Université de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Institut National Polytechnique de Toulouse*
Discipline ou spécialité : *Sciences et Génie des Matériaux*

Présentée et soutenue *Solène TADIER*
Le *26 Novembre 2009*

Titre : *Étude des propriétés physico-chimiques et biologiques de ciments biomédicaux à base de carbonate de calcium : apport du procédé de co-broyage*

JURY

Mr L. SEDEL	*Professeur, Univ. Paris Diderot*	*Président*
Mr M. BOHNER	*Pr. associé, Univ. de Sherbrooke (Canada)*	*Rapporteur*
Mr H. OUDADESSE	*Professeur, Univ. de Rennes 1*	*Rapporteur*
Mr J.A. PLANELL	*Professeur, Univ. Politècnica de Catalunya (Esp)*	*Membre*
Mme N. LE BOLAY	*Professeur, INP de Toulouse*	*Membre*
Mr C. REY	*Professeur, INP de Toulouse*	*Membre*
Mme C. COMBES	*Maitre de Conf. – HDR, INP de Toulouse*	*Membre*

Ecole doctorale : *Sciences de la Matière*
Unité de Recherche : *Institut Carnot CIRIMAT*
Directeur de Thèse : *C. COMBES*

à mes parents...

à Elsa et à Morgann...

à mes grands-parents...

Remerciements

Les recherches qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisées au sein du laboratoire Institut Carnot - Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux, dans l'équipe « Phosphates, Pharmacotechnie, Biomatériaux », dirigée par Monsieur **Christian Rey** puis par Madame **Christèle Combes**.

Je souhaite donc remercier Christian et Christèle pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe et pour m'avoir proposé ce sujet de thèse passionnant.
Christèle, merci de m'avoir accordé ta confiance. Merci pour la liberté que tu m'as laissée pour m'approprier ce sujet de recherche et pour ton soutien en toutes circonstances. Merci aussi et surtout pour ta convivialité et ta façon de toujours privilégier les rapports humains.
Christian, je tiens à vous remercier pour les conseils que vous avez distillés tout au long de ses trois ans. J'apprécie tous les jours le plaisir communicatif que vous prenez à « faire de la Recherche », à être à la paillasse, à tester et à comprendre ; j'apprécie aussi beaucoup les discussions et réflexions communes où j'apprends toujours beaucoup. Travailler à vos côtés m'a donné plus encore l'envie de devenir chercheuse.

Je tiens également à remercier les personnes qui ont accepté de juger mon travail :

- Monsieur **Laurent Sedel**, professeur de l'Université Paris Diderot et chef de service à l'hôpital Lariboisière pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury,
- Messieurs **Marc Bohner**, professeur associé de l'Université de Sherbrooke et **Hassane Oudadesse**, professeur de l'Université de Rennes 1 pour l'intérêt qu'ils ont manifesté pour ce travail en acceptant d'être rapporteurs,
- Monsieur **Josep Anton Planell**, professeur de l'Universitat Politècnica de Catalunya pour avoir consenti à examiner ce manuscrit.

Un grand merci à **Nadine Le Bolay**, non seulement pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse mais aussi pour sa très grande disponibilité tout au long de ces trois années. Merci pour ton aide, tes conseils précieux, tes encouragements, le temps et les ressources que tu m'as consacrés. J'emporte avec moi une part de ton optimisme !

Je souhaite exprimer ici tout le plaisir que j'ai eu à travailler avec l'ensemble des membres de l'équipe PPB ; je vous remercie tous pour votre accueil chaleureux, l'ambiance amicale et les grands éclats de rire que j'ai trouvés ici. Vous avez même réussi à me garder un an de plus à Toulouse !!!!!! ☺

Je souhaite tout d'abord dire un grand merci à **Mona** qui m'a aussi bien accueillie et autant appris au labo que chez elle. J'apprécie beaucoup ton amitié et je garde bien en tête qu'« *on ne peut pas se mettre en travers du bonheur* ».

Merci **Hélène** pour ton accueil à Toulouse et les moments de détente et de discussion que j'ai eu le plaisir de partager avec toi. Julien et toi m'avez offert un petit bout de « Sud » quand je suis arrivée ici et j'espère avoir l'occasion de vous croiser encore et d'en recueillir davantage dans les années qui viennent…

Jean-Phi, j'ai beaucoup apprécié ta disponibilité et le temps que nous avons passé à discuter, à réfléchir ou à rire. Travailler à tes côtés a été un plaisir et m'a permis d'apprendre beaucoup de ta rigueur scientifique.

Merci à **Cédric**, **Françoise**, **Gérard** et **Olivier** pour votre aide technique et scientifique. Vous m'avez appris beaucoup et permis d'avancer plus vite et plus loin. Olivier, merci pour ta sympathie, pour ta disponibilité et tes conseils avisés. Cédric, j'apprécie toujours les moments que nous passons ensemble, au labo ou ailleurs. Gérard, merci pour votre disponibilité. Vous êtes toujours là et trouvez toujours une solution lorsque j'ai besoin de vous ! Françoise, merci pour ton aide, précieuse aussi bien au labo qu'en TP ; merci aussi pour l'attention que tu portes aux gens qui t'entourent.

Amal, j'ai eu le plaisir de partager le même bureau que toi. Tu étais toujours là, pour m'aider ou pour me faire rire. Ton entrain et ta bonne humeur nous manquent…

Christophe, merci pour ta disponibilité et l'aide que tu m'as apportée. Tu es toujours plein(g) de bons conseils. Tu n'as pas encore réussi à me convertir à l'accent toulousain(g) mais il te reste encore quelques mois pour y parvenir…

merci **David** d'être toujours là pour des dépannages en tous genres (et parfois aux moments les plus cruciaux), d'être toujours là pour se pencher sur un problème et proposer des solutions (ou un chocolat), d'être déjà là tôt le matin et encore là quand il n'y a plus personne le soir, en bref d'être toujours quelqu'un sur qui on peut compter.

merci à **Farid**, **Ahmed**, **Imane**, **Sabrina**, **Caroline**, **Laëtitia**, **Patricia**, **Nicolas**, **Oriana**, **Fred**, **Anne**, **Barth** et **Stéphanie** pour le bout de route que nous avons parcouru ensemble. J'espère que vous l'avez apprécié autant que moi. Merci également à **Hakim** pour m'avoir

ouvert bien des portes (!) et m'avoir tenu compagnie des jours entiers. Merci enfin à **Sophie** Chatainier avec qui j'ai eu le plaisir de commencer ces recherches.

Je tiens aussi à remercier **Michèle** et **Jean-Louis**, que je croise un peu moins parce qu'ils sont toujours à l'étage en-dessous ou à l'étage au-dessus. Merci Michèle pour votre grande gentillesse ; merci aussi d'avoir accepté d'être ma « tutrice » pour mon monitorat et pour votre aide en TP. Merci Jean-Louis pour toutes vos histoires qui m'ont expliqué une étymologie, un pourquoi ou un comment.

Merci aussi à **Domi** et à **Jeanny** pour votre disponibilité et votre efficacité.

Je n'oublie bien-sûr pas les « pharmaciens » qui m'ont accueillie à maintes reprises dans leurs locaux. Merci aux **Sophie**(s) pour leur aide et leurs conseils ; merci à **Sandrine** pour sa bonne humeur, sa disponibilité et son concours précieux. Merci aussi à **Hélène**, **Fabien**, **Audrey** et **Mme Sautereau** pour m'avoir soutenue et encouragée.

J'ai également eu le plaisir de croiser de nombreuses autres personnes à l'école. Je pense plus particulièrement à **Jaime**, petit rayon de soleil espagnol, qui a beaucoup contribué à l'animation du couloir et au plaisir que j'ai eu à y venir travailler. Merci aussi à **Aurélie**, à **Yann** (qui regrette toujours de ne pas travailler avec des matériaux aussi beaux que les miens !), **Alex**, **Christel**, **Loïc**, **Greg**, **Laura**, **Joana**, **Christos** et à tous ceux avec qui j'ai partagé ce bout de chemin.

Merci aussi à ceux que j'ai croisé lors de mes enseignements…

Mes remerciements vont également à **Tiffaine**, **Mathieu**, **Sonia**, **Béatriz** et **Laurent**, qui ont chacun contribué à compléter mes résultats durant leurs stages respectifs.

Merci au **Professeur Koutsoukos**, de l'Université de Patras (Grèce) de m'avoir accueillie durant deux mois au sein de son équipe où j'ai pu m'initier aux plaisirs de la C4.

Je n'oublie pas non plus les autres acteurs de ma vie toulousaine, et en tout premier lieu **Arnaud**, **Romain**, **Céline** et **Florence** pour les bons moments que j'ai passés avec vous.

Merci aussi à **Seb**, **Hélène**, **Aurélie** et à **Jessica**. Je ne sais pas si vous vous rendez-compte de ce que vous avez réussi à me faire faire !
Bien-sûr, je n'oublie pas tous mes amis qui sont restés loin de Toulouse mais toujours près de moi, et en premier lieu, **Odeline** et **Yog** qui ont eu la curiosité de venir voir ce que j'avais fait pendant trois ans. Merci aussi à **Pitch** qui a souhaité contribuer à ce manuscrit jusqu'à la dernière minute. Merci à la mailing-list : c'est toujours un bonheur de vous lire et de vous voir.

Merci **Yann** pour ton soutien constant. Nous avons partagé beaucoup au travers de nos thèses respectives et de l'aide que tu m'as apportée pour réaliser ce travail. Je suis heureuse aujourd'hui de partager bien plus avec toi.

Enfin je tiens à remercier l'ensemble de **ma famille** et plus particulièrement mes parents, mes sœurs et mes grands-parents qui m'ont toujours soutenue et confortée dans mes choix, ainsi que Marie-Claude et Sylvain qui m'ont accompagnée, notamment lors de mon installation toulousaine. Je sais que j'ai beaucoup de chance d'être si bien entourée ; où que vous soyez, vous restez toujours près de moi.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 5

1. Les phosphates de calcium 5
1.1. Généralités sur les orthophosphates de calcium 5
1.2. Le phosphate dicalcique dihydraté (DCPD) ou brushite 7
1.3. L'hydroxyapatite phosphocalcique (HA) 8
1.3.1. L'hydroxyapatite stœchiométrique 9
1.3.2. Écarts à la stœchiométrie 11

2. Les carbonates de calcium 12
2.1. La calcite 13
2.2. L'aragonite 14
2.3. La vatérite 15
2.4. Le carbonate de calcium amorphe (CCA) 15

3. Les biomatériaux pour reconstruction osseuse 16
3.1. Composition et structure du tissu osseux 17
3.1.1. La structure de l'os 17
3.1.2. Composition et structure de la phase minérale des tissus calcifiés 19
3.2. Historique des biomatériaux pour reconstruction osseuse 22
3.2.1. Les différents types de greffes 22
3.2.2. Emploi des phosphates de calcium en tant que biomatériaux 23
3.2.3. Emploi des carbonates de calcium en tant que biomatériaux 24

4. Les ciments pour reconstruction osseuse 25
4.1. Historique 26
4.2. Emploi d'un ciment et techniques d'injection et de pose 27
4.2.1. Emploi d'un ciment 27
4.2.2. Techniques chirurgicales « mini-invasives » 27
4.3. Avantages et inconvénients d'un ciment 29
4.4. Perspectives et challenges actuels dans la recherche sur les ciments 31

5. Les ciments à base de carbonate de calcium 33
5.1. Le ciment $CaCO_3$-CaP 33
5.2. Le ciment $CaCO_3$ 34

CHAPITRE II : SYNTHESES, TRAITEMENTS ET CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DES POUDRES REACTIVES 35

1. Synthèses et caractérisations des poudres réactives 35
1.1. Synthèse et caractérisations de la brushite – $CaHPO_4$, $2H_2O$ 36
1.2. Synthèse et caractérisations de la vatérite – $CaCO_3$ 39
1.2.1. Synthèse de la vatérite 1 (V1) 39
1.2.2. Synthèse de la vatérite 2 (V2) 40

1.2.3. Caractérisations physico-chimiques des vatérites synthétisées 41
1.3. Synthèse et caractérisations du $CaCO_3$ amorphe (CCA) 45

2. Comportement des poudres réactives au broyage et au co-broyage 48
2.1. Généralités 49
2.1.1. Le broyage et l'agglomération 49
2.1.2. Le co-broyage 50
2.1.3. Choix des conditions de broyage et co-broyage 52
2.2. Broyage des poudres réactives 53
2.2.1. Comportement au broyage de la brushite 53
2.2.2. Comportement au broyage de la vatérite 57
2.2.3. Comportement au broyage du $CaCO_3$ amorphe 59
2.3. Co-broyage de la phase solide des ciments étudiés 60
2.3.1. Comportement au co-broyage : étude du ciment mixte $CaCO_3$-CaP 61
2.3.2. Comportement au co-broyage : étude du ciment $CaCO_3$ 64

3. Conclusions 67

CHAPITRE III : ÉTUDE DE L'INFLUENCE DU BROYAGE ET DU CO-BROYAGE SUR LES PROPRIETES D'USAGE DU CIMENT 69

1. Revue bibliographique 69
1.1. Injectabilité d'un ciment 69
1.1.1. Comment définir l'injectabilité ? 70
1.1.2. Comment mesurer l'injectabilité ? 71
1.1.3. Comment améliorer l'injectabilité ? 72
1.2. Influence du procédé de broyage sur la composition et les propriétés des ciments 74
1.2.1. Influence du procédé de broyage sur les propriétés de la pâte 74
1.2.1.1. Injectabilité de la pâte 75
1.2.1.2. Temps de prise du ciment 78
1.2.2. Influence du procédé de broyage sur la composition et les propriétés du ciment dur 79
1.2.2.1. Porosité du ciment 80
1.2.2.2. Propriétés mécaniques du ciment 80

2. Étude du ciment $CaCO_3$-CaP 81
2.1. Étude de faisabilité de l'élaboration des ciments à partir des poudres broyées et co-broyées 81
2.2. Influence des procédés de broyage et de co-broyage des poudres réactives sur l'injectabilité de la pâte 85
2.2.1. Protocole de mesure de l'injectabilité mis en place 85
2.2.2. Résultats et discussions 87
2.2.2.1 Influence des conditions de synthèse de la vatérite utilisée pour la préparation du ciment (V1 ou V2) 88
2.2.2.2. Influence du broyage de la brushite sur l'injectabilité du ciment $CaCO_3$-CaP 90
2.2.2.3. Influence du co-broyage des poudres réactives sur l'injectabilité du ciment $CaCO_3$-CaP 91
2.2.2.4. Synthèse, discussions et conclusions 92
2.2.3. Étude du phénomène de séparation de phases lors de l'injection 94

2.2.3.1. Protocole de mesure mis en place 95
2.2.3.2. Résultats et discussions 96
2.3. Influence des procédés de broyage et de co-broyage des poudres réactives sur les autres propriétés d'usage du ciment 99
2.3.1. Influence sur le temps de prise du ciment 99
2.3.2. Influence sur la porosité du ciment dur 101
2.3.3. Influence sur les propriétés mécaniques du ciment 102

3. Étude du ciment $CaCO_3$ 103
3.1. Réaction de prise 106
3.2. Cinétique de la réaction de prise 105
3.3. Injectabilité du ciment 107
3.4. Conclusions et perspectives sur l'étude du ciment $CaCO_3$ 108

Conclusions et perspectives 109

CHAPITRE IV : ÉLABORATION, CARACTERISATIONS ET PROPRIETES DES FORMULATIONS DE CIMENT CONTENANT DU STRONTIUM 113

1. Revue Bibliographique 113
1.1. Agents de contraste radio-opacifiants utilisés dans le domaine biomédical 114
1.2. Avantages et limitations de l'utilisation du strontium et du carbonate de strontium 116
1.2.1. L'élément strontium dans le corps humain 116
1.2.2. Intérêt du carbonate de strontium en tant qu'agent de contraste 120
1.3. Introduction du strontium dans des ciments phosphocalciques 120
1.3.1. Ajout du strontium dans la phase solide 121
1.3.2. Substitution du calcium dans les produits réactifs 122
1.3.3. Ajout du strontium dans la phase liquide 124

2. Étude du ciment $CaCO_3$-CaP 124
2.1. Préparation et caractérisations physico-chimiques du ciment contenant du strontium 125
2.1.1. Ajout dans la phase solide : $SrCO_3$ 125
2.1.1.1. Le carbonate de strontium 125
2.1.1.2. Préparation des ciments 126
2.1.2. Ajout dans la phase solide : $SrCO_3$ co-broyé 129
2.1.2.1. Étude du co-broyage de la phase solide du ciment contenant du carbonate de strontium 130
2.1.2.2. Étude du co-broyage de la phase solide contenant du carbonate de strontium 133
2.1.2.3. Caractérisations des ciments élaborés à partir de la phase solide co-broyée contenant du $SrCO_3$ 137
2.1.2.4. Devenir du $SrCO_3$ lors de la réaction de prise 139
2.1.3. Ajout dans la phase liquide : $SrCl_2$, $6H_2O$ 142
2.1.4. Conclusions et perspectives 147
2.2. Étude de la radio-opacité du ciment : effet du pourcentage de strontium et de la voie d'ajout 148
2.2.1. Méthodologie 148

2.2.2. Résultats 149
2.3. Influence de l'introduction de strontium sur les propriétés d'usage du ciment $CaCO_3$-CaP 155
2.3.1. Influence de l'introduction du strontium sur l'injectabilité de la pâte des ciments 155
2.3.2. Influence de l'introduction du strontium sur la porosité des ciments 158
2.3.3. Influence de l'introduction du strontium sur les propriétés mécaniques des ciments 160
2.4. Étude de la dissolution des ciments et de la libération du strontium 161
2.4.1. Méthodologie 161
2.4.2. Résultats 163
2.4.2.1. Détermination des quantités maximales de calcium et de strontium solubilisées 163
2.4.2.2. Dissolution des ciments et libération du strontium 165
2.4.2.3. Caractérisation des ciments après dissolution 171
2.4.2.4. Discussions et conclusions 177
2.5. Étude in-vitro de la biocompatibilité des ciments dopés au strontium 178
2.5.1. Méthodologie 178
2.5.2. Résultats 179

3. Étude du ciment $CaCO_3$ 183
3.1. Élaboration et caractérisation physico-chimique des ciments contenant du strontium 183
3.1.1. Ajout dans la phase solide : $SrCO_3$ 183
3.1.2. Ajout du strontium dans la phase liquide : $SrCl_2$, $6H_2O$ 188
3.2. Comparaison des différents ciments contenant du strontium 193

4. Conclusions 196

CHAPITRE V : ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES IONS PHOSPHATE SUR LA REACTION DE PRISE DU CIMENT $CACO_3$ 199

1. Contexte et problématique de l'étude 199
1.1. Résultats des essais in-vivo 199
1.2. Influence des ions phosphate sur la cristallisation du carbonate de calcium 201
1.3. Objectif de l'étude 202

2. Généralités sur la cristallisation en solution 202
2.1. La sursaturation 203
2.2. La nucléation 204
2.2.1. La nucléation primaire 205
2.2.2. La nucléation secondaire 205
2.3. La croissance cristalline 205
2.4. La méthode de croissance cristalline à composition constante 206
2.4.1. Principe de la méthode 206
2.4.2. Appareillage 207
2.4.3. Choix des conditions opératoires 208

3. Étude expérimentale 210
3.1. Synthèse et caractérisations de l'aragonite – $CaCO_3$ 210
3.2. Préparation des solutions de travail et titrantes 213

3.3. Croissance de l'aragonite sur l'aragonite 213
3.3.1. Influence de la sursaturation sur la vitesse de croissance cristalline 214
3.3.2. Choix d'une sursaturation et d'une masse de germes 216
3.3.3. Caractérisation de l'aragonite précipitée 216
3.4. Influence des ions phosphate sur la cristallisation de l'aragonite 217
3.4.1. Concentrations en ions phosphate < 8 µM 218
3.4.2. Concentration en ions phosphate ≥ 8 µM 219
3.4.3. Caractérisations de l'aragonite précipitée en présence de phosphates 221
3.4.4. Mécanisme d'inhibition de la cristallisation de l'aragonite 224

4. Discussions et Conclusions 225

CONCLUSION GENERALE 229

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES :

Annexe A : Matériels et méthodes
Annexe B : Noms et compositions de divers ciments phosphocalciques commercialisés
Annexe C : Revue bibliographique des principales stratégies suivies pour la mesure de l'injectabilité de ciments hydrauliques
Annexe D : Solubilité de divers sels de strontium
Annexe E : Doses journalières d'ions strontium et calcium libérés
Annexe F : Équilibres en solution
Annexe G : Préparation des solutions titrantes

ABRÉVIATIONS

Produits :

CaP : phosphate de calcium

CCA : Carbonate de Calcium Amorphe – $CaCO_3$

DCPD : phosphate de calcium dihydraté ou brushite – $CaHPO_4$, $2H_2O$

HA : hydroxyapatite phosphocalcique – $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$

V1 et **V2** : Vatérite 1, synthétisée selon le premier protocole décrit au chapitre II et Vatérite 2, synthétisée selon le second protocole – $CaCO_3$

Matériel & méthodes :

C4 : méthode de Croissance Cristalline à Composition Constante

$\mathbf{d_{0,5}}$: diamètre moyen des particules mesuré par granulométrie laser (µm)

DRX : Diffraction des Rayons X

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourrier (Fourrier Transformed InfraRed)

L/S : rapport massique $\frac{liquide}{solide}$ utilisé pour gâcher un ciment

MEB : Microscopie Électronique à Balayage

Sur les spectres infrarouges et les diagrammes de diffraction des rayons X :

A : aragonite ($CaCO_3$)

M : $MgCO_3$

N : NaCl

NC : Na_2CO_3

NMC : NH_4MgCl_3, $6H_2O$

S : $SrCO_3$

V : vatérite ($CaCO_3$)

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

L'os est un matériau composite naturel qui possède des propriétés d'autoréparation, grâce à une importante activité métabolique des cellules osseuses. Cependant, ces processus biologiques peuvent s'avérer trop longs ou ne pas être suffisants, notamment dans le cas d'importantes pertes osseuses d'origine traumatiques ou pathologiques. L'ostéoporose, par exemple, dont le nombre de malades augmente en raison de l'allongement de la durée de vie, nécessite le comblement de lésions osseuses parfois difficiles d'accès.

Pour pallier cette insuffisance, des techniques de greffes osseuses ont été mises au point. Compte-tenu des risques d'infection et de contamination des matériaux d'origines biologiques, on assiste ces dernières années à l'essor de substituts osseux synthétiques.

Parmi les matériaux développés récemment, on distingue les ciments minéraux hydrauliques pour le comblement de cavités osseuses et dentaires, qui se présentent sous la forme d'un système pâteux injectable durcissant *in-situ*. Le développement industriel et commercial des ciments minéraux injectables est récent et reste limité, bien que les parts de marché de ces produits soient en constante augmentation. L'amélioration de l'injectabilité des ciments minéraux d'une part, ainsi que l'augmentation de leur vitesse de résorption d'autre part, constituent deux exigences dans le cahier des charges actuel des praticiens utilisant ce type de biomatériaux, afin d'alléger la procédure chirurgicale et de favoriser une reconstruction osseuse rapide. Par ailleurs, dans ce contexte, la présence et le contrôle d'un agent de contraste (radio-opacifiant) biocompatible est essentielle pour le suivi radiologique du ciment pendant et après implantation.
Une des difficultés rencontrées avec la plupart des ciments hydrauliques injectables est le contrôle de la viscosité et de la cohésion de la pâte qui doit pouvoir être facilement injectée à l'aide d'une seringue mais aussi prendre et durcir rapidement (en quelques minutes) au contact des fluides et des tissus biologiques. Une des voies qui n'a pas encore été explorée de manière approfondie est le contrôle de la taille et de la distribution de taille des particules des poudres réactives et de leurs interactions par un traitement préalable de co-broyage de la

phase solide. De plus, le procédé de co-broyage devrait également permettre une dispersion homogène du radio-opacifiant difficile à obtenir par d'autres méthodes.

De nombreuses formulations de ciments pour reconstruction osseuse ont été étudiées et développées, dont plusieurs ont été mises au point au sein de l'équipe « Phosphates, Pharmacotechnie, Biomatériaux » du CIRIMAT de Toulouse. Parmi ces dernières, nous nous intéresserons au cours de cette étude à deux compositions de ciments à base de carbonate de calcium [Combes et coll., 2006-a, 2006-b].

L'objectif de ce travail de thèse est l'étude des propriétés physico-chimiques et biologiques de ces deux ciments. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'optimisation de leurs formulations afin de répondre aux principales attentes des chirurgiens.

Dans un premier temps, et grâce à une collaboration initiée en 2006 avec le laboratoire du Professeur G. Brunel de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Toulouse, j'ai participé à l'évaluation préliminaire de ces deux types de ciments *in-vivo*. Cette étude chez le rat a été réalisée dans le cadre de la thèse de S. Chatainier [Chatainier, 2007].
Les analyses histologiques des explants n'ont pas montré de tissu inflammatoire au sein des défauts créés et comblés avec les deux types de ciments qui se sont révélés être biocompatibles et résorbables. Cependant, cette étude *in-vivo* a permis de mettre en évidence plusieurs propriétés de ces ciments qu'il reste à améliorer. En effet, si leur forme galénique a permis de combler les cavités créées, l'implantation des ciments aurait été facilitée s'ils avaient été injectables. Par ailleurs, nous avons pu remarquer qu'au contact des fluides biologiques, la pâte avait tendance à diffuser ; le site d'implantation (calvaria) très irrigué a contribué à amplifier ce phénomène. De plus, ces essais ont révélé l'insuffisance du contraste aux rayons X des deux ciments pour suivre leur évolution une fois implantés. Enfin, les analyses physico-chimiques réalisées sur les explants après une semaine d'implantation ont montré que la réaction de prise *in-situ* de l'un des deux ciments testés (composé uniquement de carbonate de calcium) ne semble pas avoir été complète.
L'ensemble de cette étude préliminaire *in-vivo* a ainsi permis de préciser les problématiques auxquelles nous allons essayer de répondre grâce aux travaux qui sont présentés dans les chapitres suivants.

Le premier chapitre s'attache à présenter les matériaux utilisés au cours de ce travail de thèse, à savoir les phosphates et les carbonates de calcium. Après un paragraphe concernant la structure de l'os humain, les ciments pour reconstruction osseuse et leurs principaux atouts sont détaillés. Enfin, les deux formulations de ciments étudiées sont présentées.

Le deuxième chapitre s'intéresse tout d'abord à la synthèse et aux caractérisations physico-chimiques des poudres réactives entrant dans la formulation des deux ciments. La seconde partie du chapitre est consacrée au comportement au broyage et au co-broyage de ces solides pulvérulents. Les modifications que ces traitements entraînent sont également décrites.

Le troisième chapitre aborde les propriétés physico-chimiques et d'usage des deux ciments, préparés à partir des poudres non broyées, broyées et co-broyées. Nous nous sommes en particulier intéressés à l'amélioration et au contrôle de l'injectabilité de la pâte.

La préparation, les caractérisations et les propriétés des ciments contenant du strontium sont décrites dans le chapitre IV. L'élément strontium a été introduit dans les formulations à la fois pour ses propriétés d'agent radio-opacifiant et d'ion biologiquement actif.

L'étude de la cristallisation de l'aragonite (une variété du carbonate de calcium) en présence d'ions phosphate sera présentée au chapitre V ; cette étude à caractère fondamental a été menée en vue de mieux appréhender la réaction de prise *in-vivo* du ciment uniquement à base de carbonate de calcium.

Enfin, la conclusion générale permettra de reprendre les discussions et les principaux résultats de ce travail et abordera quelques perspectives intéressantes pour la suite de cette étude.

CHAPITRE I :

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Revue bibliographique

Ce chapitre est consacré à la présentation de généralités bibliographiques liées à l'étude présentée dans ce mémoire. La première partie concerne les phosphates et les carbonates de calcium et la raison de leur utilisation dans le domaine des biomatériaux pour reconstruction osseuse. Nous détaillerons plus particulièrement les propriétés et les caractéristiques physico-chimiques des composés qui ont été utilisés dans le cadre de ces travaux. Ensuite, nous présenterons ce qu'est un ciment et quels sont ses atouts, ce qui nous amènera à poser la problématique de ce travail en présentant la formulation des deux ciments à base de carbonate de calcium que nous avons étudiés.

1. Les phosphates de calcium

1.1. Généralités sur les orthophosphates de calcium

Les sels de calcium dérivés de l'acide orthophosphorique (H_3PO_4) et nommés par conséquent orthophosphates de calcium forment une famille de sels aux compositions chimiques et structures cristallines diverses.

Utilisés en médecine (substituts osseux et dentaires), en agriculture (engrais), en pharmacie (dentifrice), en chimie analytique (matériaux de remplissage de colonnes chromatographiques) et en tant qu'additifs dans l'industrie agro-alimentaire, les phosphates de calcium ont été largement étudiés.

La plupart de ces composés dérivent des neutralisations successives des trois acidités de l'acide orthophosphorique, dont les équations de réactions acido-basiques et les constantes d'acidité correspondantes sont indiquées ci-dessous [Heughebaert et coll., 1990] :

$H_3PO_4 + H_2O \Leftrightarrow H_2PO_4^- + H_3O^+$	$Ka_1 = 5{,}863.10^{-3}$	à 37°C	(éq. I-1)
$H_2PO_4^- + H_2O \Leftrightarrow HPO_4^{2-} + H_3O^+$	$Ka_2 = 6{,}849.10^{-8}$	à 37°C	(éq. I-2)
$HPO_4^{2-} + H_2O \Leftrightarrow PO_4^{3-} + H_3O^+$	$Ka_3 = 6{,}622.10^{-13}$	à 37°C	(éq. I-3)

Le tableau I-1 regroupe les principaux sels stœchiométriques du système $Ca(OH)_2$-H_3PO_4-H_2O, amorphes ou cristallisés, et indique leur rapport atomique Ca/P. On distingue généralement les phosphates de calcium qui sont obtenus à température ambiante ou modérée de ceux obtenus par procédé à haute température (synthèse ou décomposition).

Tableau I-1 : Les orthophosphates de calcium

orthophosphate de calcium	**formule chimique**	**acronyme**	**rapport Ca/P (atomique)**
phosphate monocalcique			
anhydre[1]	$Ca(H_2PO_4)_2$	MCPA	0,50
monohydraté[1]	$Ca(H_2PO_4)_2, H_2O$	MCPM	0,50
phosphate dicalcique			
anhydre (monétite)[1]	$CaHPO_4$	DCPA	1
dihydraté (brushite)[1]	$CaHPO_4, 2H_2O$	DCPD	1
phosphate octocalcique			
triclinique[1]	$Ca_8(PO_4)_4(HPO_4)_2, 5H_2O$	OCP_t	1,33
apatitique[1,*]	$Ca_8(PO_4)_{3,5}(HPO_4)_{2,5}(OH)_{0,5}$	OCP_a	1,33
amorphe[1]	$Ca_8(PO_4)_4(HPO_4)_2, nH_2O$	OCP_{am}	1,33
phosphate tricalcique			
α, α' ou β [2]	$Ca_3(PO_4)_2$	α- (β-) TCP	1,50
apatitique[1]	$Ca_9(PO_4)_5(HPO_4)(OH)$	TCP_a	1,50
amorphe[1]	$Ca_9(PO_4)_6, nH_2O$	TCP_{am}	1,50
hydroxyapatite phosphocalcique[1,2]	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	HA	1,67
oxyapatite[2]	$Ca_{10}(PO_4)_6O$	OXA	1,67
phosphate tétracalcique[2]	$Ca_4(PO_4)_2O$	TTCP	2

[1] : composé obtenu à température basse ou modérée
[2] : composé obtenu à haute température
* : [Rodrigues et Lebugle, 1999]

Parmi tous ces composés, nous nous intéresserons plus particulièrement au phosphate dicalcique dihydraté et à l'hydroxyapatite phosphocalcique, deux sels d'intérêt biologique qui ont été utilisés au cours de ce travail de thèse.

1.2. Le phosphate dicalcique dihydraté (DCPD) ou brushite

La neutralisation de la deuxième acidité de l'acide orthophosphorique conduit aux hydrogénophosphates de calcium de rapport atomique Ca / P = 1, parmi lesquels se trouve le phosphate dicalcique dihydraté (DCPD) ou brushite de formule chimique $CaHPO_4$, $2H_2O$. C'est un composé à caractère acide qui cristallise généralement sous forme de plaquettes, mais qui peut également prendre l'aspect d'aiguilles.

La brushite a été identifiée dans certaines calcifications pathologiques (tels que les calculs dentaires ou rénaux) et caries. Plusieurs auteurs ont suggéré qu'elle est un précurseur de la minéralisation osseuse, et notamment des apatites biologiques [Roufosse et coll., 1979 ; Glimcher et coll., 1981]. Dans le domaine des matériaux de reconstructions osseuse et dentaire, des ciments à base de brushite ont été mis au point [Mirtchi et coll., 1989]. Par ailleurs, la brushite entre dans la formulation de dentifrices, de retardateurs de flamme, ou d'agents fertilisants. Composé alimentaire, le DCPD est identifié sous le nom E341 par la classification européenne des additifs alimentaires [Dorozhkin, 2009].

Le DCPD cristallise dans le système monoclinique (groupe d'espace Ia) avec les paramètres cristallographiques a = 5,812 ± 0,002 Å, b = 15,180 ± 0,003 Å, c= 6,239 ± 0,002 Å et β = 116°25' ± 2' [Jones et Smith, 1962 ; Curry et Jones, 1971]. La maille cristalline contient quatre motifs $CaHPO_4$, 2 H_2O et la structure est représentée sur la figure I-1. Cette dernière montre que les cristaux de brushite sont constitués de feuillets ondulés de composition $CaHPO_4$, arrangés parallèlement les uns aux autres, normaux à l'axe b et liés entre eux par une double couche de molécules d'eau.

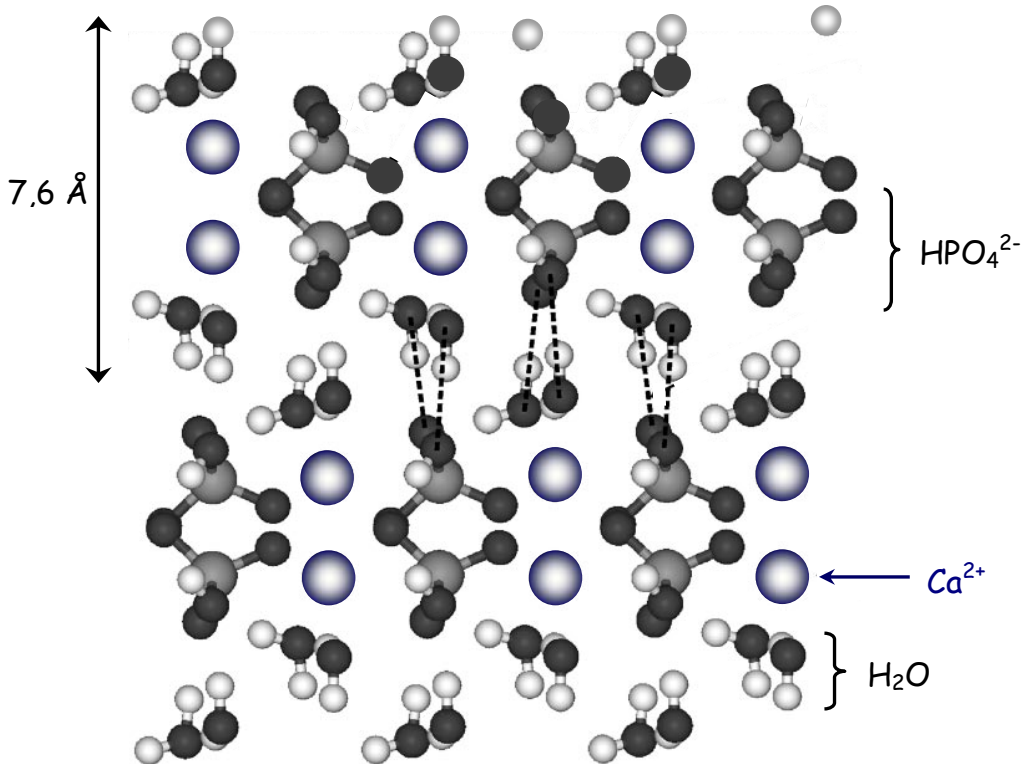


Figure I-1 : Projection sur la face (010) de la structure cristallographique du DCPD ; les pointillés représentent certaines liaisons hydrogène, d'après [Arsic et coll., 2004].

La brushite est généralement synthétisée en milieu aqueux, soit par double décomposition d'un sel de calcium et d'un sel de phosphate [Jensen et Rathlev, 1953], soit par neutralisation de l'acide phosphorique dans la chaux [St Pierre, 1955].

Les caractérisations de ce composé par spectroscopie infrarouge et diffraction des rayons X sont données dans le chapitre II.

1.3. L'hydroxyapatite phosphocalcique (HA)

Le terme apatite désigne une famille de minéraux de formule chimique générale $Me_{10}(XO_4)_6(Y)_2$ où Me est habituellement un cation bivalent (Ca^{2+}, Sr^{2+}…), (XO_4) un anion trivalent (PO_4^{3-}, VO_4^{3-},…) et Y un anion monovalent (OH^-, Cl^-,…).

1.3.1. L'hydroxyapatite stœchiométrique

Bien que l'hydroxyapatite stœchiométrique pure, de formule générale $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ et de rapport atomique Ca/P =1,67 n'intervienne jamais dans les systèmes biologiques, elle sert de modèle pour les minéraux osseux et dentaire. Elle est donc très utilisée pour l'élaboration de substituts osseux ou dentaires, sous formes de céramiques, de revêtements, de ciments ou de composites (cf. paragraphe 3.2.2).

Elle cristallise dans le groupe d'espace $P6_3/m$ du système hexagonal. Ses paramètres de maille sont les suivants :

a = 9, 418 Å c = 6,881 Å β = 120° [Kay et coll., 1964]

La structure cristallographique de l'hydroxyapatite est représentée sur la figure I-2. L'HA est formée d'un empilement de tétraèdres d'ions phosphate qui constituent deux types de tunnels parallèles à l'axe c :

- le premier correspond à l'axe ternaire du cristal. Il est occupé par des ions calcium et son diamètre mesure environ 2 Å.
- le second correspond à l'axe sénaire hélicoïdal et est situé au sommet de la maille élémentaire. Les parois de ce tunnel sont constituées d'atomes d'oxygène ou de calcium et il est occupé par les ions hydroxyde. La taille de ce tunnel est de 3 Å pour l'HA. Les ions qui se trouvent dans les tunnels sont peu liés au reste du réseau qui constitue l'édifice stable, ce qui confère aux apatites des propriétés d'échangeur d'ions et d'accepteur de petites molécules (O_2, H_2O,…).

La maille cristalline, représentée en traits pleins sur la figure I-2, contient deux motifs.

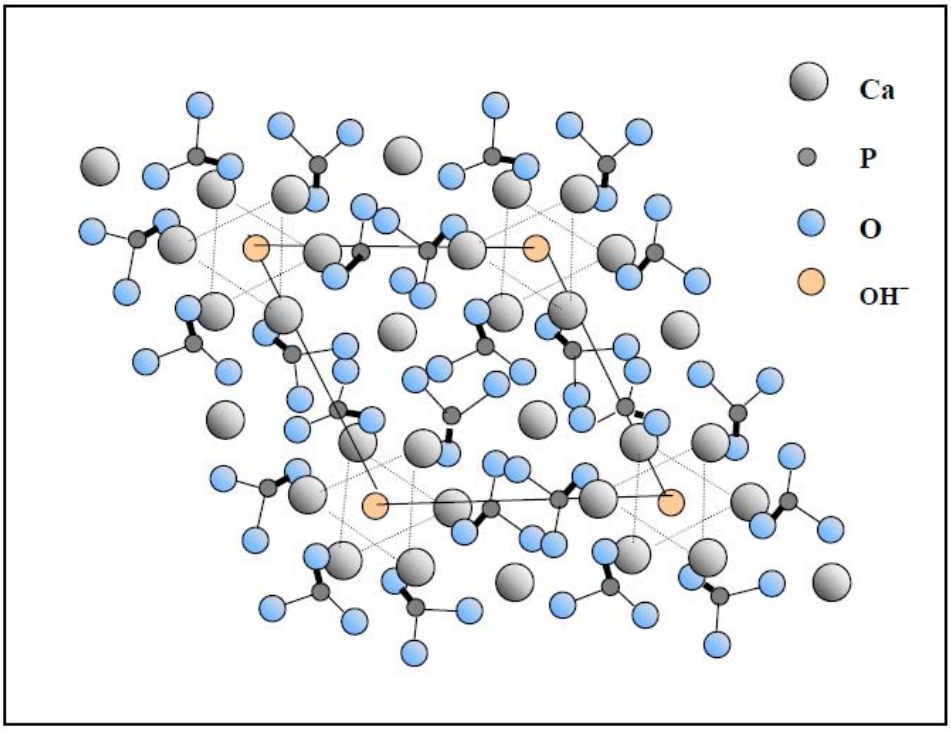


Figure I-2 : Projection dans le plan de base (001) de la structure de l'hydroxyapatite.

Le diagramme de diffraction des rayons X de l'hydroxyapatite stœchiométrique est présenté sur la figure I-3 et les distances interatomiques et intensités des principales raies de diffraction sont reportées dans le tableau I-2.

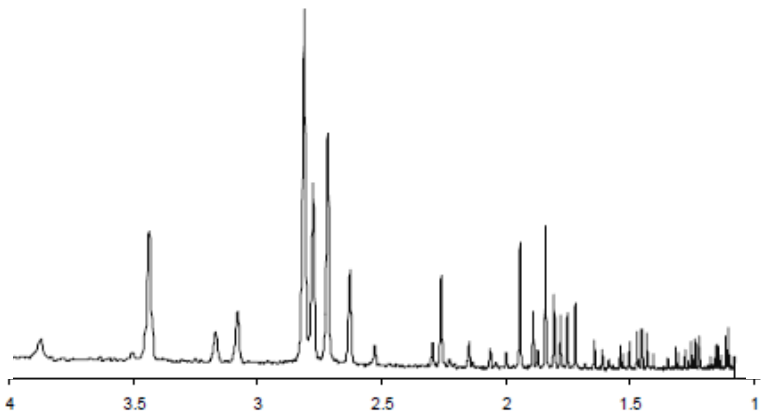


Figure I-3 : Diagramme de diffraction des rayons X de l'hydroxyapatite stœchiométrique.

Tableau I-2 : Distances inter-réticulaires et intensités des principales raies de diffraction de l'HA [fiche JCPDS n° 90432]

d théorique (Å)	**I/I_0**	**h k l**
3,44	40	0 0 2
2,81	100	2 1 1
2,78	60	1 1 2
2,72	60	3 0 0
2,63	25	2 0 2
2,26	20	3 1 0
1,94	30	2 2 2
1,84	40	2 1 3

1.3.2. Écarts à la stœchiométrie

L'une des caractéristiques de l'apatite est d'admettre un grand nombre de substitutions, qui peuvent être partielles ou totales. Le tableau I-3 répertorie des exemples de substitutions possibles. Un ion peut être substitué par un ion de même charge et de taille différente, ce qui aura pour conséquence une légère déformation de la maille et une variation des paramètres a et c. Il peut également être substitué par un ion de charge différente. Ce type de substitution nécessite alors une compensation de charge, qui peut être assurée par la création de lacunes (notées □) au niveau des sites Me^{2+} ou Y^- (aucune apatite possédant des lacunes en site XO_4^{3-} n'a jamais été décrite).

Les apatites ont donc une structure particulièrement stable, qui connaît d'importants écarts à la stœchiométrie. Ceci se traduit généralement par une cristallinité médiocre, une solubilité accrue et une variation du rapport atomique Ca/P entre 1,5 et 1,67. Seule l'HA de rapport 1,67 est stœchiométrique, les autres sont déficientes en calcium.

Tableau I-3 : Exemples de substitutions possibles dans la structure apatitique

Me^{2+}	**XO_4^{3-}**	**Y^-**
Ca^{2+}		
Mg^{2+}	PO_4^{3-}	OH^-
Cu^{2+}	SO_4^{2-}	Br^-
Na^+	CrO_4^{2-}	S^{2-}
Sr^{2+}	SiO_4^{4-}	F^-
Ba^{2+}	MnO_4^-	I^-
Zn^{2+}	CO_3^{2-}	O^{2-}
K^+	AsO_4^{3-}	Cl^-
Cd^{2+}	VO_4^{3-}	□
Pb^{2+}	HPO_4^{2-}	CO_3^{2-}
□		
Eu^{3+}		

2. Les carbonates de calcium

Le carbonate de calcium ($CaCO_3$) est le composé le plus répandu (en termes de distribution géographique et d'abondance) dans les précipités minéraux d'origine biologique (organismes marins et géologiques) [Günther et coll., 2005]. Les poudres de $CaCO_3$, peu coûteuses, sont largement utilisées en tant que charge dans le caoutchouc, le plastique, l'industrie du papier, les encres d'impression, les cosmétiques, les dentifrices et l'industrie agro-alimentaire. Par ailleurs, de nombreuses études se sont intéressées au carbonate de calcium dans le but d'éviter la formation de calcaire dans les installations industrielles.

Le carbonate de calcium est un composé ionique qui existe sous six formes allotropiques différentes, classées ici par ordre de stabilité décroissante en solution : la calcite, l'aragonite, la vatérite, le $CaCO_3$ monohydraté, le $CaCO_3$ hexahydraté et le $CaCO_3$ amorphe.

Ce paragraphe s'intéresse de manière plus détaillée aux quatre formes de carbonate de calcium impliquées dans les différentes études qui sont présentées dans les chapitres suivants. Nous ne présenterons donc pas les polymorphes hydratés.

2.1. La calcite

La calcite est le polymorphe thermodynamiquement stable du carbonate de calcium ; on la trouve sous de nombreuses formes dans la nature. Elle cristallise dans le système rhomboédrique (groupe d'espace $R\bar{3}c$) [Behrens et coll., 1995] et ses paramètres cristallographiques sont a = 6,361 Å et α = 46°6' [Dědek, 1966].

La figure I-4 représente sa structure cristallographique, constituée de plans d'ions calcium perpendiculaires à l'axe c. Les plans sont distants les uns des autres de 3,028 Å et les ions Ca^{2+} y sont disposés en triangles équilatéraux, à 4,96 Å de distance les uns des autres. Les plans de calcium sont séparés, à équidistance, par un plan d'ions carbonate. De ce fait, les ions calcium sont entourés de six oxygène chacun [Dědek, 1966]. La maille élémentaire, représentée en gras sur la figure I-4, contient deux motifs $CaCO_3$. Les cristaux de calcite prennent la forme de rhomboèdres presque cubiques [Dědek, 1966].

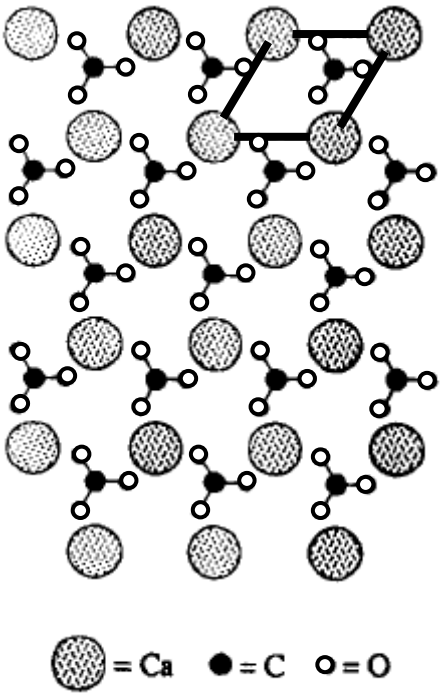


Figure I-4 : Projection de la structure cristallographique de la calcite sur le plan de base (la maille élémentaire est représentée en gras) [Behrens et coll., 1995].

2.2. L'aragonite

Cette forme métastable du carbonate de calcium est le composant principal de la perle, du corail, et des coquilles de nombreux êtres vivants.

L'aragonite cristallise sous la forme orthorhombique (groupe d'espace Pmcn [Behrens et coll., 1995]) ; ses paramètres de maille sont : a = 4,94 Å, b = 7,94 Å et c = 5,72 Å [Dědek, 1966]. La figure I-5 représente sa structure cristallographique. L'aragonite est également constituée d'un empilement de plans d'ions calcium, disposés en triangles équilatéraux. Mais à la différence de la calcite, les plans de calcium sont séparés par deux plans d'ions carbonate, ce qui fait que chaque ion calcium est entouré de neuf anions oxygène. La maille élémentaire contient quatre motifs $CaCO_3$. Ses cristaux ont généralement l'aspect de bouquet d'aiguilles [Dědek, 1966].

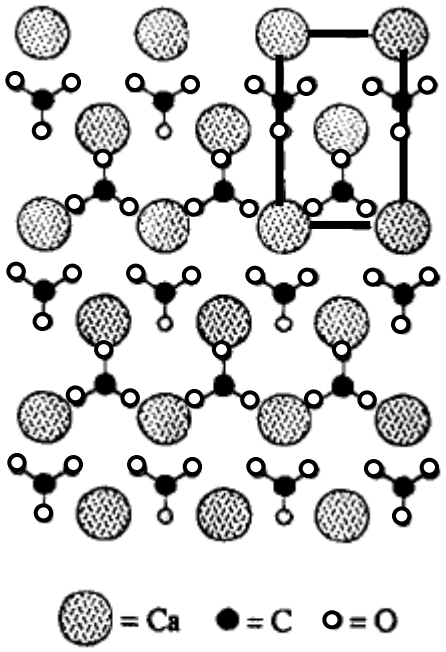


Figure I -5 : Projection de la structure cristallographique de l'aragonite sur le plan de base (la maille élémentaire est représentée en gras) [Behrens et coll., 1995].

2.3. La vatérite

Contrairement à la calcite et à l'aragonite, il y a très peu d'occurrence de la vatérite dans des minéraux naturels [Grasby, 2003]. En effet, exposée à l'eau, la vatérite est très instable et recristallise généralement sous forme de calcite. On en trouve toutefois dans les coquilles d'escargots [Ma et Lee, 2006].

La vatérite cristallise dans le système hexagonal. Ses paramètres de maille sont : a = 4,12 Å et c = 8,556 Å [Dědek, 1966]. Sa structure cristallographique est représentée figure I-6. Les groupements carbonate sont ici alignés parallèlement à l'axe c. Ses cristaux se présentent sous forme d'aiguilles, de fleurs, ou encore de lentilles [Dědek, 1966].

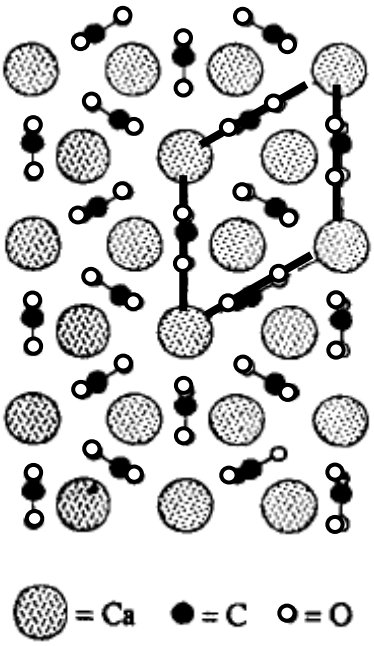


Figure I-6 : Projection de la structure cristallographique de la vatérite sur le plan de base (la maille élémentaire est représentée en gras) [Behrens et coll., 1995].

2.4. Le carbonate de calcium amorphe (CCA)

Le carbonate de calcium amorphe ou CCA se présente généralement sous forme colloïdale. C'est le seul polymorphe non cristallisé de $CaCO_3$; il est isotrope à la lumière polarisée et son

diffractogramme de rayons X présente un halo diffus. Cependant, le CCA est caractérisé par un ordre à courte distance [Levi-Kalisman et coll., 2002].

Très soluble (log K_s ~ -6 à 25°C [Ogino et coll., 1987]), le carbonate de calcium amorphe est difficile à stabiliser dans les conditions normales de température et de pression. Pourtant, il est assez commun à l'état naturel et semble jouer un rôle prépondérant dans les mécanismes de biominéralisation de certains organismes marins et de certaines plantes. Précurseur de la formation de phases plus stables (aragonite, calcite) [Faatz et coll., 2004 ; Günther et coll., 2005], c'est également la forme sous laquelle le $CaCO_3$ est stocké temporairement dans les organismes. Ainsi, il est mobilisable à tout moment, par exemple lors des mues de certains crustacés, qui nécessitent de grandes réserves de carbonate de calcium [Günther et coll., 2005]. Levi-Kalisman et coll. [2002] ont montré qu'il n'existe pas « un » carbonate de calcium amorphe mais plusieurs CCA, qui diffèrent par leurs organisations à courte distance et par la présence de composés mineurs (phosphate, magnésium, macromolécules…) susceptibles de stabiliser la phase amorphe. Si les êtres vivants arrivent à toujours reproduire *in-vivo* la même variété, il est difficile de synthétiser du CCA de manière reproductible en laboratoire.

3. Les biomatériaux pour reconstruction osseuse

Les biomatériaux sont des matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical et destinés à interagir de manière temporaire ou permanente avec les systèmes biologiques, dans un but diagnostique, préventif ou thérapeutique. Dans le cas du comblement osseux, le biomatériau implanté est destiné à restaurer un os lésé et à préserver l'intégrité corporelle du patient.

Les sels de phosphate et de carbonate de calcium décrits dans les paragraphes précédents sont couramment utilisés en tant que biomatériaux pour reconstruction osseuse. Cette partie s'attache à expliquer pourquoi, en détaillant tout d'abord la composition et la structure des tissus osseux et en présentant ensuite l'historique de l'utilisation de ces composés dans le domaine biomédical.

3.1. Composition et structure du tissu osseux

3.1.1. La structure de l'os

L'os est un matériau composite naturel, composé d'une phase organique (principalement du collagène de type I plus diverses protéines en faibles quantités), et d'une phase minérale constituée d'apatite carbonatée [Webster et Ahn, 2006]. C'est un matériau vivant, en constant remodelage, grâce à l'action principale de deux types de cellules : les ostéoclastes qui participent à la résorption osseuse (dissolution du minéral et dégradation de la matrice organique), et les ostéoblastes qui reforment le tissu osseux.
Ce couplage résorption / reconstruction, équilibré chez un adulte sain, permet de garantir le développement et la régénération d'un tissu osseux de qualité, de réguler constamment la masse osseuse et d'adapter la morphologie de l'os aux stimuli de son environnement (par exemple aux contraintes mécaniques) [Bain et Gross, 2005 ; Meyer et Wiesman, 2006]. Il lui confère également ses propriétés uniques d'autoréparation qui lui permettent, si le défaut est de taille minime, de se régénérer sans cicatrice.

En d'autres termes, le remodelage osseux permet au squelette humain, composé de 206 os, d'assurer la totalité de ses diverses fonctions en étant tout à la fois :

- une structure rigide et mobile capable de défier la gravité et de supporter des charges mécaniques,
- un bouclier qui protège les organes internes,
- un support rigide pour les attaches musculaires,
- un réservoir pour les nutriments dont le corps a besoin, notamment le calcium : la régulation de la concentration en ions calcium dans le plasma sanguin est accomplie principalement grâce à l'équilibre entre la formation osseuse (qui transfère des minéraux du sang vers l'os) et la résorption osseuse (qui transfère les minéraux de l'os vers le sang). Notons que le calcium n'est pas libéré de l'os tel quel mais qu'il s'agit plutôt de la résorption entière d'unités structurelles osseuses [Heaney, 2006].

On peut distinguer deux types d'architectures osseuses : l'os cortical (ou os lamellaire) et l'os spongieux (ou os trabéculaire).

L'os cortical possède une structure très hiérarchisée à diverses échelles (figure I-7-a). Il est composé de fibres de collagène sur lesquelles se développent les cristaux du minéral osseux. Ces fibres sont collées parallèlement les unes aux autres et forment ainsi des lamelles ; l'enroulement concentrique de ces dernières constitue des ostéons, traversés en leur centre par un réseau de nerfs et de vaisseaux sanguins tridimensionnel.
L'empilement compact des ostéons permet à l'os cortical d'assumer la majeure partie du soutien mécanique et de la fonction protectrice du squelette.

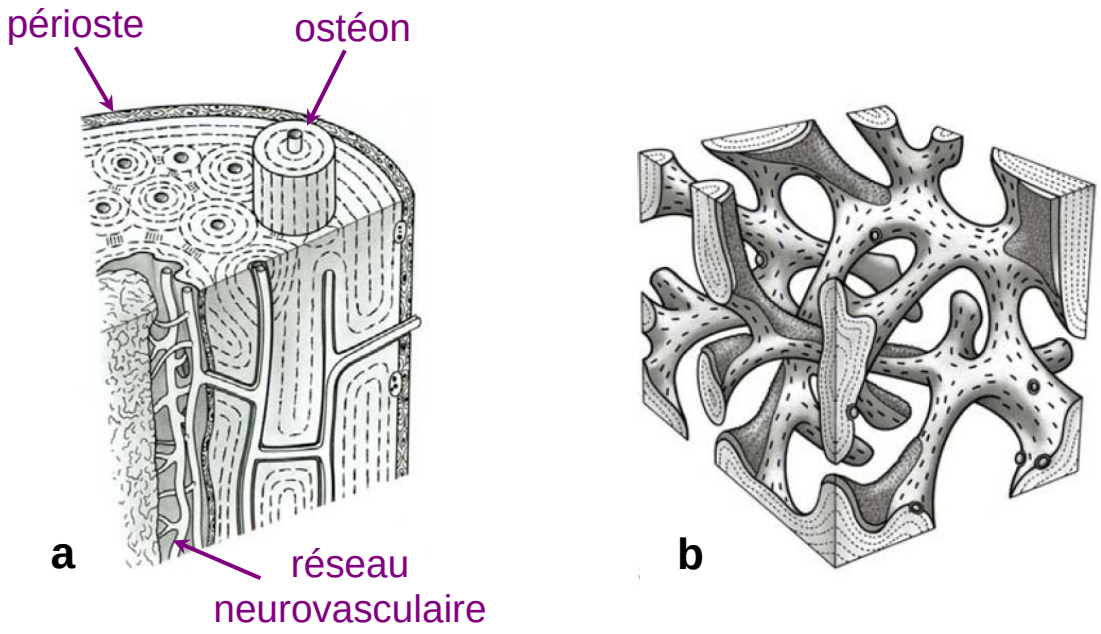


Figure I-7 : Schémas : a). de la structure de l'os cortical ; b). de la structure d'un os spongieux [Meyer et Wiesman, 2006].

Si l'os cortical a une structure dense et microporeuse (avec des pores de 1 à 10 µm [Legeros et coll., 2008]), l'os trabéculaire, schématisé sur la figure I-7-b, possède en revanche une structure macroporeuse (pores de 200 à 400 µm [Legeros et coll., 2008]), qui lui confère des propriétés structurelles et fonctionnelles différentes, et lui offre en particulier une importante surface d'échange avec les fluides. L'os trabéculaire prend donc plus particulièrement part aux fonctions métaboliques telles que l'homéostasie du calcium.

D'autres tissus hautement minéralisés sont présents dans le corps humain : *la dentine*, partie interne de la dent, recouverte par de l'*émail* au niveau de la couronne, ou de *cément* au niveau

de la racine. À la différence de l'os, une fois la formation de la dent achevée, les cellules qui forment l'émail (améloblastes) meurent et aucune réparation n'est possible [Jones, 2001].

3.1.2. Composition et structure de la phase minérale des tissus calcifiés

La composition chimique globale des tissus calcifiés (os, dentine, émail et cément) du corps humain est donnée dans le tableau I-4.

Tableau I-4 : Composition globale des tissus calcifiés [Lacout, 1989]

	Émail	**Dentine**	**Os compact et cément**
Eau (%)	2,3	13,2	32
Partie organique (dont lipides et protéines) (%)	1,7	17,5	22
Partie minérale (%)	96	69,3	46

La phase minérale de ces tissus a été identifiée par Legros [1984] comme étant une apatite phosphocalcique poly-substituée décrite par la formule suivante :

$$\underbrace{Ca_{8,3}\,\square_{1,7}}_{\text{site } Me^{2+}}\ \underbrace{(PO_4)_{4,3}(CO_3)_{1,0}(HPO_4)_{0,7}}_{\text{site } XO_4^{3-}}\ \underbrace{(CO_3,OH)_{0,3}\square_{1,7}}_{\text{site } Y^-}$$

Notons que cette formule n'est qu'un modèle global, qui ne prend en compte ni les variations de compositions chimiques d'un tissu à l'autre (cf. tableau I-5) ni les variations de compositions avec l'espèce, l'âge, le sexe, l'origine ou encore le régime alimentaire.

Les ions carbonate sont les ions de substitution prépondérants dans le minéral osseux. Au sein de la structure apatitique, ils peuvent se placer soit dans les sites habituellement occupés par les ions hydroxyde (substitution de type A) soit dans ceux habituellement occupés par les ions phosphate (substitution de type B). Les deux types de substitutions peuvent avoir lieu simultanément, ce qui conduit à des apatites poly-substituées AB, telle que celles de la phase minérale des tissus osseux.

Tableau I-5 : Composition chimique minérale de divers tissus calcifiés [Elliott, 1994] et de l'hydroxyapatite stœchiométrique

Constituant	**Émail**	**Dentine**	**Os**	**HA**
Ca (%)	37,6	40,3	36,6	39
P (%)	18,3	18,6	17,1	18,5
CO_2 (%)	3,0	4,8	4,8	/
Na (%)	0,7	0,1	1,0	/
K (%)	0,05	0,07	0,07	/
Mg (%)	0,2	1,1	0,6	/
Sr (%)	0,03	0,04	0,05	/
Cl (%)	0,4	0,27	0,1	/
F (%)	0,01	0,07	0,1	/
Rapport Ca/P	1,59	1,67	1,65	1,67
Cristallinité	bonne	mauvaise	mauvaise	bonne

Malgré un rapport Ca/P proche de celui de l'hydroxyapatite phosphocalcique, les tissus calcifiés ont une composition chimique complexe, fluctuante et hétérogène qui limite la caractérisation physico-chimique de ces apatites d'origine biologique et rend la synthèse de leurs analogues délicate ; par conséquent, l'HA stœchiométrique est depuis longtemps un matériau modèle de choix pour l'élaboration de substituts osseux. La synthèse, la caractérisation et l'élaboration de matériaux pour comblement des os à base d'apatites carbonatées, nanocristallines et non-stœchiométriques, analogues au minéral osseux, est plus récente [Eichert et coll., 2007].

Il a été montré que la structure des nanocristaux d'apatite non-stœchiométrique, qu'elle soit d'origine biologique ou synthétique, est composée d'un cœur comprenant des sites apatitiques bien identifiés et d'une couche hydratée en surface (cf. figure I-8) [Rey et coll., 1990 ; Eichert et coll., 2007]. Cette dernière est structurée et comporte des environnements spécifiques d'ions minéraux dits « non-apatitiques » (hydrogénophosphate, phosphate, carbonate...) qui ne présentent pas les caractéristiques des ions constituant le réseau cristallin de l'hydroxyapatite. Diverses techniques spectroscopiques telles que la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) appliquée aux solides ou la spectroscopie

d'absorption des rayons X au voisinage du seuil d'absorption des éléments (XANES) ont permis de les mettre en évidence [Rey et coll., 1990, 1991 ; Wu et coll., 1994].

Ces espèces ioniques, présentes en surface, sont labiles et facilement échangeables. Par conséquent, cette couche hydratée détermine la réactivité des apatites (maturation, échanges ioniques, adsorption des protéines) [Rey et coll., 1990, 1991 ; Ouizat et coll., 1999 ; Cazalbou et coll., 2004].

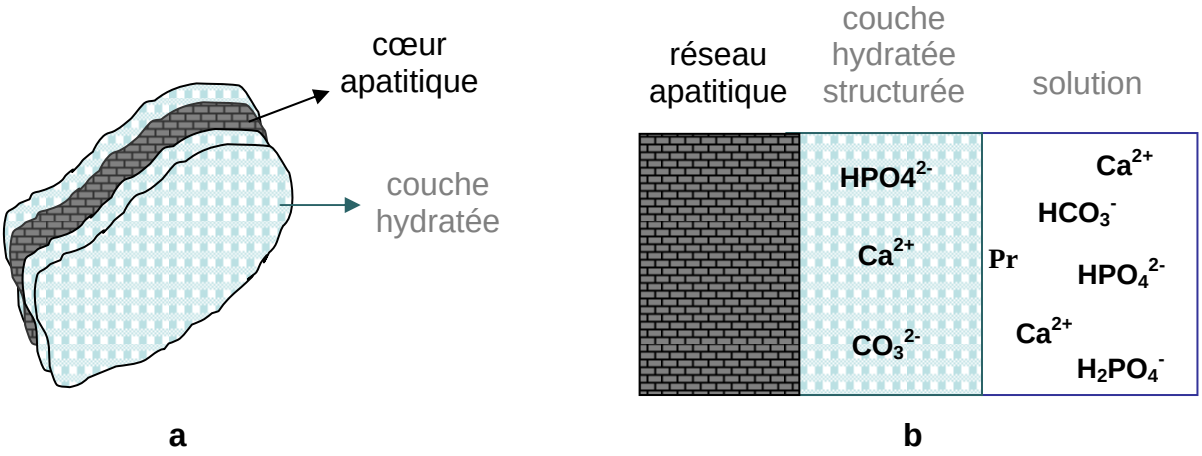


Figure I-8 : Schémas des nanocristaux d'apatite présentant la couche hydratée structurée de surface : a). vue 3D ; b). coupe transversale. Quelques protéines (Pr) peuvent être incorporées dans cette couche et déplacées par échange ionique.

Il a été montré que cette couche hydratée se retrouve dans les tissus au tout début de la minéralisation ainsi que dans les apatites de synthèse fraîchement préparées. Lors du vieillissement en solution, le domaine apatitique se développe progressivement aux dépens de la couche hydratée [Cazalbou, 2000]. Cette évolution est ralentie lorsque les apatites nanocristallines sont carbonatées et leur réactivité est ainsi préservée plus longtemps [Cazalbou et coll., 2005].

Les travaux de D. Eichert [2001] portant sur la caractérisation des apatites nanocristallines hydratées (sous forme de gels) ou lyophilisées montrent que les caractéristiques spectrales attribuées à ces environnements non-apatitiques sont significativement modifiées par l'opération de séchage (lyophilisation). Quelle que soit la technique spectroscopique utilisée, les bandes correspondant aux groupements non-apatitiques sont plus fines et mieux définies lorsque l'analyse est réalisée sur les apatites humides. La figure I-9 illustre cette modification

sur les principales bandes des groupements phosphate, observées dans la région υ1-υ3 par spectroscopie infrarouge.

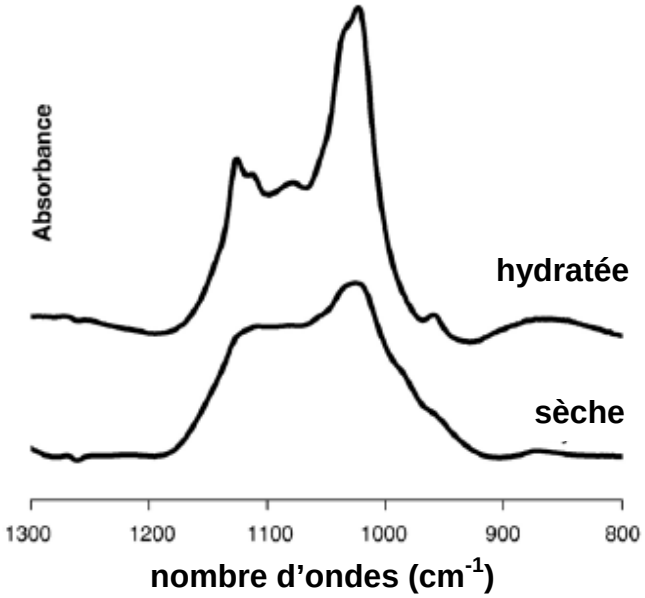


Figure I-9 : Spectres infrarouges d'un échantillon d'apatite carbonatée sous forme hydratée et sous forme lyophilisée : modification des bandes phosphate due au séchage (lyophilisation) (régions ν_1-ν_3 et ν_2 CO_3) [Rey et coll., 2007].

