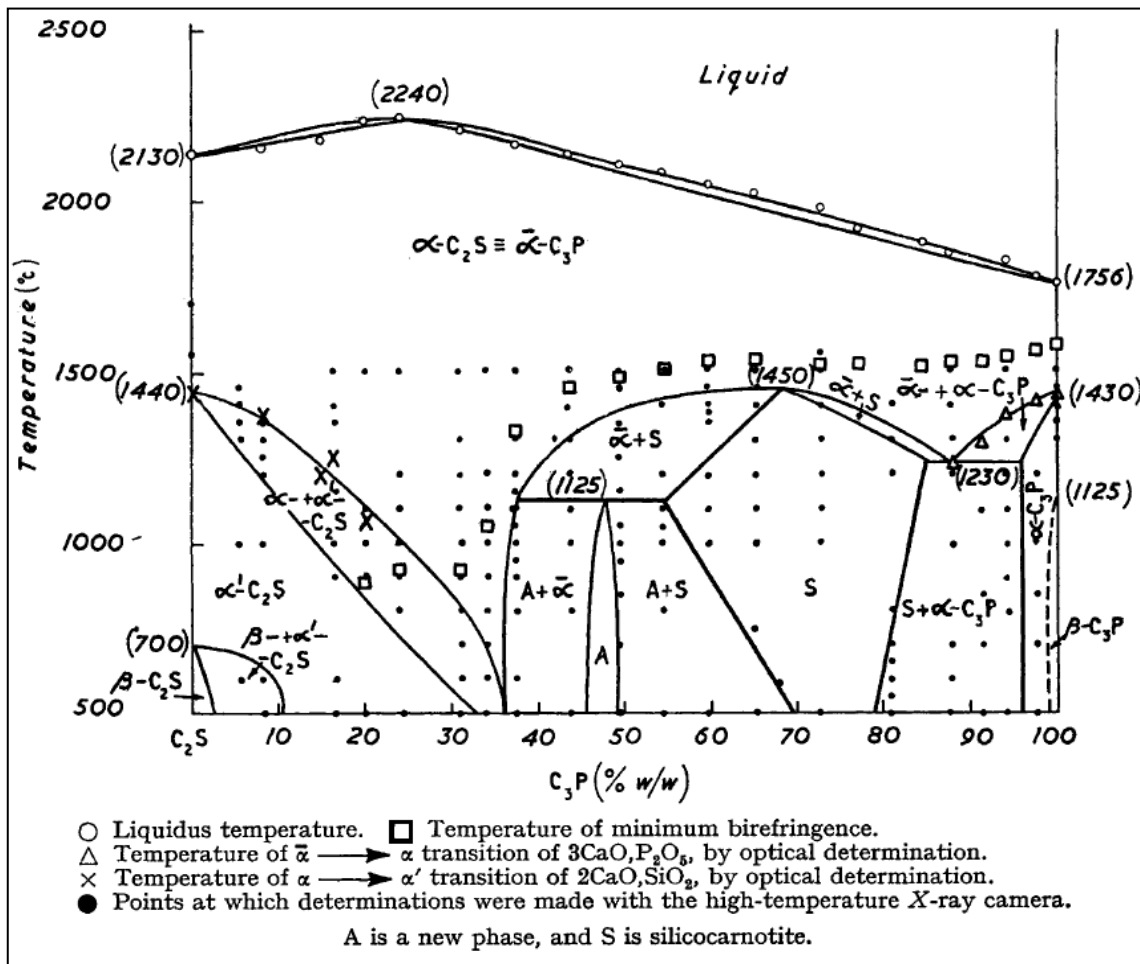


Figure I-11 : Diagramme de phase du système $2\text{CaO},\text{SiO}_2(\text{C}_2\text{S})\text{-}3\text{CaO},\text{P}_2\text{O}_5(\text{C}_3\text{P})$ [NUR59]

L'ajout de $2\text{CaO},\text{SiO}_2$ dans le TCP ($3\text{CaO},\text{P}_2\text{O}_5$), en proportions variant de 1 à 20 % massique, stabilise la phase α du TCP. Pour des teneurs en $2\text{CaO},\text{SiO}_2$ supérieures à 4 % massique, une phase secondaire nommée silicocarnotite (de formule chimique

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_4(\text{SiO}_4)_2$ et notée S sur le diagramme) est formée. D'après ce diagramme, la variété allotropique β du TCP n'est stable qu'en dessous de 1 % massique de $2\text{CaO}, \text{SiO}_2$. Tous ces résultats montrent la difficulté d'obtenir la variété allotropique β du TCP en présence de silicium.

I.3.3. Intérêt biologique de la substitution de silicium

D'un point de vue biologique, le bénéfice apporté par l'ajout de silicium dans l'hydroxyapatite a été évalué *in vitro* et *in vivo*. Après immersion dans des solutions de type *Simulated Body Fluid* (SBF), une plus grande bioactivité a été mise en évidence sur Si-HA comparé à HA pure [BAL03; VAL05; SIL10]. Des études de prolifération de cellules ostéoblastiques ont prouvé la biocompatibilité de l'hydroxyapatite silicatée [THI06-b; PAL09-a]. Plus le taux de silicium incorporé dans l'HA est important, plus la prolifération cellulaire est grande, depuis un jour jusqu'à une semaine de culture [VAL05]. Une étude *in vivo* rapporte également que le pourcentage de croissance osseuse et de recouvrement os/implant est significativement plus important sur Si-HA que sur HA [PAT02]. La présence de groupement silicate dans l'hydroxyapatite augmente également la dissolution du matériau *in vivo*, ce qui se traduit par un remodelage osseux plus rapide [POR03; POR04-c].

L'évaluation biologique du TCP silicaté est orientée vers l'étude de Si- α -TCP. C. L. Camiré et coll. ont examiné la bioactivité, *in vitro* et *in vivo*, de ciments phosphocalciques obtenus à partir de Si- α -TCP [CAM06]. Ils ont montré que l'addition de 1 % massique de silicium améliore significativement l'activité ostéoblastique et l'intégration osseuse. Des matériaux constitués d'un mélange de HA et de α -TCP entouré d'une phase amorphe et contenant une quantité de SiO_2 variant de 0,5 à 10,0 % massique, ont été étudié en milieu SBF par X. W. Li et coll. [LI06]. La bioactivité de ces matériaux est supérieure à celle de l'HA pure et augmente par addition de SiO_2 à hauteur de 5 % massique.

Le comportement d'implants à base d'HA et de Si- α -TCP *in vivo* a été étudié par S. Langstaff et coll. [LAN01]. Les résultats montrent une intégration rapide de l'implant dans les tissus osseux receveurs, accompagnée de la formation d'une matrice osseuse minéralisée. Après immersion dans de l'eau déionisée ou dans une solution contenant des sels d'Earle, un rapide phénomène de précipitation biomimétique est observé à la surface du matériau de composition massique 68 % en Si- α -TCP, 24 % en HA et 8 % en β -TCP [TUC08]. Ce phénomène pourrait être expliqué par la présence de l'élément silicium aux joints de grains du matériau. Un matériau similaire, constitué de 2/3 de Si- α -TCP et 1/3 de HA en masse, a été

implanté dans une large région défectueuse de tibia de mouton [MAS06; MAS07] ou de manière ectopique chez des souris [PAP07]. Aucune inflammation au niveau de l'implant n'a été décelée. L'implant, progressivement résorbé par les ostéoclastes, est, au bout de deux ans, entièrement remplacé par un nouveau tissu osseux minéralisé.

I.3.4. Conclusion

Le silicium peut se substituer dans la structure d'un phosphate de calcium sur les sites de phosphore. A l'heure actuelle seuls l'hydroxyapatite silicatée (Si-HA) et le phosphate tricalcique α silicaté (Si- α -TCP) ont été synthétisés. La biocompatibilité ainsi que la bioactivité de ces phosphates de calcium silicatés ont été démontrées *in vitro* et *in vivo*. Les propriétés biologiques de ces matériaux sont, dans certaines études, supérieures à celles du produit non substitué. L'hydroxyapatite présente un très faible produit de solubilité dans l'eau ($K_s = 3,05 \cdot 10^{-59}$) ce qui en fait un composé quasi-insoluble contrairement au TCP. La variété α du TCP, dont le produit de solubilité ($K_s = 8,46 \cdot 10^{-32}$) est plus grand que celui du β -TCP ($K_s = 2,07 \cdot 10^{-33}$), se résorbera plus rapidement après implantation. Cependant, une résorption trop rapide peut nuire à l'efficacité de l'implant. Pour pallier cet inconvénient, l'étude de l'incorporation de silicium dans le β -TCP semble intéressante. Les travaux concernant l'élaboration ainsi que l'évaluation biologique de β -TCP contenant du silicium font l'objet, respectivement, des chapitres III et IV.

L'incorporation de groupements silicate dans le réseau cristallin des phosphates de calcium conduit également à la formation de nouvelles liaisons Si-O-Si. Ces liaisons constituent des sites d'accueil favorables au procédé de silanisation [PAS08], étape intermédiaire avant le greffage de biomolécules permettant la fonctionnalisation du matériau [DUR04]. Pour mieux cerner cette problématique, une mise au point bibliographique sur la technique de fonctionnalisation de surface ainsi que sur ses objectifs est proposée au paragraphe suivant.

I.4. Fonctionnalisation de surface

Dans le but d'améliorer l'intégration d'une prothèse au niveau du site receveur, de nouvelles approches se sont récemment développées. Parmi les systèmes actuellement en cours d'étude figurent les matériaux biomimétiques qui reproduisent artificiellement l'environnement extracellulaire, le but étant que ces matériaux interagissent avec les tissus environnants pour stimuler une réponse cellulaire spécifique. Dans cette optique, un intérêt croissant s'est porté sur les techniques de modifications de surface [HEN02]. Plusieurs approches consistent à modifier la chimie de surface du matériau originel pour le rendre ostéoinducteur, c'est-à-dire capable d'accueillir les cellules progénitrices de l'hôte, d'induire leur différenciation ostéoblastique et donc de stimuler l'ostéogénèse.

La méthode la plus couramment étudiée à l'heure actuelle consiste à associer un matériau biocompatible à des biomolécules spécifiques (peptides, protéines d'adhésion, facteur de croissance...) dont le rôle sur le comportement cellulaire est connu. La conception du matériau ostéoinducteur passe ici par une fonctionnalisation de sa surface par adsorption ou greffage covalent de la biomolécule. Plusieurs aspects sont à considérer pour l'élaboration de tels systèmes :

- La capacité du système à présenter la biomolécule au site approprié,
- La présence d'un substrat qui améliorera le recrutement et l'attachement des cellules,
- La présence d'un espace nécessaire à la migration des cellules,
- Une vascularisation adéquate assurant la survie des cellules au contact du système,
- La capacité du système à se biodégrader sans occasionner de réponse inflammatoire ou de produits de dégradation toxiques pouvant nuire au processus de reconstruction osseuse.

Afin de répondre à ce cahier des charges, l'utilisation de phosphate de calcium comme substrat est pertinente. Après implantation, le premier phénomène biologique intervenant au cours du remodelage tissulaire est l'adhésion de cellules osseuses à la surface du matériau. Pour favoriser ce processus, de nombreux auteurs se sont alors intéressés au greffage de protéines d'adhésion contenant la séquence peptidique RGD spécifique de l'adhésion cellulaire. Le paragraphe suivant présente l'intérêt biologique de la fonctionnalisation de surface avant d'aborder les méthodes employées pour y parvenir.

I.4.1. Intérêt biologique du greffage

Afin de favoriser l'adhésion des cellules osseuses, le greffage de peptides contenant la séquence d'acides aminés RGD (Arginine – Glycine – Acide Aspartique) au contact de substituts osseux s'est largement développé. Le paragraphe suivant s'attache à présenter les résultats d'études biologiques menées sur divers matériaux contenant cette séquence peptidique.

I.4.1.a. Greffage de protéine d'adhésion

La mise en culture de cellules ostéoblastiques sur du polyéthylène téréphtalate (PET) fonctionnalisé par des peptides RGD a montré que des points de contacts focaux¹ se sont formés *in vitro* entre les cellules et le PET après 15 h, contrairement au matériau vierge [CHO08]. Une étude *in vitro*, à l'aide de cellules épithéliales, sur des substrats de silicone après immobilisation de RGD ou de YIGSR (séquence peptidique de l'adhésion cellulaire) a démontré qu'en moins de 96 h les cellules atteignent la confluence, contrairement aux surfaces non traitées [CHE06]. D'autres études ont montré que le greffage de peptides contenant la séquence RGD permet, en peu de temps (de 1 à 8 h), une amélioration significative de l'attachement de cellules ostéoprogénitrices à la surface d'HA [ITO02; DUR04; BAL06], d'alliage Ti-6Al-4V [POR04-a], d'alliage de titane recouvert d'HA [PAL09-b], de cellulose [BAR04] ou de substrats en titane recouvert d'or [HUA03]. Il permet aussi l'augmentation de l'attachement de cellules endothéliales à la surface de substrat en silice [POR99].

Certains auteurs mettent également en évidence une stimulation de l'activité des phosphatases alcalines (*cf.* paragraphe I.1.3.b) sur des cultures de cellules ostéoblastiques après fonctionnalisation d'hydroxyapatite à l'aide de peptide RGD [ITO02; DET10]. De plus, l'étude de D. Itoh et coll. indique une forte expression du phénotype ostéoblastique (OP, OC, BSP et COLL I) incluant la formation de nodules de minéralisation après traitement de la surface à l'aide de RGD [ITO02]. L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* semble prometteur, cependant ils contrastent avec les conclusions d'études récentes conduites *in vivo*.

Des essais d'implantation d'un alliage de titane recouvert d'HA et fonctionnalisé à l'aide de peptide RGD sur des fémurs de lapin ne révèlent aucune amélioration de l'adhésion, de la différenciation ou de la croissance osseuse de cellules ostéoprogénitrices par rapport à l'alliage

¹ Jonctions d'ancrage de la cellule à la surface ; constitués d'un assemblage d'intégrines, ces points de contact focaux représentent une très forte adhésion de la cellule à la surface

non traité [PAL09-b]. Des matériaux d'HA recouverts de peptides RGD ont été implantés dans des tibias de lapins [BIT09] et de rats [HEN08]. Selon A. Bitschnau et coll. aucune différence significative sur la formation osseuse n'est observée entre HA/RGD et l'hydroxyapatite seule. Plus marquant, les résultats de l'étude de K. M. Hennessy et coll. indiquent que le peptide RGD a un effet néfaste sur l'adhésion et la survie des cellules souches mésenchymateuses et qu'il inhibe de manière significative la formation osseuse.

Les résultats contradictoires entre les études *in vitro* et *in vivo* peuvent s'expliquer par la complexité du système étudié *in vivo* [PAL09-b]. Après implantation, rapidement des phénomènes d'adsorption de protéines du plasma et de composants de la matrice extracellulaire ont lieu. Une étude montre également la grande variabilité des résultats selon que des essais *in vitro* soient réalisés dans des conditions statiques ou dynamiques [SIL10]. La plupart des études *in vitro* de greffage de peptides RGD ont été réalisées dans des milieux statiques et ne contenant pas de sérum [OKA98; POR99; BAR04; CHE06]. Dans ce dernier cas, les cellules cultivées entrent directement et uniquement en interaction avec la séquence peptidique RGD pour laquelle elles possèdent les intégrines spécifiques. C'est pourquoi, pour réaliser des essais *in vitro*, H. Marques da Silva et coll. suggèrent, afin de mieux prévoir le comportement *in vivo*, de travailler dans des conditions dynamiques et en présence de sérum biologique [SIL10].

K. M. Woo et coll. indiquent qu'un composite constitué d'HA et de poly-L-lactate (PLLA) contribue à un environnement plus favorable pour la survie de cellules ostéoblastiques comparé au polymère seul [WOO07]. La présence d'HA dans le composite permet d'augmenter de plus de 1,4 fois l'adsorption de protéines d'adhésion. En effet, les biocéramiques phosphocalciques présentent, intrinsèquement, une grande capacité d'adsorption de protéines dont les protéines d'adhésion [KIL01]. Certains auteurs se posent alors la question de l'intérêt de fonctionnaliser la surface d'HA à l'aide de protéine contenant la séquence RGD [SAW07; HEN08].

Cependant, ces matériaux restent peu efficaces pour la régénération de larges pertes de substances osseuse [JOH96]. Dans de telles situations, il convient d'utiliser des substituts osseux qui permettent la différenciation ostéoblastique de cellules progénitrices assurant ainsi l'ostéogénèse dans l'ensemble du matériau. C'est pourquoi, le greffage à la surface de biomatériaux de facteurs de croissance spécifiques à l'ostéogénèse semble intéressant.

I.4.1.b. Apport potentiel du greffage de facteurs de croissance

Il y a beaucoup d'intérêt à développer l'utilisation des facteurs de croissance pour l'amélioration de la reconstruction osseuse [LIE02] :

- Accélération de la guérison de fracture (particulièrement chez les patients qui présentent des risques de non union osseuse),
- Traitement de non union osseuse avérée,
- Amélioration des spondylodèses primaires (fixation de deux ou plusieurs vertèbres),
- Traitement de pseudarthrose avérée de la colonne vertébrale (absence de consolidation de deux fragments osseux après une fracture).

Parmi les facteurs de croissance impliqués dans le processus du remodelage osseux (I.1.4.e) et rencontrés en chirurgie osseuse les BMP sont les protéines les plus étudiées. Les BMP, et plus particulièrement la BMP-2, stimulent la différenciation ostéogénique en augmentant la synthèse de protéines de la matrice osseuse telles que l'OC, la BSP, l'OP et l'ALP [CHE97; LEC97; TAK05]. Ce facteur de croissance est également capable d'induire la formation osseuse *in vivo* et *in vitro* en accélérant la formation de nodules de minéralisation [CHE97; GEI03; KEM08]. Immobilisés sur de l'HA, des peptides dérivés de la BMP-2 améliorent la différenciation ostéogénique de cellules souches mésenchymateuses [LEE10].

A cause du manque de vascularisation, la viabilité *in vivo* de la plupart des biomatériaux est compromise durant les trois à sept jours suivant l'implantation, temps nécessaire à la création de nouveaux vaisseaux sanguins [JIA08]. Pour pallier ce problème, la solution serait de concevoir un matériau favorisant, *in vitro*, l'angiogénèse et la vascularisation. Par l'intermédiaire d'une fonctionnalisation de surface, il serait possible d'intégrer des facteurs de croissance, stimulant ces processus, à un biomatériau. Mais à ce jour, peu d'études utilisant la technique du greffage abordent ce point. L. L. Y. Chiu et coll. se sont néanmoins récemment intéressés à l'immobilisation du facteur de croissance VEGF et/ou Ang1² sur une matrice collagénique [CHI10]. Au bout de trois et sept jours, la densité de cellules endothéliales *in vitro* est au moins 1,5 fois plus élevée que sur le matériau contrôle. Suite à cette co-immobilisation, la formation d'une structure vasculaire est favorisée *via* la création de tubes fabriqués par les cellules endothéliales. Hormis cette étude, les autres travaux ne mentionnent pas explicitement l'immobilisation de tels facteurs de croissance sur des

² Facteur de croissance de l'angiogénèse qui prévient l'apoptose des cellules endothéliales

substrats synthétiques. Les résultats obtenus sont malgré tout prometteurs. L'addition de VEGF sur des défauts de radius de lapin voué à une non-union osseuse conduit à une amélioration significative de la vascularisation et de la régénération osseuse [GEI05]. Y. Yonamine et coll. ont implanté des microsphères de polymère contenant le facteur de croissance VEGF sur un large défaut osseux [YON10]. A l'aide d'un tel matériau, la formation d'os épais et mature est stimulée contrairement à l'utilisation du facteur de croissance seul.

De nombreuses études traitent également de l'utilisation du facteur de croissance bFGF, pour *basic Fibroblast Growth Factor*, en chirurgie réparatrice. Implanté en sous-cutané, il induit une vascularisation significativement plus importante du site à traiter [TAB99-a]. Bien que le bFGF ne soit pas ostéoinducteur en tant que tel, son efficacité dans le processus de guérison de fractures a été mise en évidence *in vivo* sur des péronés de babouins [RAD99] ou sur des défauts crâniens de singes [TAB99-b]. Adsorbé sur un macroporeux d'HA, l'expression *in vitro* des gènes responsables de l'ostéogenèse est augmentée, traduisant ainsi le rôle du facteur de croissance bFGF sur les propriétés ostéogéniques du matériau [JEO10].

L'efficacité de plusieurs facteurs de croissance sur la régénération osseuse a été démontrée. Parallèlement, plusieurs travaux illustrent l'amélioration des propriétés biologiques de matériaux après immobilisation d'une biomolécule contrairement à son utilisation sous forme soluble [SHE08; CHI10; LEE10]. Afin d'assurer une immobilisation covalente de la biomolécule, le procédé de fonctionnalisation de surface par silanisation, présenté dans le paragraphe suivant, a été développé.

I.4.2. Fonctionnalisation de surface par silanisation

Pour garantir l'efficacité du dispositif, il est préférable que l'immobilisation de la biomolécule se fasse de manière covalente. Une simple adsorption peut conduire à un relargage incontrôlé de la molécule voir à sa dégradation [WOJ10]. Pour éviter sa dispersion en dehors du site à traiter et afin de promouvoir son efficacité localement, les biomolécules doivent être greffées de manière covalente au matériau, c'est-à-dire *via* des groupements fonctionnels tels que des fonctions carboxylique, hydroxyle ou amine. Les matériaux ne possédant pas systématiquement de telles fonctions, celles-ci doivent être apportées par un traitement préalable nécessitant l'intervention d'une ou de plusieurs molécules intermédiaires (Figure I-12).

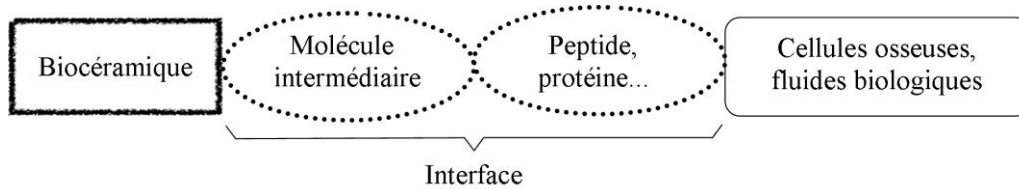


Figure I-12 : Principe de la fonctionnalisation de surface de biocéramiques

Le procédé le plus couramment employé pour réaliser ce greffage de molécule intermédiaire est la silanisation à l'aide d'organo-alkoxysilanes. La réaction de silanisation de surface a été développée par E. P. Plueddemann [PLU82] et a par la suite été largement étudiée dans des domaines très variés. Elle consiste à recouvrir une surface par des organo-alkoxysilanes dans le but de créer des groupements fonctionnels très réactifs à la surface d'un matériau. La réaction de silanisation a lieu grâce à la présence de groupements hydroxydes présents à la surface du matériau et aboutit à la formation de liaisons covalentes Si-O-Si entre l'organo-alkoxysilane et le substrat. Cette technique a été récemment adaptée aux biocéramiques par l'équipe de M. C. Durrieu qui l'a utilisée pour fonctionnaliser la surface d'hydroxyapatite [DUR04].

Après avoir présenté les organo-alkoxysilanes et leur réactivité, le principe de la biofonctionnalisation par silanisation est illustré à partir des travaux de M. C. Durrieu et coll. Suivant l'application visée, de nombreux organo-alkoxysilanes peuvent être employés pour traiter les surfaces. Les plus rencontrées ainsi que les objectifs alors recherchés, sont présentés au paragraphe I.4.2.c. Afin de réaliser une interface stable entre l'organo-alkoxysilane et la biomolécule, un agent de couplage supplémentaire est souvent requis. Le paragraphe I.4.2.d leur est consacré.

I.4.2.a. Généralités sur les organo-alkoxysilanes

Les organo-alkoxysilanes répondent à la formule générale $X_n\text{Si}(\text{OR})_{4-n}$. Les groupements X sont des chaînes alkyles non hydrolysables pouvant porter diverses fonctions notamment des amines, particulièrement réactives avec les acides carboxyliques et les esters. Les groupements OR (R = Cl, CH₃, C₂H₅) sont facilement hydrolysables, ce qui conduit à la formation de silanols $X_n\text{Si}(\text{OH})_{4-n}$ (Figure I-13).

Quelle que soit la nature du groupement X, les organo-alkoxysilanes présentent deux types de réactivité [FOR09]. En présence d'eau, ils subissent une hydrolyse et peuvent ainsi faire l'objet d'une réaction de condensation intermoléculaire appelée homocondensation (Figure

I-13). Cette réaction aboutit à la formation de liaisons Si-O-Si intermoléculaires. Une macromolécule est ainsi formée par polymérisation. Cette réaction de polymérisation peut se poursuivre pour aboutir à un gel formant un réseau à trois dimensions (Figure I-14). Ce type de réactivité n'est pas favorable à la formation de monocouche de molécule à la surface d'un substrat.

En milieu anhydre, les silanols peuvent également réagir avec les groupements hydroxyde présents à la surface d'un substrat, selon une réaction dite d'hétérocondensation, pour assurer une liaison chimique entre la molécule et le matériau (Figure I-15).

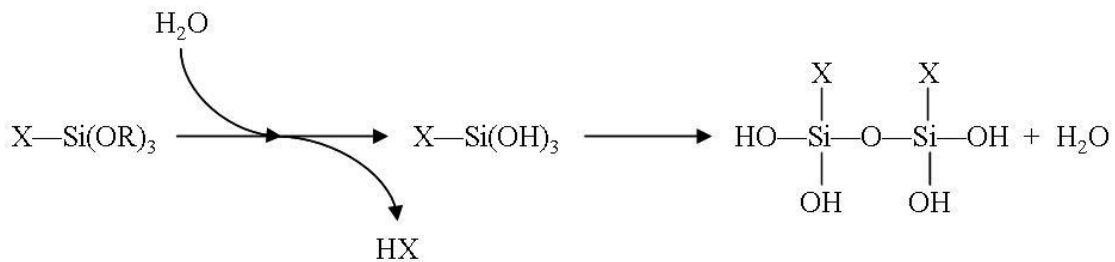


Figure I-13 : Réactions d'hydrolyse et d'homocondensation des organo-alkoxysilanes

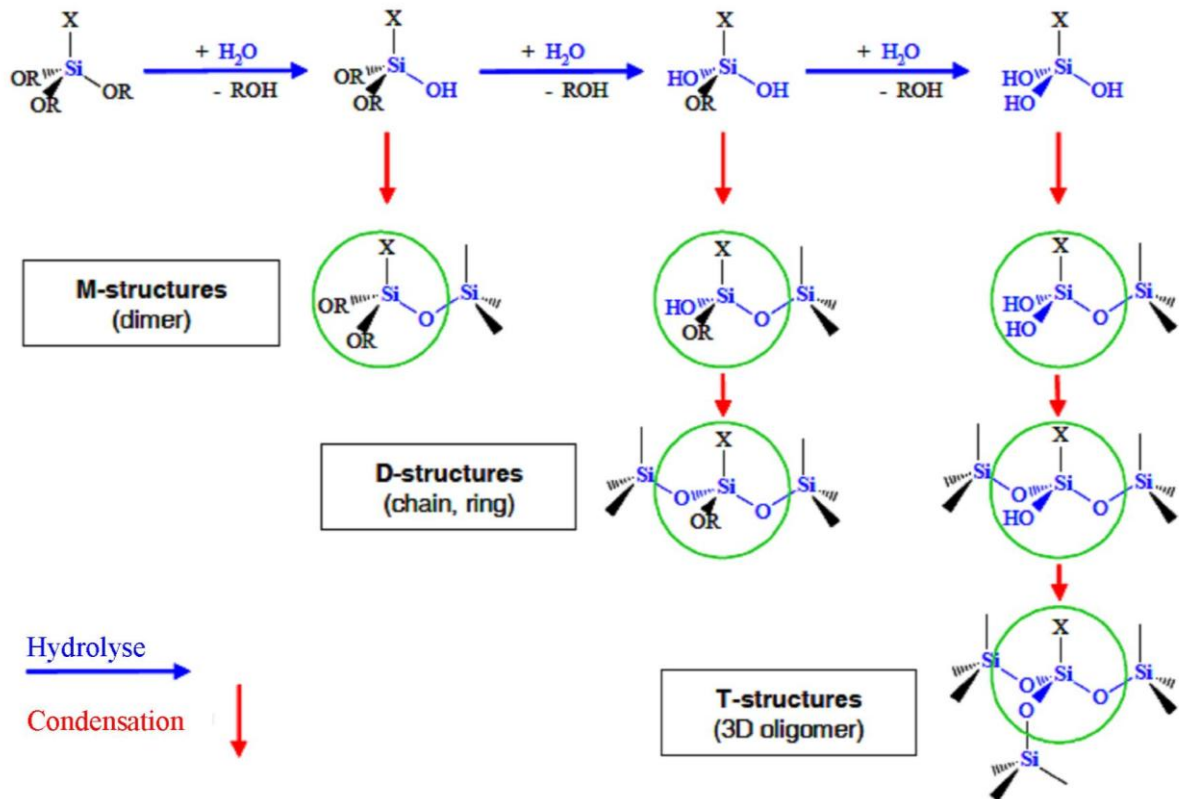


Figure I-14 : Différentes voies d'hydrolyse et de condensation des organo-alkoxysilane, d'après [DAM05]

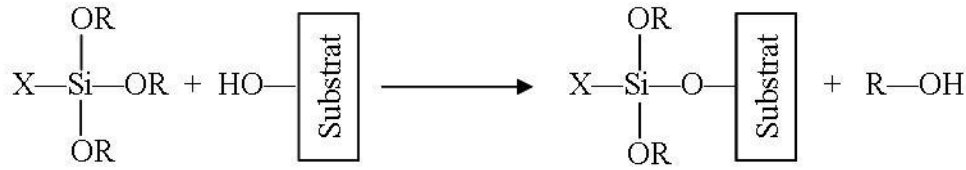


Figure I-15 : Réaction d'hétérocondensation des organo-alkoxysilanes

Au cours de modifications de surfaces à l'aide d'organo-alkoxysilanes, la balance entre l'hétéro- et l'homocondensation dépend de la nature du substrat et de la quantité d'eau environnante. La présence d'eau est nécessaire pour la formation de monocouches d'organo-alkoxysilanes mais lorsque la quantité d'eau augmente, l'homocondensation est privilégiée et le risque de former des multicouches par polymérisation s'accroît (Figure I-16a) [GLA04; MUT05]. La condensation des organo-alkoxysilanes provoque alors la formation d'un réseau de molécules liées à la surface. C'est pourquoi de nombreuses réactions de silanisation sont réalisées dans des solvants anhydres [NAN98; POR99; DUR04; WAN08].

Le pH du milieu réactionnel joue également un rôle important. Un milieu acide favorise l'hydrolyse des organo-alkoxysilane et ralentit leur condensation contrairement à un milieu basique (Figure I-16b).

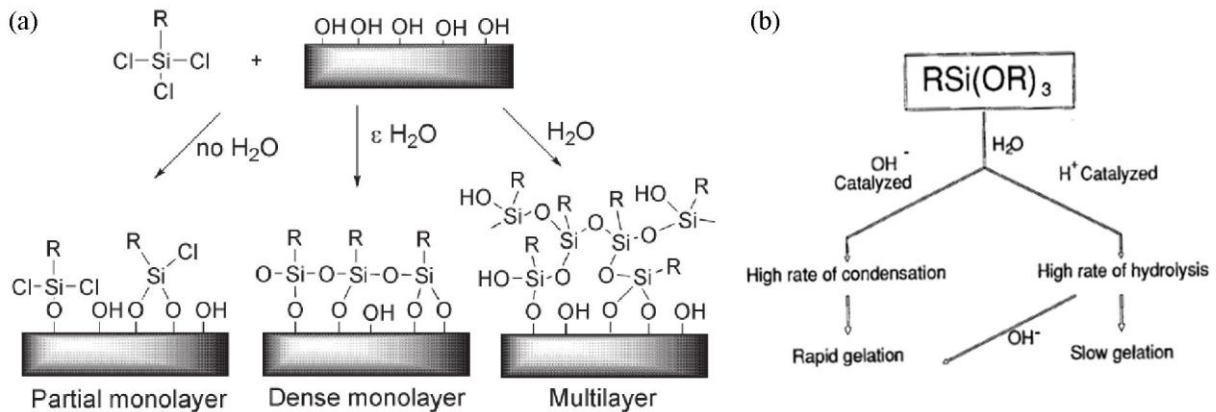


Figure I-16 : Influence (a) de l'eau [MUT05] et (b) du pH [ARK92] sur la réactivité des organo-alkoxysilanes

I.4.2.b. Principe de la silanisation pour la biofonctionnalisation [DUR04]

Afin de développer une nouvelle stratégie de modification biomimétique, M. C. Durrieu et coll. ont greffé des peptides contenant la séquence d'acides aminés RGD à la surface de matériaux macroporeux d'HA. Ils ont mis au point un protocole se déroulant en trois étapes détaillées à la Figure I-17.

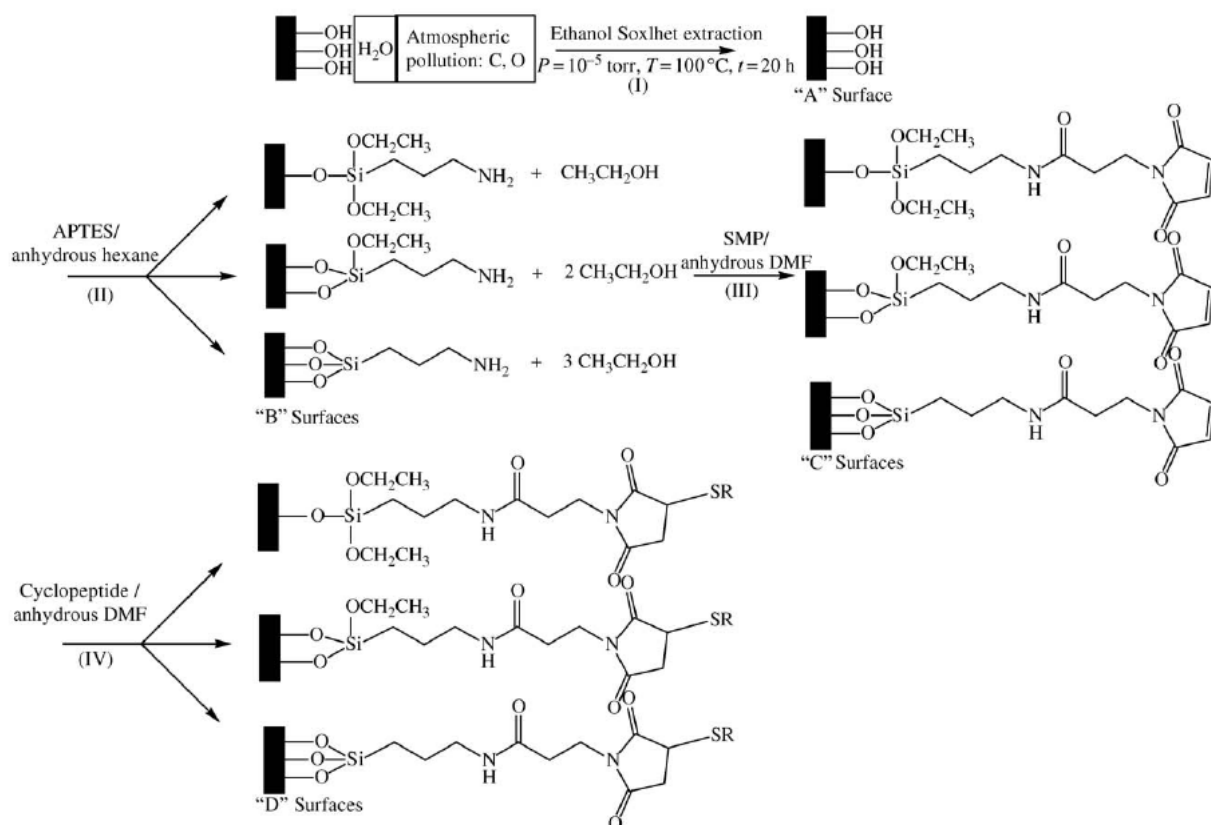


Figure I-17 : Procédé de greffage établi par M. C. Durrieu et coll. [DUR04]

Après un nettoyage de la surface du matériau (I, surface A), une silanisation à l'aide du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) est effectuée (II, surface B). Le greffage de l'organo-alkoxysilane à la surface de l'HA se fait *via* les groupements OH présents à la surface du substrat. Un agent de couplage, le 3-Succinimidyl-3-MaléimidoPropionate (SMP), est alors ajouté par le biais du groupement amine de l'APTES (III, surface C). Cette étape permet d'apporter à la surface du matériau un groupement maléimide ($\text{H}_2\text{C}_2(\text{CO})_2\text{N}$) dont la double liaison $\text{C}=\text{C}$ réagit facilement avec les fonctions thiols (R-S-H) présentes dans les peptides (IV, surface D). Ce protocole a également été employé pour fonctionnaliser, à l'aide de la séquence peptidique RGD, la surface d'alliage de titane, aluminium et vanadium (Ti-6Al-4V) [POR04-a], de substrat de silice [POR99], ou de cellulose [BAR04].

I.4.2.c. Les organo-alkoxysilanes pour le greffage et leurs applications

Plusieurs molécules, dont celles présentées sur la Figure I-18, sont rencontrées dans la littérature pour réaliser le procédé de silanisation de surface. Parmi elles, le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) constitue la molécule la plus couramment employée dans les études de fonctionnalisation de surface. Les terminaisons de type amine primaire ont

la capacité d'immobiliser divers ions ou molécules, propriété recherchée dans les domaines de l'électronique, la catalyse ou encore la biochimie.

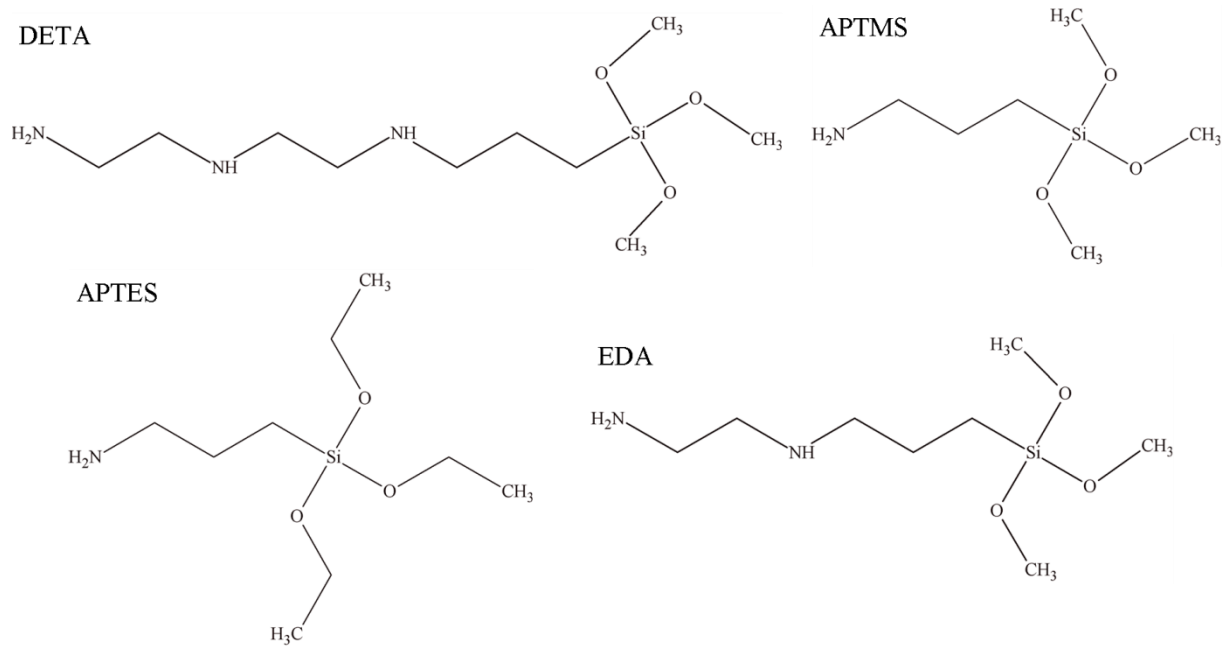


Figure I-18 : Exemples de molécules utilisées dans les procédés de silanisation

La silanisation à l'aide d'APTES a par exemple été étudiée pour améliorer la dispersion des argiles dans l'eau ou dans des solvants organiques [WHE05]. Des substrats de silicium [HOO01; OH02; PAS08; KIM09], de silice poreuse [EK03] ou de carbone [MAT07] ont été silanisés à l'aide d'APTES. Le greffage d'APTES à la surface de matériaux à base d'HA [ZUR05; BAL06; SCH09; DET10] ou d'HA et de Si- α -TCP [WAN08], de titane [NAN98; XIA98; DUB06] ou de verres bioactifs [VER09] a pour but de créer des sites d'accueil favorables au greffage ultérieur de biomolécules.

Les biocéramiques phosphocalciques possèdent à leur surface des groupements hydroxyde comme point d'ancrage de la molécule. Dans le cas des verres, un nettoyage de la surface permet d'activer ces fonctions et les surfaces en titane doivent au préalable subir une oxydation pour apporter des fonctions hydroxydes [KOK04].

A cause de ses faibles propriétés mécaniques, l'hydroxyapatite ne peut être implantée dans des zones de fortes contraintes. Pour pallier ce défaut, la fabrication de composites céramiques/polymères s'est largement développée. Afin d'améliorer la qualité de l'interface organique/inorganique et donc les propriétés mécaniques du composite, la silanisation de particules d'HA a été étudiée à l'aide de 3-aminopropyltriméthoxysilane (**APTMS**) [DUP96]. La

différence entre l'APTMS et l'APTES réside dans la composition du groupement R, il s'agit d'un méthyle pour le premier et d'un éthyle pour le second (Figure I-18). L'APTMS a également été greffé à la surface d'HA dans le but d'immobiliser ultérieurement des biomolécules [VAS08] ainsi qu'à la surface de substrat en silice poreuse [EK03]. La fonctionnalisation de surface par le greffage covalent d'APTMS à la surface d'HA, est également potentiellement intéressante pour l'absorption de métaux lourds dans le traitement des eaux [DAS06].

L. A. Chrisey et coll. [CHR96] ainsi que A. Rezaia et coll. [REZ99] ont utilisé une stratégie similaire à celle proposée par M. C. Durrieu et coll. pour immobiliser une séquence peptidique à la surface de *wafer* de silicium. L'étape de silanisation a été ici réalisée à l'aide de triméthoxysilylpropyldiéthylènetriamine (**DETA**) ou de *N*-(2-aminoéthyl)-3-aminopropyl-triméthoxysilane (**EDA**). Ces molécules ont une chaîne alkyle X plus longue que dans l'APTMS ou l'APTES, contenant une ou deux fonctions amine secondaire (Figure I-18).

Le greffage des organo-alkoxysilanes conduit à la création de fonction amine à la surface des substrats. Mais pour garantir l'intégrité de la biomolécule tout en assurant son greffage covalent, l'utilisation d'un agent de couplage est recommandée [DUR04].

I.4.2.d. Les agents de couplage

Parmi les biomolécules couramment employées dans les fonctionnalisations de surface figurent les peptides et les protéines. Une protéine est une macromolécule biologique composée d'une ou de plusieurs chaînes d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Les acides aminés possèdent un squelette carboné et au moins une fonction amine et une fonction acide carboxylique (Figure I-19). La liaison peptidique résulte de la réaction entre une fonction amine primaire (-NH₂) et carboxylique (-COOH). En général, une protéine contient plus de 50 acides aminés, pour des tailles plus petites la molécule est appelée peptide.

Les propriétés des protéines sont en relation directe avec leur structure tridimensionnelle. Un contact direct avec le substrat à fonctionnaliser peut interagir avec cette structure et donc altérer les propriétés des protéines. C'est pourquoi, afin de ne pas dénaturer la protéine, les études de biofonctionnalisation s'intéressent majoritairement au greffage de peptides. De plus, en ne travaillant qu'avec des peptides, seule la séquence peptidique pertinente vis-à-vis de l'application visée est sélectionnée.

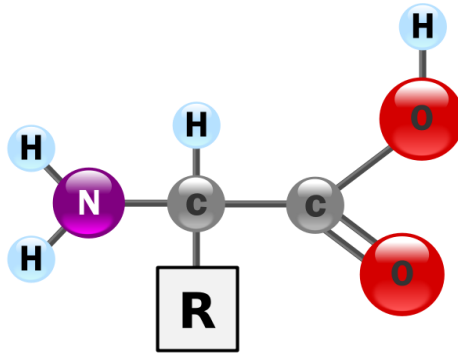


Figure I-19 : Structure commune à tous les acides aminés³

La liaison entre la molécule intermédiaire (organo-alkoxysilane par exemple) et les peptides étant complexe, elle nécessite le plus souvent le recours à un intermédiaire supplémentaire appelé « *cross-linker* » ou agent de couplage. Ces molécules, dont quelques exemples sont présentés à la Figure I-20, possèdent des fonctions chimiques adéquates pour lier les peptides de manière covalente au substrat ayant préalablement subi une silanisation.

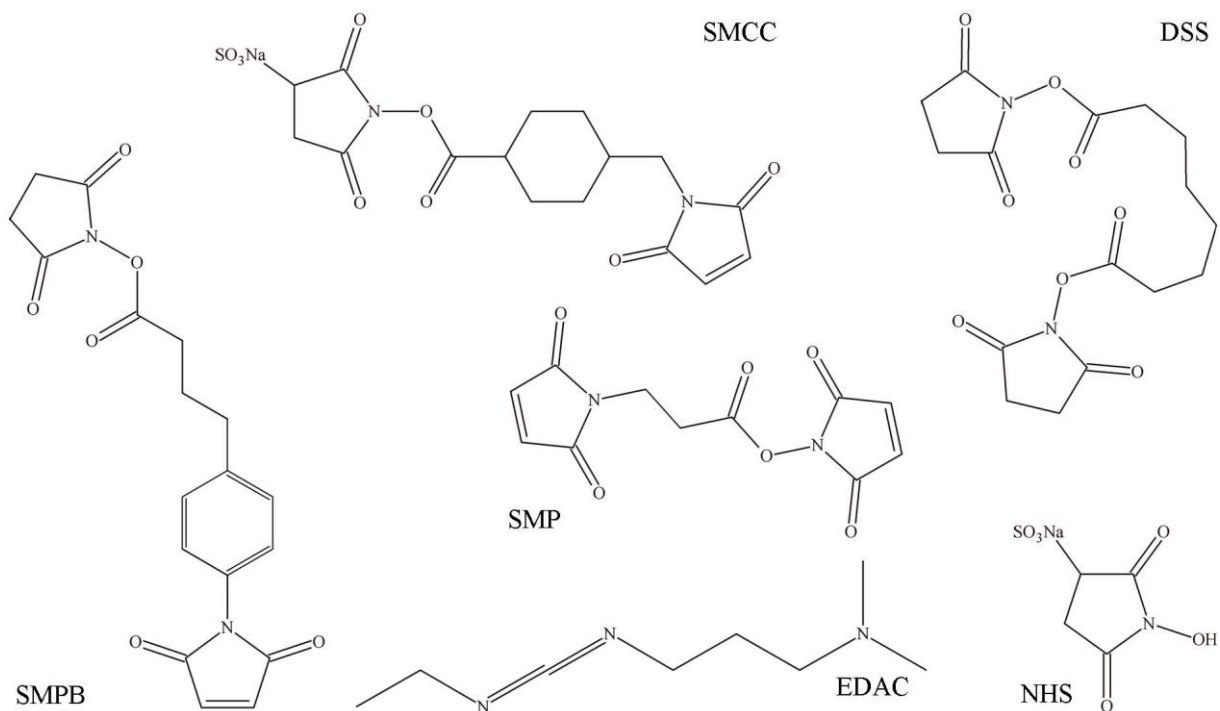


Figure I-20 : Exemples d'agents de couplage rencontrés pour l'immobilisation de protéines

Le greffage de peptides peut se faire *via* une liaison amide stable ($R-CO-NH-R_1$) par le biais de la réaction entre la fonction amine du peptide et une fonction carboxylique présente à la surface des matériaux traités. Les fonctions carboxyliques peuvent être apportées à la surface des matériaux grâce à un agent de couplage à base d'imide (un amide secondaire cyclique) tel

³ D'après http://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_aminé (site consulté le 10/08/2010)

que l'ester subérique bis-*N*-hydroxysuccinimide (**DSS**) [WAN08] ou un mélange de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (**EDAC**) et de sulfo-*N*-hydroxysuccinimide (**NHS**) [SCH09; CHI10] (Figure I-20). Plusieurs études tirent également profit de la fonction thiol (R-SH) présente dans la cystéine, un acide aminé localisé dans la plupart des protéines. Cette fonction thiol réagit avec la fonction alcène (>C=C<) apportée *via* le 3-Succinimidyl-3-MaléimidoPropionate (**SMP**) (Figure I-20) [XIA98; POR99; BAR04; DUR04; POR04-a; BAL06]. Les peptides possédant une fonction thiol peuvent également venir se greffer par le biais de sulfosuccinimidyl 4-(*N*-maleimidométhyl) cyclohexane-1-carboxylate (**SMCC**) [REZ99] ou de succinimidyl 4-(maleimidophényl)butyrate (**SMPB**) [CHR96] (Figure I-20).

Dans le but d'immobiliser une biomolécule, le traitement d'un substrat silanisé à l'aide d'un agent de couplage semble efficace [XIA02; CHE06]. Ces constatations motivent la poursuite des recherches et du développement de biomatériaux fonctionnalisés à l'aide de facteurs de croissance pouvant stimuler les processus de vascularisation, d'angiogénèse ou d'ostéogénèse.

Le procédé de fonctionnalisation de surface par silanisation est, actuellement, le plus couramment employé. Cependant, d'autres techniques ont été mises en œuvre dans le but d'améliorer les propriétés biologiques ou mécaniques des substituts osseux.

I.4.3. Autres procédés de fonctionnalisation de surface

D'autres voies de fonctionnalisation de surface d'hydroxyapatite, qui ont principalement pour objet l'amélioration des propriétés mécaniques de composites HA/polymère par modification de l'interface inorganique/organique, se sont développées. Des monomères, tels l'acide méthacrylique, l'acide 4-penténoïque ou l'acide vinyl phosphonique ont été ajoutés lors de la réaction de précipitation de l'HA en supposant que les groupements carboxylique viennent se substituer aux groupements phosphate [HAQ07]. De nombreuses études recensent également le greffage d'acide L-lactique (LA) sur les groupements hydroxyde à la surface de phosphate de calcium selon une réaction de déshydratation et conduisant à une liaison carboxylate avec le calcium (-Ca⁺ O-CO-) [HON04; QIU05-a; QIU05-b; XU07-c; YAN08; CUI09; NEJ09]. Parmi les autres monomères retrouvés dans la littérature, peuvent être cités l'isocyanate de 2-méthacryloyloxyéthylène [MAT03] et le 3-isocyanateméthyl-3,5,5-triméthylcyclohexylisocyanate [ZHA08] qui sont immobilisés à la surface de l'HA grâce à la présence

d'une fonction isocyanate ($-N=C=O$). Une fois la molécule greffée, une polymérisation peut être déclenchée à la surface de la céramique avec ou sans l'intermédiaire d'un catalyseur.

De nouvelles voies originales dans la fabrication de films bioactifs à la surface de biomatériaux sont apparues, inspirées de la technique Langmuir-Blodgett [BLO37]. Elles consistent à élaborer des films minces multicouches par adsorption alternative de polyanions et de polycations à la surface d'un substrat (Figure I-21) [DEC97]. Les polyélectrolytes les plus souvent rencontrés sont les acides hyaluronique, polyglutamique, polyaspartique, l'alginate, la polylysine ou le chitosan [SCH02]. Le film formé peut être fonctionnalisé en y incorporant des protéines ou des peptides [JES03; JES04; CHU08] sans que ces biomolécules ne perdent leur activité biologique [LEG07]. Cette technique d'assemblage couche par couche peut également être utilisée pour mimer la MEC en déposant des couches de sulfate de chondroïtine (CS), un glycosaminoglycane présent dans le tissu conjonctif, alternées avec des couches de collagène [LIU07] ou du facteur de croissance bFGF [MA07]. Y. Zhu et coll. rapportent également le dépôt successif de couches de poly(styrène sulfonate) de sodium et de chitosan pour améliorer la cytocompatibilité de l'acide poly(L-lactique) [ZHU03]. Afin de déposer la première couche de polyélectrolyte, un traitement préalable est souvent requis pour charger, positivement ou négativement, la surface du biomatériau. Une aminolyse de la surface suivie d'une acidification du milieu permet d'obtenir une charge de surface positive [ZHU03; MA07], une hydrolyse permet de la charger négativement [LIU07].

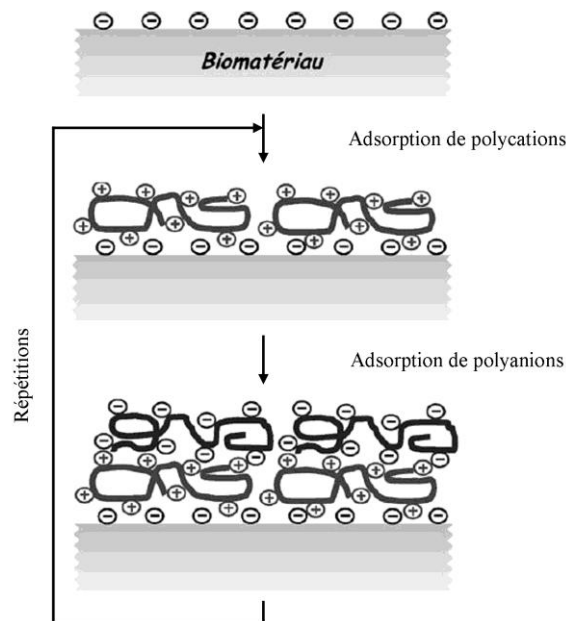


Figure I-21 : Principe de la méthode de modification de surface couche par couche, d'après [SCH02]

Afin d'assurer la biointégration d'implants métalliques une autre méthode consiste à réaliser des dépôts biomimétiques à leur surface [KOK96; DOR02; BAR03; CAM03; LIU09]. Ces dépôts proviennent principalement de la nucléation et de la croissance de phosphate de calcium à partir de solution sursaturées. Les implants métalliques n'étant pas intrinsèquement ostéoconducteurs, leur bioactivité est ainsi améliorée à l'aide de ces dépôts biomimétiques. De telles modifications de surface n'apportent pas directement de caractère ostéoinducteur aux matériaux. Cependant cette méthode est potentiellement intéressante pour biofonctionnaliser les matériaux. Des biomolécules ostéogéniques peuvent être ajoutées aux composants inorganiques du milieu sursaturé et ainsi coprécipiter ensemble à la surface du matériau [DOR02; LIU09]. Néanmoins, l'élaboration de tels dépôts reste longue.

I.5. Conclusion

Le tissu osseux peut être assimilé à un composite constitué d'un ensemble de cellules contenues dans une matrice extracellulaire essentiellement constituée de collagène de type I et d'apatite phosphocalcique lacunaire et mal cristallisée. Cet ensemble assure le maintien de l'appareil locomoteur. L'architecture particulière du tissu osseux renferme la réserve en cellules ostéoprogénitrices donnant naissance aux ostéoclastes et ostéoblastes. Ces cellules contribuent au remodelage osseux par des mécanismes simultanés de résorption du tissu osseux ancien et de synthèse de matrice osseuse nouvelle. De nombreuses protéines et facteurs de croissance gouvernent l'activité de ces cellules au cours du remodelage contribuant ainsi au maintien de la masse osseuse.

Pour combler un déficit osseux, les matériaux à base de phosphates de calcium sont largement employés comme substitut de par leur composition chimique proche du minéral osseux. Parmi eux, l'hydroxyapatite (HA) et le phosphate tricalcique β (β -TCP) sont biocompatibles et ostéoconducteurs. Ainsi, après implantation, ces céramiques supportent la repousse osseuse. Cependant, lorsqu'elles sont implantées en site extra osseux elles ne sont pas capables de générer une nouvelle matrice osseuse, elles ne sont pas ostéoinductrices. Afin d'améliorer les propriétés biologiques de ces matériaux, de nouvelles voies de recherches sont actuellement en cours de développement, notamment celle qui consiste à se rapprocher de la composition chimique de l'os en y incorporant des ions en substitution.

Parmi les éléments d'intérêt biologique, le silicium a fait l'objet de nombreuses études depuis les travaux de E. M. Carlisle [CAR70; CAR72]. D'après la littérature, il apparaît que le silicium peut s'incorporer dans les phosphates de calcium. Sa substitution dans l'hydroxyapatite ou le phosphate tricalcique α a été largement étudiée, les groupements de silicate venant se substituer à ceux de phosphate. Les essais *in vitro* de bioactivité ou de culture cellulaire ainsi que les tests *in vivo* sur ces matériaux indiquent une amélioration des propriétés biologiques (prolifération cellulaire, différenciation ostéoblastique, régénération osseuse...) par rapport aux matériaux non substitués. A ce jour, aucun travail ne traite de la substitution de silicium dans la variété β du phosphate tricalcique. Ce matériau possède pourtant l'intérêt d'être biorésorbable. Il apparaît alors intéressant d'étudier la possible incorporation du silicium dans le β -TCP.

Par ailleurs, de nouvelles techniques de fonctionnalisation de surface sont susceptibles de permettre une amélioration de la biointégration des implants. Parmi ces différentes méthodes,

le procédé de silanisation à l'aide d'organo-alkoxysilanes doit permettre d'immobiliser de manière covalente des peptides. Afin de stimuler le processus de repousse osseuse et ainsi apporter un caractère ostéoinducteur aux phosphates de calcium, les facteurs de croissance constituent des biomolécules de choix. De plus, la présence de groupements silicate apportés suite à l'incorporation de silicium dans l'hydroxyapatite permet d'envisager une fonctionnalisation de sa surface. En effet, la formation de liaison Si-O-Si inorganique/organique est facile à mettre en œuvre. Sur ces bases, il apparaît intéressant d'étudier la silanisation des phosphates de calcium.

Après avoir détaillé l'ensemble des techniques expérimentales utilisées, les résultats concernant la synthèse et l'élaboration de matériaux à base de phosphate tricalcique β et de silicium seront présentés au chapitre III. Afin d'évaluer l'influence du silicium sur le comportement biologique du phosphate tricalcique β , le chapitre IV est dédié aux essais réalisés en milieu cellulaire et acellulaire sur les matériaux élaborés. Enfin, le chapitre V est consacré à une étude préliminaire du greffage covalent d'organo-alkoxysilane à la surface de poudre d'hydroxyapatite silicatée.

Chapitre II

Techniques expérimentales

Chapitre II : Techniques expérimentales

Ce chapitre est consacré à la présentation des méthodes et des techniques expérimentales employées dans cette étude. Le procédé de synthèse des poudres et l'élaboration de matériaux denses de phosphates de calcium sont détaillés dans une première partie. Les moyens de caractérisation des poudres et des matériaux massifs mis en œuvre font l'objet d'une seconde partie. La troisième partie, quant à elle, est consacrée aux méthodes de caractérisation employées afin d'évaluer le comportement des matériaux en milieu acellulaire et cellulaire. Les essais de culture cellulaires, réalisés au Friedrich-Baur-Research Institute for Biomaterials à l'Université de Bayreuth (Allemagne) sous la responsabilité du Professeur Günter Ziegler et en collaboration avec Rainer Detsch et Ulrike Deisinger, y sont détaillés.

II.1. Élaboration des matériaux

II.1.1. Synthèse des poudres

La synthèse des poudres de phosphate de calcium se fait par précipitation en voie aqueuse. Elle consiste à ajouter, à débit contrôlé, une solution phosphatée contenant ou non un précurseur de silicium, à une solution de calcium, dans un réacteur à pH et température contrôlés. Après avoir présenté le montage et le protocole de synthèse, les paramètres des réactions de précipitation réalisées pour l'ensemble de l'étude seront détaillés.

II.1.1.a. Montage et protocole de synthèse

➤ Mise en solution des précurseurs

Les réactifs de départ, utilisés pour la synthèse des poudres, sont le nitrate de calcium tétrahydrate $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, pureté : 99 %), l'hydrogénophosphate de diammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Merck, pureté : 99 %) et le tétraacétate de silicium $\text{Si}(\text{OCOCH}_3)_4$ (Sigma Aldrich, pureté : 98 %). La mise en solution des précurseurs de calcium et de phosphate en milieu aqueux ne pose aucun problème. Celle du précurseur de silicium est plus complexe, sa dissolution en solution aqueuse est quasi impossible. Selon les travaux de thèse conduit par M. Palard [PAL07], une étape préliminaire est nécessaire pour réaliser une suspension de ce réactif. Elle consiste à broyer, dans une jarre en alumine de 250 mL, le mélange constitué d'eau et du réactif sous forme de poudre avec des billes de broyage également en alumine. La jarre est ensuite placée dans un broyeur mélangeur de type planétaire (Pulvérisette 6, Fritsch) pendant 1 mn à $150 \text{ tr} \cdot \text{mn}^{-1}$ afin de casser d'éventuels agglomérats et d'homogénéiser le mélange.

➤ Mode opératoire

Deux dispositifs ont été utilisés pour synthétiser les poudres, la différence majeure entre les deux montages étant le volume du réacteur. Le premier sera noté GR (pour « Grand Réacteur »), sa capacité est de 10 L. Le second, noté PR (pour « Petit Réacteur »), est équipé d'un réacteur de 2 L. Quel que soit le dispositif, les éléments et le principe du montage sont semblables au schéma représenté sur la Figure II-1.

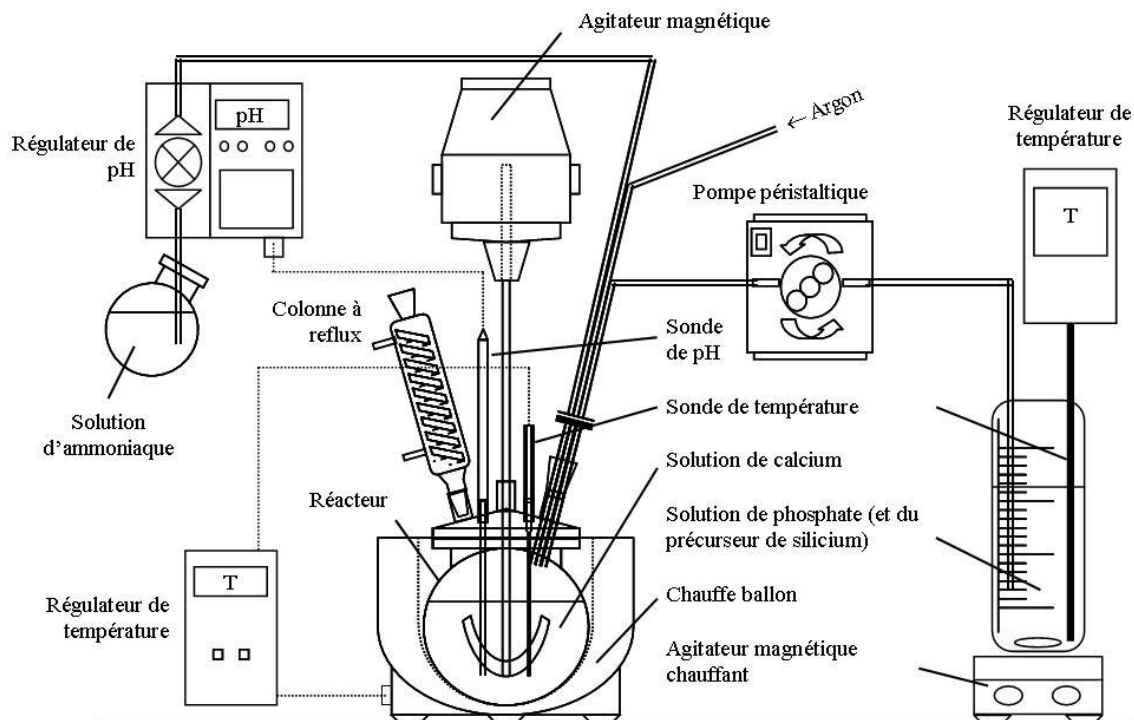


Figure II-1 : Schéma du montage PR de synthèse par précipitation en voie aqueuse

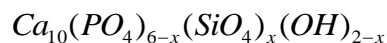
La solution de nitrate de calcium est introduite dans le réacteur, puis chauffée, agitée (GR : RZR 2102 Control, Heidolph; PR : RZR 2041 Heidolph) et maintenue à une température de consigne. Le contrôle de la température se fait à l'aide d'une sonde (Horst) plongeant dans la solution. Pour le montage GR, le réacteur est équipé d'une double paroi assurant la circulation d'une huile chauffée à la température désirée (Phoenix II, Thermo Scientific). Dans le montage PR, la température du réacteur est réglée à l'aide d'un chauffe ballon (Horst). Dans les deux dispositifs, une colonne à reflux permet la recondensation des gaz émis durant la synthèse. Le pH du milieu réactionnel doit être maintenu constant à sa valeur de consigne. Il est contrôlé par un régulateur de pH relié à une pompe doseuse (GR : Pompe gamma/L, ProMinent; PR : BL 7916, Hanna Instruments) permettant son ajustement par ajout automatique d'une solution d'ammoniaque NH_4OH à $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Merck). La solution contenant le précurseur de phosphate et celui de silicium (le cas échéant), placée dans un second réacteur, est également maintenue à une température de consigne *via* une plaque chauffante régulatrice munie d'une sonde de température (IKA Labortechnik). Afin d'éviter une éventuelle carbonatation des produits de synthèse, le réacteur est placé sous balayage d'argon. Lorsque les solutions de calcium et de phosphate ont atteint leur température de consigne, la solution de phosphate est introduite à débit contrôlé dans le réacteur principal à l'aide d'une pompe péristaltique (GR : Pumpdrive 5206, Heidolph; PR :

Pump Drive PD 5001, Heidolph). Après ajout complet, le mélange est maintenu sous agitation mécanique constante et balayage d'argon pendant un temps de maturation variant selon le produit synthétisé. Les régulations en température et en pH sont également maintenues durant cette période. A l'issue de la maturation, le précipité est récupéré par centrifugation (IEC CL40 Centrifuge, Thermo Scientific) à 500 g pendant 5 mn. Pour éliminer un maximum de résidus de synthèse, il est ensuite lavé deux fois à l'eau distillée. Le « gâteau » récolté est alors séché dans une étuve ventilée (Mettler) à 80°C pendant 24 h.

II.1.1.b. Paramètres de synthèse

Les synthèses de phosphate tricalcique β (β -TCP) sont principalement réalisées dans le réacteur GR, une étude complémentaire a été effectuée dans le réacteur PR. Un des objectifs du travail étant d'étudier la synthèse du phosphate tricalcique β contenant du silicium, les détails concernant les différents paramètres de ces synthèses seront précisés au paragraphe III.1 consacré à la synthèse de poudres à base de β -TCP et de silicium.

Les poudres d'hydroxyapatite (HA) et d'hydroxyapatite silicatée (SiHA) sont, quant à elles, toutes synthétisées dans le réacteur GR. La synthèse d'HA silicatée a déjà fait l'objet d'un précédent travail au sein du laboratoire SPCTS [PAL07]. Le précurseur de calcium est dissout dans 2,0 L d'eau distillée. Le précurseur de phosphate et éventuellement de silicium sont mis en solution dans un volume d'eau distillée de 1,5 L. Le nombre de mole d'hydrogénophosphate de diammonium et de tétraacétate de silicium ainsi que leurs concentrations sont définis par rapport à la concentration de la solution de calcium et en fonction de la composition souhaitée. Il s'agit de conserver un rapport molaire Ca/(P+Si) constant et égal à 10/6 comme dans le cas de l'hydroxyapatite purement phosphocalcique et sur la base de la formule chimique hypothétique suivante [GIB99] :



L'apatite silicatée a été synthétisée pour $x = 0,5$ mol, elle sera notée par la suite $Si_{0,5}HA$. Les quantités de réactifs employées pour synthétiser les poudres d'HA et de $Si_{0,5}HA$ sont précisées dans le Tableau II-1.

La température du milieu réactionnel est ici régulée à $90,0 \pm 1,0^\circ C$ tandis que la solution « phosphate + silicium » est maintenue à $70,0 \pm 1,0^\circ C$. Le pH du milieu réactionnel est fixé à $9,0 \pm 0,1$ et la vitesse d'addition des précurseurs de silicium et de phosphate est maintenue à $2,4 L \cdot h^{-1}$. Afin d'obtenir des composés monophasés, un temps de maturation de 60 mn est

appliqué dans le cas de la synthèse de HA et de 30 mn pour Si_{0,5}HA. De plus, toutes les poudres sont synthétisées en imposant un débit d'argon à 30 L·h⁻¹ et une vitesse d'agitation du milieu réactionnel à 150 rpm tout au long de la synthèse.

Tableau II-1 : Notation, quantité de réactifs (n), rapports molaires (Ca/P) et (Ca/(P+Si)) des réactifs, teneurs hypothétiques (x) et pourcentages massiques hypothétiques (%_m) de silicium.

Notation	n _{Si} (mol)	n _{Ca} (mol)	n _P (mol)	Ca/P réactifs	Ca/(P+Si) réactifs	x _{Si} (mol)	% _m Si
HA	0	2,560	1,536	1,667	1,667	0	0
Si _{0,50} HA	0,064	1,280	0,704	1,818	1,667	0,50	0,152

II.1.2. Densification des matériaux

II.1.2.a. Étude dilatométrique

Le frittage naturel des poudres est suivi sur un dilatomètre vertical informatisé (SETARAM TMA 92) par mesure de la variation d'épaisseur Δe des échantillons en fonction du cycle thermique. L'analyse est réalisée sur des poudres préalablement calcinées à 750°C pendant 30 mn. Des pastilles sont réalisées par pressage uniaxial sous une contrainte de 125 MPa dans un moule métallique de 10 mm de diamètre. Un taux de compaction en cru proche de 50 % est alors obtenu. Les essais sont exécutés sous balayage d'air à 20 mL·mn⁻¹. Le cycle thermique choisi monte jusqu'à 1300°C avec des rampes de montée et descente en température de 20°C·mn⁻¹. Un blanc est préalablement enregistré, afin de considérer les dilatations thermiques propres à l'appareillage. Ce blanc est défalqué des courbes brutes des échantillons pour obtenir les variations dimensionnelles de l'échantillon seul.

II.1.2.b. Frittage

Le frittage naturel d'échantillons pressés est effectué sous air dans un four de type Super Kanthal. Les rampes de montée et de descente en température sont fixées à 20°C·mn⁻¹. Les températures de frittage employées sont déduites des résultats de l'étude dilatométrique et seront précisées au cas par cas.

II.2. Caractérisation des matériaux

II.2.1. Caractérisation des poudres

II.2.1.a. Observation de la morphologie des poudres

La morphologie et la texture des poudres est mise en évidence par microscopie électronique à balayage (MEB). Deux appareillages sont utilisés : Hitachi S2500 et Philips XL30. Les poudres sont au préalable déposées sur un porte-échantillon recouvert d'une pastille de carbone avant d'être métallisés à l'or ou au platine.

II.2.1.b. Mesure de masse volumique

La masse volumique des poudres (ρ) est mesurée par pycnométrie à hélium à l'aide d'un appareillage Micromeritics AccuPyc 1330. Chaque valeur est établie à partir de 10 mesures successives.

II.2.1.c. Mesure de surface spécifique

La surface spécifique des poudres est déterminée par la méthode B.E.T. (Brunauer-Emmett-Teller) d'adsorption d'azote à huit points (Analyzer Micromeritics ASAP2010). Avant d'effectuer les mesures, la poudre subit un dégazage sous vide à 250°C pendant 12 h. Les valeurs de surface sont obtenues à partir de la mesure de l'isotherme d'adsorption du diazote N₂.

Le diamètre moyen des particules élémentaires supposées sphériques (Φ_{moyen}) peut être estimé à partir de la mesure de la surface spécifique (S_{BET}) et de la masse volumique de la poudre (ρ), selon l'Expression II-1 où Φ_{moyen} , S_{BET} et ρ sont exprimés respectivement en μm , $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ et $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$.

$$\phi_{moyen} = \frac{6}{\rho \cdot S_{BET}}$$

Expression II-1 : Loi de détermination de la taille des particules élémentaires

II.2.1.d. Analyse qualitative par diffraction des rayons X

L'analyse des phases cristallines présentes au sein des poudres est réalisée par Diffraction des Rayons X (DRX). Les diffractogrammes sont acquis avec la radiation K α du cuivre (CuK α 1,54056 Å) sur un diffractomètre $\theta/2\theta$ Siemens D5000. Les clichés de DRX sont enregistrés

dans l'intervalle [20-40°], en 2θ , avec un pas de $0,05^\circ$ et un temps de comptage de 4 s. Les phases en présence sont identifiées par comparaison avec les références du fichier *International Center for Diffraction Data – Powder Diffraction Files* (ICDD-PDF) sur le logiciel EVA (Brüker AXS). Le Tableau II-2 regroupe les numéros des fiches PDF d'intérêt ainsi que les composés correspondants.