3.2. Historique des biomatériaux pour reconstruction osseuse

3.2.1. Les différents types de greffes

On distingue trois types de techniques de greffe osseuse :

- l'autogreffe (l'os est prélevé sur le patient lui-même, sur un autre site),
- l'allogreffe (l'os est prélevé sur un autre individu de la même espèce),
- l'hétérogreffe ou xénogreffe (l'os provient d'une autre espèce).

Par extension, on parle de « greffes » alloplastiques lorsque des matériaux synthétiques sont utilisés en tant que substituts osseux.

L'autogreffe reste la référence ou « gold standard » dans le domaine des substituts osseux car elle permet de s'affranchir de tout problème de compatibilité, ainsi que de transmissions

virales. En revanche, elle présente aussi de nombreux inconvénients voire d'éventuelles complications : la nécessité de prélever de l'os sur un autre site que celui à traiter impose au patient une opération et un traumatisme supplémentaires. De plus, on ne peut prélever qu'une quantité limitée d'os.

L'allogreffe quant à elle, en plus d'être coûteuse, présente des risques de transmission d'infections et/ou de réactions antigéniques, malgré le traitement de stérilisation par voie thermique, chimique ou par irradiation γ appliqué au matériau osseux avant son implantation. De plus ces traitements sont réalisés lors de procédés complexes, qui limitent la prédictibilité des résultats [Legeros et coll., 2008].

L'hétérogreffe pose également plusieurs problèmes : l'approvisionnement limité pour certaines espèces, la biodiversité (variabilité biologique), le risque de rejets dû aux résidus organiques après traitements, les risques de contamination virale et bactérienne.

Toutes ces limitations ont conduit au développement considérable de la recherche sur les matériaux synthétiques, qui permettent d'obtenir des substituts de manière reproductible, en quantité quasiment illimitée, sans risque de transmissions, et avec un coût contrôlé. En outre, il est possible de choisir la forme (blocs denses, granulés poreux, poudres, gels, ciments) et le type de matériaux constitutifs (métaux, alliages, polymères, céramiques).

3.2.2. Emploi des phosphates de calcium en tant que biomatériaux

Les composés phosphocalciques ont été étudiés en tant que substituts osseux depuis plus de 80 ans [Bohner, 2000]. Ils sont biocompatibles et utilisés pour des xénogreffes (par exemple sous forme de Bio-Oss®, qui sont des hydroxyapatites d'origine bovine) ou pour des greffes alloplastiques. On en trouve sous formes de céramiques denses ou poreuses, de granulés, de ciments, ou encore de revêtements de prothèses métalliques.

La première utilisation *in-vivo* des phosphates de calcium (sous forme de TCP) a été réalisée par Albee et Morrison en 1920. En 1951, Ray a implanté de l'hydroxyapatite chez des rats. Malgré ces tests précoces, les propriétés mécaniques médiocres des phosphates de calcium ne

permettent pas d'envisager leur utilisation dans des zones soumises à de fortes contraintes mécaniques.

Depuis plusieurs années, les chercheurs considèrent davantage la bioactivité des matériaux, c'est-à-dire leur capacité à réagir de façon positive avec l'organisme en accélérant les processus de réparation tissulaire. Les composés phosphocalciques possèdent notamment la propriété de former une véritable liaison chimique avec l'os défectueux, et l'établissement d'un contact entre l'implant et les tissus osseux environnants va assurer la biointégration du matériau [Hench et coll., 1971]. En raison de l'ensemble de ces propriétés, les phosphates de calcium entrent dans la composition de nombreux substituts osseux, pour leur conférer une bioactivité tout au moins de surface, dans le cas des revêtements.

Deux composés sont plus particulièrement utilisés pour ce type d'applications : l'hydroxyapatite qui, comme nous l'avons vu précédemment, constitue un modèle de choix, et le phosphate tricalcique (β-TCP). Celui-ci est utilisé car il est plus rapidement dégradé que l'HA dans l'organisme. Des céramiques biphasiques HA-βTCP ont également été mises au point : le contrôle du rapport des phases HA/ β-TCP permet d'ajuster le processus et la vitesse de résorption à l'application visée [Daculsi et coll., 1990].

3.2.3. Emploi des carbonates de calcium en tant que biomatériaux

Depuis plus de 30 ans, les carbonates de calcium naturels, principalement les coraux et la nacre, ont été très étudiés sous forme de poudres, de céramiques ou de granulés poreux et de gels pour des applications de reconstruction osseuse [Chiroff et coll., 1975 ; Souyris et coll., 1985 ; Begley et coll., 1995 ; Piatelli et coll., 1997 ; Demers et coll., 2002 ; Berland et coll., 2005]. Ils sont biocompatibles, bioactifs et résorbables. De plus, de nombreuses études *in-vivo* démontrent la capacité de ces matériaux à base de $CaCO_3$ naturel à favoriser la croissance osseuse au-fur-et-à-mesure de leur résorption, qu'ils soient ou non associés à des molécules biologiquement actives ou des cellules [Roudier et coll., 1995 ; Fricain et coll., 1996 ; Arnaud et coll., 1999 ; Petite et coll., 2000].

Plusieurs variétés de coraux, majoritairement constitués d'aragonite, peuvent être utilisées pour ce type d'applications. Grâce à leur porosité naturelle (46 à 48 % du volume total pour

les coraux de porites et de favites [Oudadesse, 1989]), ils servent de support pour la recolonisation du tissu osseux [Guillemin et coll. 1989].
Dès les années 1970, l'utilisation du corail en tant que biomatériau a été étudiée et les premiers tests *in-vivo* chez l'homme ont eu lieu en 1981 [Chatainier, 2007]. Les greffons coralliens ont été utilisés dans de nombreuses chirurgies (ORL, maxillo-faciale, orthopédique, comblement d'alvéoles). Les travaux de H. Oudadesse [1989] ont montré que le carbonate de calcium implanté est dissout et qu'il se forme une couche d'apatite carbonatée qui se lie à l'os environnant. Les ions calcium libérés pourraient être utilisables par les ostéoblastes pour conduire à un os nouvellement formé [Legeros et coll., 2008].

La nacre, constituée principalement d'aragonite et de calcite, présente aussi des propriétés ostéoconductrices (capacité à engendrer la formation osseuse lorsqu'elle est mise au contact de l'os), également dues à la formation d'une couche riche en phosphate à sa surface, qui permet d'établir la liaison nacre-os [Kim et coll., 2002].

Aujourd'hui encore, des matériaux à base de carbonate de calcium naturel sont utilisés sous forme de poudre, de céramique poreuse ou de gel [Chatainier, 2007]. Afin de s'affranchir des problèmes d'approvisionnement ou encore de contamination, des matériaux à base de $CaCO_3$ synthétique ont également été étudiés et développés, qu'ils soient uniquement constitués de carbonate de calcium [Lucas et coll., 2001 ; Ueno et coll., 2005 ; Combes et coll., 2006-a] ou associés avec des sels de phosphate de calcium [Mirtchi et coll., 1990 ; Constantz et coll., 1995 ; Khairoun et coll., 1997 ; Chung-King, 2003 ; Combes et coll., 2006-b].

4. Les ciments pour reconstruction osseuse

Les ciments forment une famille de biomatériaux caractérisés par leur formulation galénique ; ils constituent une alternative à l'obtention de céramiques à haute température. Un ciment est défini comme une « matière solide (…) qui, mélangé[e] avec un liquide, forme une pâte durcissant à l'air ou dans l'eau » [dictionnaire Le Robert]. Ainsi on peut considérer qu'un ciment est composé d'une phase solide pulvérulente et d'une phase liquide qui, gâchées dans les bonnes proportions, font prise et durcissent. Le rapport masse de liquide sur masse de solide sera noté L/S dans la suite de ce manuscrit.

Il est à noter que, parmi les ciments utilisés actuellement en chirurgie orthopédique ou dentaire, on peut différencier les ciments hydrauliques minéraux des ciments polymères (ou ciments composites lorsque ces derniers contiennent une charge minérale). Seuls les ciments minéraux seront décrits dans la suite de ce manuscrit.

L'annexe B présente des exemples de différents ciments phosphocalciques actuellement commercialisés, ainsi que leurs compositions respectives. Elle met en évidence l'existence de deux classes principales de ciments : les premiers sont dits « apatitiques » et les seconds « brushitiques », en référence à la phase majoritaire finale constituant les ciments une fois pris. On peut distinguer essentiellement trois mécanismes de réaction de prise :

- le premier implique une réaction acide-base entre un composant acide (tel que le DCPD ou l'H_3PO_4) et un composant basique (tel que le TTCP ou le $CaCO_3$). C'est le cas des ciments apatitiques, qui ont un pH de prise acide.
- le deuxième correspond à une hydrolyse d'un composant métastable (le phosphate de calcium amorphe par exemple) qui reprécipite sous la forme d'un composé plus stable (tel que l'apatite). C'est le cas des ciments mono-composants.
- le troisième conduit à une phase instable (telle que le DCPD) qui évolue à pH physiologique vers la phase apatitique stable ; c'est le cas des ciments brushitiques.

4.1. Historique

Les premiers à avoir proposé un ciment phosphocalcique biomédical sont Legeros et coll. [1982], tandis que Brown et Chow [1985] déposaient un brevet il y a un peu plus d'une vingtaine d'années. Depuis, de nombreuses formulations ont été mises au point, étudiées et commercialisées [Hanker et coll., 1986 ; Monma et coll., 1988 ; Mirtchi et coll., 1989 ; Lacout et coll., 2000].

Cependant, ces ciments présentent chacun des limites et sont parfois réservés à des usages exclusifs, comme celui de la chirurgie dentaire pour Brown et Chow. La recherche sur le sujet s'est donc intensifiée ces dernières années, comme en témoigne l'évolution exponentielle du nombre d'articles traitant des ciments phosphocalciques, en particulier dans les bases de

données scientifiques biomédicales [Bohner et coll., 2005-b]. Cet engouement pour les ciments hydrauliques est notamment dû à leur biocompatibilité, à leur bioactivité, à leur capacité à s'adapter à la forme du défaut osseux à combler et, de manière plus récente, à leur facilité de mise en œuvre et d'implantation.

4.2. Emploi d'un ciment et techniques d'injection et de pose

4.2.1. Emploi d'un ciment

En chirurgie dentaire, les ciments sont surtout utilisés pour combler un défaut osseux au maxillaire ou à la mandibule. En général, l'objectif de ces greffes est d'augmenter ou de maintenir le volume osseux afin de pouvoir, par la suite, implanter une prothèse dentaire [Chatainier, 2007].

En chirurgie orthopédique, les ciments sont utilisés pour combler des défauts osseux, mais aussi pour fixer certaines prothèses : le premier remplacement prothétique cimenté a été décrit par Gluck en 1890 [Goncalves, 2001]. Cependant, les interventions par voies ouvertes sont lourdes. Elles nécessitent l'hospitalisation et une période de convalescence du patient pendant des durées prolongées. C'est pourquoi, lorsque cela est possible, des techniques chirurgicales nouvelles et moins invasives sont privilégiées.

4.2.2. Techniques chirurgicales « mini-invasives »

Le substitut osseux est introduit dans le site à combler à l'aide d'une seringue, par une incision minime. Ces techniques permettent ainsi de diminuer le temps d'hospitalisation, la durée de la convalescence, le délai avant la reprise des activités du patient, la douleur et le risque de maladies infectieuses nosocomiales. De ce fait, elles sont également très intéressantes du point de vue du coût global pour la société. Dans ce paragraphe, nous aborderons trois techniques chirurgicales qui se développent actuellement : la vertébroplastie, la cyphoplastie et la technique de cathétérisme osseux. Ces techniques sont récentes puisqu'en

traumatologie, la technique de vertébroplastie n'est utilisée que depuis une vingtaine d'années et la cyphoplastie n'est autorisée que depuis 2006 [Huet, 2009].

Les fractures, en particulier vertébrales, sont invalidantes et nombreuses : en France uniquement, on dénombre quarante à soixante-cinq mille fractures vertébrales par an [Orcel, 2009]. Elles induisent une morbidité et une surmortalité, ainsi qu'un coût économique important [Orcel, 2009]. Elles peuvent provenir d'un accident ou d'une pathologie telle que l'ostéoporose. Il est donc nécessaire de trouver un traitement approprié qui puisse soulager la douleur et rétablir la fonction de soutien de la colonne vertébrale.

La vertébroplastie correspond à l'injection d'un ciment dans la fracture vertébrale par voie percutanée. Elle est guidée et contrôlée continument par imagerie (radiographie, fluoroscopie ou tomodensitométrie). L'implantation du ciment a principalement deux conséquences : la vertèbre est consolidée par stabilisation mécanique, ce qui peut avoir un effet antalgique.

La cyphoplastie débute par la mise en place d'un ballonnet gonflable dans la fracture vertébrale (cf. figure I-10, b). Ce ballonnet est ensuite gonflé (c), afin de restaurer la hauteur et la position de la vertèbre endommagée. Puis le ballon est retiré : il laisse derrière lui une cavité nette qui est remplie de ciment sous contrôle radiographique continu (d). Comparativement à la vertébroplastie, cette technique présente deux avantages. En effet, elle limite les risques de fuites de ciments vers les parties molles ou le système veineux [Taylor et coll., 2006]. De plus, elle permet une meilleure restauration de la hauteur vertébrale, ce qui facilite le réalignement de la colonne [Laredo, 2009]. Ceci peut diminuer le risque de fracture vertébrale adjacente à une vertèbre traitée ainsi que la cyphose, qui correspond à une exagération de la courbure dorsale.
Cependant, la cyphoplastie est une technique plus complexe et plus coûteuse que la vertébroplastie [Feydy, 2009].

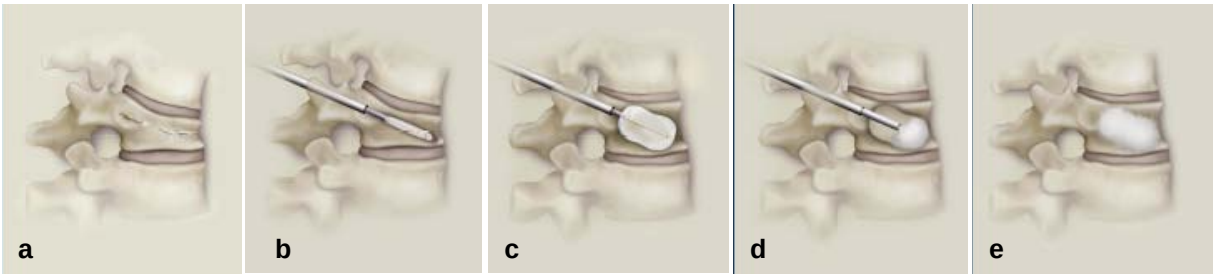


Figure I-10 : Schémas des différentes étapes de la cyphoplastie : a). fracture vertébrale ; b). mise en place du ballonnet ; c). gonflement du ballonnet ; d). remplissage de la cavité par le ciment ; e). résultat postopératoire [Medtronic®, 2009].

La technique de cathétérisme osseux est notamment utilisée dans le traitement des lésions ostéoporotiques ou métastatiques des articulations. Elle consiste en une approche indirecte : on introduit un cathéter dans l'os par un point d'accès unique, situé dans la région diaphysaire (corps de l'os). Après pénétration dans la moelle osseuse et forage jusqu'à la lésion à combler, le substitut osseux sera injecté au moyen d'une seringue dans le cathéter et jusqu'au remplissage de la cavité. Cette technique évite toute dissection des points d'ancrage des muscles, tendons, ligaments et nerfs, dissection qui serait nécessaire lors d'une intervention chirurgicale classique [Goncalves, 2001].

Par ailleurs, les ciments minéraux pourraient être utilisés pour prévenir de fractures lourdes à traiter : ils seraient injectés dans les zones fragiles (lésées ou décalcifiées), mises en évidence par radiographie [Goncalves, 2001].

4.3. Avantages et inconvénients d'un ciment

Le développement de ces techniques chirurgicales peu invasives nécessite l'élaboration de substituts osseux adaptés, c'est-à-dire injectables sous forme d'une pâte visqueuse durant l'intervention et capable de durcir *in-situ* pour développer rapidement des propriétés mécaniques. Cette propriété est l'un des avantages majeurs des ciments vis-à-vis des céramiques traditionnelles.

À l'heure actuelle, les chirurgiens préfèrent utiliser les ciments acryliques ou composites pour ce type d'applications, en partie parce qu'ils en ont l'habitude et que de nombreuses études à court et à long terme ont été réalisées avec ces ciments qui présentent des propriétés

rhéologiques (au moment de l'implantation) et mécaniques (une fois implanté) adaptées pour ces techniques. Cependant, le débat de l'utilisation des ciments phosphocalciques, en particulier chez les patients jeunes, reste ouvert.

Ce paragraphe s'intéressera donc aux avantages et aux inconvénients de l'utilisation d'un ciment minéral vis-à-vis d'une céramique tout d'abord, puis vis-à-vis d'un ciment polymérique.

Le tableau I-6 rassemble les principaux avantages et les principaux défauts des ciments phosphocalciques. Les propriétés marquées d'un astérisque «♣» sont spécifiques à certains ciments ; les autres sont communes à tous les ciments minéraux.

Tableau I-6 : Principaux avantages et inconvénients des ciments phosphocalciques [Dorozhkin, 2008]

Avantages	Inconvénients
Biocompatibilité et **bioactivité** excellentes Bonne **ostéoconduction**	**Propriétés mécaniques** faibles, notamment pour les chargements mécaniques précoces
Facilité à préparer le ciment	♣ Manque de **cohésion de la pâte** possible → désagrégation du ciment en présence de fluides biologiques (« washout ») et une séparation des phases solide et liquide peut être observée au moment de l'injection (« filter pressing »)
♣ **Injectabilité** → possibilité de recourir à des techniques chirurgicales mini-invasives **Forme adaptable** → contact ciment-os optimum même dans des défauts à géométries complexes	Manque de **macroporosité** et de porosité interconnectée → limite la croissance osseuse
Prise in-situ et à température physiologique Le dégagement de chaleur lors de la réaction de prise se fait de manière lente et diminue les conséquences de l'**exothermicité**	♣ **Biodégradation** *in-vivo* plus lente que la croissance d'os néoformé
Coût faible	
Association possible d'antibiotiques, de facteurs de croissance, de protéines dans la formulation → libération des agents biologiques de manière locale	

♣ : propriétés spécifiques à certains ciments

L'utilisation d'un ciment polymère à base de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) permet de s'affranchir du manque de cohésion de la pâte au moment de l'injection et de contrôler parfaitement son injectabilité. Cependant, la réaction de prise de ce type de ciments (polymérisation du MMA) est généralement très exothermique et s'accompagne donc d'un échauffement local qui peut endommager les tissus environnants et dénaturer les éventuelles molécules thérapeutiques (antibiotiques,…) ou molécules biologiquement actives ajoutées à la formulation du ciment. Enfin, aucun de ces ciments n'est ni bioactif ni résorbable et s'il se dégrade, les monomères libérés ou encore ceux qui n'ont pas réagi (monomères résiduels) peuvent être toxiques pour l'organisme.

En d'autres termes, le candidat idéal serait un ciment qui allierait la biocompatibilité, la bioactivité et l'ostéoconduction d'un ciment minéral rapidement résorbable avec les propriétés rhéologiques et mécaniques d'un ciment polymère. Ce constat explique le développement de nombreux ciments composites.

4.4. Perspectives et challenges actuels dans la recherche sur les ciments

Malgré une recherche très active et les progrès réalisés ces dernières années, il reste encore beaucoup à faire dans le domaine des ciments biomédicaux à base de phosphates de calcium et de nouvelles perspectives de recherche se sont ouvertes [Bohner et coll., 2005-b]. En effet, certaines propriétés physiques, chimiques et biologiques des ciments sont encore peu étudiées ou mal comprises.

Par ailleurs, l'écart entre les propriétés des ciments actuellement sur le marché et les attentes des chirurgiens et des radiologues est assez grand. Il est donc essentiel d'identifier les propriétés-clés répondant aux besoins cliniques, afin d'y apporter des solutions adéquates. Les études sur le sujet [Ginebra et coll., 1994 ; Bohner et coll., 2005-b] indiquent qu'il serait nécessaire que :

- le ciment soit peu coûteux.
- le gâchage du ciment soit facile et reproductible et qu'il conduise à une pâte homogène et sans grumeaux.

- la pâte du ciment soit complètement injectable sans démixtion de phases et que sa cohésion soit suffisante pour qu'elle ne se désintègre pas au contact des fluides biologiques.
- la période pendant laquelle il est possible de modeler le ciment sans endommager sa microstructure soit suffisamment longue pour faciliter la pose du ciment *in-situ*.
- le ciment prenne assez rapidement. Selon Ginebra et coll. [1994], le temps de prise initial du ciment (mesuré par la méthode de l'aiguille de Gillmore) doit être compris entre 4 et 8 minutes.
- la force maximale du ciment soit atteinte dans un temps minimum après implantation. Cette période devrait être de l'ordre de la durée de l'anesthésie, car le patient doit rapidement pouvoir bouger à nouveau [Ginebra et coll., 1994].
- le ciment soit radio-opaque afin de visualiser son introduction dans le site osseux et de vérifier son évolution (résorption, dégradation,….) à plus ou moins long terme.
- l'implantation du ciment donne de bons résultats cliniques, tels que le remplacement rapide du substitut par de l'os néoformé ou une apposition osseuse rapide [Bohner et coll., 2005-b]. Cela nécessite de contrôler la taille et l'interconnexion de la porosité pour permettre la diffusion des nutriments et des cellules ainsi que la repousse du tissu osseux nouvellement formé [Legeros et coll., 2008] en phase avec la résorption progressive et à court terme de l'implant.

Parmi toutes ces propriétés, certaines en particulier nécessitent d'être améliorées et sont actuellement le fruit d'une recherche active. On peut notamment citer :

- une **résorption** plus rapide. Des études récentes montrent que les ciments brushitiques peuvent avoir une résorption plus rapide que les ciments apatitiques. Cependant, la transformation *in-vivo* de la brushite en apatite qui a été observée, peut ensuite limiter la résorption du ciment [Bohner et coll., 2005-b]. D'une façon générale, l'introduction de composés plus solubles que l'apatite ($CaCO_3$, $CaSO_4$,..) dans la formulation des ciments est une voie qui est explorée par différents groupes de recherche.
- le contrôle de la **porosité** qui favorise à la fois la résorption du ciment et la repousse du tissu osseux.
- le **comportement rhéologique** des ciments phosphocalciques [Bohner et coll., 2005-b]. Il y a encore assez peu d'études sur le sujet et la plupart des ciments minéraux ne sont pas injectables.

- l'**addition de radio-opacifiants** devrait permettre une meilleure visualisation lors de l'injection des ciments, particulièrement pour les techniques de vertébroplastie.

5. Les ciments à base de carbonate de calcium

La problématique de ce travail de thèse s'inscrit dans le contexte de l'amélioration et du contrôle des propriétés physico-chimiques et biologiques des ciments minéraux en vue d'apporter des réponses aux attentes des praticiens. De nouvelles compositions de ciments ont récemment été mises au point par l'équipe Phosphates, Pharmacotechnie, Biomatériaux du CIRIMAT de Toulouse. Ces ciments contiennent une proportion majoritaire de carbonate de calcium (de 50 à 100 % en masse). Le $CaCO_3$ étant plus soluble que les sels de phosphate, le but est d'obtenir une gamme de ciment résorbables dont on peut contrôler la vitesse de résorption en ajustant la quantité de carbonate de calcium introduite. La faisabilité et la cytocompatibilité de ces ciments ont été démontrées [Combes et coll., 2006-a ; Combes et coll., 2006-b] et un brevet d'invention a été déposé en 2001 [Fontaine et coll., 2001].

Les travaux de thèse qui sont présentés dans les chapitres suivants portent plus particulièrement sur les deux ciments qui constituent les extrêmes de cette gamme :
- la phase solide du premier contient 50 % de $CaCO_3$ et 50 % de phosphate de calcium (CaP). Il s'agit donc d'un ciment mixte, qui sera noté par la suite « ciment $CaCO_3$-CaP ».
- la phase solide du second est constituée à 100 % de $CaCO_3$. Ce ciment sera noté « ciment $CaCO_3$ ».

5.1. Le ciment $CaCO_3$-CaP

Le principe de base de ce ciment repose sur la réactivité d'un mélange biphasique de poudres incluant une variété métastable du carbonate de calcium associée à un sel de phosphate de calcium.

La phase solide du ciment $CaCO_3$-CaP est constituée pour moitié de vatérite et pour moitié de DCPD (rapports pondéraux). Elle est gâchée avec la phase liquide, de l'eau désionisée, dans

un rapport L/S = 0,5. Ce rapport a été minimisé pour obtenir des propriétés mécaniques maximales tout en conservant une pâte malléable [Miao, 2004 ; Combes et coll., 2006-b].

La réaction de prise a été étudiée *in-vitro* en plaçant le ciment dans une atmosphère saturée en eau dans une étuve à 37°C (température physiologique) pendant 48 heures. Le ciment prend par une réaction de dissolution - reprécipitation qui mène à la formation d'une apatite carbonatée analogue au minéral osseux. Cette réaction de prise sera détaillée de manière plus précise dans le chapitre III.

5.2. Le ciment $CaCO_3$

Le principe de ce ciment repose sur le mélange de deux phases polymorphes du $CaCO_3$. La phase solide est en effet constituée pour un tiers de carbonate de calcium amorphe et pour deux tiers de vatérite. Gâchée avec de l'eau désionisée dans un rapport L/S = 0,67 (ce rapport a également été optimisé lors d'études antérieures), elle forme une pâte malléable. Tout comme pour le ciment $CaCO_3$-CaP, la réaction de prise a été étudiée *in-vitro* en plaçant le ciment dans une atmosphère saturée en eau dans une étuve à 37°C pendant 48 heures. Après réaction, le produit constitutif majoritaire du ciment est l'aragonite [Combes et coll., 2006-a]. La composition et les propriétés physico-chimiques de ce ciment seront également discutées dans le chapitre III.

CHAPITRE II :

SYNTHESES, TRAITEMENTS ET CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DES POUDRES REACTIVES

Chapitre II :
Synthèses, traitements et caractérisations physico-chimiques des poudres réactives

Ce chapitre aborde dans une première partie la synthèse et la caractérisation des trois poudres réactives utilisées pour l'élaboration des ciments : le phosphate dicalcique dihydraté (DCPD), la vatérite et le carbonate de calcium amorphe (CCA). Le DCPD et la vatérite entrent dans la formulation du ciment mixte $CaCO_3$-CaP ; la vatérite et le CCA composent la phase solide du ciment uniquement à base de carbonate de calcium.
La deuxième partie du chapitre concerne l'étude du comportement de ces poudres au broyage et au co-broyage, et le choix des conditions de traitement pour la suite de l'étude.

1. Synthèses et caractérisations des poudres réactives

La première étape dans l'élaboration d'un ciment est la synthèse des poudres constituant sa phase solide. Elle doit être reproductible et si possible simple à mettre en œuvre.

Les synthèses de carbonates et de phosphate de calcium décrites dans les paragraphes suivants ont toutes été réalisées à température ambiante, par double décomposition en milieu aqueux. Le principe général est le suivant : dans une solution « A » sont dissous les sels qui contiennent les cations d'intérêt (ions calcium) ; dans une solution « B » sont dissous les sels contenants les anions nécessaires (ions carbonate ou phosphate).

La solution A est ensuite versée dans la solution B, ce qui mène à la précipitation d'un carbonate (vatérite ou CCA) ou d'un phosphate de calcium (brushite).
Tous ces produits étant métastables en solution, ils sont filtrés puis séchés par lyophilisation afin d'éviter toute évolution, et enfin stockés à -20°C dans des piluliers hermétiques.
Les appareils utilisés et les protocoles suivis pour réaliser les caractérisations des poudres lyophilisées sont décrits dans l'annexe A.

1.1. Synthèse et caractérisations de la brushite – $CaHPO_4, 2H_2O$

Dans le tableau II-1 sont indiquées les compositions des solutions A et B, préparées préalablement.

Tableau II-1 : Composition des solutions cationique et anionique pour la synthèse du DCPD

Solutions	**Ions d'intérêt**	**Composition des solutions**
A	calcium	0,367 moles de $Ca(NO_3)_2$, 4 H_2O dans 600 mL d'eau désionisée
B	hydrogénophosphate	0,367 moles de $H_2PO_4NH_4$ dans 1400 mL d'eau désionisée additionnée de 20 mL d'ammoniaque (NH_4OH à 20%)

Après dissolution totale des sels, la solution A est versée dans la solution B ; la composition des deux solutions permet de maintenir un rapport atomique Ca/P = 1 dans le milieu de précipitation, ce qui correspond au rapport du DCPD. Le mélange est ensuite laissé pendant 5 heures à température ambiante et sans agitation magnétique pour maturation. Passées ces 5 heures, il est filtré sur Büchner et lavé avec deux litres d'eau désionisée.
Le précipité obtenu est lyophilisé ; on récupère alors environ 38 g de brushite, sous forme d'une poudre blanche d'aspect cotonneux.

Le DCPD obtenu cristallise sous forme de plaquettes (figure II-1) de diamètre moyen $d_{0,5}$ = 9,2 ± 0,3 µm, déterminé par granulométrie laser. La pureté du produit est vérifiée par spectrophotométrie d'absorption infrarouge (figure II-2) et par diffraction des rayons X (figure II-3).

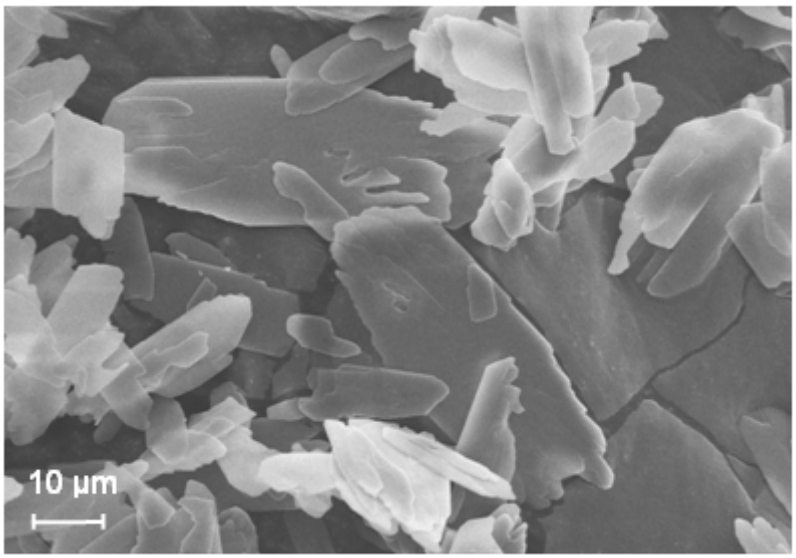


Figure II-1 : Micrographie au microscope électronique à balayage (M.E.B.) du DCPD.

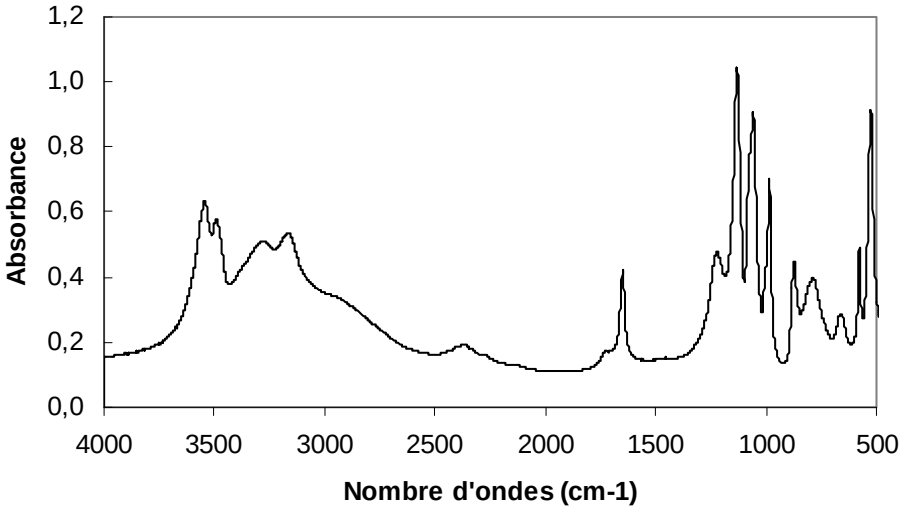


Figure II-2 : Spectre d'absorption infrarouge du DCPD.

Dans le tableau II-2 sont répertoriées les principales bandes d'absorption infrarouge de la brushite. Elles sont dues à l'eau (de cristallisation ou non) et aux ions phosphate.

Tableau II-2 : Principales bandes d'absorption visibles sur le spectre infrarouge du DCPD

Attribution des bandes d'absorption IR	**Position (cm^{-1})**
élongation O-H de l'eau de cristallisation	3543
élongation O-H de l'eau de cristallisation	3491
élongation O-H de l'eau de cristallisation	3277
élongation O-H de l'eau de cristallisation	3166
eau résiduelle	1724
eau résiduelle	1650
$HPO4^{2-}$	1222
$HPO4^{2-}$	1132
élongation P-O : $HPO4^{2-}$	1058
élongation P-O	985
$HPO4^{2-}$	873
$HPO4^{2-}$	789
libration de l'eau	661
O-P-O(H) bending mode	576
$HPO4^{2-}$	524

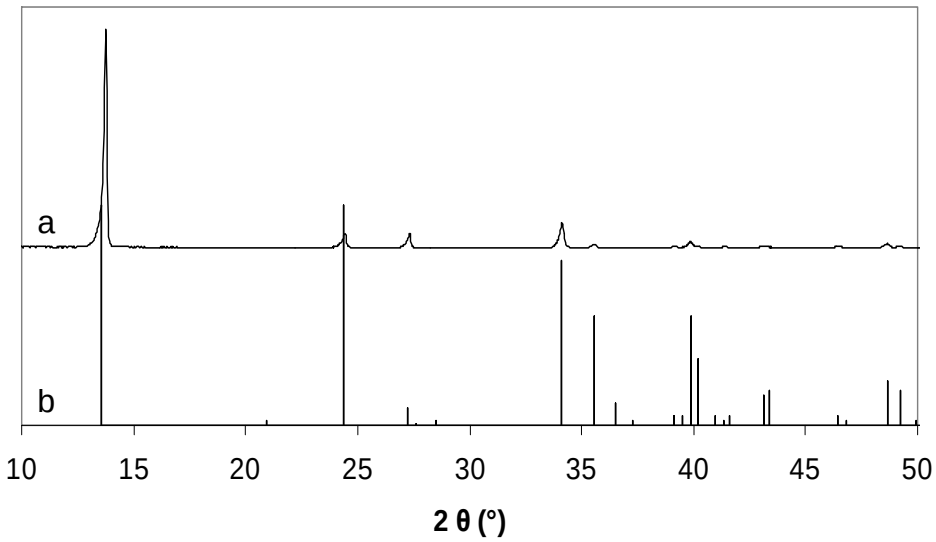


Figure II-3 : Diffractogrammes des rayons X du DCPD : a). synthétisé ;
b). de référence [fiche JCPDS n° 90077].

1.2. Synthèse et caractérisations de la vatérite – $CaCO_3$

La vatérite, variété polymorphe métastable du $CaCO_3$, est difficile à obtenir sans trace de calcite, qui est la forme stable à pression et température ambiantes. Notons que deux protocoles de synthèse de la vatérite ont été mis au point au laboratoire et utilisés au cours de ces travaux de thèse pour des raisons qui sont exposées dans la suite : ils nous conduisent à distinguer la préparation de la vatérite 1 et de la vatérite 2.

1.2.1. Synthèse de la vatérite 1 (V1)

La composition des solutions « A » et « B » nécessaires à la synthèse de la vatérite 1 est donnée dans le tableau II-3.

Tableau II-3 : Composition des solutions cationique et anionique pour la synthèse de la vatérite 1

Solutions	**Ions d'intérêt**	**Composition des solutions**
A	calcium	0,25 moles de $CaCl_2$, 2 H_2O dans 250 mL d'eau désionisée
B	carbonate	0,25 moles de Na_2CO_3, 10 H_2O dans 250 mL d'eau désionisée

La solution A est versée rapidement dans la solution B ; il se forme alors un gel très visqueux et translucide. Sous l'effet d'une agitation magnétique vigoureuse pendant quelques secondes, ce gel se change en une solution peu visqueuse d'un blanc laiteux ; dès homogénéisation de la solution, le mélange est filtré sur Büchner. On lave ensuite avec 500 mL d'eau désionisée. Le précipité récupéré est lyophilisé. On obtient environ 25 grammes de poudre blanche finement divisée.

Cette synthèse a deux inconvénients. Le premier est qu'elle n'est pas reproductible. En effet, le gel qui se forme lors du mélange des solutions A et B est très visqueux et a tendance à bloquer le mouvement du barreau aimanté limitant ainsi l'homogénéisation du milieu réactionnel. La croissance des cristaux dans ce gel est donc incontrôlée et mène à des poudres

de granulométries assez différentes d'une synthèse à l'autre (variation jusqu'à 50 % de la taille moyenne). De plus, il arrive qu'une petite quantité de calcite, plus stable, précipite également.

Notons que lorsque cette vatérite a été utilisée pour les travaux qui suivent, nous n'avons sélectionné que des lots purs (aucune trace de calcite détectable ni par spectrophotométrie d'absorption infrarouge ni par diffraction de rayons X).

Le deuxième inconvénient est la quantité de poudre limitée que l'on obtient. En prévision d'un développement industriel de ce type de ciment, il faudrait parvenir à synthétiser de plus grandes quantités de poudres réactives en une seule fois.

Nous avons donc travaillé à améliorer le protocole de synthèse selon les deux axes suivants :

- contrôler et si possible éviter la formation du gel visqueux lors du mélange A + B,
- augmenter les quantités de réactifs afin d'obtenir une quantité plus importante de produit.

Cette étude nous amène à proposer la synthèse de la vatérite 2.

1.2.2. Synthèse de la Vatérite 2 (V2)

Nous avons étudié l'influence de trois facteurs sur la synthèse : la vitesse d'ajout de la solution A dans la solution B, la température des deux solutions et la concentration en ions calcium de la solution A. Pour cela, un plan d'expériences de type Doehlert a été établi. Toutefois, nous ne détaillerons pas cette étude ici mais présenterons simplement le protocole de synthèse mis au point. Ce denier mène à la formation de la « vatérite 2 » et nécessite la préparation de deux solutions A et B, dont la composition est donnée dans le tableau II-4.

Si l'on compare la composition des solutions avec celles préparées pour la synthèse de la vatérite 1 (tableau II-3), la concentration de la solution A et le volume de la solution B sont ici doublés.

Tableau II-4 : Composition des solutions cationique et anionique pour la synthèse de la vatérite 2

Solutions	**Ions d'intérêt**	**Préparation des solutions**
A	calcium	0,50 moles de $CaCl_2$, 2 H_2O dans 250 mL d'eau désionisée
B	carbonate	0,50 moles de Na_2CO_3, 10 H_2O dans 500 mL d'eau désionisée

Après dissolution totale des sels, la solution A est versée dans la solution B à l'aide **d'une pompe péristaltique** à un débit fixé à 25 mL/min et à température ambiante. Cette pompe permet de contrôler la vitesse d'ajout de A dans B et donc la formation du gel.
La solution B est agitée de manière vigoureuse, et se trouble lors de l'ajout de calcium. Un gel peu visqueux se forme, puis la solution prend rapidement un aspect blanc laiteux. Elle est alors filtrée rapidement sur Büchner et lavée avec 1,5 litre d'eau désionisée. Le précipité obtenu est lyophilisé. On obtient environ 50 g d'une poudre blanche finement divisée.

Ce protocole de synthèse donne une poudre pure chimiquement (jamais aucune trace de calcite n'a été détectée) et permet d'obtenir 2 fois plus de vatérite qu'avec le procédé suivi pour la « vatérite 1 ».

1.2.3. Caractérisations physico-chimiques des vatérites synthétisées

Les deux vatérites obtenues, notées V1 et V2, ont été analysées par granulométrie laser (cf. annexe A). La figure II-4 présente les courbes de distribution de taille de leurs particules, toutes deux monomodales. Les diamètres moyens ($d_{0,5}$) de V1 et V2 ont été calculés d'après la distribution granulométrique : ils correspondent au diamètre de 50 % du volume cumulé des particules. Le calcul montre que les particules de V1 ($d_{0,5}$ = 1,7 ± 0,3 µm) sont plus petites que celles de V2 ($d_{0,5}$ = 2,30 ± 0,03 µm). En effet pour cette dernière, l'ajout de la solution B dans la solution A est plus lent et permet la croissance et l'agglomération des cristaux de vatérite.

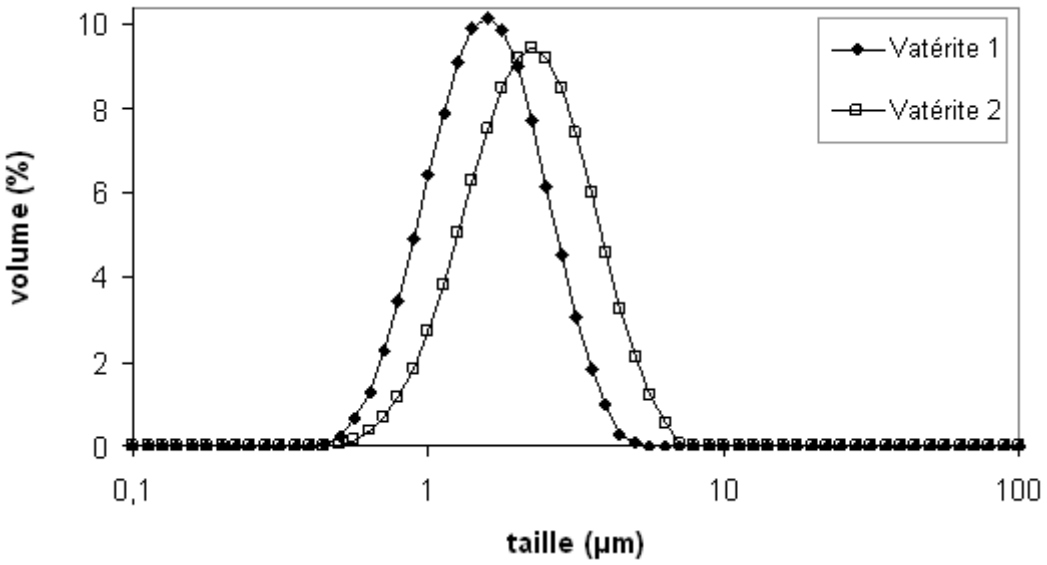


Figure II-4 : Distributions granulométriques des deux types de vatérite synthétisés.

L'observation de ces deux types de vatérite par microscope électronique à balayage (voir figure II-5) et la mesure des diamètres des particules montrent que la vatérite 1 forme des lentilles plutôt individualisées, alors que la vatérite 2 forme des particules plus grosses, de formes irrégulières et agglomérées, ce qui explique à la fois la granulométrie plus élevée et la distribution de taille plus large.

On peut également remarquer (figure II-5-c et d) que la morphologie des cristaux de V2 (lentilles) est moins circulaire que celle de V1 : certaines sont ovales ou ont la forme de « fleurs » décrites dans d'autres études [Yan et coll., 2009].

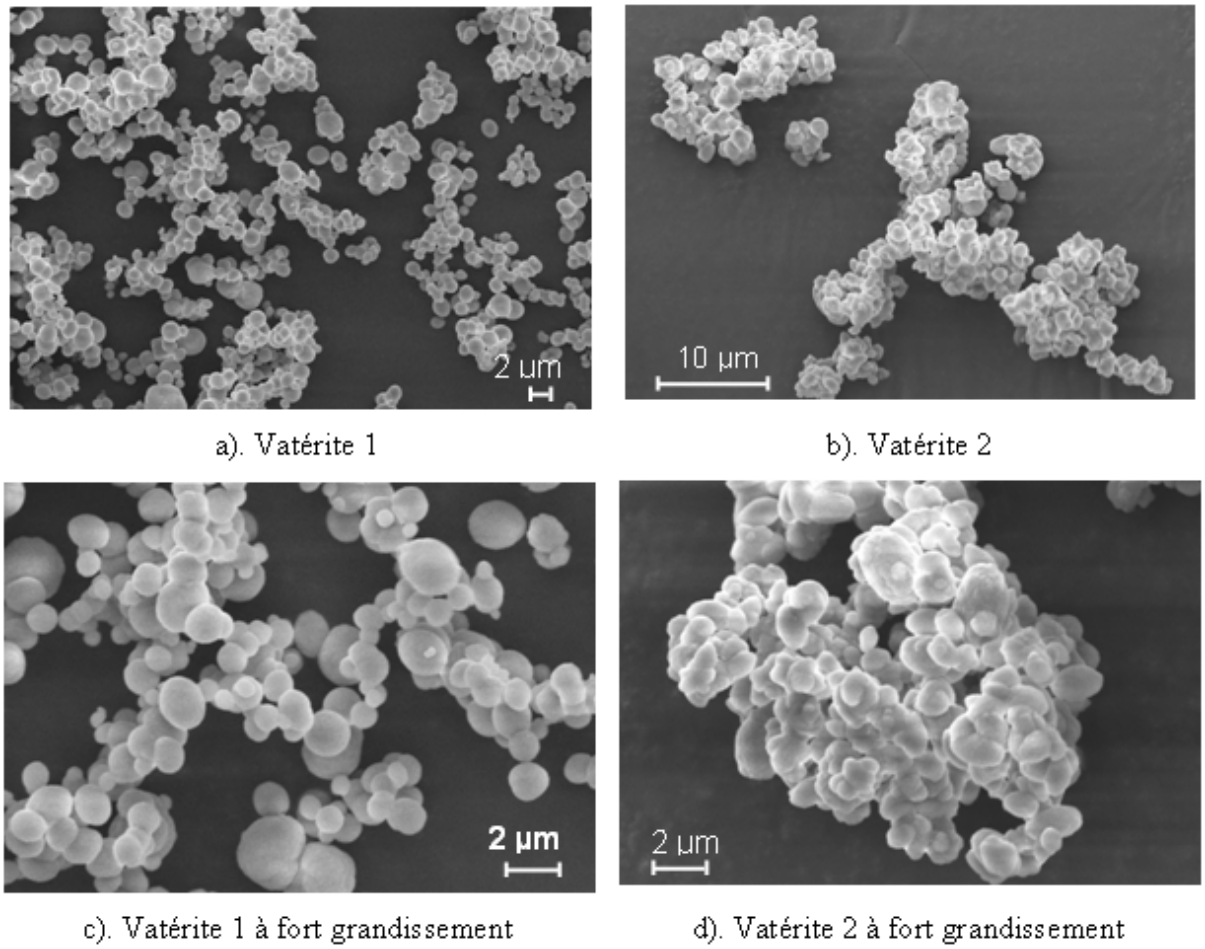


Figure II-5 : Micrographies MEB à différents grandissements des deux types de vatérite synthétisés.

Le spectre d'absorption infrarouge de la vatérite, identique pour V1 ou V2, est présenté sur la figure II-6. Il montre les bandes d'absorption des groupements carbonates caractéristiques à 876 et 745 cm^{-1} (cf. tableau II-5) et prouve que la vatérite synthétisée est pure.

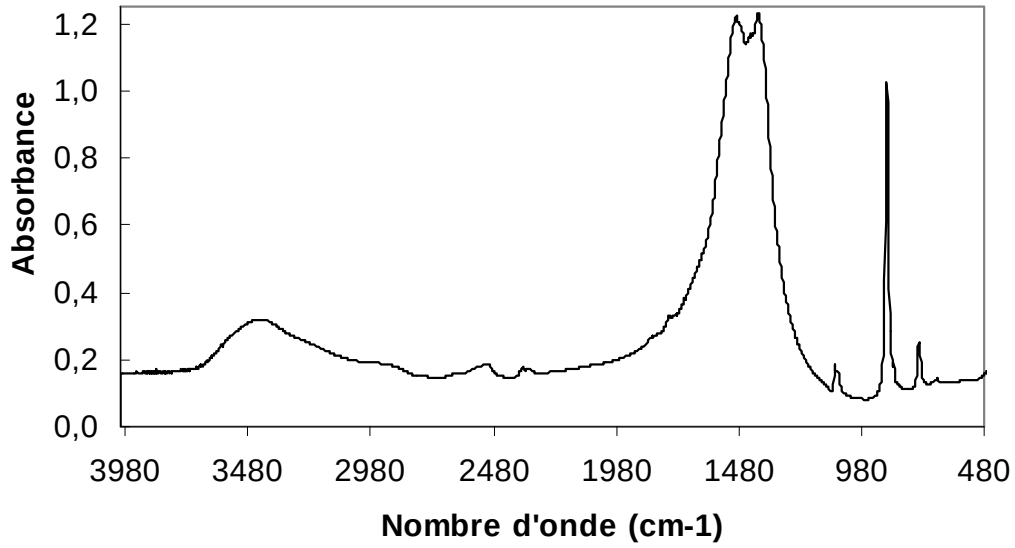


Figure II-6 : Spectre d'absorption infrarouge de la vatérite.

Tableau II-5 : Principales bandes d'absorption infrarouge de la vatérite synthétisée (V1 ou V2)

Bande	**Position (cm^{-1})**
ν_3 CO_3 (dédoublée)	1491
ν_3 CO_3 (dédoublée)	1401
ν_1 CO_3	1088
ν_2 CO_3 caractéristique de la vatérite	876
ν_4 CO_3	745

Le diagramme de diffraction de rayons X des vatérites 1 et 2 est identique ; celui de V2 est présenté sur la figure II-7 à titre d'exemple.

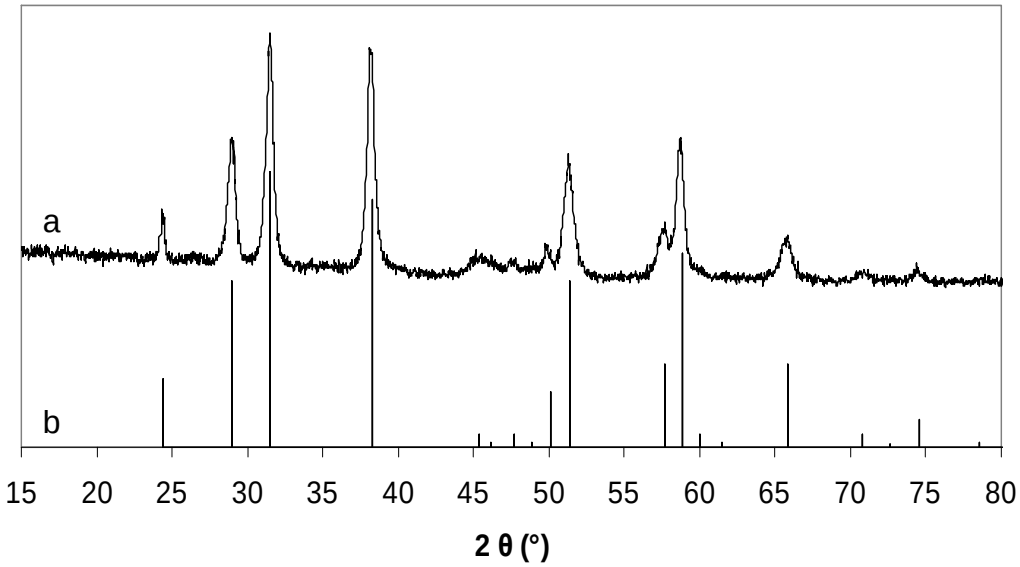


Figure II-7 : Diagrammes de diffraction des rayons X de la vatérite : a). V2 synthétisée ; b). de référence [fiche JCPDS n°33026].

1.3. Synthèse et caractérisations du $CaCO_3$ amorphe (CCA)

Ce composé très instable du carbonate de calcium est également obtenu par double décomposition (précipitation), entre deux solutions, notées A et B. La composition de chacune de ces deux solutions est détaillée dans le tableau II-6. Certaines précautions particulières sont à respecter afin d'éviter toute évolution de ce composé vers une forme plus stable du $CaCO_3$.

Tableau II-6 : Composition des solutions cationique et anionique pour la synthèse du CCA

Solutions	**Ions d'intérêt**	**Composition de la solution**
A	calcium	0,057 moles de $CaCl_2$, 2 H_2O + 0,029 moles de $MgCl_2$, 6 H_2O dans 200 mL d'eau désionisée
B	carbonate	0,064 moles de $NaHCO_3$ dans 200 mL d'eau désionisée additionnée de 20 mL d'ammoniaque (NH_4OH à 20%)

La présence d'ions magnésium dans la solution A, connus pour être des inhibiteurs de la cristallisation de la calcite [Loste et coll., 2003], permet de stabiliser la forme amorphe du $CaCO_3$ lors de sa précipitation. L'ajout d'ammoniaque dans la solution B rend celle-ci alcaline et favorise ainsi la dissociation des ions HCO_3^- en CO_3^{2-} (pKa = 10,3). En effet, en solution neutre ou acide une partie des ions carbonate CO_3^{2-} est transformée en ion bicarbonate HCO^{3-} et même en H_2CO_3, diminuant l'activité des ions CO_3^{2-} et entravant toute précipitation de carbonate de calcium [Dědek, 1966].

Une fois les solutions prêtes, la solution A est versée très rapidement dans la solution B et on filtre immédiatement sur Büchner. On ne procède à aucun lavage car les études préliminaires que nous avons réalisées ont montré que l'étape de lavage conduit à un composé mal cristallisé et non amorphe. Une partie de l'ammoniaque ainsi que des contre-ions ne pourra donc pas être éliminée en raison de l'absence de lavage. Le précipité récupéré est lyophilisé, après quoi on obtient 6 à 7 grammes de poudre blanche agglomérée.

Cette synthèse conduit à la formation de $CaCO_3$ amorphe qui se matérialise sur le diffractogramme de rayons X par deux halos diffus centrés autour de 2θ = 37 degrés et de 2θ = 53 degrés (figure II-8). Le précipité n'ayant pas été lavé lors de la synthèse, les contre-ions présents forment des produits secondaires cristallisés, notamment du NaCl, du $MgCO_3$ et, en faible quantité, du NH_4MgCl_3, 6 H_2O. Ces produits sont présents en quantité limitée, mais qui peut varier d'une synthèse à l'autre.

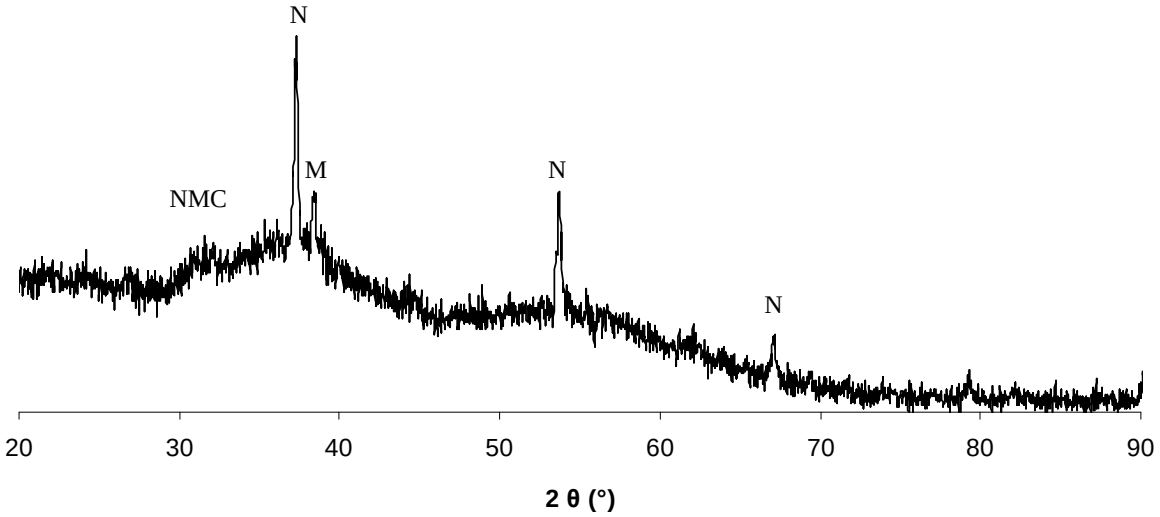


Figure II-8 : Diagramme de diffraction des rayons X du carbonate de calcium amorphe synthétisé ; raies du NaCl (N), du $MgCO_3$ (M) et du NH_4MgCl_3, 6 H_2O (NMC).

Le spectre d'absorption infrarouge présenté sur la figure II-9 montre les bandes d'absorption des carbonates, détaillées dans le tableau II-7. La levée de dégénérescence qui conduit au dédoublement de la bande d'absorption entre 1400 et 1500 cm^{-1} est caractéristique d'un produit amorphe [Weiner et coll., 2003].

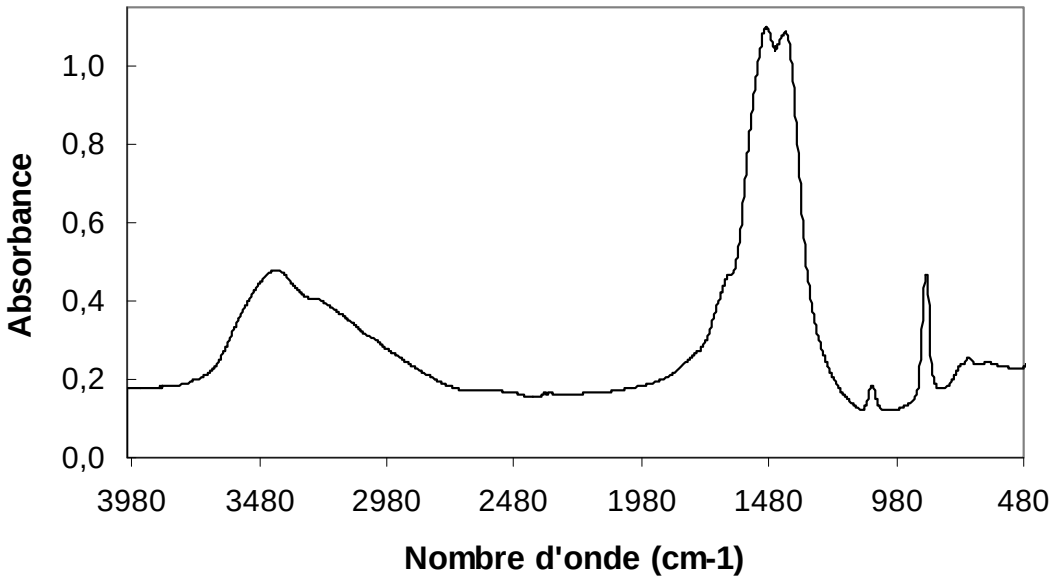


Figure II-9 : Spectre d'absorption infrarouge du $CaCO_3$ amorphe.

Tableau II-7 : Principales bandes d'absorption infrarouge du CCA

Bande	**Position (cm^{-1})**
eau	1634
ν_3 CO_3 (dédoublée)	1487
ν_3 CO_3 (dédoublée)	1417
ν_1 CO_3	1075
ν_2 CO_3	862

La lyophilisation du CCA a tendance à générer une agglomération des particules ; ces agglomérats sont de différentes tailles et de forme mal définie (figure II-10). L'analyse par granulométrie laser donne un diamètre moyen des particules de 4,2 ± 0,9 µm.

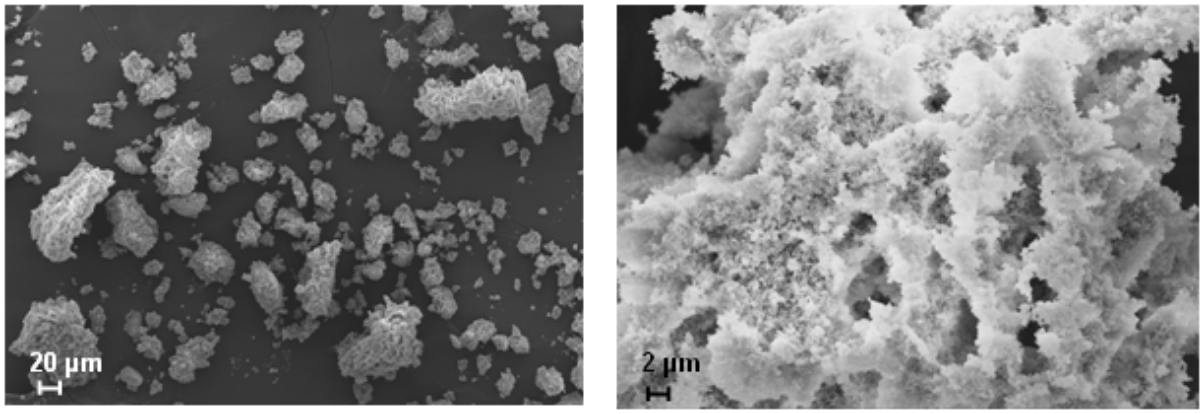


Figure II-10 : Micrographies MEB du carbonate de calcium amorphe à différents grandissements.

2. Comportement des poudres réactives au broyage et au co-broyage

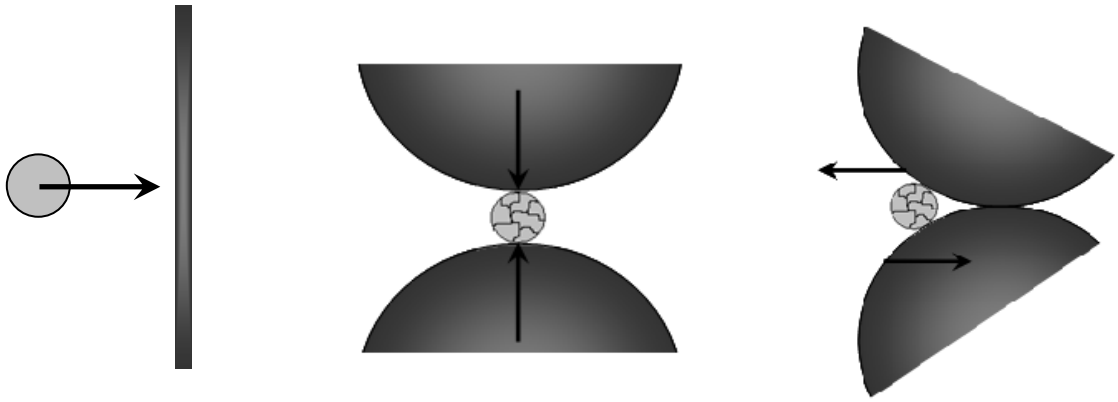
Cette partie débute par un rappel bibliographique sur les procédés de broyage et de co-broyage qui ont été appliqués pour le traitement des poudres synthétisées. Ensuite, le comportement au broyage de chaque produit séparé est détaillé. Enfin, les mécanismes de co-broyage des phases solides des deux ciments étudiés sont décrits.

2.1. Généralités

2.1.1. Le broyage et l'agglomération

Le procédé de broyage permet la réduction de solides particulaires en fragments plus petits par l'application de contraintes mécaniques.

Les différents types de broyeurs sont classés en fonction des tailles des particules entrantes et sortantes ; on distingue le broyage grossier (particules de l'ordre du mm) du broyage fin (1000 à 10 µm) et du broyage ultrafin (moins de 10 µm).
Étant donné les granulométries des poudres réactives utilisées dans cette étude, c'est ce dernier qui nous intéresse plus particulièrement. Il peut être réalisé avec des broyeurs à rotor ou à stator, des broyeurs à corps broyants libres et des broyeurs à jets d'air (broyage pneumatique). Les forces mécaniques mises en œuvre dans ces broyeurs sont des forces d'impact, de compression et de cisaillement (figure II-11). Ces forces peuvent avoir lieu entre une particule et un corps broyant, une particule et la paroi de la chambre de broyage ou deux particules entre elles.



a). impact b). compression c). cisaillement

Figure II-11 : Représentation schématique des différentes forces s'exerçant sur une particule au cours du procédé de broyage.

Ces forces extérieures entraînent des déformations élastiques et inélastiques des corps broyés ; ces déformations, ajoutées à la présence de discontinuités intra- et inter- granulaires induisent

l'initiation et la propagation des fissures ; la série de fragmentations qui s'ensuit crée de nouvelles surfaces. On peut distinguer trois classes de fragmentation (figure II-12) :

- l'abrasion ou attrition des particules produit une érosion de surface qui crée des particules fines ; elle peut par exemple être due aux frottements.
- l'écaillage dû aux contraintes exercées sur les particules conduit à des fragments de mêmes dimensions ou parfois de plus grandes tailles que ceux produits par abrasion.
- l'éclatement ou désintégration se produit lorsque l'énergie mécanique est intense pour la particule et résulte en des fragments de petites tailles.

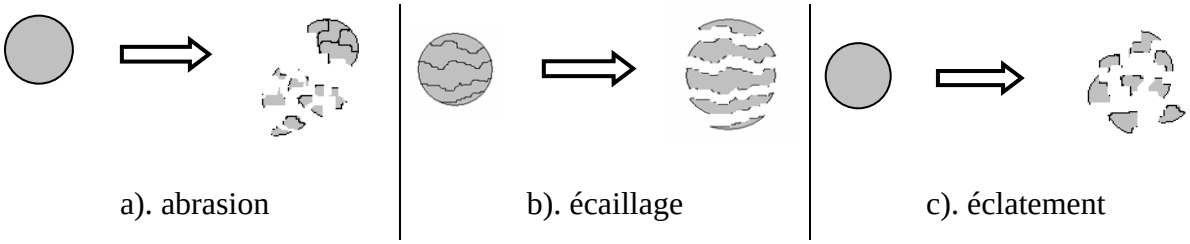


Figure II-12 : Représentation schématique des différents types de fragmentations d'une particule au cours du broyage.

La série de fragmentations mise en œuvre durant le procédé de broyage a des conséquences à la fois sur la taille et sur la morphologie du solide broyé. Dans la suite de l'étude, la forme du corps broyé ne pourra donc pas être considérée indépendamment de sa taille.

Lorsque les forces de surface inter-particulaires deviennent élevées, les particules s'attirent les unes-les-autres, jusqu'au contact permanent où deux particules n'en deviennent qu'une seule : c'est le phénomène d'agglomération.

Ainsi tout solide est réduit jusqu'à une **taille minimale**, en fonction de sa nature et des conditions du broyage. Une fois cette taille atteinte, les mécanismes d'agglomération prennent le pas sur la fragmentation. On observe alors sur la distribution granulométrique une diminution du nombre des particules de petites tailles au profit des plus grosses.

2.1.2. Le co-broyage

Le co-broyage est une technique qui a été découverte accidentellement en 1968 par l'International Nickel Company pour la production d'alliages métalliques [Benjamin, 1970].

Elle consiste à introduire deux matériaux différents (notés A et B) dans la chambre de broyage et à les broyer ensemble, d'où le terme co-broyage.

Depuis, ce procédé a notamment été utilisé comme alternative à la synthèse chimique ou à l'extrusion pour former des matériaux composites (par exemple l'addition d'une charge au sein d'une matrice polymère [Zapata-Massot, 2004 ; Seyni, 2008]). Il constitue surtout une voie très intéressante de formulation de mélanges car il favorise l'homogénéité des dispersions. Par ailleurs, la réduction de taille des matériaux et le mélange intime des constituants forcés par l'action des corps broyants réduisent les risques de ségrégation A / B et améliorent la surface de contact entre les deux matériaux ; dans le cas où une réaction a lieu entre les deux constituants, sa reproductibilité est augmentée et la réactivité du mélange est accrue [Zapata-Massot et LeBolay, 2007].