Tableau II-2 : Fiches PDF de références pour l'indexation des différents composés

Formule chimique	Nom du composé	Abréviation	N° fiche PDF
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hydroxyapatite	HA	9 - 432
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Phosphate tricalcique α	α -TCP	9 - 348
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Phosphate tricalcique β	β -TCP	9 - 169
$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Pyrophosphate de calcium β	β -CPP	9 - 346

II.2.1.e. Affinement de paramètres de maille sur diffractogramme de rayons X

Pour l'analyse de structure, les diffractogrammes des poudres sont acquis sur l'appareillage $\theta/2\theta$ Siemens D5000, sur l'intervalle [10-130°], avec un pas de $0,015^\circ$ en 2θ et un temps de comptage de 5 s. L'affinement des paramètres de maille est réalisé par la méthode WPF (*Whole Pattern Fitting* ou méthode de Le Bail) à l'aide du logiciel FullProf Suite, version 1.10. Outre les paramètres propres au modèle cristallographique choisi, cette méthode permet d'affiner des paramètres plus spécifiques liés à l'instrumentation de diffraction comme la position de l'échantillon.

La qualité de l'affinement est évaluée à l'aide des facteurs de confiance suivants :

- R_p : résidu du spectre,
- R_{wp} : résidu pondéré du spectre, qui traduit la convergence de l'affinement,
- χ^2 : représente la somme des carrés des résidus et permet de juger de l'adéquation du modèle aux mesures expérimentales.

II.2.1.f. Spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier

Les spectres infrarouges (FT-IR) des poudres sont enregistrés en transmission à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier Perkin Elmer, Spectrum One. Les analyses sont réalisées dans la gamme de longueur d'onde allant de 4000 à 400 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} .

Pour réaliser le spectre FT-IR d'un échantillon pulvérulent, la poudre à analyser est mélangée à hauteur de 0,5 % massique à du KBr (IR grade) dans un mortier en agate. Une pastille de ce mélange est ensuite pressée dans un moule de 13 mm de diamètre.

Pour les échantillons liquides une goutte de l'échantillon à analyser est déposée, à l'aide d'une pipette Pasteur, entre deux fenêtres de KBr.

Préalablement à l'analyse d'un échantillon, un blanc est réalisé sur une pastille ne contenant que du KBr. Ce blanc est ensuite défalqué des spectres réalisés.

Afin de pouvoir comparer les spectres FT-IR des phosphates de calcium, une normalisation est nécessaire. Après une correction automatique de la ligne de base, chaque spectre est multiplié par un coefficient ramenant l'absorbance de la bande ν_4 PO₄, située à 602 cm⁻¹, à la valeur de un [REY89].

II.2.1.g. Spectroscopie de diffusion Raman

Les spectres Raman sont enregistrés dans le domaine 250 - 3750 cm⁻¹ sur un spectromètre T64000 de chez Horiba Jobin Yvon. Les spectres sont acquis avec un temps de pause de 30 s pour une longueur d'onde excitatrice de 514,532 nm (avec une puissance de 300 mW au niveau de l'échantillon), en mode triple soustractif (1800 traits·mm⁻¹). Préalablement à l'étude d'un échantillon, un étalon de silicium, dont le pic caractéristique est fixé à 521,6 cm⁻¹, est analysé pour calibrer les spectres en intensité et en énergie.

Afin de pouvoir comparer les spectres entre eux, ceux-ci sont moyennés, ce qui permet une normalisation sans parti pris sur le choix d'un pic particulier.

II.2.1.h. Analyse thermique

Le comportement thermique des poudres a été suivi par thermogravimétrie (TG), analyse thermique différentiel (ATD) et spectroscopie de masse (SM). Deux appareillages différents sont employés suivant l'information recherchée et la nature de l'échantillon étudié.

L'appareillage SDT 2960 Simultaneous DSC-TGA, TA Instruments, qui enregistre simultanément le signal TG et ATD, est utilisé pour la caractérisation de routine des phosphates de calcium. Dans ce cas, la vitesse de montée et de descente en température est fixée à 20°C·mn⁻¹ et les analyses sont paramétrées jusqu'à 1400°C

Pour analyser les poudres issues du greffage, l'instrument LABSYS evo, Setaram équipé du dispositif TG est utilisé. Les creusets disponibles pour ce dispositif sont de 500 µL ce qui permet de réaliser une analyse fine de l'évolution thermogravimétrique des échantillons avec

une précision de 0,2 µg. Les gaz émis par les poudres lors du traitement thermique sont analysés à l'aide d'un spectromètre de masse à quadrupole (Pfeiffer Vacuum Thermostar) couplé à l'appareil LABSYS evo. L'argon en balayage à 100 mL·mn⁻¹ est utilisé comme atmosphère du four et gaz vecteur afin d'acheminer les gaz émis vers le spectromètre de masse. La vitesse de chauffe est fixée à 5°C·mn⁻¹ jusqu'à 1000°C avant une descente en température à 5°C·mn⁻¹.

Toutes les analyses sont réalisées en atmosphère neutre sous flux d'argon. Les expériences sont effectuées dans des creusets en platine ou en alumine suivant la nature de l'échantillon et les masses de poudres analysées sont adaptées aux volumes des creusets. Avant chaque analyse, un blanc est réalisé avec le creuset contenant une masse de poudre d'alumine inerte équivalente à la masse de poudre analysée pour se prémunir des effets de l'appareillage et de la poussée d'Archimède. Ce blanc est ensuite défalqué des analyses TG des échantillons.

Par principe, la spectrométrie de masse permet de faire la distinction entre deux produits même si ces derniers répondent à des masses moléculaires identiques. Leur différenciation se fait alors soit par un suivi des masses isotopiques (ex : ¹⁶O à M = 16 et ¹⁸O à M = 18), soit par un suivi des masses des sous-espèces (ou fragments) créées lors du bombardement électronique (ex : CO à M = 28 fragments de CO₂ à M = 44). Le Tableau II-3 regroupe les masses suivies lors des analyses et la nature des espèces susceptibles d'y être associées.

Tableau II-3 : Masses moléculaires et espèces chimiques associées suivies par SM

Masses	Espèces chimiques	Masses	Espèces chimiques
12	C, CO, CO ₂	30	NO, NO ₂ , N ₂ O, CH ₃ NH ₂
14	N, N ₂ , NO, NO ₂ , N ₂ O, NH ₃ ...	31	CH ₃ -NH ₂ , C ₂ H ₅ OH
16	O, O ₂ , CO, CO ₂ , H ₂ O, N ₂ O, CH ₄ , SiO...	32	N, ¹⁸ O, O ₂
17	NH ₃ , H ₂ O	44	CO ₂ , N ₂ O, SiO, C ₃ H ₈
18	H ₂ O, ¹⁸ O, NH ₃	45	¹³ CO ₂ , C ₂ H ₅ OH
28	CO, N ₂ , CO ₂ , N ₂ O, SiO, CH ₃ NH ₂	46	NO ₂ , CO, ¹⁸ O, C ₂ H ₅ OH

II.2.1.i. Analyse élémentaire du carbone

Le taux de carbone contenu dans les poudres (exprimé en pourcentage massique de carbone) est déterminé par analyse élémentaire à l'aide d'un appareillage EMIA-V 320 V, HORIBA. De 0,5 à 2,0 g de poudre sont chauffés par induction en présence de fondants (un mélange de fer, de cuivre et d'étain) dans des creusets en alumine, à haute température (T > 2500°C) et sous un flux constant d'oxygène. Le carbone contenu dans les échantillons est sublimé et

transformé en dioxyde de carbone CO₂ et en monoxyde de carbone CO. Ces deux gaz sont ensuite dosés par spectroscopie d'absorption infrarouge. Des analyses sans poudre, appelées blancs, et des mesures avec des étalons (4,180 % et 0,044 % massique de carbone) sont réalisées pour tracer une droite d'étalonnage qui permet de déterminer le pourcentage massique de carbone dans le domaine étudié.

II.2.1.j. Analyse chimique par ICP/AES

L'analyse chimique élémentaire d'un échantillon pulvérulent est réalisée par ICP/AES (*Inductively Coupled Plasma/Atomic Emission Spectroscopy*) et nécessite une mise en solution préalable de la poudre. L'échantillon sous forme liquide peut ainsi être analysé par spectrométrie d'émission atomique couplée à un plasma induit.

➤ Mise en solution par micro-onde

Une masse précise de poudre sèche (80 mg au maximum) est placée dans un réacteur en téflon dans lequel différents acides concentrés sont versés. La masse de poudre est ajustée de telle sorte que la concentration des éléments à doser soit comprise entre 30 et 80 mg·L⁻¹ pour le calcium et le phosphore et supérieure à 1,5 mg·L⁻¹ pour le silicium. Pour la mise en solution des éléments calcium et phosphore, 4 mL d'acide nitrique HNO₃ à 15 mol·L⁻¹ sont employés et le silicium est dissout à l'aide de 10 mL d'acide fluorhydrique HF à 3 mol·L⁻¹. Après ajout des acides, les réacteurs sont placés dans un dispositif micro-ondes (CEM, MARS 5). Les mélanges sont alors soumis à une montée en température et en pression jusqu'à 180°C et 3 MPa et restent dans ces conditions pendant 20 mn. La descente en pression et en température n'est pas contrôlée.

➤ Analyse chimique

Les analyses chimiques élémentaires sont réalisées à l'aide d'un appareillage Thermo-Opteck de modèle Iris. L'échantillon à doser est pompé puis nébulisé afin d'obtenir un aérosol. Cet aérosol est transporté jusqu'au plasma où il est vaporisé, atomisé, excité et/ou ionisé. Des solutions étalons (0 et 40 mg·L⁻¹ de chaque élément) sont préalablement analysées pour tracer une droite d'étalonnage. Au cours de l'analyse des échantillons, une solution étalon à 20 mg·L⁻¹ en calcium, en phosphore et en silicium est régulièrement analysée afin de contrôler qu'il n'y a pas de dérive du signal.

II.2.2. Caractérisation des produits frittés

II.2.2.a. Analyse structurale

➤ Diffraction des rayons X

L'analyse structurale des produits frittés est réalisée par DRX sur l'appareillage Siemens D5000 en utilisant les mêmes paramètres d'acquisition que pour les matériaux pulvérulents (cf. paragraphe II.2.1.d)

➤ Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

L'analyse par FT-IR de matériaux massif a été réalisée sur un appareillage Perkin Elmer (Spectrum One) à l'aide d'un dispositif de réflexion totale atténuée (ATR pour *Attenuated Total Reflexion*). L'échantillon est directement placé sur le pointeau en diamant de la cellule ATR et l'acquisition est réalisée entre 400 et 4000 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} .

II.2.2.b. Mesure de densité

La densité des pastilles frittées (d_{Archi}) est déterminée par la méthode d'Archimède dans de l'eau distillée. Cette méthode consiste à réaliser deux pesées de l'échantillon, l'une à l'air ($m_{sèche}$) et la seconde plongée dans l'eau (m_{hydro}). Les densités sont alors calculées à partir de l'Expression II-2a. Le taux de densification d'un échantillon (τ) peut être déduit de la densité (d_{Archi}) et de la mesure de la masse volumique des poudres calcinées à 1000°C pendant 15 h (ρ) selon l'Expression II-2b.

$$(a) \quad d_{Archi} = \frac{m_{sèche}}{m_{sèche} - m_{hydro}}$$

$$(b) \quad \tau(\%) = \frac{d_{Archi}}{\rho} \cdot 100$$

Expression II-2 : Détermination, par la poussée d'Archimède, du taux de densification des échantillons frittés

II.2.2.c. Mesure de rugosité

Les matériaux frittés sont polis façon miroir à l'aide de papier en carbure de silicium possédant un grain de 6,4 μm . Ils sont ensuite nettoyés pendant 10 mn à l'aide des ultrasons dans de l'éthanol pour éliminer les résidus du polissage. La rugosité de la surface des

échantillons est déterminée sur un profil de 1 mm de longueur à l'aide d'un rugosimètre SJ-201P, Mitutoyo. La rugosité moyenne (R_a) est obtenue à partir de 10 mesures.

II.2.2.d. Analyse microstructurale

La microstructure des matériaux frittés est observée par MEB (Philips XL30). Afin de révéler les joints de grains, un gravage thermique de 6 mn à une température inférieure de 20°C à la température de frittage est réalisé sur le matériau préalablement poli. La taille des grains est déterminée par analyse d'images à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corp., Etats-Unis).

Le traitement des images nécessite un nombre important de traitements qui se décompose en plusieurs grandes étapes : renforcement des contours, amélioration du contraste et de la luminosité, seuillage, binarisation et squelettisation. Plusieurs micrographies sont analysées pour un même échantillon afin de prendre en compte les éventuelles hétérogénéités de la microstructure. Une fois les images analysées, les valeurs de taille de grains sont fournies en Diamètre Cercle Equivalent (DCE) qui représente le diamètre du disque ayant la même surface que le grain. Ce résultat n'est, en toute rigueur, interprétable que si les grains sont de forme équiaxe. Les valeurs de taille des grains sont également présentées sous forme de classes donnant accès à la répartition granulométrique des échantillons.

II.2.2.e. Microscopie électronique à transmission

Les échantillons frittés sont observés au Microscope Electronique à Transmission (MET). La préparation des échantillons pour l'observation passe par un polissage mécanique jusqu'à une épaisseur de 50 μm avant de réaliser une cuvette (dimpler Gatan) réduisant l'épaisseur à 30 μm . Des lames de 3 mm de diamètre sont alors carottées dans ces sections, puis amincies ioniquement sous une tension d'accélération de 5 kV et un courant d'émission de 10 μA (PIPS Gatan). Les préparations, recouvertes d'une fine pellicule conductrice de carbone, sont ensuite examinées au moyen d'un appareillage JEOL 2010 (200 kV). Le microscope est de plus équipé d'un spectromètre à dispersion d'énergie (EDS pour *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) permettant de réaliser une analyse chimique des échantillons observés (Princeton Gamma-Tech).

II.2.2.f. Spectroscopie de photoélectrons X

L'analyse chimique de la surface des échantillons frittés est réalisée par Spectroscopie de Photoélectrons X (XPS pour *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) sur un appareillage Axis

Ultra DLD spectrometer (Kratos Analytical Ltd). Cette technique exploite l'effet photoélectrique. L'XPS est basée sur la mesure de l'énergie cinétique des photoélectrons éjectés de l'échantillon sous l'impact de rayons X d'énergie $h\nu$ connue et de l'ordre du keV. Le spectre en énergie des photoélectrons éjectés comporte des raies dont l'interprétation permet une analyse chimique de l'échantillon. Les acquisitions sont réalisées à l'aide de la radiation monochromatique K_{α} de l'aluminium (1486,6 eV). Les spectres de photoélectrons sont calibrés en utilisant le pic de photoélectron C 1s de contamination détecté à 285,0 eV.

Après correction du bruit de fond par la méthode de Shirley, la déconvolution des spectres est réalisée à l'aide du logiciel Vision (Kratos) et la composition atomique des échantillons est calculée à l'aide des coefficients de Scofield [SCO76].

II.3. Étude des céramiques en milieu acellulaire et cellulaire

II.3.1. Étude des transformations chimiques de surface en milieu SBF

II.3.1.a. Préparation de la solution SBF

La solution *Simulated Body Fluid* (SBF) utilisée pour cette étude est le c-SBF défini par Kokubo [KOK91]. Un volume de 500 mL d'eau distillée, placé dans une fiole de 1 L, est chauffé à 37°C sous agitation magnétique *via* une plaque chauffante régulatrice équipée d'une sonde de température (IKA Labortechnik). Une quantité précise des réactifs présentés dans le Tableau II-4 est ensuite ajoutée dans l'ordre suivant : chlorure de sodium (NaCl), hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO₃), chlorure de potassium (KCl), phosphate de dipotassium trihydrate (K₂HPO₄·3H₂O), chlorure de magnésium hexahydrate (MgCl₂·6H₂O), acide chlorhydrique à 1 mol·L⁻¹ (HCl), chlorure de calcium (CaCl₂), sulfate de sodium (Na₂SO₄), et Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane (NH₂C(CH₂OH)₃ ou TRIS). Tous ces réactifs proviennent de la société Merck. La dissolution totale d'un sel est attendue avant d'ajouter le sel suivant. Une fois tous les sels dissous, le pH de la solution est ajusté, si nécessaire, à la valeur de 7,40 à l'aide de HCl ou de NH₂C(CH₂OH)₃ (TRIS). De l'eau distillée est ensuite ajoutée pour compléter la fiole à un volume de 1 L. La solution est alors filtrée sur une membrane Millipore de 0,22 µm, pour éliminer les éventuelles bactéries, avant d'être transférée dans un flacon en plastique et conservée à 5°C.

Tableau II-4 : Ordre d'addition et quantités de réactifs pour la préparation de la solution c-SBF [KOK91]

Ordre	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Réactif	NaCl	NaHCO ₃	KCl	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	MgCl ₂ ·6H ₂ O	HCl 1N	CaCl ₂	Na ₂ SO ₄	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃
Quantité	7,996 g	0,350 g	0,224 g	0,228 g	0,305 g	40 mL	0,278 g	0,071 g	6,057 g

II.3.1.b. Protocole expérimental d'immersion

Le volume de solution SBF (V_{SBF}) à ajouter dépend de la surface apparente (S_a) des échantillons selon l'Expression II-3 [KOK06]. La surface apparente des pastilles denses de l'étude étant de l'ordre de 450 mm² (15 mm de diamètre, 2 mm d'épaisseur), le volume de solution SBF nécessaire pour réaliser les essais de bioactivité est de 45 mL. L'immersion des échantillons se fait dans des flacons en polyéthylène de 50 mL avec bouchon. Pour respecter les recommandations de T. Kokubo et coll. [KOK06], les pastilles sont maintenues à la

verticale, au fond des flacons (Figure II-2) à l'aide de fils inertes en platine en forme de ressort. Les flacons sont ensuite placés dans une étuve réglée à 37°C (Modèle Vötsch industrietechnik VC 0018) pendant les temps d'immersion suivants : 8h, 1 jour, 3 jours, 7 jours et 14 jours. A l'issue de ces différentes immersions, les pastilles sont trempées quelques secondes dans de l'acétone pour stopper l'action du SBF puis mises à sécher à l'air libre. Les solutions SBF après immersion des échantillons sont récoltées et conservées à 5°C.

$$V_{SBF} = \frac{S_a}{10}$$

Expression II-3 : Relation entre surface apparente (S_A) des échantillons et volume de solution SBF (V_{SBF}) nécessaire

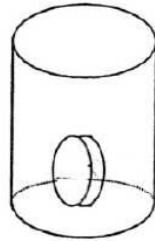


Figure II-2 : Disposition de la pastille dans la solution SBF [KOK06]

II.3.1.c. Caractérisation des transformations chimiques de surface

A l'issue de l'immersion en milieu SBF, la surface des pastilles est analysée par diffraction des rayons X et par spectroscopie infrarouge en mode ATR. La surface des pastilles est également observée par microscopie électronique à balayage. Le pH des solutions SBF récoltées après immersion est mesuré à l'aide d'une sonde pH (Malvern). Les éléments calcium, phosphore et silicium présents dans la solution SBF sont dosés par ICP/AES. Un blanc, constitué de la solution SBF avant immersion, est préalablement analysé et sert de référence.

Les essais présentés dans la suite de ce chapitre (étude de la dégradation des matériaux et culture cellulaire) ont été réalisés au laboratoire Friedrich-Baur-Research Institute for Biomaterials à l'Université de Bayreuth en Allemagne, sous la responsabilité du Professeur Günter Ziegler et en collaboration avec Rainer Detsch et Ulrike Deisinger.

II.3.2. Étude de la dégradation des matériaux

Ce test permet d'avoir une information sur la solubilité d'un matériau. La dégradation des phosphates de calcium est évaluée par des mesures de concentrations en ions calcium et phosphate libérés par le matériau en présence d'une solution proche du liquide physiologique.

II.3.2.a. Protocole expérimental

Pour chaque matériau étudié, quatre pastilles sont testées. La solution de dégradation est composée de NaCl (Sigma Aldrich) en concentration physiologique (0,9 m.%) et de Trishydroxyméthylaminométhane (TRIS, Fluka BioChemika) dans des proportions volumiques 2:1 (NaCl:TRIS). Le TRIS est utilisé comme tampon en biochimie, pour travailler avec un pH variant entre 6,5 et 9,7. Le mélange est filtré sous hotte sur une membrane Millipore de 0,22 μm avec une seringue stérile. Placés au fond de puits de cultures (TPP, VWR), les échantillons sont recouverts de 1 mL de la solution de dégradation puis placés dans un incubateur régulé à 37°C (HeraCell, Heraeus) pendant quatre semaines. Durant l'incubation, le milieu est prélevé et renouvelé aux temps suivants : 3, 5, 7, 10, 12, 14, 21 et 28 jours. Chaque solution prélevée est congelée en attendant d'en mesurer les concentrations en calcium et en phosphate par spectroscopie UV.

II.3.2.b. Dosage de la concentration en ions calcium

➤ Principe du dosage

La méthode utilisée ici est basée sur la méthode de la crésolphthaléine complexone (CPC) de W. R. Moorehead et coll. [MOO74]. La CPC réagit avec le calcium et le magnésium dans une solution alcaline pour former une couleur pourpre qui absorbe la lumière dans la gamme 540-600 nm. De la 8-hydroxyquinoline est ajoutée au réactif pour lier préférentiellement le magnésium et ainsi empêcher une interférence avec ce cation.

➤ Protocole du dosage

Une droite d'étalonnage est obtenue à partir de solutions étalons de concentration en ion calcium croissante (0,02, 0,04, 0,06, 0,08 et 0,10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et préparées à l'aide de carbonate de calcium (Sigma Aldrich, pureté : 99 %). Elles permettent de tracer une droite d'étalonnage. Dans une cuve en plastique dédiée à la spectroscopie UV, 10 μL de solution étalon sont introduits auxquels sont ajoutés 1 mL d'eau distillée, 1 mL du réactif CPC et 1 mL d'une solution tampon basique de diéthylamine (Merck Schuchardt). Le réactif CPC est une solution

de 8-hydroxyquinoline à $17,22 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Fluka Chemika) et de crésolphthaléine complexone à $0,06 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Fluka Chemika). Pour les échantillons à analyser, $25 \text{ }\mu\text{L}$ de solution à tester sont mélangés dans une cuve avec $975 \text{ }\mu\text{L}$ d'eau distillée, 1 mL de réactif CPC et 1 mL de la solution tampon basique de diéthylamine. Au bout de 5 mn de réaction, l'absorbance des mélanges est mesurée à 575 nm à l'aide d'un spectrophotomètre DU640, Belckman Coulter et les concentrations en calcium sont déduites de la droite d'étalonnage.

II.3.2.c. Dosage de la concentration en ions phosphate

➤ Principe du dosage

Ce dosage repose sur la méthode décrite par Fiske et Subbarow [FIS25]. A pH acide le phosphate inorganique réagit avec le molybdate d'ammonium pour former un complexe ammonium phosphomolybdate $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$. En présence d'un réducteur organique ce dernier se transforme en chromophore bleu d'hétéropolymolybdénum stable, qui absorbe la lumière à 340 nm .

➤ Protocole du dosage

Les solutions standards, de concentration en ions phosphate $0,95$, $1,90$, $3,80$, $5,70$ et $7,60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sont préparées à l'aide de dihydrogénophosphate de potassium (Sigma Aldrich, pureté : 99%) pour réaliser une droite d'étalonnage. Dans une cuve en plastique de spectroscopie UV, $100 \text{ }\mu\text{L}$ d'acide sulfurique à $2,5 \text{ M}$ sont introduits auxquels sont ajoutés, $25 \text{ }\mu\text{L}$ de la solution à analyser (solution étalon ou échantillon de dégradation), $100 \text{ }\mu\text{L}$ de molybdate d'ammonium à $2,5 \%$ (Fluka Chemika), $10 \text{ }\mu\text{L}$ de solution réductrice composée d'acide 1-amino-2-naphtol-4-sulfonique à $1,72 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Fluka Chemika) et $775 \text{ }\mu\text{L}$ d'eau distillée. Au bout de 10 mn de réaction, l'absorbance est mesurée à 340 nm et les concentrations en phosphate sont déduites de la droite d'étalonnage.

II.3.3. Techniques de culture cellulaire

La suite de chapitre décrit les essais réalisés en milieu cellulaire. Ce paragraphe II.3.3 est consacré à la présentation des différentes lignées cellulaires ainsi que des techniques de culture cellulaire communes à tous les essais réalisés : préparation des échantillons, culture et ensemencement des cellules, observation de la morphologie des cellules, utilisation d'un témoin et test statistique.

II.3.3.a. Préparation des échantillons

Préalablement à la culture cellulaire, les échantillons polis sont nettoyés aux ultrasons en les immergeant dans une solution d'Extran (Merck), qui est un agent nettoyant, puis de dodécylsulfate de sodium (SDS, Sigma), un détergent. Les matériaux sont ensuite stérilisés à 134°C pendant 20 mn dans un autoclave Systec et conservés dans une étuve avant leur utilisation.

II.3.3.b. Cellules utilisées pour l'étude

➤ Cellules MC3T3-E1

La lignée cellulaire MC3T3-E1 (*Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur* DSMZ, Allemagne) est une lignée de cellules ostéoblastiques issues du calvaria de rat, 3T3 correspondant au type de souris et E1 représentant l'état de clonage. Ces cellules ont été choisies pour évaluer la cytotoxicité des matériaux car elles présentent la particularité d'être très sensibles aux signaux toxiques [SUD83; SIM05].

Ces cellules sont cultivées dans un milieu essentiel minimum alpha modifié (α MEM, Gibco) contenant des sels minéraux et des acides aminés, notamment de la glutamine, des vitamines et du glucose. Les sels minéraux permettent de maintenir la pression osmotique des cellules de telle sorte que l'osmolarité du milieu soit celle du sérum physiologique ($9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl). Les acides aminés constituent une source d'azote et assurent la synthèse protéique. Le milieu de culture utilisé ici est particulièrement riche en glutamine car cet acide aminé essentiel a tendance à se désaminer spontanément à 37°C. Le glucose constitue une source d'énergie et de carbone pour les cellules. Ce milieu de base est complété avec 10 vol.% de sérum de veau fœtal (FBS, Sigma Aldrich) et 1 vol.% d'antibiotique pénicilline/streptomycine (PS, Sigma Aldrich). Le FBS est un sérum issu des fœtus de veau, il contient des facteurs de croissance et des vitamines nécessaires à la survie et la prolifération des cellules.

➤ Cellules ST-2

Les cellules ST-2 (DSMZ, Allemagne) sont issues d'une lignée de cellules souches stromales isolées de la moelle osseuse de souris BC8 [BIA01]. Elles sontensemencées sur les matériaux pour étudier la différenciation ostéoblastique.

Les cellules ST-2 sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Gibco) complété de 10 vol.% de FBS (Sigma Aldrich), 1 vol.% de PS (Sigma Aldrich) et 1 vol.% de GlutaMAXTM (Gibco). Le

GlutaMAX™ est une forme de glutamine stabilisée qui résiste mieux à la dégradation dans le temps. Pour stimuler l'ostéogénèse et induire la différenciation ostéoblastique, sont ajoutés dans le milieu de culture 50 µg·mL⁻¹ d'acide ascorbique (Sigma Aldrich), 100 nM de dexaméthasone (Sigma Aldrich) et 10 mM de β-glycerophosphate (Sigma Aldrich) [OTS99].

➤ Cellules SaOs-2

Les cellules SaOs-2 (DSMZ, Allemagne), dérivées d'un ostéosarcome humain, appartiennent à la lignée des cellules ostéoblastiques. Elles ont la capacité de produire une matrice extracellulaire collagénique [MCQ95] et supportent les étapes de prolifération, différenciation et minéralisation nécessaires pour la formation osseuse [HAU04]. Elles sont utilisées pour étudier le comportement des échantillons vis-à-vis du processus de biominéralisation.

Les cellules SaOs-2 sont cultivées dans un milieu McCoy's 5A + GlutaMAX™ (Gibco). Ce milieu est complété par 15 vol.% de FBS (Sigma Aldrich) et 1 vol.% de PS (Sigma Aldrich). À ce mélange sont ajoutés 10 mM de β-glycérophosphate (Sigma Aldrich) nécessaire pour induire la minéralisation [MCQ95]. Avant utilisation, le milieu final est filtré sur une membrane Millipore de 0,22 µm.

II.3.3.c. Culture et ensemencement des cellules

Les manipulations ont lieu dans une salle de culture cellulaire sous un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM). Le matériel plastique utilisé est stérile et à usage unique. Tout le matériel disposé sous la hotte (pinces, bouteilles... etc.) est préalablement nettoyé à l'éthanol pour le décontaminer.

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de cultures de 75 cm² (Nunc) munies d'un bouchon assurant l'entrée et la sortie des gaz. Elles permettent l'étalement du milieu de culture sur une grande surface sur laquelle les cellules se multiplieront sous le milieu de culture. Les cellules sont cultivées dans une étuve à atmosphère contrôlée : 37°C, 95 % d'humidité et 5 % de CO₂. L'entretien des cultures débute avant que les cellules atteignent la confluence (point où toutes les cellules entrent en contact les unes avec les autres). Après les avoir rincées avec du tampon phosphate salin (PBS, Biochrom AG), elles sont détachées de leur support à l'aide d'un mélange trypsine-EDTA (Sigma Aldrich). L'EDTA chélate les ions calcium servant à la fixation des cellules au support. Après un temps d'incubation de 2 mn environ à l'étuve à 37°C, l'action de la trypsine est bloquée en ajoutant 20 mL de milieu complet. En effet, le sérum de veau fœtal du milieu complet contient des inhibiteurs de cette enzyme.

Un comptage de cellules est alors réalisé sur un échantillon de 1 mL à l'aide d'un appareillage Particule Count and Size Analyzer (Beckman Coulter GmbH). En fonction du résultat, une quantité précise du mélange est centrifugée pendant 5 mn à 250 g (Biofuge Startos, Heraeus) afin d'obtenir une suspension à $100\ 000\ \text{cellules}\cdot\text{mL}^{-1}$. Le culot est repris par le milieu complet et les cellules sont remises en culture dans de nouvelles boîtes. Le milieu de culture est renouvelé de cette manière tous les 2 jours. Lorsque les cellules sont prêtes pour l'ensemencement, les pastilles de phosphate de calcium sont disposées dans des boîtes de pétri de 24 puits de 16 mm de diamètre (TPP, VWR). Chaque pastille est alorsensemencée avec un volume de 1 mL de milieu de culture préparé à une concentration de 100 000 cellules par millilitre.

La cytotoxicité des matériaux est évaluée au bout de 48 h d'incubation des cellules MC3T3-E1. Les analyses de différenciation ostéogénique et de minéralisation sont réalisées au bout d'un temps d'incubation de 14 jours des cellules ST-2 et SaOs-2 respectivement. Durant cette période d'incubation, tous les 2 à 3 jours, le milieu de culture est renouvelé.

II.3.3.d. Observation de la morphologie des cellules

La morphologie des cellules à la fin de la période de culture est observée par MEB. Il est nécessaire au préalable de fixer les cellules à la surface des échantillons ce qui demande une préparation spécifique.

A l'issue de la période de culture sur les matériaux, les cellules sont nettoyées au PBS puis deux solutions fixantes sont ajoutées dans les puits pendant 1 h chacune. La première est une solution de paraformaldéhyde (3 vol.%) et de glutaraldéhyde (3 vol.%) permettant de fixer les cellules (Sigma Aldrich) et la seconde est composée de cacodylate de sodium à 0,2 M utilisé comme agent tampon (Sigma Aldrich). Les échantillons sont ensuite déshydratés par immersions successives, pendant 20 mn, dans des bains d'acétone de concentration croissante (de 30 vol.% à 100 vol.%). Ils subissent alors un séchage hypercritique pour conserver la morphologie des cellules. Cette technique consiste à placer l'échantillon au-delà du point critique C du liquide présent dans les pores. D'après le diagramme pression, température (P, T) au dessus de ce point C il n'existe pas d'interface entre le liquide et sa vapeur, les tensions capillaires sont alors évitées. A l'issue de cette étape, les échantillons sont recouverts d'une couche de carbone et d'une couche d'or (pulvérisateurs Cressington) avant de les observer au MEB (Quanta 200, FEI). Les images MEB présentées sont représentatives de l'ensemble des observations réalisées.

II.3.3.e. Utilisation de témoin

Pour les observations microscopiques, des pastilles de Thermanox[®] (Nunc) sont utilisées comme témoins. Ces disques en polyéthylène téréphtalate (PET) sont traités sur une face pour optimiser l'attachement et la croissance cellulaire.

Pour les analyses quantitatives, le témoin correspond à un puit de culture sans échantillon et sera appelé référence (REF). Le fond des puits de culture est également spécifiquement traité pour la culture cellulaire.

Ces témoins suivent au cours de l'étude les mêmes traitements que les échantillons.

II.3.3.f. Test statistique

Les résultats présentés correspondent à la moyenne de plusieurs mesures \pm l'écart-type. Le nombre d'échantillons testés ainsi que le nombre de mesures réalisées par échantillons sont précisés au cas par cas. Les résultats sont enfin normalisés par rapport à la référence (Réf. = 100 %).

Pour évaluer l'influence d'un paramètre d'analyse donné, le test de Student, qui permet de comparer deux populations d'échantillons indépendantes, a été effectué. Le niveau de différence significative est fixé pour $p > 0,05$.

II.3.4. **Étude de la cytocompatibilité**

Sur le milieu de culture MC3T3-E1 cultivé 48 h en présence des différents matériaux, deux tests colorimétriques sont réalisés simultanément. Le premier est le test WST-1, qui permet de mettre en évidence l'activité mitochondriale des cellules [ISH93; SIM05], le second est le test Resazurin qui donne une information sur la perméabilité de la membrane cellulaire [BAT04]. La prolifération des cellules MC3T3-E1 est mesurée par comptage de cellules.

II.3.4.a. Principe du test WST-1

Ce test colorimétrique permet de quantifier l'activité des déshydrogénases mitochondriales des cellules. Il s'agit d'enzymes de la chaîne respiratoire situées sur la membrane interne des mitochondries. Ce test est basé sur la segmentation des sels de tetrazolium (apporté par la solution WST-1) par les déshydrogénases mitochondriales des cellules viables. Le sel de tetrazolium est réduit en formazan soluble par l'enzyme succinate tetrazolium qui existe dans la chaîne respiratoire mitochondriale et qui n'est active que dans les cellules vivantes (Figure

sont alors placées en incubation à 37°C pendant 1 h afin de laisser la réaction se produire. Au bout de 1 h, pour chaque échantillon, deux prélèvements de 200 µL sont disposés dans une microplaque destinée à l'analyse colorimétrique. Le mélange de référence (milieu de culture + WST-1 + Resazurin) est également analysé, il s'agit du blanc de la mesure. L'analyse de couleur se fait à l'aide d'un lecteur de microplaques POLARStar-optima (BMG Labtech) et l'acquisition des données à l'aide du logiciel FLUOStar-Optima. L'analyse de couleur du test WST-1, se fait par absorbance UV/Vis à 450 nm et celle du test Resazurin par fluorescence à 560 et 590 nm correspondant respectivement aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

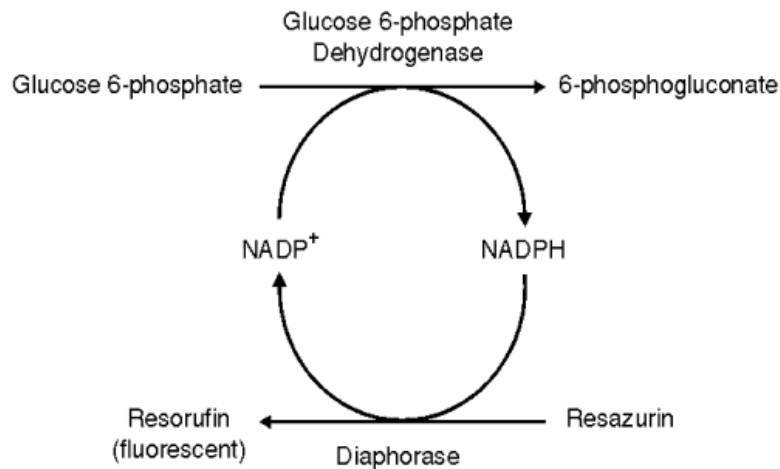


Figure II-4 : Schéma des réactions impliquées au cours du test Resazurin [BAT04]

II.3.4.d. Comptage de cellules

Une fois les prélèvements pour l'analyse colorimétrique réalisés, les cellules sont nettoyées au PBS. Pour décoller les cellules de la surface des matériaux, 200 µL de trypsine sont ajoutés. Après agitation, l'action de la trypsine est stoppée par 750 µL de milieu de culture complet. Le mélange résultant, est prélevé et le comptage des cellules réalisé (Beckman Coulter GmbH).

II.3.5. Étude de la différenciation ostéogénique

L'aptitude des matériaux à induire une différenciation ostéogénique a été étudiée à l'aide des cellules souches ST-2. Au bout de 14 jours d'incubation au contact des matériaux, les cellules sont lysées et congelées. Lysér les cellules consiste à dissoudre leur membrane cellulaire, par un mécanisme viral, enzymatique ou osmotique, pour en extraire les macromolécules biologiques (ADN, protéines...). Le produit de la lyse est appelé le lysat. La prolifération

cellulaire est alors mesurée et pour évaluer la différenciation des cellules, l'activité des phosphatases alcalines (ALP) et la quantité de collagène dans les cellules ont été déterminées. De plus, différents marqueurs ostéogéniques ont été mis en évidence à l'aide de la technique de transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR pour *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*).

II.3.5.a. Lyse des cellules

La lyse des cellules est réalisée à l'aide du kit Cytotox 96[®] (Promega). La solution de lyse est ajoutée à hauteur de 10 µL pour 100 µL de milieu cellulaire dans les puits de culture. La plaque de culture est placée en incubation pendant 45 mn à 37°C. Le milieu est ensuite centrifugé à 250 g pendant 4 mn. Le lysat de cellules est stocké à -25°C jusqu'à son utilisation ultérieure.

II.3.5.b. Prolifération cellulaire

➤ Principe de la mesure

La prolifération cellulaire a été mesurée en déterminant l'activité des lactates déshydrogénase (LDH) dans le lysat de cellules. La méthode est basée sur la réduction du NAD⁺ en NADH, suite à la réaction d'oxydation du lactate en pyruvate, réaction catalysée par la LDH (Figure II-5) [LEG92]. NAD⁺/NADH représente un système de coenzyme assurant les transferts d'hydrogène. Les protons ainsi créés au cours de la réaction conduisent à la conversion du sel de tetrazolium en un sel soluble et coloré de formazan (Figure II-3). L'activité des LDH, directement corrélée avec la formation de formazan, est liée au nombre de cellules et est mesurée par spectrophotométrie.

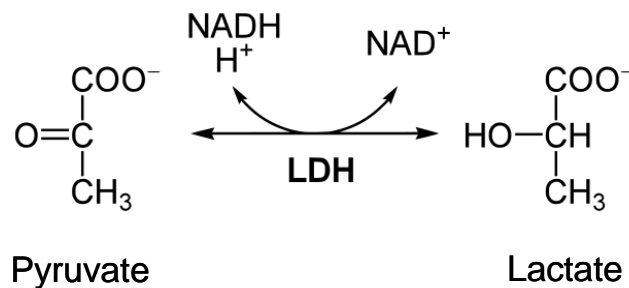


Figure II-5 : Réaction de transformation du lactate en pyruvate⁵

⁵ D'après http://commons.wikimedia.org/wiki/File:LDH_reaction.svg (site consulté le 07/07/2010)

➤ Protocole expérimental

La mesure a été réalisée avec le kit commercial TOX7 (Sigma Aldrich). Après avoir décongelé le lysat de cellules pendant 45 mn à 37°C, le mélange est centrifugé à 250 g pendant 5 mn. Dans une cuve en plastique pour analyse spectroscopique, sont ajoutés 140 µL du surnageant puis 60 µL du mélange réactif fourni avec le kit. Ce mélange réactif contient, en proportions égales, une solution substrat (acide lactique), un colorant et un cofacteur, c'est-à-dire une substance nécessaire, en plus d'une enzyme, au bon déroulement de la réaction. Le NADH étant sujet à la photodégradation, l'ensemble est placé dans le noir pendant 20 à 30 mn à température ambiante. A la fin de cette période d'incubation, la réaction est stoppée en ajoutant 300 µL de HCl à 1N et 300 µL d'eau distillée sont versés pour compléter la cuve. Au bout d'une heure, l'absorbance est mesurée à 490 nm. Elle est proportionnelle au nombre de cellules présentes sur chaque échantillon. Un blanc de mesure, constitué du mélange ne contenant pas de lysat de cellules, est réalisé à 690 nm et est soustrait des résultats.

II.3.5.c. Viabilité cellulaire

La viabilité des cellules a été analysée à l'aide du test WST-1 précédemment présenté au paragraphe II.3.4.a.

II.3.5.d. Quantification du collagène

Lorsque les cellules ST-2 se différencient, elles ont tendance à produire beaucoup de collagène. Les échantillons sont tout d'abord fixés à l'aide d'une solution de Bouin (Sigma Aldrich). Il s'agit d'un mélange de formaldéhyde, d'acide acétique et d'acide picrique très utilisée pour fixer les cellules car il préserve le noyau ainsi que les chromosomes. La quantité de collagène présente dans les cellules ST-2 est ensuite déterminée à l'aide du rouge de Sirius (Chroma). Le rouge de Sirius est une solution saturée de rouge de Sirius dans de l'acide picrique qui permet de révéler les fibres de collagène.

Après avoir disposé 100 µL de lysat de chaque échantillon dans une microplaque d'analyse spectroscopique, l'ensemble est placé une nuit dans une étuve à 80°C. Les lysats sont alors nettoyés à l'aide de 250 µL de PBS puis fixés à l'aide d'une solution de Bouin (Sigma Aldrich) pendant 1 h. Après avoir retiré la solution de Bouin, les échantillons sont nettoyés trois fois à l'eau distillée. Le rouge de Sirius (Chroma) est ensuite ajouté à hauteur de 150 µL, puis l'ensemble est placé pendant 1 h dans un incubateur agitateur réglé à 37°C. Les échantillons sont alors nettoyés cinq fois à l'aide de 250 µL de HCl à 0,01 N. Pour détacher le

réactif coloré lié au fond du puits, 150 μL de NaOH à 0,1 N sont ajoutés. Le tout est placé sous agitation pendant 30 mn à température ambiante. L'absorbance du mélange résultant est analysée à 550 nm et un blanc est réalisé avec la solution de NaOH seule. La concentration en collagène I est déduite d'une droite d'étalonnage réalisée dans la gamme de concentration en collagène allant de 0 à 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

II.3.5.e. Quantification de l'activité des phosphatases alcalines

➤ Principe de la mesure de la quantité d'ALP

O. A. Bessey et coll. sont à l'origine de cette méthode [BES46]. A un pH de 10,4, les ALP catalysent l'hydrolyse du p-nitrophényl phosphate (p-NPP) en p-nitrophénol (de couleur jaune) et en phosphate selon la réaction présentée sur la Figure II-6. La teneur en p-nitrophénol formé est mesurée par spectrophotométrie à 405 nm, elle est proportionnelle à la quantité d'ALP dans les échantillons. L'activité de l'enzyme ALP est exprimée par le nombre de mole de p-nitrophénol produit par minute. Cette activité est normalisée par rapport à la masse de protéine contenue dans les échantillons.

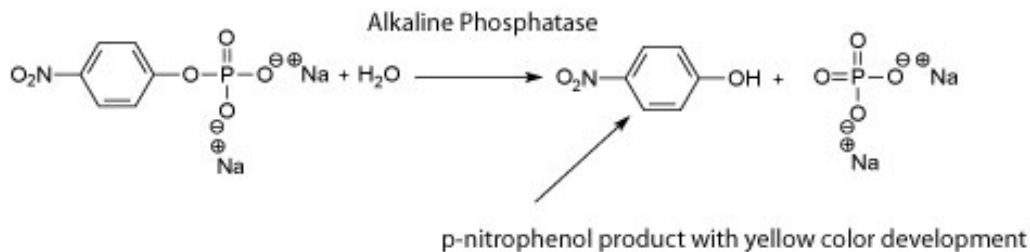


Figure II-6 : Réaction d'hydrolyse du p-nitrophényl phosphate⁶

➤ Principe de la quantification des protéines

La méthode utilisée pour mesurer la concentration en protéines dans les lysats est la méthode de M. M. Bradford [BRA76]. Cette analyse est basée sur la formation de complexes entre le colorant Coomassie G-250 bleu et les protéines. La formation de ces complexes entraîne un changement de couleur dans le milieu qui est mesuré par spectrophotométrie à 595 nm.

➤ Protocole expérimental

L'activité des phosphatases alcalines est déterminée à l'aide d'un kit Sigma Aldrich. Après avoir décongelé, puis centrifugé le lysat à 250 g pendant 5 mn, 250 μL en sont placés dans

⁶ D'après <http://www.sigmaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/alkaline-phosphatase.html> (site consulté le 07/07/2010)

une cuve de spectroscopie. La solution tampon ALP, contenant 0,1 M de Tris, 2,0 mM de $MgCl_2$ et 9,0 mM de p-NPP, est ajoutée à hauteur de 100 μL par échantillon avant de les placer en incubation à 37°C pendant 80 mn. La réaction d'hydrolyse est stoppée par 300 μL de NaOH à 1 N et l'absorbance des échantillons est mesurée 405 nm (A_{405}) après avoir réalisé un blanc de mesure à 690 nm.

La concentration totale en protéine contenue dans les lysats est mesurée à l'aide du réactif de Bradford (Sigma Adrich). Pour ce faire, 50 μL de mélange lysé sont mélangés à 1,5 mL de réactif. Après une période d'incubation de 45 mn à température ambiante, l'absorbance des échantillons est mesuré à 595 nm. La concentration massique en protéine des échantillons ($C_{protéine}^m$) est déduite d'une droite d'étalonnage réalisée dans la gamme de concentration en protéine allant de 95 à 1000 $\mu g \cdot mL^{-1}$.

L'activité des ALP normalisée à la masse de protéine ($Activité_{ALP}$) est calculée selon l'Expression II-4a où n_{p-NPP} représente le nombre de mole de p-NPP en nmol, t le temps d'incubation en mn et $m_{protéine}$ la masse de protéine en mg. La loi de Beer-Lambert permet de calculer n_{p-NPP} selon l'Expression II-4b avec A_λ l'absorbance mesurée à la longueur d'onde λ , ε le coefficient d'extinction molaire (ici égal à 18 500 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), l la longueur du trajet optique (1 cm), C_{p-NPP}^{mol} la concentration molaire en p-NPP et $V_{échantillon}$ le volume de l'échantillon de lysat analysé. Quant à $m_{protéine}$, elle est obtenue par l'intermédiaire de la mesure de la concentration massique en p-NPP mesurée dans les échantillons ($C_{protéine}^m$) via l'Expression II-4c. Au final, il en découle l'Expression II-4d qui permet d'obtenir l'activité des ALP qui s'exprime en nmol de p-NPP $\cdot mn^{-1} \cdot mg^{-1}$.

$$(a) \quad Activité_{ALP} = \frac{n_{p-NPP}}{t \cdot m_{protéine}}$$

$$(b) \quad A_\lambda = \varepsilon \cdot l \cdot C_{p-NPP}^{mol} \quad \text{d'où} \quad n_{p-NPP} = C_{p-NPP}^{mol} \cdot V_{échantillon} = \frac{A_{405} \cdot V_{échantillon}}{\varepsilon \cdot l}$$

$$(c) \quad m_{protéine} = C_{protéine}^m \cdot V_{échantillon}$$

$$(d) \quad Activité_{ALP} = \frac{A_{405}}{\varepsilon \cdot l \cdot t \cdot C_{protéine}^m}$$

Expression II-4 : Détails du calcul de l'activité des ALP normalisée par rapport à la masse de protéine

II.3.5.f. Étude RT-PCR

L'étude RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) a été réalisée par Rainer Detsch du laboratoire BioCer Entwicklungs-GmbH à Bayreuth.

Brièvement, cette technique a été mise au point par K. B. Mullis et coll. [MUL87]. La technique de PCR précédée d'une étape de transcription inverse (RT-PCR) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné par des enzymes, les ADN polymérase, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin en ARN simple brin est répétée en boucle. Au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle. Pour avoir réplication d'un ADN double brin, il faut agir selon trois étapes (Figure II-7) :

- (1) dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin ;
- (2) borner et amorcer la réplication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques ;
- (3) réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire. A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin. Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique.

Après isolation d'ARN à l'aide du kit de purification Master-Pure ARN (Biozym), la transcription reverse a été réalisée avant la réaction en chaîne de polymérisation afin d'amplifier les gènes (GoTaq Green MasterMix, Promega). Suite à la réaction de RT-PCR, le produit obtenu est déposé dans un gel d'agarose avec des colorants marqueurs d'ADN.

L'expression des gènes codant pour le collagène I (COLL I), l'ostéocalcine (OC), la sialoprotéine osseuse (BSP), l'ostéoprotégérine (OPG) et RANK-L est mise en évidence par électrophorèse. A titre de référence la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), gène exprimé dans toutes les cellules, est également révélé. Les séquences amplifiées sont répertoriées dans le Tableau II-5. Quant à l'échantillon servant de référence, il s'agit ici du lysat de cellules issu du puit de culture sans échantillon appelé REF.

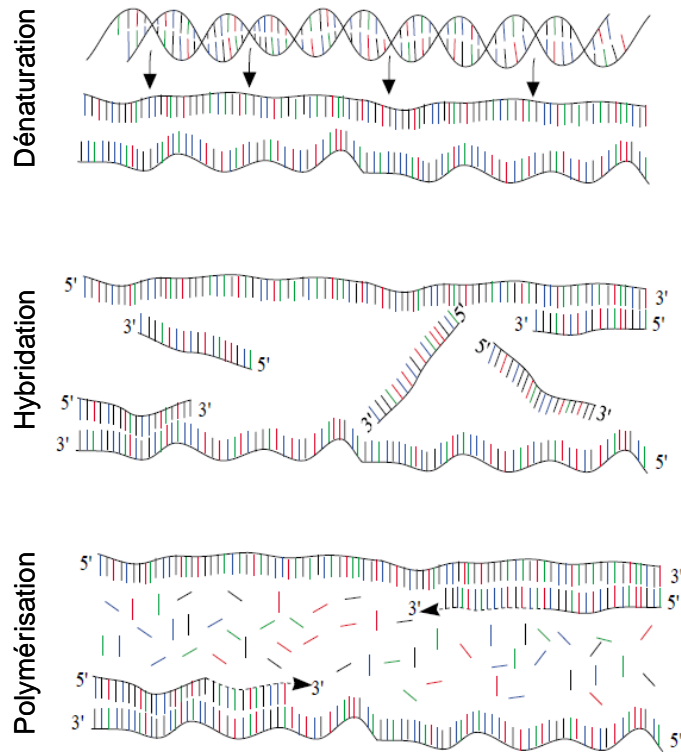


Figure II-7 : Étapes principales régissant la réaction de PCR⁷

Tableau II-5 : Récapitulatif des amorces PCR utilisées (A : adénine ; C : cytosine ; G : guanine ; T : thymine ; pb signifie paire de base et est une unité qui correspond à l'appariement de deux bases azotées situées sur deux brins complémentaires d'ADN ou d'ARN)

Nom	Amorce	Température d'hybridation (°C)	Taille du fragment amplifié (pb)
COLL I amorce sens	GAACGGTCCACGATTGCATG	48	167
COLL I amorce antisens	GGCATGTTGCTAGGCACGAAG		
OC amorce sens	AAGCAGGAGGGCAATAAGG	55	209
OC amorce antisens	CAGAGTTTGCTTTAGGGC		
BSP amorce sens	ACCGGCCACGCTACTTTCTTT	55	431
BSP amorce antisens	GACCGCCAGCTCGTTTTCA		
OPG amorce sens	TCCTGGCACCTACCTAAAACAGCA	55	579
OPG amorce antisens	CTACACTCTCGGCATTCACTTTGG		
RANK-L amorce sens	GCCGAGGAAGGGAGAGAACGAT	55	277
RANK-L amorce antisens	CGCTCGAAAGTACAGGAACAGA		
GAPDH amorce sens	ACCACAGTCCATGCCATCAC	48	452
GAPDH amorce antisens	TCCACCACCCTGTTGCTGTA		

⁷ D'après <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> (site consulté le 27/08/2010)

II.3.6. Étude de la minéralisation

L'habilité des matériaux à induire la minéralisation a été étudiée à l'aide des cellules SaOs-2 à l'issue d'un temps d'incubation de 14 jours. Différentes colorations ont été réalisées sur les matériaux pour mettre en évidence le collagène, les ALP et les nouvelles zones calcifiées.

II.3.6.a. Coloration du collagène

Le milieu de culture de chaque puits est retiré à l'aide d'une pompe à vide. Les cellules présentes à la surface des pastilles sont nettoyées avec 1 mL de PBS. Dans chaque puits, 1 mL de solution fixante de Bouin (Sigma Aldrich) est ajouté. Au bout de 1 h la solution est retirée, les pastilles sont nettoyées à l'eau distillée et 1 mL de rouge de Sirius (Chroma) est ajouté. Les détails concernant ces deux solutions ont été présentés au paragraphe II.3.5.d. Après 1 h de contact, le colorant est retiré et les pastilles nettoyées cinq fois à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique à 0,01 N (Roth Carl).

II.3.6.b. Coloration des phosphatases alcaline

La phosphatase alcaline (ALP) est une glycoprotéine membranaire produite par de nombreuses cellules dont les ostéoblastes. Elle constitue une enzyme dont la présence est indispensable à la minéralisation de l'os. Dans les cellules ostéoblastiques, les vésicules de calcification contenant des ALP peuvent être colorées et donc mises en évidence. Pour cette coloration, un kit de phosphatase alcaline (Sigma Aldrich) est utilisé. Dans cet essai, les ALP sont mises en évidence par une capture simultanée à l'aide de naphthols substitués et de sels de diazonium. Un pigment insoluble et visible sur les sites d'activité de la phosphatase apparaît.

Pour ce faire, le milieu de culture de chaque puits est retiré et les cellules sont nettoyées avec 1 mL de PBS. Une solution fixante, composée de citrate, d'acétone et de formaldéhyde, est déposée sur les pastilles (temps de contact : 2 mn). Le réactif colorant est alors ajouté à hauteur de 600 µL. Il s'agit d'un mélange de nitrate de sodium, de Fast Red Violet-alcalin et d'une solution de naphthol AS-BI. Au bout de 15 mn, il est retiré et les pastilles sont nettoyées deux fois à l'eau distillée. Une solution d'hématoxyline Gill N°3 est alors ajoutée, après 2 mn de contact, les échantillons sont nettoyés une dernière fois à l'eau distillée.

II.3.6.c. Coloration et quantification des phosphates de calcium

L'une des techniques utilisées pour révéler des zones nouvellement calcifiées est la coloration Von Kossa. Le principe repose sur une réaction de substitution suivie d'une réaction

photochimique : les ions calcium des tissus sont substitués par des ions argent « invisibles » qui sont ensuite réduits en argent métallique. Les phosphates et carbonates de calcium présents dans les tissus sont alors mis en évidence avec une coloration noire. Celle-ci correspond au noircissement à la lumière des phosphates et carbonates d'argent. La procédure originale propose de travailler avec du nitrate d'argent, mais l'efficacité de l'utilisation d'une solution de lactate d'argent et d'hydroquinone a été validée [RUN93].

Le milieu de culture des puits est retiré et les cellules sont nettoyées avec 1 mL de PBS puis avec de l'eau distillée. Les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de formaldéhyde à 10 % (Roti-Histofix, Carl Roth GmbH). Après 10 mn, elles sont nettoyées à l'eau distillée. Dans l'obscurité, 1 mL de lactate d'argent à 0,5 % (Fluka Chemie GmbH) est ajouté. Après 20 mn et un nettoyage à l'eau distillée, 1 mL de solution d'hydroquinone à 0,5 % (Merck-Schuchardt) est ajouté et laissé agir pendant 2 mn. La solution d'hydroquinone joue le rôle de révélateur photo. Après avoir nettoyé les cellules à l'eau distillée, une solution de thiosulfate de sodium à 5 % (Merck KGaA) est ajoutée. Après 5 mn de contact, les pastilles sont nettoyées trois fois à l'eau distillée et laissées sécher à l'air libre.

II.3.6.d. Observations au microscope optique et quantification

A l'issue des colorations, les pastilles sont observées à l'aide d'un microscope optique confocal Axioplan (Zeiss).

Les observations microscopiques de la coloration Von Kossa ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ (NIH Images) afin de quantifier la densité de minéralisation. Pour chaque composition, quatre images de microscopie optique sont traitées. Chaque image est découpée en quatre zones distinctes qui sont binarisées par une étape de seuillage de manière à révéler les zones nouvellement calcifiées avec une couleur noire. Le logiciel détermine ainsi l'aire (en pixels) occupée par la minéralisation à la surface des échantillons.

Chapitre III

Élaboration de matériaux à base de phosphate tricalcique β et de silicium

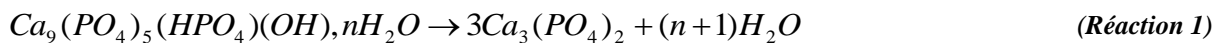
Chapitre III :Élaboration de matériaux à base de phosphate tricalcique β et de silicium

L'objectif de ce chapitre est d'étudier l'élaboration de matériaux de β -TCP et de silicium ainsi que la possible incorporation de l'élément silicium dans la structure du phosphate tricalcique β . Ces travaux accordent une attention particulière à la détermination de la nature et de la localisation des différentes phases chimiques en présence dans les matériaux. Pour cette étude, les poudres sont synthétisées par précipitation en voie aqueuse. La première partie de ce chapitre rappelle les notions essentielles concernant la synthèse du phosphate tricalcique β et présente les synthèses réalisées pour cette étude. La seconde partie est consacrée à la caractérisation des poudres synthétisées, l'objectif étant de déterminer la composition des matériaux et d'étudier l'influence du silicium sur la synthèse du phosphate tricalcique β . La troisième partie de ce chapitre traite de l'élaboration de céramiques denses à base de phosphate tricalcique β et de silicium avant de terminer sur une discussion générale portant sur l'ensemble des résultats.

III.1. Synthèse par précipitation en voie aqueuse

III.1.1. Généralités sur la synthèse du β -TCP

Le β -TCP ne peut pas directement être synthétisé par précipitation en milieu aqueux. Il est nécessaire, au préalable, de réaliser la précipitation du phosphate tricalcique apatitique (TCP apatitique) de formule $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{HPO}_4)(\text{OH})\cdot n\text{H}_2\text{O}$. La calcination de ce composé, au dessus de 700°C , conduit à la formation du phosphate tricalcique anhydre cristallisé $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ par condensation des ions hydrogénophosphate selon la réaction globale [MOR89] :



Le phosphate tricalcique apatitique est en fait une hydroxyapatite non stœchiométrique, déficitaire en calcium de type $\text{Ca}_{10-y}\square_y(\text{PO}_4)_{6-y}(\text{HPO}_4)_y(\text{OH})_{2-y}\square_y$ avec $y = 1$ et où \square représente une lacune. Elle est notée CDHA pour *Calcium Deficient Hydroxyapatite*. Le mode de synthèse classiquement utilisé pour l'hydroxyapatite peut donc être employé pour synthétiser le phosphate tricalcique apatitique, à savoir la précipitation en milieu aqueux à partir d'une solution de nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et d'hydrogénophosphate de diammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

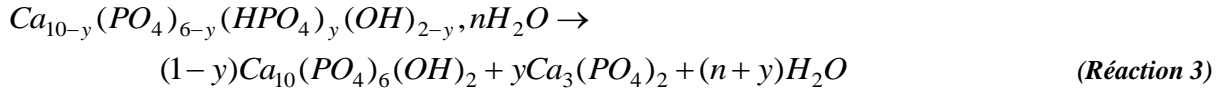
La Figure III-1 représente le diagramme de phase du domaine $\text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$ sous pression de vapeur d'eau. Le composé défini TCP pur ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) est caractérisé par un rapport molaire Ca/P égal à 1,500. La lecture de ce diagramme indique qu'une faible variation de ce rapport molaire engendre l'apparition de phases secondaires. Lorsque $\text{Ca/P} < 1,500$, il s'agit du pyrophosphate de calcium $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (CPP) et lorsque $\text{Ca/P} > 1,500$, la phase secondaire est de l'HA.

Lorsque le rapport molaire Ca/P du précipité est inférieur à 1,500, la poudre synthétisée est constituée de phosphate tricalcique apatitique et de phosphate dibasique anhydre CaHPO_4 . Le traitement thermique de la poudre brute de synthèse, en dessous de 1280°C , conduit à un mélange biphasé constitué de phosphate tricalcique β et de pyrophosphate de calcium β selon la réaction de décomposition suivante :



(Réaction 2)

Pour un rapport molaire Ca/P compris entre 1,500 et 1,667 (valeur correspondant, respectivement, aux composés définis TCP et HA), le précipité répond à la formule générale de l'hydroxyapatite déficitaire en calcium, $Ca_{10-y}□_y(PO_4)_{6-y}(HPO_4)_y(OH)_{2-y}□_y, nH_2O$, avec $0 \leq y \leq 1$. Au-delà de 800°C, il est décomposé en phosphate tricalcique β et en hydroxyapatite stœchiométrique selon la réaction globale suivante [MOR89] :



Le rapport molaire initial Ca/P des précipités influence donc la composition finale du produit calciné. De nombreux paramètres de synthèse conditionnent la composition finale du précipité et donc son rapport molaire Ca/P. Une précédente étude, menée au laboratoire SPCTS par A. Destainville et coll., a permis d'optimiser le protocole de synthèse afin d'obtenir, de manière reproductible, du phosphate tricalcique apatitique [DES03]. Les paramètres affinés, à savoir un pH égal à 7,0 et une température du milieu réactionnel de 30°C sont ceux utilisés dans la suite de ce travail.

La synthèse de phosphate tricalcique β en présence de silicium a été étudiée dans les deux réacteurs GR et PR présentés au paragraphe II.1.1. Des poudres contenant différentes teneurs en silicium ont été préparées et différents temps de maturation ont été appliqués au cours des réactions de précipitation. Les détails concernant les quantités de réactifs, les paramètres de synthèse ainsi que les notations des poudres sont précisés au paragraphe suivant.

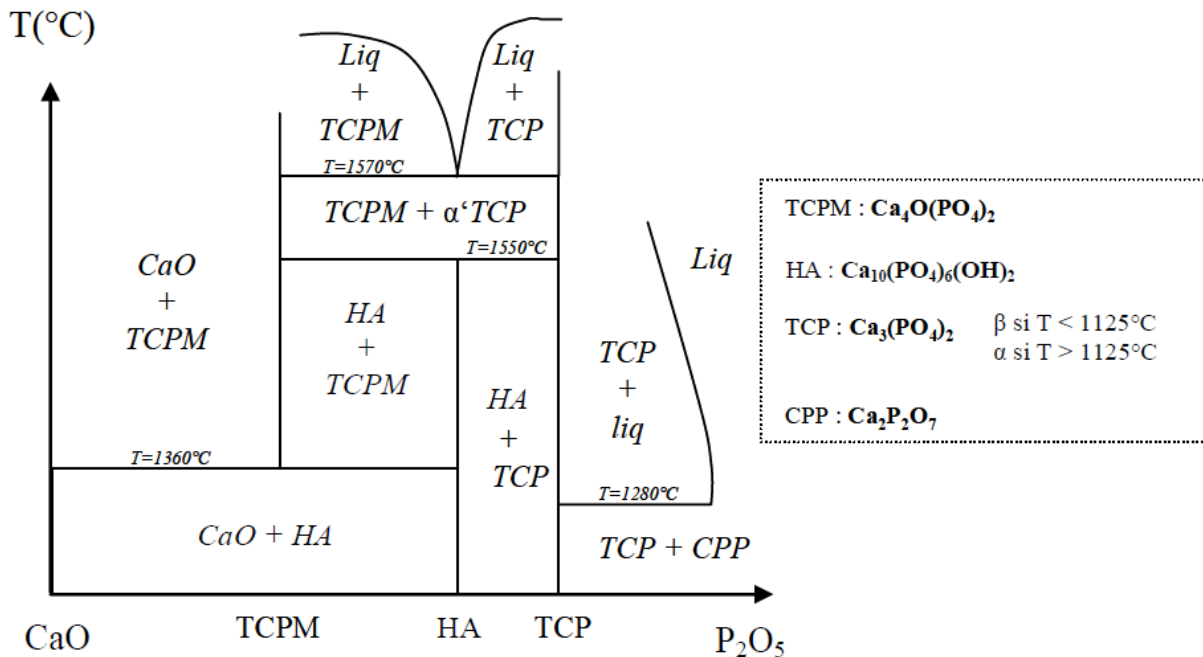
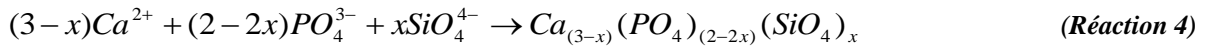


Figure III-1 : Diagramme binaire CaO – P₂O₅, P_{H₂O} = 500 mm Hg [RIB73]

III.1.2. Paramètres de synthèse

La synthèse de β -TCP en présence de silicium a été conduite en supposant que les tétraèdres de silicate SiO_4 pourraient se substituer à ceux de phosphate PO_4 , comme c'est le cas lors de la synthèse d'hydroxyapatite silicatée [GIB99; PAL08]. Pour respecter l'équilibre des charges, le nombre de mole de chacun des précurseurs est calculé selon la formule hypothétique suivante, où x représente le nombre de moles de silicium :



Cette formulation correspond à celle proposée par C. L. Camiré et coll. dans le cas de la synthèse de TCP silicaté de structure α [CAM06]. L'hypothétique création de lacune de calcium, nécessaire pour maintenir l'électroneutralité de la formule chimique, empêche de conserver le rapport molaire Ca/P de 1,500 du TCP pur.

Le protocole expérimental de synthèse est détaillé à la section II.1.1.a. La suite de ce paragraphe, quant à lui, présente les paramètres propres à la synthèse de β -TCP en présence ou non de silicium dans les réacteurs GR et PR. Le grand réacteur (GR) a permis de produire des quantités de poudres importantes nécessaires pour réaliser une caractérisation complète (analyse chimique, structurale, comportement thermique et étude de frittage) et élaborer suffisamment de pastilles pour l'étude biologique. Les poudres synthétisées dans le petit réacteur (PR) ont été essentiellement caractérisées par diffraction des rayons X et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier afin d'apporter des éléments de discussion supplémentaires sur l'influence du silicium au cours de la synthèse de β -TCP.

III.1.2.a. Synthèses réalisées dans le réacteur GR

Dans le réacteur GR, deux teneurs en silicium sont étudiées : $x = 0,05$ et $x = 0,10$. Les poudres correspondantes sont notées, respectivement, $\text{Si}_{0,05}$ -CDHA et $\text{Si}_{0,10}$ -CDHA avant condensation des ions hydrogénophosphate (poudre brute) et $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP et $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP après (poudre calcinée). Une poudre de référence ne contenant pas de silicium est également synthétisée. Les quantités de matière des réactifs sont alors calculées de telle sorte à obtenir un rapport molaire Ca/P égal à celui du TCP, soit 1,500. La poudre est dans ce cas notée CDHA avant condensation des ions hydrogénophosphate et β -TCP après.

La solution de calcium est préparée dans un volume d'eau distillée de 2,0 L et le précurseur de phosphate, avec éventuellement celui de silicium, est dissout dans 1,5 L d'eau distillée. Le Tableau III-1 regroupe les quantités de réactifs utilisées pour obtenir les poudres synthétisées dans le réacteur GR. Pour la synthèse de β -TCP, un temps de maturation de 10 h est appliqué.

Pour les synthèses réalisées en présence de silicium, le temps de maturation des réactions de précipitation varie afin d'étudier l'influence de l'addition de silicium sur la synthèse de phosphate tricalcique apatitique.

III.1.2.b. Synthèses réalisées dans le réacteur PR

Les synthèses réalisées dans ce réacteur sont conduites en présence ou non du précurseur de silicium. Trois poudres sont synthétisées avec les teneurs en silicium suivantes : $x = 0,05$, $x = 0,10$ et $x = 0,20$. Etudiées après condensation des ions hydrogénophosphate, elles sont notées respectivement $\text{Si}_{0,05}\text{-}\beta\text{-TCP}_{\text{PR}}$, $\text{Si}_{0,10}\text{-}\beta\text{-TCP}_{\text{PR}}$ et $\text{Si}_{0,20}\text{-}\beta\text{-TCP}_{\text{PR}}$, l'indice PR étant ajouté à la notation pour les différencier des précédentes poudres synthétisées dans le réacteur GR. Les poudres préparées sans silicium respectent les mêmes rapports molaires Ca/P en réactifs que les poudres contenant du silicium, mais sans ajouter le précurseur de silicium durant la synthèse. Autrement dit, ces poudres sont synthétisées avec une teneur en silicium « fictive » et sont notées $(\text{Si})_{0,05}\text{-}\beta\text{-TCP}_{\text{PR}}$, $(\text{Si})_{0,10}\text{-}\beta\text{-TCP}_{\text{PR}}$ et $(\text{Si})_{0,20}\text{-}\beta\text{-TCP}_{\text{PR}}$.

Dans le réacteur PR, la solution de calcium est préparée dans un volume de 0,5 L tout comme celle de phosphate. Les quantités de réactifs utilisées pour ces six synthèses sont répertoriées dans le Tableau III-2. Pour toutes ces synthèses, cinq temps de maturation sont étudiés : 30, 60, 90, 120 et 150 mn.

III.1.2.c. Paramètres de synthèse communs

Pour toutes les synthèses à base de phosphate tricalcique apatitique, la température du milieu réactionnel, ainsi que celle de la solution contenant le phosphate et éventuellement le silicium, sont régulées à $30,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$. Ces réactions de précipitation sont réalisées à un pH de $7,0 \pm 0,1$ et la vitesse d'addition de la solution contenant les précurseurs de silicium et de phosphate est fixée à $3,0 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$. La vitesse d'agitation du milieu réactionnel est fixée à 150 rpm tout au long de la synthèse.

La section III.2 est consacrée à la caractérisation des poudres synthétisées et le paragraphe III.3 présente les résultats concernant l'élaboration (frittage) de céramiques à base de phosphate tricalcique β et de silicium. Ce chapitre se termine sur une discussion générale de l'ensemble des résultats.

Tableau III-1 : Notation, quantité de réactifs (n), rapports molaires (Ca/P) et (Ca/(P+Si)) des réactifs, teneurs hypothétiques (x) et pourcentages massiques hypothétiques (%_m) de silicium pour les synthèses réalisées dans le réacteur GR

Notation		n _{Si} (mol)	n _{Ca} (mol)	n _P (mol)	Ca/P réactifs	Ca/(P+Si) réactifs	x _{Si} (mol)	% _m Si
Brute	Calcinée							
CDHA	β-TCP	0	1,280	0,853	1,500	1,500	0	0
Si _{0,05} -CDHA	Si _{0,05} -β-TCP	0,021	1,259	0,811	1,553	1,513	0,05	0,463
Si _{0,10} -CDHA	Si _{0,10} -β-TCP	0,043	1,237	0,768	1,611	1,526	0,10	0,948

Tableau III-2 : Notation, quantité de réactifs (n), rapports molaires (Ca/P) et (Ca/(P+Si)) des réactifs, teneurs hypothétiques (x) et pourcentages massiques hypothétiques (%_m) de silicium pour les synthèses réalisées dans le réacteur PR

Notation	n _{Si} (mol)	n _{Ca} (mol)	n _P (mol)	Ca/P réactifs	Ca/(P+Si) réactifs	x _{Si} (mol)	% _m Si
Si _{0,05} -β-TCP _{PR}	0,005	0,295	0,190	1,553	1,513	0,05	0,463
(Si) _{0,05} -β-TCP _{PR}	0						
Si _{0,10} -β-TCP _{PR}	0,010	0,290	0,180	1,611	1,526	0,10	0,948
(Si) _{0,10} -β-TCP _{PR}	0						
Si _{0,20} -β-TCP _{PR}	0,020	0,280	0,160	1,750	1,556	0,20	1,924
(Si) _{0,20} -β-TCP _{PR}	0						

III.2. Caractérisation des poudres

Ce paragraphe s'articule en trois parties. La première s'attache à décrire la composition chimique des poudres synthétisées dans les réacteurs GR et PR. Les poudres brutes issues du réacteur GR et les poudres calcinées provenant des deux réacteurs sont caractérisées par diffraction des rayons X, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, analyse chimique ICP/AES et analyse thermique différentielle. Après avoir défini les compositions d'intérêt pour la suite de l'étude, leurs caractéristiques physiques sont détaillées dans la seconde partie. Enfin, la troisième partie est consacrée à l'étude du comportement thermique de ces poudres.

III.2.1. Composition chimique des poudres

III.2.1.a. Analyses structurale et spectroscopique des poudres brutes

La Figure III-2 et la Figure III-3 présentent les diffractogrammes des poudres brutes synthétisées dans le réacteur GR respectivement sans et avec addition de silicium. Les pics de diffraction sont larges et mal définis. La poudre de référence ($x = 0$) est constituée d'une apatite monphasée (Figure III-2). Pour une teneur en silicium x de 0,05, quel que soit le temps de maturation, le même résultat est observé (Figure III-3a). Dans le cas où $x = 0,10$, et pour un temps de maturation nul, une phase secondaire identifiée comme étant de la monétite de formule CaHPO_4 apparaît (Figure III-3b). Les poudres obtenues pour des temps de maturation supérieurs (à partir de 20 mn) sont, quant à elles, constituées d'apatite monphasée.

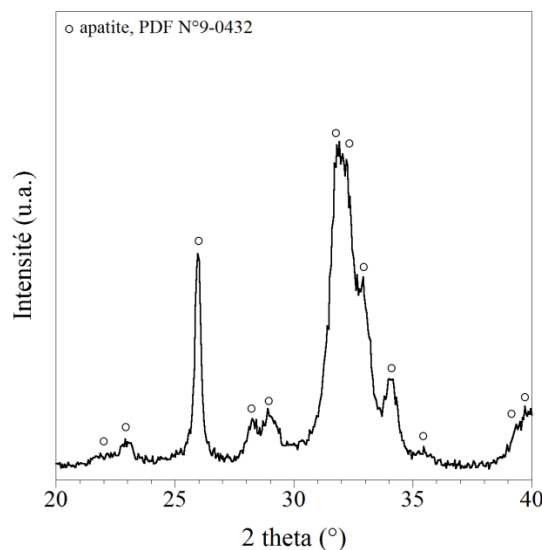


Figure III-2 : Diagramme DRX de la poudre brute issue du réacteur GR pour $x = 0$

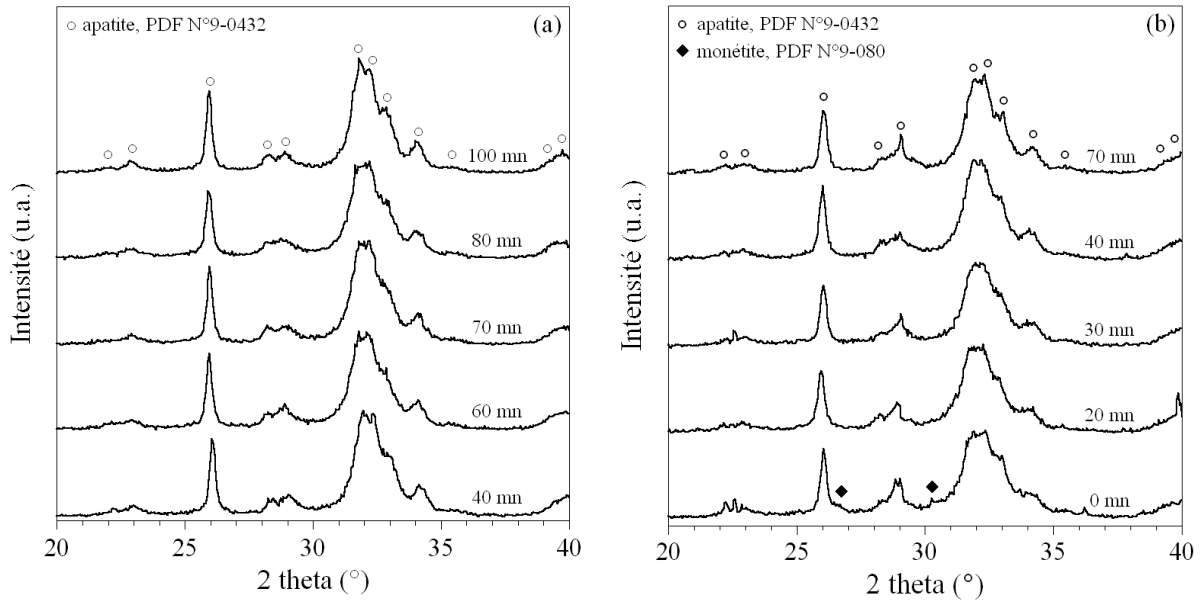


Figure III-3 : Diagrammes de DRX, en fonction du temps de maturation, de poudres brutes issues du réacteur GR avec (a) $x = 0,05$ et (b) $x = 0,10$

Les spectres FT-IR des poudres brutes sont présentés à la Figure III-4 pour la synthèse sans silicium et à la Figure III-5 pour les synthèses réalisées en présence de silicium. Quelle que soit la teneur x en silicium ou le temps de maturation, les spectres sont similaires et les mêmes bandes d'absorption sont présentes. Les bandes d'absorption des groupements phosphate apparaissent pour toutes les poudres : ν_3 PO₄ (1120-1020 cm⁻¹), ν_1 PO₄ (960 cm⁻¹), ν_4 PO₄ (600-560 cm⁻¹) et ν_2 PO₄ (480 cm⁻¹). Les bandes à 3540 et 630 cm⁻¹ sont attribuées aux groupements hydroxyde (respectivement ν_s OH et ν_l OH) tandis que celles à 1140 et 875 cm⁻¹ correspondent aux groupements hydrogénophosphate HPO₄. Des résidus de synthèse azotés sont mis en évidence par la succession de bandes à 3200, 1380 et 830 cm⁻¹ et l'eau adsorbée à la surface des particules apparaît à 3500 et 1640 cm⁻¹. Aucune évolution significative de l'intensité de ces bandes en fonction du temps de maturation ou de la teneur en silicium n'est discernable.

La diffraction des rayons X indique que les poudres brutes de synthèse sont principalement constituées d'apatite mal cristallisée. Les analyses spectroscopiques révèlent, quelle que soit la teneur en silicium ou le temps de maturation, la présence d'ions hydrogénophosphate, phosphate et hydroxyde au sein des poudres brutes. Ces résultats confirment que les poudres sont composées d'une phase apatitique déficiente en calcium de type Ca_{10-y}(PO₄)_{6-y}(HPO₄)_y(OH)_{2-y} avec $0 \leq y \leq 1$. Il est à noter que ces analyses ne permettent pas la mise en évidence de la présence du silicium au sein des poudres brutes.

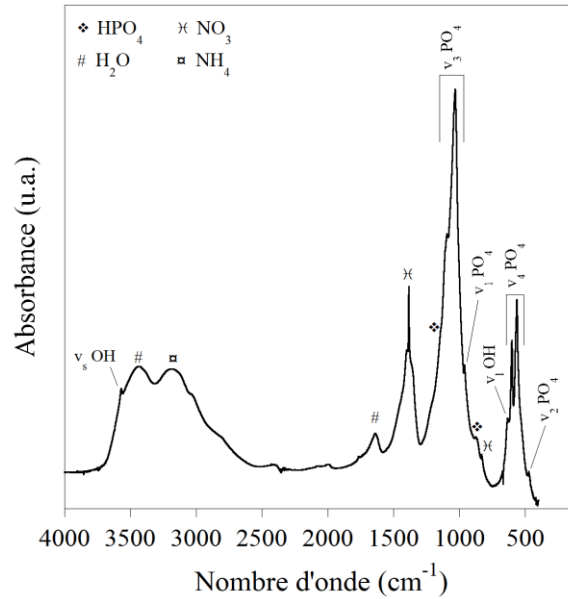


Figure III-4 : Spectre FT-IR de la poudre brute issue du réacteur GR pour $x = 0$

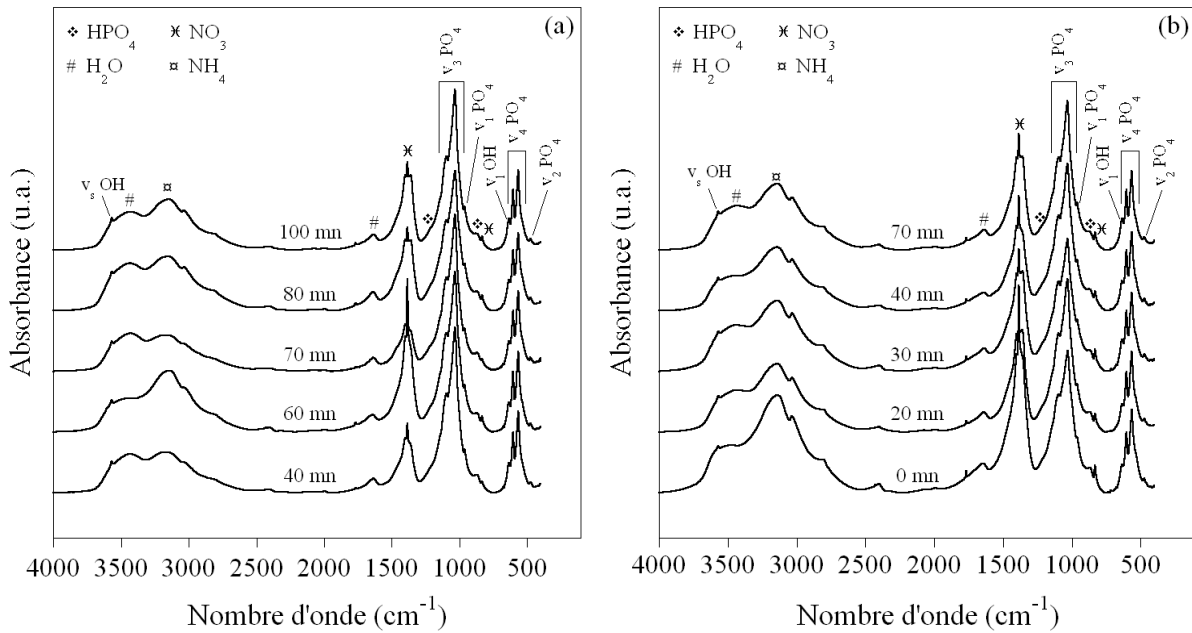


Figure III-5 : Spectres FT-IR, en fonction du temps de maturation, de poudres brutes issues du réacteur GR avec (a) $x = 0,05$ et (b) $x = 0,10$

Afin de préciser la composition chimique des précipités, il est nécessaire d'effectuer des analyses complémentaires. Une calcination des précipités à 1000°C pendant 15 h permet de décomposer la phase apatitique déficitaire en calcium. Les paragraphes suivants présentent la caractérisation des poudres après calcination.

III.2.1.b. Évolution des phases cristallines présentes dans les poudres calcinées

La calcination des précipités à 1000°C pendant 15 h est un traitement thermique préconisé par la norme AFNOR ISO 13779-3 afin d'identifier les phases cristallines présentes dans les matériaux dont le rapport molaire Ca/P est compris entre 1,500 et 1,667 [AFN08]. L'utilisation de cette norme a été étendue à la caractérisation des phosphates de calcium de rapport molaire Ca/P inférieur à 1,500 [DES03]. Suite à ce traitement thermique, et en accord avec la norme, seules les phases pures et cristallines à base de phosphate de calcium sont prises en compte.

La Figure III-6 présente le diffractogramme de la poudre pour $x = 0$ après calcination à 1000°C pendant 15 h. Tous les pics de diffraction appartiennent à la fiche PDF N°9-0169. La poudre est donc constituée d'une phase cristalline de β -TCP. En revanche, en présence de silicium, les diffractogrammes des poudres synthétisées et calcinées à 1000°C pendant 15 h présentent, suivant le temps de maturation, différentes phases cristallines de phosphate de calcium (Figure III-7).

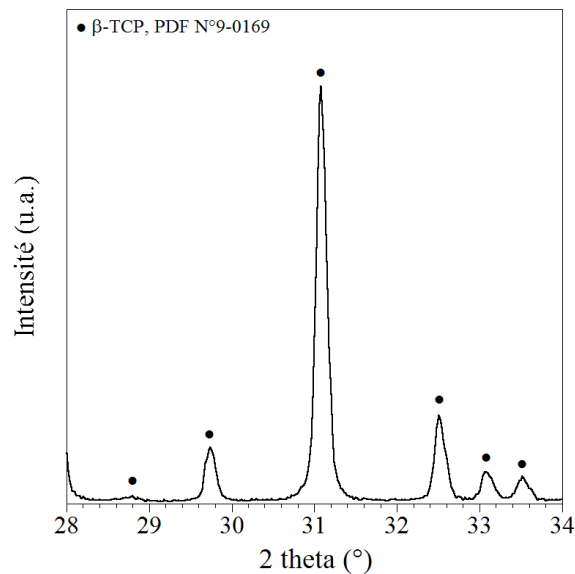


Figure III-6 : Diffractogramme de la poudre synthétisée dans le réacteur GR puis calcinée à 1000°C pendant 15 h avec $x = 0$

Dans le cas de la synthèse avec une teneur en silicium $x = 0,05$ (Figure III-7a), la poudre calcinée est, au début de la maturation, principalement composée de β -TCP. Une phase cristalline secondaire, identifiée comme étant du pyrophosphate de calcium β (β -CPP), apparaît jusqu'à 60 mn de maturation (pic d'intensité relative 35 % de la raie (201) à $2\theta = 26,9^\circ$; 45 %, raie (203) à $2\theta = 28,9^\circ$ et 30 %, raie (211) à $2\theta = 30,1^\circ$). Pour un temps de maturation de 70 mn, seule la phase cristalline β -TCP est détectée. Pour des temps de

maturation supérieurs à 70 mn, la poudre est toujours majoritairement constituée de β -TCP mais le pic de diffraction de la raie (211) de l'hydroxyapatite apparaît (pic principal d'intensité relative 100 % à $2\theta = 31,8^\circ$).

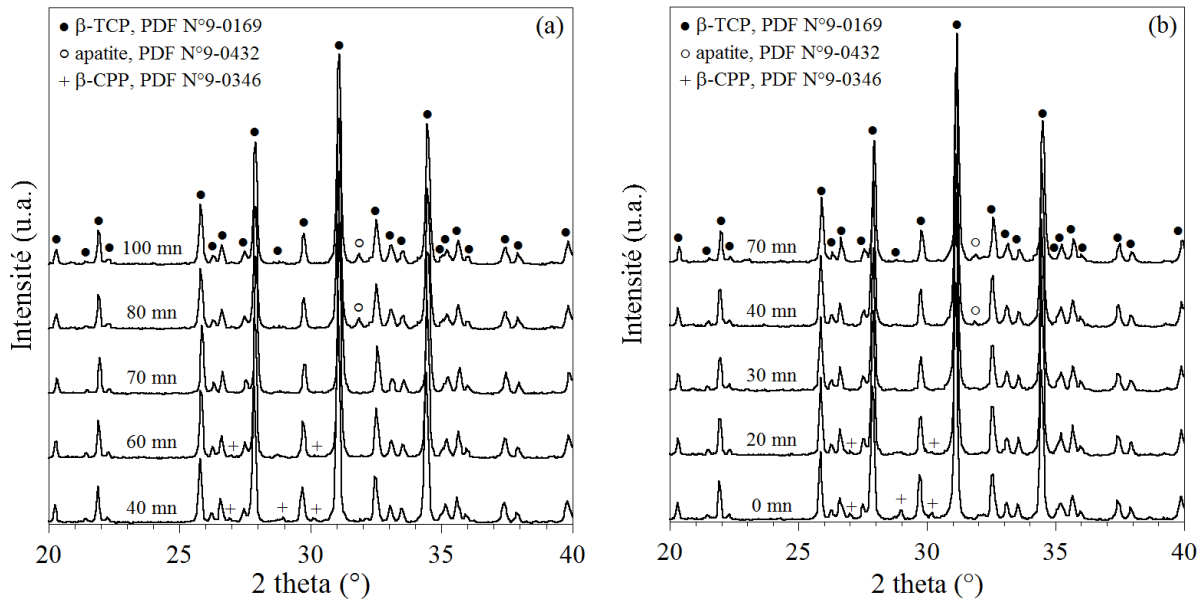


Figure III-7 : Diffractogrammes, pour différents temps de maturation, des poudres synthétisées dans le réacteur GR puis calcinées à 1000°C pendant 15 h avec (a) $x = 0,05$ et (b) $x = 0,10$

Afin d'apprécier l'évolution du système, des diffractogrammes haute résolution de DRX sont collectés sur un appareillage D8 Advanced, Brüker. Un pas de $0,015^\circ$ en 2θ , pour un temps de comptage de 2 s est fixé sur l'intervalle $[28-33^\circ]$. A partir de l'intensité de pics de diffraction caractéristiques des phases cristallines en présence, le rapport de valeur d'intensité maximale, noté R_I , est calculé selon l'Expression III-1. Les pics de diffraction retenus pour calculer ce rapport d'intensité sont :

- le pic de diffraction de la raie (211) de l'HA, d'intensité relative 100 % à $2\theta = 31,8^\circ$,
- le pic de diffraction de la raie (211) du β -CPP, d'intensité relative 30 % à $2\theta = 30,1^\circ$,
- le pic de diffraction de la raie (0210) du β -TCP, d'intensité relative 100 % à $2\theta = 31,0^\circ$.

Le pic de diffraction du β -CPP choisi pour calculer le rapport R_I n'est pas celui de la raie de diffraction principale (008) (pic d'intensité relative 100 % situé à $2\theta = 29,6^\circ$) car ce dernier se confond avec la raie de diffraction (300) du β -TCP positionnée à $2\theta = 29,7^\circ$.

Un rapport R_I positif traduit la présence d'hydroxyapatite dans la poudre. Dans ce cas, une augmentation de R_I est significative d'une augmentation de la quantité d'HA. A l'inverse, lorsque R_I est négatif, la poudre contient du pyrophosphate de calcium β et l'augmentation de R_I révèle une diminution de sa proportion.

$$R_I = \frac{I_{HA(211)} - I_{\beta-CPP(211)}}{I_{\beta-TCP(0210)}}$$

Expression III-1 : Expression du rapport d'intensité R_I

Ainsi, le graphique de la Figure III-8 représente l'évolution semi-quantitative des phases cristallines de phosphate de calcium en fonction du temps de maturation par l'intermédiaire du rapport d'intensité R_I .

En présence d'une teneur en silicium $x = 0,05$, le rapport d'intensité R_I augmente progressivement avec le temps de maturation (Figure III-8). Cette augmentation traduit, dans un premier temps, une diminution de l'intensité du pic de diffraction du β -CPP jusqu'à 70 mn de maturation, donc une diminution de la proportion de cette phase dans la poudre. Au-delà de 70 mn, de l'HA apparaît en quantité croissante avec le temps de maturation.

Lorsque la teneur en silicium incorporée lors de la synthèse est $x = 0,10$, le système suit une évolution similaire mais pour des temps de maturation plus courts (Figure III-7b, Figure III-8). La poudre est constituée de β -TCP et de β -CPP en dessous de 30 mn de maturation. La présence de β -CPP pour un temps de maturation de 0 mn était prévisible à partir du diffractogramme de la poudre brute correspondante (Figure III-3b). Il révèle en effet la présence de monétite qui, selon la Réaction 2, conduit, après traitement thermique, à la formation de β -TCP et de β -CPP. Au-delà de 30 mn de maturation, de l'HA apparaît au sein de la poudre et sa teneur s'accroît avec le temps de maturation.

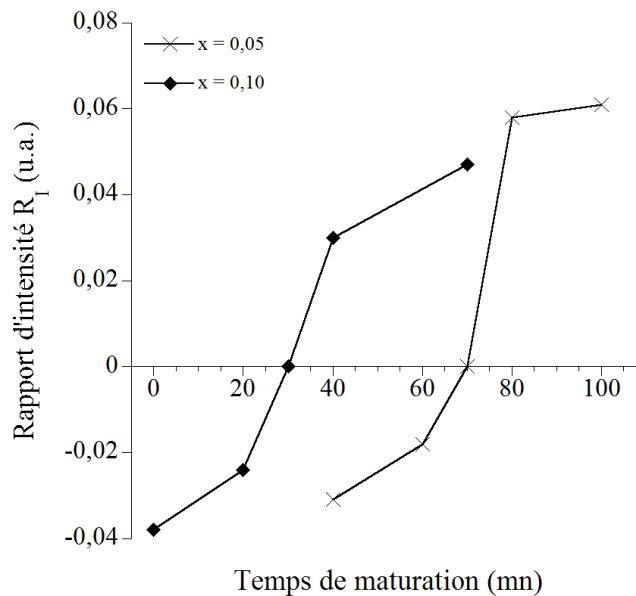


Figure III-8: Évolution du rapport d'intensité R_I en fonction du temps de maturation lors des synthèses réalisées dans le réacteur GR en présence de silicium

Afin de mieux appréhender l'influence du silicium au cours de la synthèse du β -TCP, des réactions de précipitation ont été réalisées dans le réacteur PR avec et sans le précurseur de silicium. La Figure III-9 expose l'évolution des rapports d'intensité R_I des poudres résultantes, calcinées à 1000°C pendant 15 h en fonction du temps de maturation. Que les poudres contiennent ou non du silicium et quelle que soit la quantité de silicium ajoutée, le rapport d'intensité R_I augmente continuellement avec le temps de maturation.

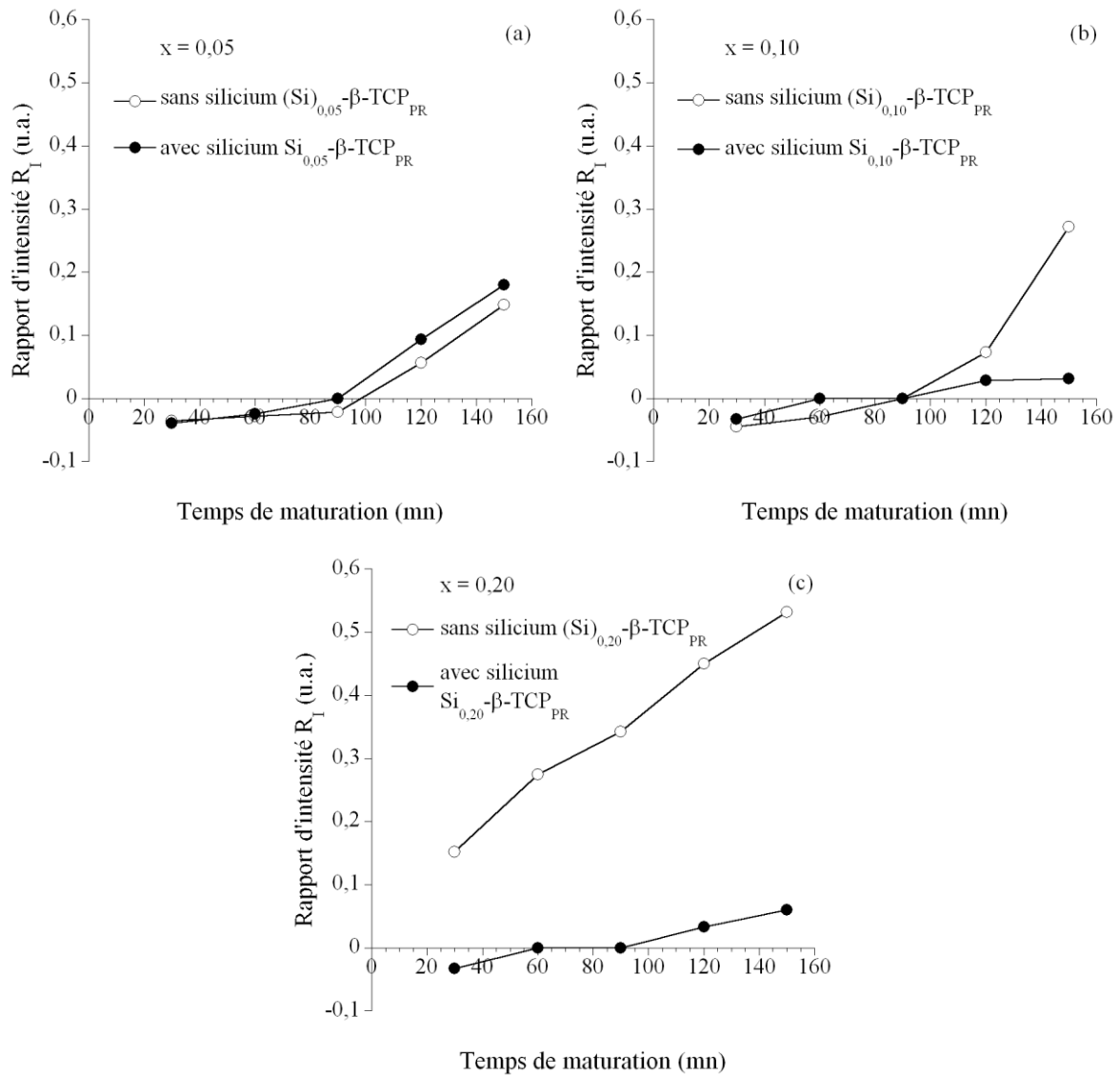


Figure III-9 : Évolution du rapport d'intensité R_I en fonction du temps de maturation lors des synthèses réalisées dans le réacteur PR en présence ou non de silicium

En présence de silicium, et pour les premiers temps de maturation, le rapport d'intensité R_I est négatif. Les poudres sont donc majoritairement composées de β -TCP et de β -CPP. Il devient ensuite positif, traduisant la présence de mélanges de β -TCP et d'HA. Aucune différence significative au niveau de l'évolution de la composition des phases cristallines n'est observée lorsque x augmente de 0,05 à 0,20.

Lorsqu'il n'y a pas de silicium dans le milieu réactionnel, pour les valeurs « fictives » $x = 0,05$ et $x = 0,10$, les poudres sont, au début de la synthèse, constituées de β -TCP et de β -CPP (Figure III-9a et b). Le rapport d'intensité R_I des poudres s'accroît alors avec le temps de maturation traduisant une diminution de la quantité de β -CPP puis une augmentation de celle d'HA lorsque R_I devient positif. Pour $x = 0,20$, dès 30 mn de maturation, la poudre présente un rapport d'intensité R_I positif et sa valeur augmente au cours de la synthèse (Figure III-9c). L'apparition d'HA est ici immédiate et sa teneur augmente avec le temps de maturation.

Lorsque $x = 0,05$, la même évolution de composition en phase cristalline est observée, que le précurseur de silicium soit présent ou non au cours de la synthèse. La présence de silicium à hauteur de $x = 0,05$ n'influence pas la composition cristalline du système. Pour des valeurs de x plus élevées, l'évolution des phases cristallines des poudres synthétisées en présence de silicium reste similaire. Au contraire, sans silicium, la proportion d'HA contenue dans les poudres augmente lorsque x augmente.

En présence de silicium et quelle que soit sa teneur x , le temps nécessaire pour obtenir une poudre ne contenant que la phase cristalline β -TCP ($R_I = 0$) varie peu. Il est compris entre 60 et 90 mn. En l'absence de silicium, au contraire, ce temps diminue d'une valeur comprise entre 90 à 120 mn (Figure III-9a) à une valeur inférieure à 30 mn lorsque la teneur « fictive » en silicium augmente (Figure III-9c).

Pour obtenir des poudres ne présentant que la phase cristalline de β -TCP en présence de silicium, les temps de maturation sont ici, dans le petit réacteur, plus grand que lors de l'étude menée dans le grand réacteur. Ceci serait lié, notamment, au volume réactionnel plus grand dans le réacteur GR (3,5 L) que dans le PR (1,0 L). La différence de régulation des paramètres de synthèse (pH et température) entre les deux réacteurs pourrait également être en cause.

Cette étude menée par DRX révèle la nature des phases cristallines présentes dans les poudres synthétisées avec du silicium. Cependant, les clichés de DRX (Figure III-7) ne mettent en évidence aucune phase secondaire pouvant traduire la présence du silicium. Pour interpréter davantage ces résultats, d'autres moyens de caractérisation doivent être mis en œuvre afin de localiser le silicium au sein des poudres. Ainsi, la suite de ce paragraphe est consacrée à la poursuite de la caractérisation des poudres calcinées à 1000°C pendant 15 h. Après avoir complété la caractérisation des phases cristallines en présence au sein des poudres, par

analyse thermique différentielle et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, la dernière partie de ce paragraphe présente les résultats des analyses chimique et structurale.

III.2.1.c. Caractérisation thermique des poudres calcinées

Le seuil de détection de l'HA par diffraction des rayons X est de 0,5 % massique [RAY01] alors qu'il est de 4 % massique pour le β -CPP [DES03]. Pour pallier le manque de précision de détection du pyrophosphate de calcium β , une méthode alternative consiste à observer le comportement thermique des poudres par ATD.

La Figure III-10 présente les courbes d'analyse thermique différentielle de poudres issues du réacteur GR, préalablement calcinées à 1000°C pendant 15 h. Ce traitement thermique préliminaire a pour but d'évacuer les résidus de synthèse et donc de permettre une analyse plus fine du comportement en température des poudres. Les courbes présentées, pour les deux teneurs en silicium, sont celles obtenues dans le cas où seule la phase β -TCP est détectée par DRX, c'est-à-dire pour 70 mn de maturation lorsque $x = 0,05$ et 30 mn lorsque $x = 0,10$. Sur ces graphiques, est également représentée, pour chaque teneur en silicium, l'analyse ATD d'une poudre contenant du β -CPP et d'une poudre contenant de l'HA. A titre de référence, est également reproduit sur ces dernières le spectre de l'analyse obtenue lorsque $x = 0$.

Pour les poudres présentant de l'HA, soit pour un temps de maturation supérieur à 70 mn lorsque $x = 0,05$ (Figure III-10a) et supérieur à 30 mn pour $x = 0,10$ (Figure III-10b), seuls les effets thermiques correspondants à la transformation de la phase TCP sont observables. Un pic endothermique apparaît à environ 1170°C lorsque $x = 0,05$ et 1160°C lorsque $x = 0,10$. Il est caractéristique de la transformation allotropique $\beta \rightarrow \alpha$ du phosphate tricalcique.

En revanche, pour les poudres calcinées obtenues après un temps de maturation inférieur à 70 mn lorsque $x = 0,05$ et inférieur à 30 mn lorsque $x = 0,10$, deux phénomènes endothermiques sont enregistrés. Le premier pic, correspondant à la transformation allotropique du TCP, débute à 1185°C pour $x = 0,05$ et 1175°C pour $x = 0,10$. Le second phénomène, intervenant vers 1280°C pour les deux teneurs en silicium, traduit la présence de pyrophosphate de calcium β au sein de la poudre. A cette température a lieu la transformation allotropique $\beta \rightarrow \alpha$ du CPP suivi de sa fusion [DES03]. En présence de β -CPP, la température de transformation allotropique du TCP augmente. De tels résultats ont déjà été observés dans des systèmes similaires [RYU02; DES07].

L'analyse ATD de la poudre ne contenant pas de silicium après calcination à 1000°C pendant 15 h ($x = 0$) ne révèle qu'un seul phénomène endothermique, à 1220°C, ce qui traduit l'absence de pyrophosphate de calcium β dans cette poudre.

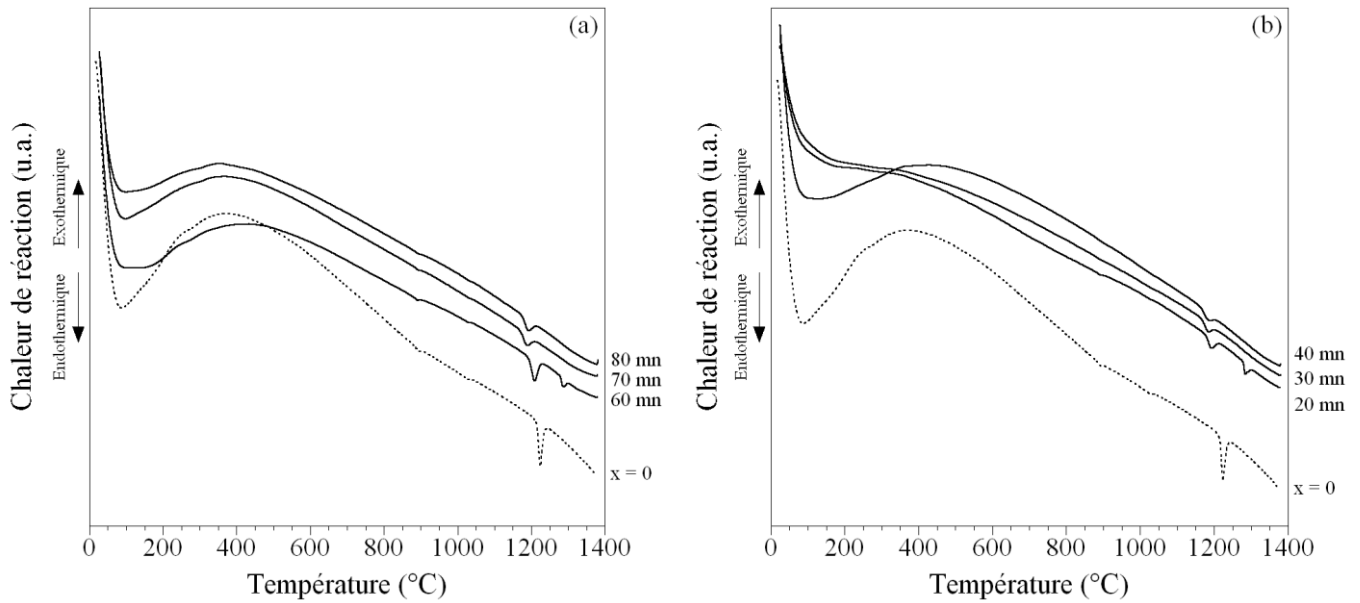


Figure III-10 : Courbes d'analyses thermiques différentielles (ATD) des poudres synthétisées dans le réacteur GR puis calcinées à 1000°C pendant 15 h avec (a) $x = 0,05$ et (b) $x = 0,10$

III.2.1.d. Caractérisation spectroscopique des poudres calcinées

Pour compléter la caractérisation des poudres issues du réacteur GR et calcinées à 1000°C pendant 15 h, leurs spectres FT-IR sont présentés à la Figure III-11.

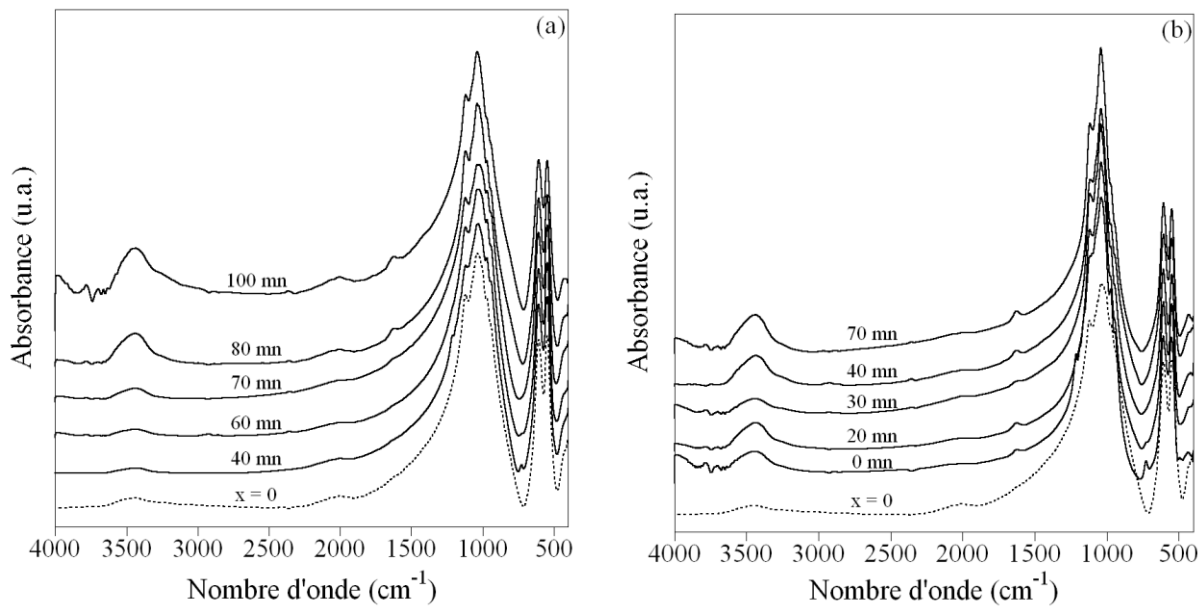


Figure III-11 : Spectres FT-IR des poudres synthétisées dans le réacteur GR puis calcinées à 1000°C pendant 15 h pour différents temps de maturation avec (a) $x = 0,05$ et (b) $x = 0,10$

Pour faciliter sa lecture, les graphiques ont été divisés en trois domaines, de 4000 à 3000 cm^{-1} , de 1500 à 800 cm^{-1} et de 900 à 400 cm^{-1} . Les figures résultantes sont données à la Figure III-12, pour $x = 0,05$, et à la Figure III-13 pour $x = 0,10$. A titre de référence, est également reporté sur ces dernières le spectre de la poudre obtenue lorsque $x = 0$.

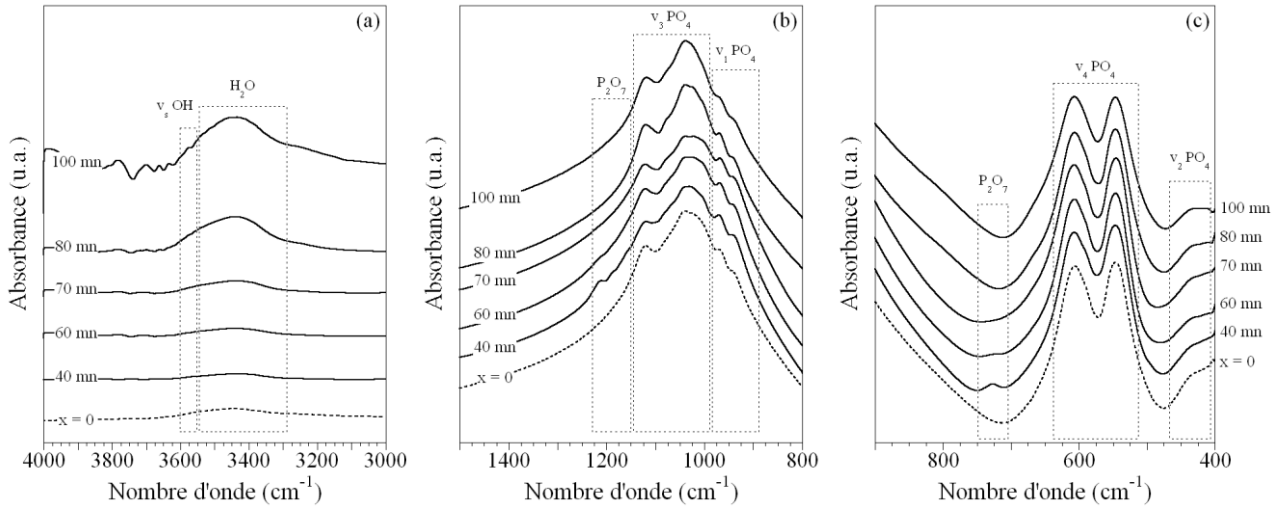


Figure III-12 : Spectres FT-IR des poudres synthétisées dans le réacteur GR et calcinées à 1000°C pendant 15 h pour différents temps de maturation et pour $x = 0,05$

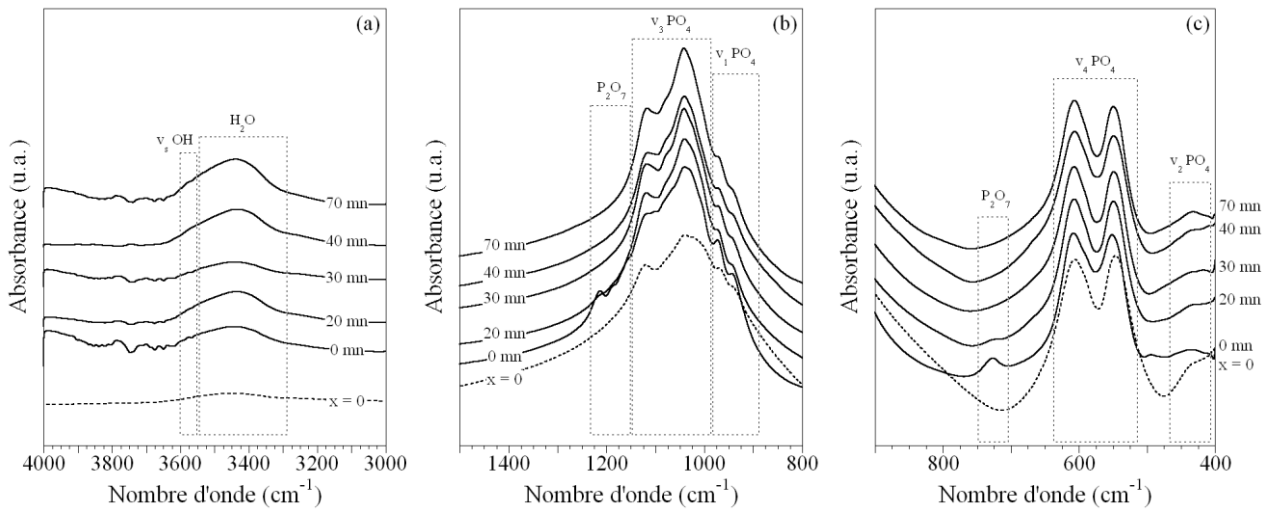


Figure III-13 : Spectres FT-IR des poudres synthétisées dans le réacteur GR et calcinées à 1000°C pendant 15 h pour différents temps de maturation et pour $x = 0,10$

Quel que soit le temps de maturation ou la teneur en silicium, les bandes relatives aux groupements phosphate sont présentes. Lorsque $x = 0$, seules ces bandes d'absorption sont détectées. Pour un temps de maturation inférieur à 70 mn lorsque $x = 0,05$ et inférieur à 30 mn lorsque $x = 0,10$, de nouvelles bandes d'absorption apparaissent à 1215 cm^{-1} (Figure III-12b et Figure III-13b) et à 725 cm^{-1} (Figure III-12c et Figure III-13c). Elles sont attribuées au

pyrophosphate de calcium β . L'intensité de ces bandes diminue lorsque le temps de maturation augmente, soit, quand la quantité de β -CPP dans la poudre diminue.

Lorsque la poudre contient de l'HA, soit au delà de 70 mn de maturation pour $x = 0,05$ et au-delà de 30 mn lorsque $x = 0,10$, seules les bandes d'absorption caractéristiques des groupements phosphate sont mises en évidence. Caractérisée par FT-IR, l'hydroxyapatite présente habituellement deux bandes d'absorption supplémentaires attribuées aux groupements OH et situées à 3580 cm^{-1} et à 630 cm^{-1} . Ici, ces bandes d'absorption sont inexistantes dans les poudres contenant de l'HA pourtant détectée par DRX (Figure III-12a et c et Figure III-13a et c).

Pour comprendre ce phénomène, les poudres synthétisées dans le réacteur PR pour $x = 0,05$ et $x = 0,20$, en présence ou non de silicium, ont été caractérisées par FT-IR après calcination à 1000°C pendant 15 h. La Figure III-14 illustre le résultat de ces analyses dans le domaine compris entre 4000 et 3600 cm^{-1} . Les spectres sont normalisés en intensité et l'échelle des absorbances est la même sur tous les graphiques. Les valeurs des rapports d'intensité R_I des poudres (Figure III-9) sont rappelées entre parenthèses.

Concernant les synthèses réalisées sans silicium (Figure III-14b et d), la bande d'absorption caractéristique de la présence de groupements OH est visible à partir de 120 mn pour $x = 0,05$ et dès 30 mn pour $x = 0,20$. L'intensité de cette bande d'absorption augmente avec le temps de maturation traduisant une augmentation de la proportion d'HA au sein des poudres. Ces résultats sont en accord avec les valeurs des rapports d'intensité R_I (Figure III-9a et c). En effet, un rapport R_I positif traduit la présence d'HA dans la poudre.

Pour les poudres issues des synthèses réalisées avec du silicium (Figure III-14a et c), cette bande d'absorption centrée à 3580 cm^{-1} n'est visible qu'à partir de 120 mn pour $x = 0,05$ et elle n'apparaît pas dans le cas où $x = 0,20$. Or, lorsque $x = 0,20$, le rapport d'intensité R_I des poudres est positif à partir de 120 mn de maturation, donc la poudre contient de l'HA.

La substitution de silicium sous forme de tétraèdres de silicate dans la structure de l'HA s'accompagne de la création de lacunes de groupements hydroxydes [PAL08]. Dans le cas présent, l'incorporation du silicium dans l'hydroxyapatite pourrait expliquer la diminution de l'intensité de la bande d'absorption des groupements hydroxyde. Pour éclaircir ce point, une étude structurale est nécessaire.

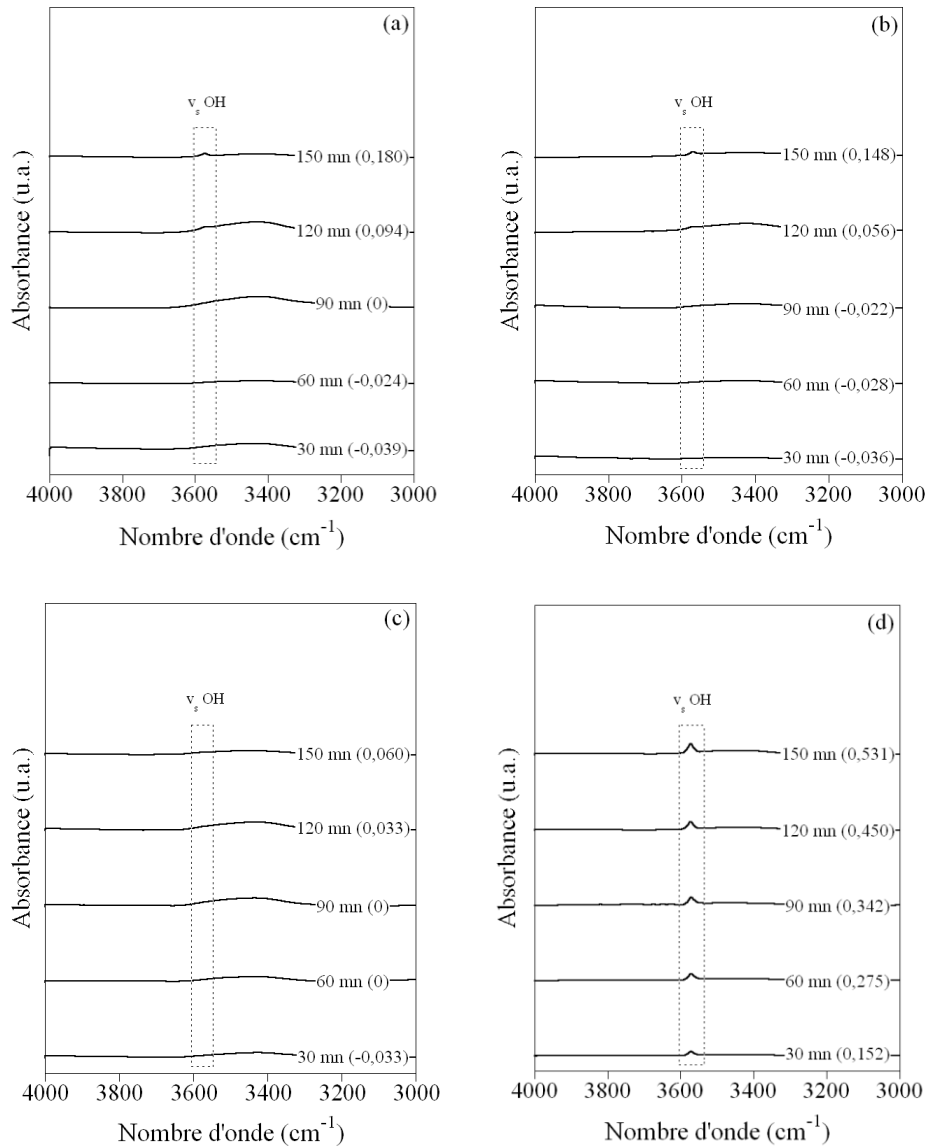


Figure III-14 : Spectres FT-IR dans la zone 4000-3000 cm⁻¹ des poudres calcinées à 1000°C pendant 15 h, (a) Si_{0,05}-β-TCP_{PR}, (b) (Si)_{0,05}-β-TCP_{PR}, (c) Si_{0,20}-β-TCP_{PR} et (d) (Si)_{0,20}-β-TCP_{PR}

Cette étude spectroscopique confirme que les poudres synthétisées dans le réacteur GR après 10 h de maturation sans silicium, après 70 mn lorsque $x = 0,05$ et 30 mn lorsque $x = 0,10$, sont composées de β-TCP. Aucune autre phase cristalline n'est mise en évidence dans ces poudres. Lorsque la poudre contient de l'HA, les bandes d'absorption attribuées aux groupements hydroxyde ne sont pas systématiquement révélées par FT-IR. Le paragraphe suivant s'attache à présenter la caractérisation structurale des poudres calcinées constituées d'un mélange d'HA et de β-TCP ainsi que celles ne contenant que la phase cristalline de β-TCP. Ces dernières poudres ont de plus fait l'objet d'une analyse chimique.

III.2.1.e. Caractérisation structurale et chimique des poudres calcinées

➤ Cas des poudres contenant un mélange d'HA et de β -TCP

Lorsque de l'HA est détectée dans les poudres par DRX, la faible intensité voire l'absence des bandes d'absorption des groupements hydroxyde pourrait indiquer que du silicium est incorporé dans l'HA. Pour élucider ce point, un diffractogramme large (dans l'intervalle $[10-130^\circ]$, avec un pas de $0,015^\circ$ en 2θ et un temps de comptage de 5 s) de DRX a été réalisé sur la poudre contenant à la fois le taux de silicium le plus fort et la quantité d'HA la plus élevée, soit la poudre synthétisée dans le réacteur PR avec $x = 0,20$ et pour 150 mn de maturation. A ce diffractogramme est comparé celui de la poudre de β -TCP (issue du réacteur GR pour $x = 0$) acquis dans les mêmes conditions. Les positions des raies de diffraction de l'HA et du β -TCP, données par leurs fiches PDF respectives, sont également reportées. Le graphique résultant est présenté sur la Figure III-15.

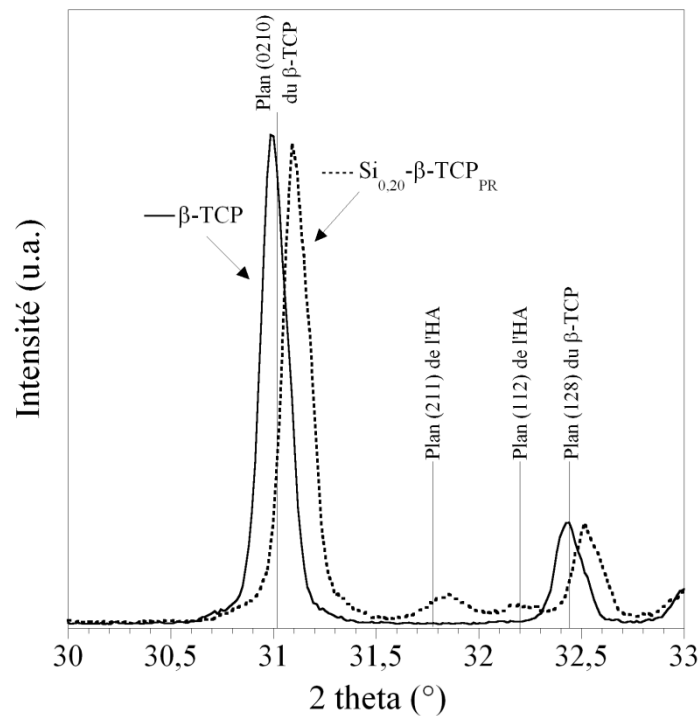


Figure III-15 : Diagrammes de DRX du β -TCP et de $\text{Si}_{0,20}$ - β -TCP_{PR} comparés aux fiches PDF de l'HA et du β -TCP

Sur la plage allant de 30 à 33° en 2θ , deux pics sont présents sur le spectre du β -TCP. Ils correspondent aux positions indiquées par la fiche PDF N°9-0169 du β -TCP. La poudre de $\text{Si}_{0,20}$ - β -TCP_{PR} (150 mn) présente, quant à elle, quatre pics de diffraction car elle contient du β -TCP et de l'HA. La comparaison de la position des pics de diffraction avec les positions annoncées par les fiches PDF du β -TCP et de l'HA met en évidence un décalage des pics du

diffractogramme de la poudre contenant du silicium ($\text{Si}_{0,20}\text{-}\beta\text{-TCP}_{\text{PR}}$) vers les grands angles. Sur le diffractogramme de $\text{Si}_{0,20}\text{-}\beta\text{-TCP}_{\text{PR}}$, le pic de diffraction de la raie (211) de l'HA d'intensité relative 100 % subit un décalage de $+0,082^\circ$ en 2θ par rapport à sa fiche PDF. Il en est de même pour le pic de la raie (0210) du $\beta\text{-TCP}$ d'intensité relative 100 % décalée de $2\theta = +0,063^\circ$ par rapport à sa fiche PDF.

Ces résultats suggèrent une modification de la structure du $\beta\text{-TCP}$ et de l'HA en présence de silicium et semblent indiquer que lorsque la poudre synthétisée contient de l'HA, le silicium se substitue dans sa structure.

➤ Cas des poudres ne contenant que la phase cristalline de $\beta\text{-TCP}$

Les poudres calcinées à 1000°C pendant 15 h ne contenant ni pyrophosphate de calcium β , ni hydroxyapatite, soit les poudres obtenues après 10 h de maturation lorsque $x = 0$, 70 mn lorsque $x = 0,05$ et 30 mn pour $x = 0,10$, ont fait l'objet d'une analyse chimique par ICP/AES.

Les quantités de silicium mesurées ont permis de remonter à la valeur expérimentale de x , la teneur en silicium (Tableau III-3). Cette analyse permet de mettre en évidence la présence de silicium dans les poudres synthétisées. Bien que les mesures issues des dosages (x_{Si} mesuré) soient toujours plus faibles que celles définies pour la synthèse des poudres (x_{Si} hypothétique), elles restent quasiment identiques.

Tableau III-3 : Teneur x en silicium théorique et mesurée par ICP/AES

x_{Si} théorique (mol)	0	0,05	0,10
Temps de maturation	10 h	70 mn	30 mn
x_{Si} hypothétique (réactifs de synthèse)	0	$0,05 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$
x_{Si} mesuré par ICP/AES (mol)	0	$0,04 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$

Des affinements de paramètres de maille ont été réalisés sur l'ensemble des poudres ne contenant que la phase cristalline de $\beta\text{-TCP}$ issues des réacteurs GR et PR. Quelle que soit la poudre analysée, les propriétés d'acquisition des spectres sont identiques tout comme les paramètres d'affinement employés. L'ensemble de ces caractéristiques est résumé au Tableau III-4.

La Figure III-16 présente, pour chaque teneur en silicium, un diffractogramme caractéristique acquis en haute résolution afin de réaliser les affinements de paramètre de maille. La majorité des pics de diffraction observée sur ces diffractogrammes appartient à la fiche PDF N°9-0169 du $\beta\text{-TCP}$. Mais pour les poudres contenant du silicium, de nouveaux pics de très faible intensité apparaissent à $2\theta = 14,7 ; 16,3 ; 18,1$ et $20,8^\circ$ (pics indiqués par les flèches). La

phase responsable de l'apparition de ces raies de diffraction n'a pas pu être identifiée. L'examen détaillé de la Figure III-16 montre de plus, que les diffractogrammes des poudres de β -TCP contenant du silicium ($x > 0$) sont décalés vers les grands angles par rapport au diffractogramme du β -TCP sans silicium ($x = 0$). L'ensemble de ces observations suggère une modification de la structure du β -TCP lorsque celui-ci est synthétisé en présence de silicium.

Tableau III-4 : Caractéristiques des affinements

<i>Propriétés des spectres</i>	
Longueur d'onde $\text{CuK}\alpha_1/\text{K}\alpha_2$ (Å)	1,54060/1,54439
Domaine angulaire 2θ (°)	10-130
Pas angulaire (°)	0,015
Temps de pause (s)	5
Nombre de points	7996
<i>Paramètres d'affinement</i>	
Système cristallin	Rhomboédrique
Groupe d'espace	R-3c
Affinement du bruit de fond	Automatique à l'aide d'une fonction polynomiale
Fonction d'affinement	Pseudo-Voigt
Nombre de paramètres affinés	12

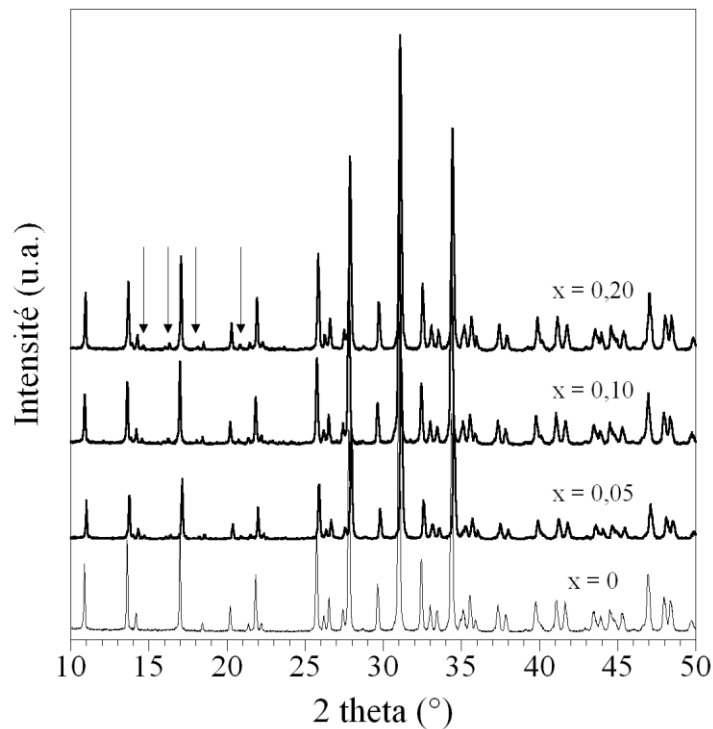


Figure III-16 : Diffractogrammes haute résolution dans le domaine en 2θ [10-50°] de poudres contenant différentes teneur en silicium et calcinées à 1000°C pendant 15 h

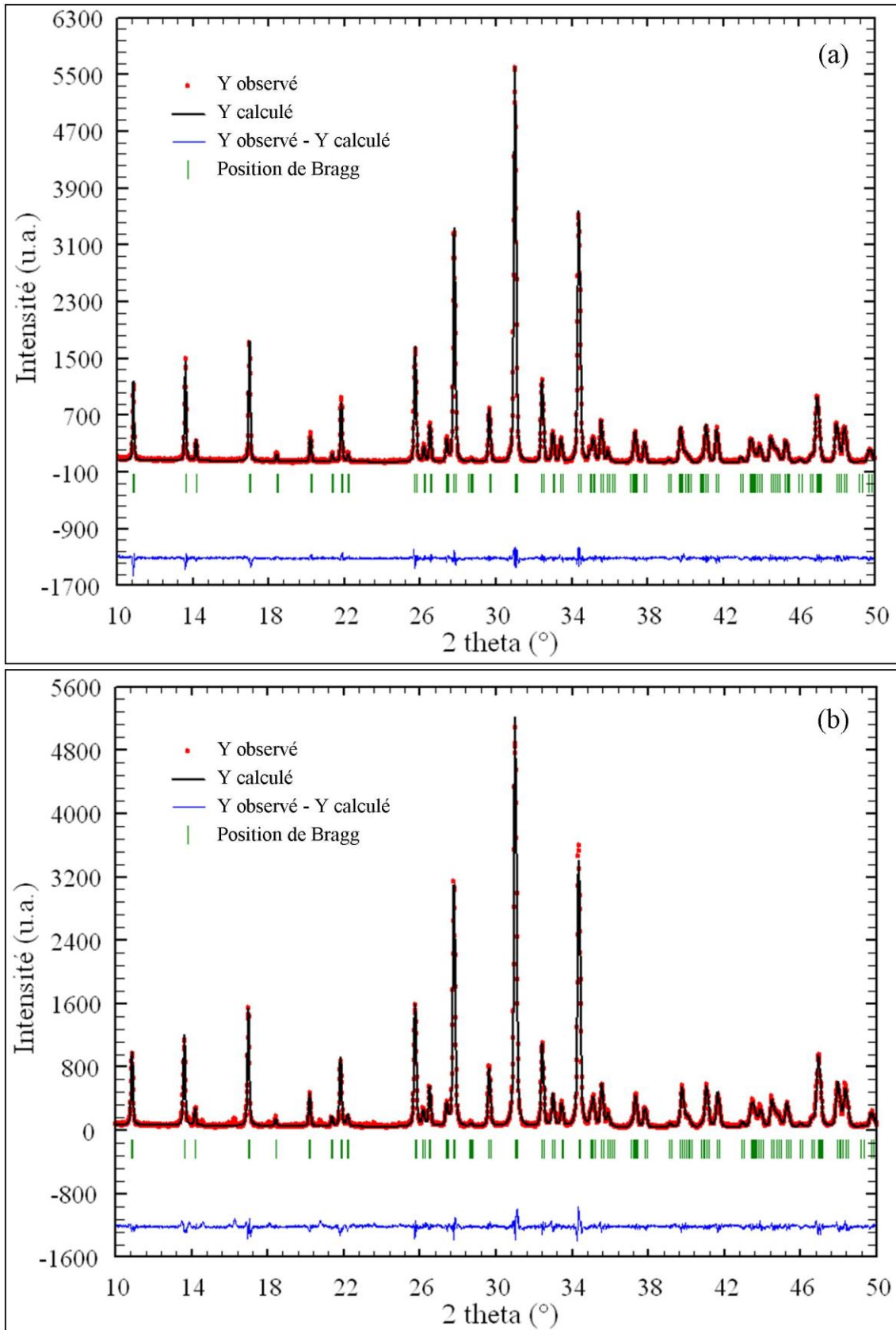


Figure III-17 : Diffractogramme expérimental (Y observé), calculé (Y calculé) et différence mesurée (Y observé – Y calculé) dans le domaine en 2θ [10-50°] à l'issue de l'affinement des poudres de β -TCP contenant une teneur en silicium de (a) $x = 0$ et (b) $x = 0,20$

La Figure III-17 permet de comparer le résultat de l'affinement (Y calculé) au diffractogramme de la poudre (Y observé) ainsi que la différence entre ces deux diagrammes. Cette figure rend compte de la bonne adéquation entre la fonction affinée et les valeurs mesurées expérimentalement. Néanmoins, pour l'échantillon de poudre contenant du silicium, les pics secondaires mis en évidence sur la Figure III-16 ne peuvent pas être affinés car ils ne correspondent pas à la fiche PDF du β -TCP (Figure III-17b).

Le bon accord entre les données observées et calculées est indiqué par les facteurs de confiance répertoriés dans le Tableau III-5. Les facteurs de confiance les plus faibles sont rencontrés pour la poudre ne contenant pas de silicium ($x = 0$), soit, celle ne présentant pas de pics de diffraction non identifiés. Les résultats des paramètres a et c affinés ainsi que du volume de la maille résultante sont présentés à la Figure III-18.

Tableau III-5 : Facteurs de confiance obtenus à l'issue des affinements de paramètres de maille

Teneur en silicium x (mol)	0	0,05	0,10	0,10	0,20	
R_p (%)	10,2	11,5	11,9	11,0	10,7	11,1
R_{wp} (%)	13,5	15,5	15,7	15,0	14,2	14,6
χ^2	1,322	1,473	1,648	1,537	1,407	1,688

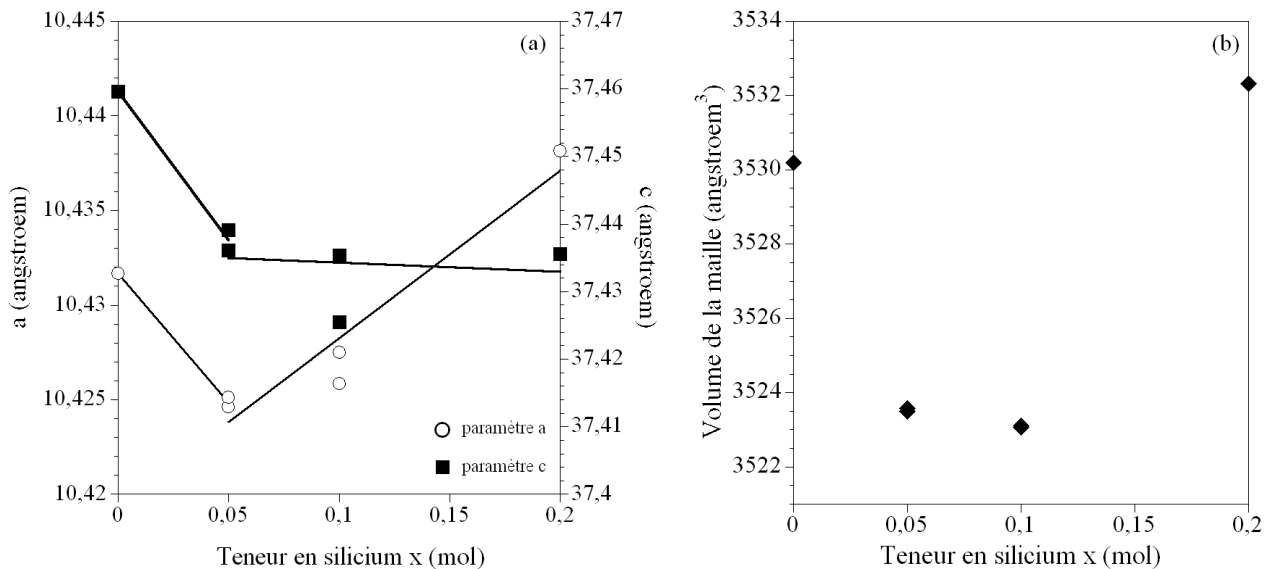


Figure III-18 : Paramètres de mailles a et c (a) et volume de la maille (b) en fonction de la teneur x en silicium

Selon l'étude de M. Yashima et coll. par diffraction de neutron [YAS03], le β -TCP présente les paramètres de maille suivants : $a = b = 10,435 \text{ \AA}$ et $c = 37,403 \text{ \AA}$ pour un volume de $3527,5 \text{ \AA}^3$. Concernant la poudre de β -TCP, le paramètre de maille a est proche

de la valeur mesurée par M. Yashima et coll. (10,432 Å) tandis que c est nettement plus important (37,459 Å). Avec l'addition de silicium, les paramètres de maille a et c diminuent jusqu'à une teneur en silicium de $x = 0,05$ (Figure III-18a). Au-delà, le paramètre a augmente tandis que c semble se stabiliser. En conséquence, le volume de la maille diminue dans un premier temps avec l'addition de silicium puis augmente au-delà de $x = 0,10$ (Figure III-18b).

L'étude des poudres calcinées à 1000°C pendant 15 h a révélé une grande variabilité de la composition en phase cristalline en fonction du temps de maturation. L'analyse chimique par ICP/AES a permis de mettre en évidence la présence du silicium au sein de ces poudres mais sa localisation dans la structure n'est toujours pas déterminée. Ce point sera discuté en fin de chapitre après la caractérisation des matériaux frittés. Quoiqu'il en soit, en présence de silicium et pour des conditions de synthèses particulières, il est possible d'obtenir du β -TCP cristallin. Ainsi, les poudres ne contenant ni pyrophosphate de calcium β , ni hydroxyapatite, sont les poudres obtenues après 10 h de maturation lorsque $x = 0$, après 70 mn de maturation lorsque $x = 0,05$ et après 30 mn de maturation pour $x = 0,10$. De plus, l'ensemble des analyses permet de confirmer que les poudres brutes sont constituées de TCP apatitique de formule $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{HPO}_4)(\text{OH})_n\text{H}_2\text{O}$.

La suite de ce manuscrit s'attache plus particulièrement à l'étude de ces trois compositions issues du réacteur GR. Elles sont par la suite notées CDHA, $\text{Si}_{0,05}$ -CDHA et $\text{Si}_{0,10}$ -CDHA lorsqu'elles sont brutes et β -TCP, $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP et $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP dans le cas où elles sont cristallisées. Les paragraphes suivants sont consacrés à la présentation des caractéristiques physiques et du comportement thermique de ces poudres.

III.2.2. Morphologie et caractéristiques physiques des poudres brutes

Le Tableau III-6 présente les caractéristiques physiques des poudres brutes de synthèse CDHA, $\text{Si}_{0,05}$ -CDHA et $\text{Si}_{0,10}$ -CDHA. La densité des poudres (ρ) ainsi que leur surface spécifique (S_{brute}) diminuent avec la teneur en silicium. A partir de ces données, le diamètre moyen équivalent des particules élémentaires (Φ_{moyen}) est estimé autour de 25 nm pour les trois compositions (cf. Expression II-1, p. 63). L'observation des micrographies obtenues au MEB (Figure III-19) indique que les particules sont agglomérées et la taille des agglomérats se situe autour de 1 μm . Quelle que soit la teneur en silicium, la morphologie des poudres brutes est similaire.

Tableau III-6 : Surface spécifique (S_{brute}), densité (ρ) et estimation du diamètre moyen équivalent des particules (Φ_{moyen}) des poudres brutes (synthèses réalisées à 30°C et pH = 7)

Poudre	Temps de maturation	S_{brute} ($m^2 \cdot g^{-1}$)	ρ ($g \cdot cm^{-3}$)	Φ_{moyen} (nm)
CDHA	10 h	$89,0 \pm 0,3$	$2,76 \pm 0,01$	$24,4 \pm 0,1$
Si _{0,05} -CDHA	70 mn	$81,3 \pm 0,2$	$2,62 \pm 0,01$	$28,2 \pm 0,1$
Si _{0,10} -CDHA	30 mn	$76,5 \pm 0,2$	$2,57 \pm 0,01$	$30,5 \pm 0,1$

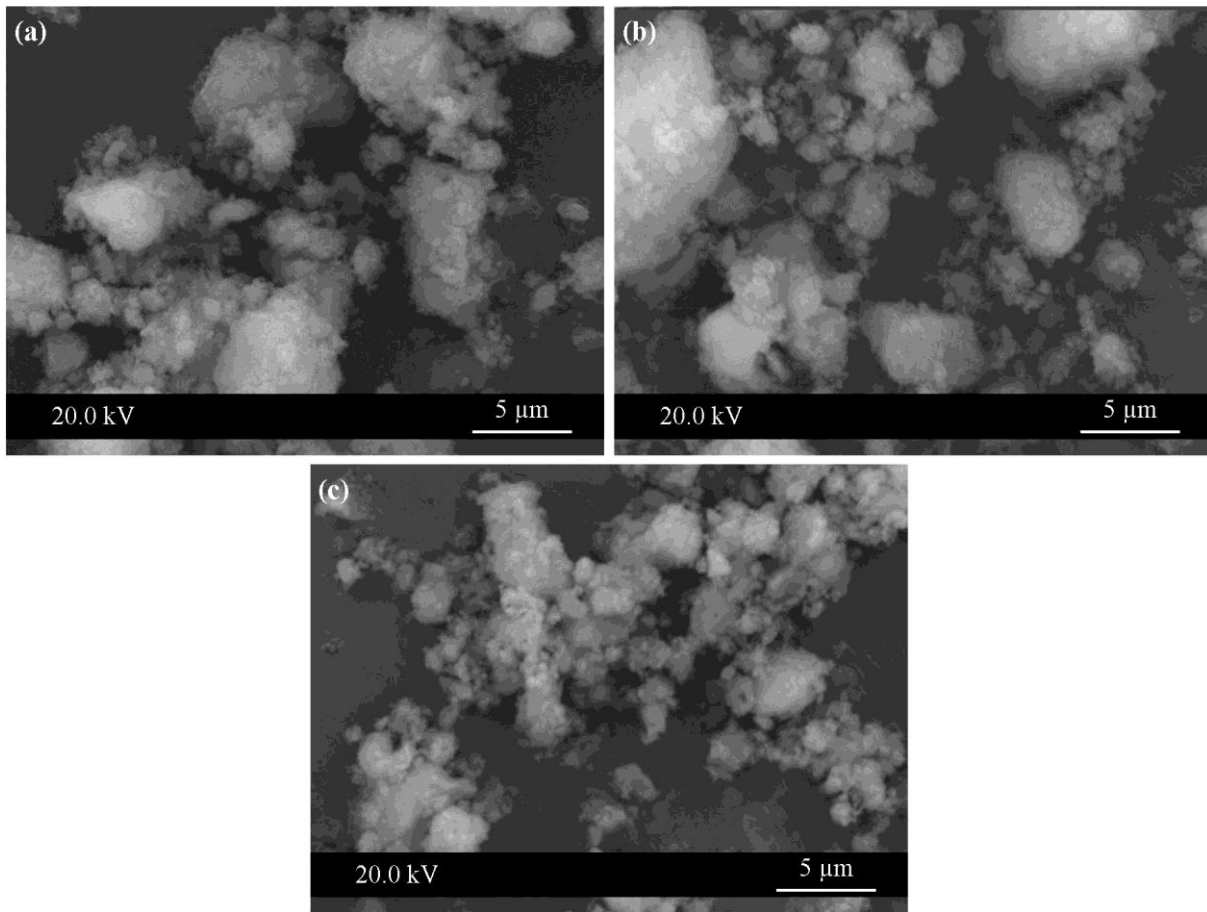


Figure III-19 : Observation MEB des poudres brutes (a) CDHA, (b) Si_{0,05}-CDHA et (c) Si_{0,10}-CDHA

Les caractéristiques structurales des poudres brutes de phosphate tricalcique apatitique ne sont pas significativement modifiées par l'addition de silicium. Dans le cas de la synthèse d'hydroxyapatite silicatée et pour des teneurs en silicium similaires à cette étude (soit voisines de 0,5 et 1,0 % massique), la densité des poudres brutes reste constante [PAL08]. Cependant, ces poudres étaient obtenues pour des temps de maturation de 15 mn, et ce, quelle que soit la teneur en silicium, tandis que dans le cas du phosphate tricalcique apatitique le temps de maturation diminue de 10 h à 30 mn avec l'augmentation de la teneur en silicium. Il y a donc

une influence du silicium sur les caractéristiques physiques des poudres de TCP apatitique synthétisées.