Les mécanismes de co-broyage peuvent être décomposés en plusieurs étapes [Zapata-Massot, 2004] :

- la première concerne la fragmentation des particules des matériaux A et B jusqu'à une taille limite. Les deux matériaux étant de nature différente, l'un des deux se fragmente plus rapidement (c'est le cas du matériau B dans la figure II-13).

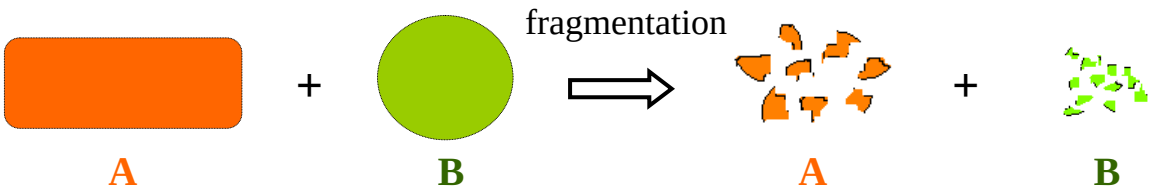


Figure II-13 : Représentation schématique du phénomène de fragmentation lors du co-broyage de deux solides particulaires A et B.

- Du fait des forces de surface inter-particulaires, les particules les plus petites ont tendance à se coller sur les plus grosses. Ce phénomène s'amplifie au-fur-et-à-mesure du co-broyage. On peut trouver différents stades d'agglomération entre les matériaux A et B : la simple soudure entre deux particules, l'enrobage des particules, et enfin l'agglomération des particules enrobées (figure II-14).



Figure II-14 : Représentation schématique des différentes étapes d'agglomération au cours du co-broyage : soudure, enrobage et agglomération.

Notons que de manière générale, l'attraction entre les particules favorise la création de liaisons A-B, évitant ainsi la ségrégation des produits. Les liaisons créées peuvent être de type covalentes, hydrogène, de Van der Waals ou une combinaison des trois.

Zapata-Massot [2004] a étudié les mécanismes de fragmentation et d'agglomération mis en jeu lors du co-broyage du carbonate de calcium sous forme de calcite comme charge d'une matrice polymère constituée de poly-(acétate de vinyle). Elle a notamment montré l'importance de l'observation microscopique pour compléter les mesures de distribution de taille utilisées habituellement pour modéliser la cinétique de broyage. En effet, les deux matériaux A et B peuvent générer des fragments de même granulométrie : la microscopie est nécessaire pour identifier les différentes populations de particules (taille et morphologie) et ne pas se limiter à une étude globale.

Les phénomènes observés lors du co-broyage et la rapidité avec laquelle ils se déroulent dépendent entre autres de la nature des deux matériaux, de leur affinité et des conditions de broyage, qu'il faut donc choisir soigneusement.

2.1.3. Choix des conditions de broyage et co-broyage

Le broyage d'un produit peut être réalisé en voie humide (en présence d'un non-solvant convenablement choisi) ou en voie sèche. Notre étude porte sur le co-broyage de la phase solide d'un ciment hydraulique. Afin d'éviter toute prise du ciment pendant le traitement de la phase solide par co-broyage et afin de préserver sa réactivité avant emploi, le broyage en **voie sèche** s'est imposé pour cette étude.

Nous avons travaillé avec un **broyeur à boulets de laboratoire**, utilisé classiquement, et dont les dimensions sont extrapolables pour la production de grosses quantités en vue d'une

industrialisation du procédé. Ce type de broyeur utilise la rotation de la chambre de broyage pour mettre en mouvement les corps broyants. Les caractéristiques de l'appareil et du procédé sont détaillées dans l'annexe A. En particulier, nous avons utilisé des boulets en alumine de **trois diamètres différents** (19, 9,2 et 5,6 mm) afin d'optimiser la fragmentation de toutes les tailles de particules. Le volume de la chambre de broyage est de 1L ; les boulets occupent 20 % de ce volume et les corps broyés 10 % du volume interstitiel restant pour minimiser la consommation des poudres réactives.

L'étude du traitement des poudres réactives par un procédé de broyage ou de co-broyage a été réalisée en collaboration avec N. Le Bolay du Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse.

2.2. Broyage des poudres réactives

Pour maîtriser le processus de co-broyage, il est nécessaire d'identifier les phénomènes de fragmentation et d'agglomération de tous les matériaux en présence. Appréhender le comportement au broyage des poudres séparées est donc essentiel pour une meilleure compréhension des mécanismes ; c'est l'objet de cette partie.

Le comportement au broyage des poudres utilisées pour la préparation des deux ciments (ciment $CaCO_3$-CaP et ciment $CaCO_3$) a été étudié en s'appuyant sur des analyses granulométriques, morphologiques et chimiques.

Dans un premier temps, nous nous intéresserons au broyage de la brushite et de la vatérite, poudres réactives utilisées pour la préparation du ciment mixte. Nous verrons ensuite le comportement au broyage du carbonate de calcium amorphe (CCA), qui, mélangé à de la vatérite, permet de préparer le ciment uniquement à base de carbonate de calcium.

2.2.1. Comportement au broyage de la brushite

L'évolution de la distribution granulométrique du DCPD au cours du broyage est présentée sur la figure II-15. Le maximum de la courbe se déplace au-fur-et-à-mesure vers les petites tailles et les populations de particules de plus de 16 µm disparaissent : les plaquettes de

brushite sont fragmentées jusqu'à 27 minutes, où la taille minimale est atteinte. Au-delà, l'agglomération des particules débute et provoque un repeuplement des populations de grandes tailles.

Pour cette étude, nous avons choisi d'**arrêter le broyage dès l'apparition de l'agglomération** ; nous travaillerons donc avec de la brushite broyée 27 minutes.

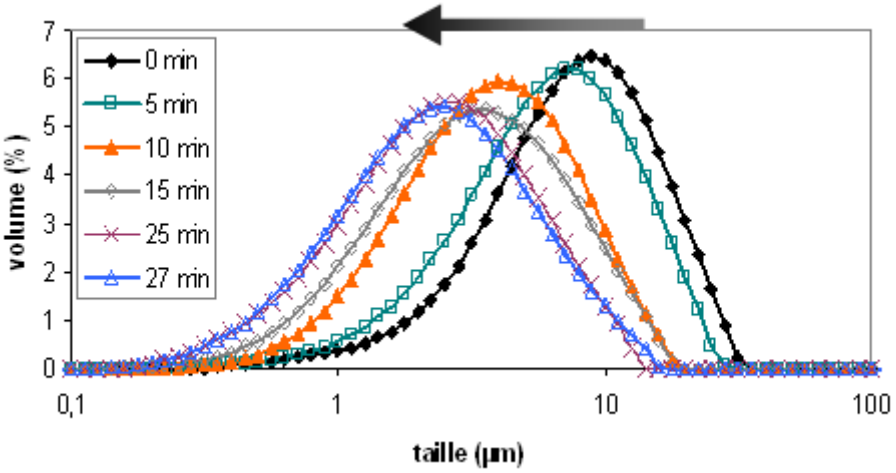


Figure II-15 : Évolution de la distribution granulométrique de la brushite en fonction de la durée du traitement de broyage.

La figure II-16 présente l'évolution du diamètre moyen (ou $d_{0,5}$) des particules de brushite. Initialement à 9,2 µm, il chute rapidement pendant les dix premières minutes puis sa diminution ralentit jusqu'à ce qu'une taille limite d'environ 2,7 µm soit atteinte.

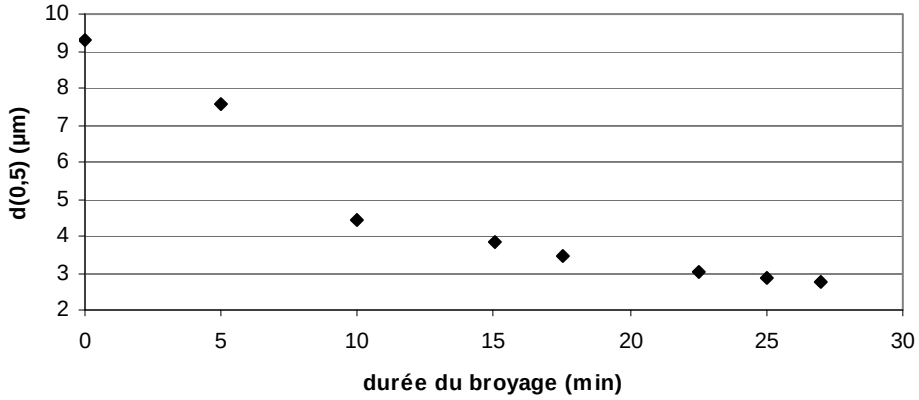
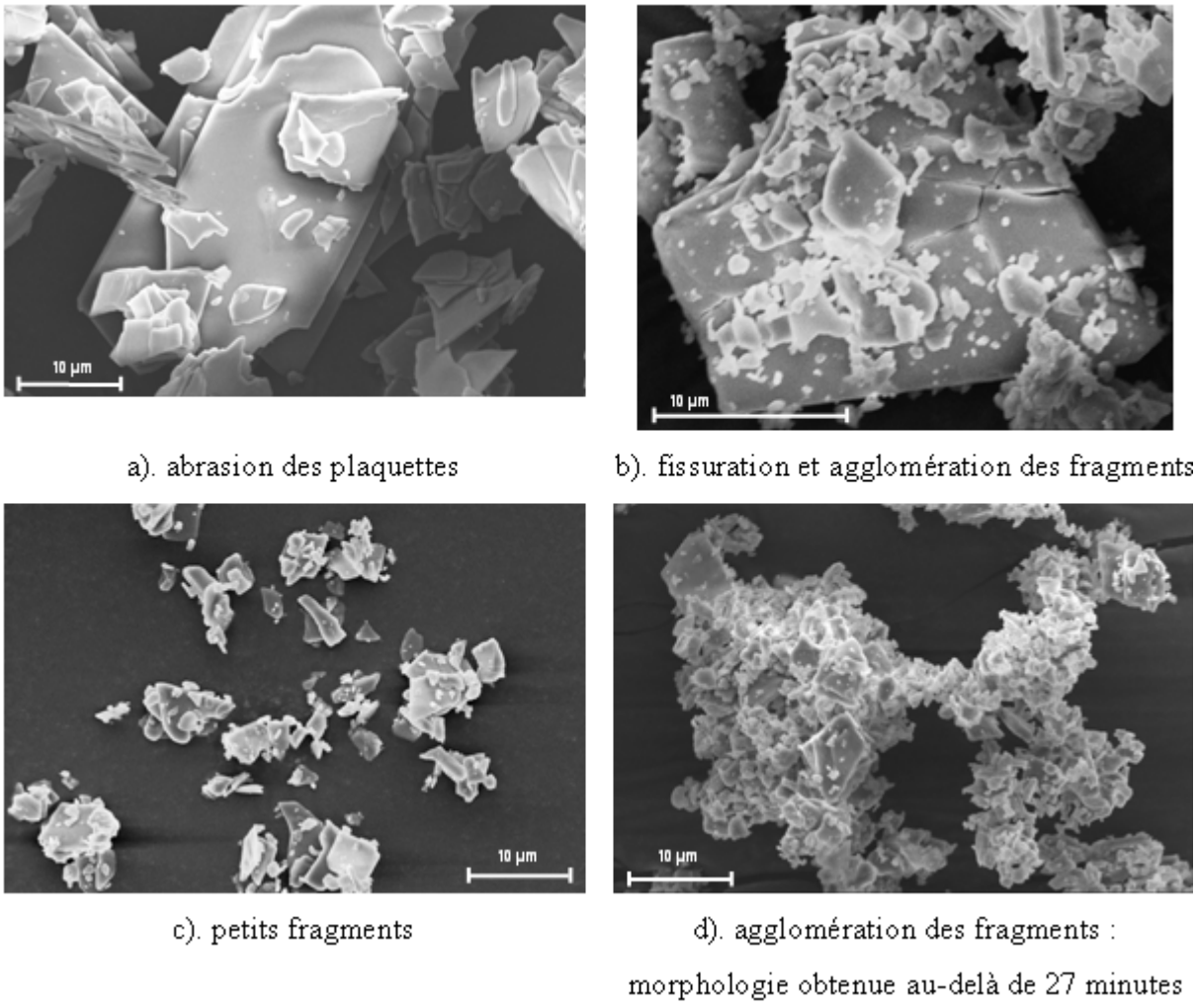


Figure II-16 : Évolution du diamètre moyen des particules de brushite lors du broyage.

L'observation au M.E.B. (figure II-17) permet de détailler plus précisément le mécanisme de fragmentation des plaquettes : l'abrasion (figure II-17-a et II-17-b) et la fissuration (figure II-17-b) des particules, prépondérantes lors des dix premières minutes de broyage, créent rapidement des fragments de petites tailles (figure II-17-c). Les interactions entre petits fragments et plus grosses particules se produisent alors, favorisant les phénomènes d'agglomération (figure II-17-b). Il s'ensuit une alternance entre fragmentation et agglomération qui explique pourquoi le diamètre moyen diminue plus lentement par la suite. Après 27 minutes de broyage, on obtient des agglomérats de touts petits fragments (fig. II-17-d).



a). abrasion des plaquettes

b). fissuration et agglomération des fragments

c). petits fragments

d). agglomération des fragments : morphologie obtenue au-delà de 27 minutes

Figure II-17 : Micrographies MEB montrant l'évolution des particules de brushite au cours du broyage.

Le spectre d'absorption infrarouge de la brushite broyée 27 minutes (figure II-18) montre que le produit n'a pas évolué lors du broyage. On retrouve en effet toutes les bandes d'absorbance caractéristiques, y compris celles de l'eau de cristallisation (entre 3150 et 3550 cm^{-1}).

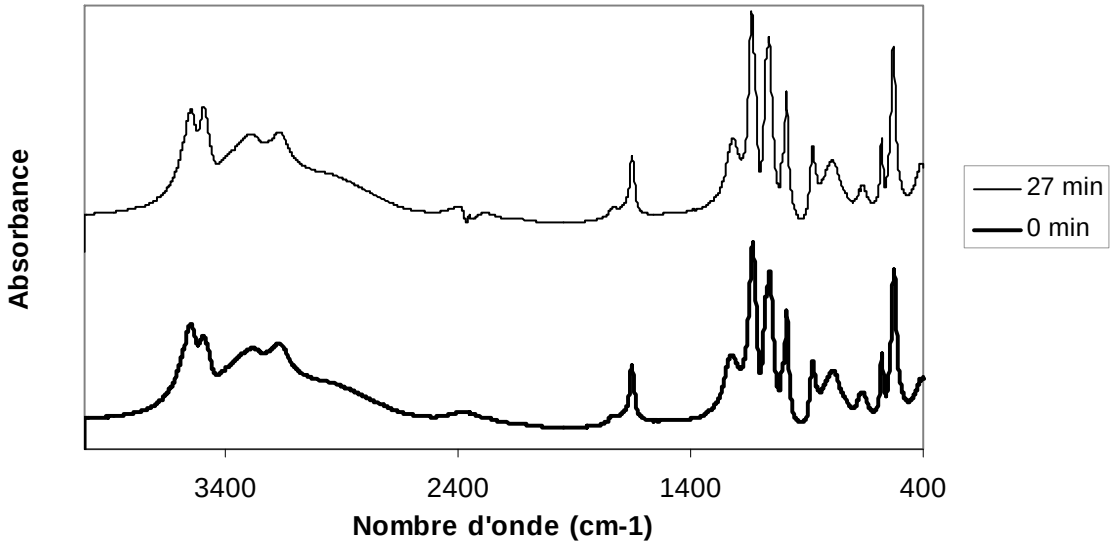


Figure II-18 : Comparaison des spectres d'absorption infrarouge du DCPD non broyé et broyé 27 minutes.

Afin de pouvoir comparer les diffractogramme de rayons X du DCPD broyé présentés sur la figure II-19, ceux-ci ont été normalisés (intensité de la raie (020) = 100). Cette figure confirme que le produit ne s'est pas transformé. Toutefois, on observe que l'intensité relative de la raie (020), centrée à $2\theta = 13,6$ °, est très significativement réduite au-fur-et-à-mesure du broyage, ce qui se traduit directement par la diminution du rapport des intensités des raies de diffraction (figure II-19). Au bout de vingt minutes de broyage, la valeur de ce rapport est de un, comme prévue par la fiche JCPDS de référence pour le DCPD [fiche JCPDS n°90077]. Cette diminution témoigne de la disparition de l'orientation préférentielle de la brushite selon le plan (020), ce qui s'explique par la modification de la morphologie des particules de brushite lors du broyage.

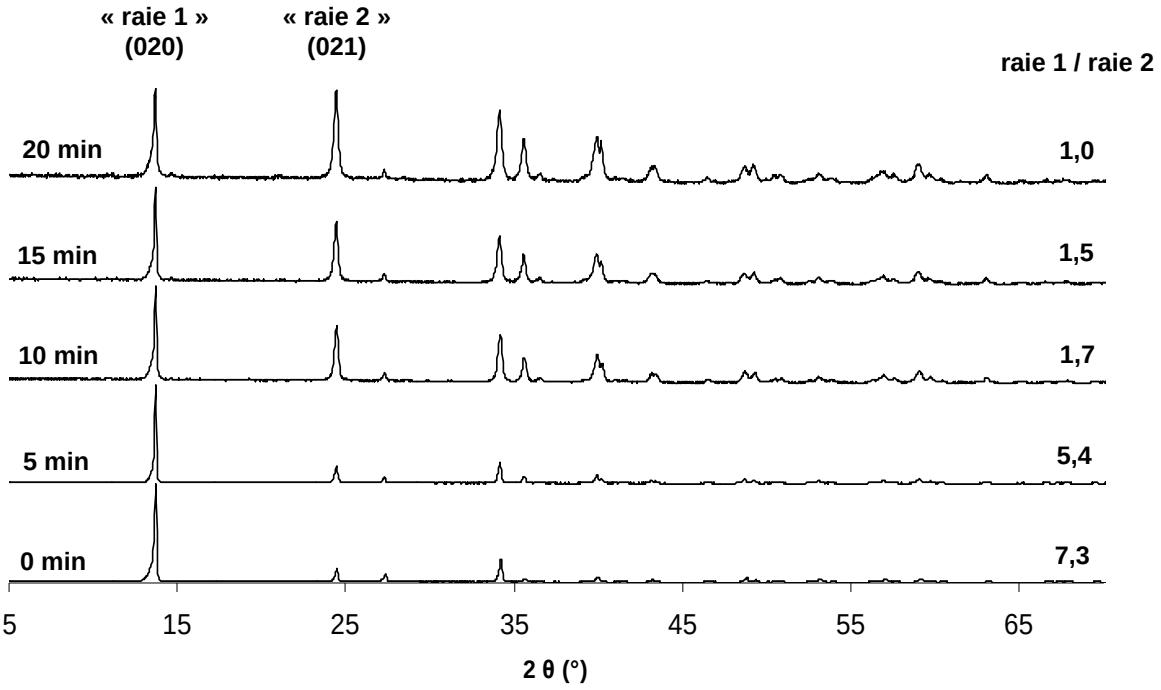


Figure II-19 : Évolution du diagramme de diffraction des rayons X du DCPD en fonction de la durée du broyage.

2.2.2. Comportement au broyage de la vatérite

Le comportement au broyage des deux vatérites, V1 et V2, a été étudié. La figure II-20 présente l'évolution du diamètre moyen des particules au cours du broyage. On observe que la taille moyenne des particules de vatérite 1 ne diminue pas significativement, même après 4 minutes de broyage.

En revanche, le diamètre moyen de la vatérite 2 est réduit de 2,3 à 1,8 µm en 8 minutes. L'observation par microscopie électronique à balayage (figure II-21) montre que ses particules ne sont pas réellement fragmentées lors du processus de broyage, mais qu'on assiste plutôt à une désagglomération des particules qui restent sous forme de lentilles. Pour des temps de broyage plus longs, les particules se ré-agglomèrent.

Ainsi, on peut considérer que la taille limite de la vatérite, dans nos conditions de broyage, est d'environ 1,8 µm, ce qui explique pourquoi les particules de V1, déjà en-deçà de cette taille, ne se broient pas.

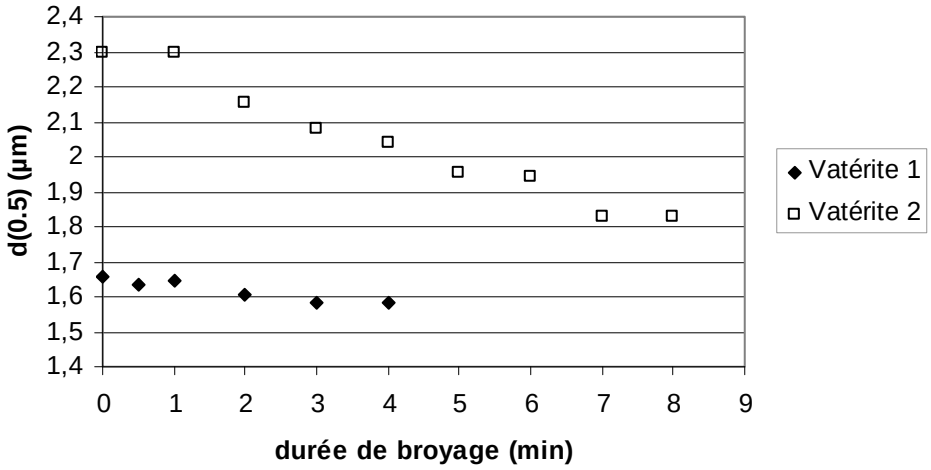
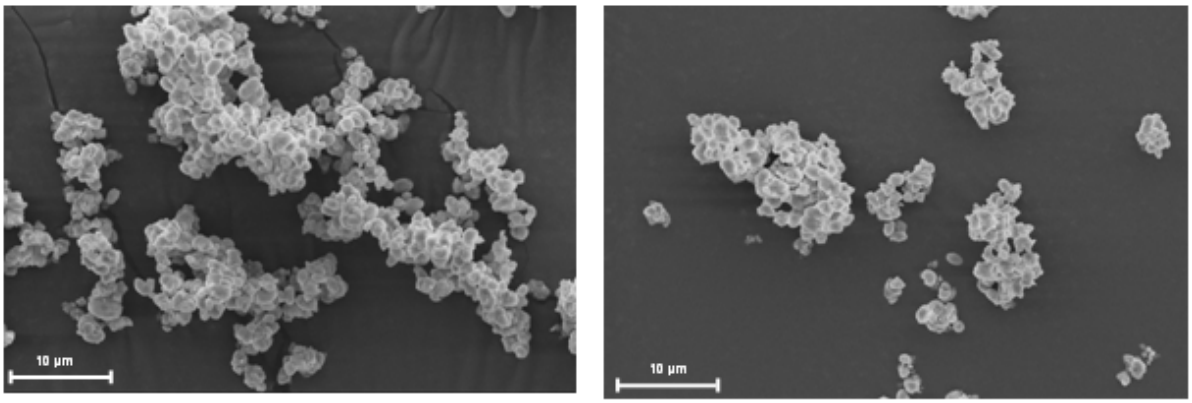


Figure II-20 : Évolution du diamètre moyen des particules des deux vatérites lors du broyage.



a). t = 4 min b). t = 8 min

Figure II-21 : Micrographies MEB montrant les particules de la vatérite 2 après différents temps de broyage.

Les caractérisations réalisées montrent que la distribution granulométrique de la vatérite 1 n'est que peu affectée par le procédé de broyage. Par conséquent, V1 sera utilisée non broyée dans la suite de notre étude.

Par ailleurs, les analyses par spectrophotométrie d'absorption infrarouge et diffraction des rayons X réalisées sur la vatérite V2 après broyage ont montré qu'elle n'est pas chimiquement modifiée par le traitement.

2.2.3. Comportement au broyage du $CaCO_3$ amorphe

L'étude du comportement au broyage du carbonate de calcium amorphe révèle qu'une taille limite de 3,3 µm est atteinte dès 4 minutes de broyage (voir figure II-22). L'agglomération des particules intervient ensuite rapidement, comme l'indique le $d_{0,5}$ mesuré après 5 minutes de traitement. Pour la suite de l'étude, et de manière similaire aux autres poudres, nous avons choisi de n'utiliser que le CCA de taille minimale (avant agglomération), c'est-à-dire après broyage durant 4 minutes.

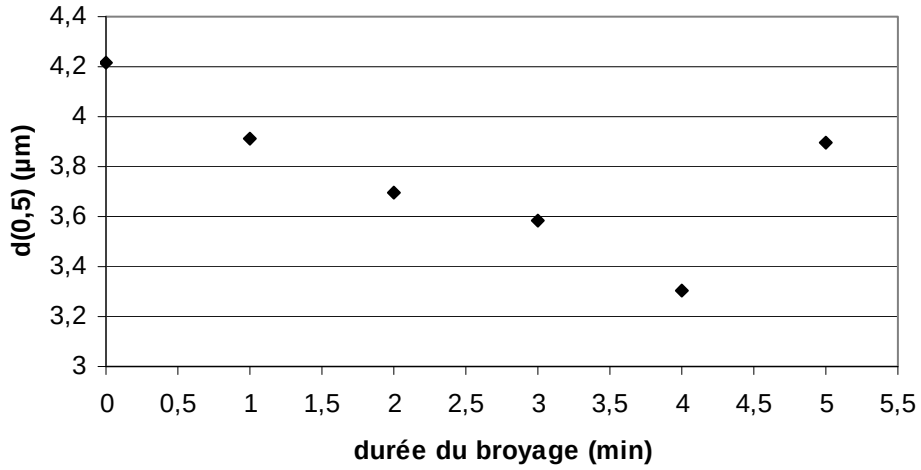
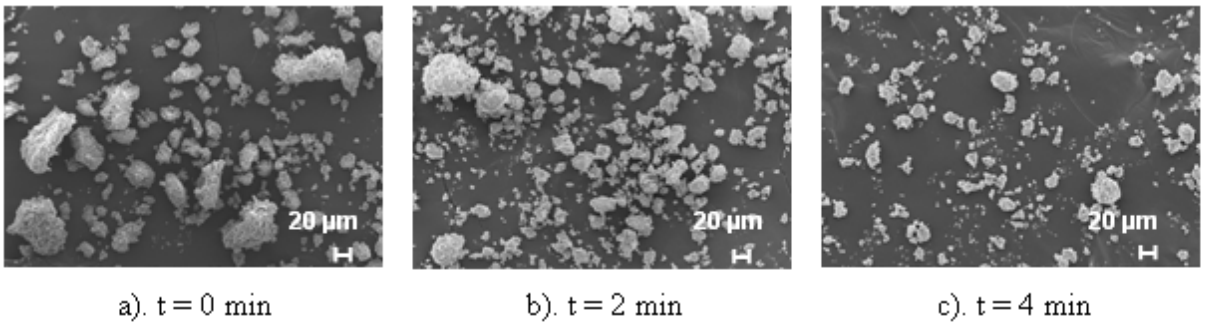


Figure II-22 : Évolution du diamètre moyen des particules du CCA avec la durée de broyage.

L'observation des particules au M.E.B. (figure II-23) montre que la diminution du $d_{0,5}$ observé sur la figure II-22 provient de la désagglomération des agrégats de particules formés lors de la lyophilisation du produit.



a). t = 0 min b). t = 2 min c). t = 4 min

Figure II-23 : Micrographies MEB au même grandissement présentant l'évolution des particules du CCA à différents temps de broyage.

Par ailleurs, le carbonate de calcium amorphe est un produit très instable et il a une forte tendance à cristalliser sous forme de calcite. Il est donc très important de vérifier, à la fois par spectrométrie d'absorption infrarouge et surtout par diffraction des rayons X qu'il n'a pas évolué sous l'effet de l'énergie mécanique apportée lors du broyage. Seuls les résultats de l'analyse par diffraction des rayons X sont présentés sur la figure II-24.

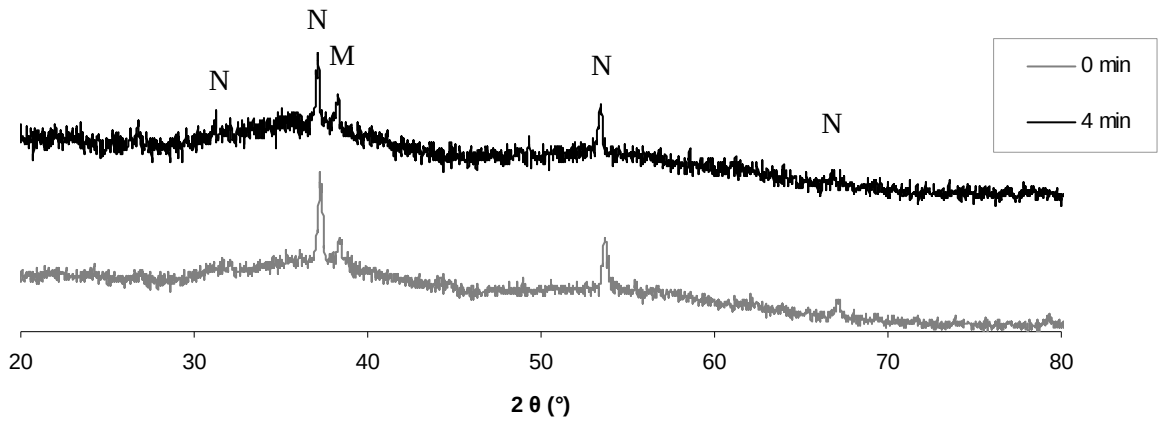


Figure II-24 : Comparaison des diagrammes de diffraction des R.X. du CCA non broyé et du CCA broyé 4 minutes; raies du NaCl (N), du $MgCO_3$ (M).

Lorsque le CCA contient du NH_4MgCl_3,6 H_2O, produit secondaire de la synthèse (figure II-8), celui-ci disparaît au cours du broyage, ce qui se traduit sur le diagramme de diffraction des rayons X par la disparition de plusieurs pics à $2\theta \approx 31°, 45°, 52°$. L'ammoniaque adsorbée sur les particules est en effet désorbée sous l'action mécanique des boulets. Cette conséquence du broyage est particulièrement positive en vue d'une utilisation du carbonate de calcium amorphe en tant que biomatériau.

2.3. Co-broyage de la phase solide des ciments étudiés

Cette partie est consacrée à l'étude du comportement au co-broyage des phases solides utilisées pour l'élaboration des deux ciments. Nous nous intéresserons tout d'abord à l'étude de la phase solide du ciment mixte $CaCO_3$-CaP, puis à celle du ciment $CaCO_3$.

Cette étude s'appuie sur des analyses granulométriques, morphologiques et chimiques réalisées sur des échantillons prélevés à différents intervalles de temps dans la chambre de broyage.

2.3.1. Comportement au co-broyage : étude du ciment mixte $CaCO_3$-CaP

La phase solide du ciment mixte est composée de brushite et de vatérite, avec un rapport massique de 1:1. La phase solide est préparée par pesée de 5g de brushite et de 5g de vatérite ; ces poudres sont introduites dans la chambre de broyage puis co-broyées.

La figure II-25 présente l'évolution du diamètre moyen des particules de la phase solide au cours du co-broyage. Qu'elle soit préparée avec la vatérite 1 ou la vatérite 2, on observe que la phase solide se comporte de la même façon : une taille limite d'environ **2,7 µm** est atteinte après une durée de co-broyage quasiment équivalente.

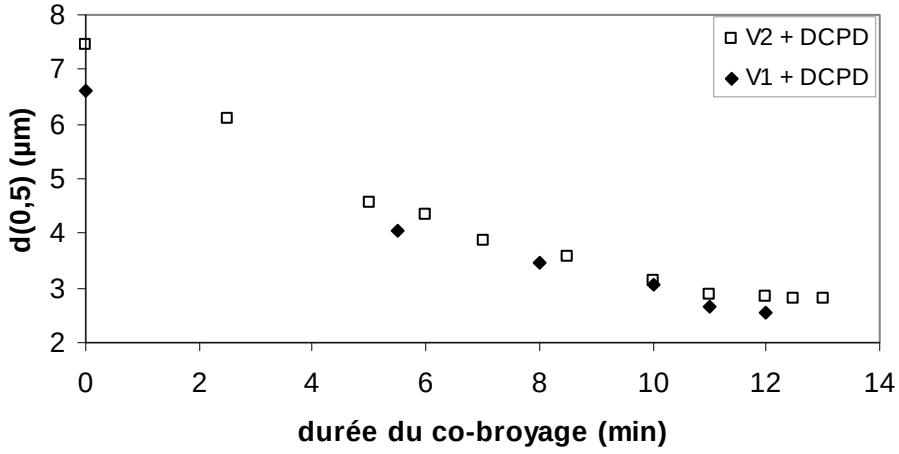


Figure II-25 : Évolution au cours du co-broyage du diamètre moyen des particules de la phase solide préparée avec la vatérite V1 ou V2.

Le comportement de la phase solide lors du co-broyage étant similaire qu'elle soit préparée avec V1 ou avec V2, nous ne détaillerons que les résultats obtenus pour V1.
Si on s'intéresse de plus près à l'évolution de la phase solide préparée avec V1, on observe qu'on a une distribution granulométrique bimodale au temps initial, ce qui reflète la présence de deux poudres de granulométries différentes : la vatérite 1 et le DCPD (figure II-26). Le

premier pic (à gauche sur le graphique) correspond aux particules de vatérite (environ 1,7 µm) et le second aux particules de brushite (autour de 9 µm). On a donc une phase solide constituée de deux composants avec des distributions de tailles de particules suffisamment distinctes pour être identifiées sans ambiguïté sur la distribution granulométrique du mélange. L'observation par microscope électronique à balayage (figure II-27-a) montre en effet que les plaquettes de brushite sont entières et dissociées des lentilles de vatérite.

Au cours du co-broyage, on observe que le nombre de particules de plus grande taille diminue au profit de celles de plus petite taille car les plaquettes de DCPD sont fragmentées (figure II-27-b). Par ailleurs, les particules de vatérite se collent au-fur-et-à-mesure sur les fragments de brushite (figure II-27-c et d). Après 10 minutes de co-broyage, les particules de petites tailles deviennent prépondérantes. Les fragments du DCPD ont une taille de plus en plus réduite et l'alternance entre fragmentation et agglomération permet de former un mélange intime entre les deux constituants (figure II-27-e et f).Après 13 minutes, on obtient une distribution large mais monomodale : les particules de brushite et de vatérite se sont agglomérées lors du co-broyage.

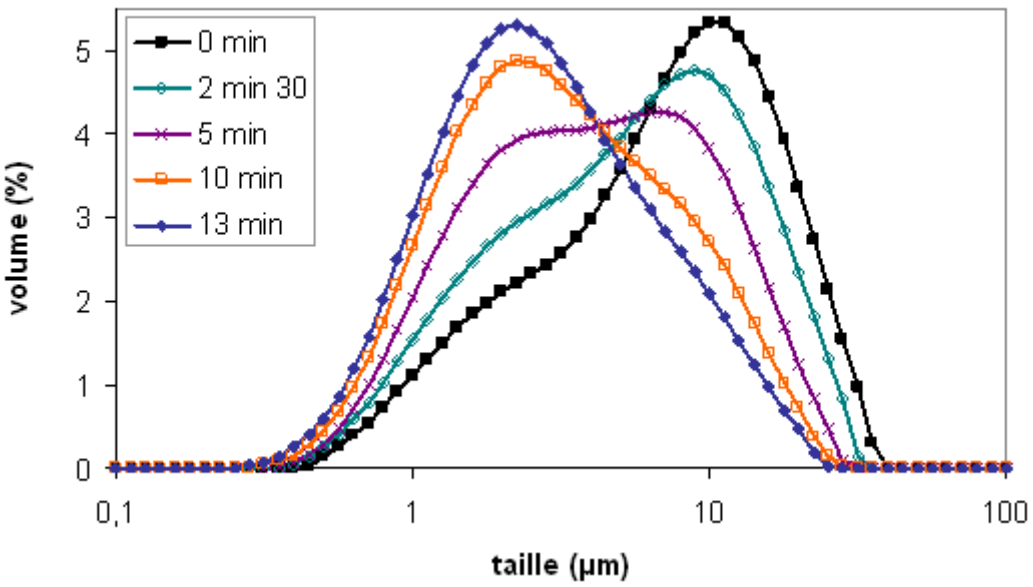


Figure II-26 : Évolution de la distribution granulométrique de la phase solide préparée avec la vatérite V1 au cours du co-broyage.

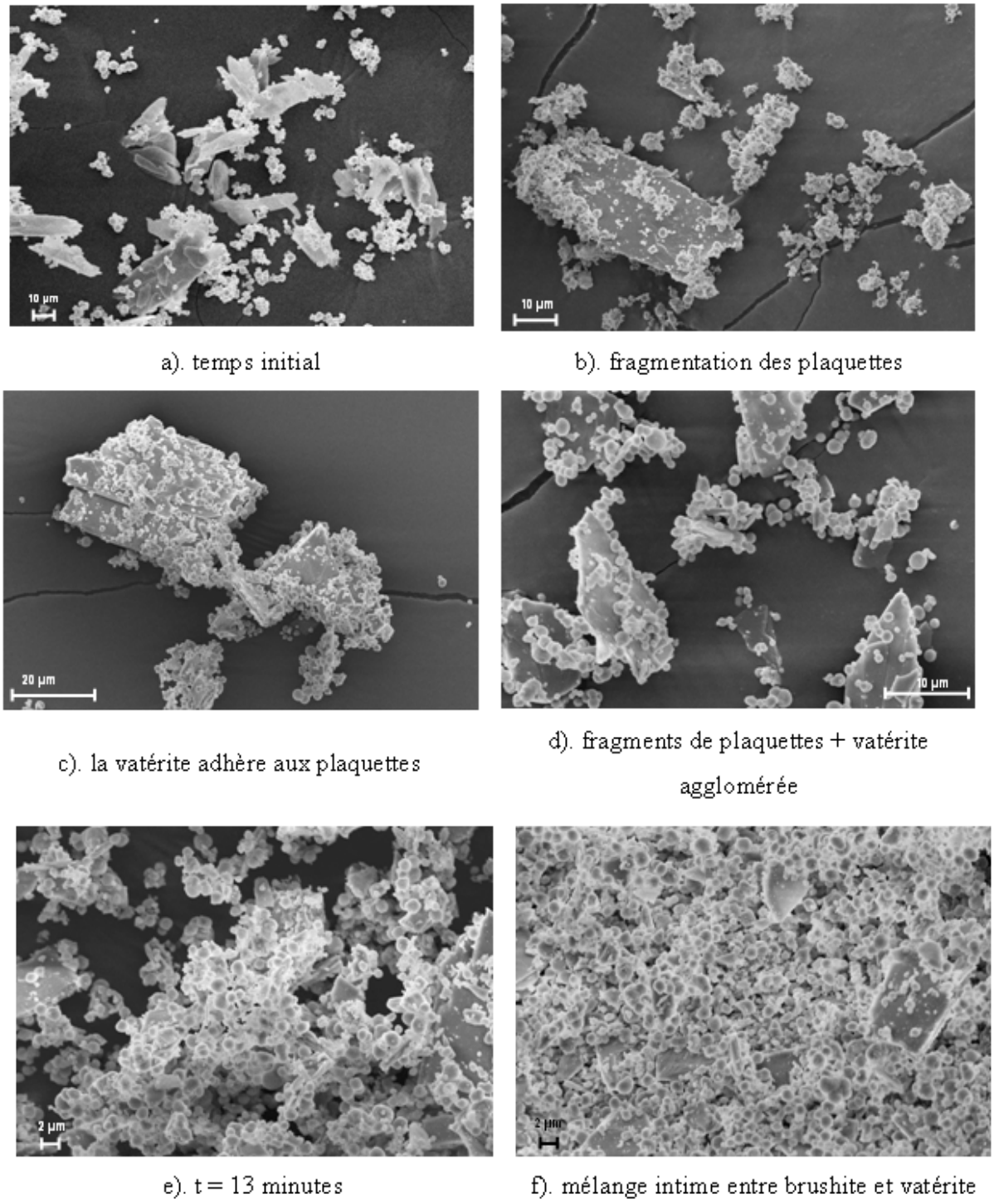


Figure II-27 : Micrographies MEB de la phase solide préparée avec la vatérite V1 : évolution lors du co-broyage.

Les diagrammes de diffraction des rayons X présentés sur la figure II-28 prouvent que la composition de la phase solide n'a pas été modifiée par le co-broyage : on retrouve les raies caractéristiques de la brushite et de la vatérite. Notons que l'orientation préférentielle de la

brushite diminue légèrement avec le co-broyage, mais pas autant que durant le broyage de la poudre seule (cf. figure II-19).

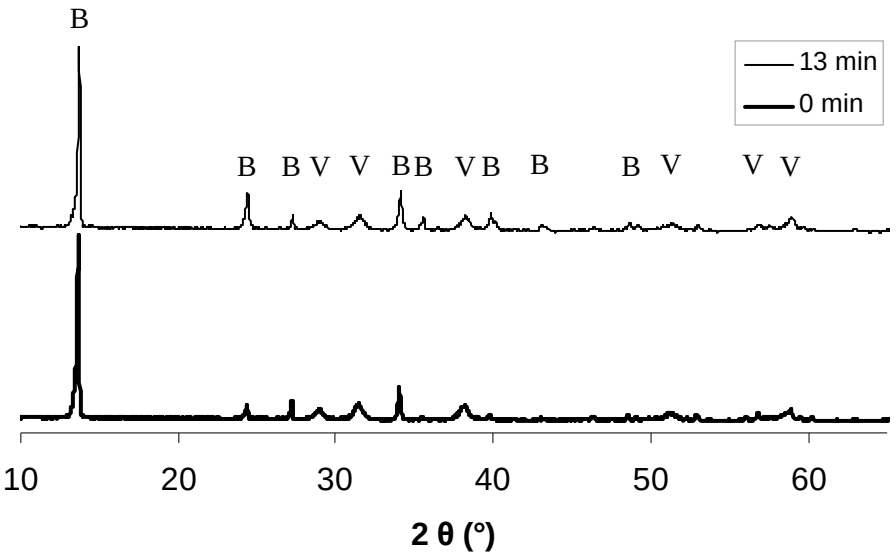


Figure II-28: Diffractogrammes de rayons X de la phase solide non broyée et co-broyée pendant 13 minutes ; raies de la brushite (B) et de la vatérite 1 (V).

2.3.2. Comportement au co-broyage : étude du ciment $CaCO_3$

La phase solide de ce ciment est composée uniquement de carbonate de calcium. Sa composition massique comprend 2/3 de vatérite et 1/3 de carbonate de calcium amorphe. Notons que cette étude a été réalisée avec la vatérite 1.

La figure II-29 présente la distribution granulométrique de la phase solide. Contrairement au ciment $CaCO_3$-CaP, la distribution est monomodale car les deux composants ont des tailles initiales proches. De plus, la distribution granulométrique évolue peu lors du co-broyage. Par conséquent, le diamètre moyen des particules, calculé d'après cette distribution, ne varie pas non plus significativement (figure II-30). Le $d_{0,5}$ initial est de 1,9 µm, c'est-à-dire inférieur à la taille limite de broyage observée pour le CCA (3,3 µm) et du même ordre de grandeur que celle de la vatérite (1,8 µm). L'apparition d'une population de petits fragments de $CaCO_3$ amorphe de tailles comprises entre 0,2 et 0,3 µm, en partie compensée par l'agglomération des lentilles de vatérite sur le CCA, explique la faible diminution du $d_{0,5}$, de 1,9 à 1,7 µm.

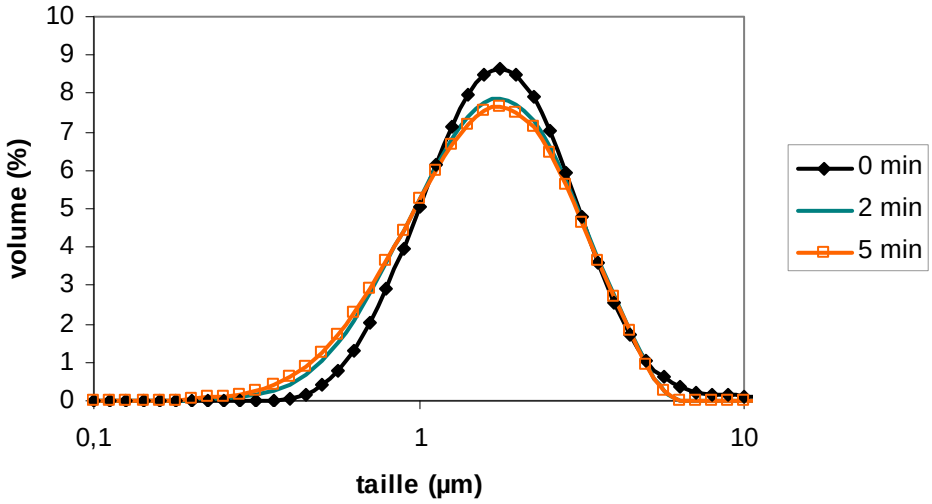


Figure II-29 : Évolution de la distribution granulométrique de la phase solide lors du co-broyage.

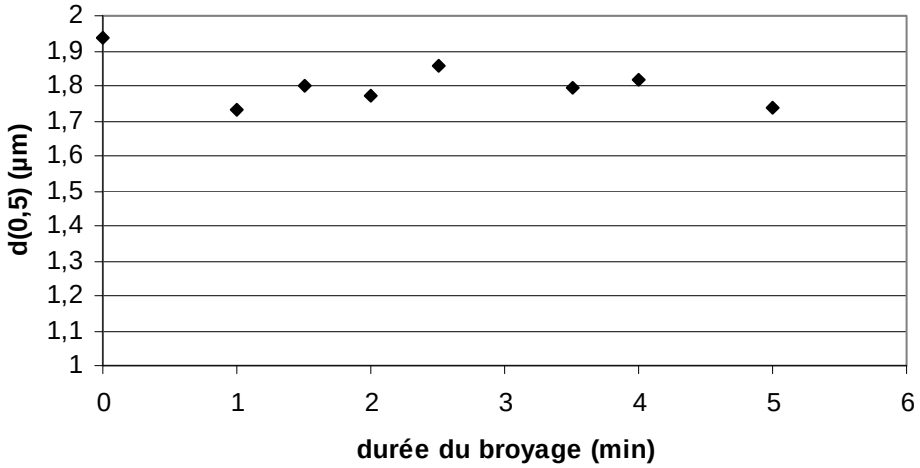


Figure II-30 : Évolution du diamètre moyen de la phase solide lors du co-broyage.

La figure II-31 illustre l'évolution morphologique de la phase solide lors du co-broyage : au temps initial, les particules de CCA et de vatérite simplement mélangées sont relativement séparées et présentent peu d'interaction (figure II-31-a). Très rapidement, les lentilles se collent sur les particules de carbonate de calcium amorphe, plus grosses, ainsi que sur les quelques fragments produits par le broyage ; il reste de moins en moins de particules de vatérite isolées (figure II-31-b et c). Après 5 minutes, on obtient des agglomérats à l'intérieur desquels les particules de $CaCO_3$ amorphe et de vatérite sont en contact intime (figure II-31-d).

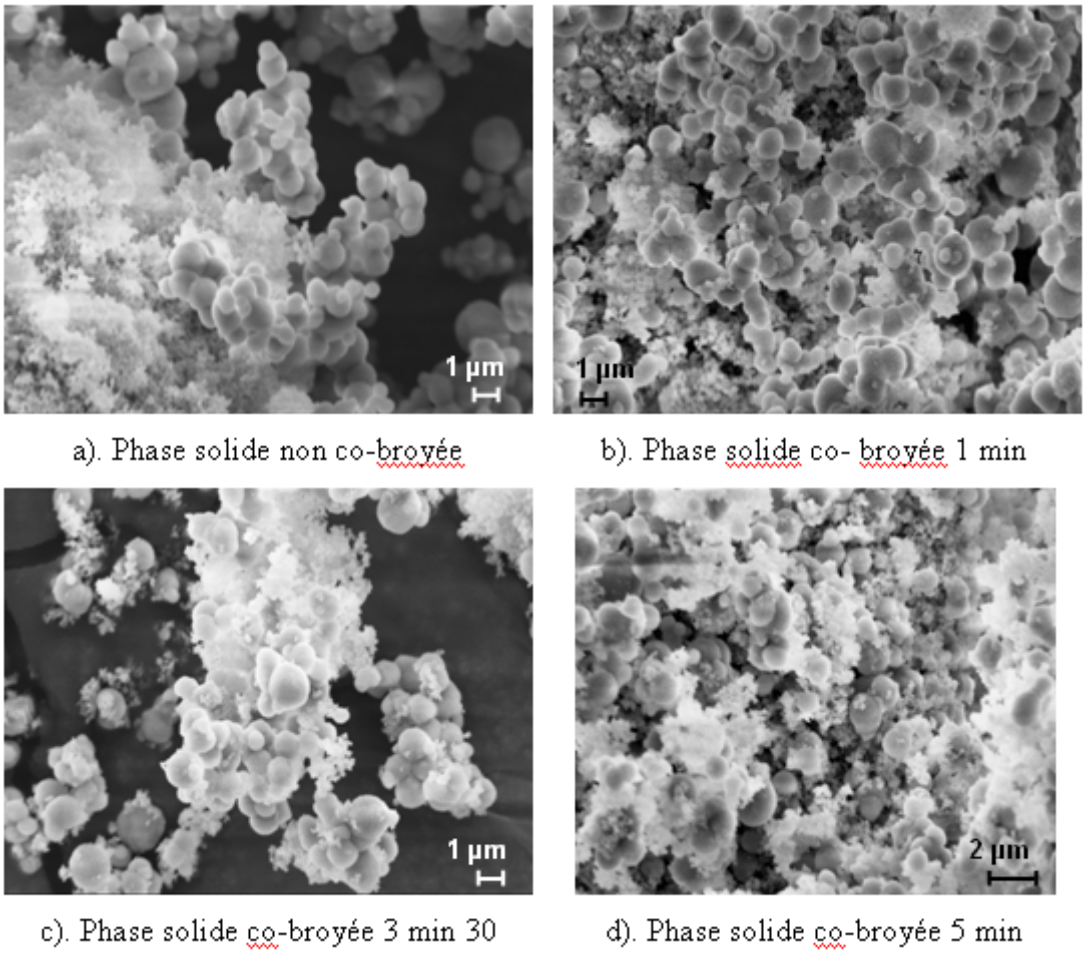


Figure II-31 : Micrographies MEB présentant l'évolution de la phase solide du ciment $CaCO_3$ après différents temps de co-broyage.

Les analyses physico-chimiques montrent que la phase solide n'évolue pas pendant le co-broyage (figure II-32). Le diffractogramme des rayons X présente en effet les raies caractéristiques de la vatérite et du NaCl provenant de l'amorphe. Les halos de diffraction du CCA sont masqués par les pics de diffraction de la vatérite qui les écrasent. De plus, l'absence de calcite ou d'aragonite montre que le carbonate de calcium amorphe n'a pas cristallisé durant le procédé.

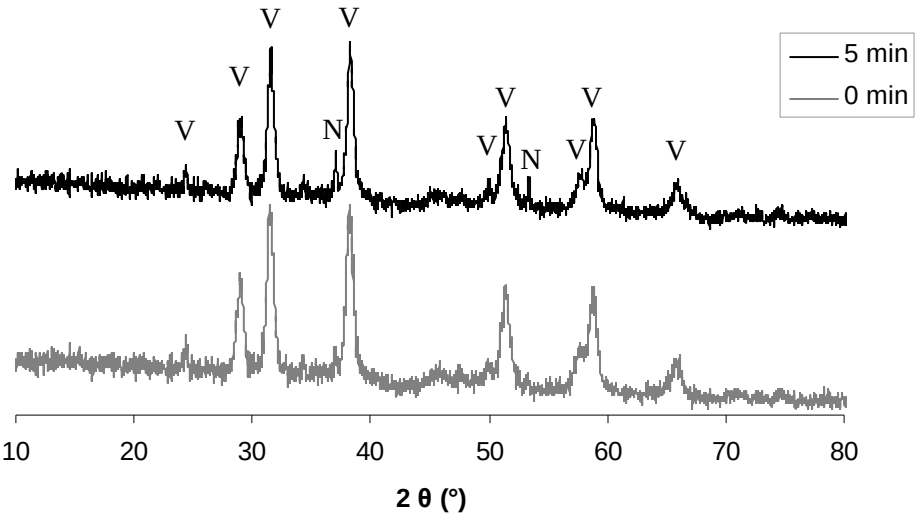


Figure II-32 : Diffractogrammes de rayons X présentant l'évolution de la phase solide du ciment $CaCO_3$ lors du co-broyage ; raies de la vatérite (V) et du NaCl (N).

3. Conclusions

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la synthèse et aux traitements des poudres réactives qui seront utilisées dans la suite de ce travail pour l'élaboration des ciments et l'étude de leurs propriétés. Les synthèses des trois poudres ont été décrites. En particulier, un nouveau protocole de synthèse de la vatérite a été mis au point ; il permet de synthétiser plus de produit et d'obtenir une vatérite chimiquement pure (absence de toute trace de calcite).

Nous avons étudié le comportement des poudres broyées individuellement à l'aide d'un broyeur à boulets de laboratoire. Pour les trois produits, la taille minimale est atteinte en moins d'une demi-heure. Seules les particules de brushite sont significativement modifiées lors du procédé de broyage : leur taille moyenne est réduite de 9,2 à 2,7 µm et la morphologie de ses particules est changée. Les mécanismes de fragmentation de cette poudre ont été identifiés. En ce qui concerne la vatérite et le carbonate de calcium amorphe, ils sont seulement désagglomérés.

Les analyses physico-chimiques par spectrophotométrie d'absorption infrarouge et diffraction des rayons X prouvent qu'aucun des trois produits métastables n'évolue ou ne recristallise lors du broyage.

Le co-broyage des deux phases solides a été réalisé, également **sans modification de la composition et de la structure des constituants de chaque phase solide** (absence de recristallisation)**.** Ce procédé a permis d'obtenir des mélanges homogènes, avec une surface de contact augmentée entre les particules réactives constituants la phase solide. Pour ce qui est de la phase solide du ciment mixte, le traitement par co-broyage a permis de réduire significativement le diamètre moyen des particules jusqu'à une taille limite de 2,7 µm environ.

Par ailleurs, les durées optimum de co-broyage, c'est-à-dire avant agglomération des particules, sont courts pour les deux phases solides (13 min pour le ciment $CaCO_3$-CaP et 5 min pour le ciment $CaCO_3$), ce qui représente un atout important en vue d'un développement industriel des ciments. De plus, les conditions de co-broyage choisies permettent d'obtenir de façon reproductible une phase solide avec des caractéristiques physiques de taille et de morphologie bien contrôlées.

Les phases solides obtenues via ces traitements de broyage ou de co-broyage peuvent servir à préparer les deux types de ciments et à étudier l'influence des caractéristiques physiques des particules de la phase solide sur leurs propriétés d'usage.

CHAPITRE III :

ETUDE DE L'INFLUENCE DU BROYAGE ET DU CO-BROYAGE SUR LES PROPRIETES D'USAGE DU CIMENT

Chapitre III :
Étude de l'influence du broyage et du co-broyage sur les propriétés d'usage du ciment

Ce chapitre traite de l'influence du broyage et du co-broyage des poudres réactives constituant la phase solide d'un ciment sur les propriétés de la pâte (injectabilité, temps de prise) et du ciment une fois pris (composition, propriétés mécaniques, porosité).
La première partie du chapitre est consacrée à une revue bibliographique sur ces différents points. Les deux parties qui suivent développent et discutent les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse, tout d'abord sur le ciment préparé à partir du mélange $CaCO_3$-CaP, plus particulièrement développé dans ce chapitre, puis sur le ciment uniquement à base de $CaCO_3$.

1. Revue bibliographique

Une des propriétés majeures d'un ciment hydraulique à laquelle nous nous intéresserons dans la suite de ce chapitre est sa capacité à être injectable, sans laquelle il serait impossible d'employer des techniques chirurgicales peu invasives. Cette revue bibliographique débute donc par une mise au point sur l'injectabilité des ciments minéraux.
Ensuite, elle abordera l'influence de l'évolution des poudres réactives au cours des traitements de broyage et de co-broyage sur les propriétés de la pâte après gâchage et du ciment après prise.

1.1. Injectabilité d'un ciment

La capacité à être injectable est l'un des avantages principaux d'un ciment vis-à-vis des céramiques classiques. Cette partie abordera donc la question de la définition du terme

« injectabilité », la méthode de mesure de cette propriété et les diverses voies envisagées pour l'améliorer.

1.1.1. Comment définir l'injectabilité ?

L'injectabilité des ciments biomédicaux est un concept récent ; par conséquent il n'existe pas, à notre connaissance, de définition reconnue par la communauté scientifique. C'est une propriété propre aux formes visqueuses (pâtes, gels…) et en particulier aux ciments, qui peuvent être injectés sous forme de pâte puis prendre et durcir *in-situ*, contrairement aux céramiques qui doivent être implantées sous forme de blocs massifs à géométrie prédéfinie.

De manière générale, nous pouvons définir l'injectabilité d'un ciment comme *la possibilité d'extruder un ciment à l'aide d'une seringue pour l'injecter dans le milieu biologique*. Une pâte est donc injectable si elle peut être injectée dans la cavité à combler par un dispositif de type seringue munie éventuellement d'un cathéter, **sans que cela ne modifie son intégrité**.

Trois facteurs majeurs sont à prendre en compte pour définir l'injectabilité d'un ciment :

- la pression d'injection (le ciment doit être injectable manuellement par tout chirurgien sans demander un effort trop important).
- le phénomène de séparation de phases qui ne doit pas avoir lieu : en effet, certains ciments minéraux font preuve d'une démixtion de phases dans le corps de la seringue lors de l'application d'une pression ; elle conduit à l'extrusion d'une pâte fluide et à la formation d'un « gâteau » (masse solide) qui reste dans la seringue et bloque le passage de la pâte restante : ce phénomène est aussi appelé « **filtre-pressage** ».
- l'évolution de la structure du ciment au cours du temps (due à la réaction de prise), ce qui a deux conséquences principales pour l'injectabilité : la diminution de cette dernière avec le temps, et une altération des propriétés finales du ciment s'il est injecté trop longtemps après gâchage [Liu et coll., 2006-a]. C'est pourquoi il est important de prendre en compte les temps caractéristiques du ciment au cours d'une étude sur l'injectabilité.

La multiplicité des phénomènes à prendre en compte rend délicate la définition de ce concept. C'est pourquoi, la plupart des définitions proposées dans la littérature ne prennent en compte

qu'une partie de ces phénomènes ; la comparaison des résultats expérimentaux d'une étude à l'autre est alors difficile voire impossible. Par exemple, si l'on ne considère que la pression d'injection, il est préconisé de diminuer les forces de friction, généralement liées à la viscosité du ciment, pour diminuer la pression et ainsi augmenter l'injectabilité. Si en revanche on considère qu'un ciment est injectable si le phénomène de séparation de phases n'a pas lieu, diminuer la viscosité du ciment devrait diminuer sa cohésion et donc son injectabilité.

Par conséquent, plusieurs publications pointent le besoin de développer une **définition standard de l'injectabilité** en tant que **propriété intrinsèque** du ciment. Il est nécessaire que ce soit une propriété mesurable : il faut donc également définir une **méthode de mesure de l'injectabilité** indépendante du dispositif de mesure [Bohner et Baroud, 2005-a ; Khairoun et coll., 1998-a ; Lewis, 2006].

1.1.2. Comment mesurer l'injectabilité ?

Il n'existe pas, à notre connaissance, de norme décrivant le protocole à suivre pour quantifier l'injectabilité d'une pâte. Les définitions de ce terme variant d'un groupe de recherche à un autre, différents dispositifs et protocoles de mesure de l'injectabilité ont été proposés. L'annexe C répertorie différentes stratégies ainsi que les conditions opératoires utilisées dans ces études.

Une des définitions du terme injectabilité, utilisée par plusieurs auteurs, est l'absence de séparation de phase. L'injectabilité est alors mesurée en pourcentage de pâte qu'il est possible d'extruder (en masse ou en volume), selon l'équation suivante :

$$Injectabilité\ (\%) = \frac{Masse\ (ou\ volume)\ de\ pâte\ extrudée\ de\ la\ seringue\ \times 100}{Masse\ (ou\ volume)\ totale\ de\ pâte\ insérée\ dans\ la\ seringue} \qquad \text{(éq. III-1)}$$

Il faut noter que, même lorsque les auteurs s'accordent sur cette définition, certains mesurent la quantité de pâte extrudée en s'arrêtant à une force d'injection limite (cas majoritaire), d'autres en s'arrêtant après un temps d'extrusion donné, d'autres indépendamment de ces deux critères.

Cette méthode de mesure a plusieurs inconvénients :

- il existe une **limite supérieure d'injectabilité** lorsqu'elle est mesurée ainsi, car il reste toujours une quantité minimale de ciment dans la seringue [Khairoun et coll., 1998-a]. Les auteurs sont alors amenés à définir une « injectabilité idéale » [Khairoun et coll., 1998-a] ou « injectabilité complète » [Gbureck et coll., 2004].
- l'injectabilité augmente lorsqu'on augmente la quantité de ciment introduite au départ dans la seringue, car il y reste toujours à peu près la même quantité après extrusion. Bohner et Baroud [2005-a] s'affranchissent de ce problème en calculant, pour chaque volume de ciment introduit, l'injectabilité maximum qu'il est possible d'atteindre.

Dans tous les cas, la méthode de mesure ne peut pas être complètement indépendante des paramètres de mesure : force et vitesse d'injection, géométrie de la seringue, quantité de pâte testée sont autant de variables à contrôler.

1.1.3. Comment améliorer l'injectabilité ?

De nombreux facteurs influencent l'injectabilité d'un ciment et permettent de l'améliorer. La synthèse des études réalisées sur le sujet permet de souligner l'influence des paramètres suivants :

- la **forme des particules de la phase solide** [Bohner et Baroud, 2005-a].

- la **taille moyenne et la surface spécifique des particules de la phase solide** [Baroud et coll., 2005 ; Bohner et Baroud, 2005-a ; Delgado et coll., 2005 ; Gbureck et coll., 2005 ; Lewis, 2006 ; Liu et coll., 2006-a].

- la **distribution de taille des particules de la phase solide** [Bohner et Baroud, 2005-a; Gbureck et coll., 2005 ; Lewis, 2006].

- les **interactions inter-particulaires** [Sarda et coll., 2002 ; Barralet et coll., 2004 ; Gbureck et coll., 2004 ; Bohner et Baroud, 2005-a ; Gbureck et coll., 2005 ; Liu et coll., 2006-b].

Ces propriétés peuvent être modifiées par les traitements de broyage et de co-broyage des poudres réactives ; par conséquent, leur influence sur l'injectabilité de la pâte sera plus particulièrement détaillée dans la suite du chapitre. D'autres paramètres clés ont également été soulignés, à savoir :

- la **composition du ciment** (phase liquide et phase solide) et l'**incorporation d'additifs** dans l'une ou l'autre des deux phases [Khairoun et coll., 1998-a ; Barralet et coll., 2004 ; Baroud et coll., 2005 ; Bohner et Baroud, 2005-a ; Burguera et coll., 2006 ; Delgado et coll., 2005 ; Gisep et coll., 2006 ; Lewis, 2006 ; Wang et coll., 2006].

- la **charge de surface des particules** [Barralet et coll., 2004 ; Gbureck et coll., 2005].

- le **rapport liquide/solide** (L/S) : l'injectabilité du ciment est améliorée lorsque la proportion L/S est augmentée [Khairoun et coll., 1998 ; Barralet et coll., 2004 ; Baroud et coll., 2005 ; Bohner et Baroud, 2005-a ; Gbureck et coll., 2005 ; Lewis, 2006 ; Burguera et coll., 2008 ; Habib et coll., 2008].

- la **méthode de mélange des phases** solide et liquide qui influe sur la viscosité du mélange [Gbureck et coll., 2005 ; Lewis, 2006] : le fait de compacter ou non la pâte ciment influe également sur son injectabilité.

- le **temps après mélange (phase liquide + phase solide)** [Khairoun et coll., 1998 ; Bohner et Baroud, 2005-a].

- le **temps de prise du ciment** [Bohner et Baroud, 2005-a].

- le **temps de vieillissement de la phase solide** préparée par broyage [Khairoun et coll., 1998].

Notons que tous ces facteurs ne sont généralement pas sans influence sur d'autres propriétés du ciment (cohésion, propriétés mécaniques,…).

Bien-sûr, le protocole expérimental de mesure de l'injectabilité est également à prendre en compte. En effet, un changement de la **géométrie du système d'injection** [Barralet et coll.

2004 ; Bohner et Baroud, 2005-a] et en particulier du diamètre de l'aiguille placée en bout de seringue modifie la mesure de l'injectabilité. Théoriquement, l'injectabilité du ciment est augmentée avec une seringue courte et de diamètre plus grand. Le **débit du ciment** ou la vitesse d'injection [Bohner et Baroud, 2005-a ; Habib et coll., 2008] ont également une influence. Théoriquement, dans le cas de fluides newtoniens, l'injectabilité du ciment est augmentée pour un débit plus petit.

Ces deux derniers points sont totalement indépendants du ciment et par conséquent toute pâte peut-être déclarée « injectable » si un dispositif approprié est utilisé. C'est aussi ce qui rend la définition du terme « injectabilité » aussi délicate, et c'est pourquoi un protocole de mesure standardisé serait nécessaire.

1.2. Influence du procédé de broyage sur la composition et les propriétés des ciments

Les procédés de broyage et de co-broyage modifient différentes caractéristiques des poudres réactives : la taille moyenne, la distribution de taille, la surface spécifique, la morphologie, les états d'agglomération et de mélange des particules de la phase solide. Ces variations peuvent engendrer à leur tour des modifications des propriétés de la pâte ainsi que du ciment pris, lesquelles sont détaillées dans cette revue bibliographique.

1.2.1. Influence du procédé de broyage sur les propriétés de la pâte

Une fois un ciment hydraulique gâché, il forme une pâte malléable qui évolue au cours du temps vers une céramique dure. Les principales propriétés de cette pâte, abordées dans le paragraphe suivant, sont sa facilité à être injectée et la vitesse avec laquelle elle se transforme, c'est-à-dire la cinétique et le temps de prise.

1.2.1.1. Injectabilité de la pâte

Peu d'études systématiques ont été menées sur l'influence de la taille moyenne et de la morphologie des particules de la phase solide sur l'injectabilité d'un ciment. De plus, à notre connaissance, aucune étude appliquée aux ciments biomédicaux n'a été réalisée à ce jour sur l'apport du co-broyage de la phase solide sur les propriétés d'injectabilité.
Nous nous intéresserons dans ce paragraphe à l'influence des caractéristiques de la phase solide sur l'injectabilité du ciment de manière générale, puis plus particulièrement sur le phénomène de séparation de phase qui peut avoir lieu lors de l'injection et qui, en bloquant le passage de la pâte, diminue son injectabilité.

La relation entre la taille moyenne des particules de la phase solide et l'injectabilité de la pâte est loin d'être simple car il faut également tenir compte de la variation continue de la distribution de taille des particules d'un ciment lors de la réaction de prise [Bohner et Baroud, 2005-a], phénomène qui peut de plus être accentué par les procédés de broyage ou de co-broyage, connus pour accroître la réactivité des poudres.
Par conséquent, si broyer les constituants d'un ciment pourrait augmenter l'injectabilité, cette augmentation ne sera que temporaire puisque la prise du ciment est plus rapide [Bohner et Baroud, 2005-a].