III.2.3. Comportement thermique des poudres

Afin de préciser les évolutions et éventuelles transformations au cours de calcinations, le comportement thermique des poudres a été suivi par thermogravimétrie (TG) et analyse thermique différentielle (ATD). Différentes calcinations ont également été réalisées sous air tous les 100°C de 600 à 900°C avec une durée de palier de 2 h dans un four Super Kanthal (montée en température de 20°C·min⁻¹). Après retour à la température ambiante, les poudres sont caractérisées par diffraction des rayons X et spectroscopie infrarouge.

III.2.3.a. Analyses thermiques

Les analyses thermiques différentielles des poudres de TCP apatitique (poudres brutes) sont présentées à la Figure III-20. L'allure des courbes diffère peu d'une composition à une autre. Les courbes d'analyse thermogravimétriques (TG) de ces mêmes poudres ainsi que leurs dérivées sont présentées à la Figure III-21. Quelle que soit la teneur en silicium, les poudres subissent une perte de masse continue jusqu'à 800°C (Figure III-21a). Les courbes dérivées d'analyses thermogravimétriques sont constituées d'une succession de pics pouvant être associés à des départs gazeux (Figure III-21b). Ces courbes mettent en évidence différents domaines de température, notés I, II et III et caractérisés par des cinétiques de perte de masse distinctes. Les pertes de masses associées à ces domaines sont répertoriées dans le Tableau III-7.

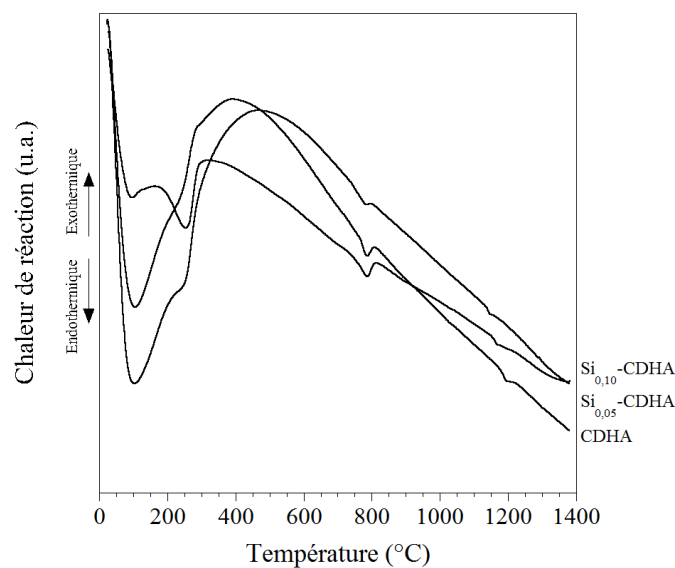


Figure III-20 : Courbes d'analyses thermiques différentielles (ATD) des poudres brutes

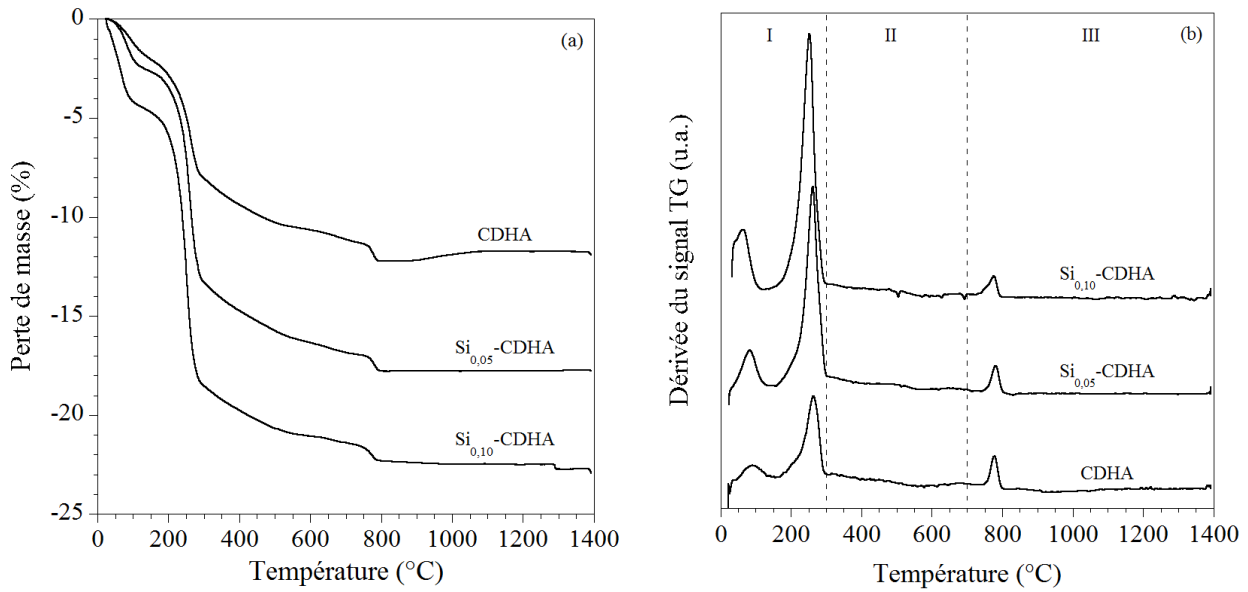


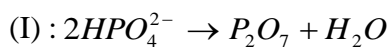
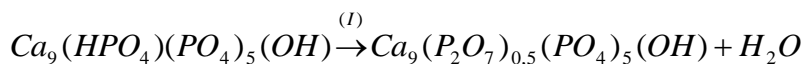
Figure III-21 : (a) Courbes d'analyses thermogravimétriques (TG) et (b) dérivées des courbes d'analyses thermogravimétriques (dTG) des poudres brutes

Tableau III-7 : Perte de masse (%) observées lors de l'analyse TG des poudres brutes

Température (°C)	30	300	700	1400	Perte totale
Domaine	I	II	III		
CDHA	8,1	3,0	1,1		12,2
Si _{0,05} -CDHA	13,3	3,5	1,0		17,8
Si _{0,10} -CDHA	18,5	2,9	1,5		22,4

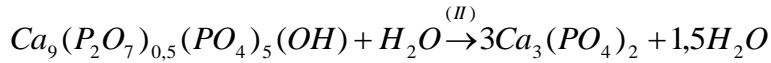
Dans le domaine de température I, s'étendant de la température ambiante à 300°C, les pertes de masses varient de 8,0 à 18,5 %. Elles sont principalement associées à des départs d'eau et de résidus de synthèses (NH₄⁺, NO₃⁻) et sont accompagnées de pics endothermiques.

Le second domaine de température s'étend de 300 à 700°C. Les pertes de masses enregistrées dans ce domaine, autour de 3 %, sont semblables quelle que soit la teneur en silicium. Elles proviennent de la condensation des ions hydrogénophosphate en ions pyrophosphate, selon l'équation (I), intervenant lors du mécanisme proposé par Mortier et coll. [MOR89] :



(Réaction 5)

Entre 700 et 1400°C, dans le domaine III, un départ gazeux autour de 760°C, accompagné d'un phénomène endothermique est observé. Les pertes de masse associées, autour de 1 %, correspondent à une réaction mettant en jeu les ions pyrophosphate $P_2O_7^{4-}$ selon le mécanisme (II) de la réaction ci-dessous :



La perte de masse est donc liée au départ d'eau qui accompagne cette réaction de décomposition de l'apatite en TCP. La température à laquelle cette réaction endothermique débute diminue de 767°C, lorsque $x = 0$, à 739°C pour $x = 0,10$ (Tableau III-8).

Le dernier phénomène endothermique, enregistré entre 1100 et 1300°C, est quant à lui associé à la transformation allotropique $\beta \rightarrow \alpha$ du TCP. Cette transformation, qui n'est associée à aucune perte de masse, démarre à une température qui décroît lorsque x augmente (Tableau III-8).

Tableau III-8 : Températures de début des réactions endothermiques intervenant au dessus de 600°C

x	0	0,05	0,10
600 < T(°C) < 900	767	752	739
1100 < T(°C) < 1300	1176	1154	1137

III.2.3.b. Calcination

La composition $Si_{0,10}$ -CDHA a été calcinée à différentes températures pour étudier les changements de phases mis en évidence par ATD. Les diffractogrammes de $Si_{0,10}$ -CDHA calcinée à différentes températures jusqu'à 1000°C sont représentés sur la Figure III-22. La structure cristallographique de cette poudre évolue de la température ambiante (poudre brute de synthèse) à 1000°C. Les pics de diffraction sont larges et mal définis jusqu'à 700°C. La poudre est, jusqu'à cette température de calcination, composée d'une apatite mal cristallisée. Au-delà de 700°C, l'allure des pics de diffraction indique que la poudre est cristallisée et qu'elle est constituée de β -TCP. Entre 700 et 800°C a eu lieu la décomposition de l'apatite en TCP. Ce résultat est en accord avec le phénomène endothermique précédemment observé à 739°C lorsque $x = 0,10$ (Figure III-20 et Tableau III-8). Lorsque la température augmente de 800 à 1000°C, aucune différence notable n'est observée sur les diffractogrammes, la poudre reste constituée de β -TCP.

Après calcinations à différentes températures, les poudres ont également été caractérisées par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et les spectres sont présentés sur la Figure III-23. Pour faciliter sa lecture, le graphique a été divisé en trois domaines, de 4000 à 3000 cm^{-1} , de 1300 à 800 cm^{-1} et de 800 à 400 cm^{-1} . Les figures résultantes sont données à la Figure III-24.

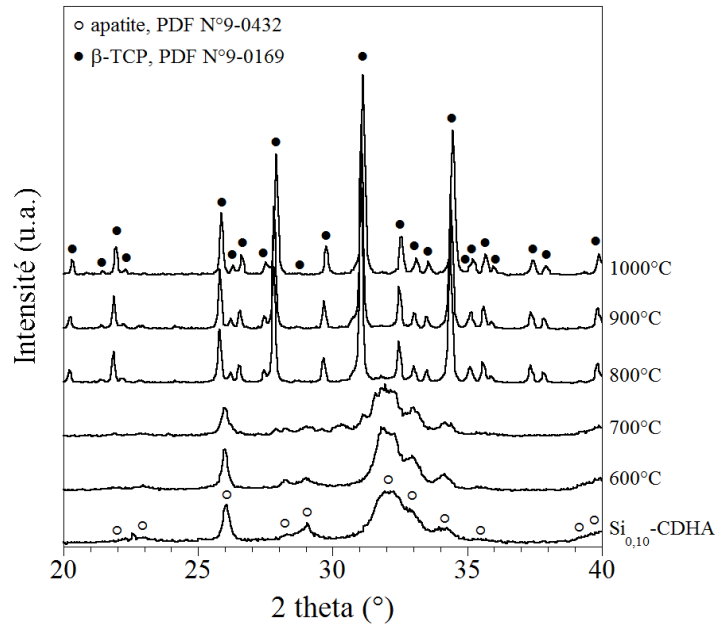


Figure III-22 : Diffractogrammes de $\text{Si}_{0.10}\text{-CDHA}$ calcinée à différentes températures

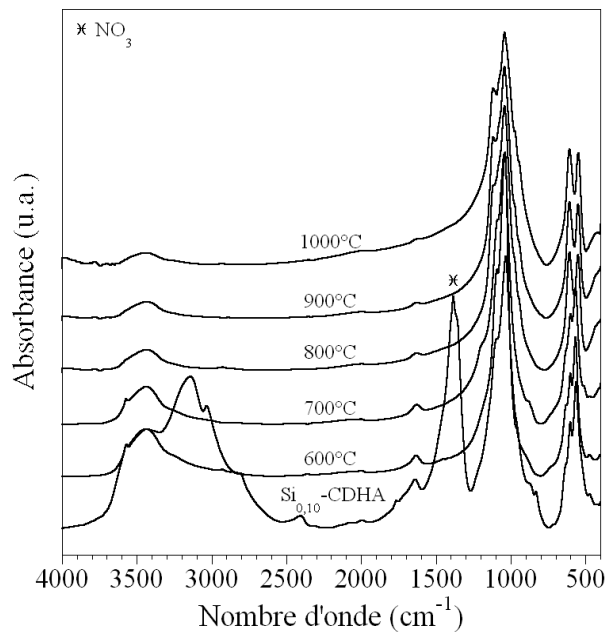


Figure III-23 : Spectres FT-IR de $\text{Si}_{0.10}\text{-CDHA}$ en fonction de la température de calcination

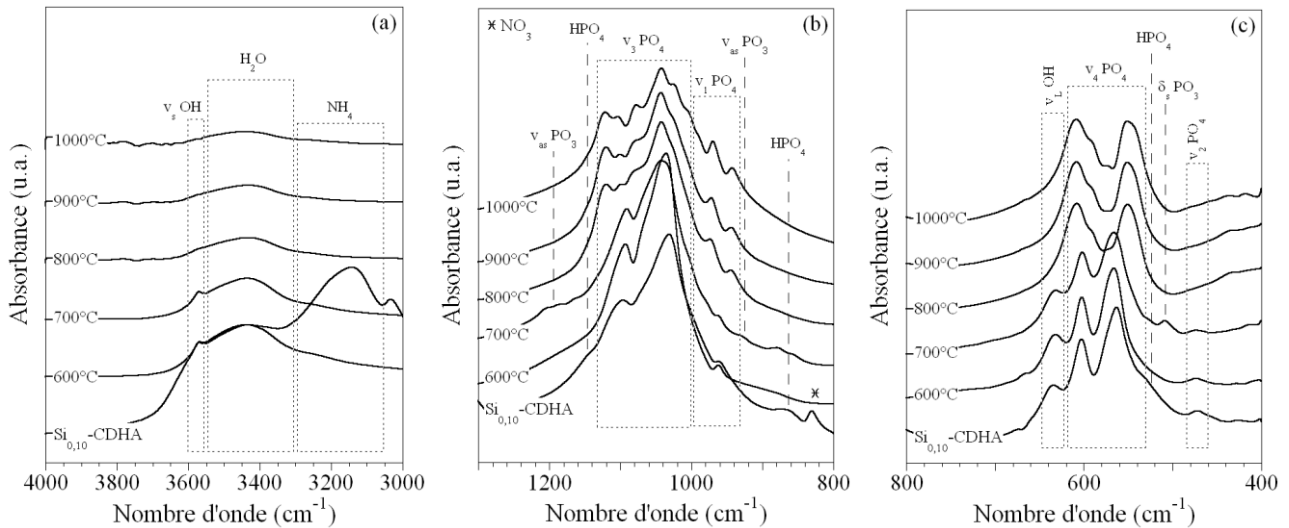


Figure III-24 : Spectres FT-IR de Si_{0,10}-CDHA en fonction de la température de calcination

Quelle que soit le traitement thermique appliqué, l'ensemble de ces spectres présente les bandes d'absorption caractéristiques des groupements phosphate. Sur le spectre de la poudre brute (Si_{0,10}-CDHA) les bandes relatives aux groupements NH₄ à 3150 cm⁻¹ (Figure III-24a) et NO₃ à 1380 (Figure III-23) et 820 cm⁻¹ (Figure III-24b) sont caractéristiques des résidus de synthèse azotés et disparaissent après calcination. Concernant les autres groupements caractéristiques, l'examen détaillé des spectres met en évidence deux domaines de température : le premier s'étendant de l'ambiante à 700°C et le second de 700 à 1000°C.

Dans le premier domaine de température, les spectres présentent les bandes d'absorption caractéristiques des groupements OH à 3575 cm⁻¹ (Figure III-24a) et à 675 cm⁻¹ (Figure III-24c) ainsi que HPO₄ à 1140, 875 cm⁻¹ (Figure III-24b) et 530 cm⁻¹ (Figure III-24c). Tandis que l'intensité des bandes HPO₄ diminue avec la température de calcination, de nouvelles bandes d'absorption, situées autour de 1200, 925 et 510 cm⁻¹, apparaissent à 700°C. Ces bandes sont attribuées à la liaison P-O-P des groupements P₂O₇ dans une structure apatitique [HEU77].

Avant 700°C, la présence d'ions hydrogénophosphate, phosphate et hydroxyde indique que les poudres sont composées d'une phase apatitique déficitaire en calcium de type Ca_{10-y}(HPO₄)_y(PO₄)_{6-y}(OH)_{2-y}. L'apparition des groupements P₂O₇ au détriment de ceux de HPO₄ à 700°C traduit le phénomène de condensation des ions hydrogénophosphates en ions pyrophosphate au cours du traitement thermique selon le mécanisme (I) de la Réaction 5.

Dans le second domaine de température, les bandes caractéristiques des groupements OH et P_2O_7 ont disparu. En effet, le pic endothermique précédemment observé autour de $750^{\circ}C$ (Figure III-20) est caractéristique de la réaction mettant en jeu les ions $P_2O_7^{4-}$ et OH^- selon le mécanisme (II) de la Réaction 6 et qui conduit à l'obtention de $Ca_3(PO_4)_2$. Donc pour les températures de calcination supérieures à $700^{\circ}C$, seules les bandes d'absorption relatives aux groupements phosphate du β -TCP apparaissent.

Cette étude a permis de mettre en évidence les différentes transformations que subissent les poudres à base de TCP apatitique et de silicium au cours d'un traitement thermique. Ces données sont nécessaires avant d'aborder l'étude du frittage de ces poudres.

III.3. Frittage des poudres

L'élaboration de matériaux en céramique nécessite généralement une étape de consolidation appelée frittage. Ce processus peut être décrit comme le passage d'un compact de poudre à un matériau cohérent sous l'action de la chaleur. Afin d'évaluer ultérieurement les propriétés biologiques des matériaux à base de phosphate tricalcique, l'étude du frittage de ces poudres est nécessaire. Cette partie consiste à déterminer les conditions de frittage naturel du phosphate tricalcique β contenant du silicium afin d'obtenir des matériaux denses.

III.3.1. Traitement thermique préalable

Afin d'obtenir des matériaux denses, il est conseillé de travailler avec des poudres constituées de TCP et non d'apatite [DES03]. L'étude du comportement thermique des poudres (paragraphe III.2.3) a permis de définir une température de calcination appropriée afin de transformer l'apatite en TCP. Ainsi, préalablement à leur mise en forme, les poudres subissent une calcination sous air à 750°C pendant 30 mn. La Figure III-25 expose les diffractogrammes des poudres à l'issue de ce programme de calcination.

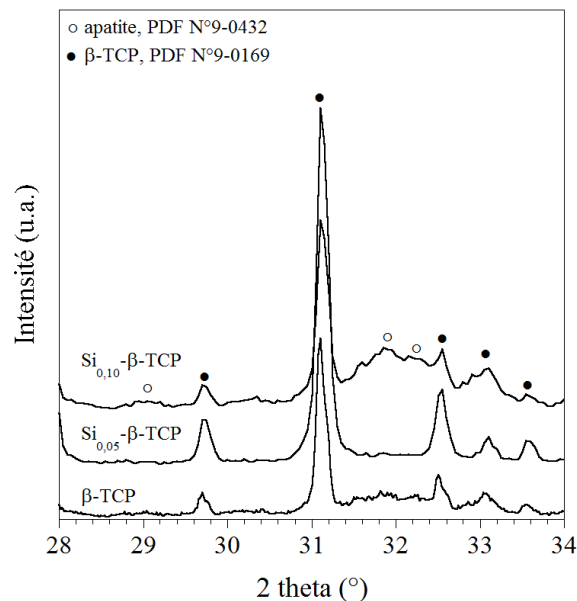


Figure III-25 : Diffractogrammes des poudres calcinées à 750°C pendant 30 mn

Après traitement thermique à 750°C pendant 30 mn, les poudres présentent majoritairement la structure du β -TCP. Les poudres brutes, composées d'apatite déficiente en calcium, se sont décomposées en quasi-totalité en β -TCP. Des pics de diffraction de faible intensité attribués à l'apatite sont observables sur les compositions β -TCP et Si_{0,10}- β -TCP traduisant la présence

de traces résiduelles de TCP apatitique. Ces résultats sont en accord avec les analyses ATD sauf pour la composition $Si_{0,10}$ - β -TCP dont la décomposition TCP apatitique \rightarrow β -TCP était observée à partir de 739°C (Tableau III-8). Cependant, les conditions expérimentales employées pour réaliser la calcination et l'analyse thermique différentielle sont différentes (quantité de poudre traitée, rampe de montée en température, atmosphère...) et la quantité d'apatite détectée après calcination reste faible.

Les poudres brutes de synthèse présentent des surfaces spécifiques élevées, de l'ordre de 80 $m^2 \cdot g^{-1}$ (Tableau III-6), ce qui rend pratiquement impossible la fabrication de compacts de poudre par pressage à cause du phénomène de feuilletage. Le traitement thermique préalable a également permis de modifier les caractéristiques physiques des poudres. La calcination des poudres à 750°C a permis de diminuer leur surface spécifique qui atteint des valeurs de l'ordre de 15 $m^2 \cdot g^{-1}$ (Tableau III-9). La morphologie des poudres après calcination (Figure III-26) est semblable quelle que soit la teneur en silicium. La taille des particules est inférieure à 0,5 μm . Ces particules sont agglomérées entre elles et la taille des agglomérats est de l'ordre du micromètre.

De telles caractéristiques physiques permettent de préparer des compacts de poudre dont les taux de compaction en cru atteignent des valeurs supérieures à 50 % de la densité théorique du β -TCP (Tableau III-9). Afin de définir le domaine de température approprié au frittage naturel de ces compacts de poudre, une étude dilatométrique est nécessaire et constitue l'objet du paragraphe suivant.

Tableau III-9 : Surfaces spécifiques des poudres calcinées à 750°C pendant 30 mn

Poudre	β -TCP	$Si_{0,05}$ - β -TCP	$Si_{0,10}$ - β -TCP
Surface spécifique ($m^2 \cdot g^{-1}$)	11,5 ± 0,1	11,6 ± 0,1	21,1 ± 0,2
Taux de compaction (%)	52,7 ± 0,1	56,5 ± 0,1	50,0 ± 1,0

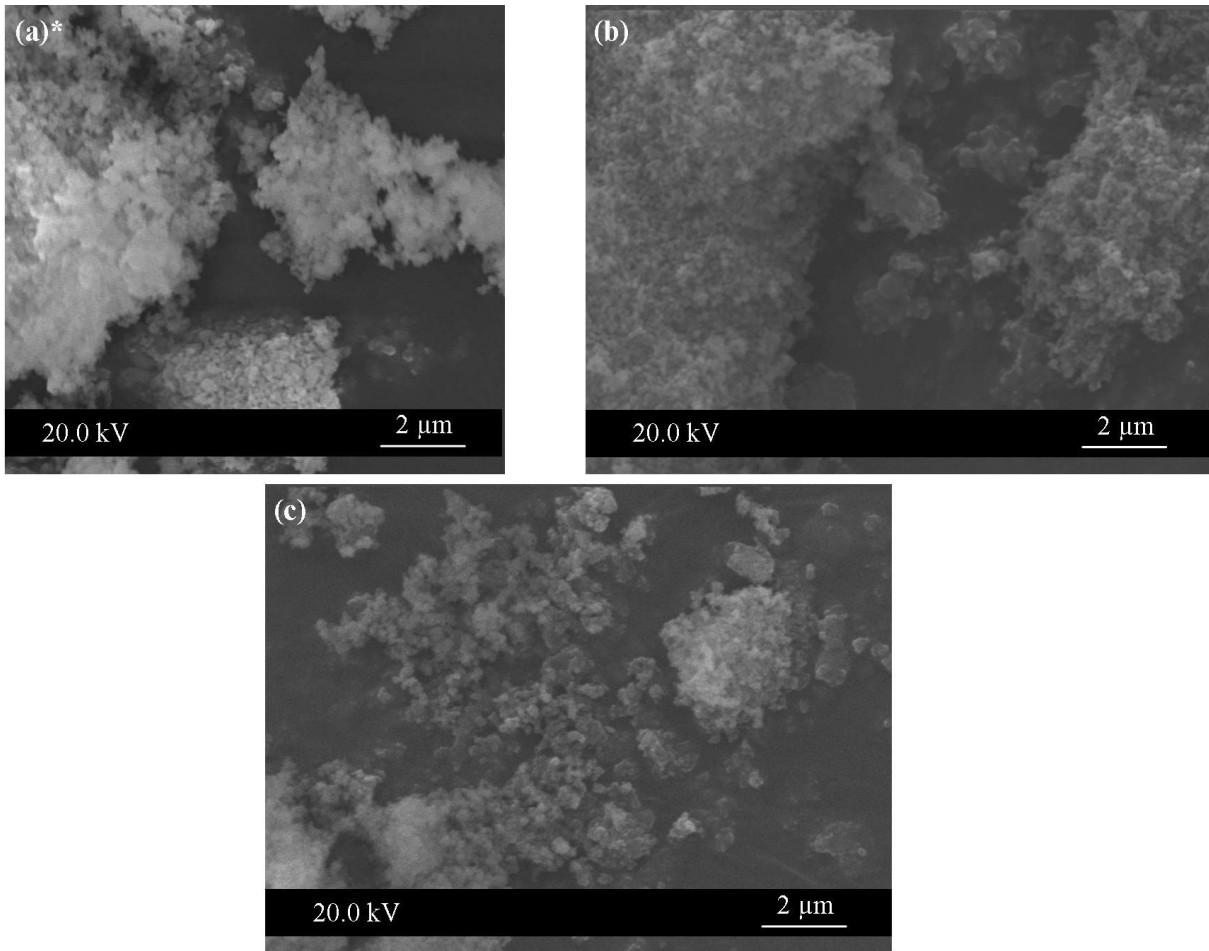


Figure III-26 : Observations MEB des poudres calcinées à 750°C pendant 30 mn : (a) β -TCP, (b) $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP et (c) $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP (*image réalisée à l'aide de l'appareillage Hitachi S2500)

III.3.2. Étude dilatométrique

Les graphiques de la Figure III-27 présentent les courbes de retrait linéaire et les dérivées de ces courbes en fonction de la température pour les compacts de poudres de composition β -TCP, $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP et $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP. Quelle que soit la composition, les courbes de retrait ainsi que leurs dérivées sont similaires. Après une étape de dilatation des matériaux, le retrait, c'est-à-dire le début du frittage, commence à 800°C pour le β -TCP (Figure III-27b). Cette température de début de frittage augmente avec le taux x de silicium pour atteindre 900°C pour la composition $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP (Tableau III-10). La température à laquelle la vitesse de frittage est maximale, correspondant au point d'inflexion de la courbe de retrait, est mise en évidence sur la courbe dérivée (Figure III-27b). Cette température augmente de 1010°C à 1100°C lorsque x augmente de 0 à 0,10 (Tableau III-10). L'addition de silicium ralentit donc le processus de densification. Lorsque la température atteint 1150°C, un phénomène de dilatation est observé sur les courbes dilatométriques de manière plus importante pour les

compositions β -TCP et $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP que pour $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP (Figure III-27a). Ce phénomène est lié à la transformation allotropique $\beta \rightarrow \alpha$ du TCP, précédemment mise en évidence au cours de l'étude du comportement thermique des poudres (Figure III-20) et qui induit une expansion du matériau à cause de la différence de densité entre les deux phases : 3,067 pour la variété β et 2,86 pour la variété α [FAM94]. Cette diminution de densité équivaut à une augmentation du volume de la maille élémentaire de 7 %. L'expansion linéaire observée sur la courbe est de 2,6 % dans le cas du β -TCP. En supposant que le phénomène de dilatation soit isotrope, cette valeur est cohérente car elle correspond environ au tiers de l'expansion volumique attendue. Avec la teneur en silicium, cette expansion volumique décroît pour atteindre une valeur de 0,5 % lorsque $x = 0,10$. Aucun phénomène particulier n'apparaît au cours du refroidissement. A la vue de ces résultats et afin d'obtenir des matériaux denses, la température de frittage doit être inférieure à 1150°C.

Tableau III-10 : Températures de début de frittage (T_{DF}) et températures auxquelles les vitesses de frittage des matériaux sont maximales (T_{MAX})

Matériau	β -TCP	$\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP	$\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP
T_{DF}	800°C	850°C	900°C
T_{MAX}	1010°C	1060°C	1100°C

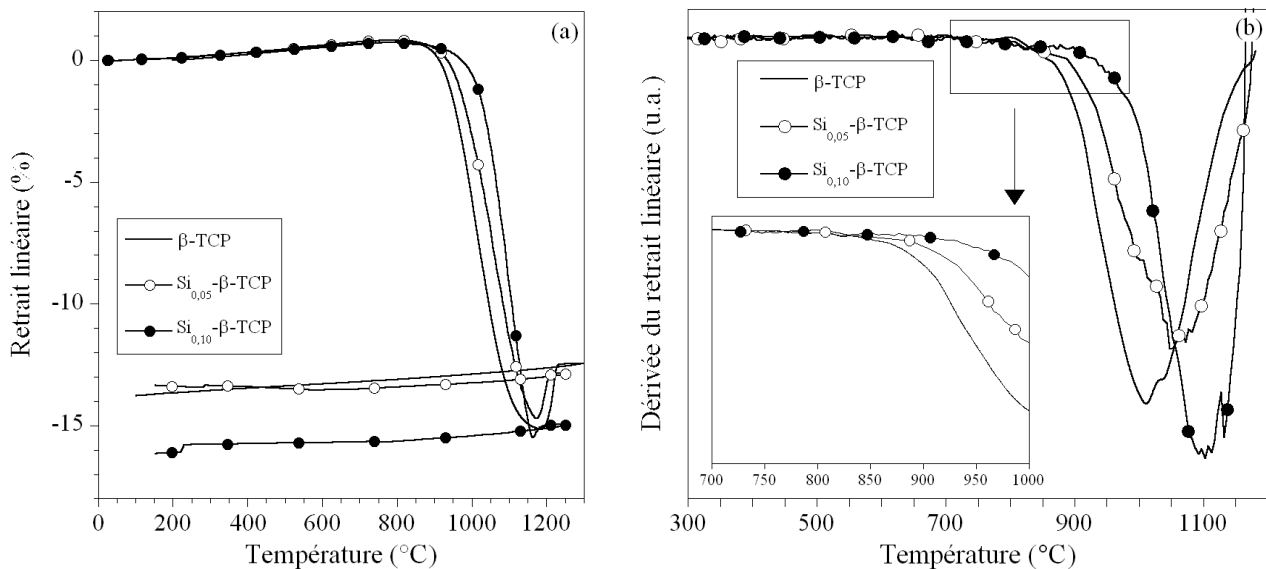


Figure III-27 : (a) Courbes de retrait linéaire et (b) dérivées des courbes de retrait linéaire des pastilles de β -TCP, $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP et de $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP en fonction de la température

III.3.3. Frittage des poudres

L'étude dilatométrique a permis de mettre en évidence un domaine de température adéquat pour fritter le $\text{Si}_x\text{-}\beta\text{-TCP}$. En dessous de 1000°C le frittage n'est pas optimum et au dessus de 1150°C l'expansion volumique causée par la transformation allotropique $\beta \rightarrow \alpha$ nuit à la densification des matériaux. Le cycle de frittage naturel alors retenu est le suivant : après une rampe de montée en température de $20^\circ\text{C}\cdot\text{mn}^{-1}$, un palier de 2 h à 1100°C est appliqué avant de redescendre à la température ambiante à $20^\circ\text{C}\cdot\text{mn}^{-1}$. A l'issue de ce programme de frittage, les matériaux sont tous constitués de la phase cristalline $\beta\text{-TCP}$ comme l'indiquent les diffractogrammes (Figure III-28). Aucune phase secondaire cristalline ne s'est formée durant l'étape de frittage. Les taux de densification des pastilles après retour à la température ambiante ont été évalués au dessus de 98 % de la densité théorique du $\beta\text{-TCP}$ (Tableau III-11). Le cycle de frittage choisi a donc permis d'obtenir des matériaux denses. La microstructure des échantillons a fait l'objet d'une étude plus approfondie présentée dans la suite de ce paragraphe.

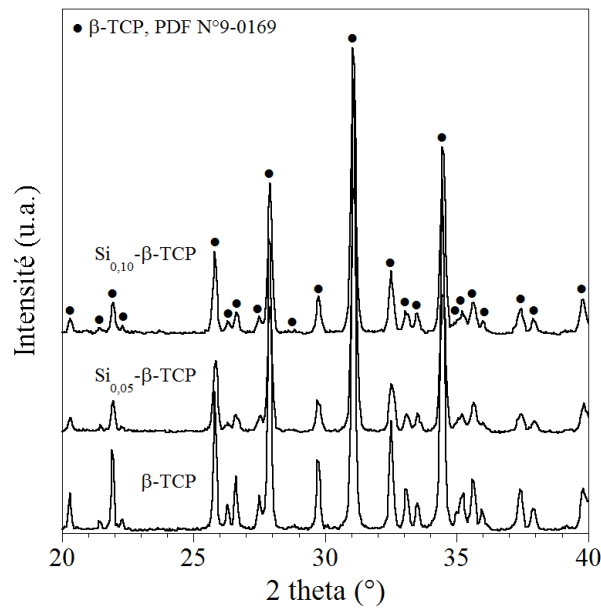


Figure III-28 : Diffractogrammes des pastilles après frittage

Tableau III-11 : Taux de densification des pastilles frittées

Matériau	$\beta\text{-TCP}$	$\text{Si}_{0,05}\text{-}\beta\text{-TCP}$	$\text{Si}_{0,10}\text{-}\beta\text{-TCP}$
Taux de densification (%)	$99,7 \pm 0,1$	$98,1 \pm 0,1$	$98,0 \pm 0,1$

III.3.4. Microstructure des matériaux frittés

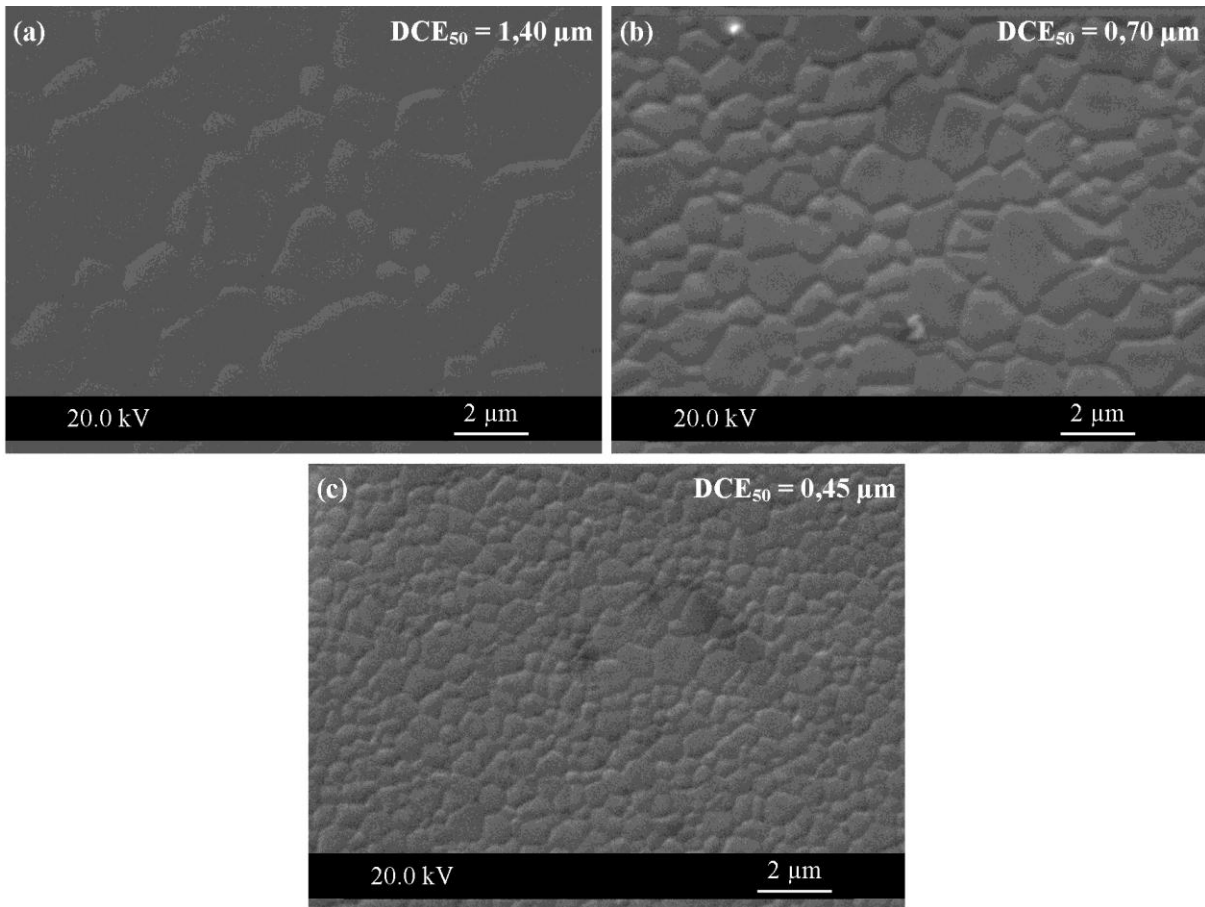


Figure III-29 : Observation MEB de la surface de pastilles frittées gravées thermiquement et taille moyenne (DCE_{50}) des grains : (a) β -TCP, (b) $Si_{0,05}$ - β -TCP et (c) $Si_{0,10}$ - β -TCP

La Figure III-29 expose les clichés obtenus par microscopie électronique à balayage après gravage thermique de la surface des échantillons. Les matériaux présentent une microstructure dense comme prédit par les mesures de poussée d'Archimède. Ces micrographies MEB mettent en évidence une diminution de la taille des grains avec l'addition de silicium. Les distributions granulaires des matériaux frittés sont exposées à la Figure III-30 et sont obtenues après l'analyse d'environ 500 grains pour le β -TCP et d'au moins 1500 grains pour les échantillons contenant du silicium. Quel que soit le matériau, aucun pic secondaire n'est mis en évidence, les distributions des grains sont quasiment monomodales (Figure III-30b). La taille moyenne des grains (DCE_{50}) diminue de $1,40 \mu\text{m}$ pour β -TCP à $0,45 \mu\text{m}$ pour $Si_{0,10}$ - β -TCP (données indiquées sur la Figure III-29). La présence de silicium dans le système ralentit la croissance granulaire. Les distributions en fréquences et fréquences cumulées en fonction de la taille des grains normalisée par rapport à la taille moyenne des grains (DCE/DCE_{50}) sont identiques (Figure III-31). Ceci indique que les distributions granulaires sont similaires. La caractérisation de la croissance granulaire peut donc être évaluée par

rapport à la taille moyenne des grains [TET99]. L'ensemble de ces résultats montre par ailleurs qu'aucun grossissement anormal des grains ne se produit au cours du frittage des différentes compositions.

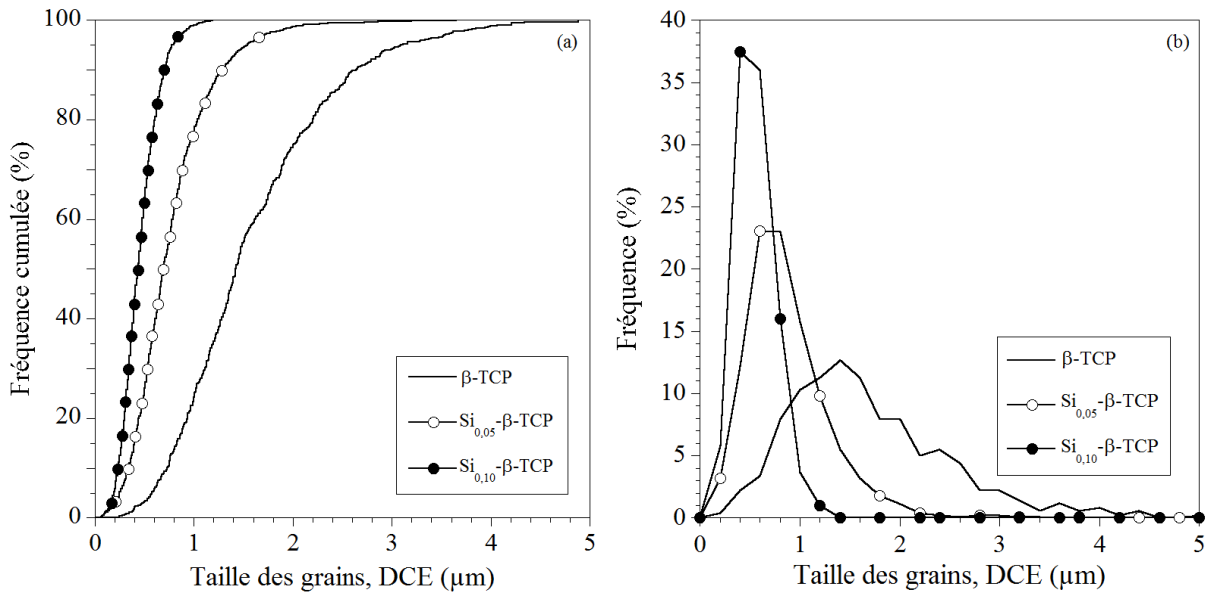


Figure III-30 : Fréquence cumulée (a) et fréquence (b) en fonction de la taille des grains

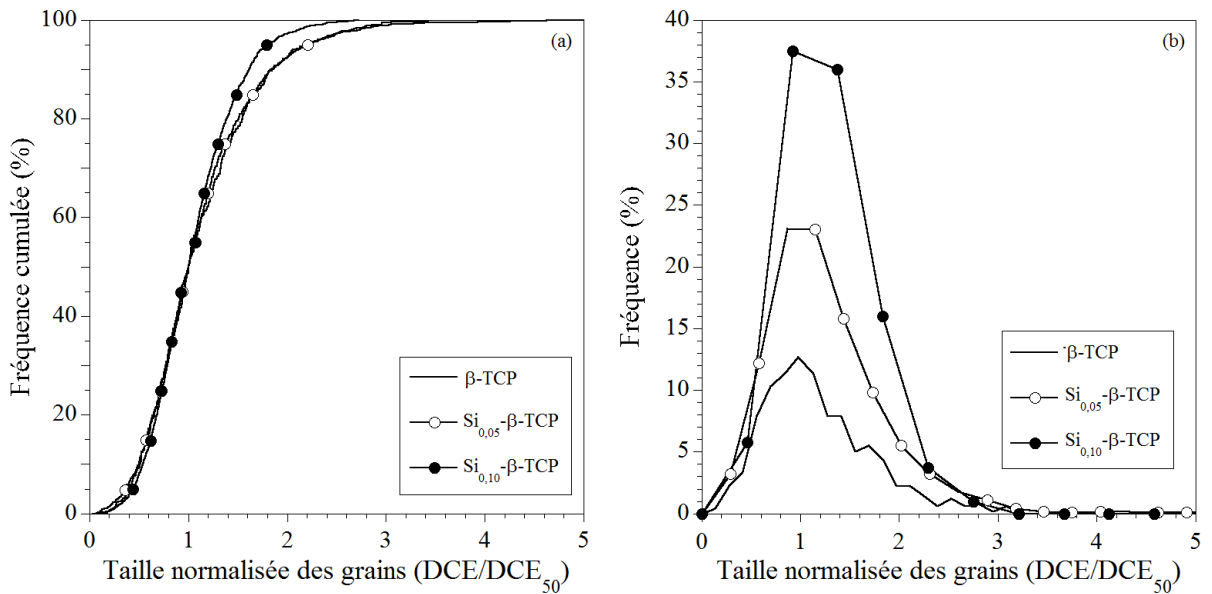


Figure III-31 : Fréquence cumulée (a) et fréquence (b) en fonction de la taille normalisée des grains

La Figure III-32 présente les micrographies en transmission des échantillons frittés. Ces clichés mettent en évidence une microstructure uniforme des céramiques dont la taille des grains diminue avec l'augmentation de la teneur en silicium (Figure III-32a, b et c). Ces observations sont en accord avec les conclusions de l'étude de la distribution

granulométrique. Les joints de grains sont propres, aucun phénomène de ségrégation n'est détecté.

L'analyse des clichés de diffraction en sélection d'aire sur les grains de ces matériaux révèle qu'ils sont constitués d'une phase cristalline. L'indexation des tâches de diffraction est en bon accord avec la fiche PDF n°9-0169 du β -TCP. L'analyse par microscopie électronique en transmission a cependant révélé la présence d'une seconde phase au sein des matériaux contenant du silicium. Celle-ci est mise en évidence à la Figure III-33 a et b. Localement le matériau contient des régions composées de grains d'environ 500 nm de diamètre. Ces zones sont observées de manière plus fréquente au sein de $\text{Si}_{0,10}\text{-}\beta\text{-TCP}$ que dans $\text{Si}_{0,05}\text{-}\beta\text{-TCP}$ alors qu'elles ne sont pas visibles dans le $\beta\text{-TCP}$. Un cliché en sélection d'aire typique de ces zones est présenté à la Figure III-33c et révèle le caractère amorphe de cette phase.

Dans l'échantillon fritté de $\text{Si}_{0,10}\text{-}\beta\text{-TCP}$, l'étude du pourtour des domaines amorphes (Figure III-33d indiqué par la flèche) a révélé la présence d'une nouvelle zone cristallisée (Figure III-33e). L'indexation des anneaux de diffraction n'a pas permis de conclure sur la nature de cette phase. Elle pourrait correspondre aux pics de diffraction non identifiés mis en évidence sur les diagrammes de DRX haute résolution (Figure III-16).

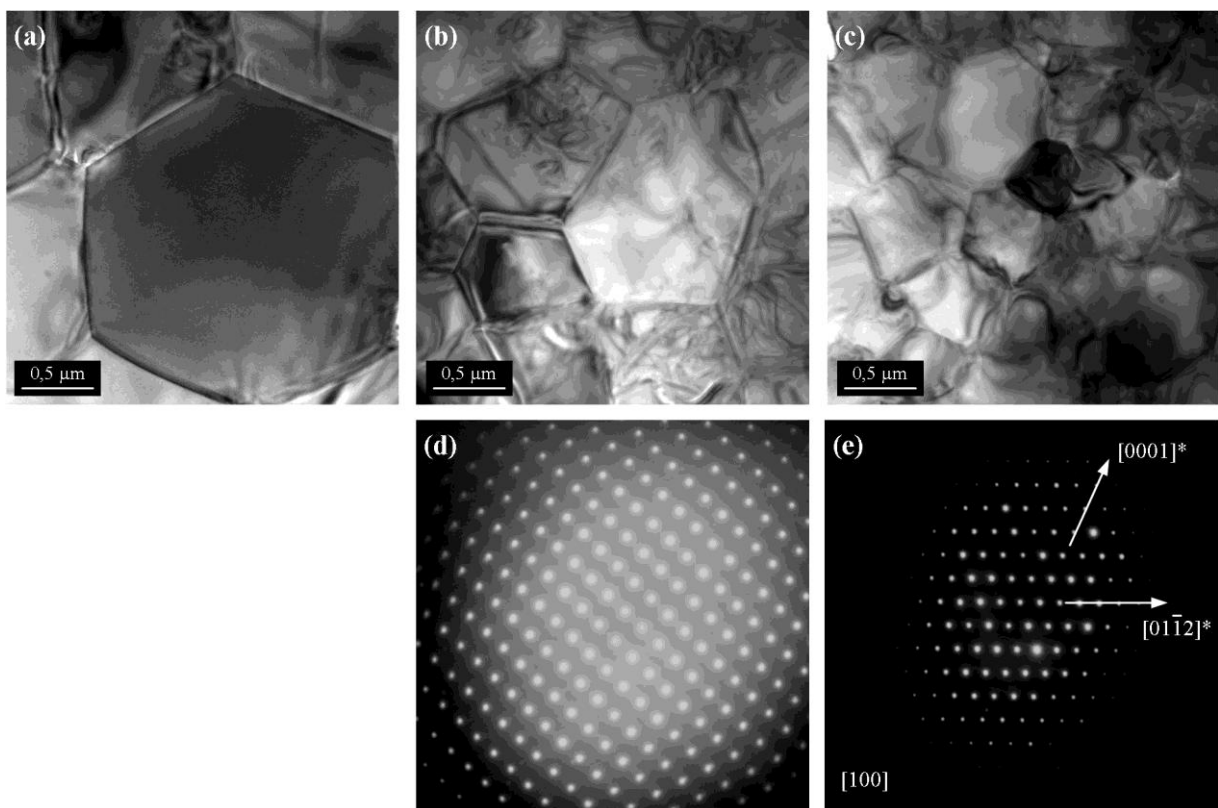


Figure III-32 : Micrographies en transmission des matériaux frittés et clichés de diffraction en sélection d'aire de (a) β -TCP ; (b) et (d) $\text{Si}_{0,05}\text{-}\beta\text{-TCP}$ et (c) et (e) $\text{Si}_{0,10}\text{-}\beta\text{-TCP}$

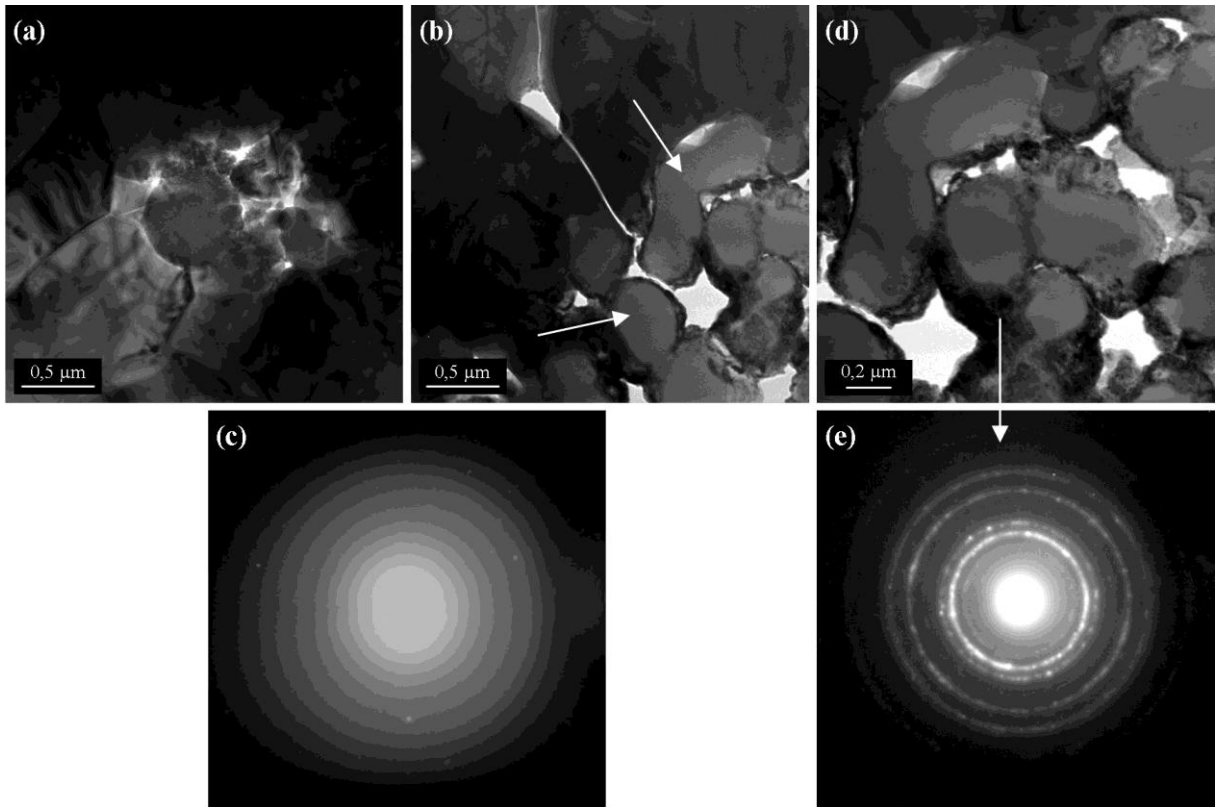


Figure III-33 : Micrographie en transmission de (a) $\text{Si}_{0,05}\text{-}\beta\text{-TCP}$, (b) et (d) $\text{Si}_{0,10}\text{-}\beta\text{-TCP}$ accompagnés des clichés de diffraction en sélection d'aire (c) et (e)

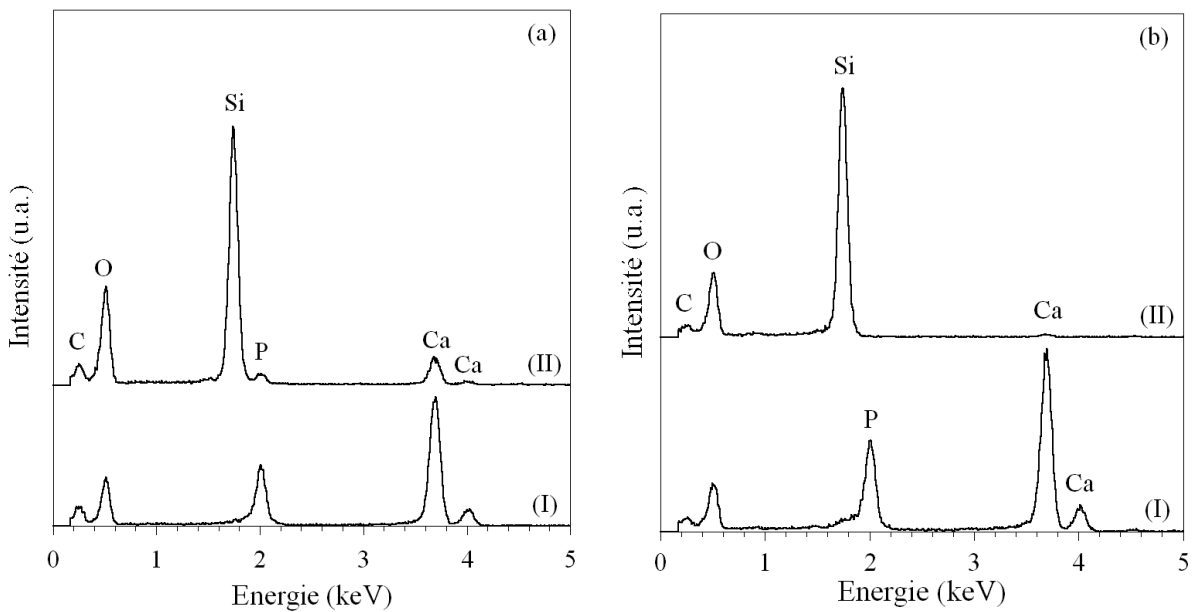


Figure III-34 : Spectres à dispersion d'énergie des matériaux frittés (a) $\text{Si}_{0,05}\text{-}\beta\text{-TCP}$ et (b) $\text{Si}_{0,10}\text{-}\beta\text{-TCP}$ avec (I) zone cristalline et (II) zone amorphe

Les spectres à dispersion d'énergie enregistrés sur les deux matériaux (Figure III-34) montrent que les domaines cristallisés sont principalement constitués de calcium, de phosphore et d'oxygène. Les zones amorphes, quant à elles, sont exclusivement composées de

silicium et d'oxygène pour $\text{Si}_{0,10}\text{-}\beta\text{-TCP}$ et des traces de phosphore et de calcium sont détectées pour $\text{Si}_{0,05}\text{-}\beta\text{-TCP}$. Le silicium est donc présent au sein des échantillons dans une phase amorphe homogène de type SiO_2 . Les domaines de phases amorphes étant plus petit dans le cas de $\text{Si}_{0,05}\text{-}\beta\text{-TCP}$, les traces de calcium et de phosphore mises en évidence pour cet échantillon sont liées au volume analysé qui contient vraisemblablement de la phase cristalline.

III.3.5. Analyse structurale des matériaux frittés

La Figure III-35 présente les spectres larges acquis par spectroscopie de photoélectrons X (XPS) à la surface des échantillons frittés. Les trois spectres sont semblables. Quelle que soit la composition, les pics caractéristiques de la présence d'oxygène (O 1s), de phosphore (P 2s et P 2p) et de calcium (Ca 2s, Ca 2p, Ca 3s et Ca 3p) apparaissent. Le pic du carbone C 1s, toujours présent dans l'environnement de la chambre d'analyse, sert de référence pour étalonner les spectres en énergie.

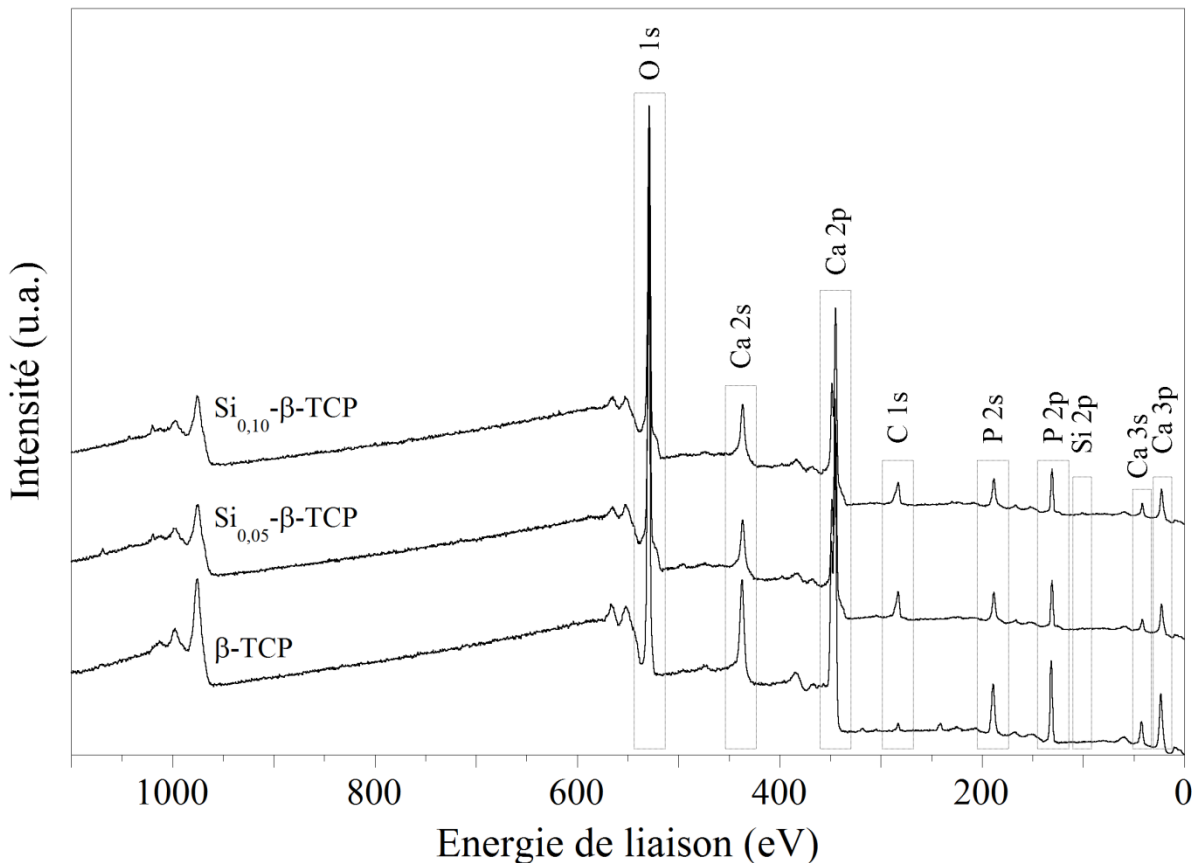


Figure III-35 : Spectres XPS larges des échantillons frittés

L'analyse plus fine de ces spectres met en évidence le pic de l'élément silicium 2p à la surface de $\text{Si}_{0,05}\text{-}\beta\text{-TCP}$ et $\text{Si}_{0,10}\text{-}\beta\text{-TCP}$. La Figure III-36 permet de comparer l'allure de ce pic pour

les trois matériaux. Logiquement, aucun signal n'est détecté à la surface de β -TCP. L'énergie de liaison du Si 2p est enregistrée à 103,6 eV dans les échantillons contenant du silicium et l'intensité du pic augmente avec l'augmentation de la teneur en silicium. Selon la littérature, ce pic est attribué aux liaisons Si-O présentes dans la silice [PER00; BES02; BAL03; AAR07; XU07-b]. Le silicium sous la forme de tétraèdres de silicate apparaît à des énergies de liaison plus faibles, de l'ordre de 101-102 eV [BAL03; XU07-a]. La faible intensité du pic Si 2p ne permet pas d'envisager sa déconvolution.

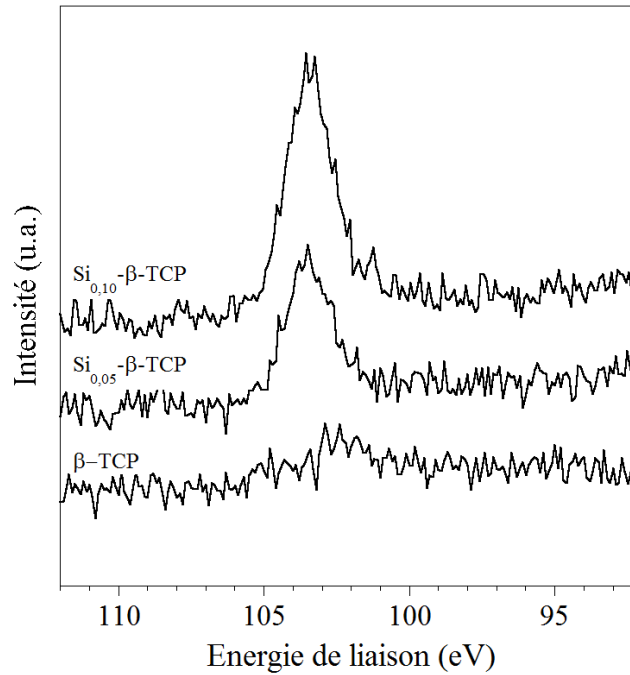


Figure III-36 : Spectres XPS haute résolution du pic Si 2p d'échantillons frittés

Les autres pics présents sur les spectres ont fait l'objet d'une étude de déconvolution (Figure III-37). Les positions des pics déconvolués sont présentées au Tableau III-12. Le pic O 1s possède plusieurs contributions suivant l'échantillon étudié. Le pic à $531,5 \pm 0,2$ eV, présent à la surface de tous les échantillons, correspond sans ambiguïté aux liaisons P-O [BAL03]. La contribution à 532,6-532,7 eV est associée aux molécules d'eau persistant à la surface des matériaux malgré le décapage ionique de la surface [CHU99]. Sur l'analyse de surface avant décapage, ces pics étaient déjà présents en forte proportion. La déconvolution révèle, pour les matériaux contenant du silicium, la présence d'un pic centré à 533,9 eV pour $x = 0,05$ et 533,1 eV pour $x = 0,10$. Cette valeur correspond à l'énergie de liaison d'un oxygène dans un environnement de silicium [PER00; BAL03; REN09]. D'autres contributions issues de la déconvolution du pic O 1s apparaissent pour les échantillons contenant du silicium et pourraient provenir de liaisons du type Ca-O-Si, Ca-O-P ou Si-O-P.

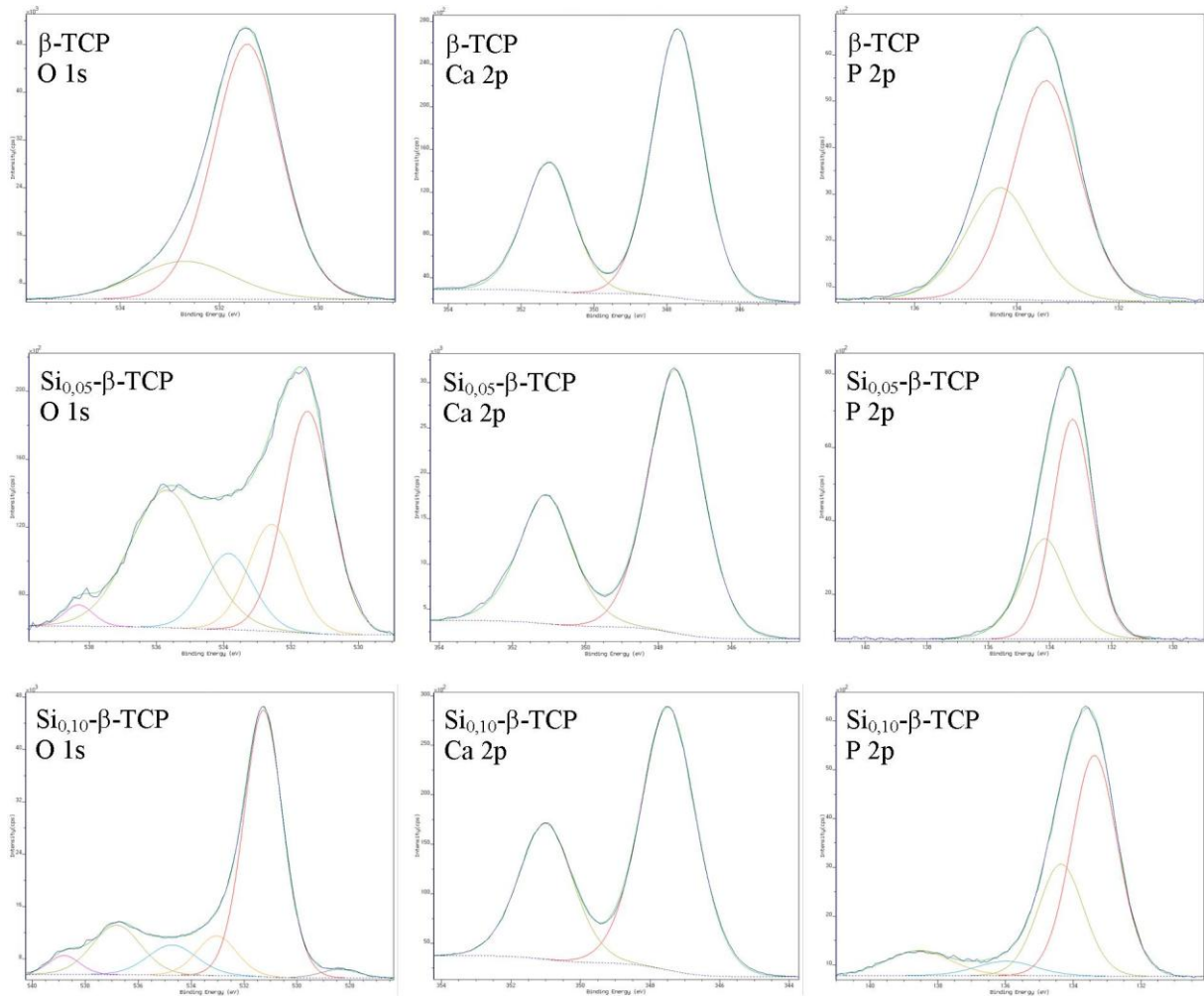


Figure III-37 : Déconvolution des pics XPS O 1s, Ca 2p et P 2p obtenus à la surface de β -TCP, $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP et $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP

Tableau III-12 : Énergies de liaisons des pics XPS déconvolués

Matériau	Eléments												
	O 1s			Ca 2p		P 2p				Si 2p			
β -TCP	531,5	532,7		347,7	351,2	133,4	134,3						-
$\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP	531,5	532,6	533,9	535,7	538,3	347,6	351,1	133,3	134,2				103,6
$\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP	528,4	531,3	533,1	534,7	536,8	538,8	347,5	351,0	133,4	134,4	136,0	138,6	103,6

Quel que soit le matériau, le pic Ca 2p est déconvolué en deux contributions. La première, centrée autour de 347,5 eV correspond sans ambiguïté à Ca 2p_{3/2} et la seconde, positionnée autour de 351,1 eV à Ca 2p_{1/2}.

Le pic P 2p contient essentiellement deux contributions. Le pic centré à 133,4 eV correspond aux liaisons P-O des tétraèdres de PO_4^{3-} [PER00]. Celui centré à $134,3 \pm 0,1$ eV est attribué aux liaisons P-OH. L'échantillon $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP possède en plus deux nouvelles contributions

qui proviennent vraisemblablement de la phase inconnue observée en microscopie électronique en transmission.

L'analyse de la surface des échantillons par XPS a également permis d'évaluer les rapports molaires Ca/P et Ca/(P+Si) des échantillons. Les valeurs calculées sont reportées au Tableau III-13. Quel que soit l'échantillon, les valeurs mesurées sont toujours inférieures aux valeurs théoriques. De nombreux auteurs rapportent également des valeurs de rapports molaires Ca/P mesurées par XPS de différents phosphates de calcium très inférieures aux valeurs attendues [TAN97; CHU99; LU00; JUN09]. Cette technique ne permet qu'un examen de la surface des échantillons, souvent riche en oxygène, et de composition différente du cœur de l'échantillon. Quoiqu'il en soit, l'évolution des rapports molaires déterminés par XPS est cohérente avec les valeurs attendues. Avec l'augmentation de la teneur en silicium, les rapports molaires Ca/P et Ca/(P+Si) augmentent.

Tableau III-13 : Rapports molaires théoriques et mesurés par XPS à la surface des échantillons frittés

Matériau	Ca/P		Ca/(P+Si)	
	Théorique	Mesuré	Théorique	Mesuré
β-TCP	1,500	1,33 ± 0,07	1,500	-
Si_{0,05}-β-TCP	1,553	1,36 ± 0,07	1,513	1,31 ± 0,07
Si_{0,10}-β-TCP	1,611	1,43 ± 0,07	1,526	1,34 ± 0,07

III.4. Discussion générale

Cette discussion générale reprend l'ensemble des résultats expérimentaux concernant l'élaboration des matériaux à base de β -TCP et de silicium. Après avoir identifié la position et la forme sous laquelle le silicium est présent au sein des céramiques, les mécanismes intervenant au cours de la réaction de précipitation des poudres seront discutés avant d'aborder l'élaboration des céramiques.

III.4.1. Localisation du silicium

L'essentiel des analyses effectuées sur les poudres brutes de synthèse ou calcinées ne révèle la présence d'aucune phase cristalline secondaire pouvant traduire la présence du silicium. La même situation est rencontrée dans la littérature après l'analyse de poudres à base de Si- α -TCP contenant des teneurs en silicium similaires [SAY03; CAM06; REI06].

Dans les poudres calcinées à 1000°C pendant 15 h, constituées de la phase cristalline unique de β -TCP, la présence du silicium a été mise en évidence par ICP/AES. Les teneurs mesurées sont proches de celles attendues en théorie (Tableau III-3). A l'issue des synthèses et de la calcination à 1000°C, le silicium est donc présent dans les poudres et coexiste avec la phase cristalline de β -TCP.