- ✓ *Influence de la taille moyenne des particules de la phase solide sur l'injectabilité de la pâte*

Les études montrent que, lorsque la taille moyenne des particules de la phase solide diminue, la viscosité de la pâte augmente [Ginebra et coll., 2004 ; Baroud et coll., 2005 ; Liu et coll., 2006-a].
Ginebra et coll. [2004] précisent également qu'ils obtiennent « comme prévu » une pâte plus épaisse car la surface spécifique des particules de la phase solide augmentant, une quantité plus importante d'eau peut être adsorbée à leur surface. Par conséquent, la pâte obtenue est moins injectable.
Delgado et coll. [2005] observent également une diminution de l'injectabilité lorsque des particules plus fines sont utilisées. Ils expliquent ce phénomène par l'augmentation des interactions entre les particules et les phénomènes de floculation qui en résultent. En effet,

s'ils ajoutent un additif qui réduit les interactions inter-particulaires, alors l'injectabilité augmente avec la finesse de la poudre.

- ✓ *Influence de la distribution de taille des particules de la phase solide sur l'injectabilité de la pâte*

Gbureck et coll. [2005] ont étudié l'influence de la distribution de taille des particules de la phase solide d'un ciment : pour leur étude, ils ont ajouté dans leur phase solide initiale, de distribution monomodale, de 13 à 33 % en masse d'additifs (TiO_2, $CaCO_3$, DCPA) de granulométrie fine afin d'obtenir une distribution de taille bimodale. Le but est d'augmenter la fraction de volume solide : les petites particules se logent dans les interstices entre les particules de taille supérieure, sans modifier leur empilement. La différence de taille entre les fines et les particules initiales déterminerait ainsi l'empilement des particules au sein de la pâte et donc les propriétés rhéologiques de celle-ci.

Dans ces conditions, les auteurs observent :

- une diminution de la quantité minimale de liquide qui doit être ajoutée à la poudre pour former une pâte plastique,
- une diminution de la viscosité du ciment,
- et, par conséquent, une nette augmentation de l'injectabilité de la pâte.

La diminution de viscosité et l'augmentation de l'injectabilité de la pâte pourraient être expliquées par la réduction de l'espace inter-particulaire qui augmenterait l'effet de répulsion électrostatique entre deux particules.
Cependant, la quantité d'additifs doit être optimisée : il existerait un pourcentage massique de particules fines pour lequel l'injectabilité serait maximale.

Notons que la distribution de taille des particules influence également l'injectabilité des ciments acryliques : il est nécessaire d'optimiser la distribution de la taille des particules pour obtenir des propriétés rhéologiques maximales [Hernández et coll., 2006].

✓ *Influence de l'état d'agglomération des particules de la phase solide sur l'injectabilité de la pâte*

De manière générale, les auteurs observent une augmentation de l'injectabilité lorsque les particules de la phase solide sont désagglomérées :

- une dispersion efficace des agglomérats de particules grâce à l'utilisation d'un additif (répulsion électrostatique) engendre un effet « liquéfiant » des pâtes à base de phosphates de calcium : leur injectabilité est augmentée [Delgado et coll., 2005 ; Gbureck et coll., 2005].
- l'ajout d'un agent floculant augmente la viscosité de la pâte alors que l'ajout d'un agent qui disperse les agrégats la diminue [Baroud et coll., 2005]. Notons cependant que ces deux agents augmentent l'injectabilité.

✓ *Influence de ces paramètres sur le phénomène de séparation de phase ou « filter-pressing », approche théorique*

Pour avoir une approche théorique du phénomène de séparation de phases, Bohner et Baroud [2005-a] ont choisi comme modèle une pâte qui, à l'inverse d'un ciment, n'évolue pas au cours du temps (aucune réaction de prise). Une suspension de phosphate de calcium tricalcique (β-TCP) dans l'eau est utilisée expérimentalement pour appuyer leur modèle théorique.

Ce modèle permet de tirer deux conclusions principales : l'injectabilité d'une pâte peut être augmentée en diminuant la taille des particules ou en diminuant la limite de plasticité (LP) des poudres réactives. Cette dernière est définie comme la quantité minimale de liquide qui doit être ajoutée à la poudre pour former une pâte plastique. En deçà de cette limite, la pâte est friable ; au-dessus, on obtient une pâte cohésive et malléable.

En effet, selon le modèle proposé par Bohner et Baroud [2005-a], l'épaisseur du gâteau qui bloque la progression de la pâte vers l'extrémité de la seringue est :

- proportionnelle au diamètre des particules,
- inversement proportionnelle à (L/S - LP),

Pour augmenter l'injectabilité en gardant L/S constant, il faut diminuer l'épaisseur du gâteau et donc diminuer LP. Les auteurs proposent plusieurs stratégies pour ce faire :

- contrôler la taille des particules en la diminuant,
- contrôler la distribution de taille des particules en favorisant des distributions granulométriques multimodales,
- contrôler la morphologie des particules en utilisant des particules sphériques plutôt que de formes irrégulières,
- contrôler l'état d'agglomération des poudres réactives et les interactions inter-particulaires en utilisant des poudres complètement désagglomérées.

Toutes ces caractéristiques de la phase solide peuvent être modifiées par le procédé de broyage, comme vérifié par les auteurs : LP diminue. Ceci pourrait, selon eux, être expliqué soit par un élargissement de la distribution de taille des particules, soit par la désagglomération des particules.

✓ *Conclusions*

Parmi tous les facteurs susceptibles d'influencer l'injectabilité d'un ciment, certains sont plus aisés à contrôler. Il est possible de proposer plusieurs axes pour augmenter l'injectabilité d'un ciment :

- diminuer la taille moyenne des particules (approche physique),
- augmenter le rapport L/S,
- utiliser des particules de forme rondes plutôt qu'allongées,
- utiliser des particules désagglomérées ou diminuer les interactions inter-particulaires,
- utiliser une distribution de particules large,
- augmenter la viscosité de la phase liquide.

1.2.1.2. Temps de prise du ciment

Les études montrent que, lorsque la taille moyenne des particules d'une phase solide diminue, le temps de prise du ciment diminue car la réaction d'hydratation des particules est accélérée [Baroud et coll., 2005 ; Bohner et coll., 2005-b ; Delgado et coll., 2005 ; Liu et coll., 2006-a ; Brunner et coll., 2007].

Ginebra et coll. [2004] se sont intéressés à l'influence de la taille des particules de la poudre réactive sur le temps de prise de leur ciment mono-composant. Ce dernier prend par une

réaction d'hydratation puis dissolution-reprécipitation d'un sel de phosphate de calcium (α-TCP). Ils ont étudié deux poudres de distributions granulométriques bimodales et de diamètres moyens différents (respectivement 10,88 et 2,22 µm). Ils obtiennent une diminution du temps de prise final d'un facteur 5 avec la poudre la plus fine.

Liu et coll. [2003] ont étudié un ciment à deux composants (TTCP + DCPA). Ils ont broyés séparément leurs deux produits (à 3 tailles de particules différentes pour chaque produit) et ont réalisé des mélanges avec toutes les combinaisons possibles de tailles et de compositions. La taille des particules est ici aussi un des facteurs déterminants pour la vitesse d'hydratation et le temps de prise. En revanche, la phase solide qui leur permet d'atteindre la plus grande vitesse d'hydratation et le temps de prise le plus court ne correspond pas au mélange des particules les plus petites pour les deux types de composés. Les auteurs en déduisent que le rapport de taille entre les deux types de composants est également important : il serait donc nécessaire d'optimiser les tailles des particules afin d'obtenir une combinaison optimisée.

Tofighi et Palazzolo [2006] quant à eux, ont étudié le co-broyage de la phase solide de leur ciment, composée de brushite et de phosphate de calcium amorphe. Ils remarquent que la cinétique de durcissement est là aussi très significativement accélérée grâce au co-broyage.

1.2.2. Influence du procédé de broyage sur la composition et les propriétés du ciment dur

Le broyage des poudres réactives constituant la phase solide d'un ciment peut modifier la composition finale de celui-ci ainsi que ses caractéristiques et propriétés physico-chimiques. En effet, il est possible que le procédé de broyage modifie les caractéristiques des poudres réactives, entraînant par là-même une modification de la réaction de prise. Brunner et coll. [2007], par exemple, ont utilisé le procédé de broyage pour rendre leurs poudres amorphes et augmenter ainsi leur réactivité. Pour eux, la cristallinité du matériau de départ a un impact très marqué sur le mécanisme de prise du ciment. D'autres études pointent également l'effet de la taille des particules sur la microstructure du ciment : la cristallinité du ciment final est diminuée lorsque la poudre est broyée : la taille des cristallites est inférieure [Ginebra et coll., 2004].

1.2.2.1. Porosité du ciment

La porosité du ciment est un facteur clé, car elle affecte non seulement les propriétés mécaniques du ciment (la résistance du ciment diminue lorsque la porosité augmente) mais aussi ses propriétés biologiques. La taille des pores en particulier, ainsi que l'interconnexion des pores affectent l'activité cellulaire.

Ginebra et coll. [2004] montrent qu'en réduisant la taille des particules de la phase solide, le nombre de points de contact entre les particules augmente et, par conséquent, la porosité du ciment pris diminue.

Tofighi et Palazzolo [2006] remarquent que le co-broyage de la phase solide du ciment qu'ils étudient leur permet de diminuer le rapport L/S de plus d'un facteur 3. Ce faisant, ils réduisent la porosité totale du ciment et modifient la distribution de taille des pores qui passe d'une distribution sub-micronique à des pores de plusieurs centaines de microns, favorables à l'activité cellulaire.

1.2.2.2. Propriétés mécaniques du ciment

Les études montrent que, lorsque la taille moyenne des particules d'une phase solide diminue, la cohésion de la structure initiale (pâte) et les propriétés mécaniques finales (ciment) augmentent [Bohner et coll., 2005-b ; Liu et coll., 2006-a].

Outre l'effet de la taille des particules sur le temps de prise du ciment cité au § 1.2.1.2., Ginebra et coll. [2004] ont également démontré son influence sur la résistance en compression du ciment pris : cette dernière augmente légèrement et elle est atteinte beaucoup plus rapidement pour le ciment élaboré avec une poudre plus fine.

Par ailleurs, une distribution de taille des particules multimodale influence également les propriétés mécaniques : par exemple, comparée à une distribution monomodale, une distribution bimodale permet de réduire la porosité grâce à un meilleur empilement des particules au sein de la pâte et d'augmenter ainsi les propriétés mécaniques [Gbureck et coll., 2005].

2. Étude du ciment $CaCO_3$-CaP

Cette partie décrit l'étude menée pour le ciment mixte préparé à partir d'un mélange $CaCO_3$-CaP. Les poudres réactives non broyées, broyées et co-broyées décrites dans le chapitre II sont utilisées pour préparer les ciments. Nous nous intéresserons tout d'abord à la réaction de prise, puis aux propriétés de la pâte et du ciment qui pourraient être modifiées par les traitements de broyage et de co-broyage détaillés dans le chapitre II.

2.1. Étude de faisabilité de l'élaboration des ciments à partir des poudres broyées et co-broyées

Dans un premier temps, il est nécessaire de s'assurer que le fait de broyer ou de co-broyer les poudres réactives n'empêche pas la prise des ciments. Ce paragraphe s'intéresse donc à détailler la réaction de prise du ciment $CaCO_3$-CaP et à comprendre dans quelle mesure celle-ci serait modifiée ou non par les traitements des poudres (vatérite et phosphate dicalcique dihydraté).

La réaction de prise du ciment peut être suivie par spectrophotométrie infrarouge en mode réflexions multiples, en déposant la pâte du ciment juste gâchée (t = 0 min) sur un cristal de ZnSe, inclus dans la cellule de mesure thermostatée à 37°C et en maintenant une atmosphère saturée en eau, afin de reproduire le plus fidèlement possible les conditions de prise du ciment dans le corps humain.

La figure III-1 présente l'évolution des spectres infrarouges du ciment de référence (préparé à partir de poudres réactives non broyées) au cours de la réaction de prise. Au temps initial (t = 0 min), le spectre de la pâte (III-1-a) est caractéristique de celui de la phase solide ; notamment, on distingue les bandes d'absorption des groupements phosphate de la brushite. Avec la prise du ciment, on observe l'apparition et l'augmentation de l'intensité d'une bande d'absorption à 1020 cm^{-1}, correspondant à la bande ν3 des groupements phosphate d'une hydroxyapatite.

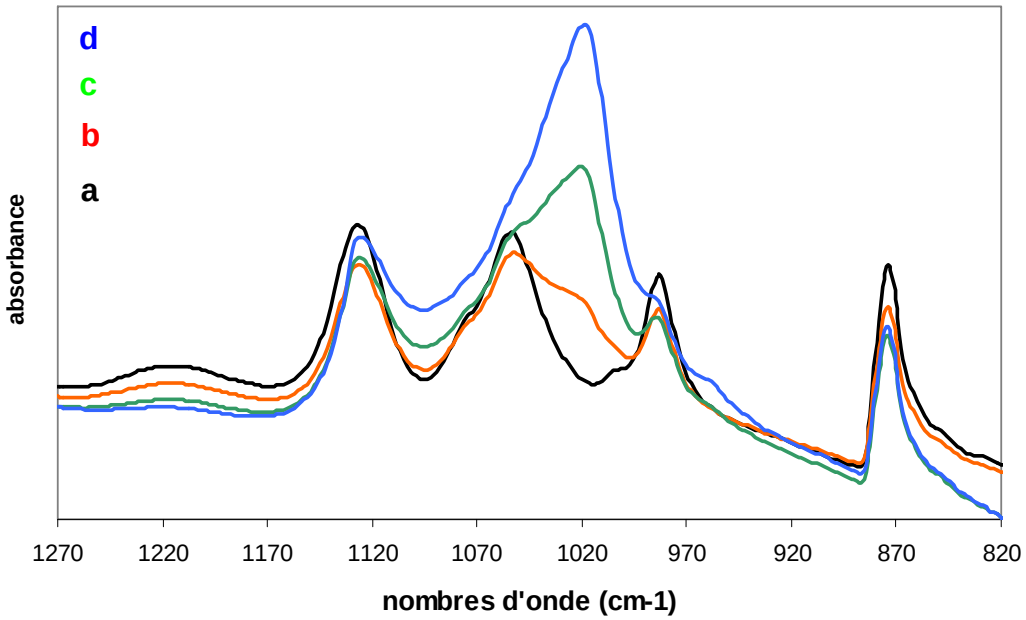


Figure III-1 : Évolution des spectres infrarouges de la pâte du ciment de référence (poudres réactives non broyées) au-fur-et-à-mesure de la prise : a). t = 0 min ; b). t = 30 min ; c). t = 1h ; d). t = 2h.

La combinaison de ces résultats et du diagramme de rayons X du ciment dur présenté sur la figure III-2-a permet de déterminer la réaction de prise du ciment (équation III-2).

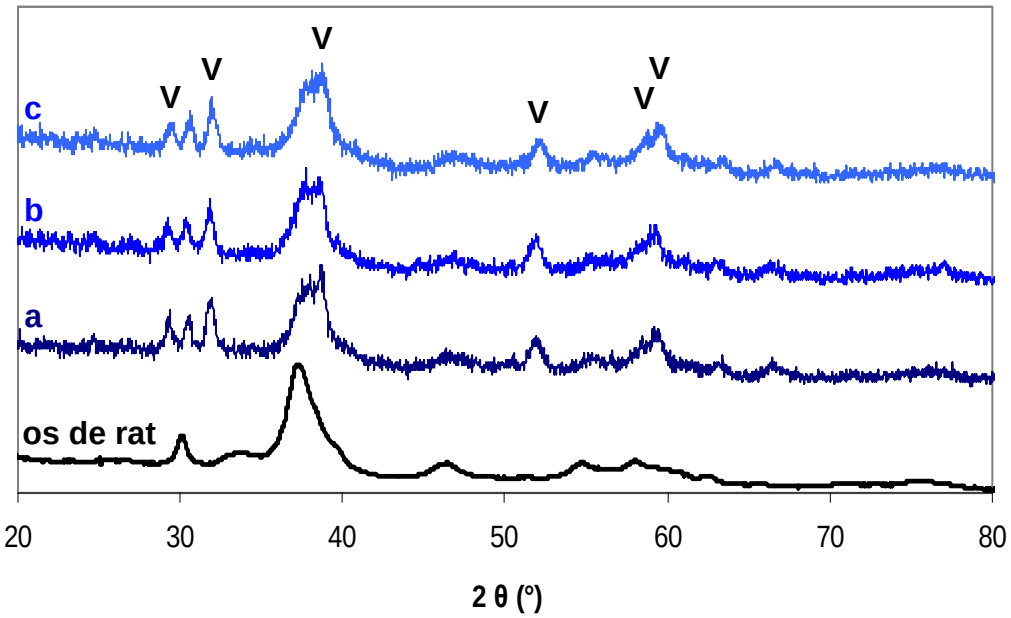


Figure III-2 : Diagrammes de diffraction de rayons X des ciments élaborés à partir de : a). brushite et vatérite non broyées (ciment de référence) ; b). brushite broyée et vatérite non broyée ; c) (vatérite + brushite) co-broyées ; V : vatérite.

Dans tous les cas, on obtient une apatite mal cristallisée analogue au minéral osseux, comme indiqué par le diffractogramme de l'os de rat, plus un excès de vatérite qui n'a pas réagi. Ces résultats confirment complètement les premières études réalisées sur ce ciment [Combes et coll., 2006-b] qui ont conduit à proposer l'équation décrivant la réaction de prise, présentée ci-dessous (éq. III-2) ; les ions hydrogénophosphate provenant du DCPD réagissent avec les ions carbonate de la vatérite pour former notamment des ions phosphate, constitutifs de l'hydroxyapatite.

$$2\ HPO_4^{2-} + CO_3^{2-} \rightarrow 2\ PO_4^{3-} + CO_2 + H_2O \qquad \text{(éq. III-2)}$$

La brushite étant un composé légèrement acide et la vatérite un composé légèrement basique, la réaction de prise de ces ciments peut être associée à une réaction acido-basique très lente des ciments CaP. Les molécules d'eau qui proviennent de la transformation de la brushite remplissent les pores entre les cristaux et participent à la formation d'une couche hydratée à la surface des nanocristaux d'apatite mal cristallisée analogue au minéral osseux.

E, effet, si l'on examine plus finement par spectroscopie d'absorption infrarouge l'apatite constituant majoritairement le ciment élaboré, on observe sur la figure III-3, la présence des

bandes phosphates et carbonates plus ou moins bien résolues et fines selon que le ciment a été séché ou non avant analyse. L'influence du séchage sur la structuration des apatites nanocristallines fraîchement précipitées a déjà été mis en évidence notamment par cette technique [Eichert et coll., 2005]. Il est intéressant de retrouver ce type d'évolution pour une apatite nanocristalline formée lors de la prise du ciment $CaCO_3$-CaP. L'observation de bandes fines et mieux résolues pour l'apatite et donc pour ce ciment (voir figure III-3-a) non séchée a été attribuée à la présence d'une couche hydratée structurée à la surface des nanocristaux [Eichert et coll., 2005]. Le séchage du ciment, et donc de l'apatite, à l'étuve conduirait à une déstructuration de cette couche hydratée qui se manifeste sur le spectre infrarouge par un élargissement des bandes (figure III-3-b), à la fois dans le domaine ν3 PO_4 (1000-1150 cm^{-1}) et dans le domaine ν3 CO_3 (1350-1500 cm^{-1}). De plus, l'apparence du spectre dans ces domaines est caractéristique d'une apatite où les groupements HPO_4^{2-} généralement présents dans la couche hydratée ont été substitués par des groupements CO_3^{2-}. Il est à noter que ces substitutions sont réversibles et que, par conséquent, cette couche hydratée devrait conférer une réactivité accrue à l'apatite et donc au ciment [Eichert et coll., 2005].

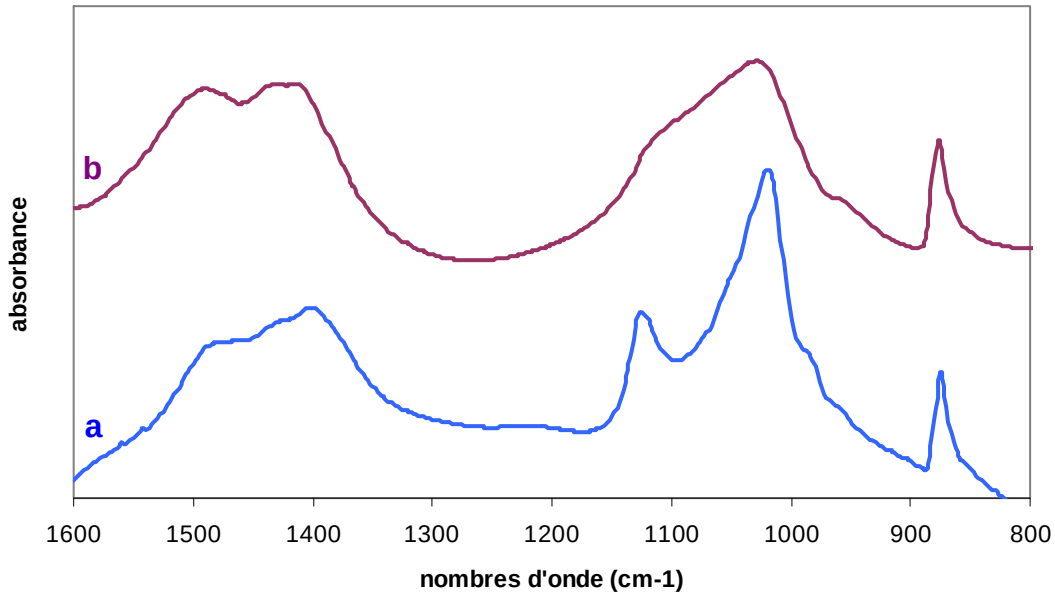
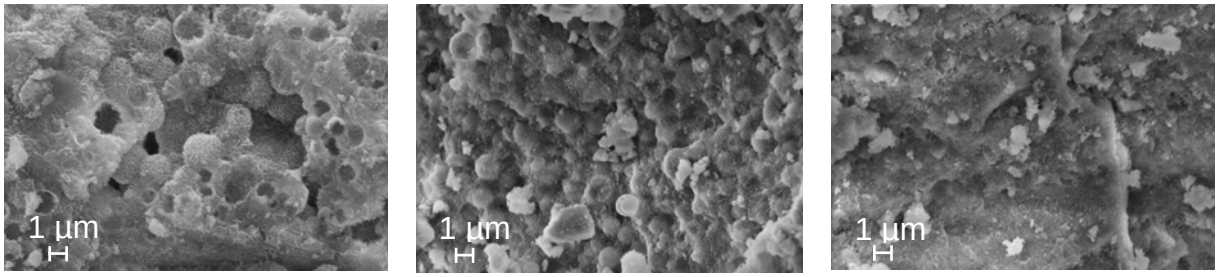


Figure III-3 : Spectres d'absorption infrarouge du ciment de référence : a). non séché ; b). séché à l'étuve à 37°C.

La microstructure du ciment élaboré à partir de la phase solide traitée ou non traitée est présentée sur les clichés de microscopie électronique à balayage présentés sur la figure III-4.

Le dégagement de CO_2 formé lors de la réaction de prise (éq. III-2) induit la microporosité observable dans le ciment durci.



a). brushite et vatérite non broyées – ciment de référence

b). brushite broyée et vatérite non broyée

c). vatérite + brushite co-broyées

Figure III-4 : Clichés de microscopie électronique à balayage des ciments élaborés à partir des poudres traitées ou non traitées.

D'après ces clichés, il semble que la taille des micropores soit réduite notamment lorsque le ciment est élaboré à partir de la phase solide co-broyée. Afin de confirmer ces observations, nous avons réalisé des mesures de porosité, qui feront l'objet d'un paragraphe plus détaillé dans la suite de ce chapitre.

2.2. Influence des procédés de broyage et de co-broyage des poudres réactives sur l'injectabilité de la pâte

Après gâchage, le ciment de référence forme une pâte très visqueuse, impossible à injecter telle qu'elle et empêchant toute utilisation du ciment $CaCO_3$-CaP par une technique de chirurgie peu invasive. Afin d'améliorer l'injectabilité du ciment, il est donc nécessaire d'étudier les paramètres qui peuvent la modifier et en particulier l'influence du traitement de broyage et de co-broyage des constituants de la phase solide. Pour cela, nous avons dû, dans un premier temps, mettre au point un protocole permettant la mesure de cette propriété.

2.2.1. Protocole de mesure de l'injectabilité mis en place

Nous avons dans un premier temps établi et fixé la géométrie du dispositif qui nous permettra d'injecter la pâte. Ensuite, nous avons mis au point un protocole de mesure de l'injectabilité

de la pâte des ciments étudiés. Tout ce travail préliminaire est essentiel afin de pouvoir comparer les résultats de tous les essais réalisés au cours de cette étude.

Nous avons mis au point un dispositif et un protocole pour réaliser la mesure de l'injectabilité à l'aide d'un analyseur de texture (TAXT2, Stable Micro Systems®). Le dispositif utilisé pour les essais est schématisé sur la figure III-5. Il permet d'adapter le piston d'une seringue de 2,5 mL (surface du piston = 64 mm^2) au bras de mesure du texturomètre. Notons que ces essais ont été réalisés avec des seringues non munies d'aiguilles. Le corps de la seringue, empli de ciment, est maintenu en place grâce à une tablette, sous laquelle est placée une balance de pesée qui permet de mesurer la masse (± 0 ,01 g) de pâte extrudée.

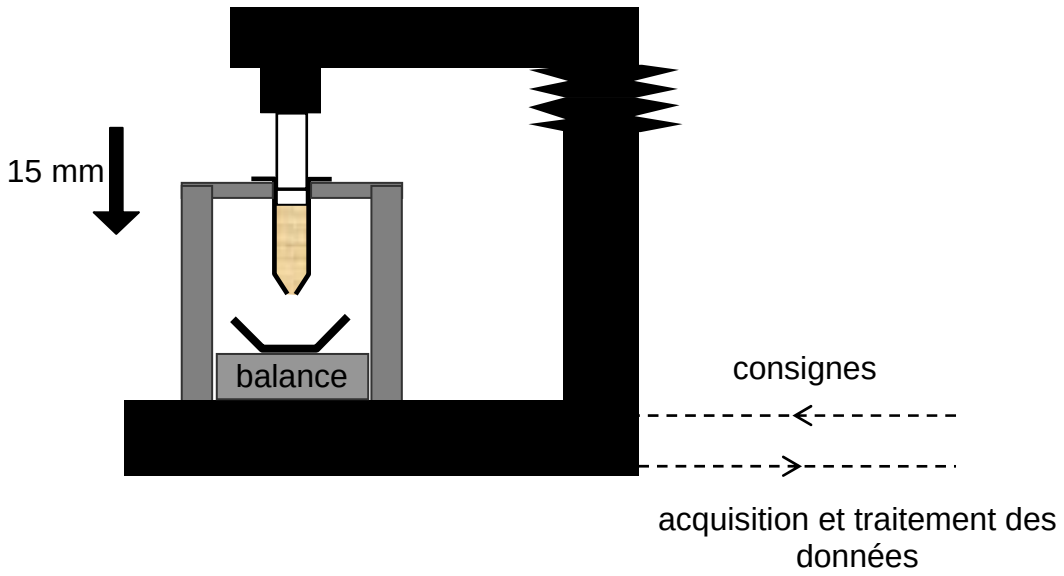


Figure III-5 : Schéma du dispositif permettant de mesurer l'injectabilité de la pâte du ciment.

Le ciment est préparé en suivant le protocole habituel (au temps initial, 2 g de phase solide sont gâchés manuellement avec 1g d'eau désionisée afin de respecter le rapport L/S=0,5), puis la seringue est emplie de ciment et disposée sur l'appareil. Le piston est introduit dans la seringue et poussé jusqu'à la graduation 1,5 mL, afin de vider l'air, d'éviter la présence de bulles et de toujours démarrer la mesure dans les mêmes conditions. La mesure a systématiquement été lancée 5 minutes après le début du gâchage de la phase liquide avec la phase solide. Ce temps correspond au temps nécessaire pour gâcher le ciment et l'insérer dans la seringue. De manière pratique, il correspondrait également au temps nécessaire au

chirurgien pour préparer le ciment et l'introduire dans le dispositif permettant l'injection dans la cavité à combler.

Au bout de ces 5 minutes, la mesure est lancée avec les conditions opératoires suivantes : le piston de la seringue se déplace à vitesse constante, fixée à 2 $mm.s^{-1}$, et réalise une course verticale de 15 mm (volume de pâte extrudée correspondant à 960 mm^3). Le système d'acquisition enregistre en continu la charge nécessaire au déplacement du piston. La pâte extrudée lors de l'essai est recueillie dans une coupelle et pesée.
La courbe de mesure alors obtenue présente l'évolution de la charge nécessaire pour extruder la pâte à vitesse constante en fonction du déplacement du piston. **Lorsque la charge d'injection diminue, la facilité à injecter le ciment augmente.**
Notons que le bras du texturomètre qui contrôle le déplacement du piston a été préalablement étalonné avec des poids (5 kg et 25 kg) ; ainsi l'évolution de la charge nécessaire pour extruder la pâte sera présentée en unité de masse.

En résumé, les mesures effectuées selon le protocole mis en place permettent donc de définir :

- la **charge maximale** nécessaire pour extruder une quantité définie de pâte (ici un volume correspondant à une course du piston de 15 mm),
- l'**évolution** de cette charge avec le déplacement du piston,
- la **masse** de pâte extrudée.

2.2.2. Résultats et discussions

La figure III-6 présente la courbe d'évaluation de l'injectabilité de la pâte obtenue pour un ciment $CaCO_3$-CaP de référence (préparé à partir des poudres réactives non broyées).

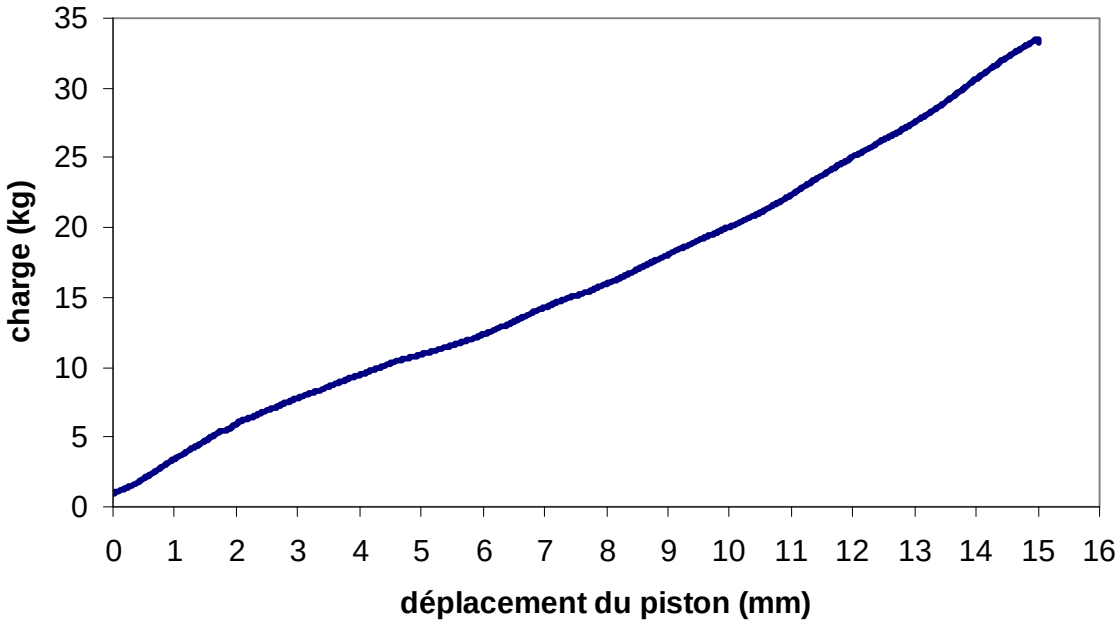


Figure III-6 : Courbe d'évaluation de l'injectabilité de la pâte de référence (poudres réactives non broyées).

Nous pouvons remarquer que la force d'injection augmente avec le déplacement du piston et atteint un maximum de plus de 33 kg pour un déplacement du piston de 15 mm. Une telle valeur de charge compromet bien sûr l'utilisation de ce ciment à l'aide d'une technique d'injection. A titre indicatif, Gbureck et coll. [2004] considèrent que la force maximum qui peut être appliquée manuellement est de 300 N, ce qui équivaut à une charge de 30 kg.

Par la suite, nous avons étudié l'influence des traitements de broyage ou de co-broyage des constituants de la phase solide (vatérite et DCPD) sur l'injectabilité de la pâte du ciment.

2.2.2.1. Influence des conditions de synthèse de la vatérite utilisée pour la préparation du ciment (V1 ou V2)

Dans le chapitre II, nous avons décrit deux protocoles de synthèses différents pour la vatérite, menant à la formation de la vatérite 1 et de la vatérite 2, qui diffèrent l'une de l'autre notamment par la taille de leurs particules et leur état d'agglomération. En effet le diamètre moyen des particules de V1 est de 1,7 µm alors que celui de V2 est de 2,3 µm (cf. chapitre II). Nous avons donc voulu tester l'influence de ces paramètres sur l'injectabilité de la pâte.

La figure III-7 présente la courbe d'évaluation de l'injectabilité d'une pâte obtenue avec le mélange (brushite + vatérite 1) non broyées d'une part (III-7-a), et d'autre part celle d'une pâte préparée à partir du mélange (brushite + vatérite 2) non broyées (III-7-b). Que l'on utilise l'une ou l'autre des vatérites synthétisées au laboratoire, les courbes montrent qu'il n'y a pas de différence significative d'injectabilité, tant au niveau de la charge maximale atteinte qu'au niveau de l'évolution de la force d'injection au cours de la course du piston.

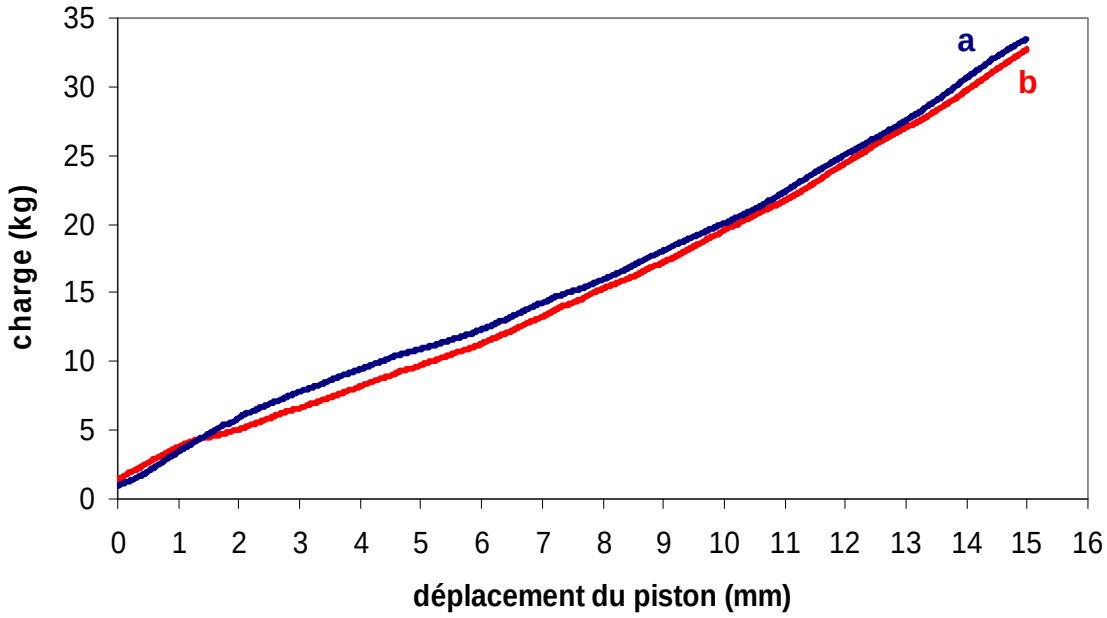


Figure III-7 : Courbe d'évaluation de l'injectabilité de la pâte de référence (poudres non broyées) préparée à partir de : a). V1 + DCPD ; b). V2 + DCPD.

Ce résultat va à l'encontre de plusieurs études qui montrent, comme nous l'avons vu lors de la synthèse bibliographique, que la taille des particules de la phase solide et leur état d'agglomération sont des facteurs clés pour contrôler l'injectabilité d'une pâte [Baroud et coll., 2005 ; Delgado et coll., 2005].

Ainsi, même si le comportement des deux types de vatérite semble identique vis-à-vis de l'injectabilité de la pâte, il nous a paru nécessaire d'approfondir cette étude en considérant leurs associations avec de la brushite broyée, sans privilégier l'une ou l'autre des vatérites.

2.2.2.2. Influence du broyage de la brushite sur l'injectabilité du ciment $CaCO_3$-CaP

La figure III-8 présente les courbes d'évaluation de l'injectabilité, pour des ciments préparés avec de la brushite broyée 27 minutes ou non broyée, associée aux vatérites V1 et V2.

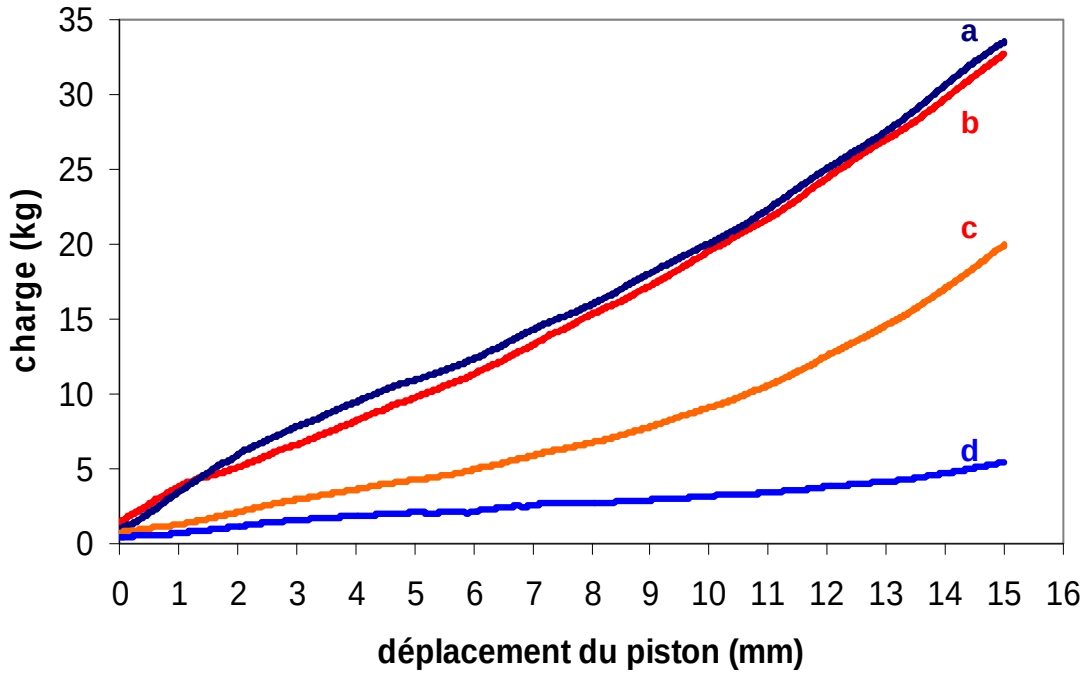


Figure III-8 : Courbes d'évaluation de l'injectabilité des pâtes préparées à partir de : a). V1 + DCPD non broyés ; b). V2 + DCPD non broyés ; c). V2 non broyée + DCPD broyé ; d). V1 non broyée + DCPD broyé.

On observe tout d'abord une diminution significative de la charge maximale nécessaire pour extruder les pâtes de ciment lorsqu'elles sont préparées à partir de brushite broyée, et ce quelle que soit la vatérite utilisée (charge équivalente à 20 kg avec la vatérite 2 et à 5,5 kg avec la vatérite 1).

On observe également une différence significative de comportement, selon le type de vatérite introduite dans la phase solide.

Il est donc vraisemblable que les particules de brushite, initialement de taille supérieure à celle de la vatérite et de morphologie (grandes plaquettes) de nature à « bloquer » le mouvement du piston soient le facteur limitant de l'injectabilité de la pâte : ce sont elles qui,

en l'absence de broyage, déterminent l'injectabilité du ciment, qui sera du même ordre de grandeur, que celui-ci soit préparé avec la vatérite 1 ou avec la vatérite 2.
En revanche, lorsque l'on broie les particules de brushite et qu'elles ont alors une taille moyenne (2,7 µm) du même ordre de grandeur que celle des particules de la vatérite, ainsi qu'une morphologie plus isotrope, de nature à favoriser l'écoulement de la pâte, il apparaît que la taille et l'état d'agglomération des particules de vatérite influent sur l'injectabilité de la pâte. Le choix du type de vatérite utilisée est alors déterminant.

2.2.2.3. Influence du co-broyage des poudres réactives sur l'injectabilité du ciment $CaCO_3$-CaP

Dans un troisième temps, l'injectabilité des pâtes préparées à partir des phases solides co-broyées décrites dans le chapitre II a été évaluée. Ces phases solides contiennent de la vatérite 1 ou de la vatérite 2 et de la brushite en quantités massiques égales.

La figure III-9 compare la courbe obtenue pour la pâte élaborée avec les poudres co-broyées à la courbe obtenue pour la pâte composée de la vatérite 1 et de brushite broyée. Cette dernière donnait jusqu'à présent les résultats d'injectabilité les plus favorables. On observe un nouveau gain d'injectabilité grâce au co-broyage, puisque la force d'injection maximale diminue encore ($\leq$ 1 kg). Par ailleurs, la charge nécessaire à l'injection de la colonne de ciment est plus faible lorsque celui-ci est préparé avec la vatérite 1 que lorsqu'il est préparé avec la vatérite 2.

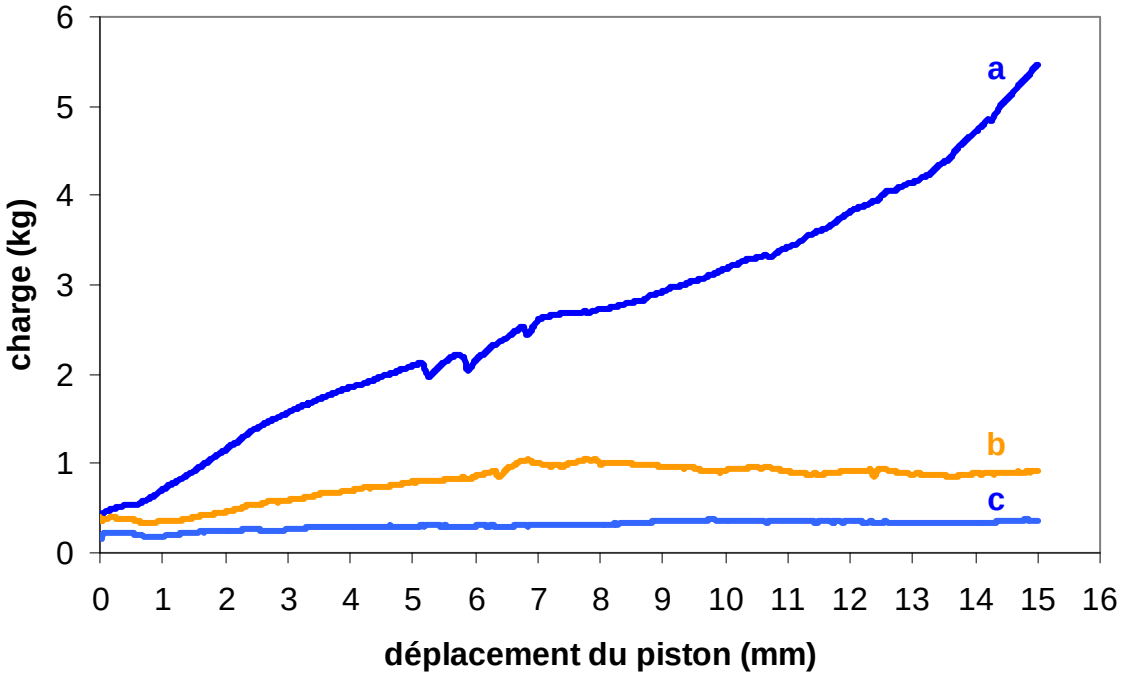


Figure III-9 : Courbes d'évaluation de l'injectabilité de la pâte préparée à partir de : a). V1 non broyée + DCPD broyé ; b). (V2 + DCPD) co-broyés ; c). (V1 + DCPD) co-broyés.

Notons également que dans le cas de la phase solide co-broyée contenant la vatérite 1, la force d'injection est presque constante tout au long du déplacement du piston. Ceci constitue une réelle différence avec les courbes d'évaluation de l'injectabilité des pâtes préparées à partir des phases solides non co-broyées.

2.2.2.4. Synthèse, discussions et conclusions

Afin de synthétiser les résultats obtenus, le tableau III-1 récapitule tous les essais réalisés et présente, pour chaque essai, la masse de pâte extrudée ainsi que la charge maximale nécessaire pour une course du piston de 15 mm (volume constant).

Tableau III-1 : Récapitulatif des essais de mesure de l'injectabilité

Composition de la phase solide	**B + V2**	**B + V1**	**B broyée + V2**	**B broyée + V1**	**(B + V2) co-broyées**	**(B + V1) co-broyées**
masse extrudée (g)	1,01	1,03	1,25	1,44	1,51	1,54
charge maximale (kg)	32,7	33,5	20,0	5,5	1,0	0,4

Ces résultats montrent que les traitements de broyage et de co-broyage des poudres réactives permettent non seulement de diminuer la charge maximale nécessaire pour déplacer une colonne de pâte d'un volume de 960 mm^3, mais également d'augmenter la masse de pâte extrudée, alors que le piston effectue dans tous les cas la même course. Ce dernier phénomène pourrait être principalement dû :

- soit à l'augmentation de la densité de la pâte, du fait des traitements de broyage et de co-broyage subits par la phase solide. Nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse en mesurant la densité réelle des poudres réactives avant et après traitement.
- soit à la diminution de la séparation de phases liquide-solide qui peut avoir lieu lors de l'injection : pour les pâtes préparées à partir des poudres non broyées, la séparation de phase conduirait à extruder une suspension moins visqueuse (car moins riche en particules solides), ce qui se traduirait par une masse extrudée diminuée. En revanche, pour les pâtes élaborées à partir de poudres réactives co-broyées, la pâte extrudée serait une suspension homogène, ce qui se traduirait par une masse extrudée plus importante.

Dans le deuxième des cas énoncés ci-dessus, le phénomène de séparation de phase s'accompagne de la formation d'un « bouchon » de particules solides qui gênent le passage de la pâte vers l'orifice ; dans ce cas, il faut donc exercer une charge de plus en plus grande pour pouvoir continuer à extruder de la pâte alors que le « gâteau » s'agrandit [Habib et coll., 2008]. C'est ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la force d'injection observée au fur-et-à-mesure de la progression du piston pour les pâtes préparées à partir de poudres réactives non broyées (figure III-10-a).

La figure III-10 récapitule les courbes de mesure de l'injectabilité obtenues pour des pâtes toutes constituées de la même vatérite (ici la vatérite 1) mais préparées soit à partir de poudres non broyées, soit avec du DCPD broyé, soit avec les poudres co-broyées.

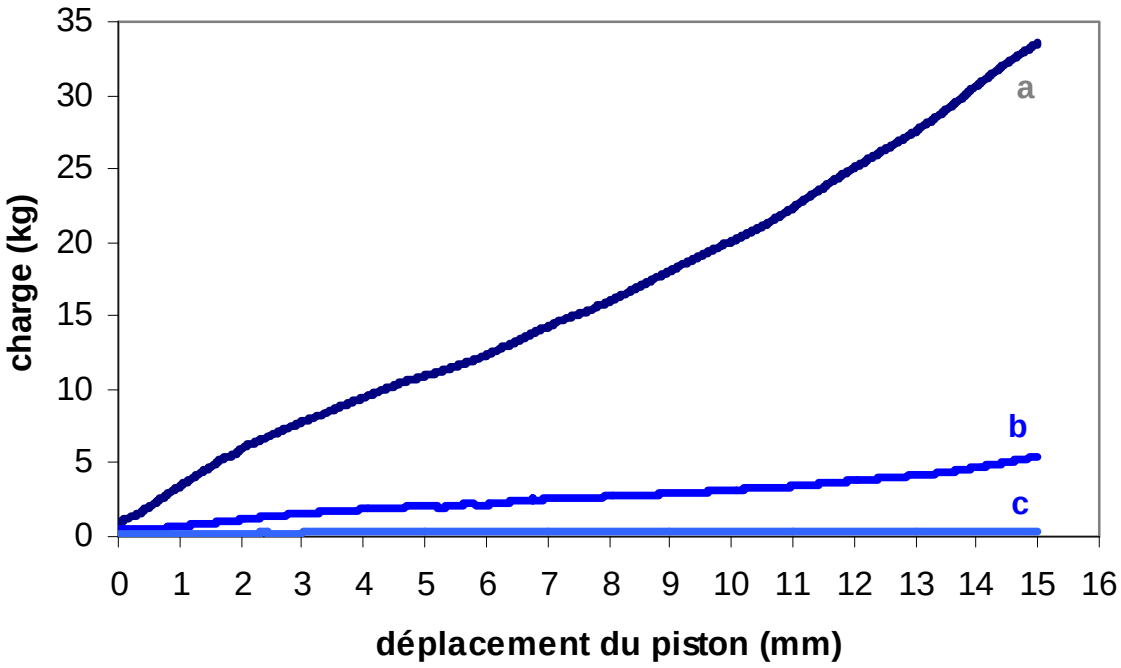


Figure III-10 : Courbes d'évaluation de l'injectabilité de la pâte préparée à partir de : a). V1 + DCPD non broyés ; b). V1 non broyée + DCPD broyé ; c). (V1 + DCPD) co-broyés.

La charge d'injection nécessaire pour déplacer le piston de 15 mm diminue d'un **facteur 100** lorsque la phase solide est co-broyée.

De plus, les traitements de broyage et de co-broyage réalisés sur la phase solide atténuent significativement l'augmentation de la force d'injection avec le déplacement du piston, jusqu'à obtenir une charge constante pour la pâte préparée avec la phase solide co-broyée. Ceci pourrait donc provenir de la diminution du phénomène de séparation de phases ou « filter-pressing ».

2.2.3. Étude du phénomène de séparation de phases lors de l'injection

Le but de cette étude est de mettre en évidence le phénomène responsable de l'augmentation de la charge d'injection avec le déplacement du piston.

Dans la revue bibliographique, nous avons souligné le phénomène de séparation de phases qui est souvent observé lors de l'injection de ciments minéraux. Si ce phénomène a lieu, il conduit à l'extrusion d'une pâte assez peu visqueuse, alors qu'une partie de la poudre reste à l'intérieur de la seringue et bloque progressivement le passage de la pâte restant à extruder. Autrement dit, au début de l'injection, on extrude une pâte contenant une proportion importante de liquide, proportion qui diminue au-fur-et-à mesure du déplacement du piston. C'est ce phénomène que nous souhaitons mettre en évidence et préciser dans le cas du ciment $CaCO_3$-CaP.

2.2.3.1. Protocole de mesure mis en place

Afin d'appréhender le phénomène de filter-pressing, nous avons mis au point un protocole permettant la mesure de la proportion massique de solide (et donc, par différence, de liquide) dans la pâte extrudée selon la position du piston dans le corps de la seringue.
La mesure a été réalisée à l'aide du même dispositif, du même appareil et dans les mêmes conditions que les mesures d'injectabilité décrites précédemment (§ III-2-2-1). La différence principale réside dans le fait que le piston réalise, pour chaque échantillon, 3 déplacements de 5 mm au lieu d'un seul de 15 mm.

La figure III-11 présente la courbe d'injectabilité obtenue pour un essai complet (course du piston = 15 mm), comparée aux courbes obtenues pour un essai réalisé en segmentant en 3 fois 5 mm la course du piston. Nous pouvons remarquer que pour les deux reprises de la course du piston à 5 mm et à 10 mm, il faut environ deux millimètres supplémentaires (de 5 à 7 mm et de 10 à 12 mm) pour que le régime d'extrusion de la pâte se rétablisse et conduise à une courbe parallèle à celle de référence. Ceci peut provenir de la relaxation de la pâte lorsque le piston cesse de la presser.

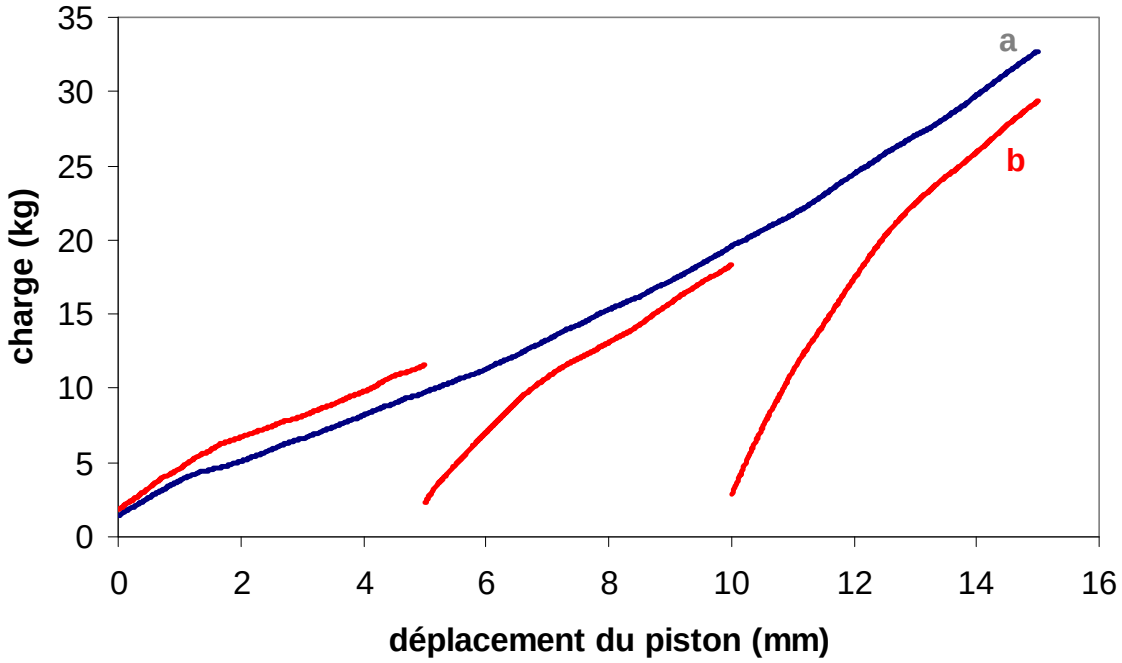


Figure III-11 : Courbes d'évaluation de l'injectabilité de la pâte de référence : a). course du piston = 15 mm ; b). course du piston = 3x 5 mm.

La masse extrudée à chaque course du piston (5 mm) est notée et la pâte récupérée est lyophilisée, afin d'éliminer l'eau pour évaluer la proportion de solide dans la pâte extrudée tout en évitant toute évolution chimique (l'eau participant à la réaction de prise du ciment, il est impossible de calculer la quantité d'eau effectivement extrudée si la réaction a lieu). Après lyophilisation, la poudre récupérée est de nouveau pesée et permet, par différence, de calculer le pourcentage de phase solide dans la pâte extrudée. Cet essai a été réalisé sur un minimum de 3 échantillons.

2.2.3.2. Résultats et discussions

Le tableau III-2 récapitule les essais réalisés et présente, pour chaque segment de course du piston, la masse de pâte extrudée (liquide + solide) ainsi que la charge maximale atteinte.

Tableau III-2 : Masse extrudée et charge maximale atteinte pour chaque segment de course

	Pâte préparée à partir des poudres non broyées		**Pâte préparée à partir des poudres co-broyées**	
déplacement	masse extrudée (g)	charge maximale (kg)	masse extrudée (g)	charge maximale (kg)
de 0 à 5 mm	0,377 ± 0,006	11,2 ± 0,4	0,524 ± 0,005	0,7 ± 0,2
de 5 à 10 mm	0,36 ± 0,03	17 ± 1	0,52 ± 0,01	0,7 ± 0,2
de 10 à 15 mm	0,27 ± 0,02	27 ± 3	0,49 ± 0,03	1,1 ± 0,2

Pour un même déplacement du piston, la masse extrudée lors des essais réalisés avec la pâte préparée à partir des poudres co-broyées est nettement supérieure à la masse extrudée avec la pâte de référence, ce qui corrobore les résultats observés pour les essais d'injectabilité.

Par ailleurs, on observe, pour la pâte du ciment de référence, une diminution de la masse de pâte extrudée, accentuée sur les 5 derniers millimètres et corroborée à une nette augmentation de la force maximale d'injection. Pour la pâte préparée à partir des poudres co-broyées, la masse de pâte extrudée ne varie pas significativement, tandis que la charge maximale n'augmente que légèrement.

L'évolution du pourcentage massique de solide dans la pâte extrudée en fonction de la course du piston est présentée figure III-12. De 0 à 5 mm, de 5 à 10 mm et de 10 à 15 mm sont présentés les résultats obtenus pour les trois courses successives du piston. Au-delà de 15 mm, le tracé correspond à la composition de la pâte qui n'a pas été extrudée lors de l'essai et reste dans la seringue.

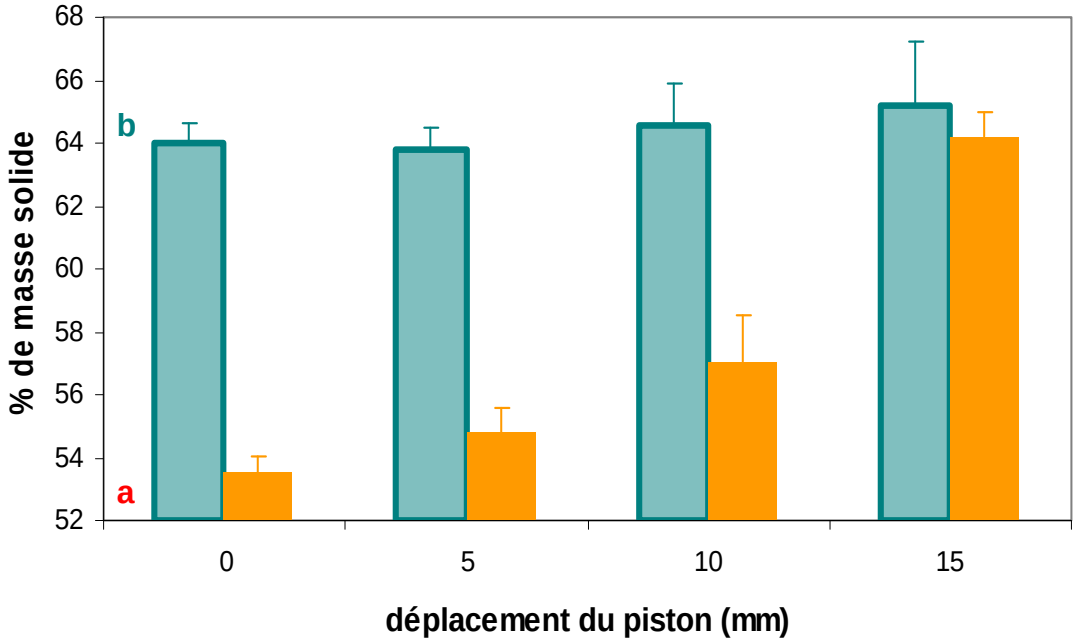


Figure III-12 : Évolution du pourcentage massique de solide dans la pâte extrudée en fonction de la position du piston au cours de sa course : a). ciment de référence ; b). ciment préparé à partir de la phase solide co-broyée.

L'histogramme du ciment de référence, présenté sur la figure III-12, montre une proportion de solide qui augmente au-fur-et à mesure de la course du piston. En effet, le phénomène de séparation de phase conduit à une extrusion préférentielle de la phase liquide. La pâte restant dans la seringue s'enrichit donc en phase solide au-fur-et-à-mesure que le piston avance. Ainsi, la pâte extrudée contient de plus en plus de solide et est de plus en plus difficile à extruder, d'où l'augmentation de la force d'injection. En particulier, la différence de composition est très nette entre la pâte extrudée sur les cinq derniers millimètres de course du piston (le pourcentage de masse solide dans la pâte avoisine alors les 57 %) et la pâte restant dans la seringue à la fin de l'essai (la masse solide représente alors environ 64 %).
Notons que Habib et coll. [2008] observent un effet similaire et l'attribuent également au phénomène de séparation de phases.

En ce qui concerne la pâte préparée avec les poudres co-broyées, la proportion massique de solide dans la pâte ne varie pas significativement ni tout au long de la course du piston, ni dans la pâte qui reste dans la seringue. Au cours de l'extrusion, le pourcentage pondéral de masse solide dans la pâte est d'environ 64 %, c'est-à-dire très proche des 66 % théoriques

(L/S = 0,5). Ces résultats montrent que la pâte reste homogène en composition (L/S) et facilement injectable tout au long de son extrusion ; le traitement de la phase solide par co-broyage permet ainsi d'éliminer tout phénomène de filter-pressing et d'obtenir une pâte complètement injectable.

2.3. Influence des procédés de broyage et de co-broyage des poudres réactives sur les autres propriétés d'usage du ciment

Les résultats obtenus démontrent l'intérêt du broyage, et plus particulièrement du co-broyage des poudres réactives pour augmenter l'injectabilité de la pâte d'un ciment. Les autres propriétés d'usage des ciments (telles que le temps de prise, la porosité ou encore les propriétés mécaniques) sont également importantes. Cette partie s'attache donc à caractériser l'influence du traitement des poudres réactives constituant la phase solide sur les propriétés d'usage du ciment.

2.3.1. Influence sur le temps de prise du ciment

Des mesures de temps de prise ont été réalisées sur les ciments élaborés à partir des poudres non broyées, du mélange brushite broyée et vatérite non broyée et de la phase solide co-broyée, en suivant le protocole décrit dans l'annexe A. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un analyseur de texture (TAXT2, Stable Micro Systems®). Ce dernier mesure la charge nécessaire pour faire pénétrer une aiguille de 0,785 mm^2 de surface dans le ciment. Le bras de l'analyseur de texture qui contrôle la pénétration de l'aiguille a été étalonné à l'aide de poids, la résistance mesurée sera exprimée en g/mm^2. On considère que le ciment est « pris » lorsqu'il atteint une résistance de 600 g/mm^2.

La figure III-13 présente l'évolution de la résistance des ciments au cours de leur prise, sachant que le temps initial (t = 0 min) correspond au moment où le ciment est gâché et moulé.

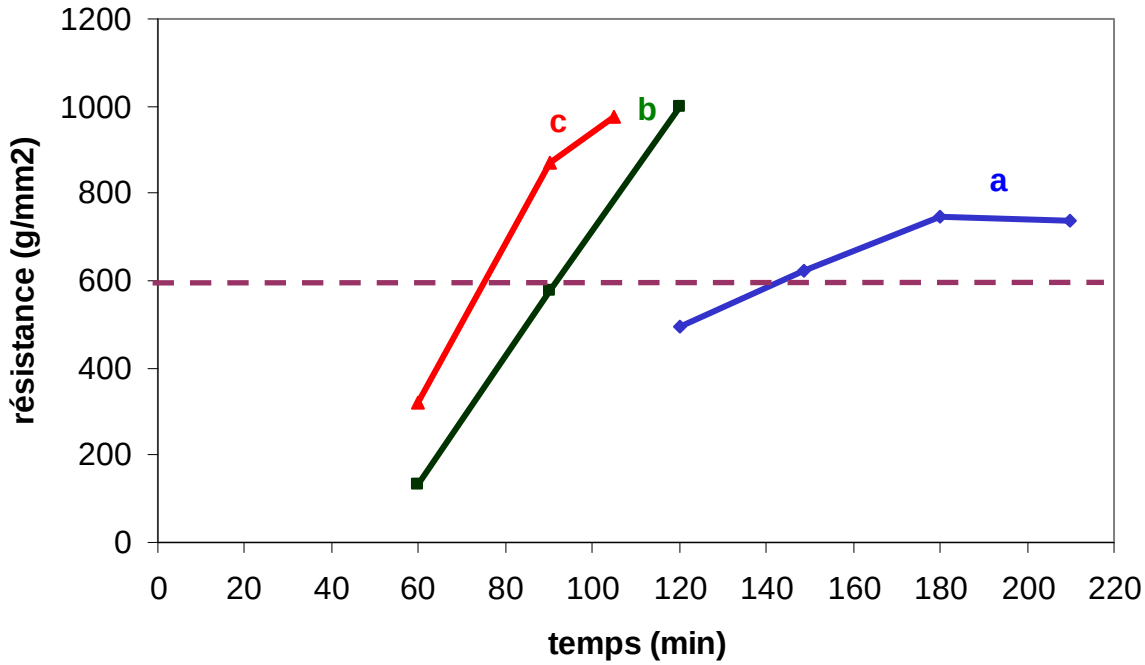


Figure III-13 : Évolution de la résistance à la pénétration des ciments au cours du temps : a). ciment de référence ; b). ciment préparé à partir de (V1 + DCPD broyé) ; c). ciment préparé à partir de la phase solide co-broyée.

De manière tout à fait logique, le broyage de la brushite accélère la cinétique de prise : le traitement des poudres par broyage génère de nouvelles surfaces des particules ; la surface réactionnelle est donc augmentée, ce qui accélère la réaction d'hydratation et de dissolution de la brushite. Ceci est tout à fait cohérent avec les résultats publiés par d'autres équipes [Baroud et coll., 2005 ; Bohner et coll., 2005-b ; Liu et coll., 2006 ; Brunner et coll., 2007].

Il est intéressant de constater que le co-broyage de la phase solide diminue le temps de prise du ciment plus que le simple broyage des constituants séparés. Ceci peut s'expliquer par :

- l'accentuation de la création de nouvelles surfaces lors du traitement,
- la réduction de l'agglomération des particules de même nature,
- l'homogénéité du système qui, comparée à un simple mélange, est améliorée,
- le mélange intime entre particules de brushite et de vatérite qui conduit à une surface de contact augmentée entre les deux types de particules réactives,
- la modification des interactions entre les matériaux déjà observée lors du co-broyage d'autres systèmes.

Au final, le temps de prise est presque diminué d'un facteur deux entre un ciment de référence (temps de prise d'environ 140 min) et un ciment élaboré à partir de poudres réactives co-broyées (temps de prise voisin de 75 min). Notons que ces temps de prise n'ont pas été déterminés selon la norme en vigueur pour les ciments biomédicaux mais que la méthode utilisée permet déjà de comparer entre eux les ciments testés.

2.3.2. Influence sur la porosité du ciment dur

Des mesures de porosimétrie ont été réalisées sur les ciments, à l'aide d'un porosimètre à mercure (Autopore 94XX, Micromeritics®). Les courbes d'intrusion du mercure sont présentées figure III-14 et les valeurs de porosité sont données dans le tableau III-3 à titre indicatif. Notons que ces mesures ont toutes été réalisées en utilisant la vatérite de type V2.

Tableau III-3 : Porosité totale exprimée en pourcentage, pour les ciments préparés en utilisant des poudres non broyées (ciment de référence), le mélange vatérite et brushite (B) broyée 27 min, ou la phase solide co-broyée.

	Ciment de référence	**B broyée + V2 non broyée**	**(B2+V2) co-broyées**
Porosité totale	61,1 %	60,5 %	59,5 %

La porosité totale du ciment diminue de moins de 2 % lorsque les poudres réactives ont été broyées ou co-broyées, ce qui s'accompagne surtout de la disparition de la porosité autour de 10 µm (figure III-14). Cette diminution de la taille des pores confirme l'observation qui avait été faite par microscopie électronique (figure III-4).

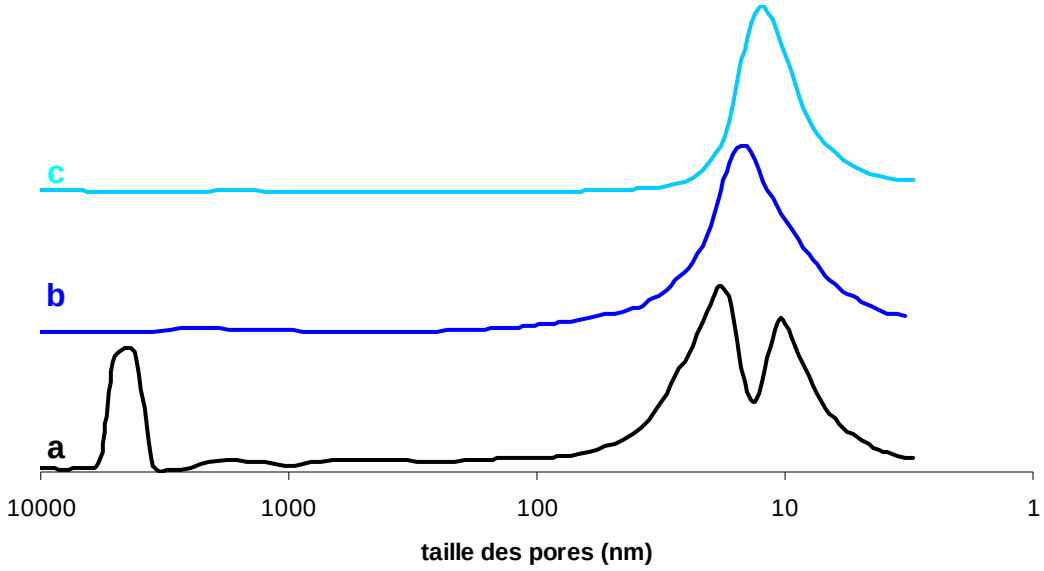


Figure III-14 : Courbes de distribution de tailles des pores dans les ciments préparés à partir de : a). poudres non broyées (ciment de référence) ; b). brushite broyée + V2 non broyée ; c). (brushite + V2) co-broyées.

La différence majeure observée sur la figure III-14 réside dans la disparition des micropores (de diamètre environ 9 µm) pour les ciments élaborés à partir d'une phase solide ayant été broyée ou co-broyée. Ce diamètre correspond à la taille des plaquettes de brushite initiales. La dissolution des particules de brushite qui a lieu lors de la réaction de prise pourrait laisser un espace vide qui créerait de la porosité dans le ciment. Lorsque la brushite est broyée, ou co-broyée avec la vatérite, la taille des particules est diminuée, ce qui pourrait expliquer la disparition de cette microporosité autour de 9 µm.

Notons également qu'avec les traitements de broyage et de co-broyage de la phase solide, la distribution de taille des pores autour de 10 nm devient monomodale.

2.3.3. Influence sur les propriétés mécaniques du ciment

Des mesures des propriétés mécaniques des ciments durs ont également été réalisées : le protocole décrit dans l'annexe A permet de mesurer la résistance à la compression des ciments. Ceux-ci sont gâchés manuellement puis moulés dans des cylindres et mis à l'étuve à

37°C pour la prise. Après séchage, ils sont démoulés et testés. Le tableau III-4 récapitule les résultats obtenus.

Tableau III-4 : Résistance en compression des ciments préparés à partir de poudres non broyées (ciment de référence), broyée, ou co-broyées

	Ciment de référence	**B broyée + V non broyée**	**(B+V) co-broyées**
Résistance en compresion (MPa)	12 ± 1	16 ± 2	15 ± 3

Les procédés de broyage et de co-broyage n'influent pas significativement sur les propriétés mécaniques finales des ciments ; celles-ci sont légèrement améliorées lorsque les poudres réactives ont été traitées, ce qui pourrait provenir de la diminution de la porosité des ciments discutée au paragraphe précédent. Notons que dans tous les cas, la résistance en compression des ciments est supérieure à celle de l'os trabéculaire, qui est de 9,1 ± 1,3 MPa [Carter et Hayes, 1977].

Par ailleurs, le broyage et le co-broyage permettent d'atteindre ces propriétés mécaniques plus rapidement, comme nous l'avons observé avec la diminution du temps de prise. De plus, il est possible de préparer le ciment en diminuant la quantité de liquide ajoutée. La diminution du rapport L/S devrait s'accompagner d'une diminution de l'injectabilité de la pâte de ciment, mais également d'une augmentation de ses propriétés mécaniques. Une des perspectives intéressantes de ce travail serait donc d'optimiser le rapport L/S afin de trouver un bon compromis entre une injectabilité suffisante pour employer le ciment dans des techniques de chirurgies peu invasives et des propriétés mécaniques améliorées.

À titre d'exemple, le ciment préparé avec la phase solide co-broyée et un rapport L/S=0,44 (au lieu de 0,5 habituellement) a une résistance en compression de 19 ± 3 MPa.

3. Étude du ciment $CaCO_3$

Les résultats obtenus par co-broyage de la phase solide sur le ciment $CaCO_3$-CaP sont prometteurs. Le but de cette nouvelle étude est de vérifier que ce type de traitement est

applicable à tout ciment minéral et tester quel est son influence sur les propriétés d'usage d'un ciment de formulation différente.

Cette partie s'intéresse donc au deuxième ciment, constitué uniquement de $CaCO_3$ et préparé en gâchant la phase solide (1/3 de $CaCO_3$ amorphe + 2/3 de vatérite) avec de l'eau désionisée selon un rapport L/S = 2/3. Nous présenterons seulement l'étude de faisabilité.

3.1. Réaction de prise

Le ciment uniquement à base de $CaCO_3$ prend par une réaction de dissolution – reprécipitation qui conduit majoritairement à la formation d'aragonite, un polymorphe métastable du carbonate de calcium. L'aragonite cristallise sous forme d'aiguilles, qui s'enchevêtrent et confèrent sa cohésion et ses propriétés mécaniques au ciment. La figure III-15-a, qui présente le diagramme de diffraction des rayons X du ciment de référence une fois pris (poudres non broyées) montre qu'on retrouve également dans la composition du ciment un léger excès de vatérite, ainsi que du Na_2CO_3, qui précipite vraisemblablement par réaction entre le NaCl provenant du CCA (cf. chapitre II) et la vatérite introduite.

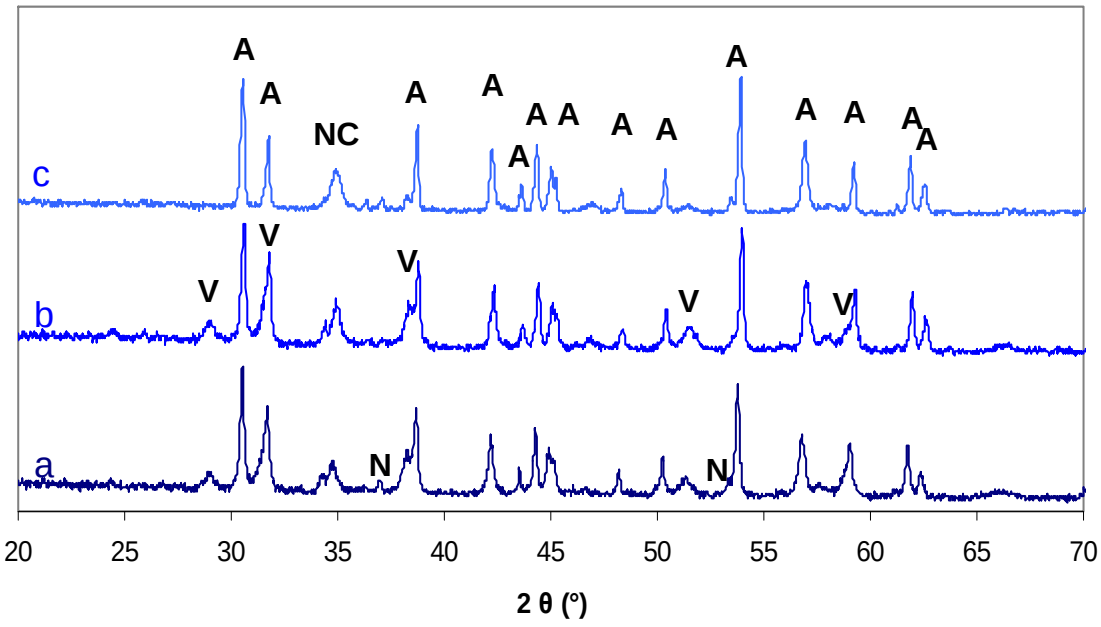
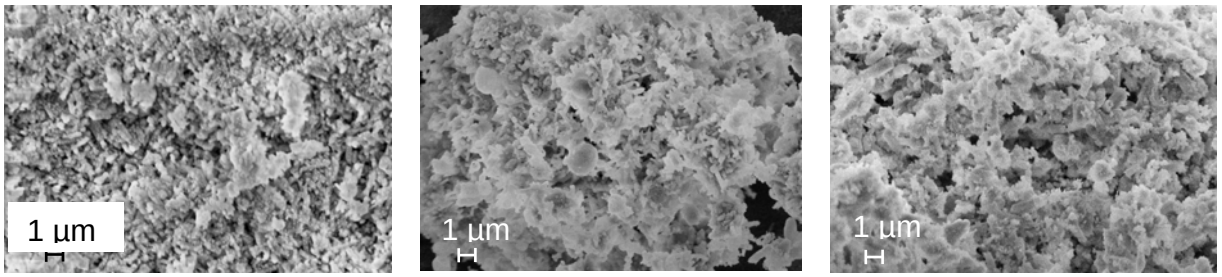


Figure III-15 : Diagrammes de diffraction des rayons X des ciments préparés à partir de : a). CCA et vatérite non broyés (ciment de référence) ; b). CCA broyé et vatérite non broyée ; c) (CCA + vatérite) co-broyés ; A : aragonite, V : vatérite, N : NaCl, NC : Na_2CO_3.

Le diffractogramme de rayons X du ciment préparé avec le CCA broyé (figure III-15-b) ne présente pas de différence significative avec celui du ciment de référence. En revanche, le co-broyage de la phase solide permet d'avoir une réaction plus complète : la vatérite réagit presque complètement (figure III-15-c).

La figure III-16 présente les clichés réalisés au microscope électronique à balayage pour les trois types de ciments. Il semble que les traitements des poudres réactives, et en particulier le co-broyage de la phase solide affectent sensiblement la morphologie des cristaux d'aragonite formés lors de la prise : le ciment de référence (cliché a) présente des cristaux aciculaires alors que les aiguilles du cliché c semblent émoussées.



a). CCA et vatérite non broyés : ciment de référence

b). CCA broyé et vatérite non broyée

c). CCA + vatérite co-broyés

Figure III-16 : Micrographies MEB des ciments préparés à partir de phases solides non traitées ou traitées.

3.2. Cinétique de la réaction de prise

Le suivi de la prise de ce ciment par infrarouge en mode réflexion, comme réalisé pour le ciment $CaCO_3$-CaP n'est pas possible. En effet le cristal utilisé est constitué de ZnSe et ne permet pas de réaliser l'acquisition du spectre en-dessous de 750 cm^{-1}, qui correspond à un domaine intéressant pour l'examen des bandes carbonates. Un autre protocole a donc été mis en place : le ciment est préparé selon le protocole habituel et, à intervalles de temps réguliers, une partie du ciment est lyophilisée afin de stopper la réaction de prise. Des spectres infrarouges en transmission (à l'aide de pastilles de KBr) sont alors réalisés pour chaque temps. Afin de pouvoir comparer ces spectres, ils ont été normalisés.

La figure III-17 présente l'évolution des spectres infrarouges au-fur-et-à-mesure de la réaction de prise, pour le ciment de référence (poudres réactives non broyées). De l'aragonite commence à cristalliser dès la première heure de réaction, alors que la proportion de vatérite ne diminue pas. Il est vraisemblable que le $CaCO_3$ amorphe présent dans le ciment, et plus soluble que la vatérite, se dissout en premier, entraînant la cristallisation d'aragonite. Une fois le CCA consommé, la vatérite se dissout à son tour.

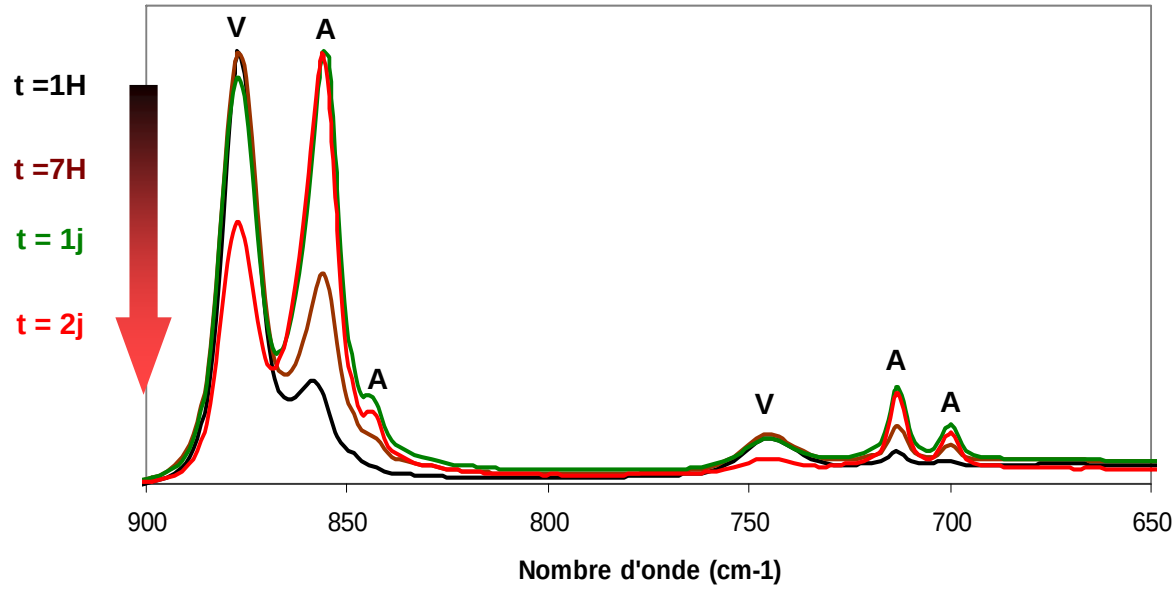


Figure III-17 : Évolution du spectre d'absorption infrarouge (région des carbonates) du ciment de référence : réaction stoppée à 1H ; 7H, 24H et 48H ; A : aragonite ; V : vatérite.

La figure III-18 compare les spectres infrarouges obtenus dans les mêmes conditions au bout d'un jour de prise pour le ciment de référence (poudres réactives non broyées), le ciment préparé avec le CCA broyé et la vatérite non broyée et le ciment préparé à partir des poudres co-broyées.

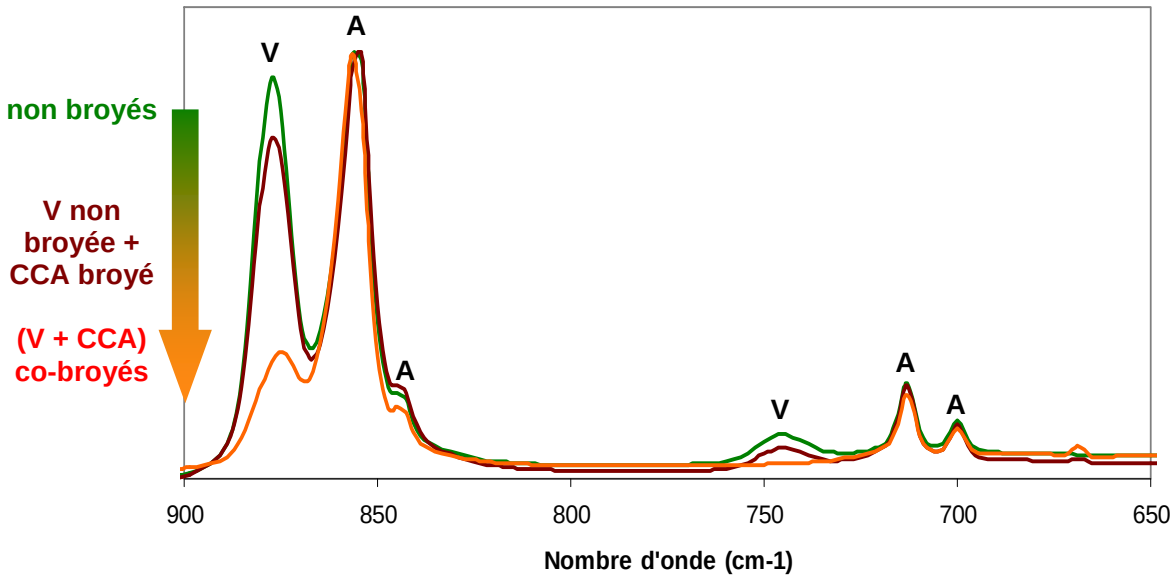


Figure III-18 : Comparaison des spectres d'absorption infrarouge (région des carbonates) de ciments préparés à partir de poudres non broyées, de CCA broyé et de (CCA+V) co-broyés et pour lesquels la réaction de prise a été stoppée au bout de 24h ; A : aragonite ; V : vatérite.

Ici aussi, et comme pour le ciment $CaCO_3$-CaP, la vitesse de réaction est accélérée par le broyage des poudres : le spectre du ciment préparé avec le CCA broyé présente une proportion de vatérite moins importante que celle du ciment de référence après un même temps de réaction.

C'est surtout l'accélération de la cinétique de prise conférée par le co-broyage de la phase solide qui est très importante : au bout d'un jour, la réaction est presque achevée et est plus complète que celle du ciment de référence après deux jours de prise (cf. figure III-17), puisqu'il reste moins de vatérite dans le ciment dur. Ceci corrobore d'ailleurs les résultats obtenus par diffraction des rayons X des ciments pris (figure III-15).

3.3. Injectabilité du ciment

La pâte du ciment $CaCO_3$ de référence (préparée à partir de poudres réactives non broyées) a la particularité d'être rhéofluidifiante : soumise à des sollicitations (comme elle l'est par exemple lors du gâchage), elle se fluidifie jusqu'à devenir complètement injectable. Cette propriété est illustrée sur la figure III-19, qui présente la courbe d'évaluation de l'injectabilité de ce ciment. Au temps initial, lorsque l'on commence à exercer une pression avec le piston

de la seringue sur la pâte, celle-ci se fluidifie, entraînant la diminution rapide de la charge d'injection ; cette dernière se stabilise ensuite autour de 2,5 kg.

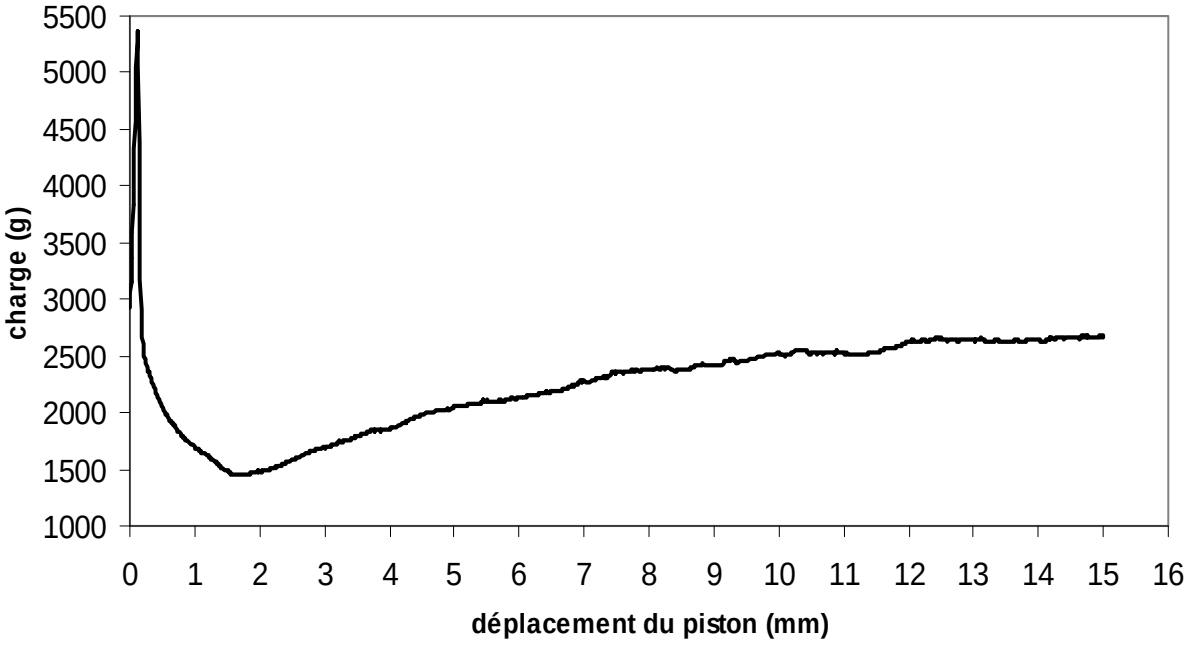


Figure III-19 : Courbe d'évaluation de l'injectabilité du ciment $CaCO_3$ préparé à partir de poudres non broyées (ciment de référence).

Il a d'ailleurs été montré que la réaction de prise et le durcissement du ciment ont lieu quel que soit l'état initial de la pâte (plus ou moins visqueuse) [Combes et coll., 2009]. Il est donc tout à fait envisageable d'ajuster la durée du gâchage afin d'obtenir une consistance de pâte adaptée à l'opération à réaliser, y compris d'obtenir une pâte complètement injectable. C'est pourquoi aucune étude d'injectabilité plus poussée n'a été réalisée pour ce ciment.

3.4. Conclusions et perspectives sur l'étude du ciment $CaCO_3$

Les résultats précédents ont permis de montrer que le co-broyage des poudres réactives s'avère également intéressant pour ce ciment, puisqu'il permet à la fois d'accélérer la prise du ciment et d'avoir une réaction de prise plus complète, ce qui pourrait améliorer les propriétés mécaniques du ciment pris.

Pour la suite de l'étude, il serait donc intéressant de réaliser à la fois l'étude du temps de prise et des propriétés mécaniques des ciments préparés à partir des poudres traitées et non traitées.

Conclusions et perspectives

Nous avons mis au point un dispositif et un protocole permettant d'évaluer l'injectabilité de la pâte des ciments qui prend en compte à la fois la charge nécessaire pour extruder la pâte et la masse de pâte extrudée.
Nous avons également établi un protocole simple permettant de quantifier semi-quantitativement la séparation de phases (phénomène de filter pressing) qui peut avoir lieu lors de l'injection/extrusion d'une pâte de ciment.

Les résultats décrits dans ce chapitre ont permis de montrer que les traitements de broyage et surtout de co-broyage de la phase solide, détaillés dans le chapitre II, permettent d'améliorer les propriétés d'usage des deux ciments :

- la prise des ciments n'est pas gênée par le traitement des poudres réactives.

- la réaction de prise n'est pas modifiée pour le ciment $CaCO_3$-CaP ; elle est plus complète pour le ciment uniquement à base de $CaCO_3$.

- la cinétique de prise est largement accélérée pour les deux types de ciments. Ce paramètre est très important d'un point de vue pratique car il est nécessaire que le ciment prenne rapidement pour qu'il reste cohésif et en place lorsque le chirurgien referme le site opératoire.

- l'injectabilité du ciment $CaCO_3$-CaP est très largement améliorée lorsque la phase solide co-broyée est utilisée : la charge maximale d'injection est divisée par un facteur 100 par rapport à la charge nécessaire pour déplacer le même volume de pâte préparée à partir de poudres non traitées. De plus, le phénomène de séparation de phases observable pour le ciment de référence est quasiment inexistant pour la pâte élaborée avec la phase solide co-broyée, ce qui représente un avantage double : d'une part, cela contribue à augmenter l'injectabilité du ciment, d'autre part, cela permet d'extruder une pâte de composition homogène et connue.

- la porosité du ciment $CaCO_3$-CaP est diminuée de moins de 2 % par les traitements de broyage et de co-broyage des poudres constituant sa phase solide. La modification principale est la disparition de la microporosité d'environ 10 µm, attribuée dans le ciment de référence à la dissolution des plaquettes de brushite.

- les propriétés mécaniques finales du ciment $CaCO_3$-CaP ne sont pas non plus affectées par le broyage et le co-broyage des poudres réactives à L/S constant. Par contre, le co-broyage de la phase solide permet de diminuer le rapport L/S dans la formulation de la pâte. Il est donc possible d'optimiser ce rapport afin d'améliorer les propriétés mécaniques du ciment.

L'étude a montré également que le séchage du ciment $CaCO_3$-CaP modifie la structuration de surface de l'apatite formée lors de la réaction de prise. En milieu humide, comme c'est le cas *in-vivo*, une couche hydratée et structurée est présente à la surface des nanocristaux d'apatite. Il serait donc intéressant d'étudier les propriétés physico-chimiques des ciments $CaCO_3$-CaP sans séchage préalable.

En ce qui concerne le ciment uniquement à base de carbonate de calcium, il est complètement injectable tel quel grâce à ses propriétés rhéofluidifiantes.

Plusieurs perspectives apparaissent : tout d'abord, il sera intéressant de compléter l'étude réalisée avec le ciment $CaCO_3$.
Ensuite, l'étude de l'influence des traitements des poudres sur la **cohésion** de la pâte semble une donnée intéressante : d'après les mesures réalisées pour quantifier le phénomène de séparation de phases qui peut avoir lieu lors de l'injection du ciment, il semble que la pâte préparée à partir des poudres co-broyées soit plus homogène et plus cohésive. Ceci peut être dû à la diminution de la taille des particules observée lors du co-broyage (cf. chapitre II) ainsi qu'aux modifications des propriétés de surface des particules qui peuvent changer les interactions particule-particule et particule-phase liquide. L'étude de ces phénomènes pourrait permettre d'optimiser la cohésion du ciment afin d'empêcher tout désagrégation lors de la mise en contact avec les fluides biologiques (phénomène dit de « wash-out »).
Enfin, nous avons choisi de stopper les traitements de broyage et de co-broyage lorsque la taille des particules minimale était atteinte (cf. chapitre II). On pourrait envisager d'étudier les pâtes préparées avec des poudres de tailles intermédiaires, pour lesquelles les traitements de broyage et de co-broyage seraient plus courts ou plus longs. Pour des durées de traitement

supérieures, l'agglomération des particules va être accentuée, pouvant notamment conduire à des distributions de taille multimodales, qui, selon Gbureck et coll. [2005] permettraient d'augmenter encore l'injectabilité de la pâte du ciment.

CHAPITRE IV :

ELABORATION, CARACTERISATIONS ET PROPRIETES DES FORMULATIONS DE CIMENTS CONTENANT DU STRONTIUM

Chapitre IV :
Élaboration, caractérisations et propriétés des formulations de ciments contenant du strontium

Ce chapitre traite de l'ajout d'un agent de contraste radio-opacifiant dans la formulation des ciments à base de carbonate de calcium, dans le but de les rendre détectables par radiographie aux rayons X au cours de leur implantation ainsi que lors de leur suivi postopératoire.

Dans un premier temps, une synthèse bibliographique permettra de préciser quels sont les agents de contraste généralement utilisés pour ce type d'applications, et pourquoi nous avons choisi d'utiliser le strontium dans cette étude.
Dans les parties suivantes, nous nous intéresserons aux résultats obtenus avec le ciment constitué de $CaCO_3$-CaP puis avec le ciment $CaCO_3$. Nous décrirons leurs préparations ainsi que les résultats des analyses physico-chimiques que nous avons réalisées. En particulier, nous détaillerons l'influence de l'introduction du strontium dans la formulation du ciment $CaCO_3$-CaP sur ses propriétés d'usage.

1. Revue Bibliographique

Pour qu'un ciment hydraulique puisse être implanté à l'aide de techniques chirurgicales peu invasives, il doit non seulement être injectable mais aussi aisément détectable au moment de l'implantation et lors du suivi postopératoire. En effet, il est nécessaire de suivre la mise en place du ciment dans le site à combler afin de vérifier l'absence de fuite dans les tissus environnants, l'absence de défauts marginaux et le remplissage complet de la cavité. Il est également important de surveiller l'évolution du ciment une fois implanté : il sera alors possible, en examinant l'interface os-ciment, d'observer la résorption du ciment et la repousse osseuse.
En chirurgie dentaire, la radio-opacité des ciments peut également permettre de détecter des caries secondaires et de surveiller le contact du ciment avec les dents adjacentes. L'opacité

doit donc être au minimum de l'ordre de celle de la dentine pour ne pas confondre le biomatériau avec une dent cariée [Cruvinel et coll., 2007].
Il faut donc non seulement **que le ciment soit visualisable** mais aussi **qu'il puisse être distingué de l'os ou de la dent du patient**. Pour cela, la radiographie aux rayons X est une technique adaptée, qui est largement répandue en milieu hospitalier et dans les cabinets dentaires et qui n'est pas douloureuse.

La radio-opacité d'un matériau peut être définie comme sa capacité à absorber des ondes électromagnétiques, et en particulier les rayons X. La propriété de radio-opacité est essentiellement affectée par la densité de la matière irradiée par les rayons X et dépend également de plusieurs facteurs : bien évidemment la composition et la concentration de l'agent de contraste introduit dans le matériau, mais aussi le rapport L/S du ciment (qui influe sur sa porosité), l'épaisseur du matériau, l'angle que fait le faisceau de rayons X avec le matériau, la méthode employée pour la mesure de l'opacité et, éventuellement, le type de film utilisé et l'âge des solutions servant à développer et à fixer le cliché [Cruvinel et coll., 2007].
L'épaisseur du ciment étant imposée par la taille de la cavité à combler, seules les modifications du rapport L/S ou de la composition du ciment sont des voies envisageables pour augmenter la radio-opacité intrinsèque d'un ciment. Faire varier le rapport L/S bouleverse de nombreuses autres propriétés du ciment (injectabilité, temps de prise, porosité, propriétés mécaniques…). Par conséquent, la démarche qui est généralement adoptée pour rendre un ciment opaque, qu'il soit minéral ou polymère, est d'ajouter à la composition initiale du ciment un agent de contraste opacifiant.

Ce paragraphe abordera dans une première partie les différents agents de contraste utilisés dans le domaine biomédical, puis il traitera plus particulièrement du strontium que nous avons choisi pour cette étude. Enfin, une synthèse bibliographique sur l'utilisation du strontium dans les ciments sera réalisée.

1.1. Agents de contraste radio-opacifiants utilisés dans le domaine biomédical

La radio-opacité d'un biomatériau est ordinairement obtenue par incorporation de particules sous formes de verres ou de céramiques contenant des métaux lourds tels que le baryum, le

strontium ou encore le zirconium [Cruvinel et coll., 2007]. On trouve également des composés iodés parmi les agents de contraste actuellement utilisés.

De manière plus générale, **la radio-opacité d'un composé augmente avec le numéro atomique de l'élément** : un atome plus lourd absorbe plus d'énergie provenant des rayons X et confère donc une opacité accrue [Aoyagi et coll., 2005].

À titre d'exemple, le tableau IV-1 regroupe quelques ciments radio-opaques et précise la nature chimique de l'agent de contraste employé ainsi que la proportion introduite dans la formulation de ciments acryliques biomédicaux.

Tableau IV-1 : Exemples d'agents de contraste utilisés dans des ciments acryliques pour vertébroplastie, [Vrignaud et coll.]

nom commercial du ciment	**société**	**agent de contraste utilisé**	**proportion introduite**
Ostéopal®	Biomet	dioxyde de zirconium ZrO_2	45 % de la phase solide
Bone Cement®	Biomet	dioxyde de zirconium ZrO_2	60 % de la phase solide
Osteofirm®	Cook	sulfate de baryum $BaSO_4$	35 % de la phase solide
Spineplex®	Strycker	sulfate de baryum $BaSO_4$	30 % de la phase solide
Spine-fix®	Teknimed	sulfate de baryum $BaSO_4$	25 % de la phase solide
Synicem VTP®	Synimed	sulfate de baryum $BaSO_4$	40 % de la phase solide
Vertebroplastic®	Depuy	sulfate de baryum $BaSO_4$	29 % de la phase solide

Pittet et coll. [2002] ont mis en place un modèle qui permet de calculer le coefficient d'atténuation linéique de l'intensité des rayons X transmise à travers un matériau. Ce coefficient dépend du numéro atomique, de la concentration volumique de chaque élément introduit dans le matériau, ainsi que de l'épaisseur du matériau. Ce modèle leur a permis de mettre en évidence la nécessité d'ajouter un agent de contraste opacifiant dans les ciments phosphocalciques, qui, intrinsèquement, ne peuvent être suffisamment opaques. Ils ont étudié l'ajout de divers opacifiants : organiques, inorganiques, solubles ou non solubles. Il apparaît que les composés inorganiques solubles (composés iodés dans leur calculs) sont les plus

efficaces : ce sont ceux qui nécessitent la proportion pondérale la moins importante pour obtenir une opacité aux rayons X fixée.

Malgré la palette d'agents de contraste potentiellement utilisables, le choix se réduit lorsque l'on prend en compte leurs inconvénients respectifs. Les composés iodés sont une source potentielle de réactions allergiques, parfois mortelles. De plus, leur classification en tant que produits pharmaceutiques complique les procédures de certification [Bohner et coll., 2005-b]. L'utilisation de composés inertes (non résorbables) tels que le sulfate de baryum ou l'oxyde de zirconium dans des matrices résorbables provoque à long terme une libération lente et continue de ces composés dans le corps humain [Damron, 2006]. Lewis et coll. [2007] rapportent par ailleurs des études où des particules de ZrO_2 ou de $BaSO_4$ ont contribué à accroître la résorption osseuse.
Dans tous les cas, l'ajout de ces additifs peut modifier les propriétés mécaniques, physiques et biologiques des ciments. Ils peuvent également interagir avec le processus chimique de réaction de prise, et ce, particulièrement s'il s'agit de composés solubles.

1.2. Avantages et limitations de l'utilisation du strontium et du carbonate de strontium

Dernièrement, plusieurs études proposent d'utiliser le strontium comme agent de contraste radio-opacifiant dans les ciments à base de phosphates de calcium [Bohner et coll., 2005-b ; Wang et coll., 2007]. Le numéro et la masse atomiques du strontium étant supérieurs à ceux du calcium et du phosphore, l'introduction de strontium dans des matrices phosphocalciques devrait effectivement augmenter leur opacité. Les avantages et inconvénients de l'ajout de strontium dans de tels matériaux sont décrits ci-après.

1.2.1. L'élément strontium dans le corps humain

Le principal avantage du strontium vis-à-vis d'autres agents de contraste potentiels est qu'il est déjà présent à l'état de traces dans le corps humain. En effet, le taux physiologique du strontium dans le plasma humain est compris entre 0,11 et 0,31 $\mu mol.L^{-1}$ [Marie et coll., 2001]. Par ailleurs, plus de 99 % du strontium du corps humain s'accumule dans les os

[Cohen-Solal, 2002]. Ainsi, implanter du strontium à l'intérieur d'un site osseux en quantité relativement faible revient à incorporer **un élément « connu » de l'organisme** qui sera donc apte à le réguler par des processus physiologiques normaux.
En effet, des études ont montré que le strontium suit, dans le corps humain, le même chemin physiologique que le calcium [Cohen-Solal, 2002]. Ingéré, le strontium est distribué à-travers le corps dans le plasma extracellulaire, les tissus mous et l'os. Le strontium peut être incorporé à l'émail dentaire ou au minéral osseux via deux types de mécanismes : d'abord par échange de surface puis par substitution ionique au sein du réseau apatitique, ce qui conduit à une incorporation du strontium relativement rapide dans de l'os jeune et à un échange à long terme dans de l'os plus vieux [Cohen-Solal, 2002]. Il a été montré *in-vitro* et *in-vivo* que l'incorporation du strontium dans le minéral osseux est réversible et dépend du site osseux, du sexe et de l'âge du patient, de la durée d'exposition au strontium et de la dose administrée [Cazalbou, 2000 ; Marie et coll., 2001]. Par conséquent, les effets du strontium *in-vivo* sont dose-dépendants.

En chirurgie dentaire, le strontium est déjà utilisé en tant que radio-opacifiant dans certains ciments [Lewis et coll., 2007], mais il semble qu'il ait également d'autres propriétés intéressantes : Landi et coll. [2008] rapportent la différence significative de composition de l'émail qui contiendrait en moyenne 104,1 µg $Sr.g^{-1}$ pour des populations de dents très cariées contre 184,0 µg Sr g^{-1} pour des dents faiblement cariées. Cet écart démontrerait l'action positive et préventive du strontium sur les caries. D'autres auteurs ont mesuré *in-vitro* l'action du strontium sur l'activité de bactéries présentes dans la cavité buccale : les bactéries sont inoculées sur des disques de ciment et les ions strontium libérés par les ciments ont un rôle antibactérien [Guida et coll., 2003], ce qui a pour double avantage une action préventive contre les caries et la diminution du risque d'infection bactérienne lors de la pause d'un ciment (caries récurrentes, maladies nosocomiales).

Une des revues bibliographiques concernant l'effet du strontium sur le corps humain [Marie et coll., 2001] synthétise de nombreuses études réalisées *in-vitro* sur des cultures cellulaires et *in-vivo* chez des animaux (rats, souris, singes) ainsi que quelques études cliniques préliminaires réalisées chez des femmes ménopausées et ceci sur différents sites osseux. Le strontium est administré sous forme de chlorure, de carbonate, de ranélate ou encore de lactate. À faible dose, le strontium réduit la résorption osseuse en bloquant directement l'action des ostéoclastes, sans pour autant présenter de toxicité pour ces cellules. Le strontium

favorise également la prolifération des cellules ostéoblastiques, augmentant ainsi la surface qu'elles occupent, c'est-à-dire le nombre de sites de formation osseuse. Ainsi, en présence de strontium, la masse osseuse est accrue sans en altérer ni le processus de minéralisation ni la composition chimique. Par ailleurs, des auteurs ont également rapporté l'effet stimulant du strontium sur la synthèse du collagène osseux [Landi et coll., 2008].
En conclusion, le strontium agit de manière synergique en inhibant l'activité des ostéoclastes (diminution de la résorption osseuse) et en stimulant celle des ostéoblastes (augmentation de la formation osseuse). De plus, il semble que le strontium possède des propriétés préventives mais aussi curatives [Marie et coll., 2001].

En revanche, de fortes doses de strontium ont des effets délétères sur la minéralisation osseuse, ce qui s'exprime à la fois par une diminution de la densité du minéral osseux et par une diminution de taille des cristaux de l'apatite. L'absorption du calcium est alors réduite et les propriétés du minéral sont vraisemblablement diminuées [Cohen-Solal, 2002 ; Landi et coll., 2008]. D'autres études pointent une relation de cause à effet entre une surdose de strontium et le développement de l'ostéomalacie (pathologie caractérisée par une décalcification osseuse), sans avoir pu, à notre connaissance, la démontrer [Cohen-Solal, 2002].

Ces résultats posent donc la question de la quantité de strontium à administrer : à faible dose, son action est bénéfique ; à forte dose, il a des conséquences néfastes. Cependant, déterminer une dose optimale s'avère délicat : d'une part, les doses proposées varient d'une étude à une autre (cf. tableau IV-2), d'autre part, ces doses correspondent majoritairement à des doses de strontium administré par voie orale, ce qui est tout à fait différent d'une dose apportée localement dans le site osseux, comme c'est le cas pour des ciments résorbables incluant du strontium dans leur formulation.

Tableau IV-2 : Doses tolérée et toxique de strontium (par kg et par jour) proposées dans diverses études

conditions de l'étude	**dose tolérée ou NOAEL (/kg/jour)**	**dose toxique ou LOAEL (/kg/jour)**	**référence**
chez des rats	/	> 8 mmol de Sr (i.e. 700 mg Sr)	[Cohen-Solal, 2002]
/	0,76 mg Sr	entre 510 et 3000 mg Sr	[Greve et coll., 2007]
chez des rats, Sr apporté sous forme de carbonate par ingestion	90 mg Sr	380 mg Sr	base de données IRIS (Integrated Risk Information System)
« selon des calculs réalisés d'après la littérature » (Homme), Sr apporté par ingestion	≤ 4 mmol Sr (i.e. 350 mg Sr)	/	[Marie et coll., 2001]
études cliniques (Homme), Sr apporté sous forme de ranélate par ingestion	0,1 mg de Sr	/	[Marie et coll., 2001]
doses thérapeutiques chez l'Homme, Sr apporté sous forme de ranélate par ingestion	entre 2,4 et 8,75 mmol de Sr (i.e. 210 à 767 mg Sr)	/	[Alkhraisat et coll., 2008]

♣ NOAEL : « No Observed Adverse Effect Level », i.e. dose de strontium qui n'a pas d'effets adverses visibles
♣ LOAEL : « Lowest Observed Adverse Effect Level », i.e. dose minimale de strontium qui entraîne des effets adverses visibles

Pour parer à cette difficulté, Alkhraisat et coll. [2008] se basent sur la concentration de strontium présente dans le plasma lors d'un traitement thérapeutique à base de ranélate de strontium, comprise selon eux entre 2 et 18 mg $Sr.L^{-1}$. Pour éviter toute action néfaste du strontium sur l'organisme, il faut que la quantité de strontium libéré par un ciment soit du même ordre de grandeur (dans leur cas, entre 12 et 30 mg $Sr.L^{-1}$ après 3 jours de libération).

1.2.2. Intérêt du carbonate de strontium en tant qu'agent de contraste

Une fois le choix du strontium comme agent de contraste réalisé, il reste encore à choisir sous quelle forme celui-ci sera introduit dans la formulation du ciment.

Les données du tableau IV-3 montrent que le carbonate de strontium a une solubilité du même ordre de grandeur que celle du carbonate de calcium. Par conséquent, non seulement le carbonate de strontium devrait être résorbable mais il ne devrait pas ou peu modifier le comportement en milieu aqueux des ciments à base de $CaCO_3$.

Tableau IV-3 : Solubilités du $SrCO_3$ et des diverses formes de $CaCO_3$ d'après la base de données [NIST]

	Strontianite ($SrCO_3$)	**Calcite** ($CaCO_3$)	**Aragonite** ($CaCO_3$)	**Vatérite** ($CaCO_3$)
pK_s à 25 °C	9,27	8,48	8,30	7,91

Le carbonate de strontium peut ainsi se solubiliser et libérer des ions carbonate et strontium, constituants minéraux de l'os et briques élémentaires pour la reconstruction osseuse. Le $SrCO_3$ est donc biocompatible. Par ailleurs, et comme nous l'avons déjà vu, la libération d'ions strontium, si elle se fait dans des doses adéquates et contrôlées, peut avoir une influence très positive sur la réparation osseuse.

1.3. Introduction du strontium dans des ciments phosphocalciques

Étant donné le potentiel prometteur du strontium, plusieurs auteurs ont étudié son incorporation dans des apatites, d'autant que les traitements à base de strontium par voie orale ont montré certaines limites : même en administrant de fortes doses de strontium, moins d'un atome de calcium sur 10 peut être substitué par du strontium dans le minéral osseux néoformé. La libération de strontium directement à partir du substitut osseux durant sa résorption pourrait pallier ces limitations et résoudre les contraintes que sont la dose, la durée du traitement et la proximité du site osseux [Landi et coll., 2008].

Cette partie se focalisera plus particulièrement sur l'incorporation du strontium dans des ciments, ce qui concerne directement notre étude. Jusqu'à présent, trois voies ont été envisagées pour introduire du strontium : ajouter un sel de strontium à la formulation de la phase solide, introduire le strontium dans les poudres réactives initiales en substitution des ions calcium, ou ajouter le strontium via la phase liquide.

Nous allons nous intéresser successivement aux trois voies d'insertion du strontium.

1.3.1. Ajout du strontium dans la phase solide

Cette voie consiste à ajouter un sel de strontium en plus des autres constituants de la phase solide.

Ainsi, Wang et coll. [2007] ont étudié l'addition de divers pourcentages massiques de carbonate de strontium (0, 4, 8, 12, 16 et 20 %) dans la phase solide d'un ciment à base de DCPD et de phosphate de calcium amorphe. Ils ont montré que, quelle que soit la proportion de carbonate de strontium introduit, le ciment prend et est constituée majoritairement d'une phase apatitique (dont les raies de diffraction aux rayons X ne sont pas altérées par l'ajout de carbonate de strontium), associée à du $SrCO_3$.

Guo et coll. [2005] ont étudié quant à eux l'addition d'hydrogénophosphate de strontium $SrHPO_4$ dans la phase solide du ciment constituée de TTCP et de DCPA, à divers pourcentages (rapport Sr/(Sr+Ca) = 0, 5 et 10 % molaires). Par réaction de prise, ils obtiennent des apatites non stœchiométriques dans lesquelles les ions strontium entrent dans le réseau en substitution des ions calcium.

Si dans un cas le strontium entre dans le réseau apatitique, et non dans l'autre, l'ensemble des propriétés des deux ciments est modifié et les conclusions des deux études sont similaires : la présence de strontium influe sur la microstructure du ciment : Wang et coll. [2007] précisent que la taille des cristaux diminue avec l'addition du $SrCO_3$. La porosité du ciment a également tendance à augmenter (plus précisément entre 20 et 350 Å dans l'étude de Wang et coll. [2007]). Par ailleurs, le temps de prise est significativement accru lorsque du strontium est ajouté, que ce soit sous forme de $SrCO_3$ ou de $SrHPO_4$. Guo et coll. [2005] expliquent ce

phénomène par l'effet inhibiteur connu du strontium sur la précipitation d'apatite [Christoffersen et coll., 1997].

L'étude de Wang et coll. [2007] précise également que la viscosité de la pâte est diminuée lors de l'addition de carbonate de strontium, ce qui a pour conséquence directe d'augmenter l'injectabilité (optimum à 8 % de $SrCO_3$ dans la phase solide). Dans les deux études ([Guo et coll., 2005 ; Wang et coll., 2007]), la proportion de strontium introduit influe sur la résistance en compression des ciments mais de manière non linéaire (optimum à 8 % de $SrCO_3$ dans la phase solide).
Wang et coll. [2007] montrent aussi, grâce à des essais de radio-opacité, que celle-ci augmente avec la concentration de carbonate de strontium. Guo et coll. [2005] quant à eux, démontrent que le strontium favorise la croissance cellulaire *in-vitro*. De plus, la substitution des ions calcium par des ions strontium augmente la solubilité des apatites.

Des études rapportent également l'utilisation de strontium dans des ciments acryliques, par exemple sous forme de SrO ajouté à la phase solide. Comparé à des ciments contenant du sulfate de baryum comme opacifiant, le temps de prise est diminué mais la température maximale atteinte durant la prise est augmentée et la résistance en fatigue des ciments est réduite [Lewis et coll., 2007].

1.3.2. Substitution du calcium dans les produits réactifs

Cette voie consiste à introduire du strontium en substitution du calcium dans les poudres réactives constituant la phase solide au moment de leurs synthèses. Ainsi, les ions strontium participeront à la réaction de prise du ciment et se retrouveront piégés dans le ciment final.

Leroux [2000] a ainsi préparé des ciments à partir de phosphate tricalcique mixte partiellement substitué ($Ca_{3-x}Sr_x(PO_4)_2$) et à partir d'un mélange de phosphate tricalcique plus phosphate tristrontique. Ces sels de phosphates étant très peu réactifs, la cinétique de réaction de prise est trop longue et cette voie a été abandonnée.

Alkhraisat et coll. [2008] et Pina et coll. [2009] ont également synthétisé du phosphate tricalcique dans lequel les ions calcium sont partiellement substitués par des ions strontium

($Ca_{3-x}Sr_x(PO_4)_2$) et l'utilisent comme réactif pour préparer un ciment. Alkhraisat et coll. [2008] ont montré que la quantité de strontium introduite modifie le pH mesuré dans le ciment lors de la réaction de prise (plus de strontium conduit à une diminution du pH), ce qui influence la composition de la phase principale du ciment (brushite puis monétite pour des teneurs plus importantes) et la quantité de produits résiduels dans la composition finale diminue.

Yu et coll. [2009], quant à eux, ont choisi d'introduire le strontium dans leur produit initial par co-broyage de la brushite avec de l'hydroxyde de calcium et du carbonate de strontium. Ils obtiennent ainsi un phosphate de calcium amorphe contenant du strontium, qui entre dans la composition de la phase solide du ciment. Les ciments durs sont alors constitués d'apatite partiellement substituée, ainsi que de $SrCO_3$ résiduel, dont la quantité diminue après 10 jours de prise.

Les propriétés d'usage de ces ciments ont été testées : le temps de prise augmente avec l'ajout de strontium. C'est également le cas dans l'étude de Alkhraisat et coll. [2008], mais uniquement jusqu'à une teneur en strontium fixée par le rapport Sr/(Sr+Ca) = 20 %. Par ailleurs, ces derniers n'observent aucune différence significative de porosité ou des propriétés mécaniques des ciments contenant du strontium, alors que pour Yu et coll. [2009], la porosité et la taille des pores sont modifiées : la majeure partie de la porosité des ciments concentrés en strontium est constituée de pores de moins de 100 nm, alors que pour des teneurs plus faibles, les pores sont majoritairement de taille supérieure à 100 nm. Par conséquent, la proportion de strontium induit une variation de la résistance en compression des ciments, toutefois non linéaire.
Yu et coll. [2009] confirment l'augmentation de radio-opacité des ciments avec la teneur en strontium. Alkhraisat et coll. [2008], quant à eux, ont pratiqués des tests de libération du strontium dans de l'eau. Les résultats indiquent que plus le ciment contient de strontium, plus la quantité de strontium libérée augmente. Les tests réalisés *in-vitro* sur cellules hFOB1.19 (ostéoblastes humains) n'ont pas montré d'influence significative de la présence de strontium dans les ciments sur l'activité et la prolifération cellulaires.

1.3.3. Ajout du strontium dans la phase liquide

Cette voie consiste à dissoudre un sel de strontium dans la phase liquide utilisée pour gâcher le ciment. Deux contraintes majeures restreignent alors la quantité de strontium qu'il est possible d'introduire dans un ciment : d'une part, la solubilité du sel et d'autre part, les ciments minéraux ayant généralement besoin de molécules d'eau pour la réaction de prise, une concentration trop élevée de sel de strontium limite la quantité d'eau disponible pour la prise du ciment [Alkhraisat et coll., 2008].

Leroux [2000] a préparé des ciments contenant du strontium à partir de deux phases liquides différentes : la première contenant de la strontiane $Sr(OH)_2,8H_2O$ et la seconde du nitrate de strontium $Sr(NO_3)_2$. Dans tous les cas, la composition finale du ciment dépend de la proportion de strontium introduite : pour un rapport Sr/(Sr+Ca) inférieur à 10 %, la phase majoritaire est apatitique, avec incorporation du strontium dans le réseau apatitique pour la solution de nitrate de strontium. Lorsque la teneur en strontium augmente, la quantité de produits de départ résiduels augmente, et l'apatite est de moins en moins bien cristallisée.

Les propriétés mécaniques de ces ciments ont été mesurées : à quantité d'eau égale, il semble y avoir un effet négatif du strontium sur leur résistance mécanique [Leroux, 2000].

Des tests de libération du strontium ont montré qu'une quantité relativement faible de cet élément est libérée et qu'elle correspond majoritairement à la dissolution des phases solubles résiduelles (nitrate de strontium par exemple). Au bout de 15 jours en milieu aqueux, il semble qu'il y ait re-précipitation d'une phase calco-strontique qui peut engendrer soit la libération de strontium soit l'incorporation de strontium dans la phase apatitique remodelée [Leroux, 2000].

2. Étude du ciment $CaCO_3$-CaP

Cette partie du chapitre développe les résultats que nous avons obtenus lors de l'introduction du strontium dans le ciment $CaCO_3$-CaP. Nous aborderons tout d'abord la préparation et les caractérisations physico-chimiques du ciment contenant du strontium. Ensuite, nous nous

intéresserons à sa radio-opacité et à ses propriétés d'usage. Nous décrirons alors le comportement du ciment en milieu aqueux. Enfin, nous présenterons les premiers résultats d'une étude cellulaire *in-vitro*, réalisée avec des cellules précurseurs des ostéoblastes.

2.1. Préparation et caractérisations physico-chimiques du ciment contenant du strontium

Nous nous sommes intéressés à l'ajout de strontium dans la formulation du ciment. Pour ce faire, deux des trois voies présentées précédemment ont été envisagées : l'ajout de strontium dans la phase solide (et il s'ajouterait alors au mélange de vatérite et brushite) et dans la phase liquide (dissous dans l'eau désionisée). Nous avons choisi d'étudier les deux cas et de les comparer afin de déterminer si l'un des deux confère de meilleures propriétés au ciment.

Afin de déterminer sous quelle forme le strontium allait être ajouté, nous nous sommes intéressés à plusieurs sels de strontium.
Pour l'ajout via la phase solide, le carbonate de strontium s'est imposé comme le meilleur candidat car le ciment $CaCO_3$-CaP contient déjà des ions carbonate. Par ailleurs le $SrCO_3$ a une solubilité relativement proche de celle du $CaCO_3$ et devrait par conséquent peu modifier la cinétique de résorption du ciment.
Pour l'ajout de strontium via la phase liquide, nous avons choisi d'utiliser le chlorure de strontium, qui possède la solubilité la plus élevée des sels de strontium (voir annexe D) et nous permettra ainsi de préparer des phases liquides suffisamment concentrées. Par ailleurs, les ions chlorure sont également présents dans l'organisme humain, notamment sous forme de NaCl et ne sont pas toxiques.

2.1.1. Ajout dans la phase solide : $SrCO_3$

2.1.1.1. Le carbonate de strontium

Le $SrCO_3$ utilisé dans cette étude est un produit commercial (Alfa Aesar®) qui se présente sous la forme de particules granulaires (figure IV-1) de diamètre moyen $d_{0,5}$ = 9 µm, identique à celui de la brushite (cf. chapitre II).

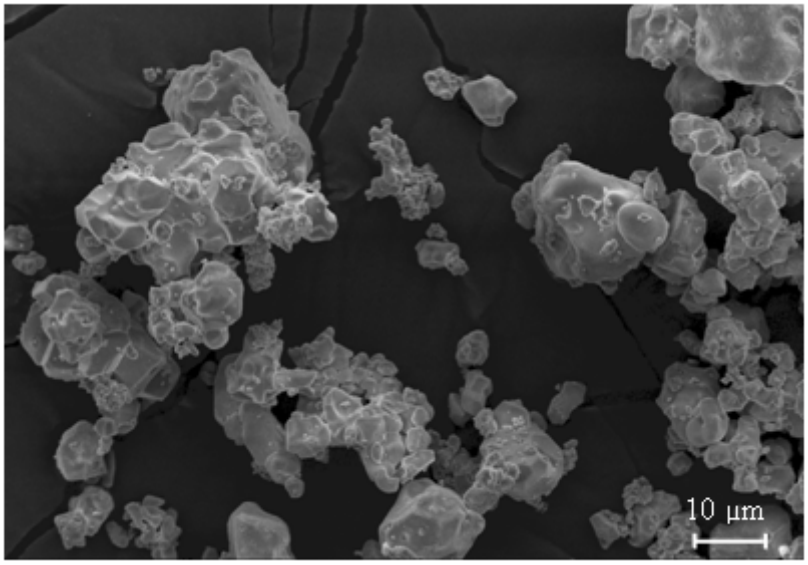


Figure IV-1 : Micrographie MEB du $SrCO_3$ commercial utilisé.

La distribution granulométrique de ses particules, présentée sur la figure IV-2, est bimodale, avec le premier mode centré autour de 0,6 µm et le second autour de 10 µm.

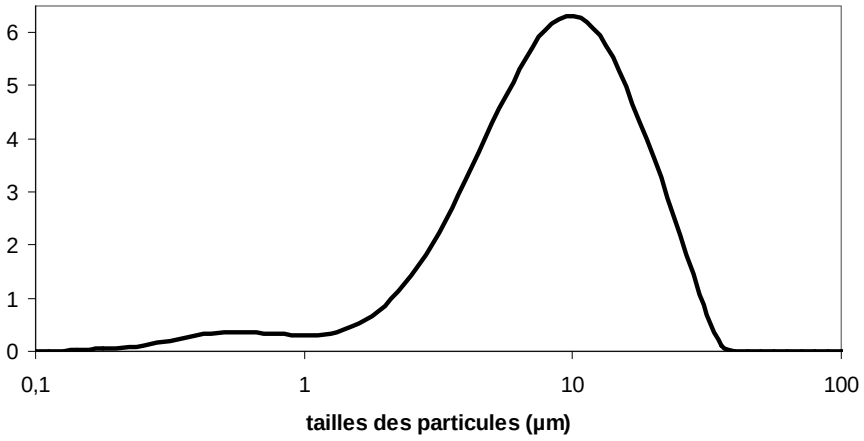


Figure IV-2 : Distribution granulométrique des particules de $SrCO_3$ commercial utilisé.

2.1.1.2. Préparation des ciments

Les ciments contenants du $SrCO_3$ sont préparés en conservant les rapports massiques $\frac{vatérite}{brushite} = 1$ ainsi que $\frac{L}{S} = 0{,}5$. Le tableau IV-4 récapitule les quantités de chaque composant nécessaires à la préparation d'un ciment.

La quantité de strontium est exprimée en pourcentage pondéral de $SrCO_3$ introduit dans la phase solide (de 0 à 20 %). Nous avons également calculé le pourcentage massique de l'élément strontium dans la pâte du ciment (phase solide + phase liquide). C'est d'ailleurs ce pourcentage qui sera utilisé dans la suite de l'étude pour identifier les ciments, et ce afin de pouvoir comparer les proportions de strontium dans la formulation du ciment quelle que soit la voie d'ajout du strontium étudiée (dans la phase solide ou dans la phase liquide).

Tableau IV-4 : Composition de la pâte des différents ciments contenants du $SrCO_3$

PHASE SOLIDE				**PHASE LIQUIDE**	**PÂTE**
% massique de $SrCO_3$	masse DCPD (g)	masse vatérite (g)	masse $SrCO_3$ (g)	masse eau désionisée (g)	% massique de Sr dans la pâte
0 % - ciment de référence	1	1	0	1	0 %
5 %	0,95	0,95	0,1	1	2 %
10 %	0,90	0,90	0,2	1	4 %
15 %	0,85	0,85	0,3	1	6 %
20 %	0,80	0,80	0,4	1	8 %

Après avoir mélangé manuellement les trois composants de la phase solide, le ciment est préparé selon le protocole décrit dans le chapitre I. La figure IV-3 représente les diagrammes de diffraction de rayons X des ciments préparés avec différentes proportions de $SrCO_3$ et donc avec différents pourcentages pondéraux de strontium dans la pâte.

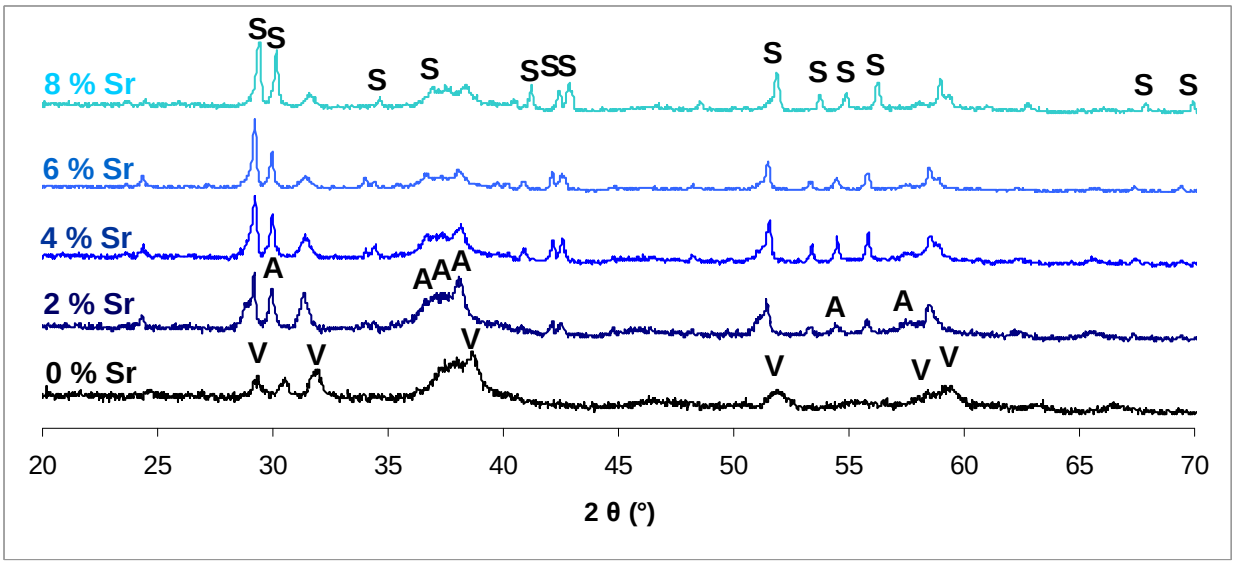


Figure IV-3 : Diagrammes de diffraction des rayons X des ciments préparés avec différentes proportions de Sr dans la pâte ; V : Vatérite ; S : $SrCO_3$; A : Apatite mal cristallisée.

Le ciment de référence (sans strontium) est composé de vatérite et d'apatite mal cristallisée. Au-fur-et-à-mesure de l'addition de $SrCO_3$ dans la phase solide, les raies caractéristiques de ce composé deviennent de plus en plus intenses sur le diffractogramme du ciment pris, ce qui indique que le $SrCO_3$ ne participe pas à la réaction de prise de manière significative, mais reste tel quel dans le ciment final.

La figure IV-4 présente des micrographies montrant la microstructure des ciments contenant différentes proportions de carbonate de strontium. L'examen des clichés ne met pas en évidence d'influence notable de la présence de $SrCO_3$ sur la microstructure des ciments.

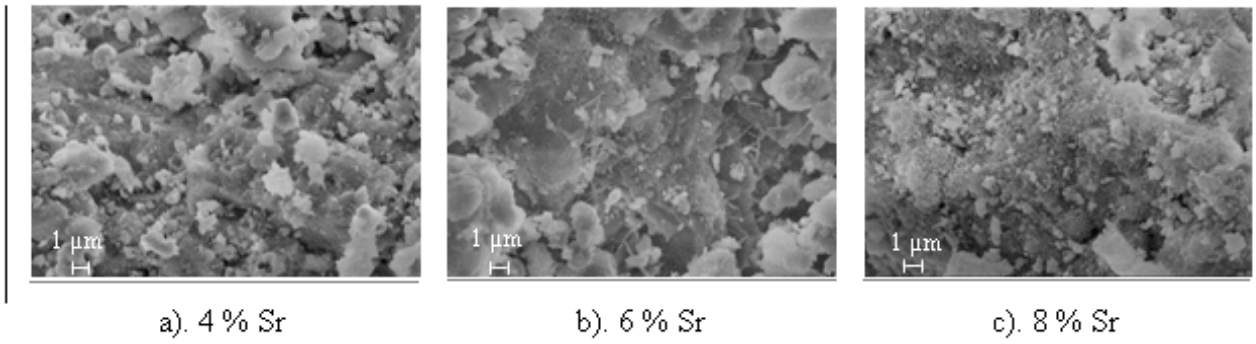
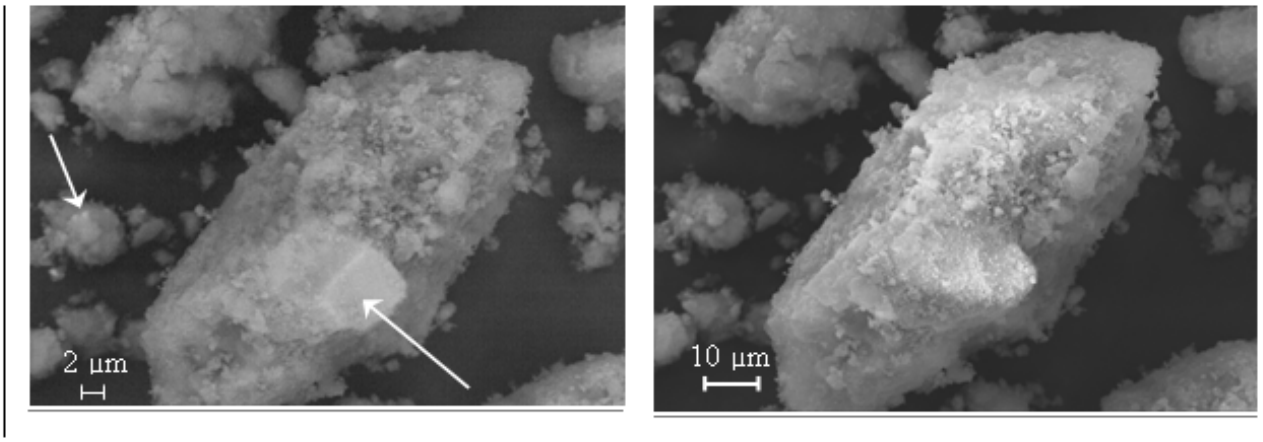


Figure IV-4 : Clichés MEB des ciments préparés à partir de la phase solide contenant diverses proportions de $SrCO_3$ (différents pourcentages massiques de strontium dans la pâte).

D'après les diagrammes de diffraction de rayons X, on sait qu'il reste des particules de carbonate de strontium dans les ciments pris. Cependant, le $SrCO_3$ n'affectant pas la microstructure apparente des ciments, il est difficile de l'observer au détecteur d'électrons secondaires. En revanche, il est décelé plus facilement par contraste chimique, en utilisant le détecteur à électrons rétrodiffusés. Sur la figure IV-5, qui compare le même cliché obtenu avec deux détecteurs différents, on observe la particule de $SrCO_3$ (qui apparaît plus claire) sur le cliché IV-5-a. Cette observation confirme que le $SrCO_3$ reste sous sa forme initiale dans le ciment dur : le ciment prend autour et englobe les particules de carbonate de strontium.



a). $SrCO_3$ visualisé au détecteur à électrons rétrodiffusés (contraste chimique)

b). ciment visualisé au détecteur à électrons secondaires

Figure IV-5 : Clichés MEB du ciment contenant 20 % de $SrCO_3$ dans la phase solide.

Comme on peut le voir sur les micrographies, les particules de $SrCO_3$ sont dispersées de manière hétérogène dans la matrice du ciment. Il est donc probable que le contraste d'un tel ciment sur un cliché obtenu par radiographie à rayons X ne sera pas non plus homogène, ce que l'on souhaite éviter. Dans le but de pallier cet inconvénient, nous nous sommes donc intéressés au co-broyage de la phase solide.

2.1.2. Ajout dans la phase solide : $SrCO_3$ co-broyé

Cette partie du chapitre s'intéresse donc au co-broyage de la phase solide à trois constituants : vatérite, brushite et $SrCO_3$. Le but est double : ce co-broyage devrait améliorer les propriétés du ciment, dont l'injectabilité (voir chapitre III), et homogénéiser la répartition du $SrCO_3$ dans l'ensemble du ciment. Une meilleure dispersion de l'agent de contraste devrait en effet

permettre d'obtenir une radio-opacité idoine dans tout le matériau, et éventuellement de diminuer la quantité de $SrCO_3$ nécessaire.

2.1.2.1. Étude du co-broyage de la phase solide du ciment contenant du carbonate de strontium

L'étude du broyage et co-broyage du $SrCO_3$ a été réalisée en collaboration avec N. Le Bolay du Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse.

Avant de nous intéresser au traitement de la phase solide par co-broyage, nous devons étudier le comportement au broyage du $SrCO_3$ commercial. La figure IV-6 présente l'évolution de la distribution granulométrique des particules de $SrCO_3$ au cours du broyage. Au temps initial, la taille des particules présente une distribution bimodale. Au-fur-et-à-mesure du broyage, la proportion de particules fines augmente au détriment des plus grosses et on obtient une distribution monomodale qui se rapproche du mode le plus petit (centré autour de 0,5 µm).