La composition hypothétique initiale des poudres synthétisées est $\text{Ca}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_{(2-2x)}(\text{SiO}_4)_x$. Dans le système $2\text{CaO}, \text{SiO}_2-3\text{CaO}, \text{P}_2\text{O}_5$ étudié par Nurse et coll., cette composition peut s'écrire $x(2\text{CaO}, \text{SiO}_2), (1-x)(3\text{CaO}, \text{P}_2\text{O}_5)$ [NUR59]. Pour $x = 0,05$, le pourcentage massique de $3\text{CaO}, \text{P}_2\text{O}_5$ (correspondant au TCP) dans le mélange est de 97,2 %. Une telle formulation, selon le diagramme de phase établi par Nurse et coll. (Figure I-11), devrait correspondre à une solution solide constituée de silicocarnotite $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ et de α -TCP pour des températures inférieures à 1230°C. Toujours selon ce diagramme, l'addition de $2\text{CaO}, \text{SiO}_2$ de ~1 % massique ($x = 0,02$) à ~20 % massique ($x = 0,30$) stabilise la variété allotropique α du TCP. Le β -TCP est quant à lui stabilisé pour des teneurs en $2\text{CaO}, \text{SiO}_2$ inférieur à 1 % massique.

D'après l'étude du comportement thermique des poudres, sans silicium, le β -TCP est stable jusqu'à 1176°C (Tableau III-8) et au-delà de cette température apparaît la variété α du TCP. En présence de silicium, cette température de transformation allotropique diminue jusqu'à 1137°C lorsque $x = 0,10$. Cette analyse semble indiquer que le silicium stabiliserait la variété α du TCP. De nombreuses études rapportent une stabilisation, en présence de silicium, de

cette variété allotropique α qui peut alors apparaître dès 700°C [WEI05; REI06; PIE07; MAS08].

Les matériaux (poudres ou compacts de poudre) ont été traités thermiquement à des températures inférieures à la température de transformation allotropique $\beta \rightarrow \alpha$ mesurée. Ainsi, en accord avec les analyses ATD, les diffractogrammes de rayons X des poudres calcinées à 1000°C (Figure III-7) ou des matériaux frittés à 1100°C (Figure III-28), ne révèlent essentiellement que la phase cristalline de β -TCP avec éventuellement une phase secondaire minoritaire d'HA ou de β -CPP suivant le temps de maturation (Figure III-7). L'absence de la variété α du TCP sur les diffractogrammes ainsi que la faible solubilité de Si dans le β -TCP [NUR59] suggèrent que le silicium n'est pas substitué, du moins en totalité, dans la structure du β -TCP.

Lorsque la poudre synthétisée est constituée d'un mélange d'HA et de β -TCP, du silicium se substitue dans la structure de l'HA. Les résultats des affinements de paramètres de maille des poudres constituées de la phase unique de β -TCP ont révélé des évolutions lorsque la teneur en silicium augmente. Ces changements semblent indiquer que des modifications au sein du cristal de β -TCP interviendraient avec l'addition de silicium.

Jusqu'à la teneur en silicium de $x = 0,05$, les valeurs des paramètres de maille a et c diminuent (Figure III-18). En supposant que le silicium s'incorpore dans la maille du β -TCP sous la forme de tétraèdre SiO_4^{4-} , il viendrait se substituer aux groupements PO_4^{3-} . L'examen de la structure du β -TCP indique que, quelle que soit la colonne A ou B, les groupements phosphate sont entourés de cations de calcium (Figure I-9). La force Coulombienne $F_{1/2}$ exercée par une charge électrique q_1 , placée au point de rayon vecteur r_1 , sur une charge q_2 , placée au point de rayon vecteur r_2 , est définie selon Expression III-2 où ϵ_0 est la permittivité du vide ($\epsilon_0 \sim 8,854 \cdot 10^{-12} \text{ F} \cdot \text{m}^{-1}$).

$$F_{1/2} = \frac{q_1 \cdot q_2}{4\pi\epsilon_0} \frac{r_2 - r_1}{|r_2 - r_1|^3}$$

Expression III-2 : Expression de la force Coulombienne entre deux charges électriques

La charge globale d'un groupement silicate est de -4 alors qu'elle est de -3 pour le groupement phosphate. La force Coulombienne générée par le silicate sur les cations de calcium est donc plus importante que celle produite par le phosphate. De plus, la formule hypothétique du β -TCP silicaté (Réaction 4, p. 95) fait état de la création de lacunes de calcium. En supposant que des lacunes de calcium se soient créées dans la structure et que le silicium se soit incorporé sous la forme de silicate, une contraction de la maille cristalline du

β -TCP devrait être observée. Ces phénomènes pourraient expliquer l'évolution des paramètres de maille mesurée jusqu'à la teneur en silicium de $x = 0,05$. Selon R. W. Nurse et coll. [NUR59], le β -TCP peut accepter dans sa structure une teneur en silicium maximale de $x = 0,02$ (soit une teneur en $2\text{CaO},\text{SiO}_2$ de 1 % massique). Les évolutions de a et c observées jusqu'à ce que $x = 0,05$ traduiraient un dopage du silicium sous la forme de silicate dans le β -TCP. Pour confirmer ou infirmer ces hypothèses des points de mesures intermédiaires (soit des synthèses avec $x < 0,05$) seraient nécessaires.

Au-delà de $x = 0,05$, c reste constant tandis que a aurait tendance à augmenter. En présence de silicium, les diffractogrammes des poudres calcinées acquis en haute résolution révèlent des pics de faible intensité qui n'ont pu être indexés (Figure III-16). Au cours des affinements de paramètres de maille ces pics n'ont pas été pris en compte et peuvent donc nuire à la fiabilité des résultats d'affinements dans ce domaine de composition.

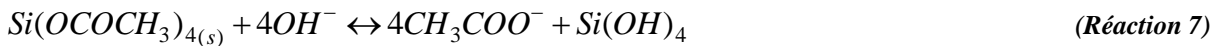
Sur les matériaux frittés, l'analyse réalisée au MET indique que le β -TCP coexiste avec une phase amorphe de type SiO_2 dès l'ajout de silicium à hauteur de $x = 0,05$ (Figure III-33). Les résultats d'analyse EDS et d'XPS suggèrent également la présence du silicium sous la forme d'un amorphe. La quantité de cette phase amorphe augmente dans les échantillons lorsque x augmente (Figure III-36). L'incorporation du silicium dans la structure du β -TCP n'est donc pas totale. Ceci est en accord avec les travaux de R. W. Nurse et coll. indiquant que la limite de solubilité du silicium dans le β -TCP est très faible ($x = 0,02$). Le silicium non incorporé dans la structure forme alors des grains de silice amorphe aléatoirement répartis dans le matériau.

La présence d'une phase amorphe a également déjà été observée dans le cas de la synthèse d'hydroxyapatite dopée avec de fortes teneurs en silicium [ARC04; PAL08] tout comme dans des systèmes HA-TCP dopés au silicium [SAY03]. L'étude de X. Wei et coll. sur le codopage du zinc et du silicium dans le β -TCP [WEI05; WEI07-a] a été complétée par une analyse des échantillons par RMN [RAW08]. Cette équipe a ainsi également mis en évidence que le silicium non incorporé dans la structure du β -TCP se présentait sous la forme de clusters de phase amorphe.

Une étude approfondie des matériaux par des affinements de structure, en tenant compte des phases secondaires (amorphes et cristallines), permettrait de localiser de manière plus précise le silicium. L'analyse des échantillons par RMN MASS (^{28}Si) devrait apporter de plus des éléments d'information sur la configuration du silicium dans le β -TCP.

III.4.2. Synthèse des poudres en présence de silicium

La synthèse de β -TCP en présence de silicium a été étudiée en utilisant la technique de précipitation en voie aqueuse. Cette technique a précédemment permis de synthétiser de l'hydroxyapatite silicatée à pH = 9 et 90°C [PAL07]. Au cours de ces synthèses en milieu basique, le tétraacétate de silicium, utilisé comme précurseur, subit une hydrolyse selon la Réaction 7. L'hydroxyde produit réagit avec les ions calcium du milieu réactionnel pour former une phase amorphe de CaSiO_3 . Cette phase réagit ensuite à haute température avec l'apatite pour former l'apatite silicatée.



Les conditions de synthèse employées pour synthétiser le β -TCP en présence d'acétate de silicium, pH = 7 et 30°C, ne sont pas favorables à l'hydrolyse du précurseur solide de silicium. Au cours de la réaction de précipitation du β -TCP, la suspension de tétraacétate de silicium solide ne réagit pas avec les ions calcium présents dans le réacteur. Le milieu réactionnel est donc dans ce cas constitué d'ions calcium et phosphate qui précipitent et ce précipité coexiste avec le tétraacétate de silicium solide. Après mise en forme et traitement thermique des précipités, le silicium est principalement localisé dans une phase amorphe de silice.

La calcination à 1000°C pendant 15 h des précipités synthétisés a permis de mettre en évidence une évolution de la composition cristalline des poudres en fonction du temps de maturation et de la teneur x en silicium (Figure III-7). Quelle que soit cette valeur x, le même enchainement des phases cristallines est détecté avec le temps de maturation. Le précipité calciné est, au début de la synthèse, constitué de β -TCP et de β -CPP puis, pour un temps de maturation précis seul le β -TCP est détecté. Pour des temps de maturation plus élevés, l'HA apparaît comme phase secondaire en quantité croissante. Ces évolutions de composition cristalline des poudres calcinées traduisent une variation du rapport molaire global Ca/P des précipités initiaux. Selon la norme AFNOR ISO 13779-3 [AFN08], ce rapport molaire Ca/P peut être calculé. La technique consiste à mesurer et à mettre en rapport les intensités intégrées de pics de diffraction caractéristiques de chaque phase cristalline à partir des diffractogrammes de poudres calcinées à 1000°C pendant 15 h. Cette technique normative ne considère que les phases cristallines de phosphate de calcium. Le silicium contribuant essentiellement à la formation de silice SiO_2 amorphe, sa proportion dans la poudre n'excède pas les 2 % massique. Cette phase amorphe ne devrait donc pas modifier de manière

significative les rapports d'intensités des pics de diffraction des phases cristallines. Les éventuelles modifications d'intensité des pics de diffractions de l'HA et du β -TCP suite à l'incorporation éventuelle de silicium dans leur structure ont été négligées.

Lorsque la poudre est constituée d'un mélange de β -TCP et d'HA ($Ca/P \geq 1,500$), les abaques utilisés pour réaliser cette quantification sont issues des travaux de S. Raynaud et coll. [RAY01]. Ces abaques ont été étendus aux poudres de rapport molaire Ca/P inférieur à 1,500, *i.e.*, lorsqu'il s'agit d'un mélange de β -TCP et de β -CPP par A. Destainville et coll. [DES03]. Le Tableau III-14 résume l'ensemble des données nécessaires pour la quantification des phases par DRX de poudres phosphocalciques. Les résultats sont illustrés sur la Figure III-38 pour les poudres synthétisées dans le réacteur GR en présence de silicium et sur la Figure III-39 pour celles issues du réacteur PR avec ou sans silicium.

Le rapport molaire Ca/P des précipités augmente continuellement avec le temps de maturation, que les poudres soient synthétisées en présence ou non de silicium. La comparaison des graphiques de la Figure III-39 indique que, lorsque $x = 0,05$ ou $x = 0,10$, le rapport molaire des précipités augmente de manière similaire que la synthèse soit réalisée avec ou sans silicium. Cette remarque confirme, qu'en faible proportion, l'addition du précurseur de silicium ne semble pas influencer la réaction de précipitation. Cependant, pour une teneur en silicium plus élevée ($x = 0,20$), les précipités synthétisés sans tétraacétate de silicium présentent globalement un rapport molaire Ca/P plus élevé que ceux obtenus en présence de silicium. Pour comprendre ces phénomènes, il est nécessaire de rappeler les mécanismes intervenant au cours de la réaction de précipitation qui est gouvernée par de nombreux équilibres.

Tableau III-14 : Rapport d'intensités intégrées des pics de diffraction et abaques pour la détermination des proportions de phases [RAY01; DES03]

Domaine de composition	Mélange β -TCP + β -CPP	Mélange HA + β -TCP		
	$\frac{Ca}{P} < \frac{3}{2}$	$\frac{3}{2} < \frac{Ca}{P} < \frac{10}{6}$		
	$90\% < \% \beta\text{-TCP} < 96\%$	$\% \beta\text{-TCP} > 80\%$	$20\% < \% \beta\text{-TCP} < 80\%$	$\% \beta\text{-TCP} < 20\%$
Rapport d'intensités	$R_p = \frac{I_{CPP(202)}}{I_{TCP(0210)}}$	$R_1 = \frac{I_{HA(211)}}{I_{TCP(0210)}}$	$R_2 = \frac{I_{TCP(0210)}}{I_{HA(210)}}$	$R_2 = \frac{I_{TCP(0210)}}{I_{HA(210)}}$
% massique	$\% \beta\text{-CPP} = 3,0158 \cdot R_p - 0,0005$	$\% \beta\text{-TCP} = 100 - (R_1/0,0111)$	$\% \beta\text{-TCP} = (92,7 \cdot R_2) / (5,45 + R_2)$	$\% \beta\text{-TCP} = R_2 / 0,085$

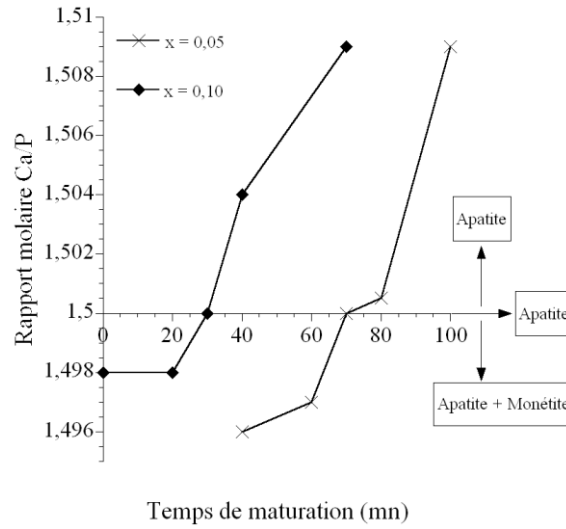


Figure III-38 : Évolution du rapport molaire Ca/P au cours des synthèses réalisées dans le réacteur GR en présence de silicium

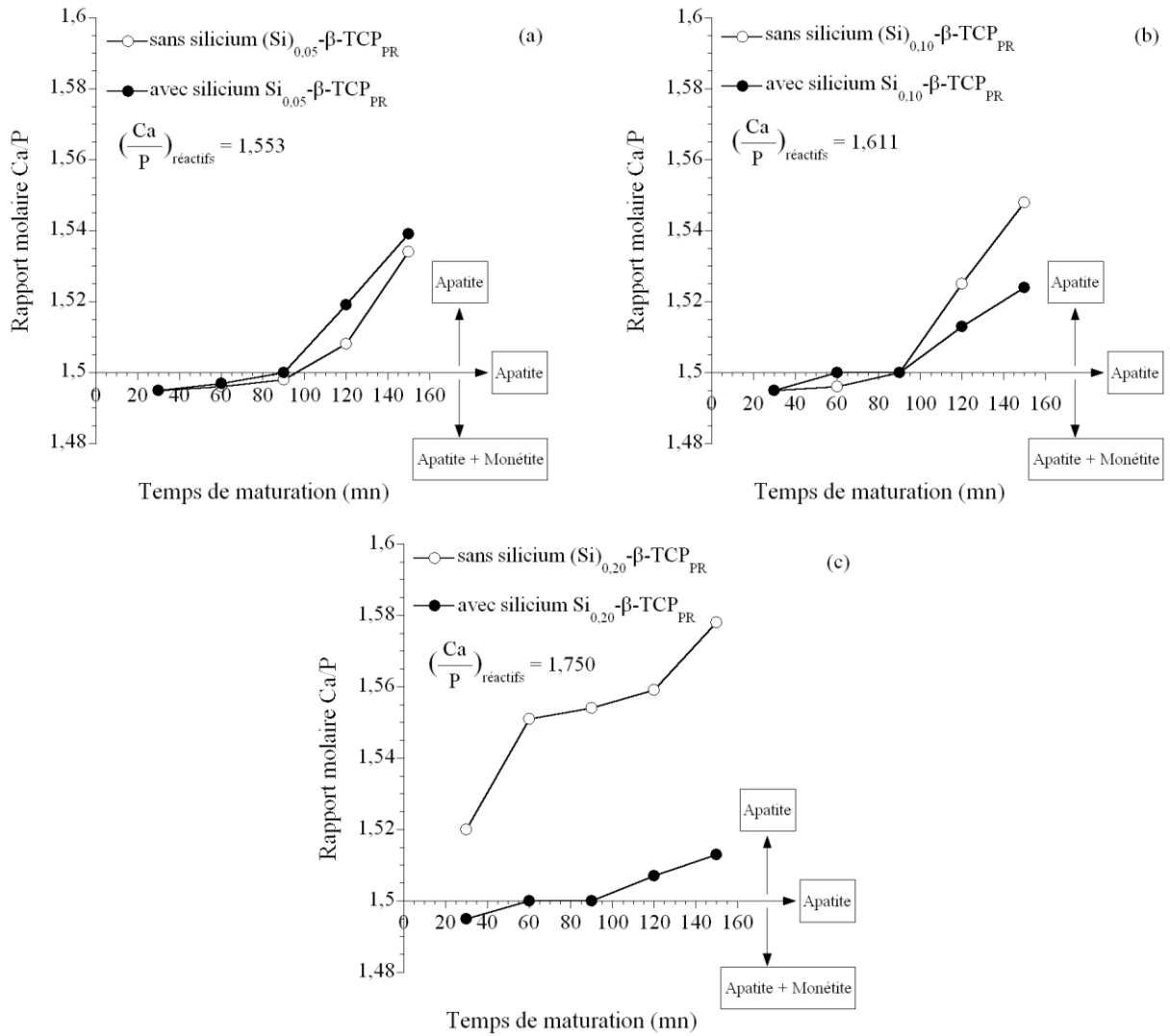
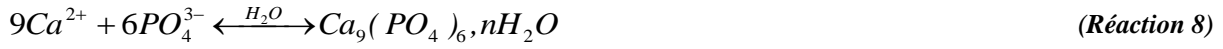


Figure III-39 : Évolution du rapport molaire Ca/P au cours des synthèses réalisées dans le réacteur PR en présence ou non de silicium

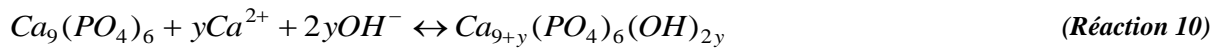
D'après des travaux antérieurs, l'introduction du phosphate dans la solution de calcium doit conduire, localement, à la précipitation initiale d'un composé amorphe dont la stoechiométrie est proche de celle du phosphate tricalcique [HEU77] :



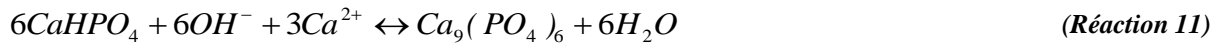
Dans le même temps, les ions PO_4^{3-} du précipité subissent une hydrolyse interne selon la réaction :



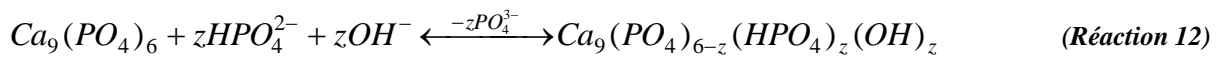
Le composé peut subir en parallèle l'incorporation progressive d'ions calcium qui conduit à l'augmentation du rapport molaire Ca/P des précipités synthétisés :



Pour un rapport molaire $Ca/P < 1,500$, les poudres brutes sont constituées d'apatite en présence d'une seconde phase identifiée comme étant de la monétite $CaHPO_4$, qui disparaît avec le temps de maturation (Figure III-3). Cette seconde phase est responsable de l'apparition du pyrophosphate de calcium β (β -CPP) après calcination selon la Réaction 2 (p. 93). Le précipité initial est donc ici biphasé et constitué d'un phosphate de calcium amorphe et de monétite. Cette dernière phase subit l'incorporation d'ions calcium selon la réaction suivante :



Cette réaction est prépondérante jusqu'à disparition de la monétite, c'est-à-dire, lorsque le rapport molaire Ca/P des précipités atteint 1,500. L'hydrolyse interne simultanée des ions phosphate du composé amorphe (Réaction 9), réaction se déroulant à rapport molaire Ca/P constant, conduit alors à la formation d'un précipité de formule $Ca_9(PO_4)_{6-z}(HPO_4)_z(OH)_z$ avec $0 < z \leq 1$, selon le processus global :



Lorsque le rapport molaire Ca/P des précipités est supérieur à 1,50, les mécanismes combinés (Réactions 8, 9 et 10) conduisent à la cristallisation d'une apatite déficitaire en calcium de formule $Ca_{9+y}(PO_4)_{6-z}(HPO_4)_z(OH)_{2y+z}$ (avec $0 < y \leq 1$ et $2y + z \leq 2$). Ce composé mène, après calcination, à un mélange biphasé d'HA et de β -TCP.

L'évolution de tels systèmes doit aboutir, au bout d'un certain temps de maturation, à la formation d'un précipité de rapport molaire Ca/P constant. Cet état correspond à un équilibre thermodynamique qui dépend de la température et du pH du milieu réactionnel [DES03]. Or, dans le cas de la synthèse de β -TCP en présence de silicium, le rapport molaire Ca/P des précipités augmente continuellement sur toute la gamme de temps de maturation étudiée. A aucun moment l'équilibre thermodynamique du système n'est atteint. Les évolutions observées relèvent alors d'une problématique de cinétique.

Pour la synthèse de TCP apatitique (Ca/P = 1,50), sans silicium, le temps de maturation minimum requis en petit réacteur pour atteindre l'équilibre est de 5 h [DES03]. Lorsque la teneur x en silicium augmente, le temps de maturation nécessaire pour obtenir un rapport molaire Ca/P de 1,50 diminue significativement au cours des synthèses réalisées dans le réacteur GR (Figure III-38). Cette diminution du temps de maturation est moins évidente pour les poudres synthétisées dans le réacteur PR du fait, vraisemblablement, de facteurs d'échelle liés à la différence de volume et de mode de régulation entre les deux réacteurs (Figure III-39).

Au cours des synthèses réalisées dans cette étude, le réacteur contient initialement le précurseur de calcium. Les réactifs de phosphate, et de silicium le cas échéant, sont progressivement ajoutés. La fin de l'ajout de ces réactifs dans le milieu réactionnel correspond au temps de maturation 0. Comme indiqué en début de paragraphe, le précurseur de silicium solide, n'est pas directement engagé dans les mécanismes de précipitation.

Une différence majeure existant entre les synthèses lorsque la quantité d'acétate de silicium augmente est le rapport molaire Ca/P des réactifs dont les valeurs sont rappelées sur la Figure III-39. Pour respecter la formule hypothétique $\text{Ca}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_{(2-2x)}(\text{SiO}_4)_x$, le rapport molaire Ca/P des réactifs augmente avec x . La diminution du temps de maturation nécessaire pour obtenir un précipité de rapport molaire Ca/P = 1,500 lorsque x augmente, s'expliquerait donc essentiellement par l'augmentation du rapport molaire Ca/P des réactifs. Ce dernier serait responsable d'une augmentation de la vitesse d'hydrolyse des ions phosphate (Réaction 9) ainsi qu'une accélération de l'incorporation des ions calcium dans le précipité initial (Réaction 10) par effet d'ions communs.

Cependant, lorsque $x = 0,20$ des différences notables sont observées entre la synthèse réalisée en présence ou non de silicium (Figure III-39c). Utilisé en forte proportion, le tétraacétate de silicium pourrait donc influencer les mécanismes de précipitation en modifiant, par exemple,

la force ionique du milieu réactionnel. Cependant, dans ce cas, le rapport molaire des réactifs (1,750) est significativement plus élevé que pour les autres teneurs en silicium (1,553 et 1,611). Ce rapport molaire Ca/P élevé conduit à une quantité d'ions calcium présents dans le réacteur beaucoup plus importante que dans les autres cas. Or, le milieu réactionnel évolue dès le début de l'introduction des réactifs dans la solution de calcium. L'état du système pour un temps de maturation nul est donc cinétiquement plus avancé que pour les autres teneurs en silicium. Les précipités synthétisés en l'absence de silicium présentent donc un rapport molaire Ca/P plus élevé.

Au final, pour des conditions de température et de pH similaires, la synthèse d'une poudre uniquement constituée de la phase cristalline de β -TCP requiert un temps de maturation précis qui diminue avec la teneur en silicium. La présence de silicium dans le milieu réactionnel serait indirectement responsable d'une augmentation de la cinétique de la réaction de précipitation *via* l'augmentation du rapport molaire Ca/P des réactifs.

III.4.3. Frittage des poudres

Après une calcination des poudres brutes à 750°C, suivi d'un frittage naturel à 1100°C, il est possible d'obtenir des matériaux denses à base de β -TCP et de silicium. La microstructure des céramiques est à grains fins et aucune croissance granulaire anormale n'est constatée.

L'introduction de silicium dans le β -TCP ralentit le processus de densification (Figure III-27 et Tableau III-10) et le grossissement des grains (Figure III-30). Pour des conditions identiques de frittage, une diminution de 57 % de la taille moyenne des grains de TCP est enregistrée après l'addition de silicium à hauteur de $x = 0,05$. Bandyopadhyay et coll. ont également observé un tel phénomène dans des matériaux constitués de β -TCP et de SiO_2 [BAN06].

La présence d'une phase amorphe dans le matériau pourrait expliquer un tel comportement. Cette phase amorphe n'est pas localisée dans les joints de grains mais est aléatoirement répartie dans le matériau sous la forme de grains sphériques (Figure III-33). Le matériau peut donc être assimilé à un composé biphasé. Dans le cas présent, la phase amorphe (à base de SiO_2) est réfractaire. Elle reste donc solide aux températures de consolidation (1100°C) utilisées, ce qui ne modifie pas la nature du frittage. La céramique peut alors être décrite comme un composite où la phase minoritaire (la phase amorphe) constitue des inclusions inertes dans la matrice céramique (le β -TCP). Dans de tels systèmes, les inclusions ont pour conséquence un ralentissement du frittage de l'ensemble du matériau [WEI88].

En résumé :

Synthèse

- Augmentation de la vitesse de réaction avec le rapport molaire Ca/P des réactifs dû à la présence de tétraacétate de silicium (lié à l'hypothèse de calcul des proportions)
- Conditions précises requises en présence de silicium pour synthétiser du TCP apatitique
→ pH = 7, T = 30°C et temps de maturation qui diminue avec la teneur en Si

Frittage

- Incorporation partielle du silicium dans la structure du β -TCP
- Excédent de silicium présent dans des grains de silice amorphe
- Ralentissement du processus de densification des poudres en présence de silice inerte
- Elaboration de matériaux denses par frittage naturel à base de β -TCP et de silice
→ Palier de 2 h à 1100°C sous air

Chapitre IV

Étude des céramiques en milieu acellulaire et cellulaire

Chapitre IV : Étude des céramiques en milieu acellulaire et cellulaire

Le β -TCP est une céramique biocompatible et biorésorbable largement utilisée sous la forme de substitut de comblement osseux. Du silicium a été incorporé dans ce matériau dans le but de stimuler la régénération osseuse. Afin d'évaluer les effets de cette modification une étude biologique est nécessaire. La première partie de ce chapitre est consacrée à l'étude du comportement des matériaux denses précédemment élaborés, notés β -TCP, $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP et $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP, lors de leur immersion dans des fluides biologiques simulés. Ensuite, ces matériaux seront testés en culture cellulaire. Différentes lignées de cellules ostéoblastiques ont été cultivées à la surface des échantillons denses à base de β -TCP et de silicium, afin d'évaluer la cytocompatibilité des matériaux, leur aptitude à induire la différenciation ostéoblastique ou encore la biominéralisation osseuse.

IV.1. Comportement des matériaux en fluide biologique simulé

L'ostéointégration d'un implant est régie par de nombreux phénomènes ayant lieu à l'interface entre l'os et la surface du matériau. Le phosphate tricalcique β , utilisé pour le remplacement de tissu osseux sous faible contrainte mécanique, est un matériau biorésorbable [HEN98]. Employé comme support temporaire pour la repousse osseuse, il est rapidement colonisé et remplacé par de l'os néoformé. L'une de ses principales caractéristiques est sa forte biorésorption : le phosphate tricalcique se dissout 22,3 fois plus rapidement que l'hydroxyapatite en milieu basique [JAR81]. La biorésorption des implants phosphocalciques est gouvernée par de nombreux facteurs dont principalement leur composition chimique et leurs caractéristiques physiques. L'étude de la dégradation en milieu physiologique des matériaux à base de β -TCP et de silicium apparaît donc essentielle. Aussi, des essais de dégradation ont été réalisés dans des solutions tamponnées TRIS-NaCl.

La dégradation du matériau est accompagnée de phénomènes de précipitation conduisant à la formation d'une couche d'apatite carbonatée proche du minéral osseux. Cette précipitation assure l'intégration de l'implant sur le site osseux receveur. Ces phénomènes peuvent être reproduits, *in vitro*, par immersion dans une solution de type SBF (*Simulated Body Fluid*). Ces solutions ioniques sursaturées simulent les fluides biologiques en terme de pH, de concentration et de nature des ions en présence (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} ...) [KOK06]. Cette technique génère un intérêt croissant depuis sa première utilisation en 1990 par T. Kokubo [KOK90]. Par la suite, des variantes de la solution originale SBF ont été élaborées [KOK91; OYA03; TAK04]. Le comportement de l'HA et du β -TCP dans ce type de solution a déjà été étudié [KIM04; JUH08]. Afin d'évaluer la capacité des matériaux à base de β -TCP et de silicium à précipiter une couche apatitique en surface, des essais d'immersion dans des solutions sursaturées ont été réalisés.

Cette partie du manuscrit s'attache à décrire la dégradation des céramiques denses de β -TCP contenant différentes teneurs en silicium ainsi que les transformations chimiques intervenant à la surface des matériaux lors de leur immersion dans la solution saturée SBF définie par T. Kokubo [KOK91].

IV.1.1. Étude de la dégradation des céramiques à base de β -TCP et de silicium

Les conditions opératoires relatives aux essais de dégradation en milieu acellulaire sont précisées au paragraphe II.3.2. Tout au long de l'étude les matériaux analysés sont les mêmes mais les solutions de dégradation sont renouvelées après chaque point d'analyse. La dégradation des matériaux a été quantifiée par mesure de la concentration en ions phosphate et calcium relargués dans la solution environnante et par observation MEB de la surface des échantillons.

La Figure IV-1 présente l'évolution de la concentration en ions calcium et phosphore dans les solutions de dégradation en fonction du temps d'immersion. Quel que soit le matériau, les concentrations en calcium et phosphore augmentent progressivement avec le temps d'immersion. Ces concentrations évoluent de manière similaire pour les compositions β -TCP et $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP tandis que $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP présente, tout au long de l'étude, un relargage d'ions calcium et phosphore plus important. Au bout de 28 jours d'immersion, les concentrations mesurées pour $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP sont de 350 et 25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivement pour les ions calcium et phosphate tandis qu'elles ne sont que de 250 et 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pour les deux autres matériaux.

Sur des substrats poreux d'apatite déficiente en calcium et de rapport molaire Ca/P égal à 1,5 fabriqués à partir de ciments de phosphate de calcium, Guo et coll. obtiennent des évolutions semblables [GUO09]. Les concentrations mesurées dans leur étude sont cependant plus élevées. Au bout de 6 h d'immersion les concentrations en ions calcium et phosphate sont respectivement de 150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ et 70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, la résorption de matériaux poreux étant plus grande que celle de matériaux denses de part une surface spécifique plus élevée [JAR81].

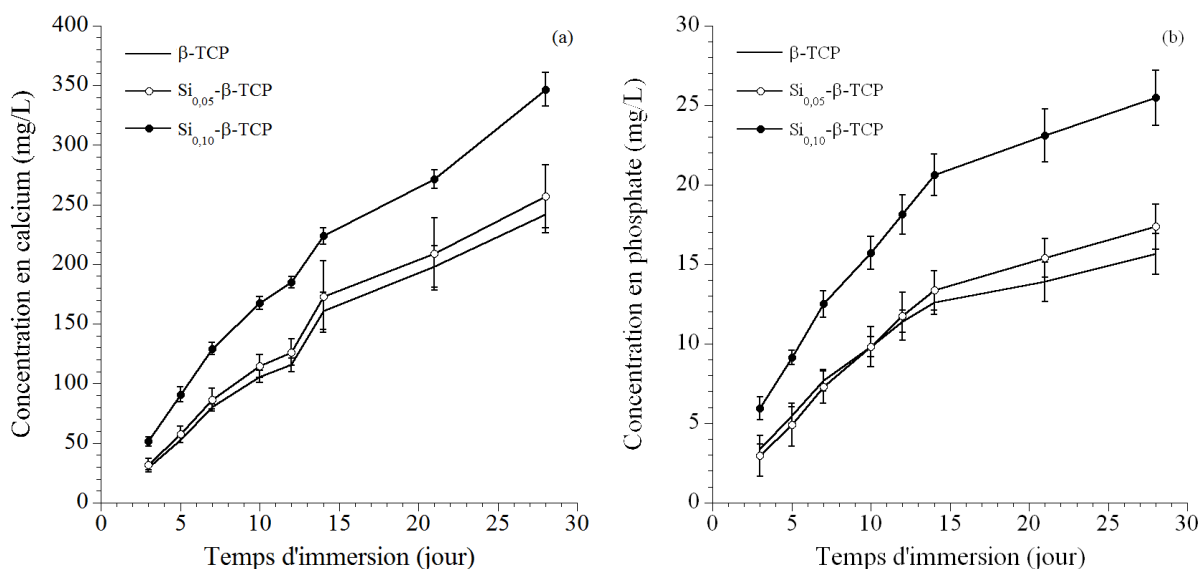


Figure IV-1 : Évolution de la concentration en (a) ions calcium et (b) en ions phosphate dans la solution de dégradation en fonction du temps d'immersion des matériaux

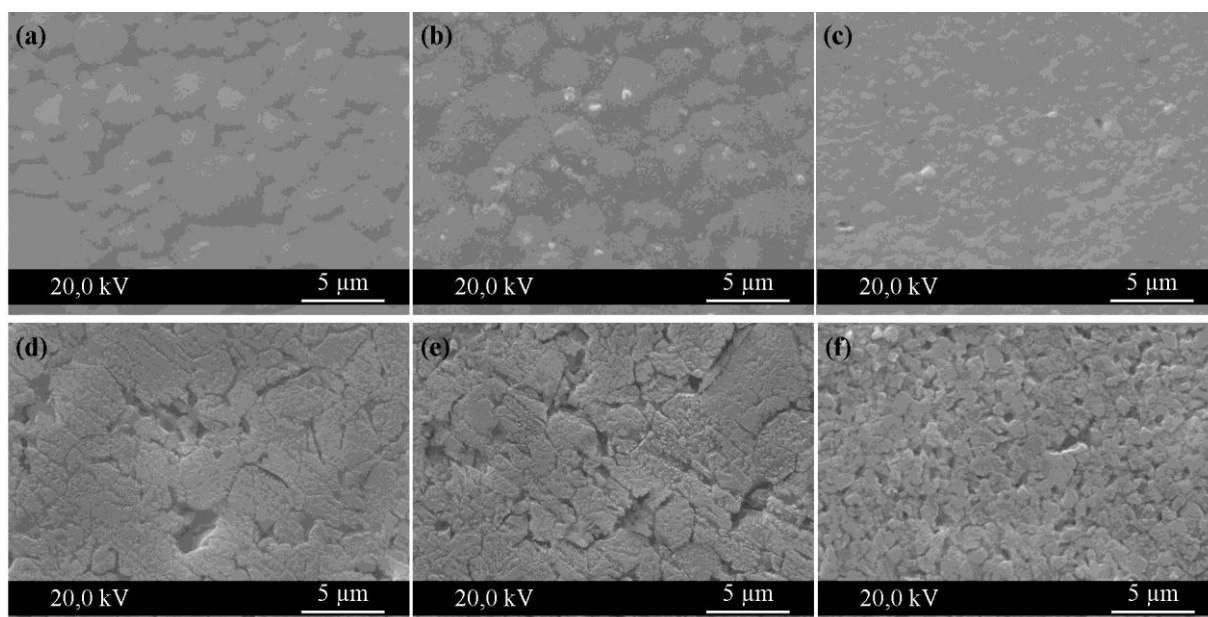


Figure IV-2 : Observations MEB de la surface de (a,d) β -TCP, (b,e) $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP et (c,f) $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP avant (a, b, et c) et après (d, e et f) 28 jours d'immersion dans la solution de dégradation

La surface des échantillons a été observée au MEB avant et après immersion pendant 28 jours (Figure IV-2). Les clichés représentant la surface avant immersion sont acquis sur des surfaces non polies. La comparaison des clichés met en évidence une érosion non uniforme de la surface des échantillons, conséquence du phénomène de dégradation des matériaux. Il n'y a plus de traces de polissage à la surface de $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP (Figure IV-2f) contrairement à la surface des autres échantillons (Figure IV-2d, e). Aucune trace de précipité n'apparaît à la surface des échantillons.

IV.1.2. Comportement des céramiques en milieu SBF

L'étude des transformations chimiques à la surface des matériaux en milieu SBF a été réalisée suivant le protocole détaillé au paragraphe II.3.1. Après différents temps d'immersion en solution sursaturée, la surface des échantillons est observée par MEB et analysée par DRX ainsi que par FT-IR. Après immersion, les solutions SBF ont fait l'objet d'analyses chimique par ICP/AES afin d'en déterminer les concentrations en ions calcium, phosphore et silicium. Leur pH a également été mesuré.

IV.1.2.a. Analyse des échantillons après immersion

La Figure IV-3 montre les images MEB des matériaux après avoir été immergés 7 jours dans une solution SBF. En comparaison aux surfaces avant immersion (Figure IV-2 a, b et c) et indépendamment de leur composition, des grains sphériques constitués d'aiguilles se sont

formés à la surface de chaque échantillon (Figure IV-3b, d et f). De telles structures ont déjà été observées à la surface de matériaux à base de phosphate de calcium [HUA04; VAL04; JUH08], d'hydroxyapatite silicatée [THI06-a], de gel de silice [LI93] ou de titane [KIM96] et sont caractéristiques des précipités d'apatite. Suivant la composition du substrat, la taille des grains varie. Ils ont un diamètre d'environ 2 μm pour le β -TCP et $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP (Figure IV-3a et b) et d'environ 4 μm pour $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP (Figure IV-3c). De plus, la présence de silicium au sein des échantillons conduit à des couches plus denses que sur le β -TCP traduisant une bioactivité plus forte après addition de silicium.

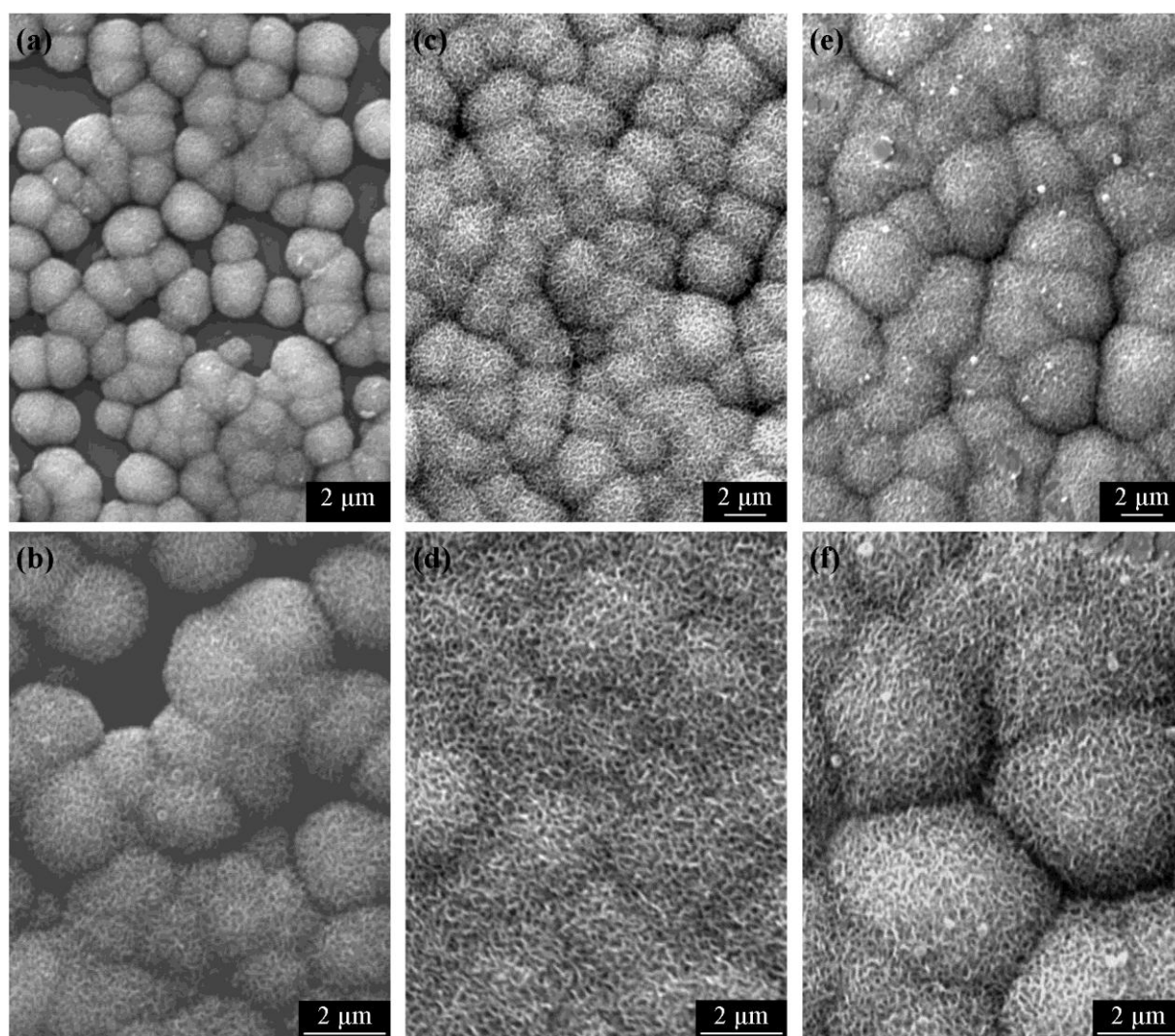


Figure IV-3 : Observation MEB de la surface de (a, b) β -TCP, (c, d) $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP et (e, f) $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP immergés en solution SBF pendant 7 jours

La nature des grains formés à la surface des matériaux a été déterminée par FT-IR et DRX.

Les diffractogrammes de la surface des échantillons, avant et après immersion dans la solution SBF, sont présentés sur la Figure IV-4. Quel que soit le temps d'immersion ou l'échantillon analysé, les pics de diffraction relatifs à la phase cristalline de β -TCP sont présents et leur

intensité diminue avec le temps d'immersion. D'autres modifications sont également à noter. Le pic de diffraction du β -TCP situé à $25,80^\circ$, correspondant au plan (1010) d'intensité relative 25 %, s'évase vers les forts angles et l'intensité de ce signal augmente avec le temps d'immersion en solution SBF. Selon sa fiche PDF (n°09-0432), l'apatite présente une raie de diffraction à $2\theta = 25,88^\circ$ d'intensité 40 % qui correspond au plan (002). Dans la zone autour de $2\theta = 32^\circ$, le fond continu des profils de DRX voit son intensité augmenter sur les échantillons ayant séjournés dans la solution SBF. Dans cette région angulaire, l'apatite présente également des pics de diffraction centrés à $2\theta = 31,77^\circ$ (plan (211), d'intensité relative = 100 %) et à $2\theta = 32,20^\circ$ (plan (112), d'intensité relative = 60 %). Ces résultats semblent indiquer qu'une phase de type apatite est détectée par DRX à la surface des matériaux.

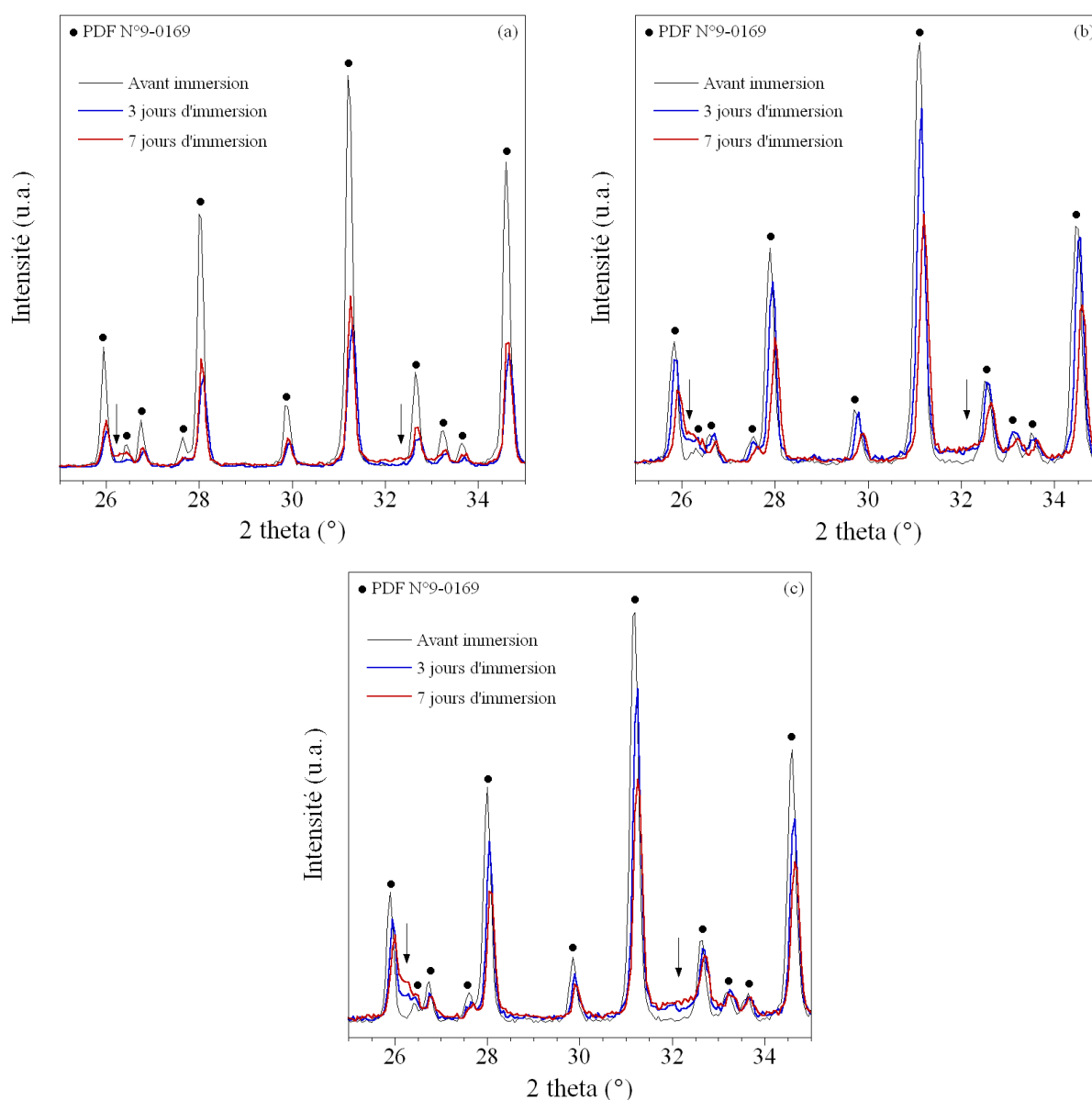


Figure IV-4 : Diffractogrammes des pastilles de (a) β -TCP, (b) $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP et (c) $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP avant et après immersion dans la solution SBF

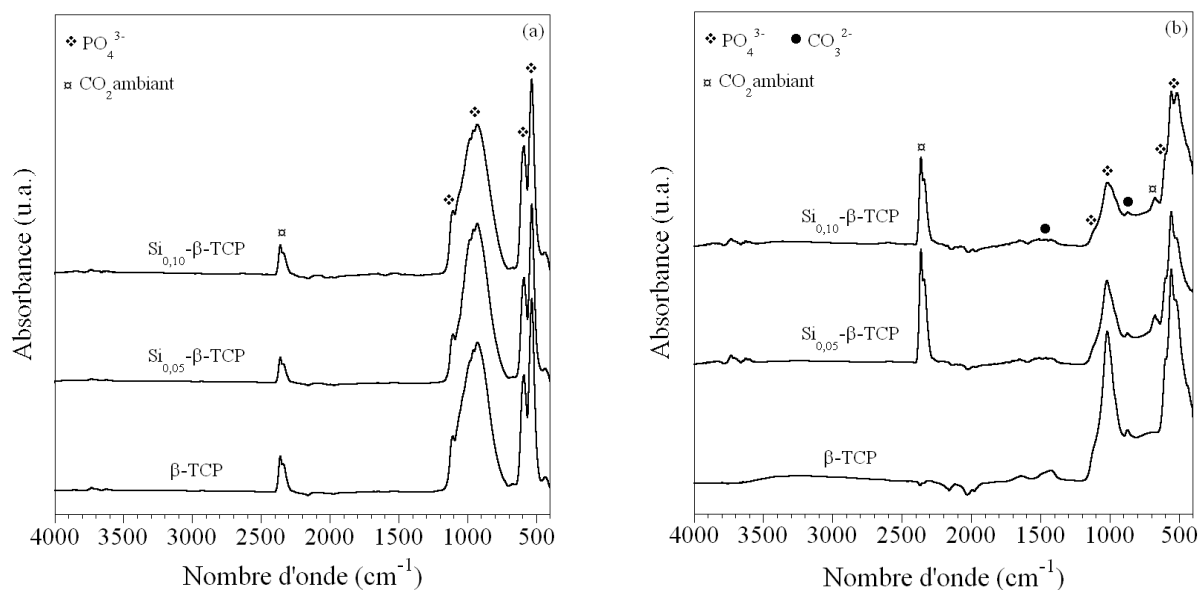


Figure IV-5 : Spectres FT-IR des pastilles (a) avant et (b) après immersion pendant 7 jours dans la solution SBF

Les spectres FT-IR de la surface des échantillons avant immersion (Figure IV-5a) ne présentent que les bandes d'absorption caractéristiques des groupements phosphate du β -TCP à 1120 (ν_3 PO_4), 960 (ν_1 PO_4), 610 (ν_4 PO_4) et 500 cm^{-1} (ν_2 PO_4). Après 7 jours d'immersion dans la solution SBF (Figure IV-5b), les bandes d'absorption sont larges et peu dédoublées ce qui indique la présence d'un composé peu cristallisé. Les pics relatifs aux groupements phosphate sont retrouvés à la surface des trois matériaux. Par rapport aux spectres avant immersion, de nouvelles bandes d'absorption apparaissent à 1460 et 870 cm^{-1} . Elles sont caractéristiques des groupements carbonates présents dans les apatites carbonatées de type B, structure où des ions phosphate sont substitués pas des ions carbonate [LEG69].

IV.1.2.b. Analyse des solutions après immersion

Après immersion des échantillons de β -TCP contenant différents teneurs en silicium dans les solutions SBF, le pH des solutions a été mesuré (Figure IV-6a). Ces solutions présentent initialement un pH de 7,4. Quelques heures après l'introduction des matériaux, le pH des solutions augmente pour se stabiliser autour de 7,7, résultat fréquemment retrouvé dans la littérature [HUA04; LEI07; WEI07-b].

Les concentrations en ions calcium et phosphore des solutions SBF suivent la même évolution et ce, quel que soit le matériau (Figure IV-6b et c). La solution SBF initiale contient des concentrations en ions calcium et phosphore d'environ 80 et 25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivement. Après immersion des matériaux, une forte diminution de ces concentrations est enregistrée dès les

premières heures pour atteindre des valeurs d'environ 50 et 10 mg·L⁻¹ respectivement. Il est à noter que la cinétique de décroissance de ces concentrations semble diminuer après 7 jours d'immersion.

La concentration en ions silicium suit une évolution différente de celles observées pour les ions calcium et phosphore (Figure IV-6d). Les valeurs mesurées dans les solutions au contact du β-TCP sont constantes et diffèrent peu de la valeur mesurée dans la solution SBF initiale, soit 0,5 mg·L⁻¹. Pour les autres échantillons, la concentration en silicium dans les solutions SBF augmente avec le temps d'immersion jusqu'à des valeurs de 1 mg·L⁻¹ pour Si_{0,05}-β-TCP et 4 mg·L⁻¹ pour Si_{0,10}-β-TCP.

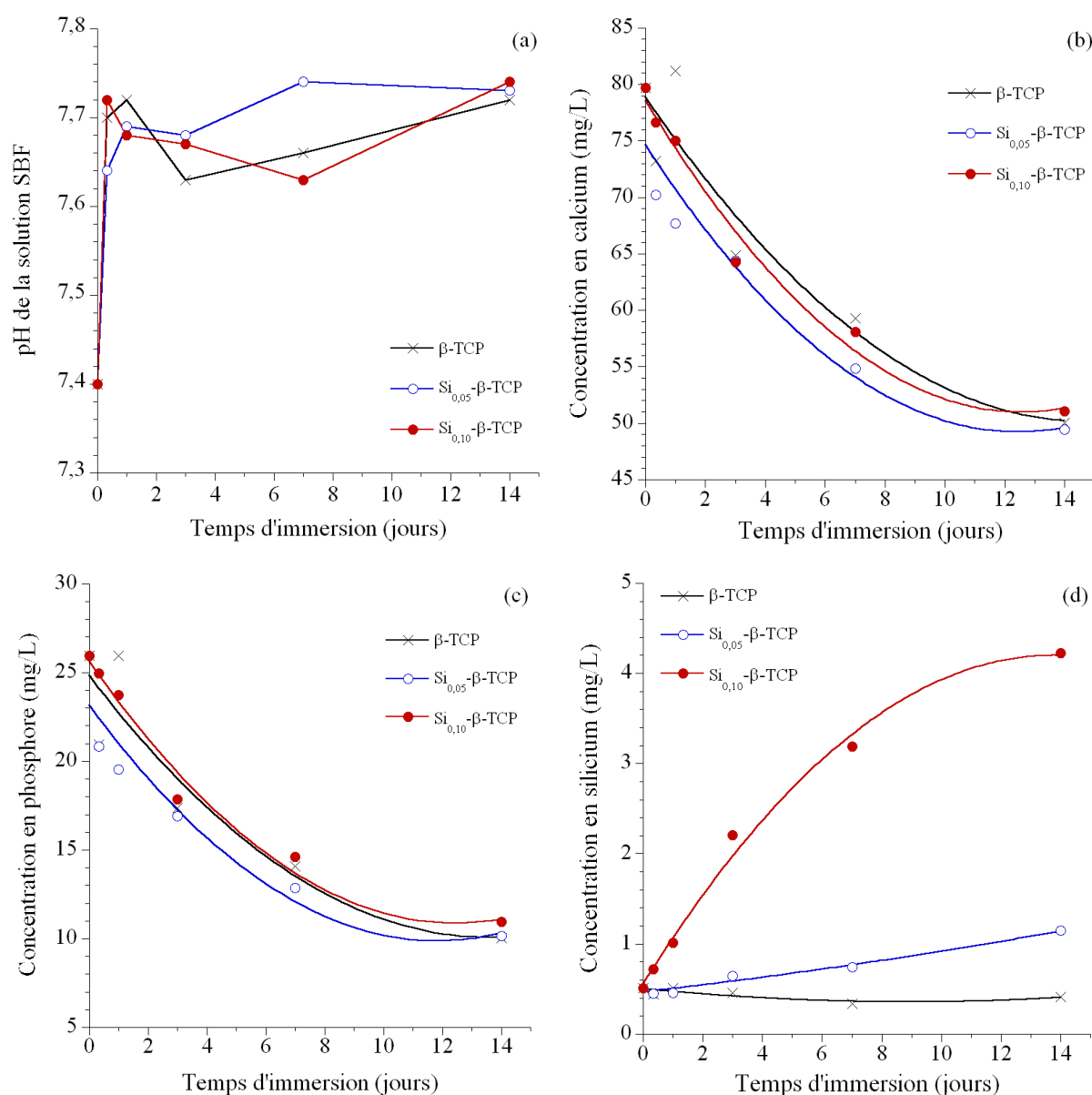


Figure IV-6 : Évolution (a) du pH, de la concentration (b) en ions calcium, (c) en ions phosphore et (d) en ions silicium de la solution SBF en fonction du temps d'immersion des matériaux

IV.1.3. Discussion

L'analyse des solutions de dégradation indique que les matériaux libèrent des ions calcium et phosphate dans le temps et que la concentration libérée par $\text{Si}_{0,10}\text{-}\beta\text{-TCP}$ est plus importante que pour les autres matériaux. Selon Porter et coll. la dissolution *in vivo* de matériaux d'HA et d'HA silicatée a lieu préférentiellement aux joints de grains [POR03]. Or, il a été précédemment montré que la taille des grains des matériaux denses de $\beta\text{-TCP}$ diminue avec la teneur en silicium (Figure III-29). Une diminution de la taille des grains entraîne logiquement une augmentation du nombre de joints de grains à la surface du matériau. Les clichés MEB des matériaux à l'issue de l'étude de dégradation (Figure IV-2), qui mettent en évidence une concentration de zones dégradées plus importante à la surface de $\text{Si}_{0,10}\text{-}\beta\text{-TCP}$, vont dans ce sens. L'augmentation de la concentration en ions calcium et phosphate libérés ne serait pas à mettre en relation, à proprement parler, avec la présence du silicium mais plutôt aux conséquentes modifications de microstructure qu'il induit lors du frittage de la céramique.

Dans le milieu SBF, solution ionique sursaturée, la concentration en ions calcium et phosphore diminue avec le temps d'immersion et est accompagnée d'une augmentation du pH (Figure IV-6a, b, c). Cette évolution serait attribuée à la croissance de la couche d'apatite mise en évidence par MEB à la surface des matériaux (Figure IV-3). Dès lors qu'un germe d'apatite s'est formé, il croît en consommant les ions calcium et phosphore à disposition dans le fluide environnant. A l'issue des 14 jours d'immersion, la diminution de la concentration en ions calcium est d'environ $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ et celle de phosphore d'environ $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ par rapport à la solution initiale, ce qui correspond à une décroissance de respectivement $7,5\cdot 10^{-4}$ et $4,8\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Cette diminution répond à un rapport molaire Ca/P voisin de 1,56. Ce rapport molaire, traduit un déficit en calcium de la couche d'apatite néoformée. Ces résultats sont en accord avec l'étude de X. Wei et coll. [WEI09]. Ces auteurs ont étudié la dissolution en milieu SBF du $\beta\text{-TCP}$ et de $\beta\text{-TCP}$ contenant 10 % molaire de silicium et de zinc. Ils suggèrent que l'augmentation de pH de 7,4 à 7,8 mesurée dans les solutions SBF correspond à la formation d'un phosphate de calcium de faible rapport molaire Ca/P.

Le processus de précipitation est généralement précédé d'un phénomène de dissolution des matériaux. Lorsque les matériaux sont immergés dans la solution SBF, ils libèrent des ions phosphate et calcium jusqu'à ce que la solution environnante devienne saturée, déclenchant la nucléation d'apatite [WEI09]. Cependant, aucune augmentation de concentration n'est observée au cours des premières heures d'immersion. Les résultats de dégradation indiquent néanmoins bien que les matériaux subissent une dissolution et libèrent des ions phosphate et

calcium. Selon S. R. Radin et coll., le phénomène de précipitation démarre à la surface du β -TCP après 6 h d'immersion, temps pendant lequel le matériau se dissout et le milieu environnant atteint la saturation [RAD93]. La première mesure étant ici effectuée après 8 h, il ne serait donc pas possible de distinguer les deux phénomènes. Pour ce faire, des mesures de concentrations à des temps d'immersion plus courts seraient nécessaires. Pendant les 8 premières heures d'immersion (premier point de mesure), les concentrations en calcium et phosphore libérées ont donc été suffisantes pour amorcer la nucléation d'apatite. Par la suite, les mécanismes de précipitation et de dissolution interviennent alors quasi simultanément et le premier mécanisme est prédominant sur le second. A partir de 7 jours d'immersion, la consommation des ions phosphore et calcium ralentit (Figure IV-6b, c). Selon M. Bohner et coll., la cinétique de dissolution du β -TCP est limitée par la diffusion et cette cinétique diminue avec la formation d'une couche d'apatite à la surface du matériau [BOH97]. Au fur et à mesure que la couche d'apatite se forme, la dissolution du β -TCP et donc le phénomène de précipitation d'apatite à la surface du β -TCP ralentissent, provoquant une diminution de la consommation en ions phosphore et calcium. Aucune différence d'évolution de concentrations dans le temps n'est observée dans les essais de dégradation (Figure IV-1). En effet, pour cette étude, le milieu de dégradation n'est pas une solution sursaturée et est de plus renouvelé après chaque point de mesure. Le fluide environnant les matériaux n'atteint donc pas la saturation nécessaire pour précipiter une couche d'apatite comme le confirment les observations MEB (Figure IV-2).

Dans le milieu SBF les concentrations en calcium et en phosphore diminuent continuellement et de manière similaire quel que soit le matériau. La concentration en silicium, quant à elle, augmente avec le temps d'immersion et avec la teneur en silicium des échantillons. Le silicium ne semble donc pas précipiter avec les ions calcium et phosphore de la solution saturée pour former les grains d'apatite. De plus, l'évolution de la concentration en silicium n'est pas proportionnelle à la teneur en silicium des échantillons ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ lorsque $x = 0,05$ contre $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pour $x = 0,10$ après 14 jours d'immersion, Figure IV-6d). Cette remarque confirmerait que la dissolution des matériaux augmente avec la teneur en silicium.

Des évolutions similaires de concentration en silicium ont été mises en évidence par E. S. Thian et coll. dans le cas de l'HA silicatée et sur une période d'immersion de 15 jours [THI06-a]. Selon A. E. Porter et coll. la dissolution du silicium à partir d'HA silicatée permet de favoriser la nucléation d'apatite carbonatée [POR04-b]. Cette remarque expliquerait la densité plus importante de grains sphériques d'apatite observée à la surface du β -TCP contenant du silicium (Figure IV-3). L'amélioration de la bioactivité en présence de silicium a

déjà été mise en évidence sur l'hydroxyapatite silicatée *in vivo* et *in vitro* [PAT02; BAL03; POR04-b], cependant, une publication récente remet en cause ces conclusions [BOH09]. M. Bohner signale qu'à ce jour, aucune étude ne démontre le réel bénéfice apporté par l'addition de silicium dans les phosphates de calcium, par manque de rigueur dans la description des matériaux étudiés ou des essais biologiques employés. C'est pourquoi, dans la présente étude, une attention particulière a été portée à la caractérisation des matériaux avant leur évaluation biologique (Chapitre III). Outre le relargage plus important de Si des échantillons contenant du silicium, sa présence sous forme amorphe dans le matériau pourrait également être responsable d'une augmentation de la bioactivité. En effet, il est bien connu que les verres sont des matériaux particulièrement bioactifs [KOK91; LI93].

L'ensemble de ces analyses met en évidence la formation à la surface des matériaux, de grains micrométriques d'apatite carbonatée peu cristallisée et déficiente en calcium par des mécanismes simultanés de dissolution et de précipitation. La présence de silicium n'entrave pas le caractère bioactif du β -TCP. Au contraire, en occasionnant une diminution de la taille des grains des céramiques, elle semble augmenter la bioactivité des matériaux.

Le silicium, qui est un élément essentiel pour la croissance et le développement des os et des tissus [CAR70], a été localisé sur des sites actifs de formation osseuse de jeunes rats et souris [LAN86]. La libération de silicium, provenant des matériaux, dans les fluides environnants semble donc potentiellement intéressante pour stimuler l'ostéogénèse. Il faut néanmoins s'assurer que ce relargage ne soit pas biologiquement néfaste. Une étude de culture cellulaire est alors nécessaire pour évaluer l'effet du silicium dans le β -TCP sur la biocompatibilité ainsi que sur le processus de régénération osseuse, ce qui fait l'objet du paragraphe suivant.

IV.2. Évaluation biologique en milieu cellulaire

Afin d'évaluer *in vitro* le comportement biologique des céramiques à base de β -TCP et de silicium, trois types de cellules de la lignée ostéoblastique (cellules précurseurs ou pré-ostéoblastes) ont été cultivées à la surface des matériaux (*cf.* paragraphe II.3.3.b) :

- Les cellules MC3T3-E1, pour évaluer la cytocompatibilité des matériaux
- Les cellules ST-2, afin d'étudier la différenciation ostéoblastique
- Les cellules SaOs-2, pour étudier l'aptitude des matériaux à induire la minéralisation.

Préalablement à l'ensemencement cellulaire, la rugosité de la surface des matériaux a été mesurée. Les valeurs, présentées au Tableau IV-1, sont toutes semblables. Une rugosité similaire des échantillons est nécessaire pour éliminer un éventuel effet de la topographie sur le comportement cellulaire. En effet, la réponse cellulaire *in vitro* est influencée par les propriétés chimiques mais également physiques de la surface des matériaux [DOS09]. Afin de n'étudier que l'influence de l'ajout de silicium dans le β -TCP, des surfaces de topographie similaires sont donc requises.

Tableau IV-1 : Rugosité moyenne des pastilles pour la culture cellulaire

Matériau	R _a (μm)
β -TCP	0,08 ± 0,01
Si _{0,05} - β -TCP	0,04 ± 0,02
Si _{0,10} - β -TCP	0,06 ± 0,02

IV.2.1. Évaluation de la cytocompatibilité des matériaux

L'étude de la cytocompatibilité se fait après 48 h de culture des cellules MC3T3-E1 à la surface des matériaux selon les protocoles détaillés au paragraphe II.3.4. L'activité mitochondriale des cellules ainsi que la perméabilité de la membrane cellulaire (ou la toxicité cellulaire) sont estimées par l'intermédiaire des tests WST-1 et Resazurin respectivement. Le comptage des cellules permet, de plus, d'évaluer la prolifération cellulaire.

IV.2.1.a. Résultats

Les résultats de l'évaluation de la cytocompatibilité des matériaux sont présentés sur la Figure IV-7. Le nombre de cellules compté à la surface des phosphates de calcium est toujours plus

faible comparativement au matériau de référence (Figure IV-7a). Cependant, le nombre de cellules augmente avec la teneur en silicium et il est significativement plus élevé sur les pastilles de β -TCP contenant du silicium que sur le β -TCP pur ($p < 4,00 \cdot 10^{-4}$). L'addition de silicium induit une augmentation de la prolifération des cellules ostéoblastiques sur la période de 48 h. L'activité mitochondriale des cellules MC3T3-E1 cultivées sur les matériaux augmente sensiblement avec la teneur en silicium (Figure IV-7a). Celle-ci est significativement plus élevée sur les pastilles de Si_x - β -TCP par rapport au matériau de référence. Cependant, aucune différence significative n'est mise en évidence entre les matériaux céramiques.

La perméabilité de la membrane des cellules cultivées sur ces céramiques est, quant à elle, supérieure à celle mesurée sur le matériau de référence (Figure IV-7b). Aucune différence significative de cytotoxicité n'est enregistrée entre $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP et la référence mais des valeurs significativement plus élevées sont mesurées sur le β -TCP ($p = 6,9 \cdot 10^{-4}$) et $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP ($p = 8,65 \cdot 10^{-3}$). Le β -TCP et $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP apparaissent donc plus toxiques pour les MC3T3-E1 que le matériau de référence.

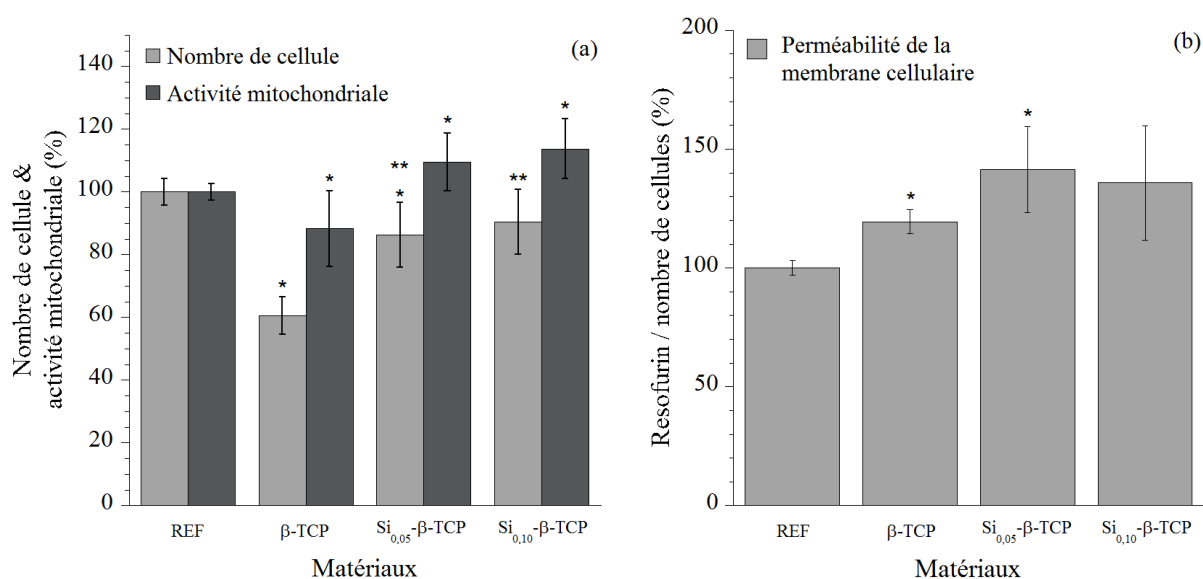


Figure IV-7 : Activité mitochondriale, nombre de cellules (a) et perméabilité de la membrane cellulaire (b) des cellules MC3T3-E1 cultivées 48 h, résultats normalisés par rapport à la référence (REF = 100 %), *p < 0,05 vs. REF et **p < 0,005 vs. β -TCP, les résultats présentent la moyenne \pm l'écart-type de mesures effectuées en duplicata sur 4 échantillons

La morphologie des cellules à l'issue des 48 h de culture a été observée par MEB (Figure IV-8). Les cellules MC3T3-E1 sont bien étalées à la surface de toutes les céramiques et forment une monocouche dense, proche de la confluence (Figure IV-8a, c et e). Quel que soit le matériau, les cellules possèdent une membrane structurée indiquant une forte activité

métabolique (Figure IV-8b, d et f). Elles possèdent en outre de nombreuses extensions cytoplasmiques leur conférant une morphologie en forme d'étoile, ce qui confirme la bonne croissance cellulaire ainsi qu'une forte adhésion des cellules aux matériaux.