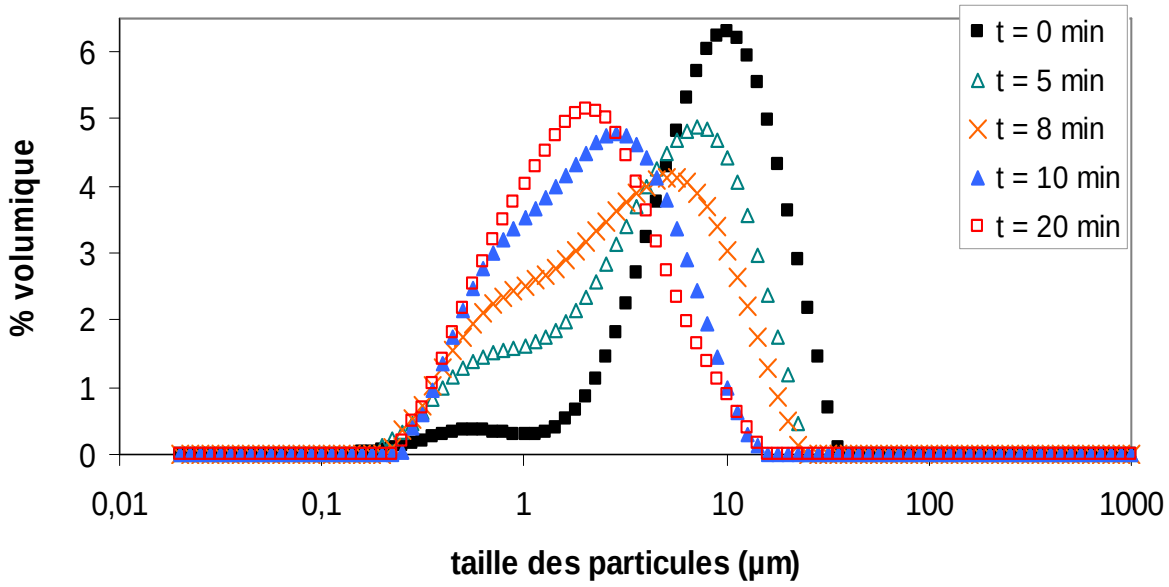


Figure IV-6 : Évolution de la distribution granulométrique des particules de $SrCO_3$ au cours du broyage.

En conséquence, le diamètre moyen des particules, calculé d'après leur distribution granulométrique, diminue au cours du broyage, pour passer de $d_{0,5}$ = 9,0 µm à t = 0 à $d_{0,5}$ = 1,9 µm à t = 20 min (figure IV-7). Par ailleurs, nous avons observé qu'au-delà de vingt minutes, les particules ont tendance à s'agglomérer entre elles.

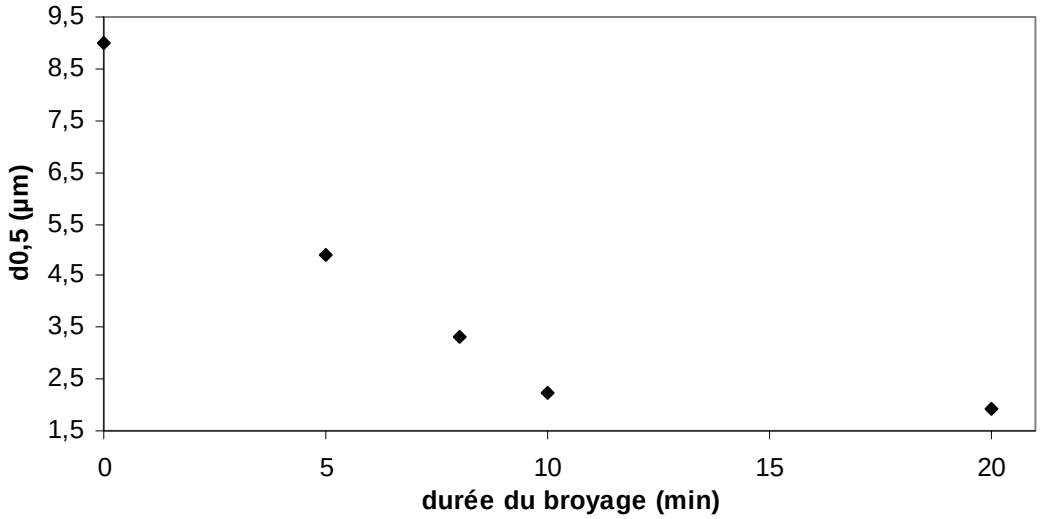


Figure IV-7 : Évolution du diamètre moyen des particules de $SrCO_3$ en fonction de la durée du traitement de broyage.

La figure IV-8 présente l'évolution morphologique des grains de $SrCO_3$ au cours du broyage : les particules se fissurent puis se fragmentent, pour former des particules de plus petites tailles, qui ont tendance à s'agglomérer sur les particules plus grosses non encore broyées. Au bout de 10 minutes, on commence à voir des agglomérats de particules fines.

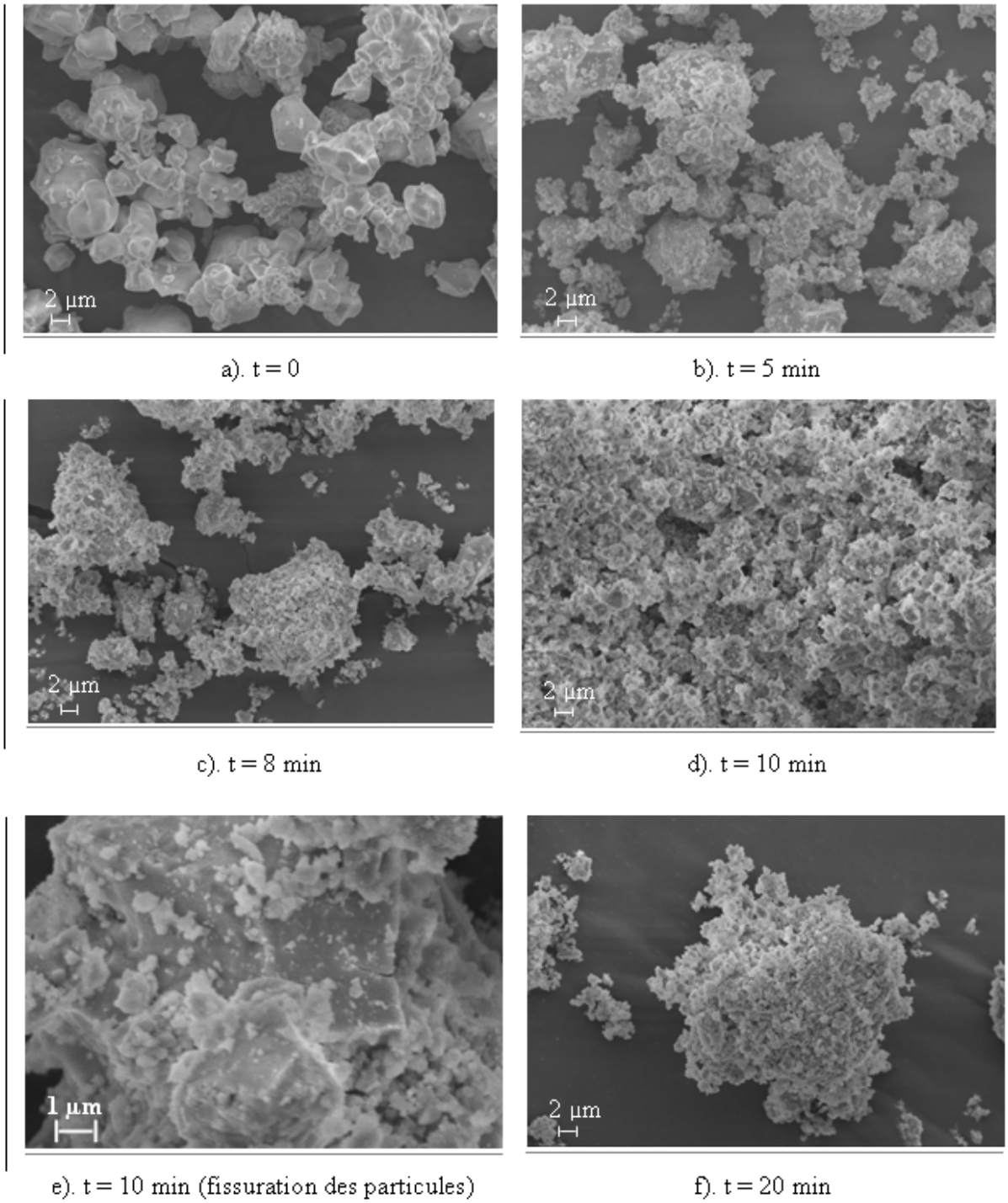


Figure IV-8 : Micrographies MEB présentant l'évolution morphologique des particules de $SrCO_3$ après différentes durées de broyage.

Le comportement au broyage de $SrCO_3$ est donc sensiblement comparable à celui de la brushite (cf. chapitre II).

2.1.2.2. Étude du co-broyage de la phase solide contenant du carbonate de strontium

Nous avons réalisé le co-broyage de la phase solide contenant diverses proportions de carbonate de strontium (10, 15 et 20 %). La figure IV-9 présente l'évolution du diamètre moyen des particules en fonction de la durée de co-broyage, et ce pour les trois compositions de phase solide. L'évolution est sensiblement la même pour les trois courbes : le diamètre chute rapidement dans les 5 à 6 premières minutes de co-broyage puis il diminue plus doucement pour atteindre un $d_{0,5}$ de l'ordre de 2,4 µm.
En conséquence, nous présenterons de manière plus détaillée uniquement les résultats obtenus pour la composition incluant 10 % de carbonate de strontium dans la phase solide.

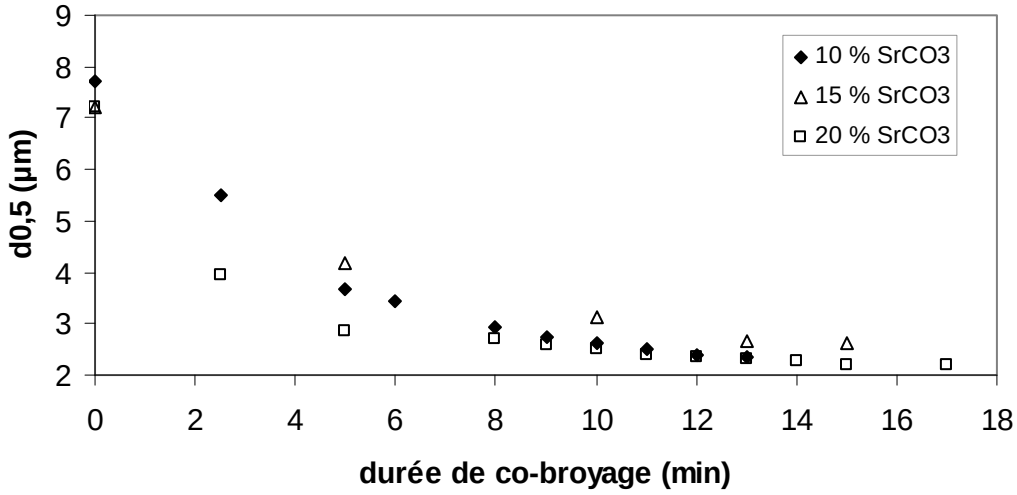


Figure IV-9 : Évolution du diamètre moyen des particules de la phase solide au cours du co-broyage.

Afin d'analyser de manière plus précise l'évolution de la taille des particules, la figure IV-10 présente l'évolution de la distribution granulométrique de cette phase solide co-broyée au cours du traitement.

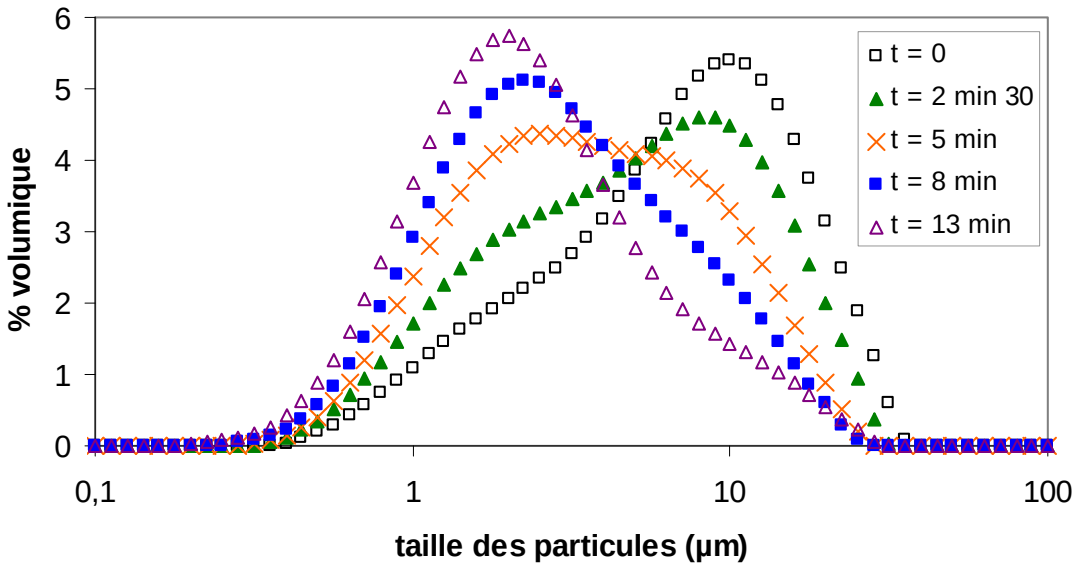


Figure IV-10 : Évolution de la distribution granulométrique de la phase solide contenant 10 % de $SrCO_3$ au cours du co-broyage.

La distribution granulométrique initiale est composée de deux modes : le premier est centré autour de 1,8 µm (~ $d_{0,5}$ de la vatérite) et le second autour de 9 µm environ (dû à la fois au $d_{0,5}$ des particules de brushite et à celui des particules de $SrCO_3$). Au-fur-et-à-mesure du co-broyage, la proportion de particules de taille la plus élevée diminue au profit de celle des plus petites : au bout de 5 minutes de co-broyage, le prorata des deux tailles de particules s'est inversé, ce qui explique la chute rapide du diamètre moyen des particules de la phase solide.

La figure IV-11 présente l'évolution des diffractogrammes de rayons X de cette phase solide (10 % $SrCO_3$) en fonction de la durée de co-broyage. Afin de pouvoir les comparer, les diffractogramme ont été normalisés (intensité de la raie (020) = 100). En effet, il est important de vérifier que la présence de carbonate de strontium dans la phase solide ne favorise pas de réaction(s) mécano-chimique(s) lors du co-broyage.

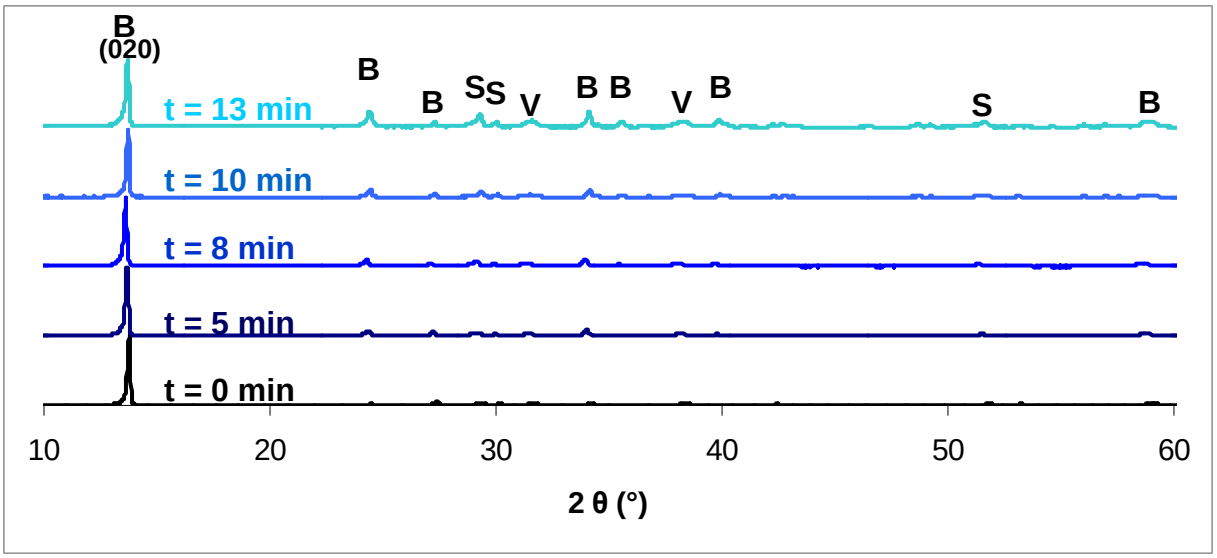


Figure IV-11 : Évolution des diagrammes de diffraction de rayons X de la phase solide contenant 10 % de $SrCO_3$ après différentes durées de co-broyage ; B : brushite ; V : vatérite ; S : $SrCO_3$.

Les observations sont les mêmes que lors du co-broyage de la phase solide sans $SrCO_3$ (chapitre II) : on retrouve après co-broyage les trois phases initialement introduites dans la chambre de broyage (DCPD, vatérite et carbonate de strontium) et on ne détecte aucune autre phase. Par ailleurs, ici aussi on observe la diminution de l'orientation préférentielle de la brushite selon le plan (020). On peut donc en déduire que les plaquettes de brushite sont fragmentées lors du co-broyage, ce qui est d'ailleurs confirmé par la figure IV-12, qui présente l'évolution morphologique des particules de la phase solide contenant 10 % de $SrCO_3$ lors du procédé de co-broyage.

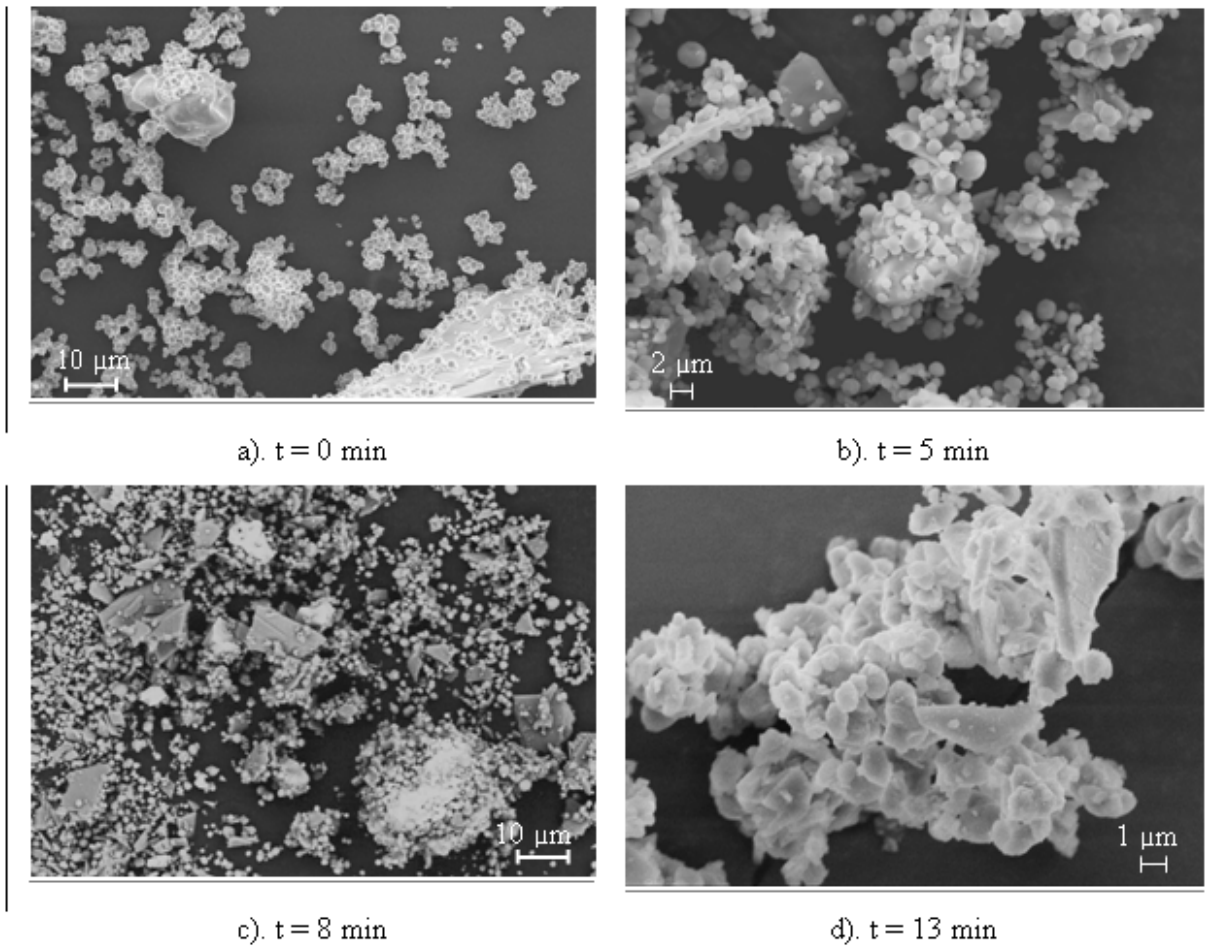


Figure IV-12 : Clichés MEB présentant l'évolution morphologique des particules de la phase solide contenant 10 % de $SrCO_3$ après différents temps de co-broyage.

Au temps initial (figure IV-12-a), on observe les trois morphologies de particules caractéristiques des trois phases en présence : des plaquettes de DCPD, des lentilles de vatérite et des particules granulaires de carbonate de strontium. Les trois composants de la phase solide n'ont que peu d'interaction les uns avec les autres. Dès 5 minutes de co-broyage, les lentilles de vatérite se collent à la fois sur les plaquettes de brushite et sur les particules de $SrCO_3$. A 8 minutes, on voit que les plaquettes se sont fragmentées, ainsi que les particules de $SrCO_3$ (qui apparaissent en blanc sur le cliché). Les lentilles de vatérite quant à elle ne sont pas fragmentées, mais se collent sur les autres particules. Au temps final, on obtient des agglomérats constitués de lentilles de vatérite, de fragments de plaquettes de brushite et de fragments de particules de $SrCO_3$. Les trois constituants forment un mélange intime et le carbonate de strontium est réparti de manière homogène dans la phase solide, d'autant plus qu'il a été fragmenté en éléments plus petits et que par conséquent, le nombre de particules de $SrCO_3$ a augmenté.

La figure IV-13 présente les diagrammes de diffraction de rayons X des phases solides co-broyées contenant différentes proportions de carbonate de strontium ; elle confirme que le co-broyage ne modifie pas la composition chimique de la phase solide, quelle que soit la proportion de $SrCO_3$.

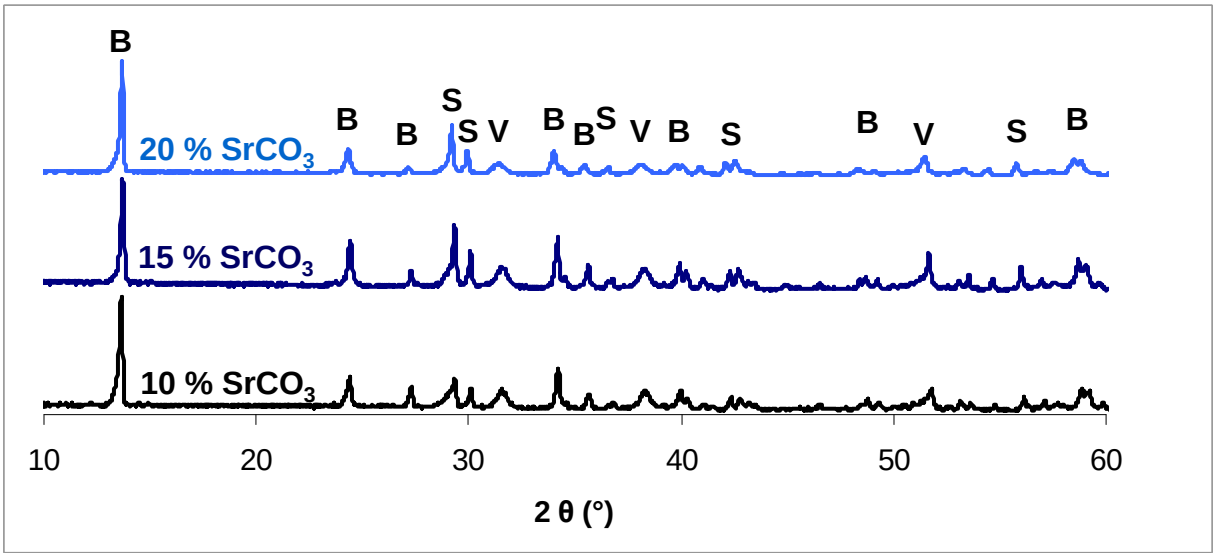


Figure IV-13 : Diffractogrammes de rayons X des phases solides contenant 10, 15 et 20 % de $SrCO_3$ après respectivement 13, 15 et 17 minutes de co-broyage ; ; B : brushite ; V : vatérite ; S : $SrCO_3$.

2.1.2.3. Caractérisations des ciments élaborés à partir de la phase solide co-broyée contenant du $SrCO_3$

Étant donné le mélange intime des constituants et la fragmentation du $SrCO_3$ lors du co-broyage, il est possible que la réactivité du carbonate de strontium soit accrue et qu'il prenne désormais part à la réaction de prise. Il est donc nécessaire de vérifier la composition des ciments après prise.

La figure IV-14 présente les diffractogrammes de rayons X des ciments durs qui ont été préparés à partir de phases solides co-broyées contenant différentes proportions de $SrCO_3$. Comme pour les ciments élaborés à partir de la phase solide non broyée contenant du $SrCO_3$, on retrouve de l'apatite mal cristallisée en phase majoritaire, de la vatérite ainsi que du carbonate de strontium qui ne participe pas ou peu à la réaction de prise. Des précisions seront

apportées à ce sujet dans le paragraphe suivant grâce à la mise en œuvre d'une technique d'analyse complémentaire : l'analyse thermogravimétrique.

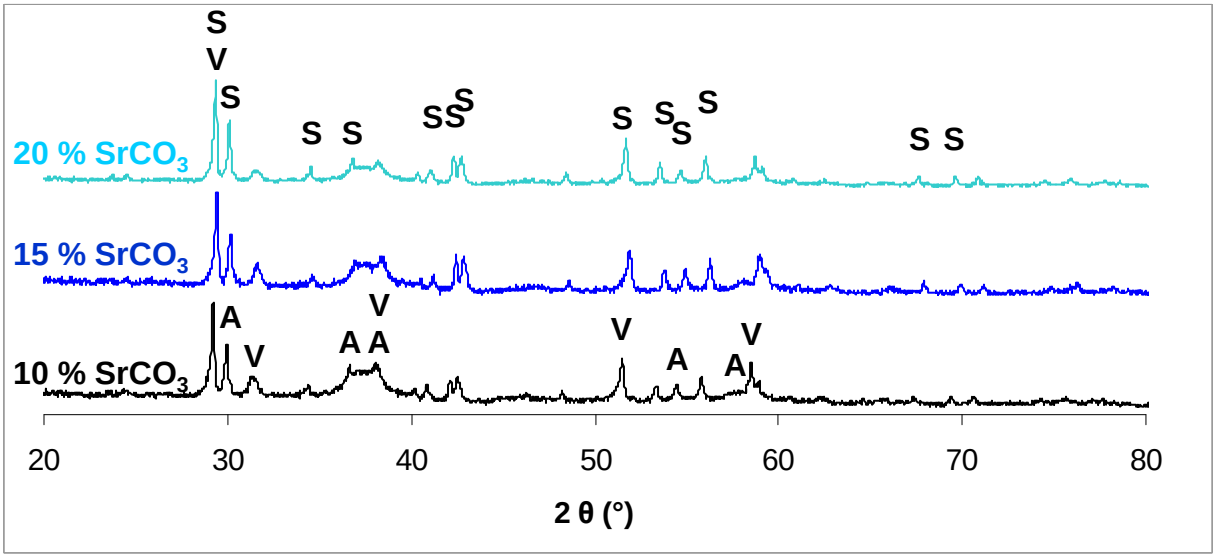


Figure IV-14 : Diffractogrammes de rayons X des ciments préparés à partir des phases solides contenant 10, 15 et 20 % de $SrCO_3$ et co-broyées pendant respectivement 13, 15 et 17 minutes ; A : Apatite mal cristallisée ; V : Vatérite ; S : $SrCO_3$.

La figure IV-15 présente la microstructure des ciments préparés à partir des phases solides co-broyées contenant du carbonate de strontium. On n'observe pas, là non plus, de différence majeure quelle que soit la proportion de $SrCO_3$ introduite.

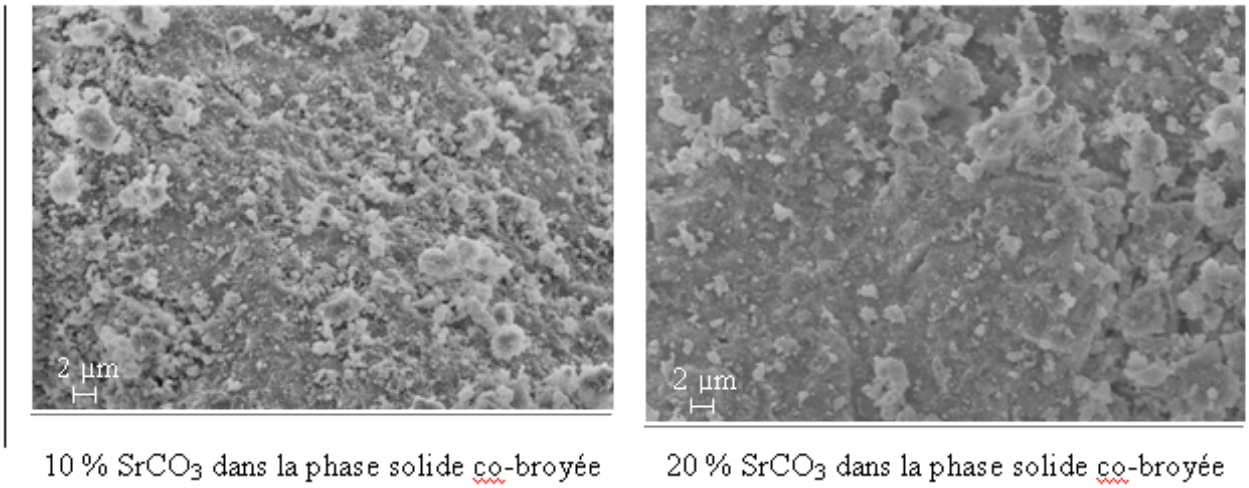


Figure IV-15 : Micrographies MEB des ciments préparés à partir des phases solides contenant 10 et 20 % de $SrCO_3$ et co-broyées respectivement pendant 13 et 17 minutes.

2.1.2.4. Devenir du $SrCO_3$ lors de la réaction de prise

Que les ciments soient préparés à partir d'une phase solide co-broyée ou non, les résultats obtenus montrent que le carbonate de strontium ne participe pas ou peu à la réaction de prise. Étant donné que la plupart des raies de diffraction du $SrCO_3$ sont proches voire confondues avec les raies soit de la vatérite soit de l'apatite, et que le ciment de référence est mal cristallisé, il s'avère difficile de calculer la quantité exacte de $SrCO_3$ que l'on retrouve dans le ciment afin de vérifier qu'il n'a pas du tout réagi.

C'est pourquoi, en utilisant la décomposition du ciment à haute température, et en adaptant le protocole proposé par Mendham et coll. [2006] pour doser les proportions de $CaCO_3$ et de $MgCO_3$ contenus dans un échantillon de dolomite, nous avons réalisé des analyses thermogravimétriques (ATG). Les essais d'ATG ont permis de tracer les thermogrammes présentés sur la figure IV-16.

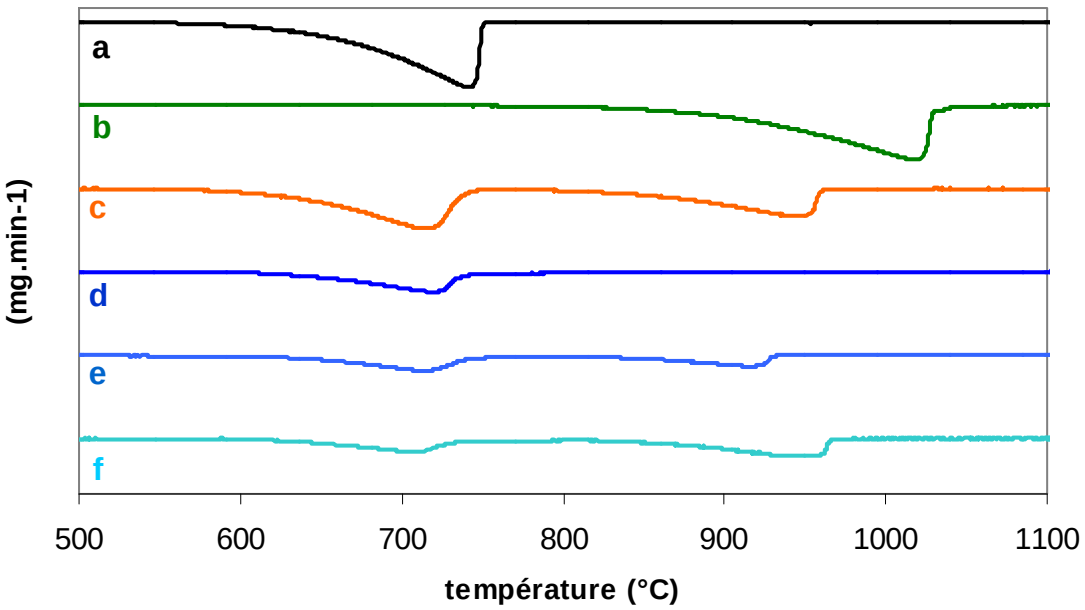


Figure IV-16 : Pertes de masse en fonction de la température de a). vatérite ; b). $SrCO_3$; c). mélange (50 % vatérite + 50 % $SrCO_3$) ; d). ciment de référence ; e). ciment préparé à partir d'une phase solide co-broyée contenant 20 % de $SrCO_3$; f). ciment élaboré à partir d'une phase solide non broyée contenant 40 % de $SrCO_3$.

Lorsque l'on chauffe la vatérite seule, le carbonate se décompose vers 750°C en libérant du CO_2 (figure IV-16-a). La décomposition du carbonate de strontium s'effectue quant à elle vers 1020°C (figure IV-16-b). Il paraît donc possible de différencier de cette manière le carbonate du ciment provenant de la vatérite de celui provenant du $SrCO_3$.

Afin de le vérifier, un mélange équimassique de vatérite et de $SrCO_3$ a été analysé par ATG (figure IV-16-c). Les interactions entre les deux composés conduisent à une diminution de la température de décomposition : la vatérite se décompose alors autour de 720°C et le $SrCO_3$ autour de 950°C, mais on observe toujours deux pics séparés.

La courbe IV-16-d présente la perte de masse enregistrée pour un ciment dur de référence (sans strontium) : on observe effectivement une perte de masse due à la vatérite alors que la perte massique dans la région du $SrCO_3$ est minime (0,4%). Les courbes IV-16-e et IV-16-f présentent les résultats pour des ciments dur préparés respectivement à partir de phases solides contenant 20 et 40 % de $SrCO_3$: la perte de masse augmente avec la quantité de $SrCO_3$ introduite (cf. tableau IV-5).

Par ailleurs, le thermogramme IV-16-e a été enregistré pour un ciment dur préparé à partir d'une phase solide co-broyée. Or, le co-broyage de la phase solide augmente les interactions entre composants (vatérite et $SrCO_3$) et diminue la taille des particules. Ceci pourrait expliquer pourquoi la température de décomposition du carbonate de strontium est encore abaissée (de 950 à 915°C environ), comparé à un mélange de poudres initiales ou à un ciment préparé à partir de la phase solide non broyée (courbes IV-16-c et IV-16-f).

Afin de comparer les résultats d'une expérience à une autre, la perte massique des ciments durs est exprimée en pourcentage de la masse totale introduite dans la nacelle de l'ATG dans le tableau IV-5. Les deux pertes massiques données ici sont dues à la décomposition de carbonates qui libère du CO_2. On peut donc remonter aux quantités de vatérite et de $SrCO_3$ qui étaient présentes dans les différents ciments.

Tableau IV-5 : Pertes massiques enregistrées par ATG pour les différents types de ciments durs

composition de la phase solide	**perte massique 1 entre 600-800°C (imputée à la vatérite)**	**perte massique 2 entre 800-1000°C (imputée au $SrCO_3$)**	**rapport** $\frac{\textit{perte de masse}\ 2}{\textit{perte de masse}\ 1}$
0 % $SrCO_3$	14,1 %	0,4 %	0,03
20 % $SrCO_3$ phase solide co-broyée	11 %	6,8 %	0,62
40 % $SrCO_3$ phase solide non co-broyée	9,1 %	11,9 %	1,31

La première remarque que nous pouvons faire est la suivante : la quantité de vatérite présente dans le ciment après prise diminue lorsque la proportion de $SrCO_3$ augmente, ce qui est tout à fait cohérent avec la préparation du ciment (cf. tableau IV-6). Deuxièmement, la perte massique liée au $SrCO_3$ est quasiment doublée lorsque l'on double la quantité de carbonate de strontium introduit dans le ciment. Et enfin, les rapports des pertes de masse sont très proches des rapports de masses introduites, ce qui permet de valider le protocole opératoire suivi.

Tableau IV-6 : Composition des ciments testés

PHASE SOLIDE				
% massique de $SrCO_3$	masse brushite (g)	masse vatérite (g)	masse $SrCO_3$ (g)	rapport massique $SrCO_3$/vatérite
0 % $SrCO_3$	1	1	0	0
20 % $SrCO_3$ phase solide co-broyée	0,80	0,80	0,4	0,5
40 % $SrCO_3$ phase solide non broyée	0,60	0,60	0,8	1,33

Ces résultats nous permettent de conclure que le $SrCO_3$ ajouté à la phase solide du ciment ne réagit pas du tout avec les autres composants (brushite et vatérite) : la totalité du sel de strontium introduit se retrouve dans le ciment final. Notons qu'il serait intéressant de compléter ces résultats en multipliant les expériences, ainsi qu'en étudiant de manière plus détaillée les diagrammes de diffraction de rayons X, par exemple à l'aide d'un affinement Rietveld. En effet, si le $SrCO_3$ réagit lors de la réaction de prise du ciment, il est vraisemblable que les ions carbonate réagissent avec les ions hydrogénophosphate du DCPD (cf. équation III-2) et que le strontium présent dans le milieu rentre alors dans la maille apatitique, en substitution de l'ion calcium. Lorsqu'une telle substitution se produit, on observe un décalage des raies de diffraction de l'apatite car l'ion strontium est plus gros que l'ion calcium : ceci induit donc des variations sensibles des paramètres de maille de l'apatite [Leroux, 2000].

2.1.3. Ajout dans la phase liquide : $SrCl_2, 6H_2O$

Le strontium peut également être introduit dans le ciment via sa phase liquide. Dans ce cas, la phase solide est préparée comme pour un ciment de référence (DCPD + vatérite) et du chlorure de strontium est dissout dans de l'eau désionisée pour préparer la phase liquide. Les masses de produits à peser pour préparer une pâte de ciment de masse totale 3 grammes sont données dans le tableau IV-7.

Tableau IV-7 : Composition de la pâte des différents ciments contenants du Sr introduit par voie liquide

PHASE SOLIDE		**PHASE LIQUIDE**		**PÂTE**	
masse brushite (g)	masse vatérite (g)	masse eau désionisée (g)	masse $SrCl_2, 6H_2O$ (g)	% massique de Sr dans la pâte	rapport molaire (Ca+Sr)/P
1	1	1	0	0 %	1,72
1	1	0,82	0,18	2 %	1,84
1	1	0,711	0,289	3 %	1,91
1	1	0,638	0,362	4 %	1,95
1	1	0,566	0,434	5 %	2,00
1	1	0,458	0,542	6 %	2,07

Lorsque le sel de strontium est totalement dissout, 1 gramme de phase liquide est pipetée et gâchée avec deux grammes de phase solide. Ensuite le ciment est placé à l'étuve à 37°C selon le protocole habituel.

La limite de solubilité du chlorure de strontium est atteinte au-delà de 55 % massique de $SrCl_2$, $6H_2O$ dans l'eau désionisée (6 % massique de Sr dans la pâte). La conséquence immédiate est qu'il est impossible d'introduire autant de strontium par cette voie que via la phase solide ; pour cette dernière, nous avions en effet pu tester une formulation de la pâte incluant jusqu'à 8% massique de Sr (cf. tableau IV-4). Cependant, comme l'on cherche à optimiser la quantité de strontium introduite, il est possible que cela permette d'obtenir un ciment suffisamment radio-opaque. Nous nous intéresserons donc à l'étude de la radio-opacité des ciments dans la suite du travail.

Auparavant, il est important de caractériser ces ciments contenant du strontium introduit par la phase liquide. La figure IV-17 présente les diffractogrammes de rayons X des ciments contenant diverses quantités de strontium. L'addition de strontium par la voie liquide ne fait pas apparaître de nouvelle phase dans la composition du ciment, ce qui tendrait à prouver que cette fois le strontium participe à la réaction de prise du ciment et rentre dans la structure apatitique.
Cependant, le rapport (Ca+Sr / P) de la pâte est supérieur à 1,67 quelle que soit la proportion de strontium introduite (cf. tableau IV-7). Il est donc impossible que tous les ions calcium et strontium présents dans la pâte du ciment ne participent à la formation du réseau apatitique. Par conséquent, soit la quantité de vatérite résiduelle augmente lorsque l'on ajoute du strontium, soit il se forme une phase mal cristallisée qui n'est pas détectable par diffraction des rayons X.

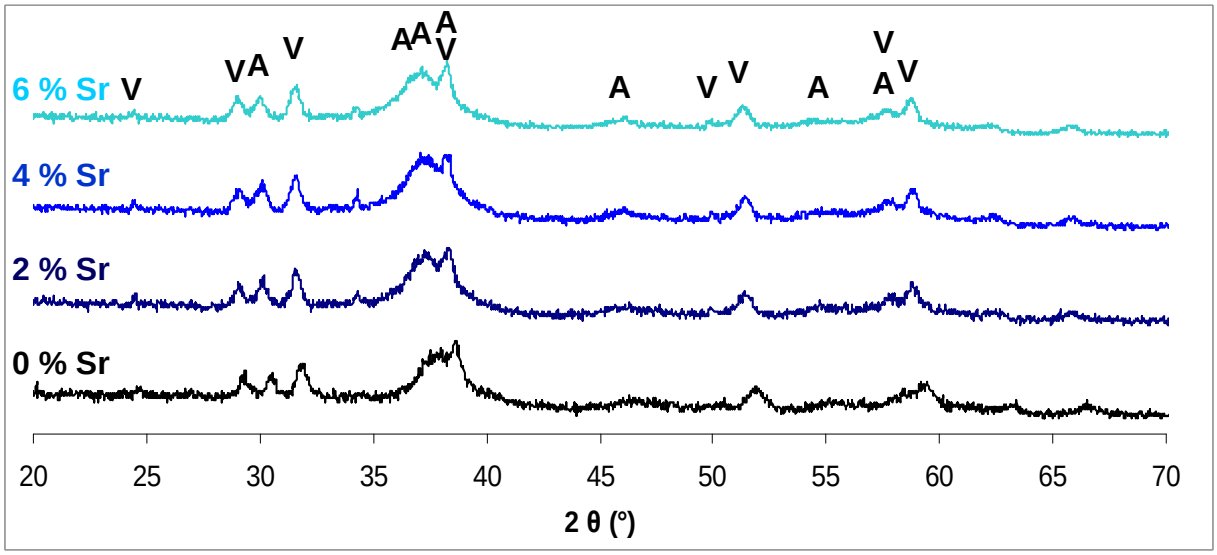


Figure IV-17 : Diagrammes de diffraction de rayons X des ciments contenant de 0 à 6 % de strontium introduit en phase liquide ; V : vatérite ; A : Apatite mal cristallisée.

Afin de vérifier si le strontium entre ou non dans le réseau apatitique en substitution des ions calcium, des affinements Rietveld des diagrammes de diffraction des ciments pris ont été réalisés. Ils ont permis de calculer les paramètres de maille de l'apatite formée lors de la réaction de prise. Le tableau IV-8 récapitule les résultats obtenus pour les quatre compositions de ciments testées.

Tableau IV-8 : Paramètres a et c de la maille de l'apatite calculés par affinements Rietveld en fonction de la quantité de strontium dans la pâte des ciments

Proportion massique de Sr dans la pâte	**0 %**	**2 %**	**4 %**	**6 %**
a (Å)	9,473(7) erreur : 0,003(4)	9,517(5) erreur : 0,005(5)	9,523(2) erreur : 0,004(2)	9,586(0) erreur : 0,004(2)
c (Å)	6,903(7) erreur : 0,001(7)	6,920(6) erreur : 0,002(9)	6,923(2) erreur : 0,002(3)	6,943(7) erreur : 0,002(2)

Les paramètres a et c de l'apatite augmentent avec la quantité de strontium ajoutée dans la phase liquide, ce qui confirme l'hypothèse de l'incorporation du strontium dans le réseau apatitique.

Leroux [2000] indique que les paramètres de maille des apatites partiellement substituées de formule $Ca_{10-x}Sr_x(PO_4)_6(OH)_2$ suivent la loi de Végard décrite, dans ce cas-ci, par les deux équations ci-dessous :

$$a(x) = 9{,}418 + 0{,}034\ x\ (Å) \qquad \text{(éq. IV-1)}$$

$$c(x) = 6{,}881 + 0{,}040\ x\ (Å) \qquad \text{(éq. IV-2)}$$

Si l'on trace l'évolution des paramètres a et c calculés par affinement Rietveld, on obtient respectivement les figures IV-18 et IV-19. Les droites en pointillés sont les représentations graphiques des équations (IV-1) et (IV-2) de la loi de Végard [Leroux, 2000].

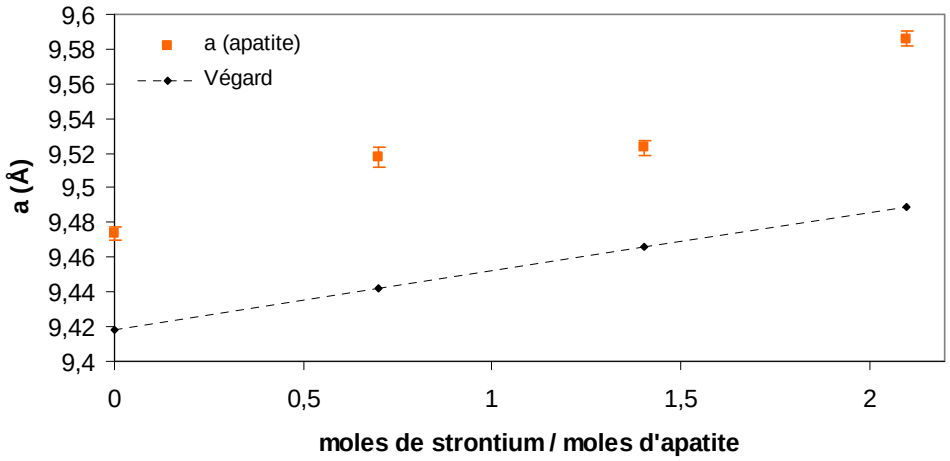


Figure IV-18 : Comparaison de l'évolution du paramètre a en fonction de la proportion de strontium ajoutée avec la loi de Végard (éq. IV-1).

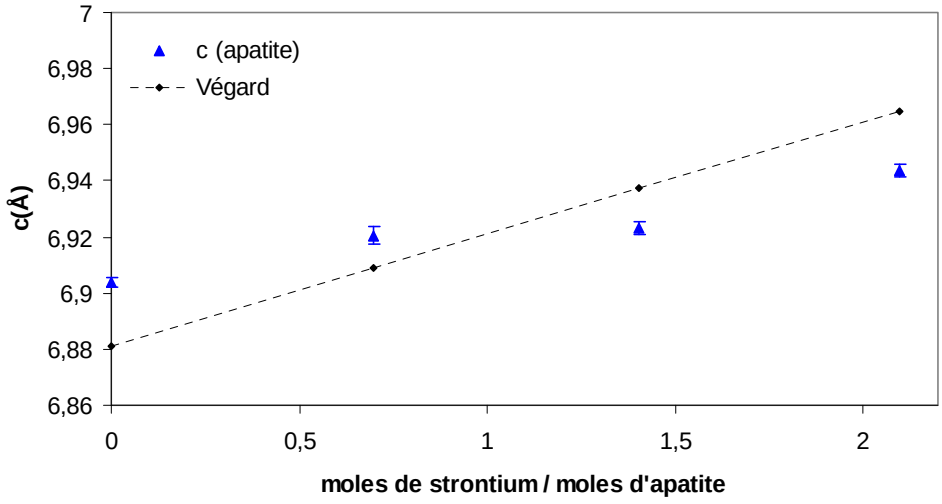


Figure IV-19 : Comparaison de l'évolution du paramètre c en fonction de la proportion de strontium ajoutée avec la loi de Végard (éq. IV-2).

Quelle que soit la quantité de strontium ajoutée dans le ciment, le paramètre a est plus grand que celui calculé par la loi de Végard mais il suit une évolution parallèle. Le paramètre c en revanche augmente moins rapidement que prévu. Cela pourrait être dû à l'insertion concomitante du chlore provenant du $SrCl_2$ dans la structure de l'apatite.

Alors que les ions strontium substituent généralement les ions calcium, le chlore entre dans la maille apatitique en substitution des ions hydroxyde. En effet, Elliott [1994] mentionne la synthèse d'apatites de formule $Ca_{10}(PO_4)_6(Cl)_{2-x}(OH)_x$; les cristaux sont hexagonaux à partir de $x \geq 0,74$; en-deçà, ils ont une structure monoclinique.
Toujours d'après Elliott, il existe, lors d'une synthèse en solution, une très forte discrimination en faveur des ions OH^- qui sont introduits dans le réseau apatitique préférentiellement aux ions Cl^-. On peut donc supposer que, dans notre cas, la substitution en chlorure est relativement faible et que le modèle hexagonal, utilisé pour le calcul des affinements Rietveld, est valide.
En revanche, étant donné la double substitution en strontium et en chlore, il est difficile d'établir le nombre d'atomes substitués, comme la loi de Végard permettrait de le faire dans des cas plus simples. Il est également probable que divers degrés de substitution coexistent dans le ciment et il semble impossible d'en déterminer précisément la composition chimique.

Si l'on s'intéresse maintenant à l'évolution de la microstructure des ciments avec la quantité de strontium introduite, les micrographies présentées sur la figure IV-20 montrent qu'à faible teneur en strontium (4 % m/m de la pâte), le ciment est apparemment semblable au ciment de référence (sans strontium). En revanche, lorsque la quantité de strontium augmente, la taille des pores semble plus importante. Ceci pourrait s'expliquer par l'acidité des solutions de chlorure de strontium : par exemple, le pH de la phase liquide permettant de préparer le ciment contenant 4 % massique de strontium est de 4,95 et le pH diminue encore avec l'addition supplémentaire de $SrCl_2$. Lors du gâchage de la pâte, les ions carbonate provenant de la phase solide réagissent avec les ions H_3O^+ selon l'équation (IV-3). Le dégagement de CO_2 qui se forme alors libère de l'espace et crée de la porosité, visible sur les clichés.

$$CO_3^{2-} + 2\ H_3O^+ \rightarrow CO_2 + 3\ H_2O \qquad \text{(éq. IV-3)}$$

La morphologie des ciments est également modifiée avec l'ajout de strontium : la micrographie IV-20-c, réalisée à plus fort grossissement, montre que l'on retrouve, dans les

ciments pris, des éléments de taille et de forme similaires aux particules de vatérite, comme si la cristallisation de l'apatite se faisait autour des lentilles de vatérite.

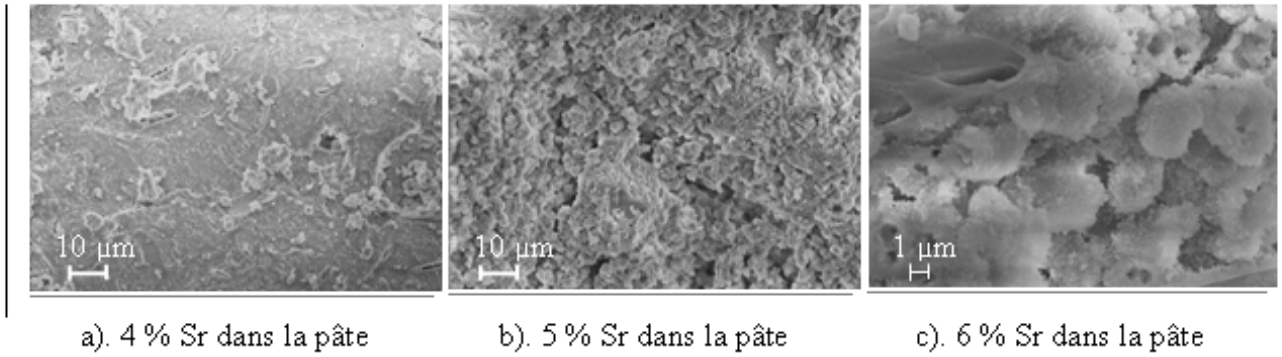


Figure IV-20 : Micrographies MEB des ciments contenants différentes proportions de strontium introduit via la phase liquide.

Par ailleurs, l'observation de ces ciments grâce au détecteur d'électrons rétrodiffusés ne fait apparaître aucun contraste chimique marqué, comme c'était le cas avec le $SrCO_3$. Ceci confirme la répartition homogène du strontium dans le ciment.

2.1.4. Conclusions et perspectives

Le strontium a été introduit dans le ciment $CaCO_3$-CaP selon deux voies : pour la première, via la phase solide, le sel de carbonate de strontium a été choisi. Dans ce cas, le strontium peut être introduit en proportions assez importantes dans le ciment (plus de 15 % de la masse de pâte) et peut également être co-broyé avec les deux autres constituants de la phase solide (DCPD et vatérite) ; ce traitement améliore l'homogénéité de sa répartition dans le ciment.
Que la phase solide soit co-broyée ou non, le $SrCO_3$ introduit ne prend pas part à la réaction de prise et se retrouve tel quel dans le ciment final, sous forme de particules granulaires englobées par la matrice apatitique.

La deuxième voie d'introduction du strontium est la phase liquide, qui est dans ce cas préparée par dissolution de chlorure de strontium dans de l'eau désionisée. À cause de la solubilité du $SrCl_2$ dans l'eau, le strontium ne peut alors être introduit qu'en quantité limitée dans le ciment (pas plus de 6 % de la masse de pâte). Par contre il prend part à la réaction de

prise du ciment et rentre vraisemblablement dans le réseau apatitique en substitution de l'ion calcium. C'est pourquoi il est réparti de manière homogène dans tout le volume du ciment.

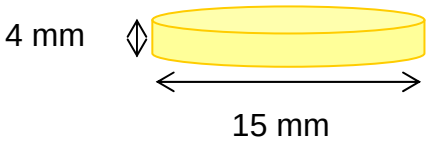
2.2. Étude de la radio-opacité du ciment : effet du pourcentage de strontium et de la voie d'ajout

Afin de mesurer l'effet de la voie d'addition du strontium sur la radio-opacité du ciment ainsi que de déterminer quelle quantité d'opacifiant introduire dans la formulation du ciment, des mesures de radio-opacité ont été réalisées. Cette partie du chapitre décrira le protocole utilisé, ainsi que les résultats obtenus.

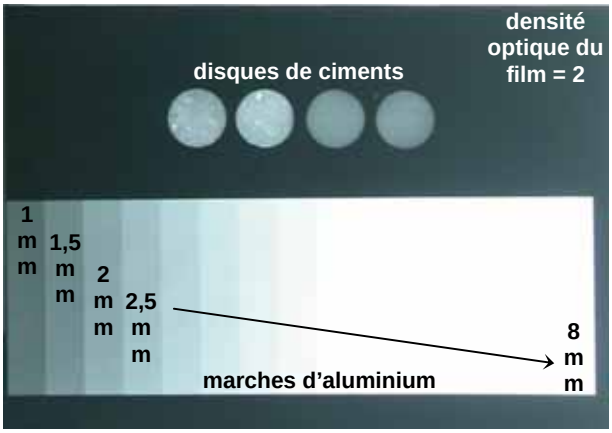
2.2.1. Méthodologie

Les mesures de radio-opacité des ciments ont été réalisées en collaboration avec M. Labarrère et D. Boitel du département de Mécanique, Structures et Matériaux de l'Institut Supérieur de l'Aéronautique et de l'Espace (ISAE) de Toulouse selon le protocole détaillé dans la norme [ISO-9917] relative aux ciments à base d'eau qui décrit l'appareillage et le protocole à suivre pour caractériser la radio-opacité d'un ciment.

Des moules ont été utilisés pour produire des disques de chaque type de ciments de 4 mm d'épaisseur et de 15 mm de diamètre (figure IV-21-a). Une plaque d'aluminium (en alliage 2017A) a été usinée en marches d'épaisseurs variant de 1 à 8 mm par pas de 0,5 mm. Les disques de ciments et la plaque d'aluminium, utilisée comme étalon, sont positionnés côte-à-côte sur le film radiographique (figure IV-21-b).
Un densitomètre permet de mesurer la densité optique de la radiographie obtenue après exposition du film, à raison d'un minimum de trois mesures par disque de ciment. Connaissant la densité moyenne de chaque échantillon de ciment, ainsi que celle des marches d'aluminium, il est possible de calculer l'épaisseur équivalente d'aluminium pour chaque ciment.



a). schéma d'un disque de ciment



b). radiographie X présentant les disques de ciments ainsi que la plaque d'aluminium étalon

Figure IV-21 : Schémas d'un disque de ciment et d'un cliché de radiographie X obtenu.

La norme stipule qu'un ciment est radio-opaque lorsque la densité optique de son image radiographique (notée DO_{ciment}) est égale à la densité optique de la marche d'aluminium de même épaisseur (DO_{Al}), c'est-à-dire 4 mm pour cette étude. En s'appuyant sur cette norme, Cruvinel et coll. [2007] proposent de définir la radio-opacité R d'un ciment selon l'équation :

$$R = \frac{DO_{ciment} \times 100}{DO_{Al}} \qquad \text{(éq. IV-4)}$$

Cependant, la densité optique d'une radiographie diminue lorsque l'opacité du matériau exposé augmente : l'image du matériau apparaît plus claire. Par conséquent, et pour éviter d'obtenir des radio-opacités supérieures à 100 %, nous avons opté pour l'équation :

$$R = \frac{DO_{Al} \times 100}{DO_{ciment}} \qquad \text{(éq. IV-5)}$$

2.2.2. Résultats

Les radiographies X obtenues lors de ces essais sont présentées sur les figures IV-22 et IV-23. Trois mesures de densité optique ont été réalisées par échantillon et chaque type de ciment a

été dupliqué. Par conséquent, les valeurs de radio-opacité présentées dans ce travail sont des valeurs moyennes.

Dans un premier temps, des mesures ont été réalisées uniquement sur les ciments contenant du strontium introduit dans la phase solide (figure IV-22), qu'ils soient préparés à partir d'une phase solide non broyée (à gauche) ou co-broyée (à droite). D'une part, comme on pouvait le prévoir, la radio-opacité des ciments augmente effectivement avec la teneur en strontium. D'autre part, il apparaît que le co-broyage de la phase solide est un moyen efficace pour obtenir des ciments homogènes (cf. disques de ciments entourés en violet) : en effet, si l'on s'attarde sur les ciments non broyés, on voit des taches claires et localisées correspondants à des particules et agglomérats de carbonate de strontium. Lorsque l'on augmente suffisamment la concentration en strontium (8 % de Sr dans la pâte), le nombre de particules de $SrCO_3$ est si important que le contraste, bien qu'encore inégal par endroits, semble plus homogène.
Les résultats indiquent également qu'une teneur massique de l'ordre de 8 % en strontium dans la pâte (i.e. 20 % de $SrCO_3$ dans la phase solide co-broyée, disque de ciment entouré en orange) est suffisante pour obtenir la même radio-opacité que la marche d'aluminium d'épaisseur 4 mm.

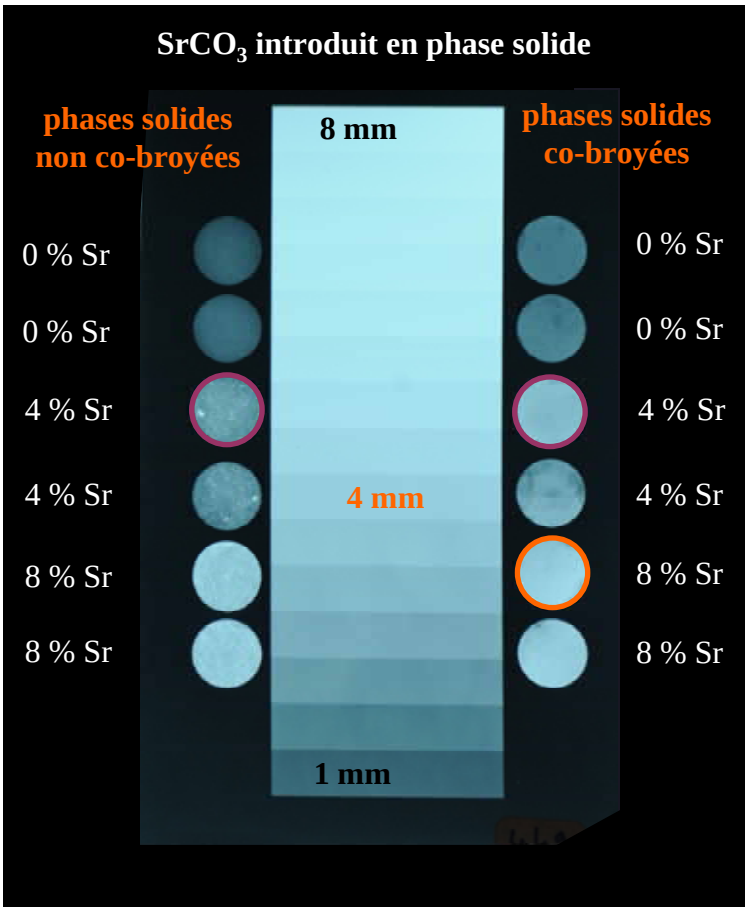


Figure IV-22 : Cliché radiographique réalisé lors des mesures de radio-opacité des ciments contenant diverses proportions de strontium dans la pâte (introduit via la phase solide).

De nouvelles mesures ont été réalisées avec des ciments pour lesquels le strontium a été ajouté soit dans la phase solide soit dans la phase liquide ; le cliché obtenu est présenté sur la figure IV-23. Le mode d'ajout du strontium varie de haut en bas (phase solide non broyée, co-broyée, phase liquide) et pour chaque voie d'ajout testée, la teneur en strontium augmente de gauche à droite. Comme nous l'avons expliqué dans le § IV.2.1.3, la teneur en strontium introduit en phase liquide est limitée par la solubilité du chlorure de strontium ; c'est pourquoi les pourcentages pondéraux de strontium sont plus faibles pour ces ciments que pour les autres.

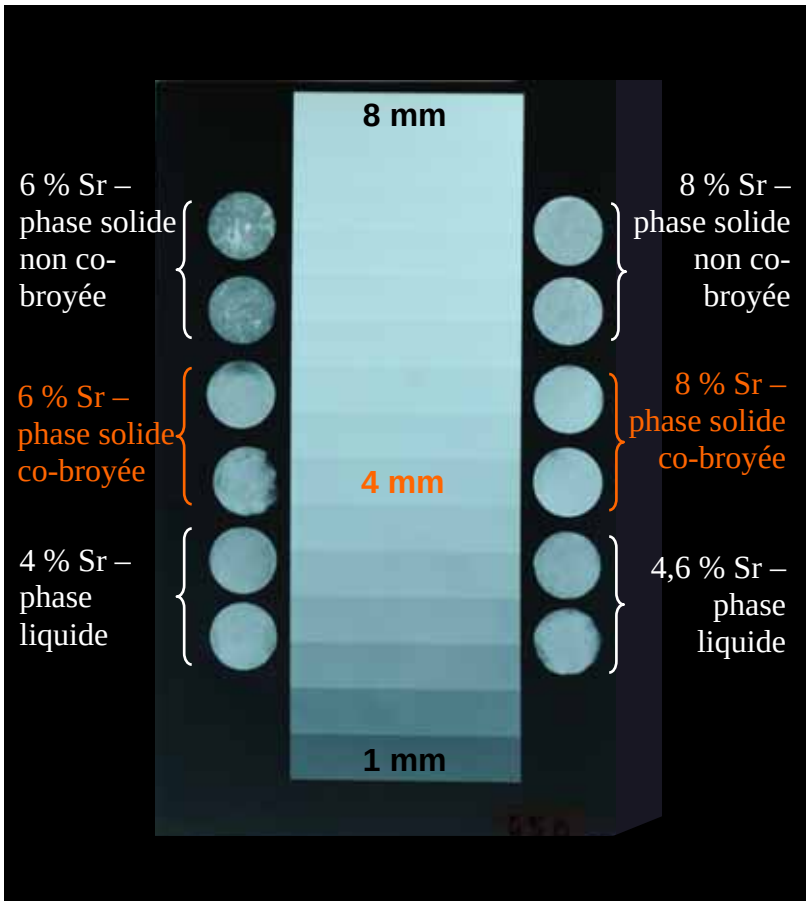


Figure IV-23 : Cliché radiographique réalisé lors des mesures de radio-opacité des ciments contenant diverses proportions de strontium dans la pâte, introduit selon les deux voies étudiées.

Pour tous ces clichés, les valeurs de radio-opacité ont été calculées selon l'équation (IV-5) et leur évolution est représentée sur la figure IV-24. Les points indiquent les valeurs de radio-opacité obtenues expérimentalement et les régressions linéaires sont représentées en pointillés.

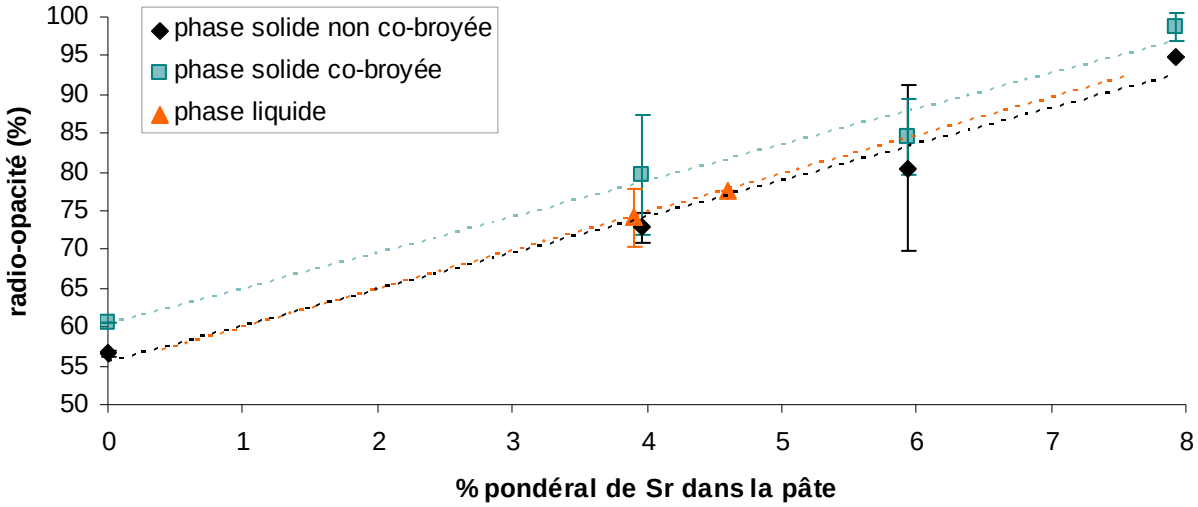


Figure IV-24 : Évolution de la radio-opacité des ciments avec la teneur et la voie d'ajout du strontium.

L'étude montre que les ciments sans strontium sont déjà radio-opaques (radio-opacité voisine de 60 %). Par ailleurs, leur radio-opacité augmente de manière linéaire avec la quantité de strontium introduite, ce qui confirme l'efficacité du strontium en tant qu'agent de contraste.

On constate aussi que, quelle que soit la quantité de strontium introduite dans la pâte, les ciments préparés à partir de la phase solide co-broyée sont plus opaques que ceux élaborés avec la phase solide non broyée. Par exemple, un ciment contenant 4 % massique de strontium introduit dans la phase solide co-broyée a une radio-opacité équivalente à celle d'un ciment préparé avec une phase solide non traitée contenant 6 % massique de strontium.
Ceci peut s'expliquer par la fragmentation des particules de $SrCO_3$ qui crée un nombre plus important de particules d'agent de contraste mais aussi par la dispersion homogène de l'agent de contraste dans le disque de ciment.
Pour 0 % de strontium, on observe également ce phénomène, qui pourrait provenir de la légère diminution de porosité du ciment due au co-broyage de la phase solide (cf. chapitre III) : un ciment plus dense est naturellement plus opaque.

Par ailleurs, les ciments dans lesquels le strontium a été introduit via la phase liquide présentent une radio-opacité sensiblement égale à celle des ciments non co-broyés.

En utilisant les équations des régressions linéaires représentées sur la figure IV-24, et en considérant qu'il s'agit d'un modèle valide (notamment pour les ciments préparés avec du strontium en phase liquide pour lesquels il n'y a que deux points), il est possible d'estimer la quantité théorique de strontium à introduire dans les différents types de ciments pour qu'ils atteignent une radio-opacité de 100 % (i.e. équivalente à celle de la marche d'aluminium de même épaisseur), en accord avec la norme [ISO-9917]. Ces valeurs sont reportées dans le tableau IV-9.

Tableau IV-9 : Quantités théoriques de strontium à introduire dans les différents types de ciments

	Sr introduit en phase solide non broyée	**Sr introduit en phase solide co-broyée**	**Sr introduit en phase liquide**
équation de la droite de régression linéaire	$y = 4,84\ x + 55,63$ ($R^2 = 0,98$)	$y = 4,83\ x + 60,53$ ($R^2 = 0,98$)	$y = 4,93\ x + 54,96$
teneur massique en strontium dans la pâte pour une radio-opacité de 100 %	9,2 %	8,2 %	9,1 %

Notons qu'une teneur de 9,1 % en strontium introduit par phase liquide n'est pas réalisable expérimentalement puisque cela se trouve bien au-delà de la limite de solubilité du chlorure de strontium. Autrement dit, dans les conditions de notre étude, il n'est pas possible de réaliser des ciments complètement radio-opaques par ajout de strontium en phase liquide.

Par ailleurs, les mesures réalisées montrent qu'une teneur en strontium de 8 % (contre 8,2 % théoriques) suffit pour que les ciments préparés à partir d'une phase solide co-broyée aient une radio-opacité de 100 %. Dans la suite de l'étude, nous nous baserons donc sur cette valeur de 8 % massique de strontium.

Réduire ainsi au maximum la quantité de strontium introduite et favoriser sa répartition dans le ciment devraient permettre de mieux contrôler son influence éventuelle sur les propriétés d'usage des ciments, que nous nous attacherons à caractériser dans la suite de ce travail.

2.3. Influence de l'introduction de strontium sur les propriétés d'usage du ciment $CaCO_3$-CaP

2.3.1. Influence de l'introduction du strontium sur l'injectabilité de la pâte des ciments

Nous avons déjà montré que le fait de co-broyer la phase solide permettait d'augmenter significativement l'injectabilité de la pâte (cf. chapitre III). Cette partie s'intéresse donc à l'influence de :

- la proportion de strontium introduite
- la voie d'ajout du strontium (phase solide ou phase liquide)

sur l'injectabilité de la pâte préparée avec une phase solide co-broyée.

La figure IV-25 présente les courbes d'évaluation de l'injectabilité pour des ciments préparés à partir de phases solides co-broyées contenant 0, 10, 15 et 20 % en masse de carbonate de strontium, ce qui correspond respectivement à 0, 4, 6 et 8 % de strontium dans la pâte.

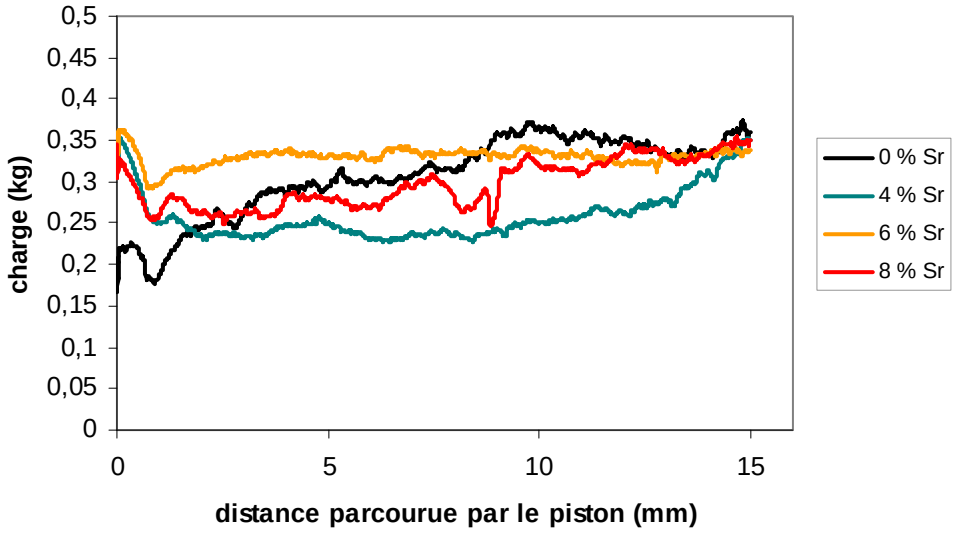


Figure IV-25 : Courbes d'évaluation de l'injectabilité de pâtes de ciments contenant diverses proportions de strontium introduit dans la phase solide co-broyée.

Il semble que la proportion de carbonate de strontium dans la phase solide co-broyée ne modifie pas significativement l'injectabilité de la pâte : la charge d'injection reste faible (aux environs de 350 g) et constante dans tous les cas. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la présence de carbonate de strontium modifie peu le comportement au co-broyage des phases solides (cf. paragraphe IV.2.1.2.1) et que le diamètre moyen des particules obtenu après traitement est dans tous les cas proche de 2,4 µm. Par ailleurs, la charge étant faible, l'influence du bruit de fond (bulles d'air…) est plus visible sur cette figure que sur les courbes présentées précédemment (cf. chapitre III).

La figure IV-26 présente les courbes obtenues pour une pâte préparée avec une phase solide co-broyée et gâchée avec une phase liquide dans laquelle du chlorure de strontium a été dissous afin de parvenir à une teneur de 3, 4,5 et 6 % en masse de strontium dans la pâte.

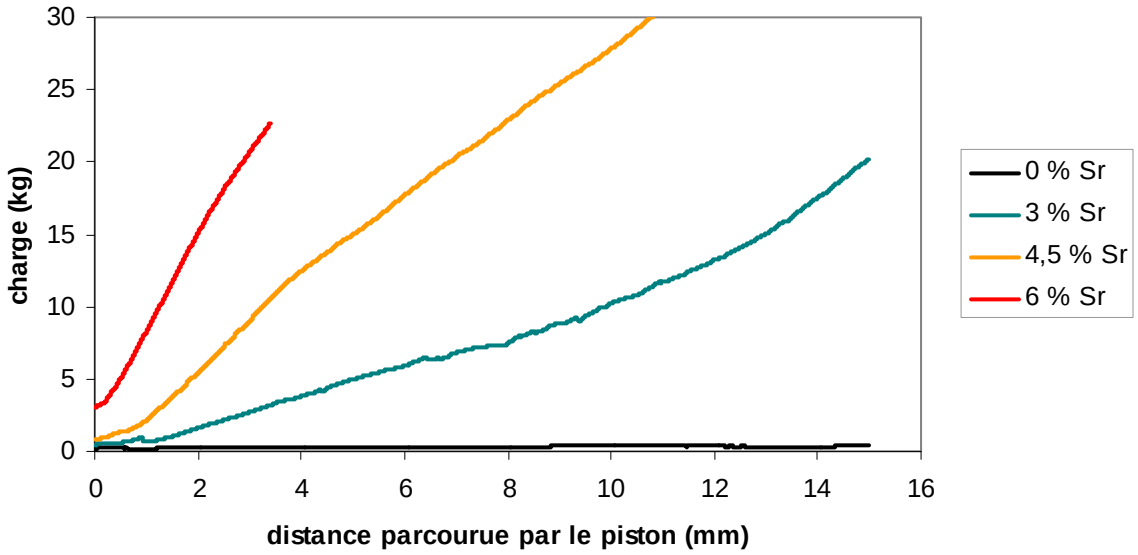


Figure IV-26 : Courbes d'évaluation de l'injectabilité de pâte de ciment contenant diverses proportions de strontium introduit dans la phase liquide et préparé à partir d'une phase solide co-broyée.

L'injectabilité diminue avec la proportion de strontium introduite dans la phase liquide : la charge d'injection augmente fortement, et les pâtes contenant 4,5 et 6 % de strontium nécessitent une charge telle que l'appareil bloque avant que le piston n'ait achevé sa course de 15 mm.

De plus, lorsque du strontium est ajouté via la phase liquide, la charge d'injection augmente avec le déplacement du piston, ce qui a pourrait être attribué à un phénomène de séparation de phases (cf. chapitre III).

Si l'on utilise les équations des régressions linéaires réalisées sur les courbes pour 4,5 et 6 % de strontium, on peut estimer par extrapolation la valeur de la charge d'injection à 15 mm de déplacement du piston. Ces résultats sont donnés à titre d'ordre de grandeur dans le tableau IV-10.

Tableau IV-10 : Charges d'injection nécessaires pour un déplacement de 15 mm du piston pour différentes teneurs en strontium

pourcentage de strontium introduit dans la pâte via la phase liquide	**0 %**	**3 %**	**4,5 %**	**6 %**
équation de la droite charge d'injection f(kg) = f(déplacement du piston (mm))	/	/	y = 2,76 x + 0,55 (R^2= 0,997)	y = 6,19 x + 2,27 (R^2= 0,997)
charge d'injection à 15 mm de déplacement du piston (kg)	0,4 (mesurée)	20,2 (mesurée)	42, 0 (extrapolée)	95, 0 (extrapolée)

Cette diminution d'injectabilité peut être attribuée à plusieurs facteurs : d'une part lorsque la proportion de strontium augmente, la quantité d'eau ainsi que le rapport volumique liquide/solide diminuent. En conséquence, la viscosité de la phase liquide et donc de la pâte augmentent.

Par ailleurs, la force ionique et le pH de la phase liquide varient selon la proportion de strontium ajoutée. Ces facteurs sont également reconnus pour influencer l'injectabilité d'une pâte [Gbureck et coll., 2004].

2.3.2. Influence de l'introduction du strontium sur la porosité des ciments

L'ajout de strontium peut également modifier la porosité du ciment final. Des mesures ont donc été réalisées sur les quatre types de ciments :

- le ciment de référence (non broyé, sans strontium),
- le ciment contenant 20 % de $SrCO_3$ dans la phase solide non broyée (i.e. 8 % de Sr dans la pâte),
- le ciment contenant 20 % de $SrCO_3$ dans la phase solide co-broyée (i.e. 8 % de Sr dans la pâte),
- le ciment contenant 4,7 % de strontium dans la pâte introduit via la phase liquide et préparé à partir d'une phase solide co-broyée.

Le tableau IV-11 donne les valeurs des porosités totales des ciments, mesurées par porosimètrie à mercure (protocole détaillé dans l'annexe A).

Tableau IV-11 : Porosité totale des ciments contenant du strontium

composition et préparation des ciments	**0% de Sr phase solide non broyée**	**0% de Sr phase solide co-broyée**	**8 % de Sr dans la pâte, introduit via phase solide non broyée**	**8 % de Sr dans la pâte, introduit via phase solide co-broyée**	**4,7 % de Sr dans la pâte, introduit via phase liquide, phase solide co-broyée**
porosité totale	61,1 %	59,2 %	49,1 %	62,1 %	52,1 %

Nous pouvons remarquer que l'ajout de strontium dans la pâte du ciment, que ce soit via la phase solide ou via la phase liquide, diminue la porosité de près de 10 %. On ne retrouve la porosité du ciment de référence que lorsque le $SrCO_3$ est introduit dans la phase solide co-broyée.

La figure IV-27 présente les courbes de distribution de tailles des pores obtenues pour les ciments testés.

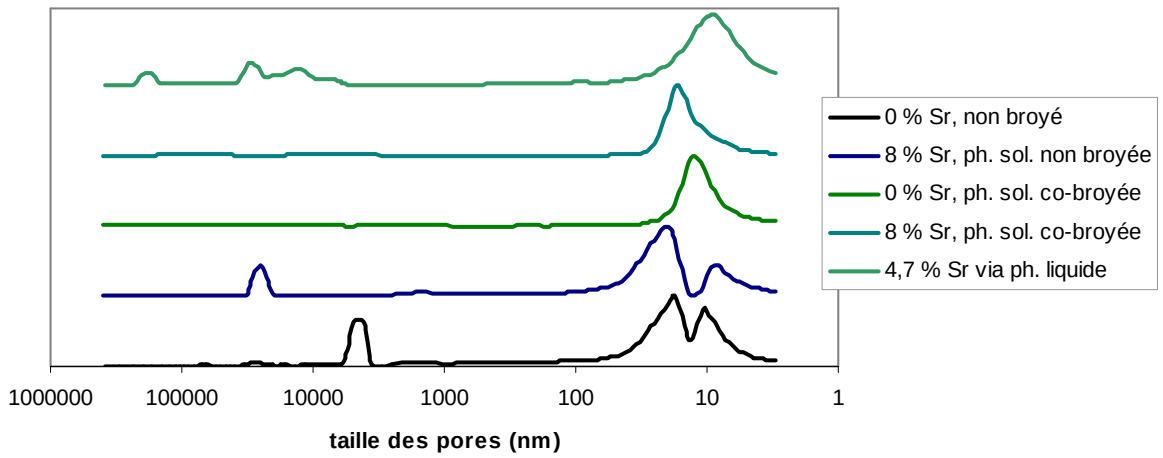


Figure IV-27 : Courbes de distribution des pores dans les ciments contenant différentes proportions de strontium dans la pâte, introduites via différentes voies.

Lorsque l'on ajoute du carbonate de strontium à la phase solide du ciment sans co-broyage, il semble que la taille des plus gros pores augmente (passant de environ 4 µm à 26 µm). On garde en outre le double pic autour de 10 nm.

L'accroissement de la taille des plus gros pores est également visible lorsque l'on compare les courbes des ciments préparés à partir de phases solides co-broyées : en présence de strontium, la porosité est décalée vers des tailles de pores un peu plus élevées (autour de 12 nm à environ 17 nm). Wang et coll. [2007] ont également observé l'augmentation du volume des pores dans des ciments phosphocalciques dans lesquels ils ont ajouté du $SrCO_3$ via la phase solide.

Cependant, la porosité liée aux pores de plus faible dimension (nanopores) reste prépondérante dans tous ces ciments : par exemple, pour le ciment contenant 8 % Sr co-broyé, la porosité due aux pores de 17 nm est de 56,2 % alors que celle due aux pores de 77 et 125 µm représente seulement 3,1 %.

L'ajout du strontium en phase liquide créé une porosité entre 5 et 200 µm, visible sur les clichés micrographiques présentés sur la figure IV-20. Cependant, la porosité totale est diminuée (cf. tableau IV-11). On peut donc supposer que les pores de plus petites tailles sont moins nombreux dans ce ciment que dans le ciment de référence.

Par ailleurs, la taille des pores et la porosité affectent la croissance de tissu néoformé et la dégradation du matériau implanté. Les pores créés, plus gros, devraient favoriser la résorption

du ciment et la diffusion des fluides biologiques à l'intérieur du ciment. Cependant, ils peuvent également affecter les propriétés mécaniques du ciment.

2.3.3. Influence de l'introduction du strontium sur les propriétés mécaniques des ciments

Le tableau IV-13 regroupe les mesures de résistance en compression des différents ciments dans lesquels le strontium a été introduit à différentes proportions. Notons que le rapport L/S est fixé dans tous les cas à 0,5 afin d'évaluer le seul effet de l'ajout de strontium.

Tableau IV-13 : Résistance en compression de ciments préparés à partir de pâtes contenant diverses proportions de strontium introduit sous forme de $SrCO_3$ dans la phase solide

	phase solide non broyée				**phase solide co-broyée**	
composition du ciment	**0 % Sr**	**4 % Sr**	**8 % Sr**	**12 % Sr**	**0 % Sr**	**4 % Sr**
résistance en compression (MPa)	12 ± 1	7 ± 1	11 ± 4	6 ± 1	15 ± 3	14 ± 5

D'une façon générale, l'ajout de $SrCO_3$ dans la phase solide non broyée semble affaiblir la résistance en compression du ciment. Nous avons montré au paragraphe IV.2.1 que les particules de carbonate de strontium ne participent pas ou peu à la réaction de prise et se retrouvent englobées par le ciment (figure IV-5). La diminution des propriétés mécaniques pourrait donc être attribuée aux interfaces entre ces deux composants qui créent des sites préférentiels d'initiation et de propagation de fissures.

Notons que pour 8 % de strontium dans la pâte, qui correspond à la proportion optimisée pour rendre le ciment suffisamment radio-opaque (cf. paragraphe IV.2.2), les propriétés mécaniques du ciment sont semblables à celles du ciment de référence.
Par ailleurs, à L/S constant, on peut voir que le co-broyage de la phase solide n'affecte pas significativement les propriétés mécaniques du ciment pris. L'optimisation du rapport L/S

(L/S < 0,5) pour les ciments élaborés à partir d'une phase solide co-broyée devrait permettre d'améliorer significativement leur résistance en compression.

Enfin, les propriétés mécaniques des ciments ne sont pas doses-dépendantes de la quantité de strontium introduite. Comme discuté dans le paragraphe IV.1.3, d'autres études ont abouti à un résultat similaire [Guo et coll. 2005 ; Wang et coll. 2007 ; Yu et coll., 2009]. Wang et coll. [2007] expliquent qu'une petite partie du strontium introduit pourrait substituer des ions calcium dans le réseau apatitique, conférant des propriétés mécaniques accrues au ciment. Le carbonate de strontium résiduel aurait un effet inverse en étant responsable de la diminution de la résistance en compression du ciment.

2.4. Étude de la dissolution des ciments et de la libération du strontium

L'étude de la dissolution des ciments $CaCO_3$-CaP a plusieurs objectifs. D'un point de vue fondamental, elle devrait permettre d'enrichir les connaissances sur ces ciments : composition et comportement en milieu aqueux à pH et température physiologiques (solubilité, évolution physico-chimique). Elle devrait également permettre d'étudier la libération du strontium et d'évaluer deux paramètres essentiels : la dose libérée et la durée de libération. De façon générale, l'étude *in-vitro* de ces matériaux, appelés à être implantés en site fortement irrigué, permettra de mieux appréhender leur comportement *in-vivo*.

2.4.1. Méthodologie

Des essais de dissolution des ciments ont été réalisés à l'aide d'un appareil Dissolutest (Pharmatest®) muni d'un système d'agitation à palettes tournantes adapté sur douze bols en parallèle (figure IV-27). Des cylindres de ciments (de diamètre 10,6 mm et de hauteur 20 mm) ont été immergés durant trois semaines dans 1 litre de solution à 0,1 M de tris(hydroxyméthyl)aminométhane $NH_2C(CH_2OH)_3$, tamponnée à pH physiologique (pH=7,4). Les récipients dans lesquels les ciments ont été immergés, sont fermés par un couvercle et maintenus à la température physiologique de 37°C. La solution est agitée à la vitesse de 100 $tr.min^{-1}$, ce qui permet d'homogénéiser sa composition dans tous les bols et tout au long de l'essai. Des prélèvements de 10 mL de solution ont été réalisés régulièrement,

et la quantité prélevée a été remplacée par la même quantité de solution tampon, afin de conserver le rapport quantité de solution / ciment tout au long de l'expérience. La modification de concentration qui en résulte a été prise en compte dans tous les calculs.

La solution prélevée a été filtrée sur des filtres millipores de 0,2 µm afin d'éviter la présence de très fines particules de ciments. Les prélèvements ont été stockés à + 4°C pour éviter toute évolution et surtout toute évaporation. Enfin, les quantités d'ions calcium et strontium présents en solution ont été dosées par spectrophotométrie d'absorption atomique (S.A.A., annexe A). La SAA ayant un domaine de linéarité de 0 à 5 ppm à la fois pour le calcium et pour le strontium, les prélèvements réalisés ont été dilués suffisamment pour se retrouver dans cette gamme de concentration. La solution de dilution utilisée pour cela est la solution tampon de l'expérience.

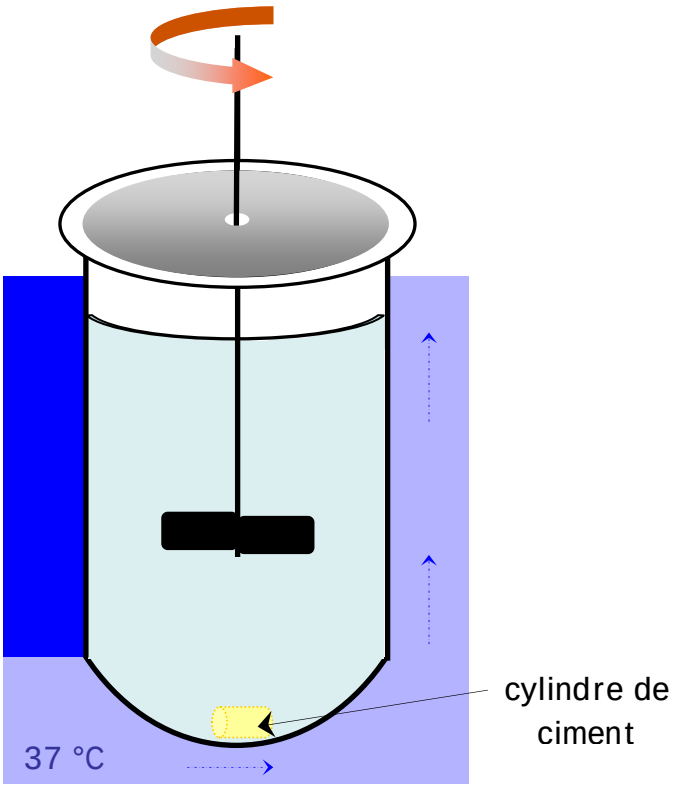


Figure IV-27 : Schéma du dispositif expérimental de l'essai de dissolution pour un échantillon de ciment.

Quatre types de ciments ont été testés :

- le ciment de référence (non broyé, sans strontium),

- le ciment contenant 8 % de strontium dans la pâte (i.e. 20 % de $SrCO_3$ dans la phase solide),
- le ciment contenant 8 % de strontium dans la pâte, introduit via la phase solide co-broyée,
- le ciment contenant 4,6 % de strontium introduit via la phase liquide.

Trois échantillons de chaque ciment ont été testés ; les résultats donnés ci-après sont donc des moyennes et les barres d'erreur représentent l'écart-type sur les trois ciments. Les écarts constatés sur les mesures réalisées avec deux ciments de même composition peuvent principalement provenir du fait que les ciments sont préparés manuellement (gâchage, pesée de l'eau, moulage et démoulage,…), ce qui peut conduire à des inhomogénéités et des petites différences d'un ciment à un autre. Ces écarts peuvent être également attribués à la précision de la méthode, et particulièrement aux dilutions précédant le dosage.

Après trois semaines d'immersion, les ciments sont récupérés et séchés à l'étuve à 37°C. Deux des trois échantillons de même composition sont broyés manuellement et remis dans la solution pendant 24 heures. À la fin de cette période, le solide restant est récupéré et un prélèvement de la solution est réalisé et filtré afin de déterminer les quantités de calcium et de strontium maximales qu'il est possible de dissoudre dans les conditions opératoires choisies. Le troisième ciment est réservé pour les analyses physico-chimiques (paragraphe IV.2.4.2.3).

2.4.2. Résultats

2.4.2.1. Détermination des quantités maximales de calcium et de strontium solubilisées

Les diagrammes de diffraction de rayons X des ciments récupérés après trois semaines d'immersion, broyés, puis laissés 24 heures de plus pour dissolution sont présentés sur la figure IV-28. Ils montrent qu'aucun des ciments testés ne peut se dissoudre complètement dans les conditions opératoires choisies : il reste systématiquement de l'apatite mal cristallisée, ainsi que du carbonate de strontium dans les ciments qui en contenaient. En revanche, la vatérite résiduelle a complètement disparu : quelle que soit la composition du

ciment, il s'agit de la phase la plus soluble. Cependant, il faut considérer qu'elle a pu réagir et se transformer en une phase plus stable.

En-dehors de la disparition des raies de diffraction de la vatérite, on retrouve, sur le diagramme, exactement les mêmes phases avant et après dissolution, ce qui signifie que le contrôle de la composition initiale du ciment lors de sa préparation permet de régir sa vitesse de résorption tout au long de l'essai.

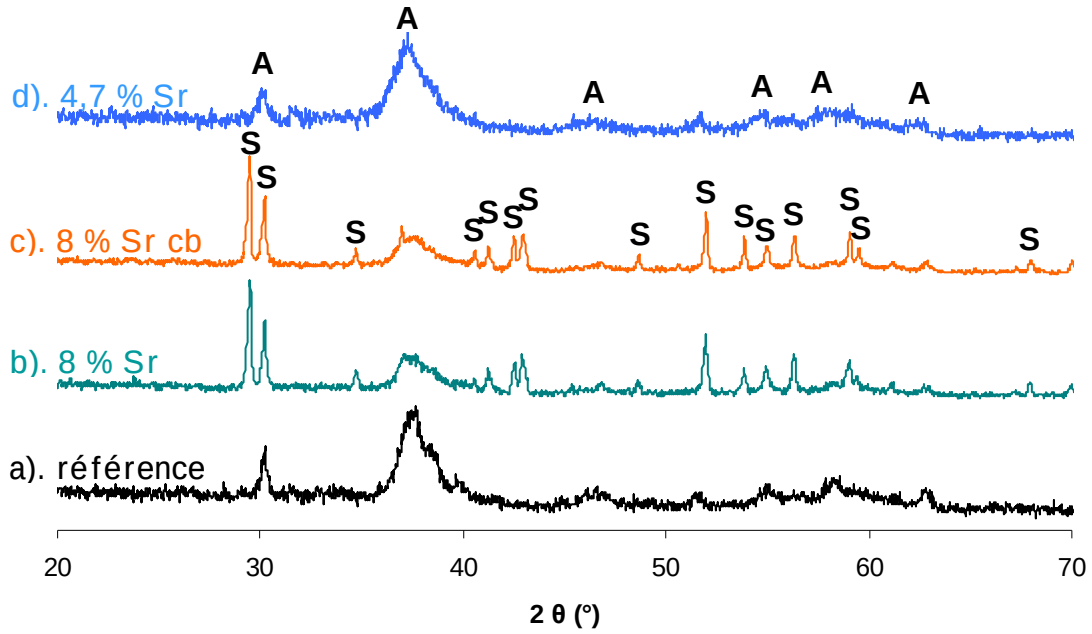


Figure IV-28 : Diffractogrammes de rayons X des poudres récupérées après dissolution des quatre types de ciments testés ; A : Apatite mal cristallisée ; S : $SrCO_3$.

La solution aqueuse que nous avons utilisée pour ces essais est un modèle qui nous permet de comparer le comportement des différents ciments. En milieu biologique, deux facteurs principaux seraient susceptibles d'influencer leur comportement : d'une part, la concentration des fluides corporels en ions calcium, strontium et phosphate sera supérieure et modifiera la solubilité des ciments ; d'autre part, la porosité secondaire créée par la dissolution de la vatérite (et dont nous discuterons plus en détail dans le paragraphe suivant) devrait permettre la colonisation des ciments par des cellules osseuses qui contribueront à la résorption des ciments.

Les prélèvements de solution réalisés après le traitement complet ont permis de quantifier les masses maximales de calcium et de strontium solubles dans les conditions opératoires choisies. Ces masses, reportées dans le tableau IV-14, seront considérées par la suite comme égales à 100 %, afin de calculer les pourcentages massiques de calcium et de strontium dissous libérés au cours des essais.

Tableau IV-14 : Masses de calcium et de strontium dissoutes pour les quatre types de ciments testés

masse maximale dissoute (100 %)	**référence**	**8 % Sr phase solide non broyée**	**8 % Sr phase solide co-broyée**	**4,7 % Sr phase liquide**
Ca (mg)	167	157	165	266
Sr (mg)	/	44	60	50

Notons que la masse maximale de calcium dissoute pour les trois premiers ciments ne diffère pas significativement. En revanche, une quantité plus importante de calcium peut être dissoute à partir du ciment dans lequel le strontium est introduit via la phase liquide.
Cela pourrait provenir de la dissolution d'une phase riche en calcium qui ne réagirait pas lors de la réaction de prise du ciment (à cause de l'introduction du strontium dans le réseau apatitique). Cela pourrait également être attribué à une augmentation de la solubilité de l'apatite avec l'introduction du strontium dans la structure apatitique [Guo et coll., 2005] ; en effet, l'ordre de stabilité en solution suivant a pu être établi : apatite carbonatée substituée en strontium > apatite substituée en strontium > HA [Landi et coll., 2008].

2.4.2.2. Dissolution des ciments et libération du strontium

La figure IV-29 présente l'évolution du pourcentage pondéral de calcium libéré durant les trois semaines de l'essai de dissolution.
De manière générale, les quatre ciments libèrent du calcium de manière continue, plus rapidement dans les 50 premières heures, puis de manière plus lente par la suite.
Les courbes des deux ciments préparés à partir de phases solides non broyées (c'est-à-dire le ciment de référence et celui qui contient 8 % de strontium dans la pâte) suivent exactement la même évolution : les deux courbes sont superposées. Après 21 jours d'immersion, ces deux ciments ont libéré un peu plus de 50 % du calcium soluble.

Les deux autres ciments, préparés à partir de phases solides co-broyées, libèrent plus de 65 % du calcium soluble qu'ils contiennent, et ce, que le strontium soit introduit via la phase solide ou via la phase liquide.

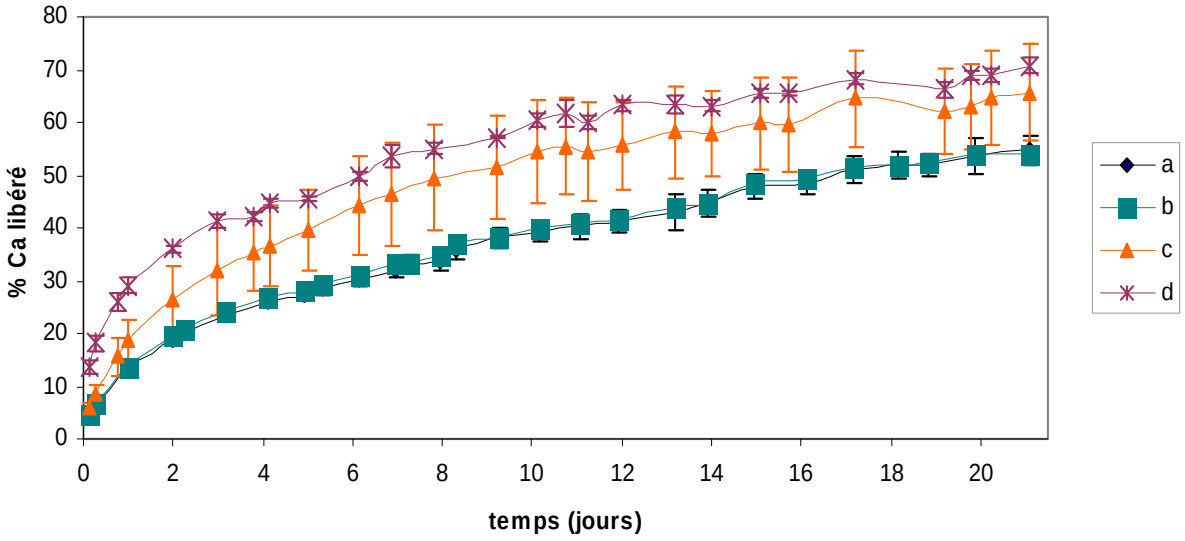


Figure IV-29 : Évolution au cours du temps du pourcentage massique de calcium libéré dans la solution tampon pour : a). le ciment de référence, b). le ciment contenant 8 % de strontium introduit sous forme de $SrCO_3$ non broyé, c). le ciment préparé avec la phase solide co-broyée incluant 8 % de strontium, d). le ciment préparé avec la phase solide co-broyée et contenant 4,7 % de strontium introduit en phase liquide.

La figure IV-30 présente l'évolution du pourcentage massique de strontium libéré par les trois types de ciments qui en contiennent. Les deux ciments contenant du strontium introduit dans la formulation via la phase solide ont un comportement similaire. En revanche, le ciment dans lequel le strontium a été introduit via la phase liquide se distingue : il libère beaucoup plus de strontium durant les deux premiers jours. Ensuite la libération est ralentie, si bien qu'après trois semaines, les trois courbes se rejoignent : les ciments ont alors libéré environ 80 % du strontium soluble.

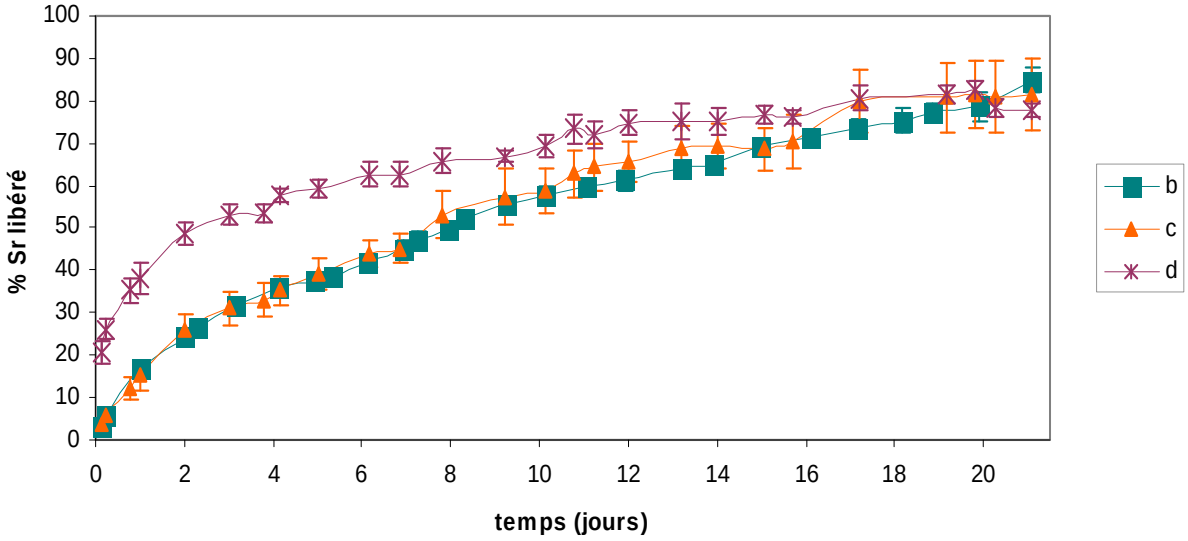


Figure IV-30 : Évolution au cours du temps du pourcentage massique de strontium libéré dans la solution tampon pour : b). le ciment contenant 8 % de strontium introduit en phase solide non broyée, c). le ciment préparé avec la phase solide co-broyée incluant 8 % de strontium, d). le ciment préparé avec la phase solide co-broyée et contenant 4,7 % de strontium introduit en phase liquide.

La figure IV-31 présente l'évolution du rapport massique Ca/Sr dans les solutions de travail.

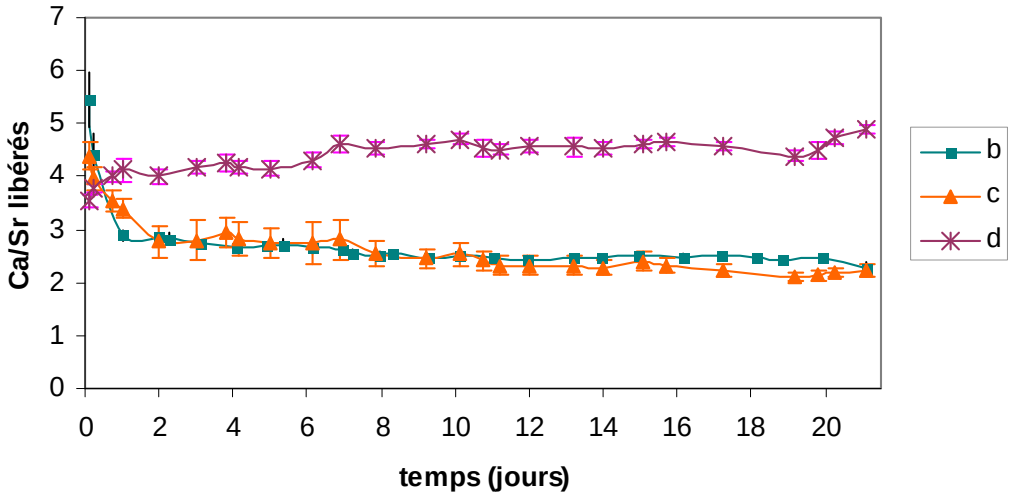


Figure IV-31 : Évolution du rapport massique Ca/Sr de la solution tampon contenant : b). le ciment contenant 8 % de strontium introduit en phase solide non broyée, c). le ciment préparé avec la phase solide co-broyée incluant 8 % de strontium, d). le ciment préparé avec la phase solide co-broyée et contenant 4,7 % de strontium introduit en phase liquide.

Cette figure met également en évidence deux comportements distincts des ciments en relation avec le mode d'ajout du strontium (en phase solide ou en phase liquide).

Dans le premier cas, après une période initiale de 24 heures pour le ciment non co-broyé et de 48 heures pour le ciment préparé à partir de la phase solide co-broyée, le rapport Ca/Sr diminue et se stabilise autour de 2,5. Il est vraisemblable que la vatérite résiduelle, la phase la plus soluble, se dissout en premier, entraînant un rapport Ca/Sr élevé durant les premiers jours. La dissolution préférentielle de la vatérite a d'ailleurs été confirmée par les diffractogrammes de rayons X présentés sur la figure IV-28. Ensuite, le $SrCO_3$ commence également à se dissoudre, ce qui a pour conséquence la baisse du rapport Ca/Sr de la solution jusqu'à la valeur de 2,5. Ce rapport pondéral est légèrement supérieur à la valeur théorique, calculée d'après les masses de calcium et de strontium introduites dans la formulation des ciments et repportée dans le tableau IV-15. Ainsi, la dissolution n'est pas congruente, ce qui peut être attribué, d'après Leroux [2000], à deux phénomènes : soit le ciment est multiphasé, soit il y a reprécipitation d'une phase différente de celle du ciment étudié. Dans notre cas, le ciment initial est triphasé (vatérite, strontianite et apatite) et il est vraisemblable que la dissolution préférentielle du carbonate de calcium soit responsable de cette non congruence.

En ce qui concerne le ciment dans lequel le strontium a été introduit via la phase liquide, le rapport Ca/Sr est plus élevé : il augmente très faiblement durant la première semaine puis se stabilise autour de 4,6 qui est le rapport massique Ca/Sr introduit (cf. tableau IV-15) : la dissolution est donc, dans ce cas congruente. Pourtant, ce ciment est également multiphasé (figure IV-17) et, d'après les caractérisations décrites dans le paragraphe IV.2.1, le calcium pourrait provenir de deux sources (de la vatérite résiduelle et de la matrice apatitique) alors que le strontium ne peut provenir que de la dissolution de l'apatite strontiée.

Tableau IV-15 : Rapport massique moyen Ca/Sr introduit dans les quatre types de ciments étudiés

composition du ciment	**ciment de référence**	**8 % de strontium introduit sous forme de $SrCO_3$**	**8 % de strontium introduit sous forme de $SrCO_3$ dans la phase solide co-broyée**	**4,7 % de strontium introduit dans la phase liquide et gâché avec une phase solide co-broyée**
rapport pondéral Ca/Sr*	/	2,13	2,13	4,60

L'ensemble des résultats présentés dans ce paragraphe prouve que les ciments testés sont solubles, et qu'ils libèrent du strontium de manière prolongée. Ils permettent également de calculer une donnée importante qui nous renseignera sur l'action bénéfique ou toxique du strontium : la dose journalière de strontium libéré, bien qu'il faille garder à l'esprit que ces données sont assez éloignées des phénomènes complexes existant *in-vivo*.

Les courbes présentées figures IV-29 IV-30 et IV-31 sont cumulatives. Lorsque l'on trace les courbes différentielles, il est possible de calculer les doses de calcium et de strontium journalières, qui correspondent à la masse libérée en vingt-quatre heures et par gramme de ciment initial. L'évolution de ces doses journalières de calcium et de strontium au cours des trois semaines d'immersion est présentée dans l'annexe E pour les quatre types de ciments testés et dans ces conditions opératoires. Le tableau IV-16 récapitule les valeurs moyennes.

Tableau IV-16 : Doses journalières de calcium et de strontium libérées en fonction de la composition des ciments et du temps d'immersion (/g de ciment)

composition du ciment	**ciment de référence**	**8 % Sr phase solide non broyée**	**8 % Sr phase solide co-broyée**	**4,7 % Sr phase liquide**
1er jour (mg/(jour x g de ciment)	Ca : 15,3 ± 0,6	Ca : 12,8 ± 0,6 Sr : 4,44 ± 0,05	Ca : 18 ± 3 Sr : 5,4 ± 0,9	Ca : 33 ± 2 Sr : 8,0 ± 0,9
2ème jour (mg/(jour x g de ciment)	Ca : 6,3 ± 0,2	Ca : 5,2 ± 0,1 Sr : 1,85 ± 0,06	Ca : 8 ± 2 Sr : 3,9 ± 0,4	Ca : 8 ± 1 Sr : 2,2 ± 0,3
3ème jour (mg/(jour x g de ciment)	Ca : 4,8 ± 0,4	Ca : 3,9 ± 0,3 Sr : 1,7 ± 0,1	Ca : 6 ± 2 Sr : 1,9 ± 0,1	Ca : 6 ± 2 Sr : 0,94 ± 0,08
moyenne J4 à J7 (mg/(jour x g de ciment)	Ca : 2,8 ± 0,4	Ca : 2,2 ± 0,3 Sr : 0,9 ± 0,3	Ca : 3,7 ± 0,5 Sr : 1,4 ± 0,3	Ca : 4 ± 1 Sr : 0,5 ± 0,2
moyenne 2ème semaine (mg/(jour x g de ciment)	Ca : 2 ± 1	Ca : 1,6 ± 0,6 Sr : 0,7 ± 0,3	Ca : 2 ± 1 Sr : 1,2 ± 0,8	Ca : 2 ± 1 Sr : 0,4 ± 0,3
moyenne 3ème semaine (mg/(jour x g de ciment)	Ca : 2 ± 1	Ca : 1,2 ± 0,9 Sr : 0,7 ± 0,3	Ca : 1 ± 1 Sr : 1,0 ± 0, 9	Ca : 1 ± 2 Sr : 0,5 ± 0,4

Quels que soient le type de ciment et l'élément (calcium ou strontium), la dose libérée le premier jour est très élevée, atteignant 33 mg de calcium libéré en 24 heures pour le ciment dans lequel le strontium a été introduit en phase liquide. Pendant les trois premiers jours, la dose journalière diminue rapidement : de plus de 66 % pour l'ensemble des ciments. Les doses journalières se stabilisent par la suite et n'évoluent pratiquement plus entre la deuxième et la troisième semaine d'immersion.

On peut donc considérer que la libération du strontium s'effectue en deux temps : les trois premiers jours, la dose libérée pourrait être assez importante pour stimuler le milieu biologique. La dose journalière libérée par la suite peut être assimilée à une dose « d'entretien », plus faible mais régulière. De plus, les doses de strontium libérées sont toutes inférieures aux doses thérapeutiques administrées par voie orale chez l'Homme (cf. tableau IV-2, [Marie et coll., 2001 ; Alkhraisat et coll., 2008]), et sont du même ordre de grandeur que les doses proposées par Alkhraisat et coll. [2008] comme étant acceptables pour une application locale (entre 12 et 30 mg $Sr.L^{-1}$). Par conséquent, le strontium libéré dans le milieu biologique lors de la résorption du ciment devrait avoir un effet bénéfique sur la réparation osseuse.

2.4.2.3. Caractérisation des ciments après dissolution

Nous avons récupéré un échantillon de chaque type de ciments après dissolution afin de les caractériser par porosimétrie à mercure. Les résultats obtenus, comparés aux valeurs de porosité avant dissolution, sont indiqués dans le tableau IV-16. Comme on pouvait le prévoir, ils montrent une augmentation de la porosité des ciments après l'essai de dissolution.

Tableau IV-17 : Porosité totale des 4 types de ciments testés, avant et après dissolution

ciments	**ciment de référence**	**8 % Sr phase solide non broyée**	**8 % Sr phase solide co-broyée**	**4,7 % Sr phase liquide**
porosité totale avant immersion	61,1 %	49,1 %	62,1 %	52,1 %
porosité totale après immersion	69,1 %	63,5 %	63 %	67,7 %

De manière générale, le séjour de trois semaines dans la solution tampon à 37°C a contribué à former une porosité secondaire au sein des ciments, moins marquée pour les ciments contenant du strontium introduit dans la phase solide co-broyée. La figure IV-32 présente les distributions de taille des pores dans les ciments après dissolution. Les courbes de porosimétrie confirment la formation d'une porosité secondaire.

Notamment pour les ciments préparés à partir de phases solides non broyées, le pic de porosité autour de 10 nm qui était bimodal avant dissolution (figure IV-27) est devenu un pic large et monomodal. De plus, une porosité d'environ 100 nm est créée.

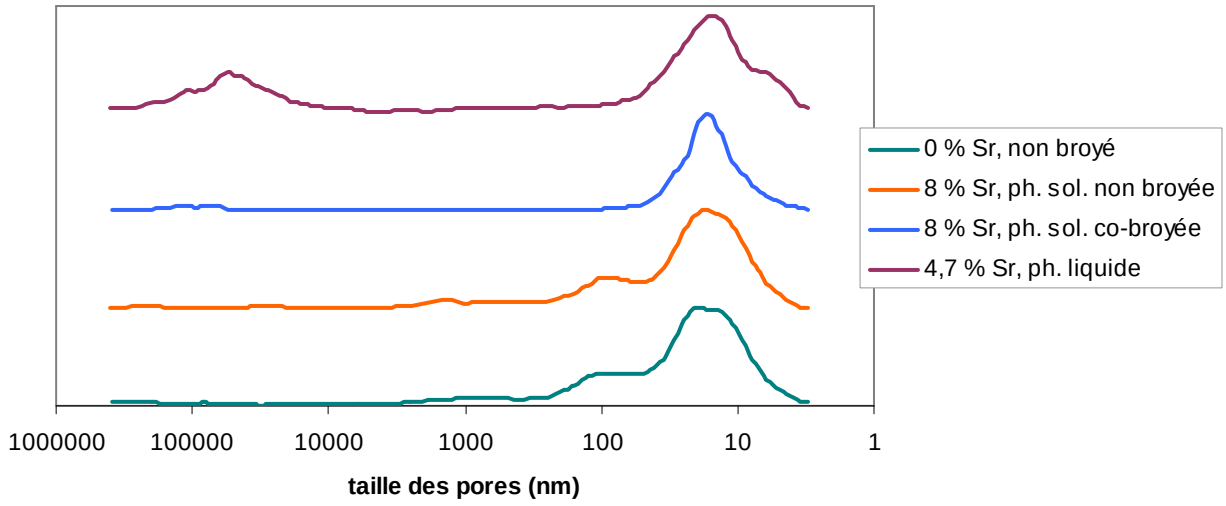


Figure IV-32 : Courbes de distribution des pores après l'essai de dissolution pour les quatre ciments testés.

Afin de détailler le mécanisme de dissolution des différents ciments, nous avons également observés les échantillons récupérés après dissolution par microscopie électronique à balayage couplée à une analyse élémentaire par EDX permettant de réaliser des cartographies élémentaires du calcium, du strontium et du phosphore. Pour cette dernière analyse, nous avons réalisé des coupes du bloc de ciment préalablement inclus dans une résine polymère afin de pouvoir observer plus finement la périphérie et le centre du ciment (figure IV-33).

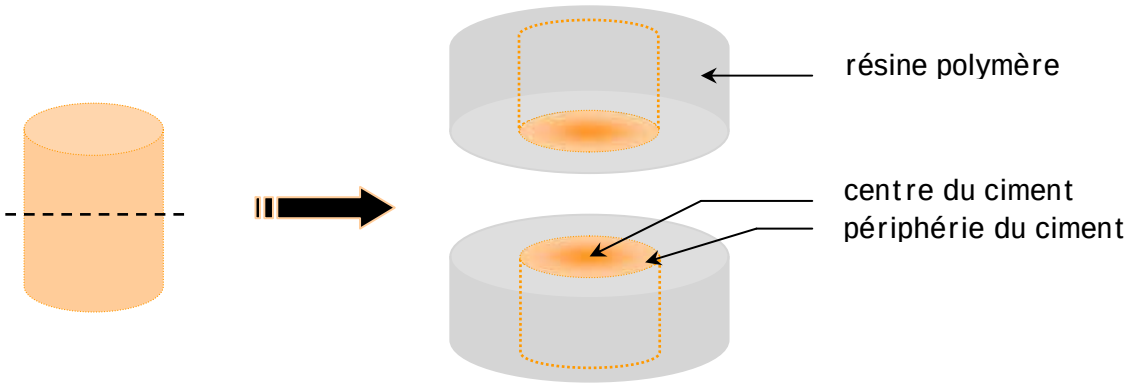


Figure IV-33 : Schéma de la coupe du ciment préalablement inclus dans une résine.

Les cartographies EDX ont été réalisées pour les éléments calcium, strontium et phosphore afin de visualiser les constituants élémentaires de toutes les phases présentes dans les ciments. Ces cartographies sont présentées sur la figure IV-34.

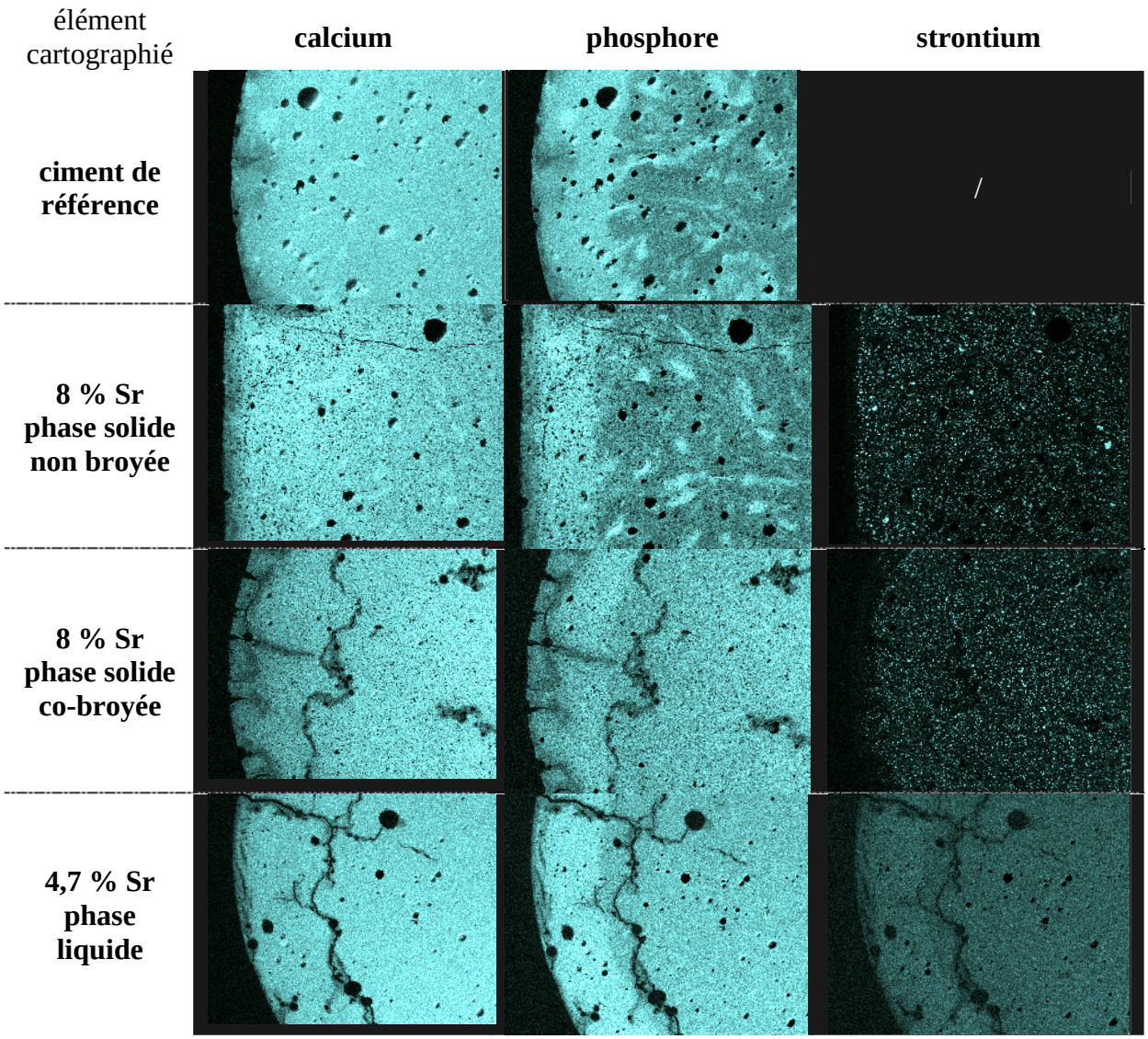


Figure IV-34 : Cartographies élémentaires (Ca, P, Sr) obtenues par analyse MEB-EDX des quatre types de ciments récupérés après 3 semaines d'immersion.

Ce sont les cartographies du phosphore qui apportent le plus d'informations. Tout d'abord, elles montrent que les ciments préparés à partir de phases solides non broyées présentent des inhomogénéités de composition. Pour ces mêmes échantillons, les inhomogénéités se voient également sur la cartographie du strontium, où l'on observe des agrégats mal répartis dans le ciment. Ces résultats appuient l'intérêt du co-broyage pour obtenir un ciment de composition homogène et donc connue.

Par ailleurs, on observe, pour tous les types de ciments, une couche périphérique plus concentrée en phosphore que le cœur du ciment. Nous avons vu que les phases solubles telles que la vatérite et le $SrCO_3$ sont dissoutes en premier. Au-fur-et-à mesure, la couche

périphérique du ciment en contact avec le milieu aqueux s'appauvrit ainsi en carbonate et se concentre donc en phosphates, moins solubles. La couche périphérique constitue ainsi une « barrière » protectrice qui peut ralentir la dissolution du cœur du ciment. Cet effet est néanmoins compensé par la création d'une porosité secondaire qui facilite la diffusion des fluides à l'intérieur du ciment.

Il est intéressant de remarquer que pour le ciment préparé à partir de la phase liquide contenant du strontium, on observe également cette couche concentrée en phosphore, qui s'accompagne d'une couche légèrement plus concentrée en strontium, ce qui confirme que le strontium s'est introduit dans la matrice apatitique : dans ce cas, après la dissolution de la vatérite, il ne reste plus qu'une couche apatitique strontiée.

Ces résultats semblent indiquer un mécanisme de dissolution des ciments par diffusion. Cependant, on devrait, dans ce cas, observer un dégradé de concentration du calcium : moins concentré en périphérie et plus concentré au centre du ciment. Or ce n'est pas visible sur les cartographies réalisées. Afin de vérifier nos hypothèses, nous avons fait une analyse par spectroscopie Raman en deux points distincts de la coupe du ciment : le premier en périphérie, le second au centre. Les spectres obtenus pour le ciment préparé à partir d'une pâte contenant 8 % de strontium introduit en phase solide non broyée sont présentés sur la figure IV-35.

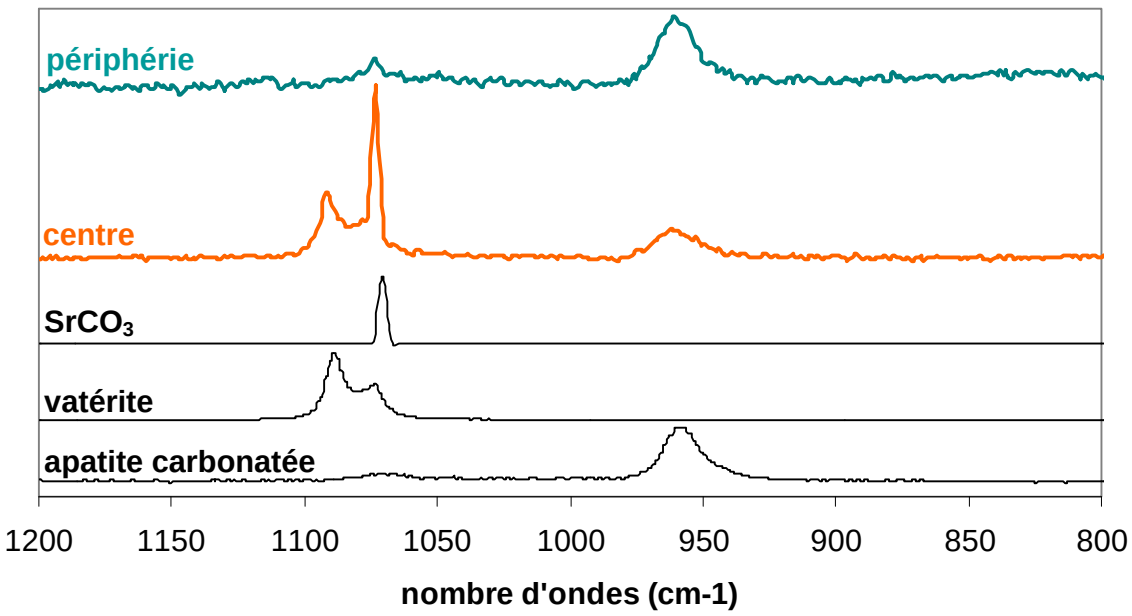


Figure IV-35 : Spectres Raman de la périphérie et du centre du ciment après dissolution comparés à ceux de composés de référence entrant dans la composition du ciment.

Sur le spectre Raman du centre du ciment, on observe les bandes d'absorption caractéristiques des phosphates dans l'apatite, ainsi que les bandes carbonate caractéristiques de la vatérite et du carbonate de strontium. En revanche, sur le spectre réalisé en périphérie du ciment, on observe principalement la bande caractéristique des phosphates de l'apatite, ainsi qu'une petite absorption due au $SrCO_3$. Ces résultats sont cohérents avec le mécanisme de dissolution proposé : les phases carbonatées (vatérite et strontianite) sont dissoutes en premier lieu, la vatérite de manière préférentielle. Il reste donc principalement de l'apatite en périphérie, tandis que la composition du cœur du ciment est intacte, ce qui est cohérent avec un mécanisme de dissolution par diffusion.

Une autre manière de vérifier le mécanisme de libération est de modéliser les cinétiques de dissolution présentées sur les figures IV-29 et IV-30. Selon Wehrlé [2007], si elles peuvent être modélisées par le modèle dit de Higuchi, cela signifie que la diffusion est le seul mécanisme responsable de la libération du principe actif, ici le strontium.

Le modèle Higuchi suit l'équation (IV-6) où Q représente le pourcentage dissous au temps t et k est une constante de vitesse :

$$Q = k\, t^{1/2} \qquad \text{(éq. IV-6)}$$

[Wehrlé, 2007]

La figure IV-36 représente l'évolution du paramètre Q en fonction de $t^{1/2}$ pour la cinétique de dissolution du strontium. Pour les deux ciments dans lesquels le strontium a été introduit en phase solide, les évolutions sont linéaires et les coefficients de régression sont supérieurs à 0,99. Ceci corrobore les résultats précédents et confirme que le strontium de ces deux ciments est libéré uniquement par diffusion à travers le réseau poreux créé par le solvant dans le ciment.
En revanche, la courbe du ciment dans lequel le strontium a été introduit via la phase liquide n'est absolument pas linéaire : le strontium n'est pas libéré par diffusion à-travers un réseau moins soluble, mais par la résorption de l'apatite strontiée.

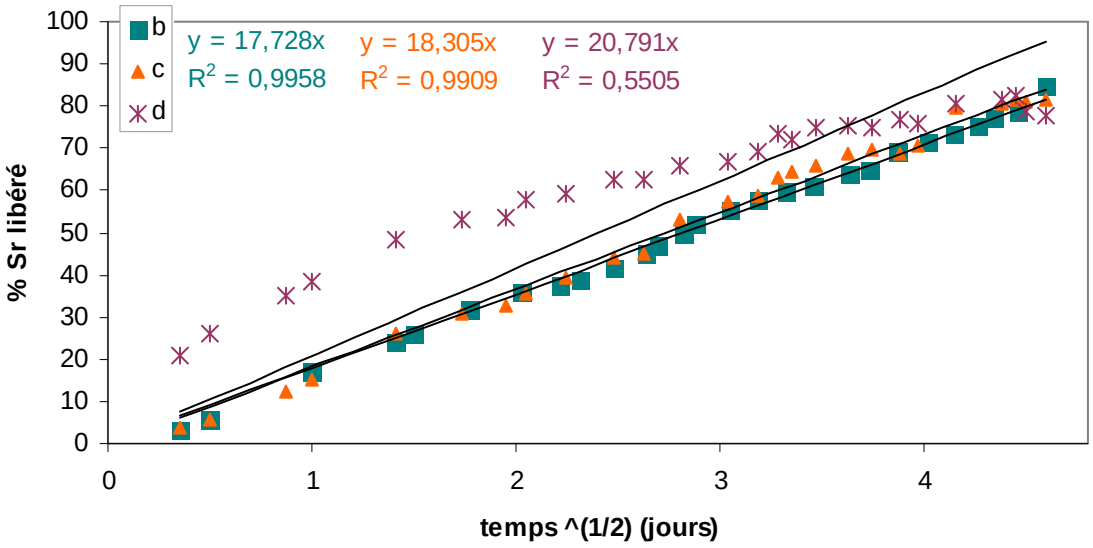


Figure IV-36 : Représentation des cinétiques de libération du strontium selon le modèle de Higuchi pour : b). le ciment contenant 8 % de strontium introduit en phase solide non broyée, c). le ciment préparé avec la phase solide co-broyée incluant 8 % de strontium, d). le ciment préparé avec la phase solide co-broyée et contenant 4,7 % de strontium introduit en phase liquide.

À titre indicatif, le tableau IV-18 donne les valeurs de l'épaisseur de la couche concentrée en phosphore, calculées d'après les cartographies EDX (figure IV-34), et moyennées sur dix mesures. On peut en effet considérer qu'elle correspond à l'épaisseur de la couche de diffusion ; il est alors possible de calculer un volume de diffusion moyenné sur la surface du cylindre.

Connaissant la masse de calcium et de strontium dans ce volume de diffusion, nous avons ensuite calculé quel pourcentage de ces éléments a été libéré en trois semaines d'immersion.

Tableau IV-18 : Épaisseur et volume de diffusion dans chaque type de ciment testé

ciments	**ciment de référence**	**8 % Sr phase solide non broyée**	**8 % Sr phase solide co-broyée**	**4,7 % Sr phase liquide**
épaisseur de la couche concentrée en phosphates	593 ± 39 µm	543 ± 9 µm	589 ± 3 µm	484 ± 30 µm
volume moyen de diffusion calculé (mm^3)	475	430	446	440
pourcentage pondéral de Ca libéré du volume de diffusion (g)	53 %	71 %	75 %	124 %
pourcentage pondéral de Sr libéré du volume de diffusion (g)	/	66 %	72 %	116 %

Ces calculs confirment les résultats décrits auparavant : pour les trois premiers types de ciments, contenant du strontium introduit en phase solide, les pourcentages sont cohérents avec un mécanisme de dissolution par diffusion. En revanche, pour le ciment dans lequel le strontium a été introduit via la phase liquide, on obtient des valeurs de plus de 100 %, ce qui prouve que la diffusion ne peut être seule responsable de la libération en solution des ions calcium et strontium.

2.4.2.4. Discussions et conclusions

Il y a bien libération prolongée du strontium du ciment vers la solution et ce quel que soit le mode d'introduction du strontium dans la formulation du ciment. Par ailleurs, cette libération qui a lieu par solubilisation et diffusion est lente et progressive ce qui permettra de conserver l'effet opacifiant du strontium pour un suivi postopératoire du ciment. Toutefois, il est très difficile d'appréhender de manière quantitative la contribution de l'action à plus long terme des cellules osseuses sur la résorption de ce type de ciments.

2.5. Étude in-vitro de la biocompatibilité des ciments dopés au strontium

Une fois les ciments caractérisés sur le plan physico-chimique, et leurs comportements en milieu aqueux étudié, nous avons souhaité évaluer l'éventuel effet du strontium sur le comportement *in-vitro* de cellules à leur contact.

Cette étude *in-vitro* préliminaire a été réalisée en collaboration avec R. Bareille du laboratoire INSERM U 577 de l'université Victor Ségalen à Bordeaux.

2.5.1. Méthodologie

Les protocoles sont détaillés plus précisément dans l'annexe A. Ces essais ont été réalisés sur trois types de ciments :
- le ciment de référence (ne contenant pas de strontium),
- le ciment contenant 8 % de strontium introduit via la phase solide co-broyée,
- le ciment contenant 4,7 % de strontium introduit via la phase liquide.

Les ciments ont été gâchés puis moulés pour former des disques de 1 cm de diamètre. Après prise, ils ont été démoulés, légèrement polis pour assurer une surface plane, puis stérilisés par rayonnement gamma (dose = 25KGy). Les cellules utilisées sont de type HBMSC (« Human Bone Marrow Stroma Cells ») induites HOP (pour « Human Osteoblast Progenitor »). Ce sont donc des cellules précurseur des ostéoblastes, issues de cellules souches de moelle osseuse et qui ont la capacité d'évoluer vers des cellules différenciées.
Des tests de prolifération cellulaire, évaluée par MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium), ont été réalisés après 1, 3, 9 et 15 jours de contact avec les matériaux (notés respectivement J1, J3, J9 et J15). Après 15 jours, des observations ont été réalisés par microscope électronique à balayage.
Des tests de différenciation cellulaire ont également été réalisés par PCR (pour « Polymerase Chain Reaction ») après 3 et 15 jours de culture cellulaire, afin de quantifier les quatre marqueurs de différenciation suivants : Cbfa, phosphatase alcaline (PaL), Collagène I et Ostéocalcine associée à un gène de ménage (Po).