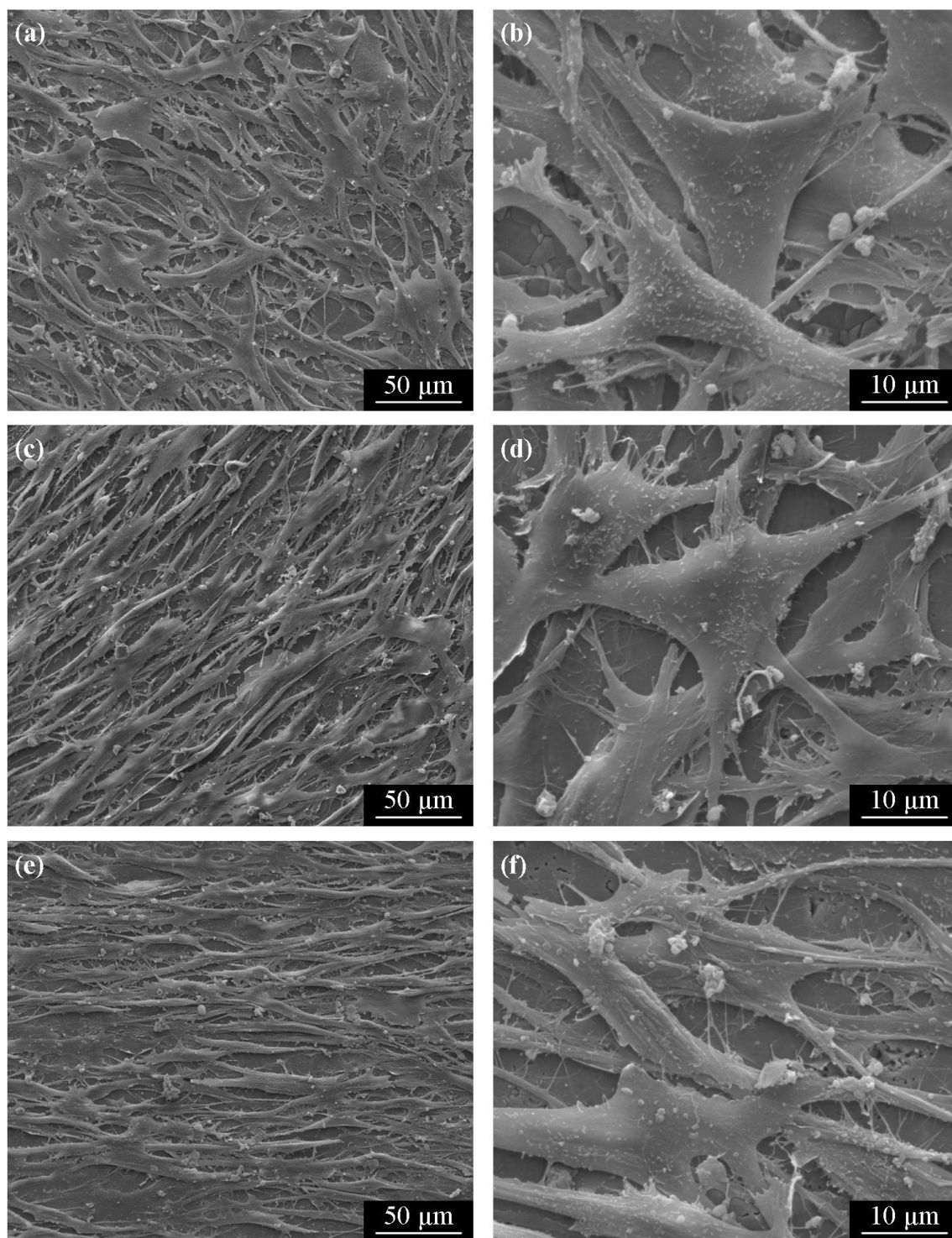


Figure IV-8 : Observations MEB des cellules MC3T3-E1 après 48 h de culture à la surface de (a), (b) β -TCP, (c), (d) $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP et (e), (f) $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP

IV.2.1.b. Discussion

La prolifération cellulaire observée sur les échantillons contenant du silicium est significativement plus élevée que sur le β -TCP pur (Figure IV-7a). Une précédente étude à montré qu'une solution riche en silicium est mitogénique (favorise la mitose et la division cellulaire) pour les cellules osseuses [KEE92]. En libérant un produit riche en silicium, les verres bioactifs stimuleraient la prolifération des ostéoblastes [XYN00]. La topographie de surface des échantillons étant semblable, le silicium relargué par les échantillons contenant du silicium (Figure IV-6d) pourrait expliquer l'augmentation de prolifération des cellules ostéoblastiques à la surface de Si_x - β -TCP. S. Ni et coll. suggèrent la même remarque après avoir observé une augmentation de la prolifération cellulaire ainsi que de la concentration en ions silicium libérée de la surface de CaSiO_3 par rapport à β -TCP [NI07]. Associée aux résultats de l'activité mitochondriale, cette étude montre que les cellules sont actives et viables au contact du β -TCP même après l'ajout de silicium. Selon les résultats de la perméabilité de la membrane cellulaire, le β -TCP et $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP apparaissent plus toxiques pour les cellules que la référence. Si tel était le cas, les cellules auraient tendance à réduire leurs points de contact avec la surface des matériaux. L'observation de leur morphologie par MEB indique au contraire que les cellules s'étalent et prolifèrent. En considérant les résultats dans leur globalité (nombre de cellules, activité mitochondriale, perméabilité de la membrane cellulaire et morphologie cellulaire), les différences observées sur la perméabilité de la membrane cellulaire sont marginales.

Au contact du β -TCP contenant du silicium, les cellules MC3T3-E1 sont actives, viables et prolifèrent. Les résultats de l'évaluation de la cytocompatibilité démontrent que les céramiques Si_x - β -TCP sont des matériaux biocompatibles. Bien que la prolifération cellulaire soit augmentée, l'addition de silicium n'améliore pas de manière significative la biocompatibilité du β -TCP. Des résultats similaires de prolifération cellulaire ont été mis en évidence à la surface de l'HA silicatée [PAL09-a]. Ces résultats ne sont obtenus qu'après 48 h de culture, afin d'évaluer de manière approfondie l'influence du silicium sur le comportement de cellules ostéoblastiques, il serait intéressant d'étudier leur cinétique de prolifération.

In vitro, après l'adhésion des cellules osseuses à la surface d'un matériau, une cascade d'évènements a lieu. Avant d'assurer la biominéralisation, les cellules mésenchymateuses doivent se différencier en ostéoblastes matures. Aussi, l'aptitude du β -TCP à induire la différenciation ostéoblastique a été étudiée et cette étude fait l'objet du paragraphe suivant.

IV.2.2. Évaluation de la différenciation ostéogénique

L'ostéogénèse est un processus complexe qui implique la différenciation de cellules mésenchymateuses en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes qui conduisent au final à la synthèse et au dépôt de protéines de la matrice osseuse. L'habilité des matériaux à base de β -TCP et de silicium à induire la différenciation ostéogénique a été étudiée à l'aide des cellules ST-2 au bout de 14 jours de culture à travers l'activité des ALP, la synthèse de collagène de type I et l'expression de gènes du phénotype ostéoblastique. Les protocoles correspondants à ces essais sont présentés au paragraphe II.3.5.

IV.2.2.a. Résultats

La prolifération des cellules ST-2 a été mesurée à l'aide de l'activité des lactates déshydrogénase (LDH) et l'activité mitochondriale renseigne sur la viabilité cellulaire (Figure IV-9a). Quel que soit le matériau, aucune différence significative n'est observée sur la prolifération cellulaire. Durant les 14 jours de culture, les cellules ST-2 ont proliféré de la même manière sur le matériau de référence que sur les céramiques. L'activité mitochondriale des cellules est significativement plus élevée sur les échantillons de Si_x - β -TCP que sur la référence. La viabilité des cellules ST-2 est donc plus grande sur les céramiques mais aucune différence significative n'est à noter suivant la teneur en silicium des échantillons.

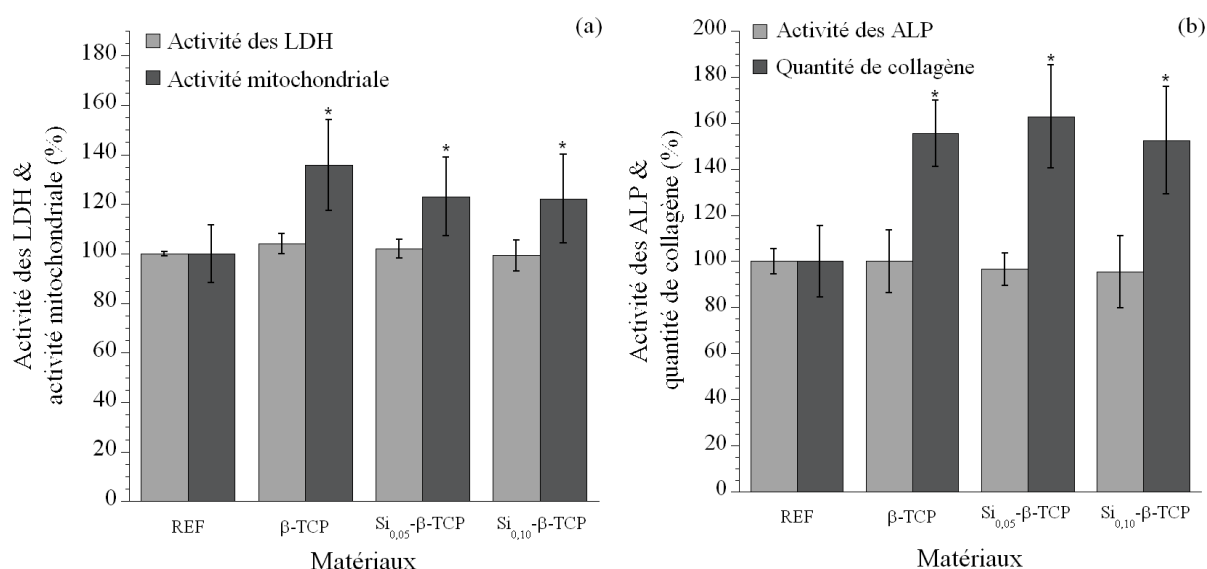


Figure IV-9 : (a) Activité des LDH et activité mitochondriale et (b) activité des ALP et quantification du collagène produit par les cellules ST-2 cultivées 14 jours, résultats normalisés par rapport à la référence (REF = 100 %), * $p < 0,0005$ vs. REF, les résultats présentent la moyenne \pm l'écart-type de 1 mesure effectuée sur chacun des 4 échantillons

L'activité des ALP ainsi que la quantification du collagène de type I renseignent sur la différenciation ostéoblastique. Quel que soit le matériau, l'activité des ALP mesurée au bout de 14 jours de culture est similaire (Figure IV-9b). Cependant, la production de collagène est significativement plus élevée à la surface des céramiques par rapport au matériau de référence, mais aucune différence majeure n'est observée suivant la teneur en silicium.

L'analyse RT-PCR indique que les cellules cultivées sur l'ensemble des matériaux (céramiques et référence) expriment, au bout de 14 jours, les gènes codant pour le collagène de type I (COLL I), l'ostéocalcine (OC), la sialoprotéine osseuse (BSP), l'ostéoprotégérine (OPG) et RANK-L (Figure IV-10).

La morphologie des cellules ST-2 à l'issue des 14 jours d'incubation a été observée (Figure IV-11). Un tapis de cellules recouvre de manière homogène tous les échantillons (Figure IV-11a, c et e). Aucune différence majeure n'est remarquée suivant la nature de l'échantillon. Les cellules ont correctement proliféré et adhéré aux substrats. Les cellules possèdent en outre une membrane structurée indiquant une forte activité métabolique et ce, quelle que soit la teneur en silicium de l'échantillon (Figure IV-11b, d et f).

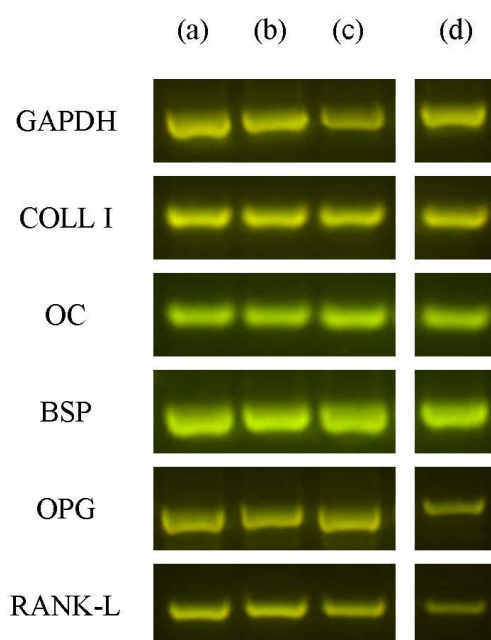


Figure IV-10 : Transcription des gènes impliqués dans la différenciation ostéogénique pour (a) β -TCP, (b) $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP, (c) $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP et (d) REF, le gène GAPDH étant utilisé comme contrôle

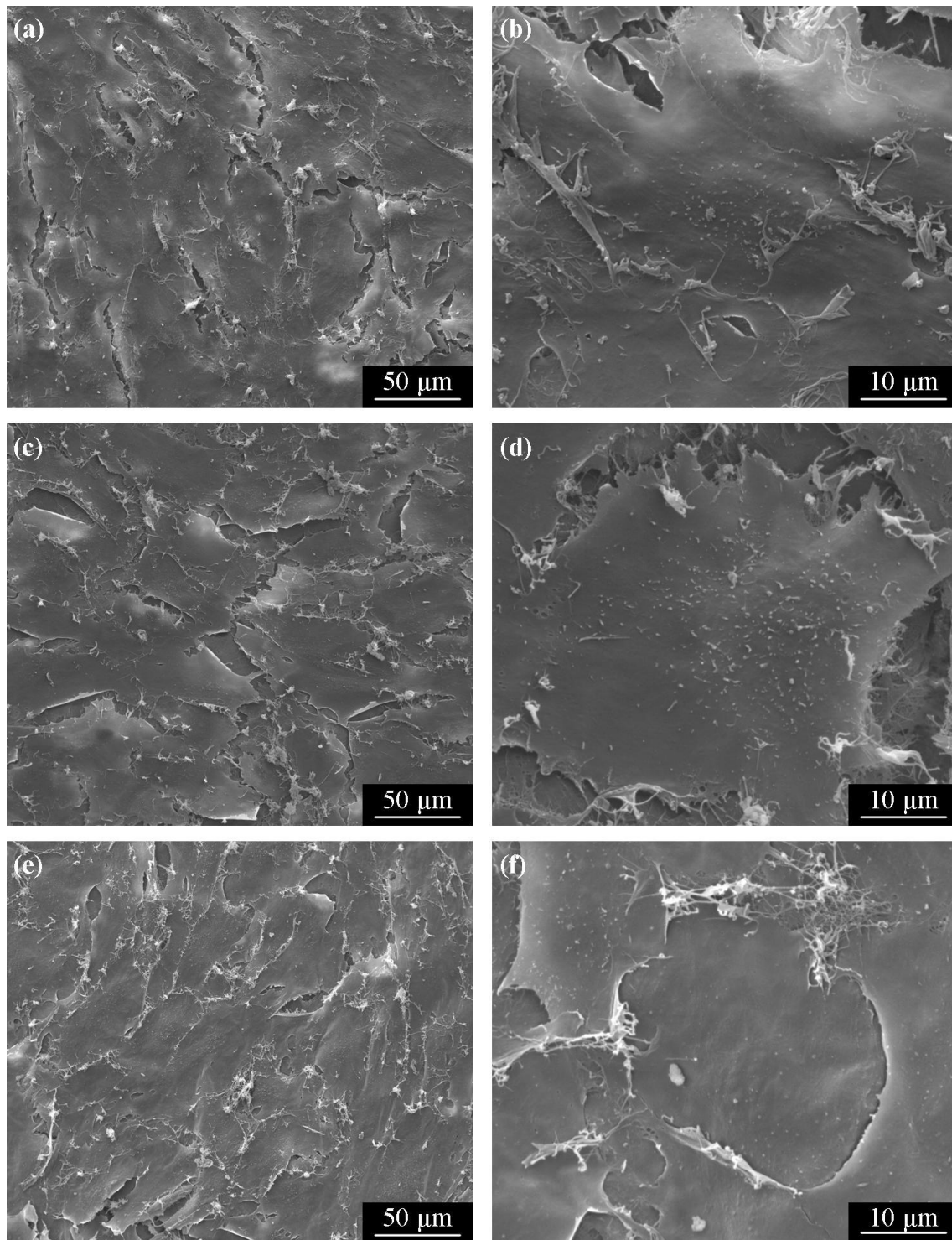


Figure IV-11 : Observations MEB des cellules ST-2 après 14 jours de culture à la surface de :

(a), (b) β -TCP, (c), (d) $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP et (e), (f) $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP

IV.2.2.b. Discussion

A l'issue des 14 jours de culture, l'activité des LDH, l'activité mitochondriale (Figure IV-9a) ainsi que les observations MEB (Figure IV-11) indiquent que les cellules ST-2 sont actives et

ont correctement proliféré à la surface de tous les matériaux. L'addition de silicium ne nuit donc pas à la viabilité des cellules pré-ostéoblastiques.

La différenciation ostéoblastique implique l'expression de protéines spécifiques telles que l'ostéocalcine, le collagène de type I ou encore une forte activité des ALP [ANS00]. La différenciation cellulaire a été étudiée à travers l'activité des ALP et la synthèse de collagène de type I par les cellules ostéoblastiques ST-2. Ces indicateurs importants de la différenciation ostéoblastique ont largement été étudiés pour une première approche de la bioactivité d'implants osseux [KOI05; NIN05]. La présence de silicium dans le β -TCP n'améliore pas de manière significative l'activité des ALP. Bien que la production de collagène par les cellules ST-2 soit élevée sur tous les matériaux, aucune amélioration n'est observée avec l'augmentation de la teneur en silicium. Les résultats observés sont tous similaires à ceux rencontrés pour le β -TCP, ce qui traduit une activité normale des cellules.

C. M. Botelho et coll. ont également montré que la production de collagène de type I par des cellules ostéoblastiques n'était pas significativement améliorée sur des substrats d'HA silicatée comparé à de l'HA pure [BOT06]. Cependant, il a été montré qu'utilisé sous forme soluble, le silicium augmente significativement l'activité des ALP au bout de 36 h de culture tandis qu'il ne modifie pas la production de collagène de type I [REF03]. S. Ni et coll. ont également observé qu'après 7 jours de culture, l'activité des ALP de cellules ostéoblastiques à la surface de substrats de CaSiO_3 est significativement plus élevée qu'à la surface de β -TCP [NI07]. Ayant également étudié la dissolution de ces matériaux dans leur milieu de culture, ils attribueraient cette observation aux plus forts taux de calcium et de silicium libérés par CaSiO_3 . Ces résultats suggèrent que le silicium permet de stimuler la différenciation ostéoblastique dès les premiers jours de contact avec les cellules. Les résultats ici présentés sont obtenus après 14 jours de culture. Pour mieux apprécier l'effet du silicium sur le phénomène de différenciation ostéoblastique, des mesures pour des temps de culture différents auraient été nécessaires.

Les marqueurs de la différenciation ostéogénique apparaissent selon une séquence bien définie dans le temps. A confluence, la prolifération cellulaire diminue et l'expression de certains gènes associés à la production de MEC est activée. Dans un premier temps, les cellules sécrètent une matrice fibrillaire essentiellement constituée de collagène de type I [FRA92]. L'expression des gènes relatifs au collagène de type I traduit ainsi l'activité des ostéoblastes durant les premières étapes de leur différenciation [STR90]. Les protéines telles que l'ostéocalcine ou la sialoprotéine osseuse apparaissent dans un second temps. Elles sont associées à la minéralisation du tissu. La sialoprotéine osseuse est la première détectée dans

les ostéoblastes différenciés, son expression coïncide avec la formation osseuse [GAN99]. L'ostéocalcine, composant majeur des protéines non collagéniques de la MEC, est synthétisée et sécrétée exclusivement par les cellules ostéoblastiques en fin de maturation et apparaît avec la minéralisation [AUB98]. L'expression de ces protéines constitue donc un indicateur de la différenciation ostéoblastique [AUB01; SIL07]. Quel que soit le matériau support, les cellules ST-2 expriment les marqueurs phénotypiques COL I, OC et BSP. En conséquence, la stimulation ostéogénique des cellules stromales ST-2 a été opérationnelle, les cellules sont différenciées en ostéoblastes.

Les protéines RANK-L et OPG sont synthétisées par les ostéoblastes et contribuent, quant à elles, à la régulation du métabolisme osseux en activant ou inhibant la différenciation ostéoclastique [SIM97; KHO01]. L'expression de leurs gènes associés par les cellules cultivées à la surface des céramiques confirme l'aptitude des matériaux à assurer l'ostéogénèse.

L'ensemble de ces résultats indique que les substrats denses de β -TCP et de Si_x - β -TCP supportent la prolifération et la différenciation de cellules ostéoblastiques jusqu'à 14 jours. L'activité des ALP et la production de collagène de type I sont similaires sur tous les matériaux. Associé à l'expression des marqueurs phénotypiques ostéoblastiques, ces résultats prouvent que les cellules pré-ostéoblastiques se sont différenciées en ostéoblastes à la surface de toutes les céramiques. Après 14 jours de culture, le silicium ne semble avoir aucune influence sur le processus de différenciation. Ce phénomène est marqué dans le temps par plusieurs étapes distinctes. Afin de statuer sur l'effet du silicium, une étude à différents temps de culture associé à une étude quantitative des gènes exprimés par RT-PCR permettrait d'estimer si la différenciation ostéoblastique intervient plus tôt en sa présence et donc s'il a un effet sur la différenciation.

Suite à l'étape de différenciation ostéoblastique, les cellules doivent assurer le dépôt de matrice extracellulaire. C'est pourquoi, le paragraphe suivant s'attache à étudier la biominéralisation des ostéoblastes à la surface des céramiques.

IV.2.3. Évaluation de la biominéralisation

A l'issue de la culture pendant 14 jours des cellules SaOs-2, l'aptitude des matériaux à induire la minéralisation a été analysée selon les essais détaillés au paragraphe II.3.6. Les colorations au Rouge de Sirius et au Fast Red Violet ont permis de mettre en évidence, respectivement, le collagène et les phosphatases alcalines (ALP) qui sont associés à la production de matrice

extra cellulaire. A l'aide de la coloration Von Kossa les nouvelles zones calcifiées apparues à la surface des matériaux ont été révélées et quantifiées.

IV.2.3.a. Résultats

La coloration au Fast Red Violet révèle l'activité des phosphatases alcalines (ALP), protéine membranaire, avec une coloration pourpre. Les ALP sont actives à la surface de toutes les céramiques ainsi que sur le Thermanox, matériau de référence (Figure IV-12). Après addition de silicium dans le β -TCP, la densité de marquage d'ALP à la surface des matériaux augmente (Figure IV-12b, d et f). L'introduction de silicium dans les céramiques augmente l'activité des ALP.

Le Rouge de Sirius permet de mettre en évidence les fibres de collagène avec une coloration orange/rouge. La Figure IV-13 présente le résultat des observations après coloration. Ces clichés révèlent la présence de taches rouge à la surface de tous les matériaux traduisant, à priori, la présence de collagène nouvellement synthétisé par les ostéoblastes. Le contraste des images n'étant pas parfait, il est délicat de raisonner de manière quantitative.

Les observations au microscope optique des cellules SaOs-2 après la coloration Von Kossa sont présentées sur la Figure IV-14. Les phosphates de calcium nouvellement formés dans les tissus sont révélés par une couleur noire. Des zones calcifiées sont visibles sur tous les matériaux. Sur $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP des surfaces noires plus larges sont observées en comparaison des autres matériaux. La quantification de cette coloration est présentée à la Figure IV-15. La quantité de phosphate de calcium déposée à la surface de $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP est similaire à celle mesurée à la surface du Thermanox. Cependant, elle est significativement plus importante sur $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP ($p = 0,01$) et $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP ($p \ll 0,001$) que sur β -TCP. L'induction de la minéralisation est donc significativement améliorée en présence de silicium.

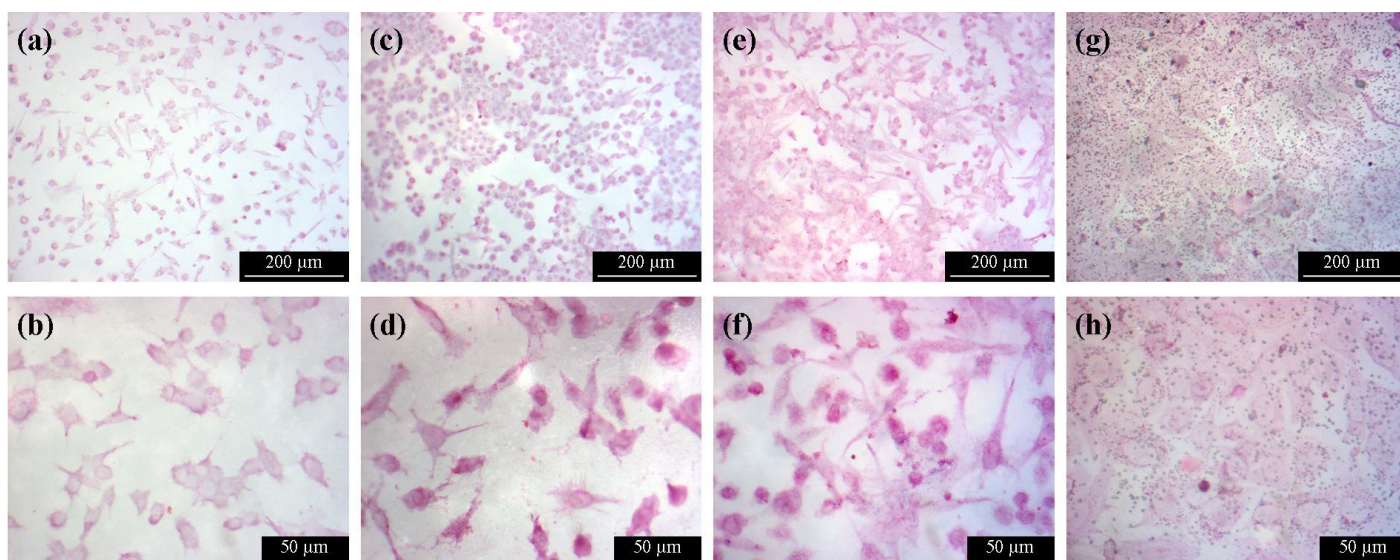


Figure IV-12 : Images de microscopie optique révélant la coloration des phosphatases alcalines à la surface de :

(a), (b) β -TCP ; (c), (d) $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP ; (e), (f) $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP et (g), (h) Thermanox

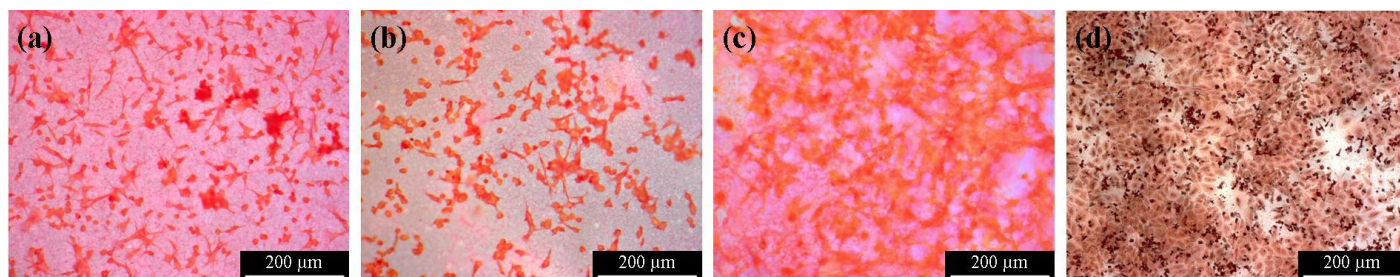


Figure IV-13 : Images de microscopie optique révélant la coloration du collagène à la surface de :

(a) β -TCP ; (b) $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP ; (c) $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP et (d) Thermanox

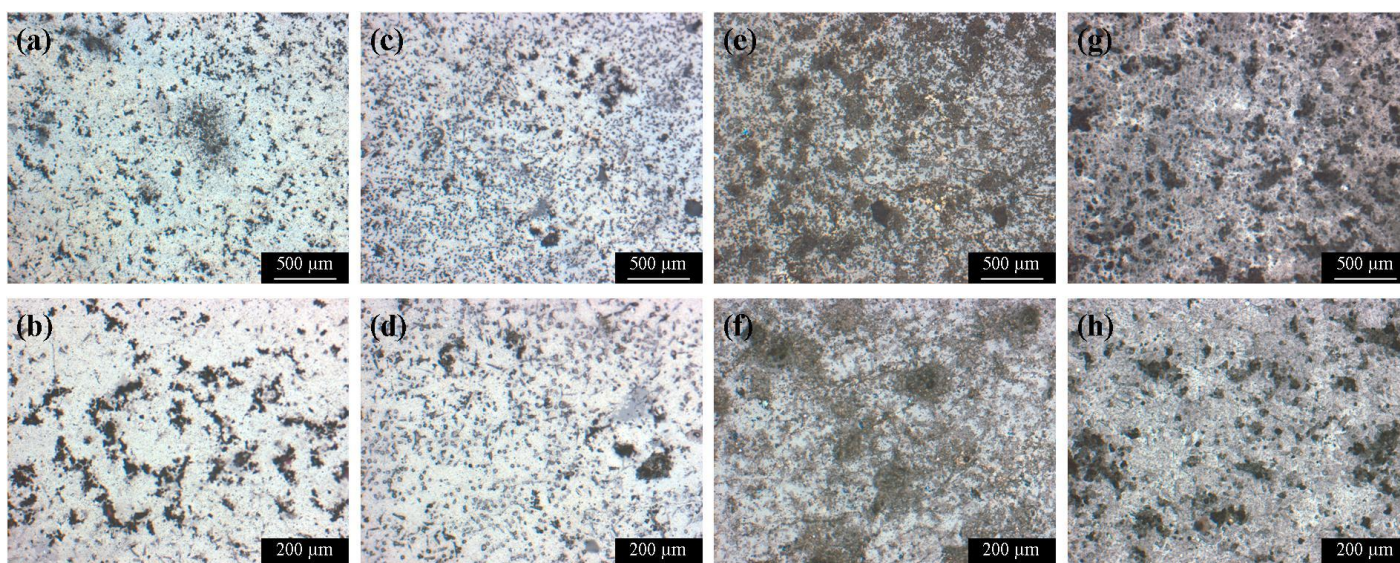


Figure IV-14 : Images de microscopie optique révélant la coloration des nouvelles zones calcifiées à la surface de :

(a), (b) β -TCP ; (c), (d) $\text{Si}_{0,05}$ - β -TCP ; (e), (f) $\text{Si}_{0,10}$ - β -TCP et (g), (h) Thermanox

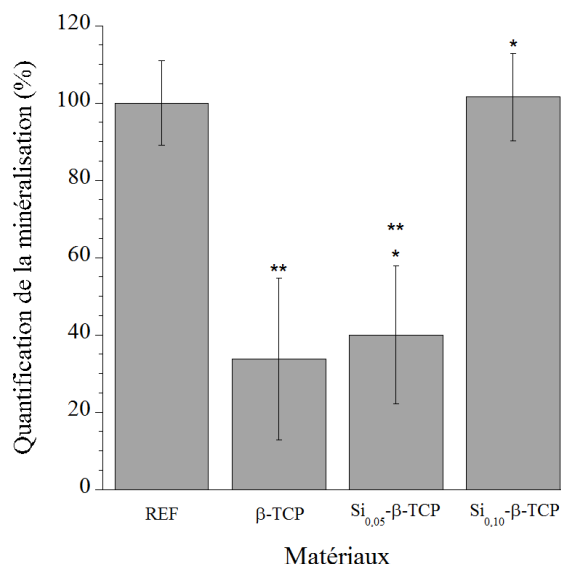


Figure IV-15 : Quantification de la densité de minéralisation à la surface des matériaux, résultats normalisés par rapport au Thermanox (REF = 100 %), *p < 0,05 vs. β-TCP et **p < 0,001 vs. REF, les résultats présentent la moyenne ± l'écart-type de 4 mesures effectuées sur chacune des 4 images de microscopie optique

IV.2.3.b. Discussion

Les ALP sont des enzymes indispensables au processus de minéralisation. Leur synthèse par les cellules ostéoblastiques est plus élevée sur le Si_x-β-TCP que sur le β-TCP pur. Un autre aspect important de la formation osseuse est la synthèse de collagène de type I, qui constitue 90 % de la phase organique de la matrice extracellulaire (MEC) de l'os mature, par les ostéoblastes [BOS99]. Une fois synthétisé, le collagène de type I est sécrété dans une région non minéralisée située entre le corps de la cellule et la matrice minéralisée [KAR04]. A la surface de tous les échantillons, les cellules SaOs-2 ont synthétisé du collagène et en quantité plus importante sur Si_{0,10}-β-TCP que sur les autres matériaux (Figure IV-13). Cependant, les colorations ici mises en œuvre ne permettent pas d'analyses quantitatives de la synthèse de collagène ou d'ALP, ce qui seraient plus pertinent pour conclure sur l'influence du silicium. Néanmoins, une étude récente conduite par D. M. Reffit et coll. a démontré que l'utilisation de silicium sous forme soluble et en concentration physiologique (10 à 20 μM) stimule la synthèse de collagène de type I [REF03]. Dans l'étude de C. M. Botelho et coll. la production de collagène mesurée à la surface d'HA silicatée est plus importante qu'à la surface d'HA pure [BOT06].

Au cours du processus de biominéralisation, les ostéoblastes synthétisent du phosphate de calcium minéralisé en site intra- et extracellulaire [ANN04]. Quelle que soit la composition des échantillons, des zones calcifiées sont présentes à leur surface et en concentration

significativement plus élevée lorsque le matériau contient du silicium. Selon E. M. Carlisle, le silicium est localisé en forte concentration dans les sites osseux en cours de minéralisation [CAR70]. A la surface d'HA silicatée, des zones de minéralisation n'ont été observées par marquage à la tétracycline qu'au bout de 21 jours de culture et aucune différence n'a été notée avec l'augmentation de la teneur en silicium [BOT06]. Cependant, *in vivo* la croissance osseuse à la surface d'HA silicatée est significativement plus grande qu'à la surface d'HA pure [PAT02]. Les résultats obtenus sur le β -TCP contenant du silicium semblent aller dans ce sens, la présence de silicium stimulerait la formation de minéraux calcifiés.

Les cellules ostéoblastiques cultivées sur les échantillons Si_x - β -TCP semblent produire davantage de collagène de type I, d'ALP et de minéraux de phosphates de calcium. L'apport de silicium dans les échantillons permettrait de stimuler la biominéralisation.

IV.3. Conclusion générale sur les essais biologiques

La biocompatibilité du β -TCP n'est plus à démontrer. Bien que le silicium semble être un élément nécessaire à la calcification osseuse [CAR70], il faut s'assurer que son addition dans le β -TCP ne soit pas biologiquement néfaste. L'ensemble de ces essais a donc permis d'évaluer le comportement biologique des matériaux à base de β -TCP et de silicium.

Par immersion dans des solutions de dégradation, la surface des matériaux s'est révélée être partiellement dissoute. Après immersion dans des solutions SBF, une couche d'apatite carbonatée mal cristallisée a été mise en évidence à la surface de l'ensemble des matériaux. Des mécanismes couplés de dissolution préférentielle aux joints de grains des céramiques et de précipitation seraient à l'origine de cette couche néoformée. Sa synthèse pourrait être favorisée par la présence du silicium qui induit une diminution de la taille des grains des matériaux occasionnant une dissolution plus importante des céramiques.

La culture des cellules MC3T3-E1 a démontré que l'addition de silicium ne nuit pas à la biocompatibilité du β -TCP. Les cellules sont viables et prolifèrent à la surface des matériaux. La différenciation ostéoblastique est une étape importante de l'ostéogénèse. Bien qu'aucune différence n'ait été observée suivant la teneur en silicium, la différenciation des cellules pré-ostéoblastiques ST-2 en ostéoblastes a bien lieu au contact de Si_x - β -TCP. Pour garantir l'intégration d'un biomatériau, les cellules osseuses doivent être capables de déposer de la MEC à leur surface. L'étude menée avec les cellules ostéoblastiques SaOs-2 indique que les matériaux n'entravent pas le processus de biominéralisation. Au contraire, la présence de silicium semble stimuler la biominéralisation osseuse.

L'ensemble de ces résultats montre que l'association du β -TCP et du silicium aboutit à un matériau aux propriétés biologiques intéressantes. Il ne nuit pas à la différenciation des cellules ostéoblastiques et stimule la biominéralisation, ce qui *in vivo* favoriserait l'intégration du biomatériau. Cependant, pour statuer sur une stimulation des propriétés biologiques en présence de silicium, il faudrait s'affranchir d'une éventuelle influence de la microstructure des céramiques. Afin de compléter l'étude du comportement biologique du β -TCP contenant du silicium, des cultures de cellules ostéoclastiques permettraient d'apporter des éléments d'information complémentaires. En effet, la régénération osseuse est un mécanisme faisant intervenir des ostéoblastes mais également des ostéoclastes qui sont responsables de la résorption osseuse.

En résumé :

Étude en milieu acellulaire

- Croissance, en fluide biologique simulé, d'une couche d'apatite *via* un mécanisme de dissolution/précipitation de la surface des céramiques

Étude en milieu cellulaire

- Céramiques non toxiques
- Matériaux supports de la différenciation ostéoblastique
- Stimulation du processus de minéralisation osseuse en présence de silicium

Chapitre V

Étude préliminaire du greffage d'organo-alkoxysilane à la surface d'hydroxyapatite silicatée

Chapitre V : Étude préliminaire du greffage d'organo-alkoxysilane à la surface d'hydroxyapatite silicatée

Dans le contexte actuel, les recherches concernant l'amélioration des biomatériaux se sont orientées vers la médecine régénérative des tissus. Il s'agit alors de développer des matériaux ostéoinducteurs. Les phosphates de calcium sont des biocéramiques ostéoconductrices, elles servent de support à la régénération osseuse. Pour apporter à ces matériaux un caractère ostéoinducteur, une des voies actuellement à l'étude consiste à fonctionnaliser leur surface à l'aide de biomolécules. Cette technique nécessite au préalable le greffage d'une molécule intermédiaire. Dans cette optique, ce chapitre propose un protocole de silanisation à l'aide d'organo-alkoxysilanes, molécules couramment employées dans les procédés de fonctionnalisation, à la surface d'hydroxyapatite et d'hydroxyapatite silicatée. Un des objectifs est également d'identifier les facteurs susceptibles d'influencer le procédé de greffage. Après avoir présenté le contexte de l'étude ainsi que le protocole mis en place, le détail de la caractérisation des poudres et des organo-alkoxysilanes étudiés font l'objet, respectivement, des parties deux et trois avant d'aborder l'analyse des poudres après greffage.

V.1. Présentation de l'étude

L'hydroxyapatite est largement utilisée en chirurgie réparatrice en raison de sa biocompatibilité et de son caractère ostéoconducteur. Cependant, ces substituts osseux sont peu efficaces pour la régénération de larges pertes de substance osseuse [JOH96], ils ne sont pas ostéoinducteurs. Dans une telle situation, il serait judicieux d'utiliser un substitut osseux qui stimule la différenciation ostéoblastique de cellules progénitrices assurant ainsi l'ostéogenèse dans l'ensemble du matériau. Pour ce faire, l'association d'un matériau et d'une molécule biologiquement active lors du processus de repousse osseuse (peptide, protéine, facteur de croissance...) est l'une des méthodes actuellement les plus étudiées [MA07; EGU09; VER09]. Pour garantir l'immobilisation covalente de la biomolécule à la surface du matériau, les recherches actuelles se sont orientées vers le greffage d'une molécule intermédiaire de type organo-alkoxysilane *via* un procédé de silanisation [PAR02; DUR04; PAS08; VER09]. Le dopage de l'HA avec du silicium doit, de plus, conduire à la création de groupements Si-OH à la surface des matériaux qui constitueraient des sites d'accueil favorables aux organo-alkoxysilanes.

L'objet de ce chapitre est d'étudier, dans une première approche, la possibilité de greffer de manière covalente un organo-alkoxysilane à la surface de poudres de phosphate de calcium cristallisé.

V.1.1. Présentation des matériaux de l'étude

Pour cette étude, deux substrats ont été étudiés, une HA stœchiométrique et une HA silicatée contenant une teneur en silicium x de 0,50, notée $Si_{0,5}HA$. Le protocole de synthèse de ces poudres est détaillé au paragraphe II.1.1. Afin de travailler avec des composés cristallins et dépourvus de résidus de synthèse, les poudres sont préalablement calcinées à 1000°C pendant 15 h. Les organo-alkoxysilanes étudiés et représentés sur la Figure V-1 sont :

- le 3-aminopropyltriéthoxysilane ou APTES (99 %, Sigma Aldrich),
- le 3-(éthoxydiméthylsilyl)propylamine ou APES (97 %, Sigma Aldrich),
- le N-(6-aminohexyl)-3-aminopropyltriméthoxysilane ou AHAPS (95 %, ABCR).

L'APTES est très couramment employé dans les études de fonctionnalisation de surface par silanisation. Cependant, à cause de ses trois groupements éthoxy (-O-C₂H₅), cette molécule est facilement hydrolysable et donc sensible à l'homocondensation (Figure I-13). C'est pourquoi le choix s'est également orienté vers l'étude de l'AHAPS qui présente une chaîne X

plus longue. L'encombrement moléculaire ainsi généré tendrait à limiter le phénomène de polymérisation ce qui favoriserait le greffage des molécules à la surface du substrat.

La différence entre l'APTES et l'APES réside dans le nombre de branches éthoxy ($-O-C_2H_5$) disponibles sur l'atome de silicium. L'APTES en compte trois alors qu'il n'y en a qu'une dans l'APES, les deux autres groupements étant des fonctions méthyle non hydrolysables.

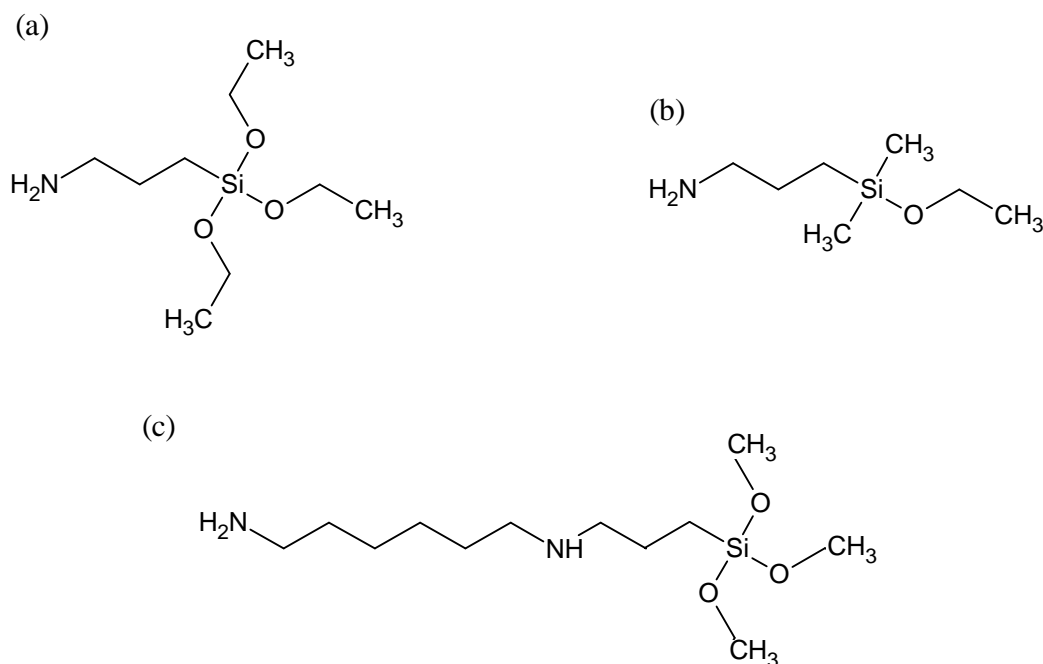


Figure V-1 : Représentation des molécules (a) d'APTES, (b) d'APES et (c) d'AHAPS.

V.1.2. Protocole de greffage

La majorité des réactions de silanisation de surface retrouvées dans la littérature sont effectuées en milieu anhydre à l'aide de solvants organiques tels que le toluène [NAN98; HER04; ZUR05; SCH09], l'hexane [DUR04] ou l'éthanol anhydre [WAN08]. Cependant, la présence d'eau apparaît nécessaire pour former une monocouche d'organo-alkoxysilane [MUT05] (Figure I-16a). Afin d'évaluer la possibilité d'un greffage qui éviterait l'utilisation de solvants organiques toxiques et/ou des conditions de travail drastiques, les essais de silanisation sont ici réalisés dans l'éthanol technique à 96 % contenant 4 % d'eau et sans contrôler l'atmosphère de réaction.

Le protocole expérimental mis en place au laboratoire se découpe en plusieurs étapes qui sont présentées à la Figure V-2. La mise en solution de poudres phosphocalciques entraîne des phénomènes de dissolution à la surface du matériau [MAR05]. De ce fait, préalablement au

greffage, une mise à l'équilibre du système « poudre + solvant » est nécessaire. Ce point fait l'objet d'une étude préalable détaillée à la section V.1.2.a.

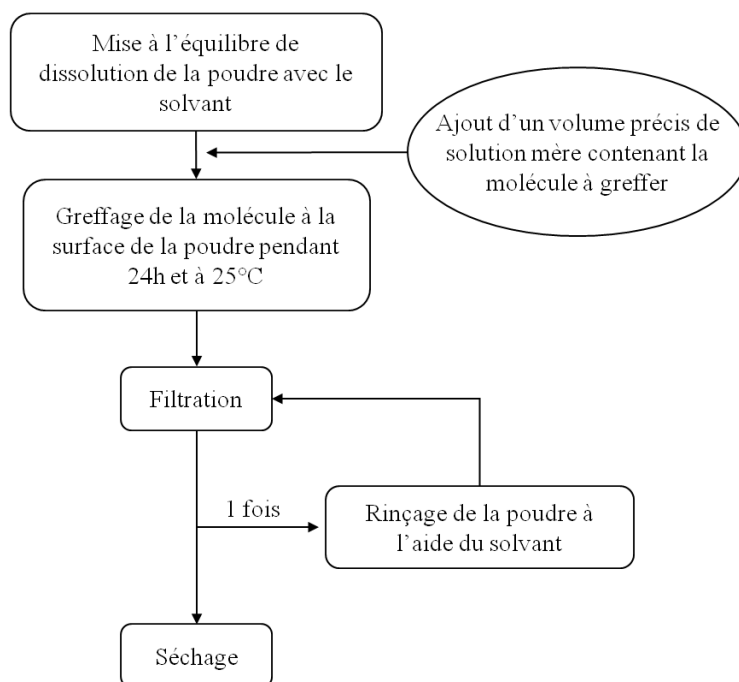


Figure V-2 : Organigramme du protocole de greffage

Après avoir préparé une solution mère de la molécule à greffer, un volume précis de cette solution est ajouté au système « poudre + solvant » à l'équilibre. Le volume de solution mère à ajouter est calculé en fonction du taux de recouvrement hypothétique souhaité de la poudre par la molécule et de sa surface spécifique. La méthode pour sa détermination est précisée dans le paragraphe V.1.2.b. A l'issue de la réaction du système « poudre + solvant + molécule », le mélange est rincé avec de l'éthanol, filtré, puis séché. Ces différentes étapes du protocole de greffage sont détaillées à la section V.1.2.c.

V.1.2.a. Mise à l'équilibre de dissolution

L'équilibre de dissolution des poudres d'HA et d'HA silicatée est étudié dans l'éthanol technique à 96 % (Elvetec). Une suspension de poudre à 2 % massique est préparée dans un erlenmeyer en pyrex de 100 mL. Afin de maintenir une température constante, celui-ci est placé dans un bain thermostaté réglé à 25°C (Polystat, Bioblock Scientific). La mesure du pH et l'agitation débutent au moment où l'éthanol est introduit dans l'erlenmeyer. Le pH est mesuré avec un pH-mètre (Mettler Toledo) préalablement étalonné à l'aide de solutions tampons de pH 7 et 10 (Fisher Scientific).

V.1.2.b. Détermination du volume de solution mère à ajouter

L'étude de greffage a été conduite dans l'hypothèse où tous les sites P-OH présents à la surface de l'HA ou les sites P-OH et Si-OH de l'HA silicatée pourraient fixer l'organo-alkoxysilane. Plusieurs concentrations de molécules organiques ont été testées. Ces concentrations ont été choisies en supposant que chaque site d'accueil pourrait recevoir une molécule d'organo-alkoxysilane. Ainsi, lorsque la quantité de molécules organiques ajoutée est identique au nombre de mole de sites de surface P-OH et Si-OH, le taux de recouvrement hypothétique de la poudre (τ_R) est dit être de 100 %. Lorsqu'il y a deux fois plus de molécules que de sites d'accueil, le taux de recouvrement hypothétique est alors de 200 %.

Afin de respecter un taux de recouvrement donné, il est nécessaire de corréler la quantité de matière en organo-alkoxysilane à la densité théorique de sites P-OH présents à la surface de la maille d'HA. D'après la Figure V-3, une maille élémentaire d'HA contient à sa surface huit sites P-OH susceptibles de recevoir la molécule organique. Dans le cas de l'HA silicatée, de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$, les silicates ajoutés lors de la synthèse venant se substituer aux groupements phosphate, la somme des sites de surface P-OH et Si-OH est donc identique au nombre de sites P-OH de surface du produit non silicaté. Par la suite, cette densité théorique de sites sera donc notée $d_{X\text{-OH}}$ où X représente P dans le cas de l'HA et P + Si dans le cas de l'HA silicatée.

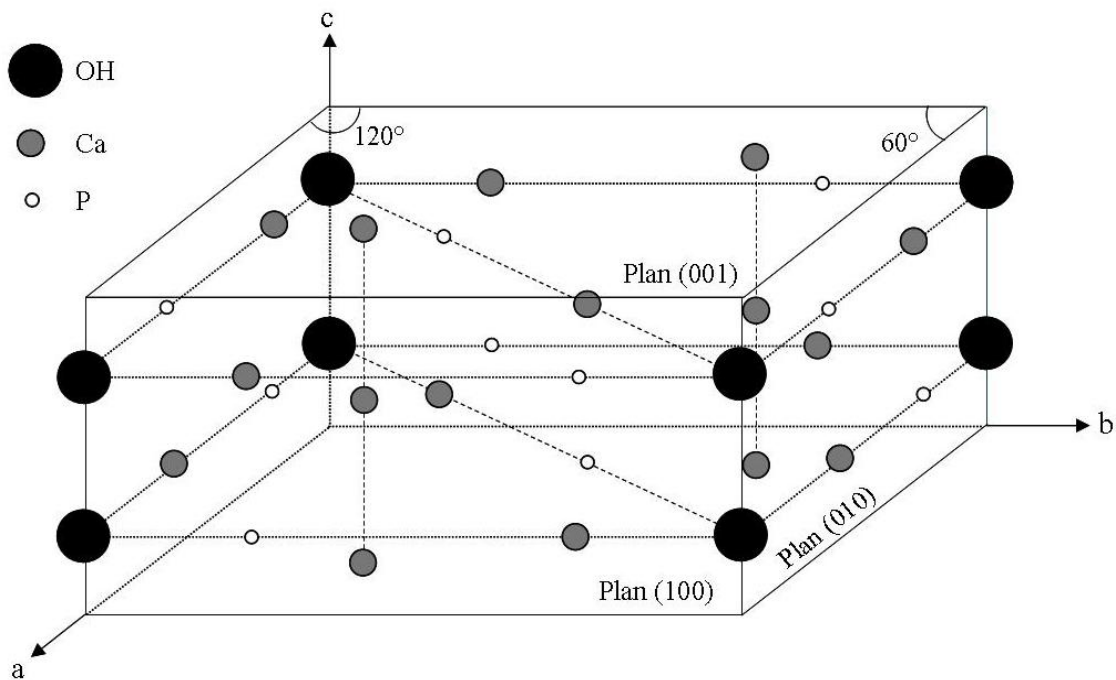


Figure V-3 : Représentation schématique de la maille cristalline de l'hydroxyapatite d'après [KAY64]

Avant de calculer la densité théorique de sites de greffage par unité de surface (d_{X-OH}), le calcul de l'aire de la maille d'HA (A_{maille} en m^2) est nécessaire (Expression V-1). Il fait intervenir les aires de chacun des plans cristallographiques (100), (010) et (001) de la maille de l'HA, notées respectivement $A_{(100)}$, $A_{(010)}$ et $A_{(001)}$, et calculées à partir des paramètres de maille a et c . L'incorporation de silicium dans l'hydroxyapatite induit une variation de ses paramètres de maille [PAL08]. Le calcul de l'aire de la maille de $Si_{0,5}HA$ sera donc ajusté en conséquence, les paramètres de maille des poudres synthétisées étant affinés par la méthode de Le Bail (cf. paragraphe II.2.1.e).

$$A_{(100)} = A_{(010)} = a \cdot c$$

$$A_{(001)} = a^2 \cdot \frac{\sqrt{3}}{2}$$

$$A_{maille} = 2 \cdot A_{(001)} + 4 \cdot A_{(100)}$$

Expression V-1 : Calcul de l'aire de la maille cristalline de l'hydroxyapatite

La densité de sites X-OH correspond au nombre de sites de surface X-OH (soit huit) sur l'aire de la maille de l'HA (A_{maille}). Un tel raisonnement considère tous les sites X-OH présents à la surface de la maille or, statistiquement dans un solide parfait, il n'existe qu'une face sur six du solide qui soit accessible. La densité de sites X-OH « corrigée » (d_{X-OH}), qui s'exprime en $mol \cdot m^{-2}$, aboutit finalement à l'Expression V-2, où N_a représente le nombre d'Avogadro.

$$d_{X-OH} = \frac{8}{6 \cdot A_{maille} \cdot N_a}$$

Expression V-2 : Expression hypothétique de la densité de sites X-OH accessibles à la surface d'un solide d'hydroxyapatite

Connaissant la masse de poudre initiale (m_p en g) introduite dans l'erlenmeyer ainsi que sa surface spécifique (S_{BET} en $m^2 \cdot g^{-1}$) à l'issue de sa mise à l'équilibre de dissolution pendant 16 h, il est possible de déduire la surface développée par cette masse de poudre (S_P en m^2) selon l'Expression V-3a. Le nombre de moles de sites de surface X-OH hypothétiquement accessibles (n_{X-OH} en mol) peut ainsi être calculé selon l'Expression V-3b. La quantité d'organo-alkoxysilane (OAS) à ajouter, notée n_{OAS} et exprimée en mol, dépend alors du taux de recouvrement désiré (τ_R en %) et du nombre de sites de surface X-OH selon l'Expression V-3c. Des solutions mères de concentrations en organo-alkoxysilane connues ($[OAS]_{SM}$ en $mol \cdot L^{-1}$) sont préparées dans un volume de 50 mL d'éthanol. Le volume de solution mère à

ajouter (V_{SM} en L) pour respecter un taux de recouvrement donné est enfin calculé selon l'Expression V-3d.

$$(a) \quad S_P = m_P \cdot S_{BET}$$

$$(b) \quad n_{X-OH} = S_P \cdot d_{X-OH}$$

$$(c) \quad n_{OAS} = \tau_R \cdot n_{X-OH}$$

$$(d) \quad V_{SM} = \frac{n_{OAS}}{[OAS]_{SM}}$$

Expression V-3 : Détails du calcul du volume de solution mère à ajouter

En émettant l'hypothèse qu'à l'issue du greffage toutes les molécules introduites sont greffées à la surface de la poudre, le pourcentage massique hypothétique d'organo-alkoxysilane contenu dans la poudre ($\%_{massique}OAS$) s'exprime alors selon l'Expression V-4 où M_{OAS} représente la masse molaire en $g \cdot mol^{-1}$ de la molécule.

$$\%_{massique}OAS = \frac{M_{OAS} \cdot n_{OAS}}{m_p}$$

Expression V-4 : Calcul du pourcentage massique hypothétique d'organo-alkoxysilane contenu dans les poudres

V.1.2.c. Greffage des molécules

Des solutions mères de concentrations connues en APTES, AHAPS et APES sont préparées. Une masse précise de molécule est pesée dans une fiole jaugée de 50 mL et complétée par de l'éthanol. Avant prélèvement pour le greffage, les solutions mères sont passées 10 mn dans une cuve à ultrasons.

Une fois l'équilibre de dissolution entre une masse m_p de poudre et l'éthanol établi, un volume V_{SM} de solution mère est prélevé à l'aide d'une micropipette (Pipetman Neo P100, Gilson) et ajouté dans le milieu. Le volume de solution mère à ajouter dépend de la surface spécifique de la poudre (S_{BET}) et du taux de recouvrement désiré (τ_R). Trois taux de recouvrement hypothétiques sont étudiés : 100 %, 200 % et 1000 %.

Une fois la molécule ajoutée, l'ensemble est maintenu de manière hermétique, sous agitation magnétique et à 25°C (Polystat, bioblock Scientific) pendant 24 h. Après greffage, la poudre est récupérée à l'aide d'une unité de filtration Millipore et de filtres Magma nylon (0,22 μm). La poudre est ensuite rincée une fois à l'éthanol pour s'assurer de l'élimination des molécules

qui ne se seraient pas greffées. Cette étape de rinçage est très souvent rencontrée dans la littérature [HER04; CHE06].

La suite de ce chapitre est dédiée à la caractérisation des poudres synthétisées par précipitation en voie aqueuse ainsi qu'à l'étude de l'équilibre de dissolution de ces poudres. Les caractéristiques des différentes solutions mères préparées ainsi que les volumes de solutions mères ajoutés pour chaque essai de greffage sont précisés au paragraphe V.3.

V.2. Caractérisation des poudres avant greffage

En accord avec la norme AFNOR ISO 13779-3 [AFN08], la composition des poudres est déterminée après calcination à 1000°C pendant 15 h. Avant le greffage des organo-alkoxysilanes, les poudres calcinées puis mises en solution dans l'éthanol sont analysées. Ainsi, ce paragraphe présente les caractéristiques physiques, chimiques et structurales des deux poudres synthétisées HA et Si_{0,5}HA.

V.2.1. Caractérisation des poudres calcinées

V.2.1.a. Analyse structurale et spectroscopique

Les diffractogrammes des poudres calcinées pendant 15 h à 1000°C sont présentés sur la Figure V-4. Les poudres sont majoritairement constituées d'hydroxyapatite. Des traces d'une phase secondaire, identifiée comme étant du phosphate tricalcique α , sont détectées dans la composition HA, alors que Si_{0,5}HA est monophasée.

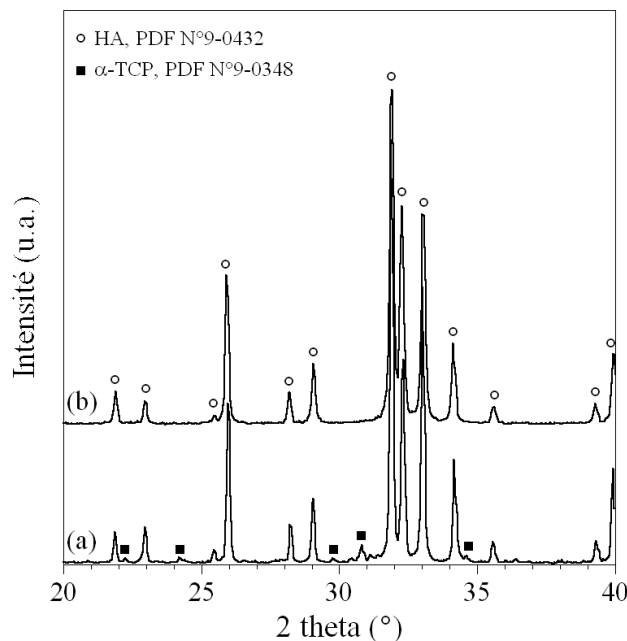


Figure V-4 : Diffractogrammes des poudres calcinées à 1000°C pendant 15 h, (a) HA et (b) Si_{0,5}HA

Les poudres étant susceptibles de contenir de la chaux (*cf.* Figure III-1) sous forme Ca(OH)₂, une analyse qualitative de celle-ci est effectuée. Sa présence est vérifiée, après calcination à 1000°C pendant 15 h, en testant le pH d'une solution aqueuse contenant de la poudre d'apatite par de la phénolphaléine. L'absence de coloration rose en solution de phénolphaléine assure

avec une grande sensibilité l'absence de chaux dans le produit calciné. Ce test est effectué suivant les recommandations de la norme AFNOR ISO 13779-3 [AFN08].

Les résultats des tests de détection de la phase $\text{Ca}(\text{OH})_2$ montrent qu'aucune coloration des solutions aqueuse des poudres d'apatite avec la phénolphtaléine n'est observée, traduisant ainsi l'absence de chaux dans toutes les poudres.

Le Tableau V-1 regroupe les valeurs des paramètres de maille affinés par la méthode de Le Bail de la phase d'hydroxyapatite des poudres calcinées. Dans ce tableau, sont également reportées les valeurs spécifiées dans la fiche PDF 9-432 de l'HA. Les paramètres de maille de l'HA déterminés par affinement sont très proches de ceux de la fiche PDF. Après addition de silicium, ces paramètres augmentent et sont accompagnés d'une augmentation du volume de la maille. De telles évolutions ont déjà été observées et sont caractéristiques de l'incorporation du silicium dans la structure de l'HA [PAL08].

Tableau V-1 : Paramètres de maille a, c et volume de la maille des deux composition

Composition	HA (9-432)	HA	Si _{0,5} HA
a (Å)	9,4180	9,4203(4)	9,4279(2)
c (Å)	6,8840	6,8832(1)	6,8956(9)
Volume de la maille (Å ³)	528,800	528,99(4)	530,80(2)

La Figure V-5 présente les spectres FT-IR des poudres calcinées pendant 15 h à 1000°C. Pour les deux compositions, les bandes d'absorption relatives aux groupements phosphate apparaissent à 1090 et 1040 cm^{-1} (ν_3), à 960 cm^{-1} (ν_1), à 602 et 565 cm^{-1} (ν_4) et à 475 cm^{-1} (ν_2). Les bandes d'absorption présentes à 3570 et 630 cm^{-1} correspondent, respectivement, aux déformations ν_s et ν_l des groupements OH. L'intensité de la bande d'absorption OH diminue fortement de HA à Si_{0,5}HA. Cette évolution confirme l'incorporation du silicium dans la structure. En effet, selon la formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$, la substitution du silicium sous la forme de tétraèdre dans l'HA s'accompagne de la création de lacunes de groupements hydroxyde [PAL08].

La Figure V-5-(II) met en évidence le domaine allant de 1000 à 400 cm^{-1} des spectres FT-IR des poudres calcinées. Dans ce domaine, de nouvelles bandes d'absorption apparaissent pour la composition Si_{0,5}HA. Celles situées à 890, 840, 750 et 500 cm^{-1} sont attribuées à la liaison Si-O des tétraèdres SiO_4^{4-} et celle positionnée à 945 cm^{-1} caractérise les liaisons Si-OH. L'apparition de ces nouvelles bandes d'absorption pour la composition Si_{0,5}HA traduit la présence du silicium, sous forme de tétraèdres de silicate, dans la structure de l'HA.

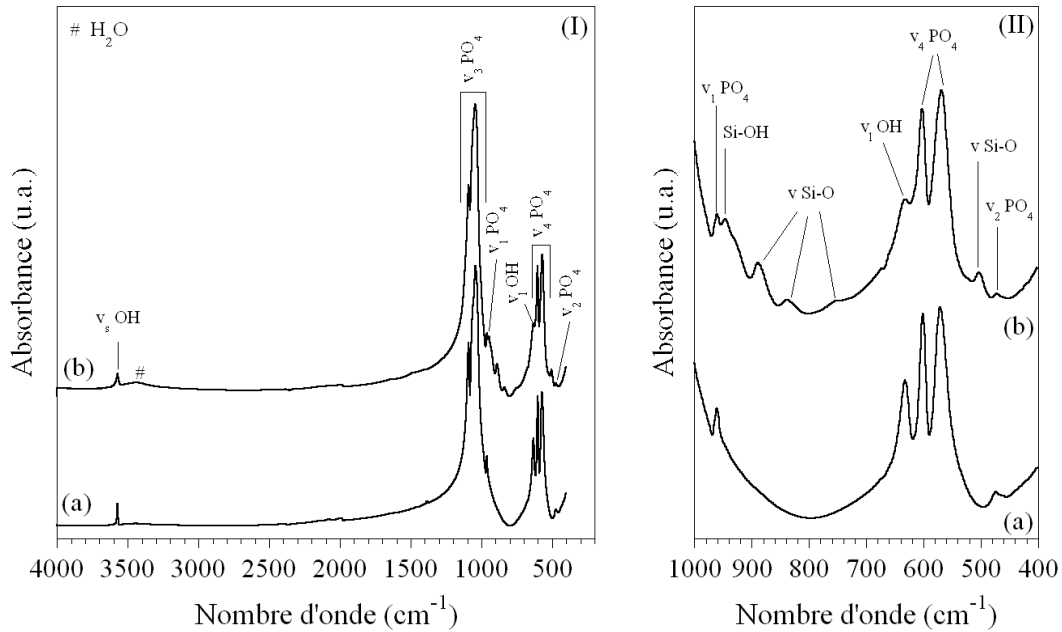


Figure V-5 : Spectres FT-IR des poudres calcinées à 1000°C pendant 15 h, (a) HA et (b) Si_{0,5}HA

V.2.1.b. Morphologie et caractéristiques physiques

A l'issue de la calcination à 1000°C pendant 15 h, la surface spécifique des poudres atteint des valeurs comprises entre 2,5 et 8,5 m²·g⁻¹, la composition Si_{0,5}HA présentant la surface spécifique la plus élevée (Tableau V-2). L'examen des clichés MEB indique que la poudre semble agglomérée (Figure V-6a et c). En accord avec les mesures de surfaces spécifiques, les grains sont de taille plus élevée pour la composition HA, autour de 1 µm, que pour Si_{0,5}HA, autour de 0,5 µm.

Tableau V-2 : Surface spécifique des poudres calcinées à 1000°C pendant 15h et après leur mise à l'équilibre de dissolution pendant 16 h

Traitement	HA	Si _{0,5} HA
1000°C - 15h	2,7 ± 0,1	8,5 ± 0,1
EtOH - 16h	3,0 ± 0,1	8,8 ± 0,1

V.2.2. Étude de l'équilibre de dissolution des poudres

L'évolution du pH des suspensions d'HA et de Si_{0,5}HA dans l'éthanol en fonction du temps est présentée sur la Figure V-7. Dès la mise en solution des poudres, l'hydroxyapatite se dissout et la valeur du pH augmente. Partant d'un pH compris entre 5,0 et 5,5, les poudres atteignent un équilibre à un pH de 6,7 et 8,0 pour, respectivement, la poudre de HA et de

$\text{Si}_{0,5}\text{HA}$. L'équilibre de dissolution des deux poudres est atteint au bout de 16 h. Les poudres issues de cette étape de mise à l'équilibre de dissolution, c'est-à-dire les poudres ayant séjourné 16 h dans l'éthanol à 25°C, seront nommées par la suite HA_{EtOH} et $\text{Si}_{0,5}\text{HA}_{\text{EtOH}}$.

Quelle que soit la composition, la surface spécifique des poudres augmente légèrement après leur mise à l'équilibre dans l'éthanol pendant 16 h (Tableau V-2). La poudre d'HA, après sa mise en solution dans l'éthanol, est constituée de grains aux bords plus saillants (Figure V-6b) qu'avant sa mise à l'équilibre (Figure V-6a). Le phénomène est moins prononcé dans le cas de $\text{Si}_{0,5}\text{HA}_{\text{EtOH}}$ (Figure V-6c et d).

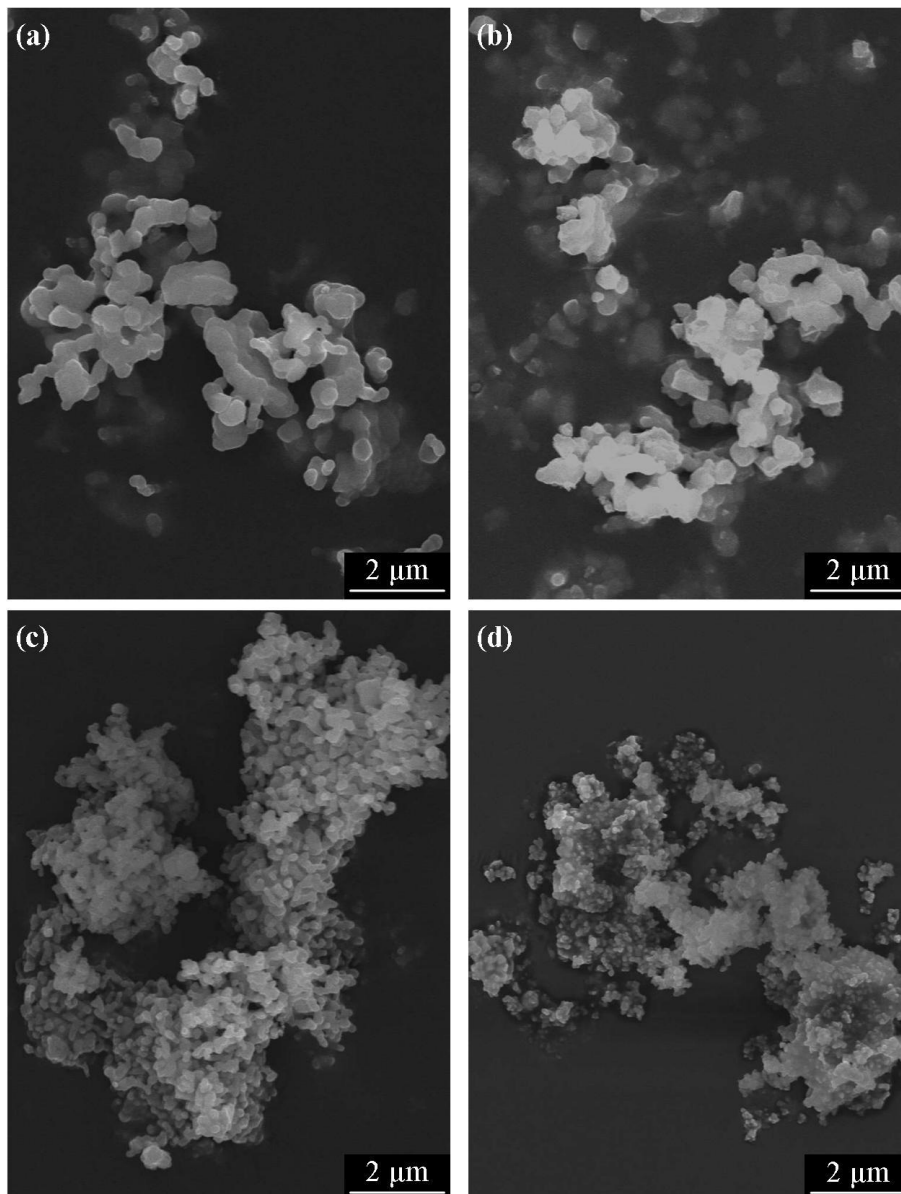


Figure V-6 : Observations MEB des poudres de HA (en haut) et de $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$ (en bas) calcinées à 1000°C pendant 15 h ((a) et (c)) et après mise à l'équilibre de dissolution dans l'éthanol pendant 16 h ((b) et (d))

L'analyse par DRX des poudres après leur mise en solution dans l'éthanol pendant 16 h (Figure V-8) ne met en évidence aucune phase secondaire autre que celle précédemment observée (Figure V-4). La poudre d' HA_{EtOH} présente toujours en faible quantité du TCP α alors que $\text{Si}_{0,5}\text{HA}_{\text{EtOH}}$ reste monophasée.

Les spectres FT-IR des poudres ne révèlent également aucune modification après leur mise à l'équilibre pendant 16 h dans l'éthanol (Figure V-9). Les deux poudres présentent les bandes d'absorption caractéristiques des groupements phosphate et hydroxyde tandis que $\text{Si}_{0,5}\text{HA}_{\text{EtOH}}$ contient des bandes attribuées aux liaisons Si-O et Si-OH.

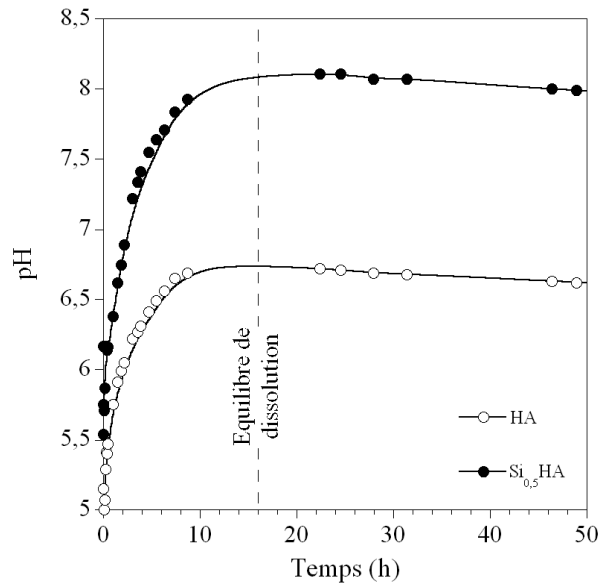


Figure V-7 : Évolution du pH en fonction du temps de suspension de HA et $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$ dans l'éthanol

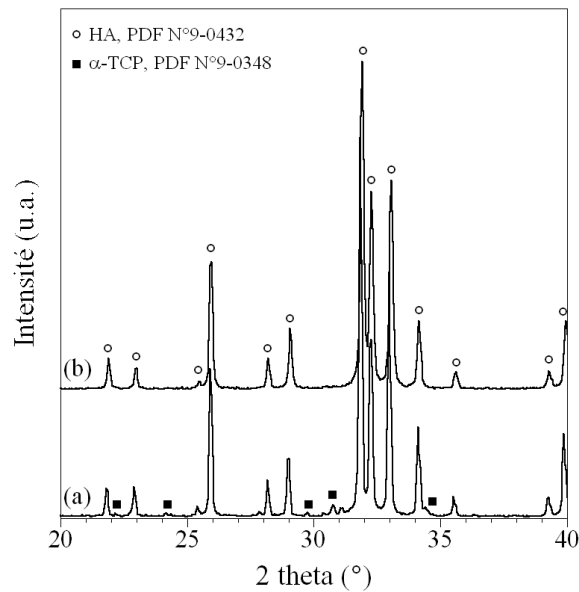


Figure V-8 : Diffractogrammes des poudres de (a) HA_{EtOH} et (b) $\text{Si}_{0,5}\text{HA}_{\text{EtOH}}$

Les spectres de diffusion Raman des poudres après leur mise en solution dans l'éthanol pendant 16 h sont représentés à la Figure V-10. Quelle que soit la poudre analysée, les bandes de vibration caractéristiques des groupements phosphate et hydroxyde sont présentes à 410-470 (ν_2 PO₄), 565-600 (ν_4 PO₄), 610 (ν_1 OH), 960 (ν_1 PO₄), 1015-1100 (ν_3 PO₄) et à 3570 cm⁻¹ (ν_s OH). Pour la composition Si_{0,5}HA, la présence de silicium est mise en évidence par une bande de vibration supplémentaire à 890 cm⁻¹.

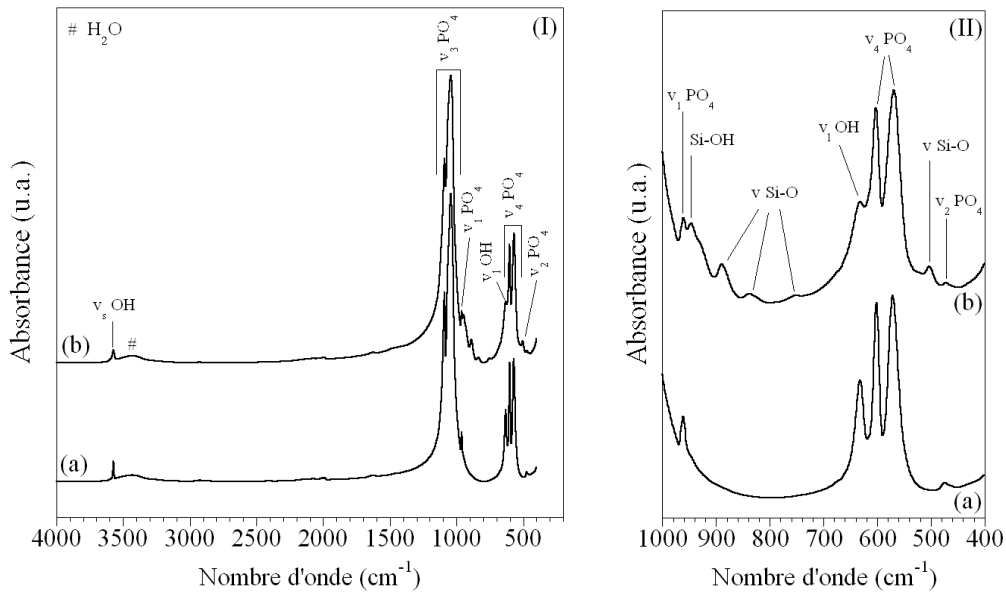


Figure V-9 : Spectres FT-IR des poudres de (a) HA_{EtOH} et (b) Si_{0,5}HA_{EtOH}

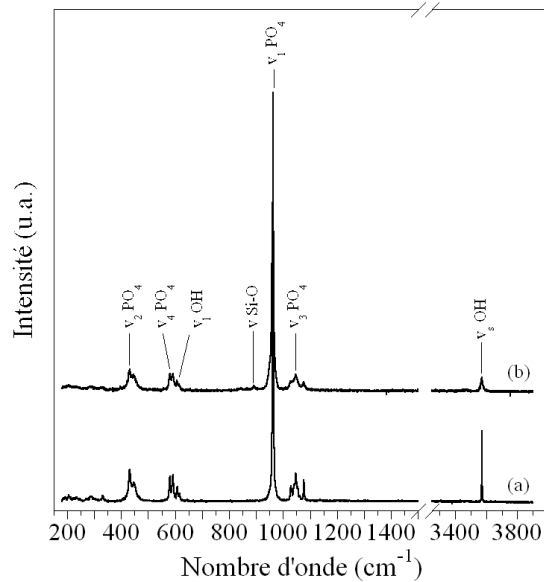


Figure V-10 : Spectre de diffusion Raman des poudres (a) HA_{EtOH} et (b) Si_{0,5}HA_{EtOH}

V.2.3. Conclusion

Les poudres synthétisées par précipitation en voie aqueuse et calcinées à 1000°C pendant 15 h sont majoritairement composées d'hydroxyapatite, des traces de phosphate tricalcique α étant observées pour la composition HA. Concernant la poudre synthétisée en présence de silicium, l'augmentation du volume de la maille de l'hydroxyapatite après affinement des paramètres de maille par la méthode de Le Bail, ainsi que la diminution de l'intensité de la bande d'absorption du groupement OH par FT-IR traduit son incorporation dans la structure de l'HA selon la formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$.

L'équilibre de dissolution de ces poudres dans l'éthanol, à 25°C et sous agitation, est atteint au bout de 16 h. Le pH enregistré à l'équilibre de dissolution est de 6,7 pour la poudre d'HA et 8,0 pour $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$.

Les poudres issues de l'étape de mise à l'équilibre de dissolution (HA_{EtOH} et $\text{Si}_{0,5}\text{HA}_{\text{EtOH}}$) sont, d'un point de vue structural, semblables aux poudres originelles (HA et $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$ calcinées à 1000°C pendant 15 h). Une très légère augmentation de leur surface spécifique ainsi qu'une modification de leur morphologie sont observées. Ces évolutions des caractéristiques physiques des poudres seraient liées aux phénomènes de dissolution ayant lieu à la surface des grains de poudre ainsi qu'à l'action abrasive de l'agitation magnétique.

L'étape de greffage des organo-alkoxysilanes est réalisée sur les poudres HA_{EtOH} et $\text{Si}_{0,5}\text{HA}_{\text{EtOH}}$, soit après les 16 h en suspension dans l'éthanol à 25°C requises afin d'atteindre leur équilibre de dissolution. Trois molécules différentes, présentées au paragraphe V.1.1, sont étudiées. Leur caractérisation ainsi que la préparation des solutions mères avant de réaliser le greffage sont détaillées au paragraphe suivant.

V.3. Caractérisation des organo-alkoxysilanes

V.3.1. Préparation des molécules pour l'étape de greffage

Avant d'introduire la molécule au contact de la poudre, l'organo-alkoxysilane est dilué dans de l'éthanol. Les caractéristiques des solutions mères sont répertoriées dans le Tableau V-3.

Tableau V-3 : Caractéristiques des solutions mères d'organo-alkoxysilanes

Molécule	APTES	APES	AHAPS
Masse molaire M_{OAS} (g·mol ⁻¹)	221,37	161,39	278,47
Pureté	99 %	97 %	95 %
Masse de molécules (g)	1,192	0,633	0,9526
Volume d'éthanol (L)	0,05	0,05	0,05
Concentration $[OAS]_{SM}$ (mol·L ⁻¹)	$1,07 \cdot 10^{-1}$	$7,61 \cdot 10^{-2}$	$6,84 \cdot 10^{-2}$
pH	10,98	10,56	11,27

Les résultats de l'affinement des paramètres de maille d'HA et de Si_{0,5}HA (Tableau V-1) permettent de calculer l'aire de la maille (A_{maille}) selon l'Expression V-1 dans chacune de ces compositions. La densité hypothétique de sites potentiels de greffage présents à la surface des poudres, notée d_{X-OH} , est alors déduite selon l'Expression V-2. Ces résultats, répertoriés dans le Tableau V-4, sont semblables quelle que soit la composition

A partir de la masse de poudre introduite dans l'erlenmeyer (m_P) et de sa surface spécifique (S_{BET}), la surface développée par la poudre (S_P) est déduite de l'Expression V-3a. La densité de sites de greffage permet de calculer le nombre de mole de molécules d'organo-alkoxysilane (n_{OAS}) à ajouter afin de respecter un taux de recouvrement (τ_R) donné selon l'Expression V-3c. Ainsi, à partir des données du Tableau V-3, le volume de solution mère à introduire (V_{SM}) est déduit de l'Expression V-3d. Enfin, le pourcentage massique hypothétique de molécule présente au sein des poudres à l'issue du greffage ($\%_{massiqueOAS}$) peut être calculé selon l'Expression V-4. L'ensemble de ces données est consigné dans le Tableau V-5.

Tableau V-4 : Aire de la maille et densité théorique de sites X-OH présents à la surface des poudres

Composition	HA ₁	Si _{0,5} HA
A_{maille} (m ²)	$413,1 \cdot 10^{-20}$	$413,6 \cdot 10^{-20}$
d_{X-OH} (mol·m ⁻²)	$5,36 \cdot 10^{-7}$	$5,36 \cdot 10^{-7}$

Tableau V-5 : Récapitulatif des caractéristiques des solutions de greffage

Molécule	APTES			APES			AHAPS		
	100 %	200 %	1000 %	100 %	200 %	1000 %	100 %	200 %	1000 %
Hydroxyapatite (HA)									
Surface spécifique S_{BET} (m ² ·g ⁻¹)	3,0			3,0			3,0		
Masse de poudre m_P (g)	2,004	2,007	2,015	2,023	2,028	2,025	2,015	2,003	2,005
Surface développée S_P (m ²)	6,012	6,028	6,045	6,069	6,084	6,075	6,045	6,009	6,015
Nombre de mol d'OAS à ajouter n_{OAS} (mol)	$3,22 \cdot 10^{-6}$	$6,46 \cdot 10^{-6}$	$32,41 \cdot 10^{-6}$	$3,25 \cdot 10^{-6}$	$6,53 \cdot 10^{-6}$	$32,57 \cdot 10^{-6}$	$3,24 \cdot 10^{-6}$	$6,44 \cdot 10^{-6}$	$32,25 \cdot 10^{-6}$
Volume de solution mère à ajouter V_{SM} (μL)	30,1	60,5	302,9	42,7	85,5	428,0	47,37	94,15	471,49
Pourcentage massique hypothétique d'OAS dans la poudre ($\%_{massique} OAS$)	0,036 %	0,075 %	0,354 %	0,026 %	0,053 %	0,258 %	0,045 %	0,089 %	0,446 %
Hydroxyapatite silicatée (Si_{0,5}HA)									
Surface spécifique S_{BET} (m ² ·g ⁻¹)	8,8			8,8			8,8		
Masse de poudre m_P (g)	2,029	2,003	2,012	2,009	2,021	2,027	2,003	2,008	2,012
Surface développée S_P (m ²)	17,855	17,626	17,706	17,679	17,785	17,838	17,626	17,670	17,706
Nombre de mol d'OAS à ajouter n_{OAS} (mol)	$9,57 \cdot 10^{-6}$	$19,15 \cdot 10^{-6}$	$94,82 \cdot 10^{-6}$	$9,48 \cdot 10^{-6}$	$19,00 \cdot 10^{-6}$	$95,52 \cdot 10^{-6}$	$9,44 \cdot 10^{-6}$	$18,93 \cdot 10^{-6}$	$94,82 \cdot 10^{-6}$
Volume de solution mère à ajouter V_{SM} (μL)	89,5	179,0	886,2	124,53	249,10	1255,2	138,01	276,75	1386,26
Pourcentage massique hypothétique d'OAS dans la poudre ($\%_{massique} OAS$)	0,106 %	0,211 %	1,033 %	0,076 %	0,155 %	0,755 %	0,131 %	0,262 %	1,295 %

V.3.2. Caractérisation spectroscopique des molécules

Les spectres FT-IR des molécules et de leurs solutions mères sont représentés à la Figure V-11a pour l'APTES et à la Figure V-12a pour l'APES. Pour plus de lisibilité, les graphiques sont découpés en deux domaines allant de 4000 à 2500 cm^{-1} et de 1700 à 700 cm^{-1} . Les travaux de nombreux auteurs ont permis d'identifier les différentes bandes d'absorption relevées sur les spectres FT-IR [CHI80; YUA97; HOO01; EK03; FUR04; DAS06; MAT07; KIM09].

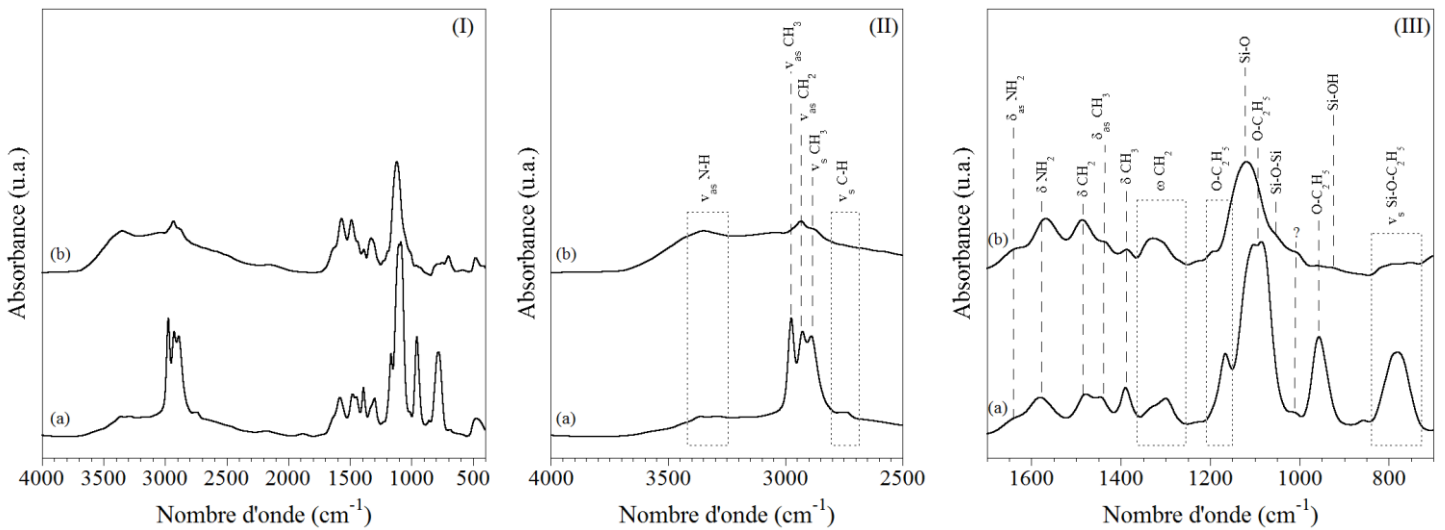


Figure V-11 : Spectres FT-IR de (a) l'APTES et (b) de la solution mère d'APTES

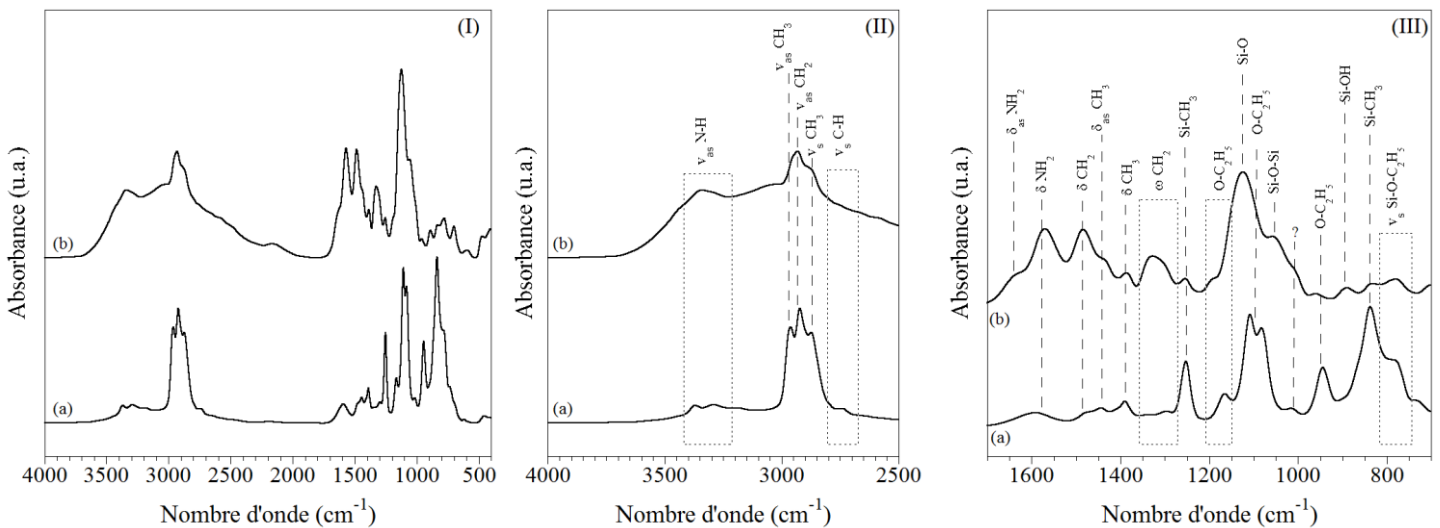


Figure V-12 : Spectres FT-IR de (a) l'APES et (b) de la solution mère d'APES

Les deux molécules présentent les bandes d'absorption caractéristiques des groupements C-H dans la gamme de nombre d'onde allant de 3100 à 2700 cm^{-1} et de 1500 à 1250 cm^{-1} . Les groupements amine sont mis en évidence autour de 3400 cm^{-1} , ainsi qu'à 1625 et 1575 cm^{-1} .

Les bandes d'absorption situées autour de 1200 cm^{-1} , à 1090 , 950 , et autour de 800 cm^{-1} témoignent de la présence des groupements éthoxy ($\text{O-C}_2\text{H}_5$) des molécules.

A la différence avec l'APTES, la molécule d'APES présente de plus des bandes d'absorption relatives aux groupements Si-CH_3 à 1250 et à 840 cm^{-1} .

Les solutions mères d'organo-alkoxysilanes étant faiblement concentrées (Tableau V-3), leurs analyses spectroscopiques ne révèlent que le signal de l'éthanol. Afin de détecter les bandes d'absorption caractéristiques de la molécule organique, il est nécessaire, au préalable, de placer à l'étuve pendant une dizaine de minutes la pastille de KBr sur laquelle plusieurs gouttes de la solution mère ont été déposées. A l'issue de ce traitement, les spectres (Figure V-11b et Figure V-12b) révèlent une forte diminution de l'intensité des bandes d'absorption relatives aux groupements $\text{O-C}_2\text{H}_5$ par rapport aux molécules non diluées (Figure V-11a et Figure V-12a). Ce résultat traduit une hydrolyse partielle des molécules. De plus, de nouveaux pics de fortes intensités apparaissent à 1125 et 1050 cm^{-1} . Ils correspondent, respectivement, aux groupements Si-O et Si-O-Si et témoignent d'un phénomène d'homocondensation de la molécule (Figure I-13). La bande d'absorption de faible intensité présente à 925 cm^{-1} , caractéristique des groupements Si-OH , traduit néanmoins la présence de groupements hydrolysés non condensés. Les molécules ne sont donc pas complètement polymérisées de telle sorte à former un réseau à trois dimensions (Figure I-14). Il est à noter que le passage des échantillons à l'étuve avant leur analyse pourrait favoriser la polymérisation des molécules.

Le spectre FT-IR de l'AHAPS a été très difficile à obtenir, il est présenté sur la Figure V-13. Le spectre de sa solution mère a quant à lui été impossible à réaliser. Malgré le passage à l'étuve, l'allure du spectre obtenu correspond à celui de l'éthanol. Quoi qu'il en soit, les bandes d'absorption révélées traduisent la présence des liaisons C-H , N-H et $\text{O-C}_2\text{H}_5$ toutes présentes dans la molécule.

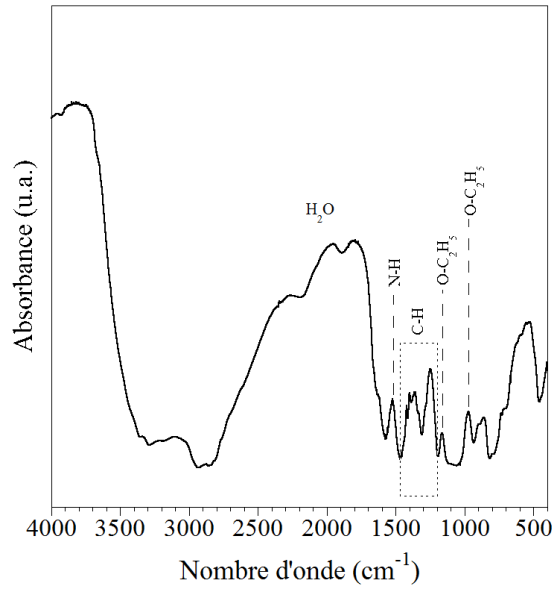


Figure V-13 : Spectres FT-IR de l'AHAPS

Les spectres de diffusion Raman des molécules sont présentés sur la Figure V-14. Seuls ceux de l'APTES et de l'APES ont été réalisés. L'analyse de l'AHAPS est irréalisable en spectroscopie Raman, la molécule étant colorée elle induit un phénomène de fluorescence. Les bandes caractéristiques des molécules précédemment décrites sont retrouvées sur les spectres de diffusion Raman. Ainsi, les bandes de vibration des liaisons C-H, N-H et O-C₂H₅ sont présentes. Concernant l'APES, les groupements Si-CH₃ sont également visibles.

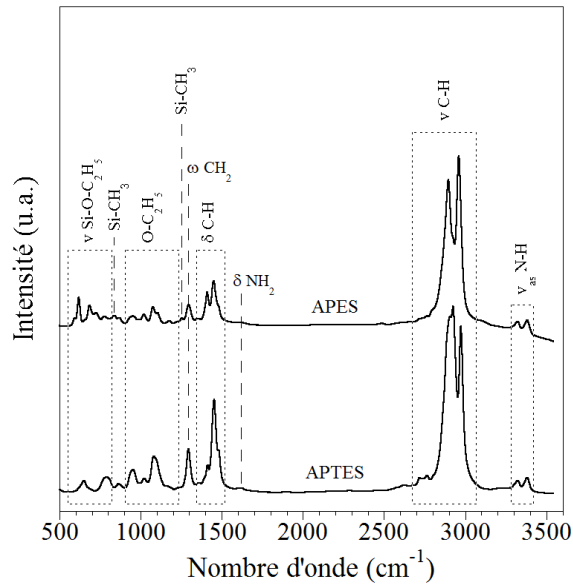


Figure V-14 : Spectres de diffusion Raman de l'APTES et de l'APES

V.4. Caractérisation du greffage

V.4.1. Morphologie des poudres après greffage

La morphologie des poudres après greffage d'APTES et d'APES pour un taux de recouvrement hypothétique de 200 % a été observée au MEB (Figure V-15). Par rapport aux poudres avant greffage, aucune différence significative n'est à noter (Figure V-6c et d). La poudre forme toujours des agglomérats dont la taille se situe autour du micromètre.

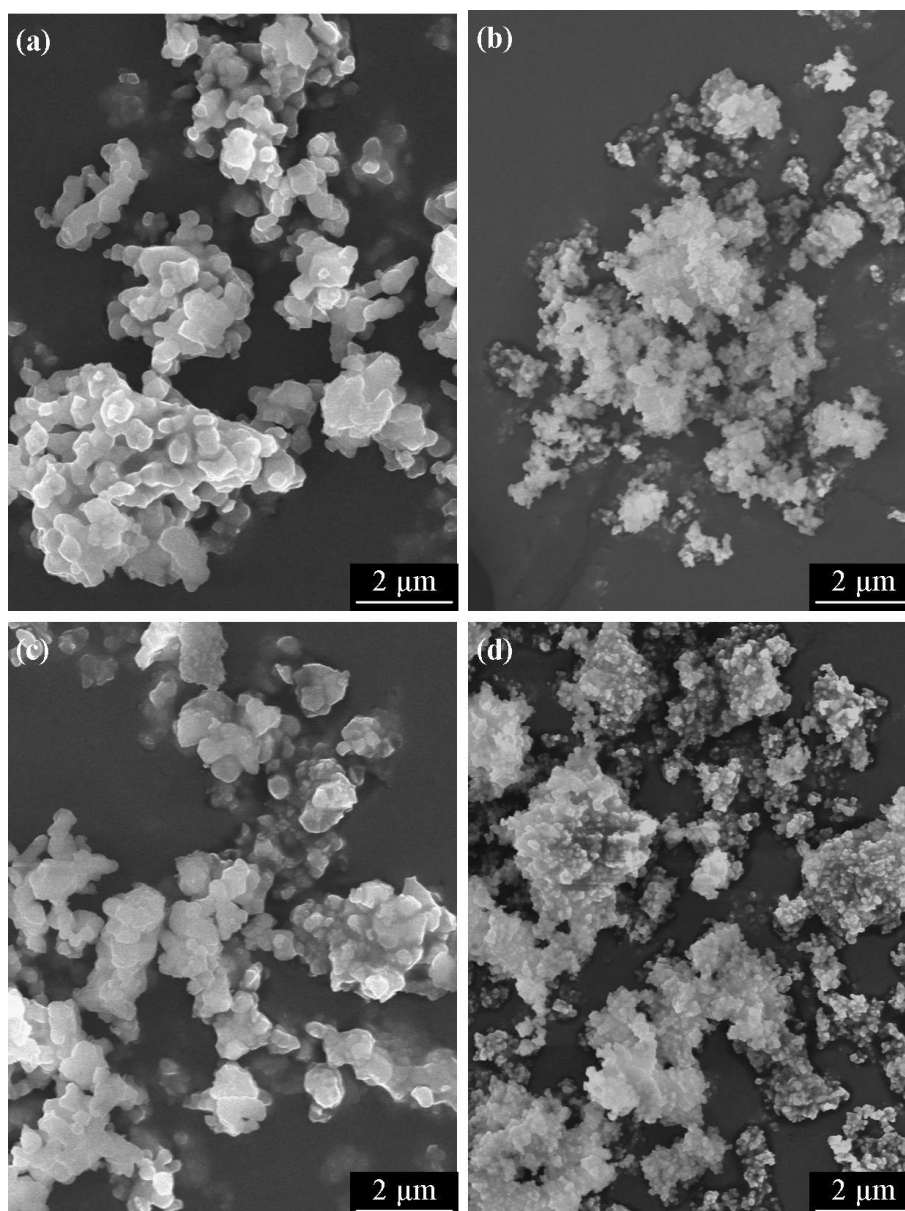


Figure V-15 : Observations MEB des poudres de HA (à gauche) et de $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$ (à droite) après greffage d'APTES à 200 % ((a) et (b)) et après greffage d'APES à 200 % ((c) et (d))

V.4.2. Analyse thermogravimétrique

Les analyses thermogravimétriques (TG) couplées à la spectrométrie d'émission de masse des poudres avant et après greffage sont présentées dans la suite de ce paragraphe. La première partie concerne les résultats obtenus pour l'hydroxyapatite (HA) et la seconde partie pour l'hydroxyapatite silicatée ($\text{Si}_{0,5}\text{HA}$).

V.4.2.a. Cas de l'hydroxyapatite

Les analyses thermogravimétriques (TG) obtenues sur l'HA suite au greffage d'APTÉS, d'APES et d'AHAPS sont représentées respectivement à la Figure V-16a, b, et c, pour les trois taux de recouvrement étudiés (100 %, 200 % et 1000 %). Pour la molécule AHAPS, seules les poudres préparées pour les taux de recouvrement 200 % et 1000 % ont été analysées par thermogravimétrie.

Concernant l'HA avant greffage (HA_{EtOH}), une perte de masse continue est enregistrée. Pour les poudres ayant subies un greffage, un décrochement est observé entre 450 et 600°C. Ce décrochement est d'amplitude plus ou moins grande suivant la molécule traitée et le taux de recouvrement utilisé.

Les courbes dérivées des analyses thermogravimétriques (Figure V-16d, e et f) sont constituées d'une succession de pics pouvant être associés à des départs gazeux. Ces derniers sont mis en évidence par spectrométrie d'émission de masse. La Figure V-17 illustre l'évolution des quantités d'espèces répondant à différentes masses au cours du traitement thermique de HA_{EtOH} . Pour les poudres d'HA après réaction avec l'APTÉS, l'APES et l'AHAPS et pour un taux de recouvrement de 1000 %, ces évolutions sont présentées sur la Figure V-18. L'ensemble de ces courbes met en évidence différents domaines de température, notés I, II, III et IV, caractérisés par des cinétiques de perte de masse et des émissions de masses distinctes. Les pertes de masses associées à ces domaines sont répertoriées dans le Tableau V-6. Dans ce tableau sont également reportés les pourcentages massiques hypothétiques d'organo-alkoxysilane contenu dans les poudres ($\%_{\text{massique OAS}}$).

Dans le domaine noté I, qui s'étend de 30 à 300°C, les pertes de masse varient de 0,100 à 0,450 % (Tableau V-6). Hormis pour l'HA après réaction avec l'APTÉS à 200 %, quels que soient les paramètres d'étude, les résultats sont semblables à celui mesuré pour la poudre de référence (HA_{EtOH}). Que ce soit pour la poudre de référence HA_{EtOH} (Figure V-17) ou les poudres après greffage (Figure V-18), ces pertes de masse sont principalement accompagnées de l'émission des masses 17, 18 et 28. Elles correspondent vraisemblablement à l'humidité et

à des résidus carbonés présents au sein des poudres. L'eau adsorbée à la surface des grains de poudre contribue, pour l'essentiel, à cette première perte de masse.

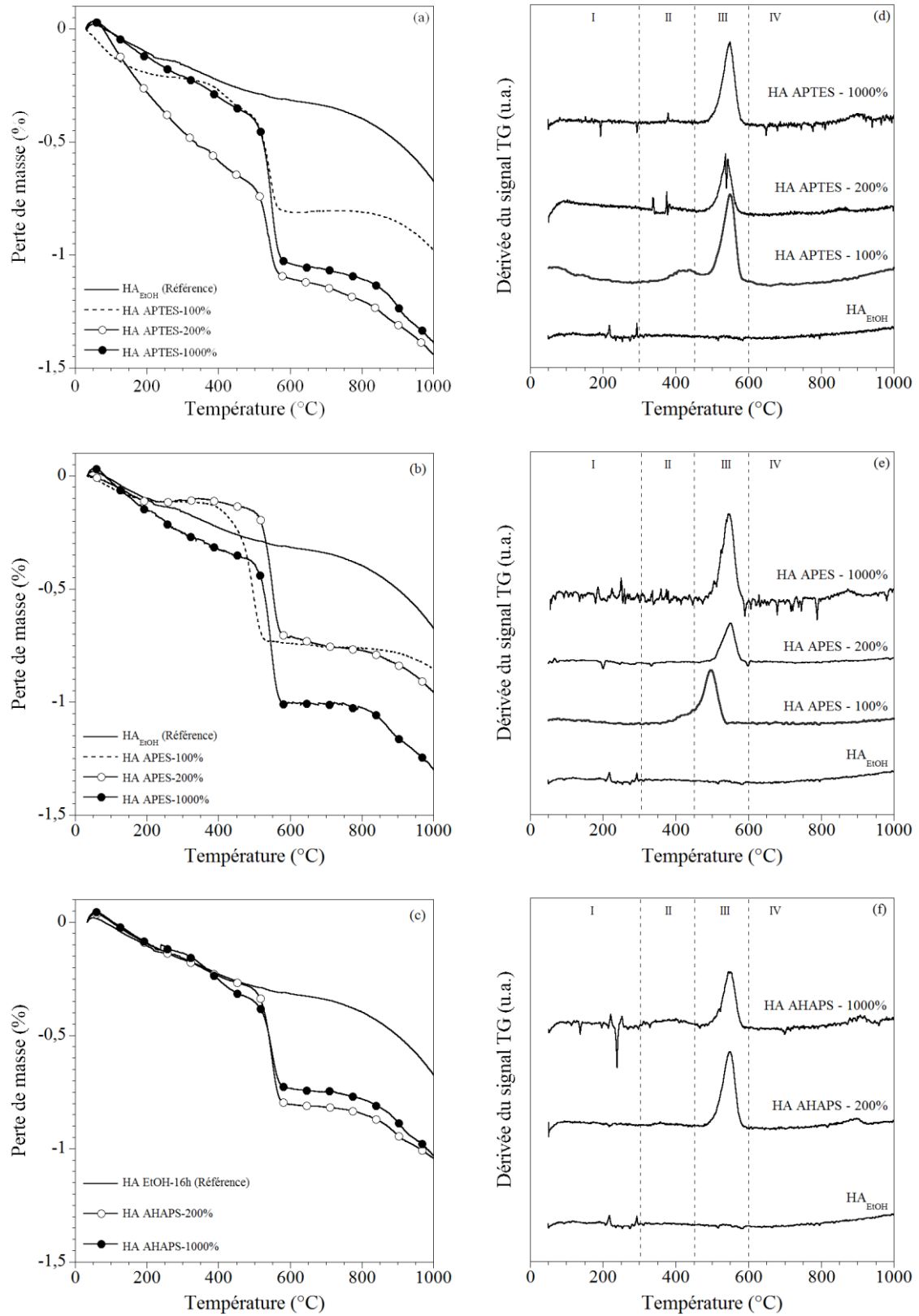


Figure V-16 : Courbes d'analyses TG (a, b, c) et dérivée des courbes d'analyses TG (d, e, f) avant et après greffage (a, d) d'APTES, (b, e) d'APES et (c, f) d'AHAPS sur poudres d'HA

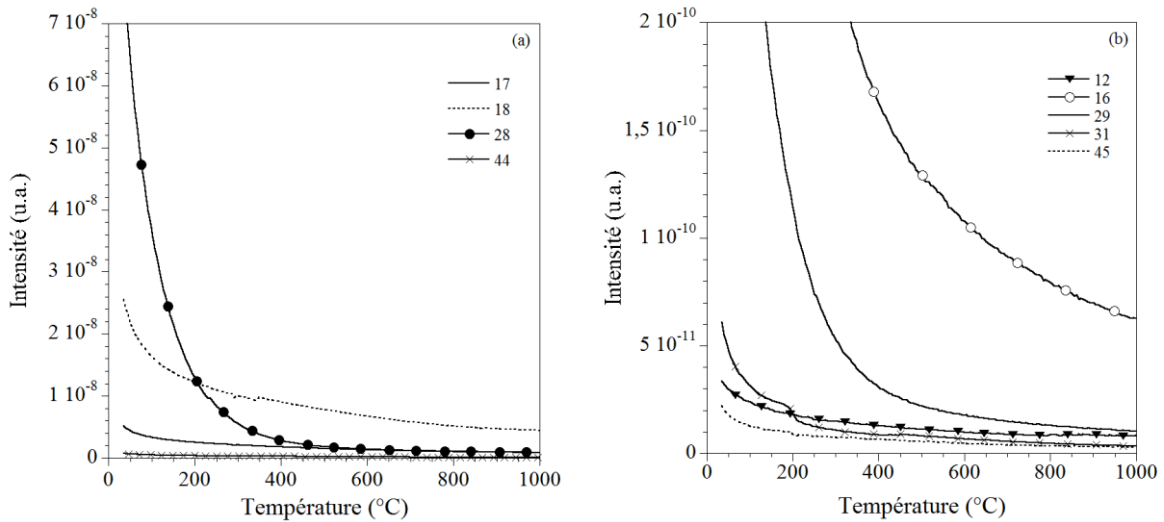


Figure V-17 : Émissions des masses (a) 17, 18, 28, 44 et (b) 12, 16, 29, 31, 45 au cours du traitement thermique de HA_{EtOH}

Le second domaine de température s'étend de 300 à 450°C. Il est caractérisé par des pertes de masse oscillant entre 0,030 et 0,200 % (Tableau V-6). Aucun lien n'est à noter entre la perte de masse mesurée et la molécule ou le taux de recouvrement appliqué. Ici encore, les pertes de masses sont similaires à celle enregistrée pour la poudre de référence qui est de 0,139 % (HA_{EtOH}). Dans ce domaine des pics d'émission des masses 16 (Figure V-18b, d, f) et 18 (Figure V-18a, c, e) sont détectés. L'examen détaillé des spectres d'émission de masse indique un léger pic d'émission de la masse 44 (Figure V-18a, c, e). L'ensemble de ces masses pourrait témoigner d'un départ de chaîne carbonée (*cf.* Tableau II-3 pour l'attribution des masses). La poudre ayant séjourné 16 h dans l'éthanol pour HA_{EtOH} et 40 h en présence d'organo-alkoxysilane, des résidus éthanoliques sous la forme de carbonates pourraient s'être chimisorbés à la surface des poudres.

Dans le domaine de température, de 450 à 600°C, les pertes de masse enregistrées pour les poudres après greffage, comprises entre 0,420 et 0,690 % (Tableau V-6) sont significativement plus élevée que celle mesurée pour la poudre de référence (HA_{EtOH}) qui est, quant à elle, de 0,056 %. Dans ce domaine de température, les pics d'émission caractéristiques des masses 12, 16, 17, 18, 28, 29, 31, 44 et 45 sont détectés pour les poudres après greffage (Figure V-18). Plusieurs combinaisons de ces masses sont envisageables :

- Les masses 28 et 44 associées aux fragments 12, 16 et 29 correspondent à un possible départ de chaînes carbonées du type CO, CO₂ ou à des groupements SiO,
- La masse 45 associée aux fragments 12, 16, 31 et 29 pourraient traduire le départ de groupements du type C₂H₅OH,
- Les masses 12, 28, 29 et 31 pourraient être attribuées à des groupements CH₃-NH₂.

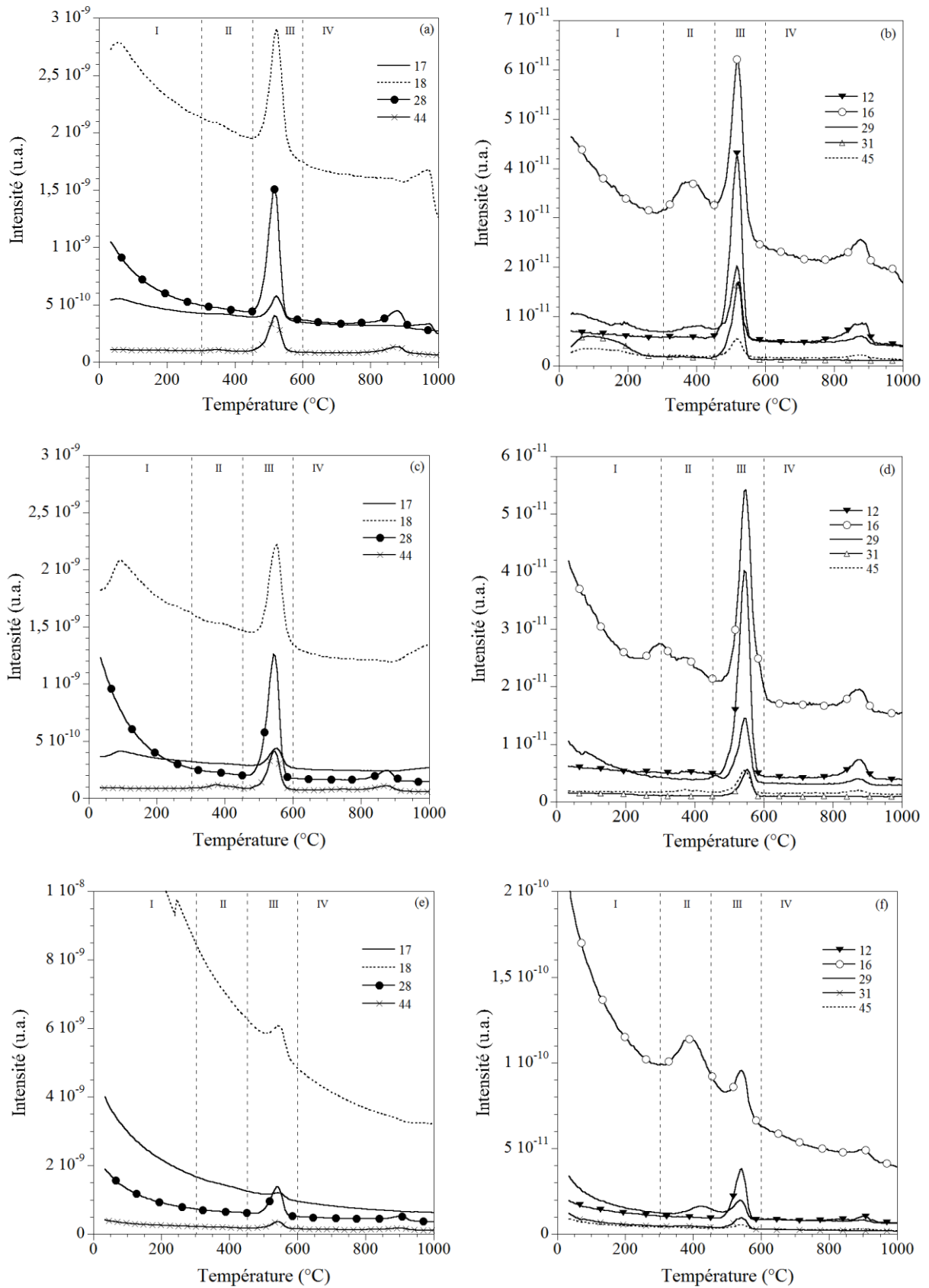


Figure V-18 : Émissions des masses 17, 18, 28, 44 (a, c, e), 12, 16, 29, 31 et 45 (b, d, f) au cours du traitement thermique des poudres d'HA après greffage (a, b) d'APTES, (c, d) d'APES et (e, f) d'AHAPS pour un taux de recouvrement théorique de 1000 %

Tableau V-6 : Pertes de masse (%) observées expérimentalement par thermogravimétrie pour HA

Température (°C)		30	300	450	600	1000	Perte totale	% _{massique} OAS
Domaine		I	II	III	IV			
HA _{EIOH}		0,158	0,139	0,056	0,329		0,682	0
HA	APTES	100 %	0,219	0,117	0,476	0,167	0,977	0,036
		200 %	0,447	0,194	0,462	0,336	1,439	0,075
		1000 %	0,210	0,140	0,689	0,355	1,394	0,354
	APES	100 %	0,117	0,122	0,504	0,117	0,859	0,026
		200 %	0,109	0,027	0,578	0,251	0,965	0,053
		1000 %	0,252	0,099	0,653	0,304	1,308	0,258
	AHAPS	100 %	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,045
		200 %	0,165	0,102	0,538	0,242	1,047	0,089
		1000 %	0,136	0,177	0,422	0,301	1,036	0,446

Cependant, l'absence du fragment 14 pour toutes les poudres ne permet pas de conclure sur l'émission de composés azotés.

La différence de perte de masse observée entre la poudre avant (HA_{EIOH}) et après greffage ainsi que l'émission de groupements carbonés dans cette gamme de température semblerait donc traduire le départ de la molécule organique. Le spectre d'émission des masses de la poudre HA_{EIOH} ne présente, quant à lui, aucun pic significatif dans ce domaine de température (Figure V-17).

Le départ de la molécule a principalement lieu à 550°C. Cependant des départs des masses 12, 16, 28, 29 et 44 sont également enregistrés vers 900°C, dans le quatrième domaine de température. L'examen des dérivées des analyses TG indique, au delà de 600°C, de faibles pertes de masse oscillant autour de 0,200 % (Figure V-16d, e, f et Tableau V-6). Ces émissions de masses ne sont pas visibles sur l'analyse de la poudre HA_{EIOH} (Figure V-17). Néanmoins, la poudre de référence présente également une perte de masse dans ce domaine de température. Les départs gazeux semblent donc plutôt provenir de résidus de molécules présents dans la chambre d'analyse qui ne se serait pas complètement évacuée à 550°C.

De manière générale, la perte de masse totale enregistrée tend à augmenter avec le taux de recouvrement (Tableau V-6). Cependant, aucune concordance n'est mise en évidence entre le pourcentage massique hypothétique d'organo-alkoxysilane présent au sein des poudres (%_{massique}OAS) et les pertes de masse déterminées expérimentalement et ce, que ce soit en considérant un domaine de température en particulier ou toute la gamme de température analysée.

V.4.2.b. Cas de l'hydroxyapatite silicatée

Les analyses thermogravimétriques (TG) obtenues sur poudres de $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$ avant et après avoir réagi avec l'APTES, l'APES et l'AHAPS sont représentées respectivement sur la Figure V-19a, b, et c, et ce pour les trois taux de recouvrement étudiés (100 %, 200 % et 1000 %). Pour la molécule AHAPS, seules les poudres préparées pour les taux de recouvrement 200 % et 1000 % ont été analysées par thermogravimétrie.

L'allure des analyses thermogravimétriques des poudres après greffage est similaire à celle de la poudre de référence, soit la poudre de $\text{Si}_{0,5}\text{HA}_{\text{EtOH}}$. Aucune variation de masse significative supplémentaire n'est décelée.

Les courbes dérivées des analyses TG (Figure V-19d, e et f) sont constituées d'une succession de pics caractéristiques de départs gazeux mis en évidence à la Figure V-20 pour $\text{Si}_{0,5}\text{HA}_{\text{EtOH}}$ et à la Figure V-21 après greffage des molécules pour un taux de recouvrement de 1000 %. L'ensemble de ces courbes illustre, ici encore, différents domaines de température, notés I, II et III, dont les pertes de masses associées sont répertoriées dans le Tableau V-7.

Le premier domaine de température s'étend de l'ambiante à 300°C et est caractérisé par des pertes de masse variant entre 0,060 et 0,145 %. Pour l'échantillon de référence ($\text{Si}_{0,5}\text{HA}_{\text{EtOH}}$) cette perte de masse est de 0,074 %. Elles sont principalement associées au départ gazeux des masses 16, 17, 18 et 28 caractéristiques de l'eau et de résidus carbonés (Figure V-20 et Figure V-21a, c, e).

Dans le second domaine de température, de 300 à 500°C, les pertes de masse mesurées sont toutes similaires et oscillent entre 0,280 et 0,425 %. L'examen des spectres d'émission de masse suggère que ces pertes sont attribuées aux départs de composés répondant aux masses 16, 17 et 18 (Figure V-21) ce qui correspond vraisemblablement à de l'eau. Quelle que soit la molécule, les masses caractéristiques de chaînes carbonées, soit 12, 28, 29, 31, 44 et 45 ne sont pas décelées dans cette gamme de température. De plus, les mêmes émissions de masses sont relevées pour la poudre de référence $\text{Si}_{0,5}\text{HA}_{\text{EtOH}}$ (Figure V-20). Les pertes de masse enregistrées ne semblent donc pas correspondre au départ de l'organo-alkoxysilane, mais plutôt de résidus provenant des conséquences de l'immersion des poudres dans l'éthanol.

Enfin, le dernier domaine de température s'étend de 500 à 1000°C. Ici encore, les pertes de masses mesurées pour toutes les poudres sont semblables et centrées autour de 0,350 % (Tableau V-7). Un départ gazeux, provenant essentiellement de la masse 16, est enregistré sur les poudres après greffage (Figure V-21). Il pourrait traduire un départ d'eau ou de carbonate. Quoiqu'il en soit, par l'absence des pics d'émission des masses 28, 44 et 45, le départ de la molécule organique n'est ici pas mis en évidence.

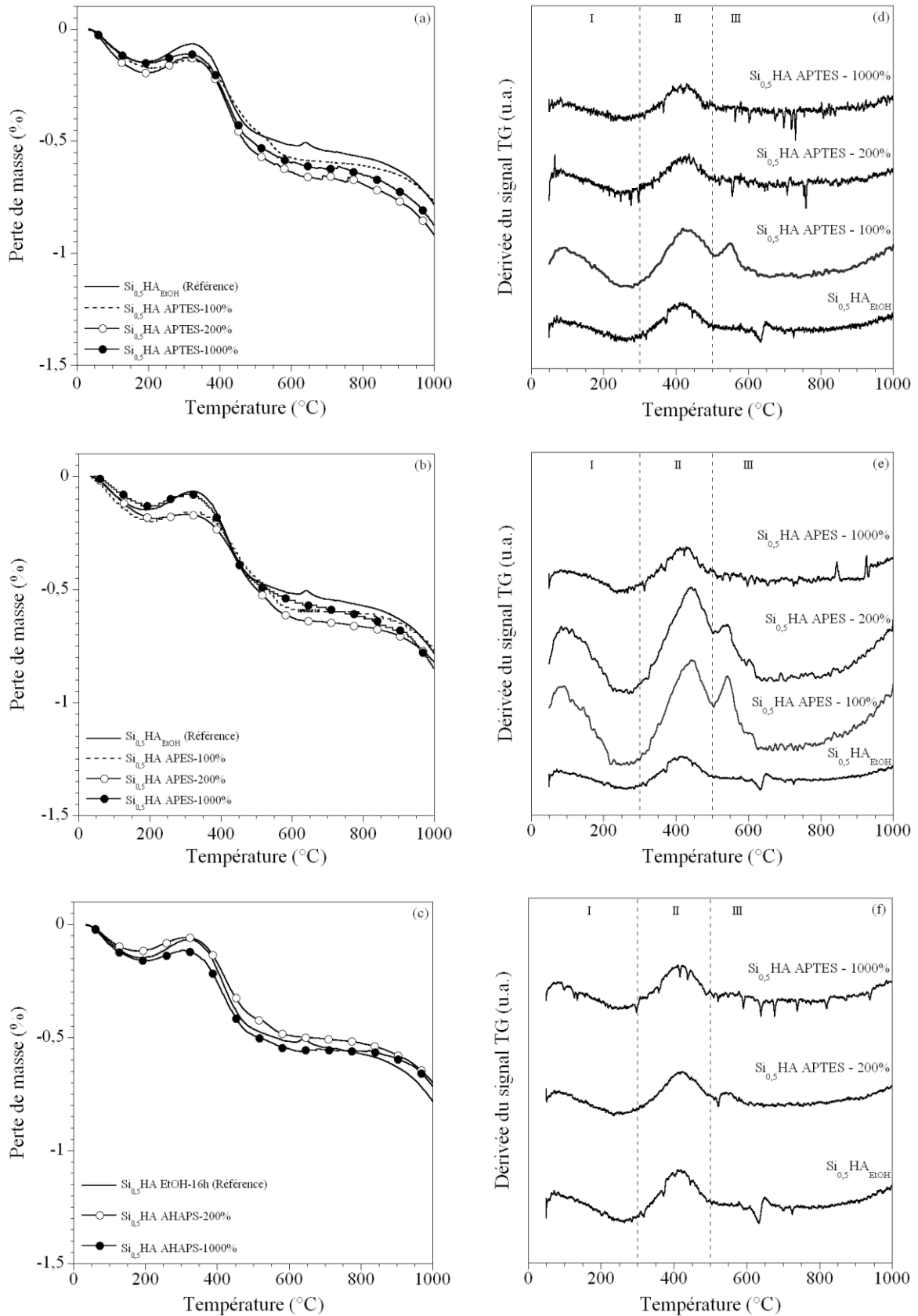


Figure V-19 : Courbes d'analyses TG (a, b, c) et dérivée des courbes d'analyses TG (d, e, f) avant et après greffage (a, d) d'APTES, (b, e) d'APES et (c, f) d'AHAPS sur poudres de Si_{0.5}HA

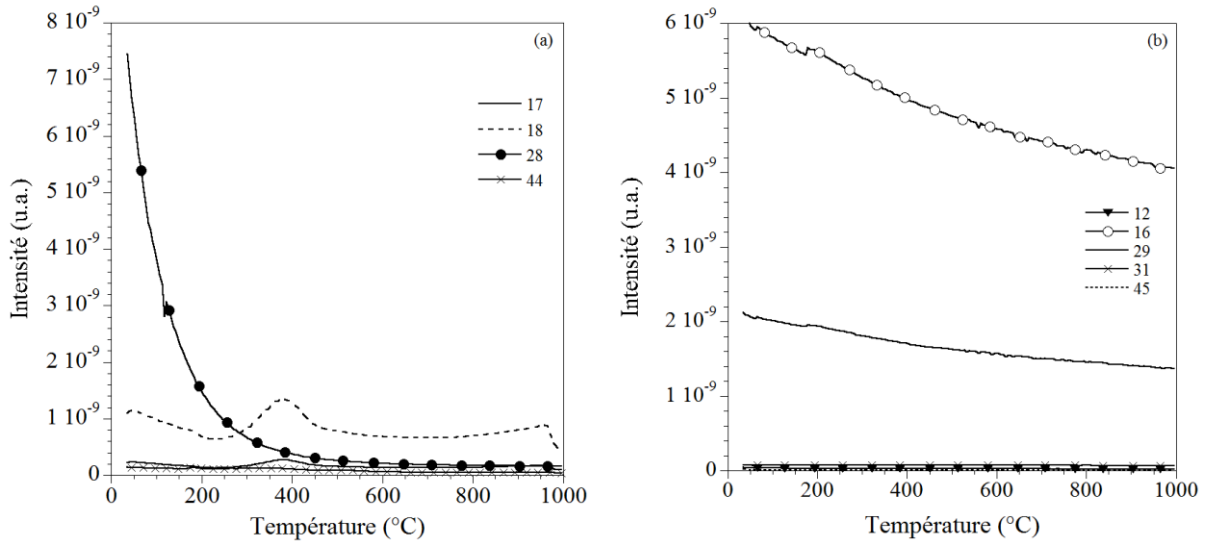


Figure V-20 : Émissions des masses (a) 17, 18, 28, 44 et (b) 12, 16, 29, 31, 45 au cours du traitement thermique de $Si_{0,5}HA$

Tableau V-7 : Pertes de masse (%) observées expérimentalement par thermogravimétrie pour $Si_{0,5}HA$

Température (°C)		30	300	500	1000	Perte totale	% _{massique} OAS
Domaine		I	II	III			
$Si_{0,5}HA_{EtOH}$		0,074	0,389	0,330		0,793	0
APTES	100 %	0,143	0,306	0,330		0,779	0,106
	200 %	0,128	0,424	0,370		0,922	0,211
	1000 %	0,114	0,400	0,375		0,889	1,033
$Si_{0,5}HA$	APES	100 %	0,162	0,287	0,327	0,776	0,076
	200 %	0,169	0,329	0,330		0,828	0,155
	1000 %	0,083	0,387	0,390		0,860	0,755
AHAPS	100 %	n.d.	n.d.	n.d.		n.d.	0,131
	200 %	0,060	0,349	0,301		0,710	0,262
	1000 %	0,116	0,374	0,232		0,722	1,295

Dans le cas de $Si_{0,5}HA$ les pertes de masses enregistrées sont toutes, quelle que soit la molécule ou le taux de recouvrement, globalement similaires (Tableau V-7). Aucun lien ne peut être établi avec les pourcentages massiques hypothétiques d'organo-alkoxysilanes présents au sein des poudres.

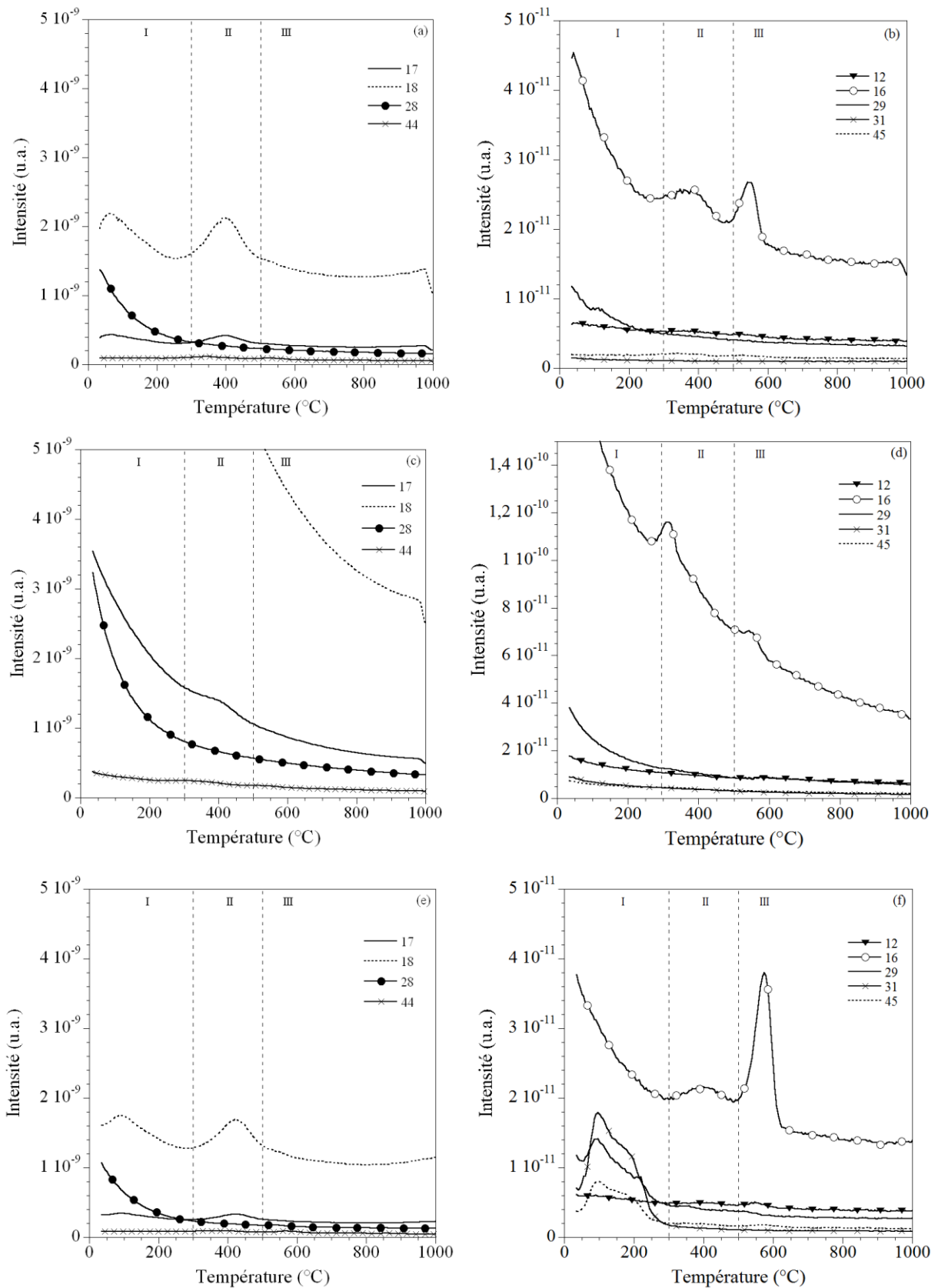


Figure V-21 : Émissions des masses 17, 18, 28, 44 (a, c, e), 16 et 29 (b, d, f) au cours du traitement thermique des poudres de $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$ après greffage (a, b) d'APTES, (c, d) d'APES et (e, f) d'AHAPS pour un taux de recouvrement théorique de 1000 %

V.4.3. Analyse élémentaire du carbone

Les résultats de l'analyse élémentaire de carbone sur les différentes poudres, avant et après greffage, sont présentés sur la Figure V-22. Afin d'observer l'influence de l'ajout d'organo-alkoxysilane, ces résultats sont normalisés par rapport aux valeurs mesurées sur les poudres après leur mise en solution dans l'éthanol pendant 16 h (Référence).

Quelle que soit la composition, le pourcentage massique de carbone présent au sein des poudres augmente avec le taux de recouvrement hypothétique.

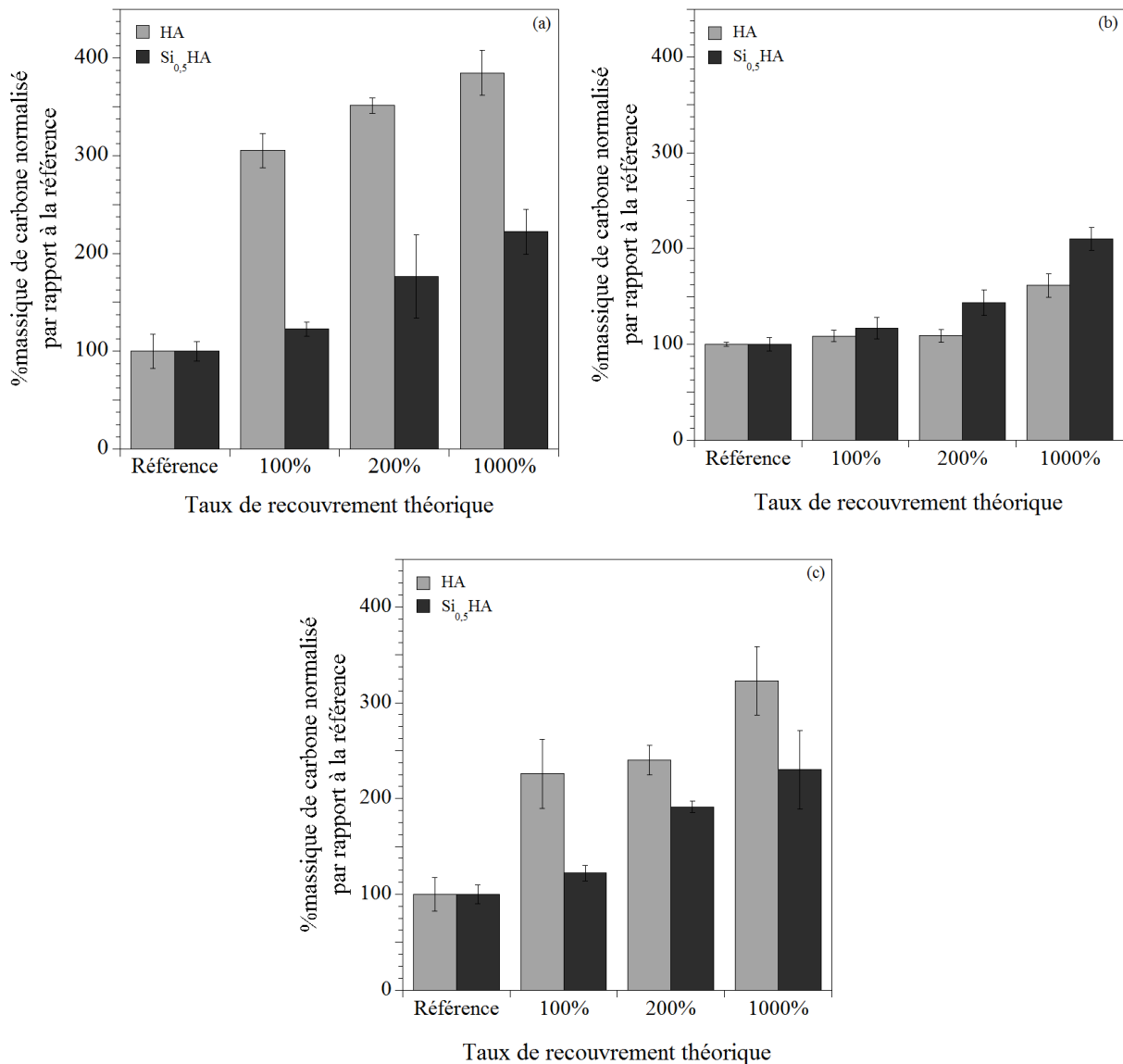


Figure V-22 : Analyse élémentaire de carbone sur les poudres d'HA et de Si_{0,5}HA après greffage (a) d'APTES, (b) d'APES et (c) d'AHAPS, résultats normalisés par rapport à ceux mesurés sur les poudres HA_{EiOH} et Si_{0,5}HA_{EiOH} (Référence = 100 %)

Dans le cas de l'APTES et de l'AHAPS (Figure V-22a et c), la teneur en carbone mesurée dans l'HA représente 225 à 375 % de celle mesurée dans le matériau de référence et elle croît avec le taux de recouvrement. En revanche, pour l'APES (Figure V-22b), le pourcentage massique de carbone mesuré pour le taux de recouvrement maximal n'atteint que 150 %, valeur deux fois plus faible que celles rencontrées après greffage d'APTES ou d'AHAPS.

Pour la composition $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$, les pourcentages massiques de carbone sont globalement plus faibles que dans le cas de HA. Les valeurs représentent ici 125 à 225 % de celle mesurée dans le matériau de référence. Quelle que soit la molécule, les évolutions observées dans le cas de $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$ sont similaires.

V.4.4. Analyses spectroscopiques

Pour chaque molécule étudiée, les poudres préparées avec le taux de recouvrement le plus élevé, soit 1000 %, ont été analysées par spectroscopies FT-IR et Raman.

Les spectres FT-IR, présentés à la Figure V-23, sont semblables à ceux observés avant greffage (Figure V-9). L'ensemble des poudres analysées présente les bandes d'absorption caractéristiques des groupements phosphate ainsi que celles attribuées aux liaisons Si-O et Si-OH dans le cas de $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$ (Figure V-23b). Aucune bande caractéristique des organo-alkoxysilane n'est détectée.

Les spectres de diffusion Raman sont représentés sur la Figure V-24. Ceux des poudres ayant réagi avec l'APTES ou l'APES en respectant un taux de recouvrement de 1000 % sont semblables aux spectres obtenus avant greffage (Figure V-10). Quelle que soit la molécule, les bandes de vibration caractéristiques des groupements phosphate et hydroxyde sont détectées ainsi que celles attribuées au silicate dans le cas de $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$ (Figure V-24b). Concernant l'AHAPS, aucune modification du spectre n'est à noter après réaction à la surface de l'hydroxyapatite silicatée (Figure V-24b). En revanche, pour l'HA, de nouvelles bandes de vibrations sont mises en évidence à 730, 1300 et 1380 cm^{-1} (Figure V-24a). Elles pourraient témoigner de la vibration des liaisons Si-O-C₂H₅ (730 cm^{-1}) et CH (1300 et 1380 cm^{-1}) de l'organo-alkoxysilane. Bien que le spectre de diffusion Raman de l'AHAPS ne soit pas disponible, ces bandes de vibration ont été précédemment mises en évidence pour l'APTES et l'APES (Figure V-14) et semblent caractéristiques des organo-alkoxysilanes. Ce résultat n'est cependant visible que pour le taux de recouvrement maximal. Le spectre de diffusion Raman de l'HA après greffage à 200 % d'AHAPS ne révèle aucun pic caractéristique des organo-alkoxysilanes (Figure V-24).

A l'issue de la réaction de greffage, la poudre est filtrée et rincé à l'aide d'éthanol (Figure V-2). Les filtrats ont été analysés par FT-IR mais aucune bande d'absorption caractéristique des organo-alkoxysilanes n'a été mise en évidence sur ces spectres.

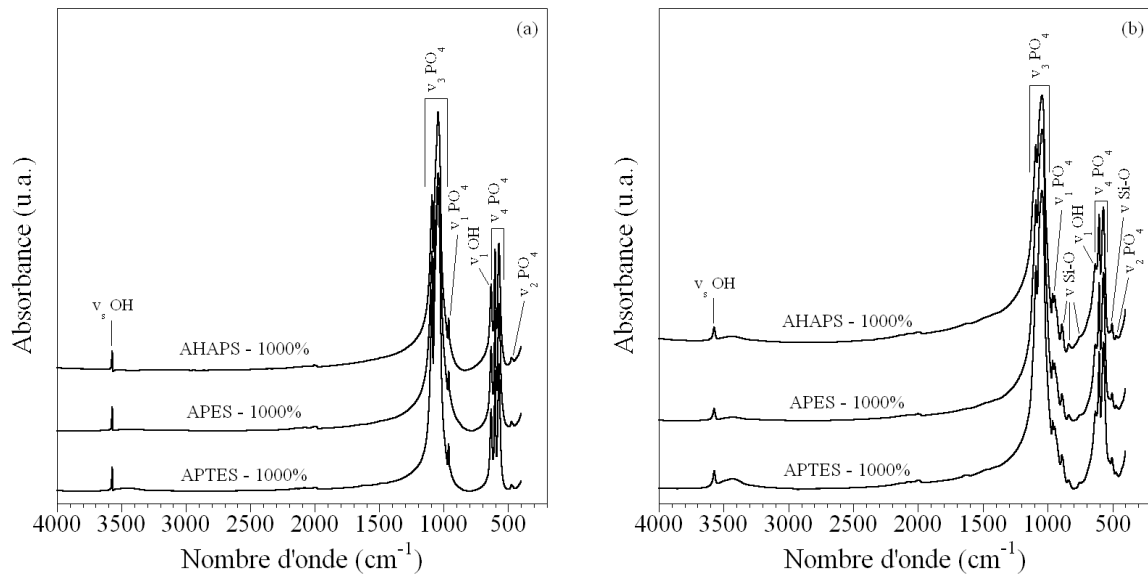


Figure V-23 : Spectres FT-IR des poudres (a) d'HA et (b) de $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$ après greffage des molécules et pour un taux de recouvrement de 1000 %

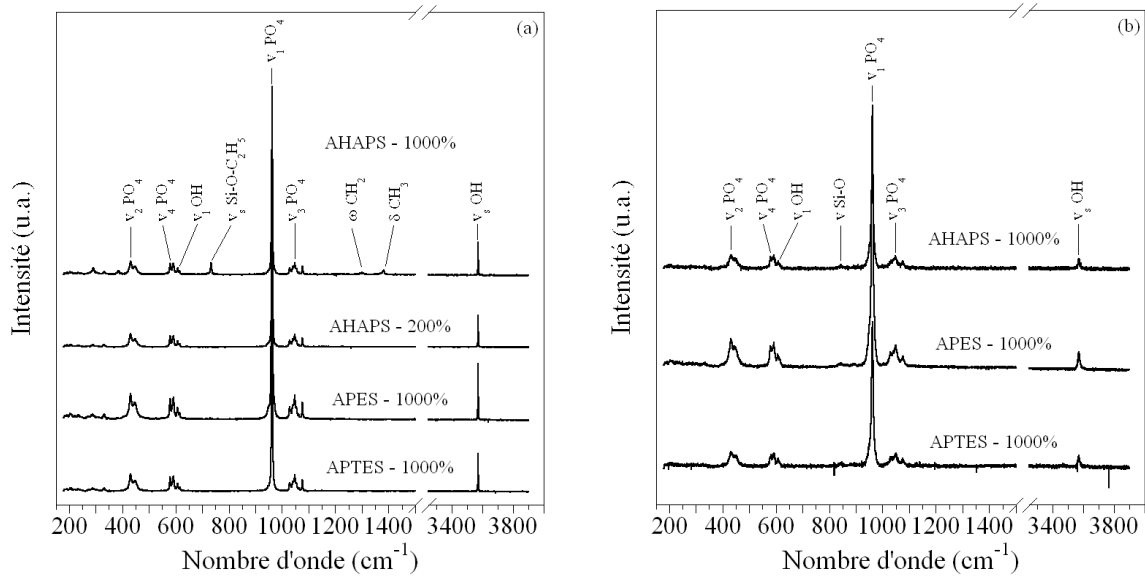


Figure V-24 : Spectres de diffusion Raman des poudres (a) d'HA et de (b) $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$ après greffage des molécules et à différents taux de recouvrement

V.5. Discussion

L'étude du greffage d'organo-alkoxysilane à la surface de poudres cristallines d'HA et de $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$ s'est conduite dans l'idée de contrôler le taux de recouvrement des particules. Pour réaliser les calculs des concentrations en molécules organiques, une des hypothèses avancées s'appuie sur le caractère parfait du cristal d'hydroxyapatite. L'ensemble de ces considérations impose de travailler avec de faibles quantités d'organo-alkoxysilanes, leurs concentrations dans les solutions de greffage variant entre $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pour les plus faible taux de recouvrement, à $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pour les plus forts. Ceci occasionne indéniablement des difficultés dans la caractérisation du greffage. En effet, la détection de bandes caractéristiques des organo-alkoxysilanes par spectroscopie vibrationnelle est quasi-impossible. Les analyses réalisées sur les poudres greffées ont cependant soulevé quelques points remarquables.

Les analyses thermogravimétriques couplées à la spectrométrie d'émission de masse ont permis de mettre en évidence plusieurs domaines de température auxquels sont associés différents phénomènes. Autour de 400°C , les poudres, quelle que soit leur composition, subissent un faible départ de résidus carbonés et d'eau. Ces pertes de masse n'étant pas associées au départ d'autres composés chimiques, elles ne proviennent pas de l'organo-alkoxysilane. Elles pourraient correspondre à des groupements éthoxy adsorbés chimiquement à la surface des poudres suite à leur immersion dans l'éthanol. Au-delà, des différences de comportement suivant la composition de la poudre sont observées.

Sur les poudres d'HA, le départ de l'organo-alkoxysilane est mis en évidence par spectroscopie d'émission de masse autour de 550°C . La teneur en carbone augmente avec le taux de recouvrement hypothétique de la poudre d'HA et l'analyse spectroscopique révèle la présence de bandes de vibration propres à l'organo-alkoxysilane pour le plus fort taux d'AHAPS. L'ensemble de ces résultats confirme la présence des molécules organiques au sein des poudres d'HA à l'issue du greffage. Cependant, les quantifications réalisées à partir de l'analyse thermogravimétrique ne permettent pas de corréler les résultats aux pourcentages hypothétiques d'organo-alkoxysilane. Toutefois, l'analyse élémentaire du carbone révèle des différences de comportement suivant les organo-alkoxysilanes étudiés. Les teneurs en carbone mesurées diminuent de l'APTES, à l'AHAPS et à l'APES.

Les poudres de $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$ présentent un comportement similaire avant et après greffage. L'analyse élémentaire de carbone indique néanmoins bien, quelle que soit la molécule, la présence de carbone au sein de ces poudres. Les teneurs mesurées étant similaires quelle que

soit l'organo-alkoxysilane utilisé, il est possible que le carbone détecté *via* cette analyse ne soit pas intégralement issu de la molécule mais également d'éventuels groupements éthoxy chimiquement adsorbés à la surface des particules. Ce carbone pourrait également provenir d'une carbonatation en surface des apatites due au dioxyde de carbone de l'air dissous dans le solvant.

L'ensemble des résultats indique donc que les molécules sont présentes à la surface d'HA contrairement, semble-t-il, à $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$. Une telle variation de comportement peut provenir du pH du milieu de réaction. Dans cette optique, il apparaît alors intéressant de suivre l'évolution du comportement des organo-alkoxysilanes (hydrolyse, dimérisation, polymérisation...) dans le solvant, ce qui serait envisageable par RMN (^{13}C , ^1H) liquide.

La différence de pH observée dans les deux milieux réactionnels ainsi que la différence de composition des deux poudres peut également induire des variations de charges de leur surface. Elles pourraient être à l'origine des différences de comportement observées entre HA et $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$. Dans l'eau distillée, le point isoélectrique de l'HA est à $\text{pH} = 6,5$ [CHO09] et celui de l'hydroxyapatite silicatée à $\text{pH} = 4$ [BOT02]. En supposant que ces valeurs soient peu modifiées dans l'éthanol, à l'issue de l'équilibre de dissolution l'HA aurait donc une charge de surface nulle tandis que la poudre de $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$ serait chargée négativement. Une étude plus approfondie de l'influence du potentiel zêta de surface des poudres (par acoustophorèse par exemple) devrait permettre d'apporter de nouveaux éléments de discussion pour mieux appréhender les phénomènes susceptibles de se produire à la surface des poudres phosphocalciques.

Enfin, pour confirmer que les molécules se soient greffées à la surface des poudres, c'est-à-dire qu'une liaison covalente entre le substrat et la molécule se soit créée, il est nécessaire d'avoir accès à la chimie de surface des matériaux. L'étude plus approfondie des poudres greffées par spectroscopie Raman (décalage des pics caractéristiques des molécules organiques et/ou des phosphates de calcium suite au greffage) ou par XPS pourrait permettre d'analyser la nature des liaisons chimiques présentes à leur surface.

En résumé :

- Mise en place d'un protocole de greffage d'organo-alkoxysilanes dans le but de contrôler le taux de recouvrement des poudres
- Mise en évidence d'organo-alkoxysilanes à la surface d'HA contrairement à $\text{Si}_{0,5}\text{HA}$
- Identification de facteurs influençant le greffage : pH du système, charge de surface des poudres et comportement de la molécule organique en solution

Conclusion générale

L'étude de l'incorporation du silicium dans le phosphate tricalcique β a été abordée selon une approche globale, de la synthèse des poudres jusqu'à la caractérisation des céramiques frittées. Pour évaluer l'influence biologique de l'addition de silicium dans le β -TCP, les céramiques élaborées ont été testés *in vitro* dans différents milieux physiologiques ainsi qu'au contact de différentes lignées cellulaires.

La synthèse d'apatite déficitaire en calcium en présence de silicium a été étudiée par précipitation en voie aqueuse à pH et température contrôlés (7 et 30°C respectivement) et en se basant sur la formule chimique hypothétique $\text{Ca}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_{(2-2x)}(\text{SiO}_4)_x$, où x représente la teneur en silicium. Quelle que soit la teneur en silicium ($x = 0, 0,05, 0,10, 0,20$), une évolution similaire des phases cristallines présentes dans les poudres calcinées est observée. Du TCP apatitique conduisant après calcination à une phase cristalline unique de β -TCP n'est obtenu que pour un temps de maturation précis (compris entre 30 et 90 mn) et dépendant de la quantité de silicium. Ce temps de maturation décroît lorsque la teneur en acétate de silicium augmente dans le milieu réactionnel. Cette augmentation entraîne un accroissement du rapport molaire Ca/P des réactifs. Cette condition initiale serait responsable de l'augmentation de la vitesse de la réaction de précipitation du TCP apatitique.

L'analyse structurale indique que pour des valeurs de $x \leq 0,05$, le silicium se substituerait partiellement aux groupements phosphate de la structure du TCP. La limite d'incorporation proposée dans la littérature ($x = 0,02$) serait atteinte [NUR59]. Le silicium non incorporé dans

le β -TCP est localisé dans des grains de silice amorphe aléatoirement répartis dans les matériaux denses. Une étude structurale approfondie pourrait apporter des éléments d'information supplémentaires sur la configuration du silicium dans le β -TCP.

Afin d'optimiser le frittage, les poudres de TCP apatitique sont préalablement calcinées à 750°C, suivi par un frittage naturel à 1100°C. Des matériaux denses à plus de 98% ont été obtenus. Le comportement au frittage des matériaux est influencé par la présence de silicium : lorsque sa teneur augmente, le processus de densification des poudres est ralenti à cycle de frittage identique et la taille des grains diminue. Le silicium présent sous la forme de grains de silice inertes dans les matériaux frittés est à l'origine de ces phénomènes.

Après immersion dans des fluides biologiques simulés, des phénomènes de dissolution et de précipitation ont été révélés à la surface des matériaux et conduisent à la formation d'une couche de grains micrométriques d'apatite carbonatée. La diminution de la taille des grains de la céramique occasionnée par la présence de silice permet d'augmenter la cinétique de dissolution des matériaux. L'amélioration de la bioactivité des céramiques est donc indirectement liée à la présence de silicium.

L'étude des cellules de la lignée ostéoblastique MC3T3-E1 indique que, quelle que soit la teneur en silicium, les cellules sont viables et prolifèrent à la surface des matériaux. Au contact des céramiques, la différenciation ostéoblastique des cellules souches ST-2, a lieu de la même manière pour toutes les teneurs en silicium. La lignée cellulaire des ostéoblastes SaOs-2 a permis de montrer que les matériaux induisent le processus de minéralisation. De plus, le taux de minéralisation osseuse synthétisé par les cellules ostéoblastiques s'accroît avec le silicium. L'ensemble de ces essais met ainsi en évidence la non toxicité du silicium dans le β -TCP. Bien que le silicium n'améliore pas de manière significative les propriétés biologiques du β -TCP, il conduit à des matériaux potentiellement intéressants pour une application en chirurgie réparatrice. Il serait toutefois nécessaire, au préalable, de connaître son comportement vis-à-vis de cellules ostéoclastiques ainsi que *in vivo*.

L'étude préliminaire de la fonctionnalisation de la surface de phosphates de calcium a été réalisée sur de l'hydroxyapatite, silicatée ou non. Un des objectifs était de mettre en place un protocole de greffage d'organo-alkoxysilane dans l'idée de maîtriser la quantité de molécules organiques à greffer et d'identifier les facteurs influençant le greffage. Les quantités de molécules étudiées étant très faibles, les moyens de caractérisation mis en œuvre pour les détecter sont peu discriminants. Toutefois, le greffage dans l'éthanol semble possible à la

surface de particules d'hydroxyapatite. Afin de mieux apprécier les phénomènes intervenant au cours du greffage et d'affiner le protocole mis en place, il apparaît alors essentiel d'étudier la charge de surface des particules dans le solvant. La détection des molécules à la surface des céramiques pourra alors être envisagée par des moyens de caractérisation notamment spectroscopiques tels que l'XPS et le Raman. L'immobilisation maîtrisée d'organoalkoxysilane à la surface de biocéramiques phosphocalciques doit permettre, à terme, de greffer des biomolécules (peptides, protéines, facteurs de croissance...) qui favorisent le processus de régénération osseuse, apportant ainsi aux phosphates de calcium des propriétés ostéoinductrices.

Références Bibliographiques

- [AAR07] Ääritalo V., Areva S., Jokinen M., Lindén M. et Peltola T. (2007). "Sol-gel-derived TiO₂-SiO₂ implant coatings for direct tissue attachment. Part I: Design, preparation and characterization." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **18**(9): 1863-1873.
- [AFN08] AFNOR ISO 13779-3 (2008). "Implants chirurgicaux - Hydroxyapatite Partie 3: Analyse chimique et caractérisation de la cristallinité et de la pureté de phase"
- [AND58] Ando J. (1958). "Phase diagrams of Ca₃(PO₄)₂-Mg₃(PO₄)₂ and Ca₃(PO₄)₂-CaNaPO₄ systems." *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **31**: 201-205.
- [ANN04] Annaz B., Hing K. A., Kayser M., Buckland T. et Di Silvio L. (2004). "An ultrastructural study of cellular response to variation in porosity in phase-pure hydroxyapatite." *Journal of Microscopy* **216**(2): 97-109.
- [ANS00] Anselme K. (2000). "Osteoblast adhesion on biomaterials." *Biomaterials* **21**(7): 667-681.
- [ANS99] Anselme K., Noël B., Flautre B., Blary M. C., Delecourt C., Descamps M. et Hardouin P. (1999). "Association of porous hydroxyapatite and bone marrow cells for bone regeneration." *Bone* **25**(2, Supplement 1): 51S-54S.
- [ARC04] Arcos D., Rodríguez-Carvajal J. et Vallet-Regi M. (2004). "Silicon incorporation in hydroxylapatite obtained by controlled crystallization." *Chemistry of Materials* **16**(11): 2300-2308.
- [ARK92] Arkles B., Steinmetz J. R., Zazyczny J. et Mehta P. (1992). Factors contributing to the stability of alkoxy silanes in aqueous solution. In: Silanes and others Coupling Agents, Mittal K. L. editors. Utrecht, VSP: 91.
- [ARM00] Armulik A., Svineng G., Wennerberg K., Fässler R. et Johansson S. (2000). "Expression of integrin subunit β1B in integrin β1-deficient GD25 cells does not interfere with αVβ3 functions." *Experimental Cell Research* **254**(1): 55-63.
- [AUB98] Aubin J. E. (1998). "Bone stem cells." *Journal of Cellular Biochemistry*(SUPPL. 30/31): 73-82.
- [AUB01] Aubin J. E. (2001). "Regulation of Osteoblast Formation and Function." *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* **2**(1): 81-94.
- [BAL03] Balas F., Perez-Pariente J. et Vallet-Regi M. (2003). "In vitro bioactivity of silicon-substituted hydroxyapatites." *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **66A**(2): 364-375.
- [BAL06] Balasundaram G., Sato M. et Webster T. J. (2006). "Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD." *Biomaterials* **27**(14): 2798-2805.
- [BAN06] Bandyopadhyay A., Bernard S., Xue W. et Bose S. (2006). "Calcium phosphate-based resorbable ceramics: Influence of MgO, ZnO, and SiO₂ dopants." *Journal of the American Ceramic Society* **89**(9): 2675-2688.
- [BAR03] Barrere F., van der Valk C. M., Dalmeijer R. A., Meijer G., van Blitterswijk C. A., de Groot K. et Layrolle P. (2003). "Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants." *J Biomed Mater Res A* **66**(4): 779-88.
- [BAR04] Bartouilh de Taillac L., Porté-Durrieu M. C., Labrugère C., Bareille R., Amédée J. et Baquey C. (2004). "Grafting of RGD peptides to cellulose to enhance human osteoprogenitor cells adhesion and proliferation." *Composites Science and Technology* **64**(6): 827-837.
- [BAT04] Batchelor R. H. et Zhou M. (2004). "Use of cellular glucose-6-phosphate dehydrogenase for cell quantitation: Applications in cytotoxicity and apoptosis assays." *Analytical Biochemistry* **329**(1): 35-42.
- [BES02] Beshkov G., Krastev V., Grigorov K., Maciel H., Tang T. A. et Huang V. (2002). "X-ray photoelectron spectroscopy study of phosphorus silicate glasses." *Surface and Coatings Technology* **161**(1): 11-19.

- [BES46] Bessey O. A., Lowry O. H. et Brock M. J. (1946). "A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum." Journal of Biological Chemistry **164**(1): 321-329.
- [BIA01] Bianco P., Riminucci M., Gronthos S. et Robey P. (2001). "Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications." Stem Cells **19**(3): 180-192.
- [BIG97] Bigi A., Foresti E., Gandolfi M., Gazzano M. et Roveri N. (1997). "Isomorphous substitutions in β -tricalcium phosphate: The different effects of zinc and strontium." Journal of Inorganic Biochemistry **66**(4): 259-265.
- [BIT09] Bitschnau A., Alt V., Böhner F., Heerich K. E., Margesin E., Hartmann S., Sewing A., Meyer C., Wenisch S. et Schnettler R. (2009). "Comparison of new bone formation, implant integration, and biocompatibility between RGD-hydroxyapatite and pure hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses - An experimental study in rabbits." Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials **88**(1): 66-74.
- [BLO37] Blodgett K. B. et Langmuir I. (1937). "Built-up films of barium stearate and their optical properties." Physical Review **51**(11): 964-982.
- [BOH09] Bohner M. (2009). "Silicon-substituted calcium phosphates - A critical view." Biomaterials **30**(32): 6403-6406.
- [BOH97] Bohner M., Lemaître J. et Ring T. A. (1997). "Kinetics of dissolution of β -tricalcium phosphate." Journal of Colloid and Interface Science **190**(1): 37-48.
- [BON90] Bonewald L. F. et Mundy G. R. (1990). "Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling." Clinical Orthopaedics and Related Research(250): 261-276.
- [BOS99] Boskey A. L., Wright T. M. et Blank R. D. (1999). "Collagen and bone strength." Journal of Bone and Mineral Research **14**(3): 330-335.
- [BOT06] Botelho C. M., Brooks R. A., Best S. M., Lopes M. A., Santos J. D., Rushton N. et Bonfield W. (2006). "Human osteoblast response to silicon-substituted hydroxyapatite." Journal of Biomedical Materials Research - Part A **79**(3): 723-730.
- [BOT02] Botelho C. M., Lopes M. A., Gibson I. R., Best S. M. et Santos J. D. (2002). "Structural analysis of Si-substituted hydroxyapatite: Zeta potential and X-ray photoelectron spectroscopy." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **13**(12): 1123-1127.
- [BRA76] Bradford M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1-2): 248-254.
- [BRA06] Brandi M. L. et Collin-Osdoby P. (2006). "Vascular biology and the skeleton." Journal of Bone and Mineral Research **21**(2): 183-192.
- [CAL75] Calvo C. et Gopal R. (1975). "The crystal structure of whitlockite from the Palermo quarry." The American Mineralogist **60**: 120-133.
- [CAM06] Camiré C. L., Saint-Jean S. J., Mochales C., Nevsten P., Wang J. S., Lidgren L., McCarthy I. et Ginebra M. P. (2006). "Material characterization and *in vivo* behavior of silicon substituted α -tricalcium phosphate cement." Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials **76B**(2): 424-431.
- [CAM03] Campbell A. A. (2003). "Bioceramics for implant coatings." Materials Today **6**(11): 26-30.
- [CAR03] Carano R. A. D. et Filvaroff E. H. (2003). "Angiogenesis and bone repair." Drug Discovery Today **8**(21): 980-989.
- [CAR70] Carlisle E. M. (1970). "Silicon: A possible factor in bone calcification." Science **167**(3916): 279-280.
- [CAR72] Carlisle E. M. (1972). "Silicon: An essential element for the chick." Science **178**(4061): 619-621.
- [CHE97] Chen D., Harris M. A., Rossini G., Dunstan C. R., Dallas S. L., Feng J. Q., Mundy G. R. et Harris S. E. (1997). "Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts." Calcified Tissue International **60**(3): 283-290.

- [CHE06] Chen H., Brook M. A., Sheardown H. D., Chen Y. et Klenkler B. (2006). "Generic bioaffinity silicone surfaces." Bioconjugate Chemistry **17**(1): 21-28.
- [CHI80] Chiang C. H., Ishida H. et Koenig J. L. (1980). "The structure of γ -aminopropyltriethoxysilane on glass surfaces." Journal of Colloid and Interface Science **74**(2): 396-404.
- [CHI10] Chiu L. L. Y. et Radisic M. (2010). "Scaffolds with covalently immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues." Biomaterials **31**(2): 226-241.
- [CHO08] Chollet C., Labrugère C. et Durrieu M. C. (2008). "Influence de la densité de peptides RGD greffés en surface de polyéthylène téréphtalate sur l'attachement des MC3T3." IRBM **29**(1): 7-12.
- [CHO09] Chotard-Ghodsnia R., Lucas S., Pagnoux C., Champion E., Viana M., Chulia D., Anselme K. et Chartier T. (2009). "Elaboration of a well-ordered porous bioceramic via a heterocoagulation colloidal process." Key Engineering Materials **396-398**: 515-518.
- [CHR96] Chrisey L. A., Lee G. U. et O'Ferrall C. E. (1996). "Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films." Nucleic Acids Research **24**(15): 3031-3039.
- [CHU08] Chua P. H., Neoh K. G., Kang E. T. et Wang W. (2008). "Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion." Biomaterials **29**(10): 1412-1421.
- [CHU99] Chusuei C. C. (1999). "Calcium phosphate phase identification using XPS and time-of-flight cluster SIMS." Analytical Chemistry **71**(1): 149-153.
- [CLE89] Clement D., Tristan J. M., Hamad M., Roux P. et Heughebaert J. C. (1989). "Etude de la substitution Mg^{2+}/Ca^{2+} dans l'orthophosphate tricalcique β ." Journal of Solid State Chemistry **78**(2): 271-280.
- [CUI09] Cui Y., Liu Y., Jing X., Zhang P. et Chen X. (2009). "The nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with l-lactic acid oligomer for bone repair." Acta Biomaterialia **5**(7): 2680-2692.
- [CUN07] Cuneyt Tas A., Bhaduri S. B. et Jalota S. (2007). "Preparation of Zn-doped β -tricalcium phosphate (β - $Ca_3(PO_4)_2$) bioceramics." Materials Science and Engineering C **27**(3): 394-401.
- [DAS06] da Silva O. G., da Silva Filho E. C., da Fonseca M. G., Arakaki L. N. H. et Airoidi C. (2006). "Hydroxyapatite organofunctionalized with silylating agents to heavy cation removal." Journal of Colloid and Interface Science **302**(2): 485-491.
- [DAC98] Daculsi G. (1998). "Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute." Biomaterials **19**(16): 1473-1478.
- [DAC90] Daculsi G., LeGeros R. Z., Heughebaert M. et Barbieux I. (1990). "Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics." Calcified Tissue International **46**(1): 20-27.
- [DAM05] Damia C. (2005). "Elaboration de poudres et de dépôts d'hydroxyapatite à haute et basse température pour applications biomédicales." Thèse de Doctorat: Université Paul Sabatier Toulouse III.
- [DAV07] Davies J. E. (2007). "Bone bonding at natural and biomaterial surfaces." Biomaterials **28**(34): 5058-5067.
- [DAW08] Dawson J. I. et Oreffo R. O. C. (2008). "Bridging the regeneration gap: Stem cells, biomaterials and clinical translation in bone tissue engineering." Archives of Biochemistry and Biophysics **473**(2): 124-131.
- [DEC97] Decher G. (1997). "Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites." Science **277**(5330): 1232-1237.
- [DES07] Descamps M., Hornez J. C. et Leriche A. (2007). "Effects of powder stoichiometry on the sintering of β -tricalcium phosphate." Journal of the European Ceramic Society **27**(6): 2401-2406.
- [DES03] Destainville A., Champion E., Bernache-Assollant D. et Laborde E. (2003). "Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate." Materials Chemistry and Physics **80**(1): 269-277.

- [DET10] Detsch R., Dieser I., Deisinger U., Uhl F., Hamisch S., Ziegler G. et Lipps G. (2010). "Biofunctionalization of dispense-plotted hydroxyapatite scaffolds with peptides: Quantification and cellular response." Journal of Biomedical Materials Research - Part A **92**(2): 493-503.
- [DIC74] Dickens B., Schroeder L. W. et Brown W. E. (1974). "Crystallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurity in β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. The crystal structure of pure β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$." Journal of Solid State Chemistry **10**(3): 232-248.
- [DOI98] Doi Y., Shibutani T., Moriwaki Y., Kajimoto T. et Iwayama Y. (1998). "Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes." Journal of Biomedical Materials Research **39**(4): 603-610.
- [DOR07] Dorozhkin S. V., Dorozhkina E. I., Oktar F. N. et Salman S. (2007). "A simplified preparation method of silicon-substituted calcium phosphates according to green chemistry principles." Key Engineering Materials **330-332 I**: 55-58.
- [DOR02] Dorozhkin S. V. et Epple M. (2002). "Biological and medical significance of calcium phosphates." Angewandte Chemie - International Edition **41**(17): 3130-3146.
- [DOS09] Dos Santos E. A., Farina M., Soares G. A. et Anselme K. (2009). "Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cell behavior." Journal of Biomedical Materials Research - Part A **89A**(2): 510-520.
- [DUB06] Dubruel P., Vanderleyden E., Bergadã M., De Paepe I., Chen H., Kuypers S., Luyten J., Schrooten J., Van Hoorebeke L. et Schacht E. (2006). "Comparative study of silanisation reactions for the biofunctionalisation of Ti-surfaces." Surface Science **600**(12): 2562-2571.
- [DUC93] Ducheyne P., Bianco P., Radin S. et Schepers E. (1993). Bioactive materials: Mechanisms and bioengineering considerations. In: Bone-bioactive biomaterials, Ducheyne P., Kokubo T. and Van Blitterswijk C. A. editors. Leiderdorp, The Netherlands, Reed Healthcare Communications: 1-12.
- [DUP96] Dupraz A. M. P., De Wijn J. R., Meer S. A. T. V. D. et De Groot K. (1996). "Characterization of silane-treated hydroxyapatite powders for use as filler in biodegradable composites." Journal of Biomedical Materials Research **30**(2): 231-238.
- [DUR04] Durrieu M. C., Pallu S., Guillemot F., Bareille R., Amédée J., Baquey C., Labrugre C. et Dard M. (2004). "Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **15**(7): 779-786.
- [EGU09] Egusa H., Kaneda Y., Akashi Y., Hamada Y., Matsumoto T., Saeki M., Thakor D. K., Tabata Y., Matsuura N. et Yatani H. (2009). "Enhanced bone regeneration via multimodal actions of synthetic peptide SVVYGLR on osteoprogenitors and osteoclasts." Biomaterials **30**(27): 4676-4686.
- [EK03] Ek S., Iiskola E. I., Niinistö L., Vaittinen J., Pakkanen T. T., Keränen J. et Auroux A. (2003). "Atomic layer deposition of a high-density aminopropylsiloxane network on silica through sequential reactions of γ -aminopropyltrialkoxysilanes and water." Langmuir **19**(25): 10601-10609.
- [ELL94] Elliot J. C. (1994). Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates, Ed. Elliot J.C., Elsevier Science, Amsterdam.
- [END05] Enderle R., Götz-Neunhoffer F., Göbbels M., Müller F. A. et Greil P. (2005). "Influence of magnesium doping on the phase transformation temperature of [beta]-TCP ceramics examined by Rietveld refinement." Biomaterials **26**(17): 3379-3384.
- [FAM94] Famery R., Richard N. et Boch P. (1994). "Preparation of β - and α -tricalcium phosphate ceramics, with and without magnesium addition." Ceramics International **20**(5): 327-336.
- [FIS25] Fiske C. H. et Subbarow Y. (1925). "The colorimetric determination of phosphorus." Journal of Biological Chemistry **66**(2): 375-400.
- [FOR09] Forget G. (2009). "Conception et synthèse de surfaces nanostructurées et/ou fonctionnalisées par des nanoparticules comme système de ciblage cellulaire." Thèse de Doctorat: Université Bordeaux 1.

- [FRA92] Franceschi R. T. et Iyer B. S. (1992). "Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells." Journal of Bone and Mineral Research **7**(2): 235-246.
- [FRA96] Fratzl P., Schreiber S. et Klaushofer K. (1996). "Bone mineralization as studied by small-angle x-ray scattering." Connective Tissue Research **34**(4): 247-254.
- [FRI95] Friesel R. E. et Maciag T. (1995). "Molecular mechanisms of angiogenesis: Fibroblast growth factor signal transduction." FASEB Journal **9**(10): 919-925.
- [FUR04] Furuzono T., Kishida A. et Tanaka J. (2004). "Nano-scaled hydroxyapatite/polymer composite I. Coating of sintered hydroxyapatite particles on poly(γ -methacryloxypropyl trimethoxysilane)- grafted silk fibroin fibers through chemical bonding." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **15**(1): 19-23.
- [GAN99] Ganss B., Kim R. H. et Sodek J. (1999). "Bone sialoprotein." Critical Reviews in Oral Biology and Medicine **10**(1): 79-98.
- [GEI05] Geiger F., Bertram H., Berger I., Lorenz H., Wall O., Eckhardt C., Simank H. G. et Richter W. (2005). "Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF₁₆₅-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects." Journal of Bone and Mineral Research **20**(11): 2028-2035.
- [GEI03] Geiger M., Li R. H. et Friess W. (2003). "Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2." Advanced Drug Delivery Reviews **55**(12): 1613-1629.
- [GHA06] Ghaith E. S., Kasuga T. et Nogami M. (2006). "Preparation of β -tricalcium phosphate containing silica by CO₂-laser-irradiation." Key Engineering Materials **309-311 II**: 779-782.
- [GIB99] Gibson I. R., Best S. M. et Bonfield W. (1999). "Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite." Journal of Biomedical Materials Research **44**(4): 422-428.
- [GIL09] Gillespie P., Wu G., Sayer M. et Stott M. J. (2009). "Si complexes in calcium phosphate biomaterials." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **21**(1): 99-108.
- [GLA04] Glaser A., Foisner J., Hoffmann H. et Friedbacher G. (2004). "Investigation of the role of the interplay between water and temperature on the growth of alkylsiloxane submonolayers on silicon." Langmuir **20**(13): 5599-5604.
- [GRE09] Grellier M., Granja P. L., Fricain J.-C., Bidarra S. J., Renard M., Bareille R., Bourget C., Amédée J. et Barbosa M. A. (2009). "The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect." Biomaterials **30**(19): 3271-3278.
- [GUO09] Guo H., Su J., Wei J., Kong H. et Liu C. (2009). "Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering." Acta Biomaterialia **5**(1): 268-278.
- [HAQ07] Haque S., Rehman I. et Darr J. A. (2007). "Synthesis and characterization of grafted nanohydroxyapatites using functionalized surface agents." Langmuir **23**(12): 6671-6676.
- [HAR00] Hardouin P., Anselme K., Flautre B., Bianchi F., Bascoulergue G. et Bouxin B. (2000). "Ingénierie tissulaire et maladies du squelette." Revue du Rhumatisme **67**(7): 498-504.
- [HAU01] Hausman M. R., Schaffler M. B. et Majeska R. J. (2001). "Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis." Bone **29**(6): 560-564.
- [HAU04] Hausser H. J. et Brenner R. E. (2004). "Low doses and high doses of heparin have different effects on osteoblast-like Saos-2 cells *in vitro*." Journal of Cellular Biochemistry **91**(5): 1062-1073.
- [HEN91] Hench L. L. (1991). "Bioceramics: From Concept to Clinic." Journal of the American Ceramic Society **74**(7): 1487-1510.
- [HEN98] Hench L. L. (1998). "Bioceramics." Journal of the American Ceramic Society **81**(7): 1705-1727.
- [HEN02] Hench L. L. et Polak J. M. (2002). "Third-Generation Biomedical Materials." Science **295**(5557): 1014-1017.
- [HEN08] Hennessy K. M., Clem W. C., Phipps M. C., Sawyer A. A., Shaikh F. M. et Bellis S. L. (2008). "The effect of RGD peptides on osseointegration of hydroxyapatite biomaterials." Biomaterials **29**(21): 3075-3083.

- [HER04] Herrera N. N., Letoffe J. M., Putaux J. L., David L. et Bourgeat-Lami E. (2004). "Aqueous dispersions of silane-functionalized laponite clay platelets. A first step toward the elaboration of water-based polymer/clay nanocomposites." Langmuir **20**(5): 1564-1571.
- [HEU77] Heughebaert J. C. (1977). "Contribution à l'étude de l'évolution des orthophosphates de calcium précipités amorphes en orthophosphates apatitiques." Thèse de Doctorat: Institut National Polytechnique de Toulouse.
- [HOL95] Holden J. L., Clement J. G. et Phakey P. P. (1995). "Age and temperature related changes to the ultrastructure and composition of human bone mineral." Journal of Bone and Mineral Research **10**(9): 1400-1409.
- [HON04] Hong Z., Qiu X., Sun J., Deng M., Chen X. et Jing X. (2004). "Grafting polymerization of L-lactide on the surface of hydroxyapatite nano-crystals." Polymer **45**(19): 6699-6706.
- [HOO01] Hooper A. E., Werho D., Hopson T. et Palmer O. (2001). "Evaluation of amine- and amide-terminated self-assembled monolayers as 'molecular glues' for Au and SiO₂ substrates." Surface and Interface Analysis **31**(9): 809-814.
- [HUA03] Huang H., Zhao Y., Liu Z., Zhang Y., Zhang H., Fu T. et Ma X. (2003). "Enhanced osteoblast functions on RGD immobilized surface." The Journal of oral implantology **29**(2): 73-79.
- [HUA04] Huang X., Jiang D. et Tan S. (2004). "Apatite Formation on the Surface of Wollastonite/Tricalcium Phosphate Composite Immersed in Simulated Body Fluid." Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials **69**(1): 70-72.
- [ISH93] Ishiyama M., Suiga M., Sasamoto K., Mizoguchi M. et He P. G. (1993). "A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye." Chemical and Pharmaceutical Bulletin **41**(6): 1118-1122.
- [ITO02] Itoh D., Yoneda S., Kuroda S., Kondo H., Umezawa A., Ohya K., Ohyama T. et Kasugai S. (2002). "Enhancement of osteogenesis on hydroxyapatite surface coated with synthetic peptide (EEEEEEPRGDT) *in vitro*." Journal of Biomedical Materials Research **62**(2): 292-298.
- [JAR81] Jarcho M. (1981). "Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics." Clinical Orthopaedics and Related Research **157**: 259-278.
- [JEO10] Jeong I., Yu H. S., Kim M. K., Jang J. H. et Kim H. W. (2010). "FGF2-adsorbed macroporous hydroxyapatite bone granules stimulate *in vitro* osteoblastic gene expression and differentiation." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **21**(4): 1335-1342.
- [JES03] Jessel N., Atalar F., Lavalley P., Mutterer J., Decher G., Schaaf P., Voegel J. C. et Ogier J. (2003). "Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins." Advanced Materials **15**(9): 692-695.
- [JES04] Jessel N., Lavalley P., Meyer F., Audouin F., Frisch B., Schaaf P., Ogier J., Decher G. et Voegel J. C. (2004). "Control of monocyte morphology on and response to model surfaces for implants equipped with anti-inflammatory agents." Advanced Materials **16**(17): 1507-1511.
- [JIA08] Jiang F., Zhang G., Hashimoto I., Kumar B. S., Bortolotto S., Morrison W. A. et Dusting G. J. (2008). "Neovascularization in an arterio-venous loop-containing tissue engineering chamber: Role of NADPH oxidase." Journal of Cellular and Molecular Medicine **12**(5B): 2062-2072.
- [JOH96] Johnson K. D., Frierson K. E., Keller T. S., Cook C., Scheinberg R., Zerwekh J., Meyers L. et Sciadini M. F. (1996). "Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: A biomechanical, histological, and radiographic analysis." Journal of Orthopaedic Research **14**(3): 351-369.
- [JUH08] Juhasz J. A., Best S. M., Auffret A. D. et Bonfield W. (2008). "Biological control of apatite growth in simulated body fluid and human blood serum." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **19**(4): 1823-1829.
- [JUN09] Jung J. Y., Hong Y. J., Choi Y. S., Jeong S. et Lee W. K. (2009). "A new method for the preparation of bioactive calcium phosphate films hybridized with 1 α ,25-

- dihydroxyvitamin D₃." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **20**(12): 2441-2453.
- [KAM08] Kamitakahara M., Kurauchi T., Tanihara M., Ioku K. et Ohtsuki C. (2008). "Synthesis of Si-containing tricalcium phosphate and its sintering behavior." Key Engineering Materials **361-363**: 59-62.
- [KAN10] Kannan S., Goetz-Neunhoeffler F., Neubauer J., Pina S., Torres P. M. C. et Ferreira J. M. F. (2010). "Synthesis and structural characterization of strontium- and magnesium-co-substituted β -tricalcium phosphate." Acta Biomaterialia **6**(2): 571-576.
- [KAR04] Kartsogiannis V. et Ng K. W. (2004). "Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology." Molecular and Cellular Endocrinology **228**(1-2): 79-102.
- [KAY64] Kay M. I., Young R. A. et Posner A. S. (1964). "Crystal structure of hydroxyapatite." Nature **204**(4963): 1050-1052.
- [KEE92] Keeting P. E., Oursler M. J., Wiegand K. E., Bonde S. K., Spelsberg T. C. et Riggs B. L. (1992). "Zeolite A increases proliferation, differentiation, and transforming growth factor β production in normal adult human osteoblast-like cells in vitro." Journal of Bone and Mineral Research **7**(11): 1281-1289.
- [KEM08] Kempen D. H. R., Lu L., Hefferan T. E., Creemers L. B., Maran A., Classic K. L., Dhert W. J. A. et Yaszemski M. J. (2008). "Retention of *in vitro* and *in vivo* BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering." Biomaterials **29**(22): 3245-3252.
- [KHO01] Khosla S. (2001). "Minireview: The OPG/RANKL/RANK system." Endocrinology **142**(12): 5050-5055.
- [KIL01] Kilpadi K. L., Chang P. L. et Bellis S. L. (2001). "Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel." Journal of Biomedical Materials Research **57**(2): 258-267.
- [KIM04] Kim H. M., Himeno T., Kawashita M., Kokubo T. et Nakamura T. (2004). "The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: An in vitro assessment." Journal of the Royal Society Interface **1**(1): 17-22.
- [KIM96] Kim H. M., Miyaji F., Kokubo T. et Nakamura T. (1996). "Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment." Journal of Biomedical Materials Research **32**(3): 409-417.
- [KIM09] Kim J., Seidler P., Wan L. S. et Fill C. (2009). "Formation, structure, and reactivity of amino-terminated organic films on silicon substrates." Journal of Colloid and Interface Science **329**(1): 114-119.
- [KOI05] Koike M., Shimokawa H., Kanno Z., Ohya K. et Soma K. (2005). "Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2." Journal of Bone and Mineral Metabolism **23**(3): 219-225.
- [KOK91] Kokubo T. (1991). "Bioactive glass ceramics: properties and applications." Biomaterials **12**(2): 155-163.
- [KOK96] Kokubo T. (1996). "Formation of biologically active bone-like apatite on metals and polymers by a biomimetic process." Thermochimica Acta **280-281**(SPEC. ISS.): 479-490.
- [KOK04] Kokubo T., Kim H. M., Kawashita M. et Nakamura T. (2004). "Bioactive metals: Preparation and properties." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **15**(2): 99-107.
- [KOK90] Kokubo T., Kushitani H., Sakka S., Kitsugi T. et Yamamuro T. (1990). "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W³." Journal of Biomedical Materials Research **24**(6): 721-734.
- [KOK06] Kokubo T. et Takadama H. (2006). "How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?" Biomaterials **27**(15): 2907-2915.
- [KRE67] Kreidler E. R. et Hummel F. A. (1967). "Phase equilibria in the system Ca₃(PO₄)₂-Zn₃(PO₄)₂." Inorganic Chemistry **6**(3): 524-528.
- [LAN96] Landis W. J., Hodgens K. J., Arena J., Song M. J. et McEwen B. F. (1996). "Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography." Microscopy Research and Technique **33**(2): 192-202.

- [LAN86] Landis W. J., Lee D. D. et Brenna J. T. (1986). "Detection and localization of silicon and associated elements in vertebrate bone tissue by imaging ion microscopy." Calcified Tissue International **38**(1): 52-59.
- [LAN01] Langstaff S., Sayer M., Smith T. J. N. et Pugh S. M. (2001). "Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part II: evaluation of biological response." Biomaterials **22**(2): 135-150.
- [LAN99] Langstaff S., Sayer M., Smith T. J. N., Pugh S. M., Hesp S. A. M. et Thompson W. T. (1999). "Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part I: Rational design, sample preparation and material characterization." Biomaterials **20**(18): 1727-1741.
- [LEC97] Lecanda F., Avioli L. V. et Cheng S. L. (1997). "Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2." Journal of Cellular Biochemistry **67**(3): 386-398.
- [LEE10] Lee J. S. et Murphy W. L. (2010). "Modular peptides promote human mesenchymal stem cell differentiation on biomaterial surfaces." Acta Biomaterialia **6**(1): 21-28.
- [LEG69] LeGeros R. Z., Trautz O. R., Klein E. et LeGeros J. P. (1969). "Two types of carbonate substitution in the apatite structure." Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS) **25**(1): 5-7.
- [LEG92] Legrand C., Bour J. M., Jacob C., Capiaumont J., Martial A., Marc A., Wudtke M., Kretzmer G., Demangel C., Duval D. et Hache J. (1992). "Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker." Journal of Biotechnology **25**(3): 231-243.
- [LEG07] Leguen E., Chassepot A., Decher G., Schaaf P., Voegel J.-C. et Jessel N. (2007). "Bioactive coatings based on polyelectrolyte multilayer architectures functionalized by embedded proteins, peptides or drugs." Biomolecular Engineering **24**(1): 33-41.
- [LEI07] Lei Y., Rai B., Ho K. H. et Teoh S. H. (2007). "In vitro degradation of novel bioactive polycaprolactone-20% tricalcium phosphate composite scaffolds for bone engineering." Materials Science and Engineering C **27**(2): 293-298.
- [LI93] Li P., Ohtsuki C., Kokubo T., Nakanishi K., Soga N., Nakamura T. et Yamamuro T. (1993). "Process of formation of bone-like apatite layer on silica gel." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **4**(2): 127-131.
- [LI06] Li X. W., Yasuda H. Y. et Umakoshi Y. (2006). "Bioactive ceramic composites sintered from hydroxyapatite and silica at 1200°C: Preparation, microstructures and *in vitro* bone-like layer growth." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **17**(6): 573-581.
- [LIE02] Lieberman J. R., Daluiski A. et Einhorn T. A. (2002). "The role of growth factors in the repair of bone biology and clinical applications." Journal of Bone and Joint Surgery - Series A **84**(6): 1032-1044.
- [LIN98] Lin F. H., Liao C. J., Chen K. S. et Sun J. S. (1998). "Preparation of high-temperature stabilized β -tricalcium phosphate by heating deficient hydroxyapatite with $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ addition." Biomaterials **19**(11-12): 1101-1107.
- [LIU07] Liu Y., He T., Song H. et Gao C. (2007). "Layer-by-layer assembly of biomacromolecules on poly(ethylene terephthalate) films and fiber fabrics to promote endothelial cell growth." Journal of Biomedical Materials Research - Part A **81**(3): 692-704.
- [LIU09] Liu Y. L., De Groot K. et Hunziker E. B. (2009). "Biomimetic mineral coatings in dental and orthopaedic implantology." Frontiers of Materials Science in China **3**(2): 154-162.
- [LOG05] Logothetis C. J. et Lin S. H. (2005). "Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone." Nature Reviews Cancer **5**(1): 21-28.
- [LU00] Lu H. B., Campbell C. T., Graham D. J. et Ratner B. D. (2000). "Surface characterization of hydroxyapatite and related calcium phosphates by XPS and TOF-SIMS." Analytical Chemistry **72**(13): 2886-2894.
- [MA07] Ma L., Zhou J., Gao C. et Shen J. (2007). "Incorporation of basic fibroblast growth factor by a layer-by-layer assembly technique to produce bioactive substrates." Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials **83**(1): 285-292.

- [MAR05] Marchat D. (2005). "Fixation du cadmium par une hydroxyapatite phosphocalcique - Etude cinétique et thermodynamique." Thèse de Doctorat: Université de Limoges.
- [MAR01-a] Marie P. (2001). "Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste." Medecine/Sciences **17**(12): 1252-1259.
- [MAR01-b] Marie P. J., Ammann P., Boivin G. et Rey C. (2001). "Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone." Calcified Tissue International **69**(3): 121-129.
- [MAS08] Massie I., Skakle J. M. S. et Gibson I. R. (2008). "Synthesis and phase stability of silicate-substituted alpha-tricalcium phosphate." Key Engineering Materials **361-363 I**: 67-70.
- [MAS06] Mastrogiacomo M., Corsi A., Francioso E., Di Comite M., Monetti F., Scaglione S., Favia A., Crovace A., Bianco P. et Cancedda R. (2006). "Reconstruction of extensive long bone defects in sheep using resorbable bioceramics based on silicon stabilized tricalcium phosphate." Tissue Engineering **12**(5): 1261-1273.
- [MAS07] Mastrogiacomo M., Papadimitropoulos A., Cedola A., Peyrin F., Giannoni P., Pearce S. G., Alini M., Giannini C., Guagliardi A. et Cancedda R. (2007). "Engineering of bone using bone marrow stromal cells and a silicon-stabilized tricalcium phosphate bioceramic: Evidence for a coupling between bone formation and scaffold resorption." Biomaterials **28**(7): 1376-1384.
- [MAT77] Mathew M., Schroeder L. W., Dickens B. et Brown W. E. (1977). "The crystal structure of $[\alpha]\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$." Acta Crystallographica Section B **33**(5): 1325-1333.
- [MAT03] Matsuda A., Furuzono T., Walsh D., Kishida A. et Tanaka J. (2003). "Surface modification of a porous hydroxyapatite to promote bonded polymer coatings." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **14**(11): 973-978.
- [MAT09-a] Matsumoto N., Sato K., Yoshida K., Hashimoto K. et Toda Y. (2009). "Preparation and characterization of β -tricalcium phosphate co-doped with monovalent and divalent antibacterial metal ions." Acta Biomaterialia **5**(8): 3157-3164.
- [MAT09-b] Matsumoto N., Yoshida K., Hashimoto K. et Toda Y. (2009). "Thermal stability of β -tricalcium phosphate doped with monovalent metal ions." Materials Research Bulletin **44**(9): 1889-1894.
- [MAT07] Matsuo Y., Nishino Y., Fukutsuka T. et Sugie Y. (2007). "Introduction of amino groups into the interlayer space of graphite oxide using 3-aminopropylethoxysilanes." Carbon **45**(7): 1384-1390.
- [MAY08] Mayer I., Cohen S., Gdalya S., Burghaus O. et Reinen D. (2008). "Crystal structure and EPR study of Mn-doped β -tricalcium phosphate." Materials Research Bulletin **43**(2): 447-452.
- [MAY09] Mayer I., Gdalya S., Burghaus O. et Reinen D. (2009). "A spectroscopic and structural study of $M(3d)^{2+}$ -doped β -tricalcium phosphate - the binding properties of Ni^{2+} and Cu^{2+} in the pseudo-octahedral $\text{Ca}(5)\text{O}_6$ host-sites." Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie **635**(12): 2039-2045.
- [MCQ95] McQuillan D. J., Richardson M. D. et Bateman J. F. (1995). "Matrix deposition by a calcifying human osteogenic sarcoma cell line (SAOS-2)." Bone **16**(4): 415-426.
- [MOO74] Moorehead W. R. et Biggs H. G. (1974). "2-Amino-2-methyl-1-propanol as the alkalizing agent in an improved continuous-flow cresolphthalein complexone procedure for calcium in serum." Clinical Chemistry **20**(11): 1458-1460.
- [MOR89] Mortier A., Lemaitre J. et Rouxhet P. G. (1989). "Temperature-programmed characterization of synthetic calcium-deficient phosphate apatites." Thermochemica Acta **143**(C): 265-282.
- [MUL87] Mullis K. B., Faloona F. A. et Ray W. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: Methods in Enzymology, Academic Press. **Volume 155**: 335-350.
- [MUT05] Mutin P. H., Guerrero G. et Vioux A. (2005). "Hybrid materials from organophosphorus coupling molecules." Journal of Materials Chemistry **15**(35-36): 3761-3768.
- [NAK06] Nakashima K. et Yamauchi J. (2006). "Magnetic properties of gadolinium-doped β -tricalcium phosphate." Journal of Alloys and Compounds **408-412**: 761-765.

- [NAN98] Nanci A., Wuest J. D., Peru L., Brunet P., Sharma V., Zalzal S. et McKee M. D. (1998). "Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules." Journal of Biomedical Materials Research **40**(2): 324-335.
- [NEJ09] Nejati E., Firouzidor V., Eslaminejad M. B. et Bagheri F. (2009). "Needle-like nano hydroxyapatite/poly(l-lactide acid) composite scaffold for bone tissue engineering application." Materials Science and Engineering: C **29**(3): 942-949.
- [NI07] Ni S., Chang J., Chou L. et Zhai W. (2007). "Comparison of osteoblast-like cell responses to calcium silicate and tricalcium phosphate ceramics *in vitro*." Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials **80**(1): 174-183.
- [NIN05] Ning C. Q., Mehta J. et El-Ghannam A. (2005). "Effects of silica on the bioactivity of calcium phosphate composites *in vitro*." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **16**(4): 355-360.
- [NUR59] Nurse R. W., Welch J. H. et Gutt W. (1959). "High-temperature phase equilibria in the system dicalcium silicate - tricalcium phosphate." Journal of the Chemical Society (Resumed): 1077-1083.
- [OH02] Oh S. J., Cho S. J., Kim C. O. et Park J. W. (2002). "Characteristics of DNA microarrays fabricated on various aminosilane layers." Langmuir **18**(5): 1764-1769.
- [OKA98] Okamoto K., Matsuura T., Hosokawa R. et Akagawa Y. (1998). "RGD peptides regulate the specific adhesion scheme of osteoblasts to hydroxyapatite but not to titanium." Journal of Dental Research **77**(3): 481-487.
- [OTS99] Otsuka E., Yamaguchi A., Hirose S. et Hagiwara H. (1999). "Characterization of osteoblastic differentiation of stromal cell line ST2 that is induced by ascorbic acid." American Journal of Physiology - Cell Physiology **277**(1 46-1).
- [OYA03] Oyane A., Kim H. M., Furuya T., Kokubo T., Miyazaki T. et Nakamura T. (2003). "Preparation and assessment of revised simulated body fluids." Journal of Biomedical Materials Research - Part A **65**(2): 188-195.
- [PAL07] Palard M. (2007). "Synthèse et frittage d'hydroxyapatites phosphocalciques silicatées." Thèse de Doctorat: Université de Limoges.
- [PAL08] Palard M., Champion E. et Foucaud S. (2008). "Synthesis of silicated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$." Journal of Solid State Chemistry **181**(8): 1950-1960.
- [PAL09-a] Palard M., Combes J., Champion E., Foucaud S., Rattner A. et Bernache-Assollant D. (2009). "Effect of silicon content on the sintering and biological behaviour of $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ ceramics." Acta Biomaterialia **5**(4): 1223-1232.
- [PAL09-b] Pallu S., Fricain J. C., Bareille R., Bourget C., Dard M., Sewing A. et Amédée J. (2009). "Cyclo-DfKRG peptide modulates *in vitro* and *in vivo* behavior of human osteoprogenitor cells on titanium alloys." Acta Biomaterialia **5**(9): 3581-3592.
- [PAP07] Papadimitropoulos A., Mastrogiacomo M., Peyrin F., Molinari E., Komlev V. S., Rustichelli F. et Cancedda R. (2007). "Kinetics of *in vivo* bone deposition by bone marrow stromal cells within a resorbable porous calcium phosphate scaffold: An X-ray computed microtomography study." Biotechnology and Bioengineering **98**(1): 271-281.
- [PAR02] Park S. W., Kim Y. I., Chung K. H., Hong S. I. et Kim S. W. (2002). "Covalent immobilization of GL-7-ACA acylase on silica gel through silanization." Reactive and Functional Polymers **51**(2-3): 79-92.
- [PAS08] Pasternack R. M., Amy S. R. et Chabal Y. J. (2008). "Attachment of 3-(aminopropyl)triethoxysilane on silicon oxide surfaces: Dependence on solution temperature." Langmuir **24**(22): 12963-12971.
- [PAT02] Patel N., Best S. M., Bonfield W., Gibson I. R., Hing K. A., Damien E. et Revell P. A. (2002). "A comparative study on the *in vivo* behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **13**(12): 1199-1206.
- [PER00] Perez-Pariante J., Balas F. et Vallet-Regi M. (2000). "Surface and chemical study of $\text{SiO}_2\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot\text{CaO}\cdot(\text{MgO})$ bioactive glasses." Chemistry of Materials **12**(3): 750-755.
- [PIE07] Pietak A. M., Reid J. W., Stott M. J. et Sayer M. (2007). "Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics." Biomaterials **28**(28): 4023-4032.
- [PLU82] Plueddemann E. P. (1982). Silane Coupling Agents, Ed. Plenum, New York.

- [POR04-a] Porté-Durrieu M. C., Guillemot F., Pallu S., Labrugère C., Brouillaud B., Bareille R., Amédée J., Barthe N., Dard M. et Baquey C. (2004). "Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti-6Al-4V: Physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion." Biomaterials **25**(19): 4837-4846.
- [POR99] Porté-Durrieu M. C., Labrugère C., Villars F., Lefebvre F., Dutoya S., Guette A., Bordenave L. et Baquey C. (1999). "Development of RGD peptides grafted onto silica surfaces: XPS characterization and human endothelial cell interactions." Journal of Biomedical Materials Research **46**(3): 368-375.
- [POR04-b] Porter A. E., Botelho C. M., Lopes M. A., Santos J. D., Best S. M. et Bonfield W. (2004). "Ultrastructural comparison of dissolution and apatite precipitation on hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite in vitro and in vivo." Journal of Biomedical Materials Research - Part A **69**(4): 670-679.
- [POR03] Porter A. E., Patel N., Skepper J. N., Best S. M. et Bonfield W. (2003). "Comparison of *in vivo* dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics." Biomaterials **24**(25): 4609-4620.
- [POR04-c] Porter A. E., Patel N., Skepper J. N., Best S. M. et Bonfield W. (2004). "Effect of sintered silicate-substituted hydroxyapatite on remodelling processes at the bone-implant interface." Biomaterials **25**(16): 3303-3314.
- [PRA03] Pratap J., Galindo M., Zaidi S. K., Vradii D., Bhat B. M., Robinson J. A., Choi J. Y., Komori T., Stein J. L., Lian J. B., Stein G. S. et Van Wijnen A. J. (2003). "Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts." Cancer Research **63**(17): 5357-5362.
- [QIU05-a] Qiu X., Chen L., Junli H., Sun J., Hong Z., Liu A., Chen X. et Jing X. (2005). "Surface-modified hydroxyapatite linked by L-lactic acid oligomer in the absence of catalyst." Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry **43**(21): 5177-5185.
- [QIU05-b] Qiu X., Hong Z., Hu J., Chen L., Chen X. et Jing X. (2005). "Hydroxyapatite surface modified by L-lactic acid and its subsequent grafting polymerization of L-lactide." Biomacromolecules **6**(3): 1193-1199.
- [RAD93] Radin S. R. et Ducheyne P. (1993). "The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. II. Precipitation." Journal of Biomedical Materials Research **27**(1): 35-45.
- [RAD99] Radomsky M. L., Aufdemorte T. B., Swain L. D., Fox W. C., Spiro R. C. et Poser J. W. (1999). "Novel formulation of fibroblast growth factor-2 in a hyaluronan gel accelerates fracture healing in nonhuman primates." Journal of Orthopaedic Research **17**(4): 607-614.
- [RAW08] Rawal A., Wei X., Akinc M. et Schmidt-Rohr K. (2008). "Dispersion of silicate in tricalcium phosphate elucidated by solid-state NMR." Chemistry of Materials **20**(7): 2583-2591.
- [RAY01] Raynaud S., Champion E., Bernache-Assollant D. et Laval J. P. (2001). "Determination of calcium/phosphorus atomic ratio of calcium phosphate apatites using X-ray diffractometry." Journal of the American Ceramic Society **84**(2): 359-366.
- [REF03] Reffitt D. M., Ogston N., Jugdaohsingh R., Cheung H. F. J., Evans B. A. J., Thompson R. P. H., Powell J. J. et Hampson G. N. (2003). "Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro." Bone **32**(2): 127-135.
- [REG05] Reginster J. Y., Seeman E., De Vernejoul M. C., Adami S., Compston J., Phenekos C., Devogelaer J. P., Curiel M. D., Sawicki A., Goemaere S., Sorensen O. H., Felsenberg D. et Meunier P. J. (2005). "Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **90**(5): 2816-2822.
- [REI05] Reid J. W., Pietak A., Sayer M., Dunfield D. et Smith T. J. N. (2005). "Phase formation and evolution in the silicon substituted tricalcium phosphate/apatite system." Biomaterials **26**(16): 2887-2897.
- [REI06] Reid J. W., Tuck L., Sayer M., Fargo K. et Hendry J. A. (2006). "Synthesis and characterization of single-phase silicon-substituted α -tricalcium phosphate." Biomaterials **27**(15): 2916-2925.

- [REN09] Ren S., Zhao X., Zhao L., Yuan M., Yu Y., Guo Y. et Wang Z. (2009). "Preparation of porous TiO₂/silica composites without any surfactants." Journal of Solid State Chemistry **182**(2): 312-316.
- [RET98] Retta S. F., Balzac F., Ferraris P., Belkin A. M., Fässler R., Humphries M. J., De Leo G., Silengo L. et Tarone G. (1998). "β-Integrin cytoplasmic subdomains involved in dominant negative function." Molecular Biology of the Cell **9**(4): 715-731.
- [REY89] Rey C., Collins B., Goehl T., Dickson I. R. et Glimcher M. J. (1989). "The carbonate environment in bone mineral: A resolution-enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy study." Calcified Tissue International **45**(3): 157-164.
- [REZ99] Rezanian A., Johnson R., Lefkow A. R. et Healy K. E. (1999). "Bioactivation of metal oxide surfaces. 1. Surface characterization and cell response." Langmuir **15**(20): 6931-6939.
- [RIB73] Riboud P. V. (1973). "Composition et stabilité des phases à structure d'apatite dans le système CaO-P₂O₅-oxyde de fer-H₂O à haute température." Annales de Chimie (Cachan, France) **8**: 381-388.
- [RUN93] Rungby J., Kassem M., Eriksen E. F. et Danscher G. (1993). "The von Kossa reaction for calcium deposits: Silver lactate staining increases sensitivity and reduces background." Histochemical Journal **25**(6): 446-451.
- [RUO87] Ruoslahti E. et Pierschbacher M. D. (1987). "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins." Science **238**(4826): 491-497.
- [RYA99] Ryan L. M., Cheung H. S., LeGeros R. Z., Kurup I. V., Toth J., Westfall P. R. et McCarthy G. M. (1999). "Cellular responses to whitlockite." Calcified Tissue International **65**(5): 374-377.
- [RYU02] Ryu H. S., Youn H. J., Sun Hong K., Chang B. S., Lee C. K. et Chung S. S. (2002). "An improvement in sintering property of β-tricalcium phosphate by addition of calcium pyrophosphate." Biomaterials **23**(3): 909-914.
- [SAD09] Sader M. S., Legeros R. Z. et Soares G. A. (2009). "Human osteoblasts adhesion and proliferation on magnesium-substituted tricalcium phosphate dense tablets." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **20**(2): 521-527.
- [SAW07] Sawyer A. A., Hennessy K. M. et Bellis S. L. (2007). "The effect of adsorbed serum proteins, RGD and proteoglycan-binding peptides on the adhesion of mesenchymal stem cells to hydroxyapatite." Biomaterials **28**(3): 383-392.
- [SAY03] Sayer M., Stratilatov A. D., Reid J., Calderin L., Stott M. J., Yin X., MacKenzie M., Smith T. J. N., Hendry J. A. et Langstaff S. D. (2003). "Structure and composition of silicon-stabilized tricalcium phosphate." Biomaterials **24**(3): 369-382.
- [SCH02] Schaaf P. et Voegel J. C. (2002). "Bioactive films for biomaterials coating and aimed for tissue engineering: New original ways?" Pathologie Biologie **50**(3): 189-193.
- [SCH77] Schroeder L. W., Dickens B. et Brown W. E. (1977). "Crystallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurity in β-Ca₃(PO₄)₂. II. Refinement of Mg-containing β-Ca₃(PO₄)₂." Journal of Solid State Chemistry **22**(3): 253-262.
- [SCH09] Schuessel A., Mayr H., Tessmar J. et Goepferich A. (2009). "Enhanced bone morphogenetic protein-2 performance on hydroxyapatite ceramic surfaces." Journal of Biomedical Materials Research - Part A **90**(4): 959-971.
- [SCO76] Scofield J. H. (1976). "Hartree-Slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV." Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena **8**(2): 129-137.
- [SHE08] Shen Y. H., Shoichet M. S. et Radisic M. (2008). "Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells." Acta Biomaterialia **4**(3): 477-489.
- [SIL07] Sila-Asna M., Bunyaratvej A., Maeda S., Kitaguchi H. et Bunyaratavej N. (2007). "Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell." Kobe Journal of Medical Sciences **53**(1): 25-35.
- [SIL10] Silva H. M. d., Mateescu M., Ponche A., Damia C., Champion E., Soares G. et Anselme K. (2010). "Surface transformation of silicon-doped hydroxyapatite immersed in culture medium under dynamic and static conditions." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **75**(1): 349-355.

- [SIM05] Simon Jr C. G., Antonucci J. M., Liu D. W. et Skrtic D. (2005). "In vitro cytotoxicity of amorphous calcium phosphate composites." Journal of Bioactive and Compatible Polymers **20**(3): 279-295.
- [SIM97] Simonet W. S., Lacey D. L., Dunstan C. R., Kelley M., Chang M. S., Lüthy R., Nguyen H. Q., Wooden S., Bennett L., Boone T., Shimamoto G., DeRose M., Elliott R., Colombero A., Tan H. L., Trall G., Sullivan J., Davy E., Bucay N., Renshaw-Gegg L., Hughes T. M., Hill D., Pattison W., Campbell P., Sander S., Van G., Tarpley J., Derby P., Lee R. et Boyle W. J. (1997). "Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density." Cell **89**(2): 309-319.
- [SOP09] Sopyan I. et Natasha A. N. (2009). "Preparation of nanostructured manganese-doped biphasic calcium phosphate powders *via* sol-gel method." Ionics **15**(6): 735-741.
- [STR90] Strauss P. G., Closs E. I., Schmidt J. et Erfle V. (1990). "Gene expression during osteogenic differentiation in mandibular condyles in vitro." J. Cell Biol. **110**(4): 1369-1378.
- [STR02] Street J., Bao M., DeGuzman L., Bunting S., Peale Jr F. V., Ferrara N., Steinmetz H., Hoeffel J., Cleland J. L., Daugherty A., Van Bruggen N., Redmond H. P., Carano R. A. D. et Filvaroff E. H. (2002). "Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(15): 9656-9661.
- [SUD83] Sudo H., Kodama H. A. et Amagai Y. (1983). "In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria." Journal of Cell Biology **96**(1): 191-198.
- [TAB99-a] Tabata Y. et Ikada Y. (1999). "Vascularization effect of basic fibroblast growth factor released from gelatin hydrogels with different biodegradabilities." Biomaterials **20**(22): 2169-2175.
- [TAB99-b] Tabata Y., Yamada K., Hong L., Miyamoto S., Hashimoto N. et Ikada Y. (1999). "Skull bone regeneration in primates in response to basic fibroblast growth factor." Journal of Neurosurgery **91**(5): 851-856.
- [TAK04] Takadama H., Hashimoto M., Mizuno M. et Kokubo T. (2004). "Round-robin test of SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials." Phosphorus Research Bulletin **17**: 119-125.
- [TAK05] Takahashi Y., Yamamoto M. et Tabata Y. (2005). "Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from biodegradable sponge composed of gelatin and β -tricalcium phosphate." Biomaterials **26**(23): 4856-4865.
- [TAN97] Tanahashi M. et Matsuda T. (1997). "Surface functional group dependence on apatite formation on self- assembled monolayers in a simulated body fluid." Journal of Biomedical Materials Research **34**(3): 305-315.
- [TAR02] Tarnowski C. P., Igelzi Jr M. A. et Morris M. D. (2002). "Mineralization of developing mouse calvaria as revealed by raman microspectroscopy." Journal of Bone and Mineral Research **17**(6): 1118-1126.
- [TET99] Tétard F., Bernache-Assollant D. et Champion E. (1999). "Pre-eutectic densification of calcium carbonate doped with lithium carbonate." Journal of Thermal Analysis and Calorimetry **56**(3): 1461-1473.
- [THI06-a] Thian E. S., Huang J., Best S. M., Barber Z. H. et Bonfield W. (2006). "Novel silicon-doped hydroxyapatite (Si-HA) for biomedical coatings: An in vitro study using acellular simulated body fluid." Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials **76**(2): 326-333.
- [THI06-b] Thian E. S., Huang J., Vickers M. E., Best S. M., Barber Z. H. et Bonfield W. (2006). "Silicon-substituted hydroxyapatite (SiHA): A novel calcium phosphate coating for biomedical applications." Journal of Materials Science **41**(3): 709-717.
- [THI85] Thiery J. P., Duband J. L. et Tucker G. C. (1985). "Cell migration in the vertebrate embryo: role of cell adhesion and tissue environment in pattern formation." Annual review of cell biology **1**: 91-113.
- [TOR07] Tortora G. J. et Derrickson B. (2007). Principes d'anatomie et de physiologie, Ed. Boeck De, 4e édition, Bruxelles.

- [TUC08] Tuck L., Astala R., Reid J. W., Sayer M. et Stott M. J. (2008). "Dissolution and re-crystallization processes in multiphase silicon stabilized tricalcium phosphate." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **19**(2): 917-927.
- [VAL05] Vallet-Regi M. et Arcos D. (2005). "Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants." Journal of Materials Chemistry **15**(15): 1509-1516.
- [VAL04] Vallet-Regi M., Pena J. et Izquierdo-Barba I. (2004). "Synthesis of β -tricalcium phosphate in layered or powdered forms for biomedical applications." Solid State Ionics **172**(1-4 SPEC. ISS.): 445-449.
- [VAS08] Vasiliev A. N., Zlotnikov E., Khinast J. G. et Riman R. E. (2008). "Chemisorption of silane compounds on hydroxyapatites of various morphologies." Scripta Materialia **58**(12): 1039-1042.
- [VER09] Verné E., Vitale-Brovarone C., Bui E., Bianchi C. L. et Boccaccini A. R. (2009). "Surface functionalization of bioactive glasses." Journal of Biomedical Materials Research - Part A **90**(4): 981-992.
- [WAN08] Wang V., Misra G. et Amsden B. (2008). "Immobilization of a bone and cartilage stimulating peptide to a synthetic bone graft." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **19**(5): 2145-2155.
- [WEI05] Wei X. et Akinc M. (2005). "Resorption rate tunable bioceramic: Si&Zn-modified tricalcium phosphate." Ceram. Eng. Sci. Proc. **26**: 129-136.
- [WEI05] Wei X. et Akinc M. (2005). "Resorption rate tunable bioceramics: Si&Zn-modified tricalcium phosphate." Ceram. Eng. Sci. Proc. **26**: 129-136.
- [WEI07-a] Wei X. et Akinc M. (2007). "Crystal structure analysis of Si- and Zn-codoped tricalcium phosphate by neutron powder diffraction." Journal of the American Ceramic Society **90**(9): 2709-2715.
- [WEI07-b] Wei X., Ugurlu O. et Akinc M. (2007). "Hydrolysis of α -tricalcium phosphate in simulated body fluid and dehydration behavior during the drying process." Journal of the American Ceramic Society **90**(8): 2315-2321.
- [WEI09] Wei X., Ugurlu O., Ankit A., Acar H. Y. et Akinc M. (2009). "Dissolution behavior of Si,Zn-codoped tricalcium phosphates." Materials Science and Engineering C **29**(1): 126-135.
- [WEI88] Weiser M. et De Jonghe L. (1988). "Inclusion Size and Sintering of Composite Powders." Journal of the American Ceramic Society **71**(3): 125-127.
- [WHE05] Wheeler P. A., Wang J., Baker J. et Mathias L. J. (2005). "Synthesis and characterization of covalently functionalized laponite clay." Chemistry of Materials **17**(11): 3012-3018.
- [WIL87] Williams D. F. (1987). "Tissue-biomaterial interactions." Journal of Materials Science **22**(10): 3421-3445.
- [WOJ10] Wojtowicz A. M., Shekaran A., Oest M. E., Dupont K. M., Templeman K. L., Hutmacher D. W., Guldborg R. E. et Garcia A. J. (2010). "Coating of biomaterial scaffolds with the collagen-mimetic peptide GFOGER for bone defect repair." Biomaterials **31**(9): 2574-2582.
- [WOO07] Woo K. M., Seo J., Zhang R. et Ma P. X. (2007). "Suppression of apoptosis by enhanced protein adsorption on polymer/hydroxyapatite composite scaffolds." Biomaterials **28**(16): 2622-2630.
- [WOZ02] Wozney J. M. (2002). "Overview of bone morphogenetic proteins." Spine **27**(16 SUPPL.).
- [XIA02] Xia N., Hu Y., Grainger D. W. et Castner D. G. (2002). "Functionalized poly(ethylene glycol)-grafted polysiloxane monolayers for control of protein binding." Langmuir **18**(8): 3255-3256.
- [XIA98] Xiao S. J., Textor M., Spencer N. D. et Sigrist H. (1998). "Covalent attachment of cell-adhesive, (Arg-Gly-Asp)-containing peptides to titanium surfaces." Langmuir **14**(19): 5507-5516.
- [XU07-a] Xu A. W., Ma Y. et Cölfen H. (2007). "Biomimetic mineralization." Journal of Materials Chemistry **17**(5): 415-449.

- [XU07-b] Xu J. L. et Khor K. A. (2007). "Chemical analysis of silica doped hydroxyapatite biomaterials consolidated by a spark plasma sintering method." Journal of Inorganic Biochemistry **101**(2): 187-195.
- [XU07-c] Xu X., Chen X., Liu A., Hong Z. et Jing X. (2007). "Electrospun poly(l-lactide)-grafted hydroxyapatite/poly(l-lactide) nanocomposite fibers." European Polymer Journal **43**(8): 3187-3196.
- [XUE08] Xue W., Dahlquist K., Banerjee A., Bandyopadhyay A. et Bose S. (2008). "Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with Zn and Mg based dopants." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **19**(7): 2669-2677.
- [XYN00] Xynos I. D., Edgar A. J., Buttery L. D. K., Hench L. L. et Polak J. M. (2000). "Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis." Biochemical and Biophysical Research Communications **276**(2): 461-465.
- [YAM00] Yamaguchi A., Komori T. et Suda T. (2000). "Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1." Endocrine Reviews **21**(4): 393-411.
- [YAN08] Yang W. Z., Zhou D. L., Yin G. F. et Li G. D. (2008). "Surface modification of biphasic calcium phosphate bioceramic powders." Applied Surface Science **255**(2): 477-479.
- [YAS03] Yashima M., Sakai A., Kamiyama T. et Hoshikawa A. (2003). "Crystal structure analysis of β -tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ by neutron powder diffraction." Journal of Solid State Chemistry **175**(2): 272-277.
- [YIN05] Yin X. et Stott M. J. (2005). "Theoretical insights into bone grafting silicon-stabilized α -tricalcium phosphate." Journal of Chemical Physics **122**(2): 1-9.
- [YON10] Yonamine Y., Matsuyama T., Sonomura T., Takeuchi H., Furuichi Y., Uemura M., Izumi Y. et Noguchi K. (2010). "Effectable application of vascular endothelial growth factor to critical sized rat calvaria defects." Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology **109**(2): 225-231.
- [YOS06] Yoshida K., Hyuga H., Kondo N., Kita H., Sasaki M., Mitamura M., Hashimoto K. et Toda Y. (2006). "Substitution model of monovalent (Li, Na, and K), divalent (Mg), and trivalent (Al) metal ions for β -tricalcium phosphate." Journal of the American Ceramic Society **89**(2): 688-690.
- [YOS05] Yoshida K., Kondo N., Kita H., Mitamura M., Hashimoto K. et Toda Y. (2005). "Effect of substitutional monovalent and divalent metal ions on mechanical properties of β -tricalcium phosphate." Journal of the American Ceramic Society **88**(8): 2315-2318.
- [YUA97] Yuan W. et van Ooij W. J. (1997). "Characterization of Organofunctional Silane Films on Zinc Substrates." Journal of Colloid and Interface Science **185**(1): 197-209.
- [ZHA08] Zhao C. X. et Zhang W. D. (2008). "Preparation of waterborne polyurethane nanocomposites: Polymerization from functionalized hydroxyapatite." European Polymer Journal **44**(7): 1988-1995.
- [ZHU03] Zhu Y., Gao C., He T., Liu X. et Shen J. (2003). "Layer-by-layer assembly to modify poly(L-lactic acid) surface toward improving its cytocompatibility to human endothelial cells." Biomacromolecules **4**(2): 446-452.
- [ZOU08] Zou C., Weng W., Cheng K., Du P., Shen G. et Han G. (2008). "Preparation of nanosized β -tricalcium phosphate particles with Zn substitution." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **19**(3): 1133-1136.
- [ZUR05] Zurlinden K., Laub M. et Jennissen H. P. (2005). "Chemical functionalization of a hydroxyapatite based bone replacement material for the immobilization of proteins." Materialwissenschaft und Werkstofftechnik **36**(12): 820-827.

Mots Clés : Substituts osseux ; Phosphate de calcium silicaté ; Synthèse de poudre ; Frittage ; Evaluation biologique ; Fonctionnalisation

Résumé

La préparation de céramiques phosphocalciques dopées au silicium (Si) a été étudiée sur la base de la formule hypothétique $\text{Ca}_{3-x}(\text{PO}_4)_{2-2x}(\text{SiO}_4)_x$ du phosphate tricalcique partiellement substitué par des groupements silicates. Des poudres d'apatite déficitaire en calcium ont été synthétisées en présence de Si par précipitation en milieu aqueux à pH 7 et 30°C. L'augmentation de la teneur en Si accroît la vitesse de réaction de précipitation de l'apatite. Le temps de maturation requis pour obtenir, après calcination des précipités, une poudre constituée d'une phase cristalline unique de phosphate tricalcique beta (β -TCP) diminue avec cette teneur. Des matériaux denses ont été obtenus après frittage naturel à 1100°C pendant 2 h. Le silicium n'est que partiellement incorporé dans la structure du β -TCP, l'excédent se retrouve dans des grains de silice amorphe qui ralentissent le processus de densification.

In vitro, des tests d'immersion en solutions salines ont révélé que la présence de Si permettait d'augmenter la bioactivité des céramiques. La biocompatibilité des matériaux a été démontrée par la prolifération des cellules MC3T3-E1 et la différenciation des cellules souches ST-2 a lieu. Le processus de minéralisation osseuse, étudié à l'aide des cellules SaOs-2, est observé sur tous les matériaux et est amélioré en présence de silicium.

Dans l'optique d'une fonctionnalisation de surface par des biomolécules, un protocole préliminaire de greffage d'une quantité contrôlée d'organo-alkoxysilane sur la surface d'hydroxyapatite silicatée a été mis en place. Différents facteurs influents dont le pH du milieu réactionnel et la charge de surface des poudres ont ainsi été révélés.

Keywords: Bone substitute; Silicated calcium phosphate; Powder synthesis; Sintering; Biological evaluation; Functionalisation

Abstract

The preparation of silicon doped calcium phosphate ceramics was studied on the basis of the hypothetical formula $\text{Ca}_{3-x}(\text{PO}_4)_{2-2x}(\text{SiO}_4)_x$ of tricalcium phosphate partially substituted by silicate groups. Calcium deficient apatite powders have been synthesised in the presence of silicon by a wet precipitation method at pH 7 and 30°C. The increase of silicon content increased the reaction rate of apatite precipitation. The maturation time required to obtain, after calcination of the precipitate, a powder consisting of a beta tricalcium phosphate (β -TCP) as unique crystalline phase decreased with this content. Dense materials were obtained after natural sintering at 1100°C for 2 h. Silicon was only partially incorporated in the crystal structure of β -TCP, the remaining silicon was in the form of grains of amorphous silica that slow down the densification process.

In vitro, immersion tests in saline solutions showed that the bioactivity of the ceramics was improved by silicon. The materials were biocompatible through the MC3T3-E1 culture and the differentiation of ST-2 stem cells occurred well. The bone mineralisation process, evaluated through SaOs-2 cells culture, was observed on all materials and increased in the presence of silicon.

For further surface functionalisation with biomolecules, a preliminary study of grafting a controlled amount of organo-alkoxysilane on silicated hydroxyapatite surface was proposed. Different influencing factors including the pH of the system and the charge of the powders surface were highlighted.