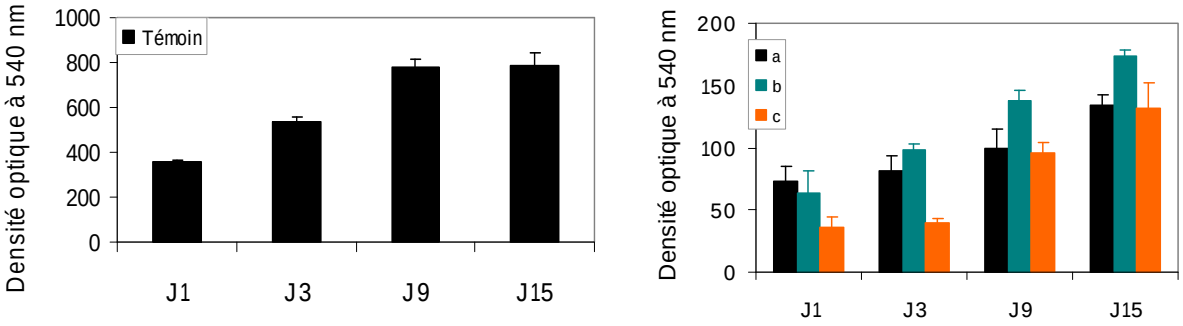
2.5.2. Résultats

Le sel de triazolium MTT, de couleur jaune, est réduit en cristaux de formazan par une enzyme présente dans les mitochondries des cellules actives. La couleur passe alors au violet. L'intensité de la coloration violette est donc proportionnelle au nombre de cellules vivantes lors du test et à leur activité métabolique. Autrement dit, c'est une méthode intéressante pour mesurer la prolifération cellulaire. La figure IV-37 présente une photo des trois ciments testés après quinze jours de culture cellulaire. Les trois ciments sont colorés ; on peut remarquer que la coloration du ciment préparé à partir de phase solide co-broyée est plus intense que les deux autres.



Figure IV-37 : Test de prolifération au MTT à 15 jours avant dissolution des cristaux ; a). ciment de référence (sans strontium) ; b). ciment avec 8 % Sr introduit en phase solide co-broyée ; c). ciment avec Sr introduit en phase liquide.

Afin de quantifier les résultats observés, les cristaux de formazan ont été solubilisés et l'absorbance de la solution colorée a été mesurée par spectrophotométrie à 540 nm et reportée sur la figure IV-38. La figure IV-38-a présente les résultats obtenus pour une culture sur plastique (témoin). La bonne prolifération indique que les cellules utilisées tout au long de l'expérience se portaient bien. La figure IV-38-b présente les résultats obtenus sur les trois types de ciments : référence (sans strontium), 8 % de strontium introduit dans la phase solide co-broyée et enfin 4,7 % de strontium introduit en phase liquide.



témoin plastique

a). ciment de référence (sans strontium)

b). ciment avec 8 % Sr introduit en phase solide co-broyée

c). ciment avec Sr introduit en phase liquide

Figure IV-38 : Évaluation de la prolifération cellulaire sur le matériau plastique témoin ainsi que sur les différents ciments testés.

Après 1 et 3 jours, il n'y a pas de différence significative pour les deux premiers types de ciments. En revanche, le ciment contenant de strontium introduit en voie liquide présente une prolifération nettement inférieure (presque divisée par un facteur deux). Après 9 et 15 jours, ce ciment rattrape son retard et les résultats sont comparables à ceux du ciment de référence. Le ciment avec 8 % de strontium introduit en phase solide présente alors une prolifération significativement supérieure aux deux autres, ce qui montrerait l'effet positif du strontium, introduit en proportion importante via la phase solide co-broyée du ciment, sur la prolifération cellulaire.

Afin de compléter ces observations, un suivi « live-dead » a été réalisé. Les clichés réalisés sont présentés sur la figure IV-38. Les cellules vivantes apparaissent en vert, tandis que les cellules mortes apparaissent en rouge. Ces résultats confirment l'étude réalisée au MTT : le nombre de cellules vivantes est moins élevé sur le ciment contenant du strontium introduit en phase liquide.

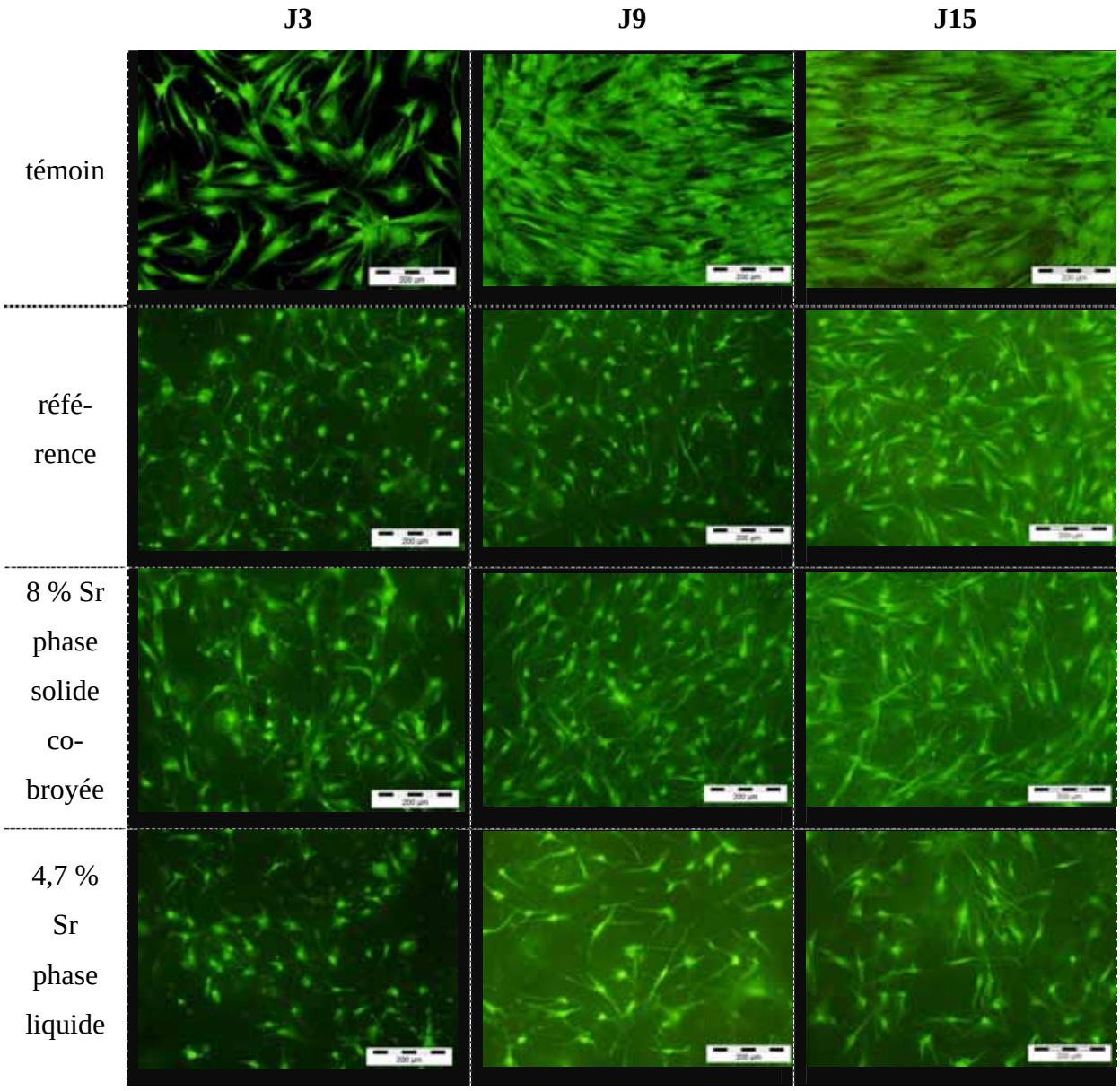
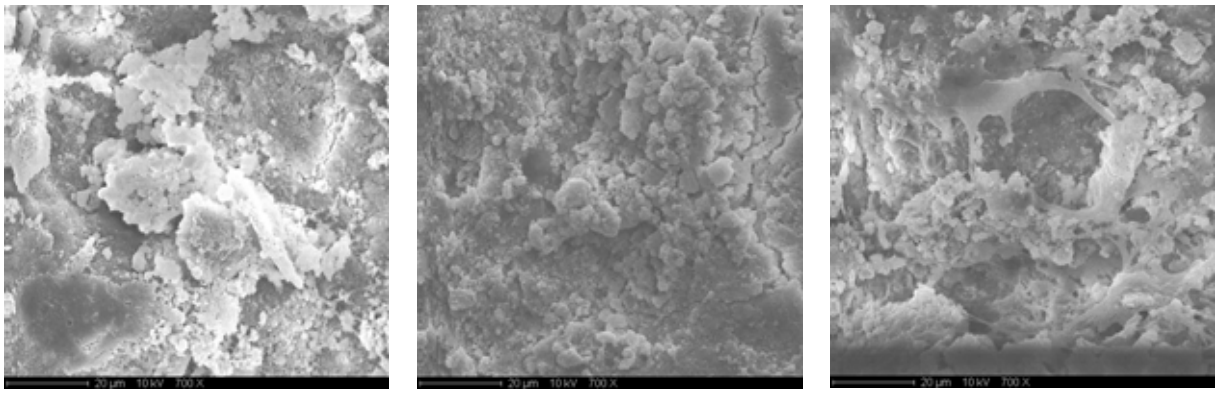


Figure IV-38 : Suivi de la prolifération cellulaire par observation au microscope à l'aide du test « live-dead ».

Pour compléter ces clichés, une observation au microscope électronique à balayage a permis de visualiser les cellules sur les trois types de ciments (cf. figure IV-39).

Alors que sur le ciment sans strontium et le ciment contenant 8 % de strontium introduit en phase solide, les cellules sont bien étalées, elles se « plaisent » moins sur le ciment contenant du strontium introduit via la phase liquide.



Ciment référence | 8 % Sr co-broyé | 4,7 % Sr introduit en phase liquide

Figure IV-39 : Micrographies MEB présentant la morphologie des cellules sur les différents ciments testés.

Afin de quantifier la différenciation des cellules induites HOP au contact prolongé des ciments, l'expression de quatre marqueurs a été mesurée par PCR. La figure IV-40 présente les résultats de l'expression des marqueurs de différenciation après 15 jours de culture, présentant une très nette surexpression des marqueurs de l'ostéocalcine (OC) et de la phosphatase alcaline (PaL) sur les trois types de ciments.

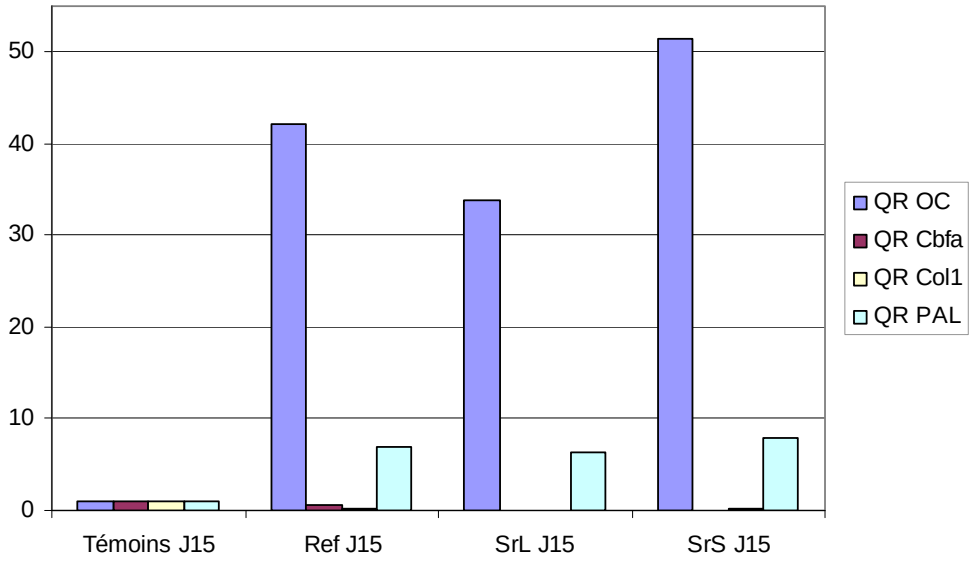


Figure IV-40 : Expression de 4 marqueurs de différentiation des cellules après 15 jours de contact avec les différents ciments : ciment de référence (Ref), ciment avec 8 % de Sr introduit via la phase solide (SrS) et ciment avec 4,7 % de Sr introduit via la phase liquide (SrL).

Ces résultats sont préliminaires, mais ils confirment les observations réalisées avec les autres tests : le ciment contenant du strontium introduit en phase solide favorise davantage la prolifération cellulaire que le ciment sans strontium ou celui pour le lequel le strontium a été apporté par voie liquide. Néanmoins, tous ces matériaux présentent un bon comportement cellulaire et un potentiel ostéogénique important. Il serait nécessaire de valider ces tests grâce à un échantillonnage plus important de chaque type de ciment.

3. Étude du ciment $CaCO_3$

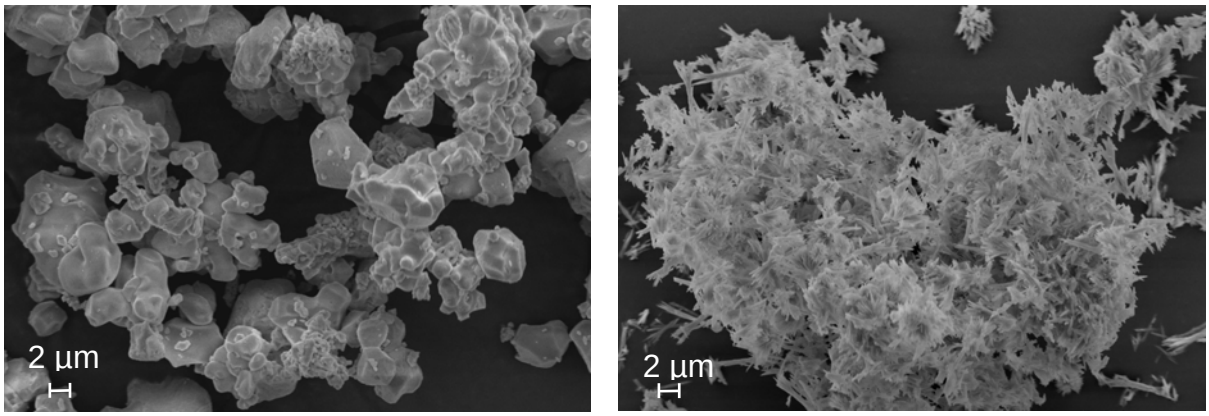
L'intérêt d'ajouter du strontium dans les ciments $CaCO_3$-CaP étant manifeste, tant au niveau de la radio-opacité que des propriétés biologiques, l'addition de strontium dans le ciment $CaCO_3$ a également été étudiée mais de manière moins approfondie que pour les ciments $CaCO_3$-CaP. Notons qu'une augmentation de la quantité de carbonate dans la formulation du ciment (ciment $CaCO_3$ comparé au ciment mixte $CaCO_3$-CaP) permettrait d'améliorer les propriétés de résorption du ciment et donc la libération de strontium *in-vivo.*

3.1. Élaboration et caractérisation physico-chimique des ciments contenant du strontium

Comme pour le ciment mixte $CaCO_3$-CaP, deux voies d'ajout du strontium ont été testées pour ce ciment uniquement à base de $CaCO_3$: dans la phase solide sous forme de carbonate de strontium, permettant ainsi de conserver un ciment uniquement carbonate et dans la phase liquide sous forme de chlorure de strontium.

3.1.1. Ajout dans la phase solide : $SrCO_3$

Deux types de carbonates de strontium ont été utilisés dans cette étude : le premier, commercial, a été décrit dans le paragraphe IV.2.1. Le second a été synthétisé au laboratoire selon la synthèse décrite dans l'annexe A. La différence principale entre les deux composants est la forme de leurs particules : granulaire pour le sel commercial, aciculaire pour le composé synthétisé par nos soins (figure IV-41).



a). $SrCO_3$ commercial b). $SrCO_3$ synthétisé

Figure IV-41 : Cliché MEB des particules des deux types de carbonate de strontium utilisés.

Les particules d'aragonite, constituant principal du ciment $CaCO_3$ après la prise, ont la forme d'aiguille, comme le $SrCO_3$ synthétisé. L'objectif était d'examiner si la morphologie des particules introduites dans la phase solide pouvait ou non favoriser la croissance des cristaux d'aragonite.

Les ciments sont préparés selon le protocole habituel, décrit dans le chapitre I, par gâchage de la phase solide et d'eau désionisée avec un rapport L/S = 2/3. Le tableau IV-19 donne les différentes compositions de ciments étudiées, et les masses à peser pour préparer des pâtes de masses totales 5 grammes.

Tableau IV-19 : Composition de la pâte des différents ciments contenants du $SrCO_3$

PHASE SOLIDE				**PHASE LIQUIDE**	**PÂTE**
% massique de $SrCO_3$	masse vatérite (g)	masse CCA (g)	masse $SrCO_3$ (g)	masse eau désionisée (g)	% massique de Sr dans la pâte
0 % - ciment de référence	2	1	0	2	0 %
5 %	1,90	0,95	0,15	2	1,8 %
10 %	1,80	0,90	0,30	2	3,6 %
15 %	1,70	0,85	0,45	2	5,3 %
20 %	1,60	0,80	0,60	2	7,1 %
25 %	1,50	0,75	0,75	2	8,9 %
30 %	1,40	0,70	0,90	2	10,7 %

La figure IV-42 représente les diagrammes de diffraction de rayons X des ciments durs, contenants différentes proportions de $SrCO_3$ commercial.

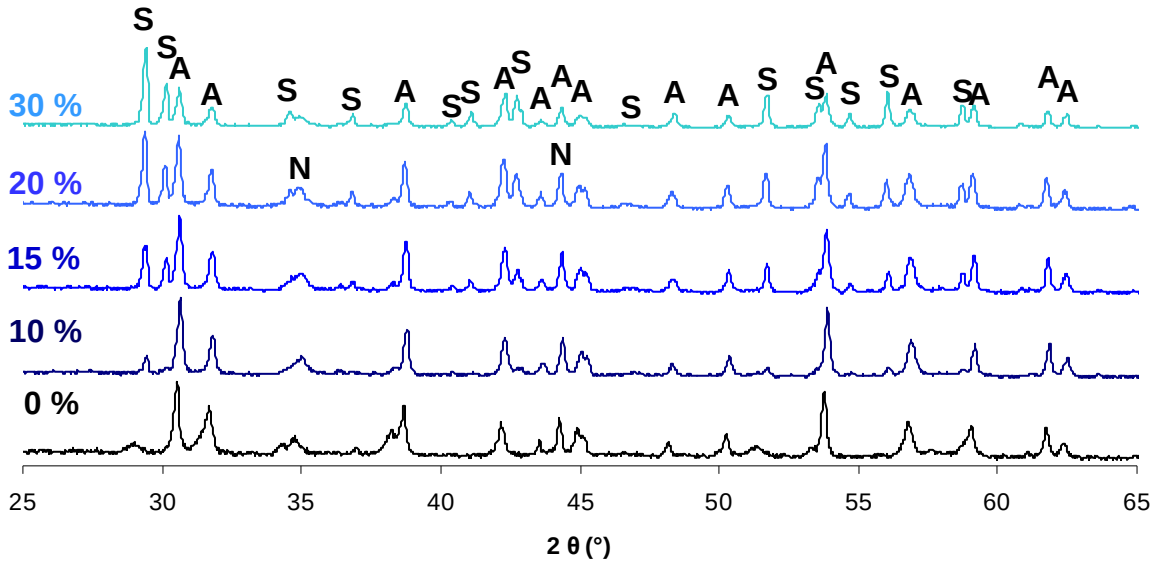
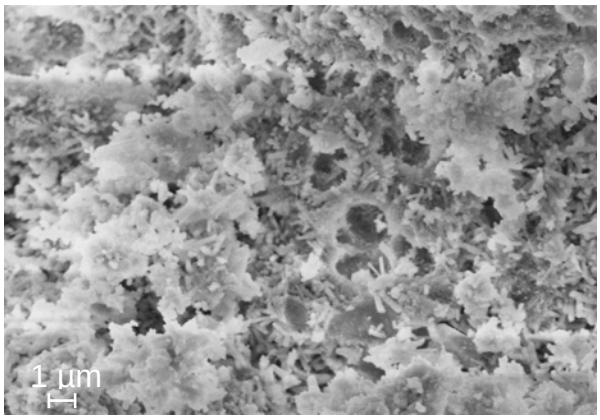


Figure IV-42 : Diffractogrammes de rayons X des ciments contenants différentes proportions de carbonate de strontium introduit dans la phase solide (0, 10, 15, 20 et 30 %)
A : aragonite ; N : Na_2CO_3 ; S : $SrCO_3$.

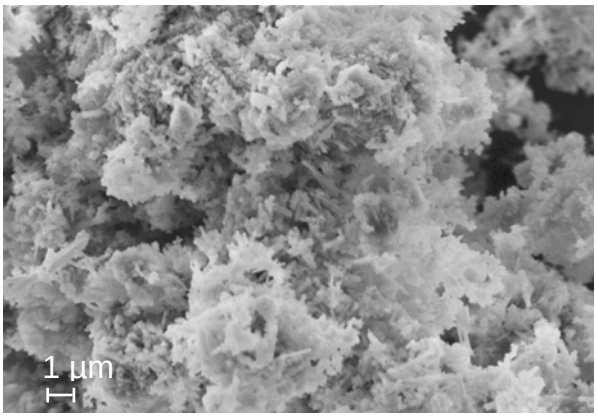
On remarque une augmentation de l'intensité des raies de diffraction caractéristiques de $SrCO_3$ lorsque la quantité de $SrCO_3$ introduit initialement dans la phase solide augmente. De plus, comme observé pour le ciment $CaCO_3$-CaP, le carbonate de strontium introduit dans la phase solide se retrouve tel quel dans le ciment dur. Le même résultat est obtenu pour les ciments préparés avec le $SrCO_3$ synthétisé au laboratoire.

La microstructure des ciments n'est apparemment pas affectée par l'addition du carbonate de strontium dans la phase solide (figure IV-43) : on retrouve l'enchevêtrement caractéristique des aiguilles d'aragonite, quelle que soit la proportion de strontium ajoutée (micrographies IV-43-a, IV-43-b et IV-43-c). Par ailleurs, les particules granulaires du $SrCO_3$ se retrouvent prises dans le réseau du ciment (voir micrographies IV-43-e et IV-43-f). Il semble même que quelques aiguilles d'aragonite poussent à la surface des particules de $SrCO_3$. Ces observations confirment les résultats obtenus par diffraction des rayons X : le carbonate de strontium reste tel quel dans le ciment dur et ne participe donc pas ou peu à la réaction de prise. En ce qui

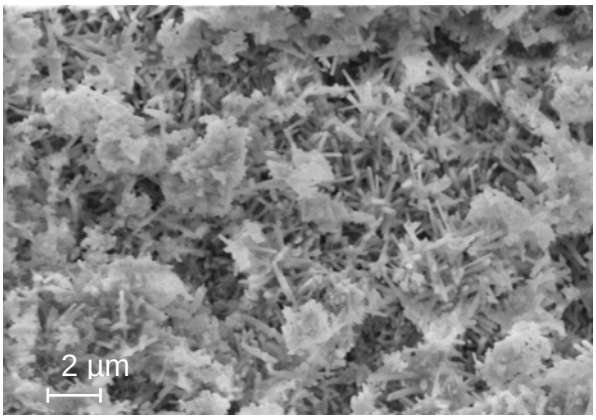
concerne le $SrCO_3$ synthétisé (micrographie IV-43-d), il est plus difficile à observer puisqu'il se confond complètement avec la matrice du ciment, de par sa morphologie aciculaire. On note toutefois que les aiguilles sont bien plus petites que pour le ciment préparé avec le $SrCO_3$ commercial ; il semble également moins poreux.



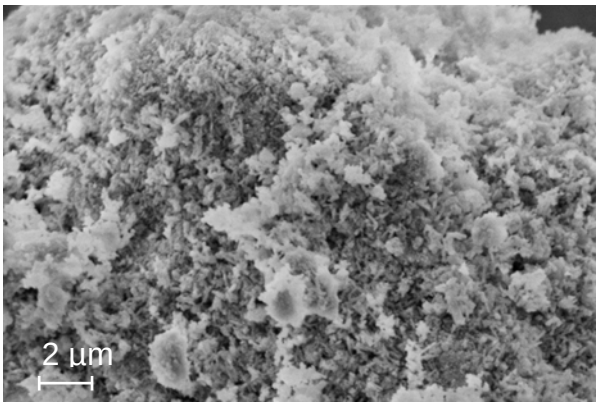
a). 5 % de $SrCO_3$ commercial



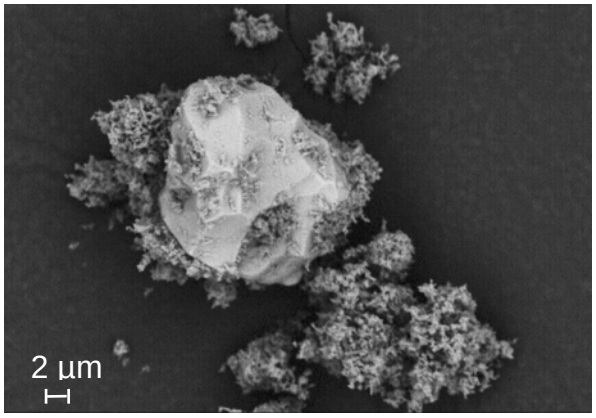
b). 10 % de $SrCO_3$ commercial



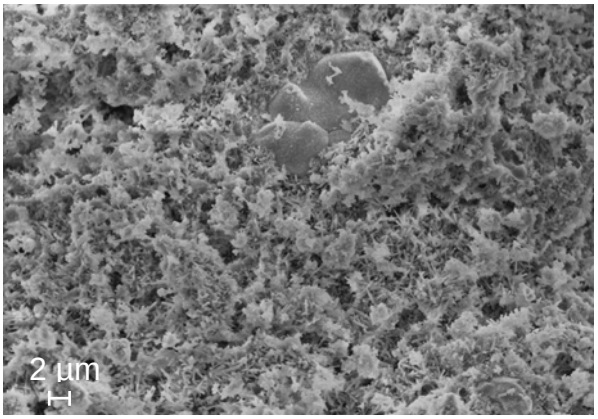
c). 20 % de $SrCO_3$ commercial



d). 20 % de $SrCO_3$ synthétisé



e). 5 % de $SrCO_3$ commercial



f). 20 % de $SrCO_3$ commercial

Figure IV-43 : Clichés du ciment observé au MEB et préparé avec différentes proportions massiques de $SrCO_3$ commercial ou synthétisé au laboratoire dans la phase solide.

Si l'on compare maintenant les diagrammes de diffraction de rayons X des ciments obtenus avec le carbonate de strontium commercial à ceux obtenus avec le carbonate de strontium synthétisé, il apparaît que, quelle que soit la proportion de strontium introduite, la composition chimique du ciment n'est pas modifiée, mais les phases en présence (aragonite et $SrCO_3$) semblent moins bien cristallisées pour le ciment élaboré avec le $SrCO_3$ synthétisé au laboratoire. La figure IV-44 présente l'exemple des ciments préparés avec 30 % de $SrCO_3$ dans la phase solide.

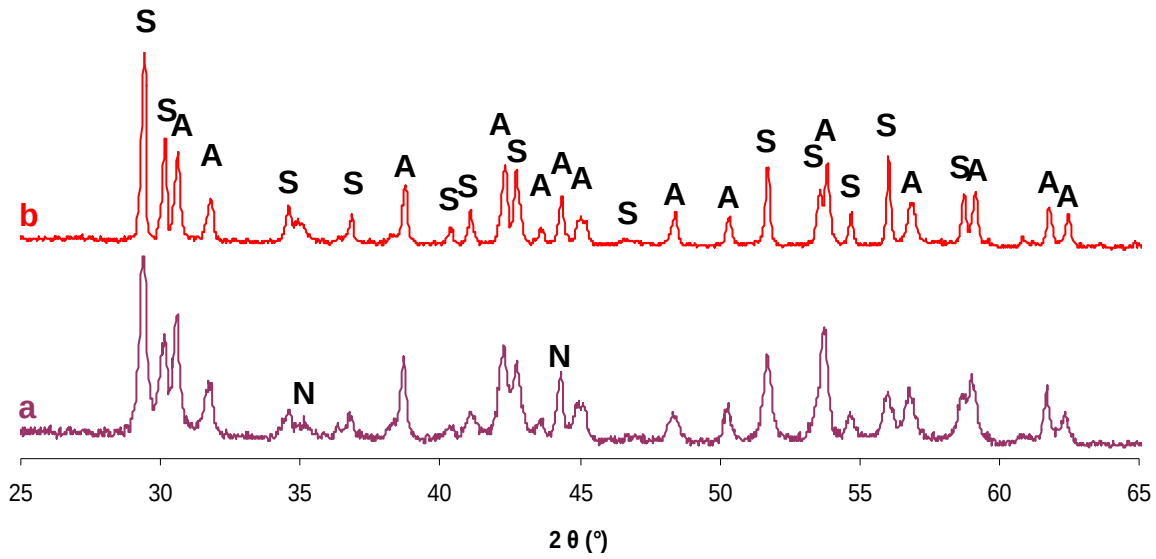


Figure IV-44 : Diffractogrammes de rayons X des ciments contenants 30 % de carbonate de strontium introduit dans la phase solide ; a). $SrCO_3$ synthétisé ; b). $SrCO_3$ commercial
A : aragonite ; N : Na_2CO_3 ; S : $SrCO_3$.

Ce constat peut, d'une part, s'expliquer par le fait que le carbonate de strontium synthétisé est déjà moins bien cristallisé que le $SrCO_3$ commercial (cf. annexe A). Comme le $SrCO_3$ ne participe pas à la réaction de prise, on le retrouve moins bien cristallisé dans le ciment final. D'autre part, la comparaison des micrographies IV-43-c et IV-43-d met en évidence un enchevêtrement d'aiguilles beaucoup plus petites contribuant à l'élargissement des raies de diffraction de l'aragonite pour le ciment élaboré avec le $SrCO_3$ synthétisé au laboratoire.

Comme pour les ciments de référence ne contenant pas de strontium (cf. chapitre III), la cinétique de la réaction de prise a été suivie en réalisant des spectres infrarouges à intervalles

de temps réguliers. Les spectres (non présentés) montrent que la cinétique de prise ne présente pas de différence majeure par rapport à celle du ciment de référence.

Les propriétés mécaniques des différents ciments ont été mesurées par des essais de résistance en compression. La moyenne obtenue sur quatre éprouvettes de même composition est reportée dans le tableau IV-20.

Tableau IV-20 : Propriétés mécaniques des différents ciments

teneur en strontium de la pâte	**résistance en compression (MPa)**	**écart-type (MPa)**
0 % (référence)	2,3	0,4
3,6 % Sr	1,4	0,5
7,1 % Sr	1,5	0,2

Les propriétés mécaniques des ciments de référence sont relativement faibles. Il semble de plus que l'addition du carbonate de strontium provoque une diminution de ces propriétés, diminution qui n'est pas corrélée à la quantité de strontium introduite. On peut supposer que la création d'interfaces entre les particules de $SrCO_3$ et la matrice de ciment (cf. micrographie IV-43-e) facilite l'amorce et la propagation de fissures éventuellement présentes dans le ciment.

3.1.2. Ajout du strontium dans la phase liquide : $SrCl_2, 6H_2O$

Pour les ciments $CaCO_3$ avec ajout du strontium en phase liquide, la phase solide est préparée comme pour un ciment de référence (vatérite + CCA). Pour préparer la phase liquide, du chlorure de strontium est dissout dans de l'eau désionisée. Le calcul de la masse de chlorure de strontium à dissoudre a été réalisé afin d'introduire autant de strontium par cette voie que lorsque l'on ajoute du strontium via la phase solide. Les masses de produits à peser pour préparer une pâte de ciment de masse totale 5 grammes sont données dans le tableau IV-21.

Tableau IV-21 : Composition de la pâte des différents ciments contenants du Sr introduit via la phase liquide

PHASE SOLIDE		**PHASE LIQUIDE**		**PÂTE**
masse vatérite (g)	masse CCA (g)	masse eau désionisée (g)	masse $SrCl_2, 6H_2O$ (g)	% massique de Sr dans la pâte
2	1	2	0	0 %
2	1	1,45	0,55	3,6 %
2	1	0,92	1,08	7,1 %

Au-dessus de 7,1 % massique de strontium dans la pâte, on se trouve au-delà de la limite de solubilité du chlorure de strontium et on ne peut donc pas préparer de phase liquide plus concentrée. Notons que, le rapport L/S de ce ciment étant plus élevé que celui du ciment $CaCO_3$-CaP (2/3 contre 1/2), plus de strontium peut être introduit par cette voie.

Une fois les phases solides et liquides prêtes, les ciments sont gâchés et laissés 48 heures à l'étuve à 37°C pour la prise. La composition des ciments durs est ensuite analysée par diffraction des rayons X (figure IV-45).

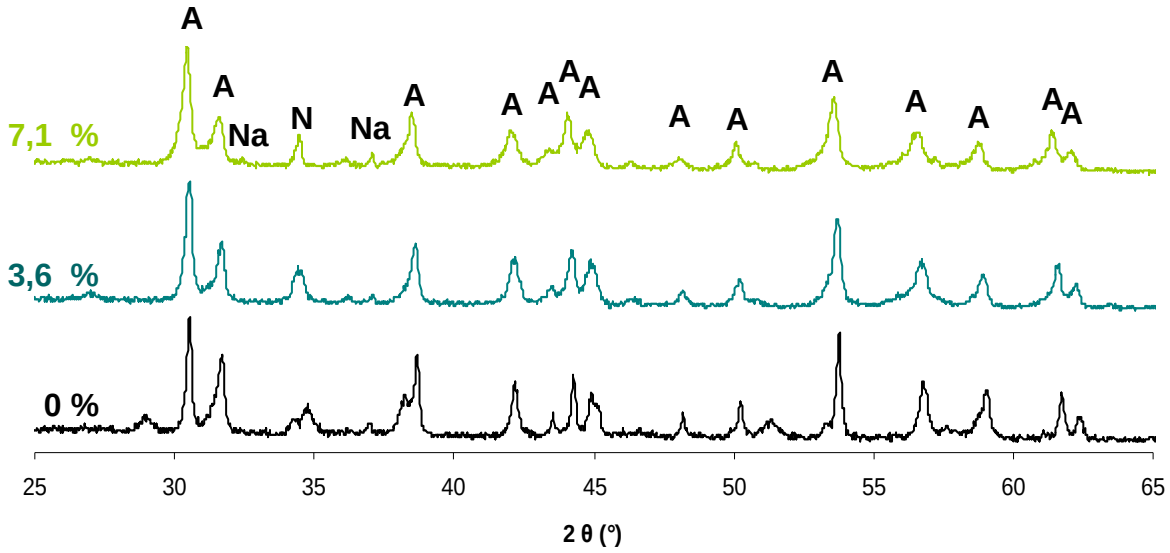
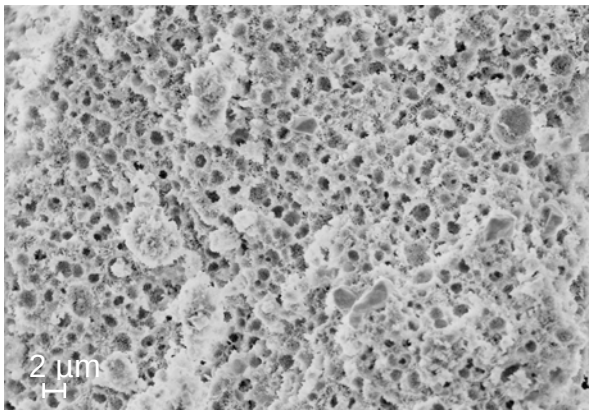


Figure IV-45 : Diffractogrammes de rayons X des ciments préparés avec différentes proportions de strontium introduit dans la pâte via la phase liquide

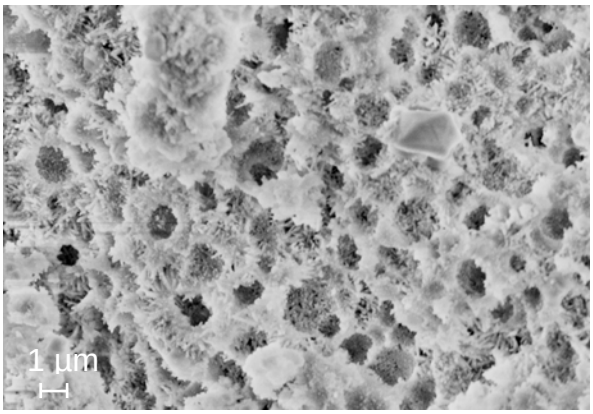
A : aragonite ; N : Na_2CO_3 ; Na : NaCl.

Avec addition du chlorure de strontium, aucune phase supplémentaire n'apparaît : le ciment est toujours constitué majoritairement d'aragonite. Par contre, la proportion de NaCl semble légèrement augmenter, ce qui est vraisemblablement dû à la cristallisation de ce sel en raison de l'augmentation de la concentration en ions chlorure dans la phase liquide. De plus, il semble que l'aragonite est de moins en moins bien cristallisée lorsque l'on ajoute du strontium, ce qui pourrait être corrélé à une substitution des ions calcium par du strontium dans l'aragonite. Des études antérieures ont en effet prouvé l'existence des solutions solides aragonite – strontianite de formule générale $Ca_xSr_{1-x}CO_3$ quel que soit le degré de substitution x du calcium par le strontium [Alia et coll., 1997 ; Lucas-Girot et coll., 2007]. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par des affinements Rietveld sur les diagrammes de diffraction puisque les paramètres de maille des solutions solides $Ca_xSr_{1-x}CO_3$ suivent une loi de Végard [Lucas-Girot et coll., 2007].

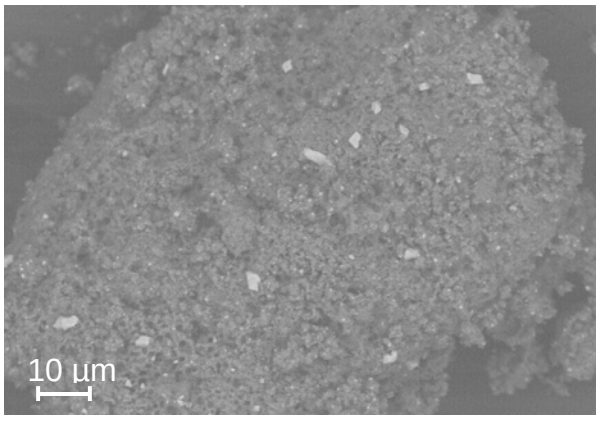
La figure IV-46 présente la microstructure des ciments observée par M.E.B. Quelle que soit la proportion de strontium ajoutée, on reconnaît les enchevêtrements d'aiguilles d'aragonite, apparemment plus fines que pour un ciment de référence (cf. figure III-16-a). Cette microstructure fine des ciments est corrélée à la moins bonne cristallisation remarquée sur les diffractogrammes de rayons X. On observe également quelques particules qui présentent un contraste au détecteur d'électrons rétrodiffusés. Étant donné la composition du ciment, il est vraisemblable que ces particules contiennent plus de strontium que le reste du ciment. Il faudrait vérifier cela par une analyse chimique car cela signifierait que le strontium n'est pas réparti de manière homogène dans le ciment, comme c'est le cas pour le ciment $CaCO_3$-CaP.



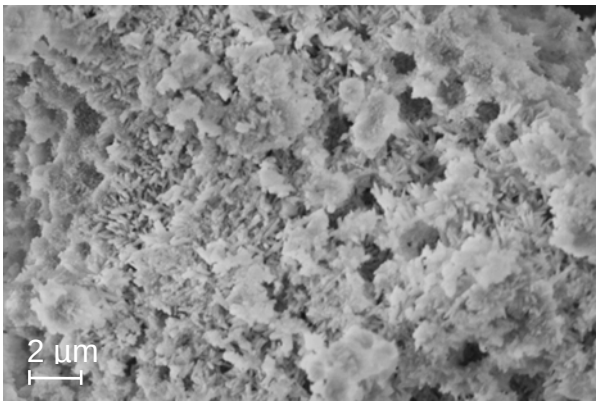
a). 3,6 % de Sr (grossissement x 2000)



b). 3,6 % de Sr (grossissement x 5000)



c). 3,6 % de Sr observé au détecteur d'électrons rétrodiffusés



d). 7,1 % de Sr

Figure IV-46 : Clichés MEB présentant la microstructure du ciment contenant différentes proportions de strontium introduites dans la phase liquide.

On observe également une forte porosité des ciments (micrographie IV-46-a), qui semble encore augmenter entre 3,6 et 7,1 % de strontium dans la pâte (IV-46-b et IV-46-d). Cette porosité peut s'expliquer par le pH acide de la phase liquide lorsqu'elle contient du chlorure de strontium, comme montré dans le tableau IV-22.

Tableau IV-22 : pH de la phase liquide mesuré pour deux proportions de chlorure de strontium en solution

teneur en strontium de la pâte	**3,6 % strontium**	**7,1 % strontium**
pH de la phase liquide correspondante	6,77	1,48

Les ions carbonate réagissent avec les ions H_3O^+ selon l'équation (IV-3), ce qui conduit au dégagement de CO_2 qui s'échappe en laissant place à des pores de forme sphérique au sein du ciment, que l'on voit très nettement sur la micrographie IV-46-a.

Le pH de la phase liquide à 7,1 % de strontium est particulièrement acide, ce qui accroît significativement la porosité de ces ciments et diminue ainsi leurs propriétés mécaniques. Cependant, la mesure quantitative de la résistance en compression n'a pu être réalisée : les ciments étant fragilisés, ils sont cassés lors du démoulage des éprouvettes préparées pour les essais mécaniques. La figure IV-47 montre des éprouvettes de ciments contenant différents pourcentages pondéraux de strontium introduit via la phase liquide. On n'observe pas (à l'œil nu) de différence notable entre le ciment de référence (sans strontium) et le ciment contenant 3,6 % de strontium, car la différence de pH n'est pas significative et les ciments sont microporeux. En revanche, le ciment contenant 7,1 % de strontium laisse apparaître des macropores et l'éprouvette démoulée n'est pas ni uniforme, ni intacte.

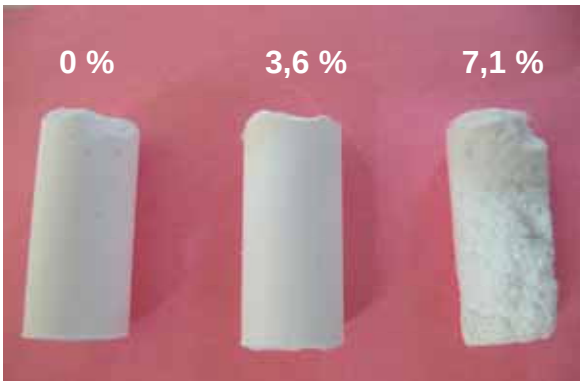


Figure IV-47 : Photo des éprouvettes de ciments contenant différentes proportions de strontium introduit en phase liquide en vue des essais de résistance en compression.

La cinétique de prise de ces ciments sera discutée plus précisément dans le paragraphe suivant ; notons simplement que, quelle que soit la proportion de strontium introduite, la réaction de prise est très nettement accélérée en présence de strontium. Or, une réaction de prise accélérée laisse moins de temps aux cristaux d'aragonite pour croître et peut en partie expliquer le moins bon état de cristallisation observé sur la micrographie IV-46-d et révélé par la diffraction des rayons X (cf. figure IV-45).

3.2. Comparaison des différents ciments contenant du strontium

Tout comme nous l'avions fait pour les ciments sans strontium (paragraphe III.3.2), nous avons lyophilisé une partie d'un échantillon de ciment à intervalles de temps réguliers afin de stopper la réaction de prise.

La figure IV-48 compare les spectres infrarouges des ciments dopés ou non au strontium après 7 heures de prise. À ce point de la réaction, nous pouvons constater que la conversion chimique du ciment de référence (sans strontium) est à peine entamée et la vatérite est encore très largement majoritaire. Pour le ciment contenant du strontium introduit en phase solide (sous forme de $SrCO_3$ à raison de 20% massique de la phase solide), la réaction semble légèrement plus rapide, mais ce n'est pas significatif. En revanche, pour les ciments à même teneur de strontium introduit dans la phase liquide, la réaction est déjà presque terminée après seulement 7 heures de prise : non seulement l'aragonite est la phase majoritaire mais il ne reste presque plus de vatérite. On peut avancer deux explications à ces observations : tout d'abord, à cause de l'acidité de la phase liquide, une partie des carbonates est convertie en CO_2, ce qui pourrait être à l'origine de la diminution si rapide de la quantité résiduelle de vatérite dans le ciment. Ensuite, les ions strontium introduits dans la pâte via la phase liquide participent à la réaction de prise du ciment et pourraient favoriser la précipitation d'aragonite car il a été montré par plusieurs auteurs que l'introduction de strontium, même en faible quantité, accroît la stabilité de l'aragonite [Astilleros et coll., 2003 ; Lucas-Girot et coll., 2007].

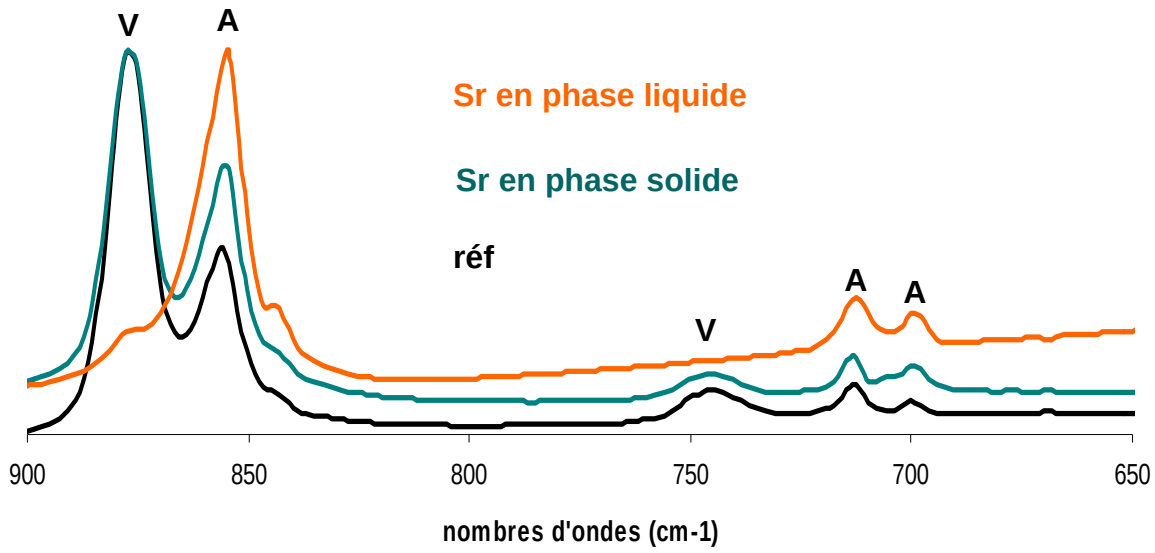


Figure IV-48 : Spectres d'absorption infrarouge (900-650 cm^{-1}) de différents ciments analysés après 7 heures d'évolution : ciment de référence (sans strontium) et ciments contenant 7,1 % de strontium introduit dans la pâte soit en phase solide soit en phase liquide ; A : aragonite ; V : vatérite.

Par ailleurs, si l'on regarde plus en détails le spectre du ciment contenant du strontium introduit en phase solide, on observe un épaulement à 706 cm^{-1}. Cet épaulement est absent des deux autres spectres car il est dû à l'absorption des groupements carbonates provenant du $SrCO_3$. L'analyse des ciments par spectroscopie infrarouge confirme donc les résultats obtenus par diffraction des rayons X.

Alia et coll. [1997] ont montré que la substitution progressive des ions calcium par des ions strontium dans le réseau cristallin de l'aragonite conduit à un déplacement des bandes d'absorbance vers les nombres d'ondes faibles. Nous n'observons pas de déplacement des bandes dans cette étude mais il est possible que le strontium ne soit introduit en quantité trop faible pour l'observer.

Par ailleurs, des analyses chimiques par spectrophotométrie d'absorption atomique dont le protocole est détaillé dans l'annexe A ont été réalisées pour doser la quantité de calcium et de strontium dans ces différents ciments. Les résultats sont donnés dans le tableau IV-23. À titre indicatif, la teneur en magnésium est également donnée puisqu'un sel de magnésium est utilisé lors de la synthèse du carbonate de calcium amorphe qui entre dans la composition de

la phase solide du ciment $CaCO_3$ (cf. chapitre II). Le calcium dosé provient quant à lui à la fois du CCA et de la vatérite. Le rapport massique Sr/Ca expérimental (noté « exp ») est comparé au rapport théorique (noté « th »), calculé d'après les quantités de strontium et de calcium qui ont servies à l'élaboration des ciments.

Tableau IV-23 : Pourcentages massiques de calcium, strontium et magnésium dans les différents ciments élaborés

introduction du strontium via	pourcentage de strontium dans la pâte	**% Ca**	**% Sr**	**% Mg**	$\mathbf{(Sr/Ca)_{exp}}$	$\mathbf{(Sr/Ca)_{th}}$
la phase solide	a). 3,6 % Sr	51,4	3,0	1,04	0,06	0,164
	b). 7,1 % Sr	45,1	17,0	0,88	0,38	0,38
la phase liquide	c). 3,6 % Sr	48,6	6,7	0,61	0,14	0,15
	d). 7,1 % Sr	44,1	11,6	0,52	0,26	0,30

Lorsque l'on introduit du strontium dans la phase solide du ciment, les quantités de vatérite et de CCA sont diminuées (cf. tableau IV-19), ce qui explique la réduction du pourcentage pondéral du calcium et du magnésium dans ces ciments. Notons que le pourcentage de strontium dans le ciment est multiplié de près d'un facteur six entre les ciments a et b, alors qu'il devrait être de deux. Ceci peut s'expliquer par le caractère localisé du dosage (on ne dissout qu'une faible quantité de ciment) alors que la dispersion des particules de $SrCO_3$ dans le ciment est hétérogène, comme observé par MEB. Ces études préliminaires mériteraient donc d'être complétées afin d'obtenir des résultats statistiques.

En ce qui concerne les ciments où le strontium est introduit en phase liquide, l'écart entre la quantité de strontium mesurée dans les ciments c et d est quasiment de deux et les rapports Sr/Ca expérimentaux sont très proches des rapports théoriques. Ces résultats confirment la bonne dispersion du strontium dans le ciment lorsqu'il est introduit via la phase liquide.

4. Conclusions

Nous avons préparé des ciments contenant du strontium selon deux stratégies différentes : la première consiste à ajouter du $SrCO_3$ à la phase solide tandis que la seconde consiste à dissoudre du $SrCl_2,6H_2O$ dans la phase liquide. Qu'il s'agisse du ciment $CaCO_3$-CaP ou $CaCO_3$, les ciments ont pris et ont été caractérisés dans les deux cas.

Lorsque du carbonate de strontium est ajouté à la phase solide non co-broyée, il ne participe pas à la réaction de prise et ses particules se retrouvent piégées dans le ciment final. Les conséquences sont multiples : d'une part le strontium est dispersé de manière hétérogène dans le ciment, d'autre part on obtient un ciment multiphasé aux propriétés mécaniques affaiblies car les interfaces entre les particules de $SrCO_3$ et la matrice de ciment sont autant de zones d'amorce d'éventuelles fissures.

L'étude réalisée sur le ciment $CaCO_3$-CaP montre que le co-broyage de la phase solide contenant du carbonate de strontium permet de pallier ces problèmes, en assurant une dispersion homogène du strontium, une opacité aux rayons X améliorée tout en conservant de bonnes propriétés d'injectabilité et mécaniques.

Lorsque du chlorure de strontium est dissout dans la phase liquide des ciments, le strontium participe à la réaction de prise et se substitue aux ions calcium dans la phase majoritaire (apatite ou aragonite). En conséquence, il est parfaitement dispersé dans le ciment et assure l'opacité des ciments aux rayons X.
Par ailleurs, l'acidité des phases liquides contenant du strontium provoque une décarbonatation partielle des ciments et crée une nouvelle porosité au sein de la structure.

La libération du strontium en milieu aqueux a été étudiée pour les ciments $CaCO_3$-CaP. Quelle que soit la voie d'introduction du strontium choisie, la libération se fait de manière lente et prolongée (moins de 25% de Sr libéré en trois semaines).

Des tests cellulaires avec des cellules HOP ont démontré l'influence positive du strontium sur la prolifération de cellules pré-ostéoblastes. Alors que le ciment de référence (sans strontium), est un bon support pour la prolifération et la différentiation cellulaire, le ciment où le

strontium est introduit via la phase liquide donne des résultats moins satisfaisants. Le ciment contenant du strontium introduit via la phase solide co-broyée se révèle être quant à lui un excellent candidat.

D'un point de vue pratique, la quantité de strontium à ajouter dans le ciment $CaCO_3$-CaP pour qu'il soit radio-opaque en regard de la norme en vigueur a été déterminée : elle est de 7,9 % massique de strontium dans la phase solide co-broyée. L'étude en culture cellulaire a montré que cette formulation confère un potentiel ostéogénique très intéressant au ciment.

CHAPITRE V :

ETUDE DE L'INFLUENCE DES IONS PHOSPHATE SUR LA REACTION DE PRISE DU CIMENT $CaCO_3$

Chapitre V :
Étude de l'influence des ions phosphate sur la réaction de prise du ciment $CaCO_3$

Ce chapitre concerne une étude *in-vitro* à caractère fondamental visant à mieux appréhender l'effet des ions phosphate, naturellement présents dans les fluides biologiques, sur la réaction de prise du ciment uniquement à base de $CaCO_3$. En effet, l'étude préliminaire *in-vivo*, réalisée chez le rat en collaboration avec la faculté de chirurgie dentaire de Toulouse a montré que, dans ces conditions, la réaction de prise de ce ciment n'est pas complète [Chatainier, 2007]. Il est donc nécessaire de comprendre pourquoi elle n'est pas complète, afin de proposer une solution adaptée à ce problème.
Après avoir posé la problématique à résoudre au cours de cette étude, des généralités sur la cristallisation en solution seront présentées. La méthodologie ainsi que les résultats de cette étude expérimentale seront ensuite détaillés et enfin discutés.

1. Contexte et problématique de l'étude

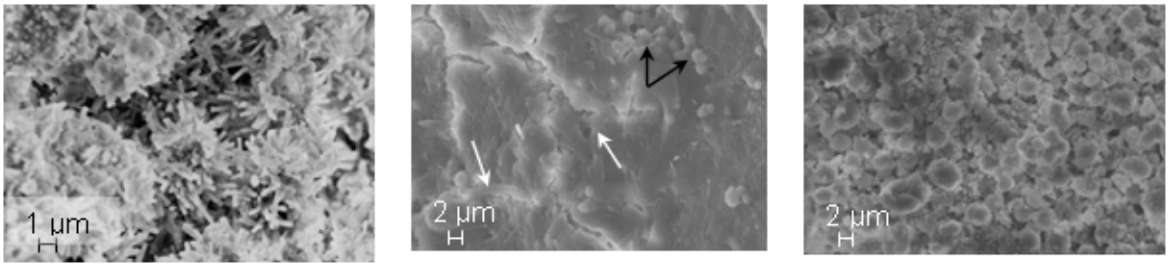
1.1. Résultats des essais in-vivo

Dans le cadre d'une collaboration initiée en 2006 avec le laboratoire du Pr G. Brunel de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Toulouse, nous avons participé aux premiers essais d'implantation chez le rat des deux types de ciment ($CaCO_3$-CaP et $CaCO_3$). Le protocole d'implantation et les résultats obtenus sont décrits en détail dans le mémoire de thèse de S. Chatainier [Chatainier, 2007].

Les poudres réactives constitutives de la phase solide ont été préparées selon les protocoles décrits dans le chapitre II puis stérilisées par rayonnement γ. Les ciments ont été gâchés avec de l'eau stérile. Une partie de la pâte ainsi préparée a été introduite dans l'une des deux cavités osseuses formées au niveau de la calvaria des rats (pour chaque animal, deux trépanations ont été réalisées : une cavité témoin et une cavité comblée à l'aide de l'un des

deux ciments testés). Le reste de pâte a été mis de côté et placé à l'étuve à 37°C dans les conditions de prise habituelles, pour comparaison. Au bout d'une semaine, des explants ont été recueillis afin de procéder notamment à des analyses physico-chimiques.

La figure V-1 présente les clichés de microscopie électronique à balayage du même échantillon de ciment $CaCO_3$ qui a été soit placé *in-vitro* dans l'étuve à 37°C soit implanté *in-vivo* chez le rat.



a). *in-vitro* à l'étuve à 37°C b). *in-vivo* chez le rat n°1 c). *in-vivo* chez le rat n°2

Figure V-1 : Cliché MEB du même échantillon de ciment $CaCO_3$, après une semaine d'évolution dans différentes conditions.

In-vitro, la réaction de prise s'est déroulée comme prévue (cf. chapitre III) : le processus de dissolution-reprécipitation du carbonate de calcium amorphe et de la vatérite constituant la phase solide du ciment a conduit à la formation d'un réseau cohésif d'aiguilles d'aragonite enchevêtrées nettement visibles sur la figure V-1-a.
In-vivo, le premier explant (figure V-1-b) présente une surface très différente, où très peu de particules aciculaires (pointées par les flèches blanches) sont observables. On distingue également quelques particules sphériques (pointées par les flèches noires) de taille similaire à celle des particules de vatérite sous forme de lentilles qui sont présentes initialement dans la phase solide du ciment. Sur le cliché du deuxième explant (figure V-1-c) aucune aiguille n'est observable et on ne retrouve que des lentilles de vatérite qui n'ont pas ou très peu réagi et qui ne paraissent pas présenter de cohésion les unes avec les autres. Dans les deux cas, il semble que la réaction de prise du ciment $CaCO_3$ et donc la cristallisation de l'aragonite n'ait pas eu lieu, ou bien seulement de manière incomplète.

Nous nous sommes donc attachés à comprendre pourquoi le ciment n'a pas pris *in-vivo* afin de proposer une solution à ce problème.

Les fluides biologiques contiennent de nombreux composés (ions minéraux, protéines,..) susceptibles d'interagir avec les carbonates de calcium lors de leur dissolution et/ou de leur re-précipitation. Parmi ces différents constituants, les ions phosphate, connus pour inhiber la cristallisation du $CaCO_3$, sont présents à une concentration de 1,0 $mmol.L^{-1}$ dans le plasma sanguin.

1.2. Influence des ions phosphate sur la cristallisation du carbonate de calcium

Bachra et coll. [1963] ont étudié la précipitation de phosphates et de carbonates de calcium dans des conditions physiologiques (concentrations en ions calcium, phosphate et bicarbonate, force ionique, pH et température). Des concentrations très faibles de phosphates inhibent la précipitation de $CaCO_3$, et particulièrement de calcite. En effet, les ions carbonate et phosphate sont en compétition pour complexer les ions calcium disponibles à la surface des solides. De manière analogue, la présence de carbonates gêne la cristallisation des phosphates de calcium.

Katsifaras et Spanos [1999] ont étudié la précipitation de la vatérite en solution en présence d'une faible concentration en ions phosphate (de 1.10^{-8} à 5.10^{-8} $mol.L^{-1}$). Les ions s'adsorbent sur les sites cationiques et la précipitation de la vatérite est inhibée par deux processus : la période d'induction précédant la précipitation est prolongée et la vitesse de croissance est diminuée. De plus, les auteurs ont également montré que la présence de phosphates ne modifie pas le mécanisme de transformation de la vatérite en calcite mais que cette transformation est retardée : les groupements phosphates, adsorbés en surface du $CaCO_3$, retardent la dissolution de la vatérite et bloquent la croissance de la calcite.

L'étude de la cinétique de dissolution de la vatérite, de l'aragonite et de la calcite en présence de phosphates a montré que les germes de carbonate de calcium adsorbent une partie du phosphate en solution, vraisemblablement par complexation avec les ions Ca^{2+} du réseau. La dissolution des sels de carbonate est contrôlée par un procédé de diffusion en surface, et est donc gênée par l'adsorption des ions phosphate sur les sites actifs [Sabbides et Koutsoukos, 1996].

Akhtar et coll. [2006] ont quant à eux étudié l'influence des ions phosphate sur la stabilité du carbonate de calcium amorphe. Ils ont montré que la présence de phosphate empêche la cristallisation du CCA en calcite.

A notre connaissance, aucune étude spécifique sur la cristallisation de l'aragonite n'a été réalisée, que ce soit en présence ou non d'ions phosphate. Cependant, au vu des résultats bibliographiques présentés ci-dessus concernant d'autres variétés de carbonate de calcium, nous avons fait l'hypothèse que ces ions pouvaient empêcher, partiellement voire complètement, la réaction de prise du ciment $CaCO_3$.

1.3. Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude fondamentale est de modéliser l'influence des ions phosphate sur la cristallisation de l'aragonite. Cela permettra de vérifier si la présence de ces ions dans les fluides biologiques, est l'un des facteurs responsables de la non-prise du ciment *in-vivo*. Cette étude devrait également permettre d'expliquer les mécanismes impliqués dans l'éventuelle inhibition de la cristallisation de l'aragonite.
Pour cela, nous avons utilisé la méthode de croissance cristalline à composition constante (C4) qui permet d'étudier les mécanismes de cristallisation en solution. Notons que la pâte du ciment dans laquelle se déroule la réaction de prise est un milieu très concentré en ions ; la précipitation en solution à l'aide de la méthode C4 constitue donc un modèle.

Cette étude a été initiée et en partie réalisée lors d'un séjour de deux mois que j'ai effectué en 2009 dans le laboratoire du Pr P.G. Koutsoukos (Laboratory of Inorganic and Analytical Chemistry, Department of Chemical Engineering, University of Patras, Grèce) avec qui nous avons collaboré.

2. Généralités sur la cristallisation en solution

Dans le cadre de notre étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux différentes étapes clés d'un processus de cristallisation en solution, à savoir l'obtention d'une solution sursaturée, la formation de germes stables également appelée germination et enfin le

développement de ces germes correspondant à la croissance cristalline. La description de ces trois étapes est l'objet du paragraphe suivant.

Notons qu'il est nécessaire de distinguer le point de vue cinétique du point de vue thermodynamique (précipitation du composé le plus stable).

2.1. La sursaturation

Une solution est dite sursaturée vis-à-vis d'un composé donné si la concentration des constituants de ce composé au sein de la solution est supérieure à leur solubilité. Le diagramme de solubilité présenté sur la figure V-2 traduit les variations de concentration du soluté en fonction du pH ; trois zones distinctes y apparaissent :

- la **zone stable** ou sous-saturée : la concentration en sel est trop faible pour donner lieu à une précipitation car le produit de solubilité n'est pas atteint : des cristaux placés dans ce type de solution se dissolvent.
- la **zone métastable** : la solution est sursaturée mais elle reste homogène pendant un temps considéré comme infini par rapport à la durée de nos expériences. Si on place un cristal du sel correspondant dans ce type de solution, il peut croître.
- la **zone instable** ou labile : la solution reste homogène pendant une durée relativement courte, puis la précipitation commence spontanément.

La connaissance des isothermes de solubilité est donc indispensable pour la mise au point des expériences de cristallisation du sel étudié.

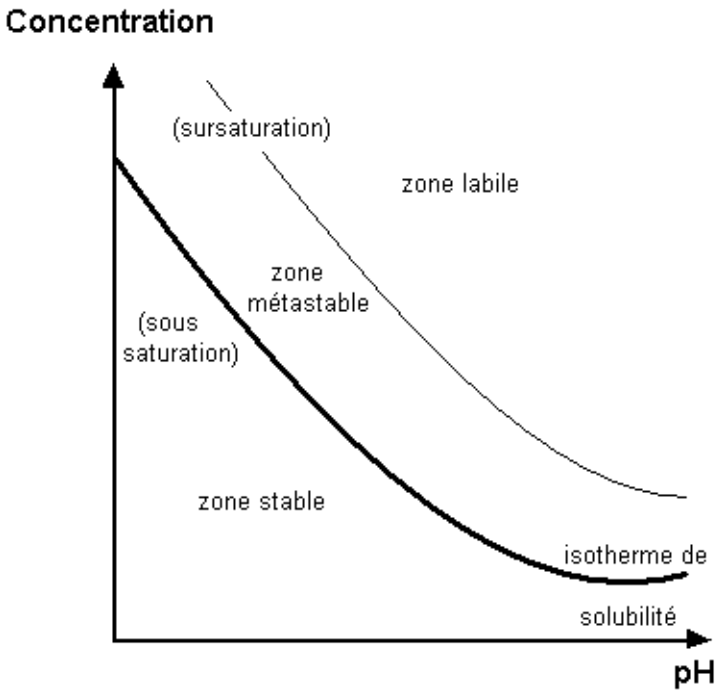


Figure V-2 : Diagramme de solubilité d'un sel en fonction du pH à température constante.

La sursaturation correspond à la force motrice qui conduit à la précipitation des cristaux. On définit notamment la sursaturation relative, notée σ par l'équation suivante :

$$\sigma = \frac{C - C_s}{C_s} \qquad \text{(éq. V-1)}$$

où C est la concentration dans la solution

C_s est la concentration à saturation

2.2. La nucléation

Lorsque les conditions de sursaturation du sel sont réunies, le processus de germination (ou nucléation) peut avoir lieu. Des germes de cristaux se forment alors.

On distingue généralement la nucléation primaire de la nucléation secondaire : la nucléation primaire concerne la précipitation de germes en l'absence de semences dans la solution. En absence d'interface solide, elle est spontanée et dite homogène. Elle est hétérogène si elle est induite par la présence de corps étrangers (impuretés ou poussières en solution, parois du

réacteur ou du dispositif d'agitation,…). Dans le cas d'une solution à sursaturation élevée, la nucléation homogène reste le phénomène prépondérant.
La nucléation secondaire est induite par la présence de cristaux de même composition (germes) dans la solution ; l'interaction cristaux – solution sursaturée permet la formation de nouveaux germes, dits « secondaires ».

2.2.1. La nucléation primaire

Par analogie avec la formation de gouttelettes de liquide à partir d'une vapeur sous-refroidie, les théories relatives à la nucléation primaire supposent que, dans la solution sursaturée, les unités de soluté se combinent par une série de réactions bimoléculaires pour produire des agrégats ordonnés ou embryons de différentes tailles. Deux processus s'opposent, l'un conduisant à l'agglomération et l'autre à la dispersion de ces agrégats. Par conséquent, il existe un équilibre dynamique de répartition de la taille des agrégats. Ce phénomène va se produire jusqu'à atteindre une taille de germe dite critique, à partir de laquelle la croissance du cristal sera énergétiquement favorisée.

2.2.2. La nucléation secondaire

La sursaturation de la solution, la vitesse d'agitation, la forme du réacteur, la masse et la forme des cristaux en suspension influencent la nucléation secondaire.

2.3. La croissance cristalline

Lorsque des germes ont atteint la taille critique, l'étape de croissance cristalline succède à l'étape de germination. On distingue alors plusieurs étapes clés dans le cheminement du processus de croissance :

- le transfert des ions hydratés vers la surface du cristal,
- l'adsorption puis la déshydratation de ces ions à la surface,
- la migration des ions adsorbés vers les sites énergétiquement favorable à la croissance,

- l'incorporation de ces ions dans ces sites.

Chacune de ces étapes peut être prépondérante vis-à-vis d'une autre pour déterminer la vitesse de croissance du cristal. Les paramètres de croissance changent avec les modifications de température ou de sursaturation.

2.4. La méthode de croissance cristalline à composition constante

La méthode de Croissance Cristalline à Composition Constante (C4) a été utilisée pour cette étude fondamentale sur la cristallisation de l'aragonite. Elle permet de garder la composition de la solution de travail constante tout au long de l'expérience. Il est alors possible de s'affranchir des variations de sursaturation, de pH et de force ionique des méthodes classiques de précipitation en solution et de déterminer de manière plus précise les vitesses de croissance des cristaux. Cette partie du chapitre s'attache à détailler le principe et l'appareillage de cette méthode, ainsi que les conditions opératoires choisies pour la suite de l'étude.

2.4.1. Principe de la méthode

La technique de croissance cristalline à composition constante permet d'étudier la nucléation et la croissance cristalline d'un composé à partir d'une solution métastable sursaturée pour laquelle le pH, la température et la composition (sursaturation, force ionique) sont maintenus constants tout au long de l'expérience. Ceci est réalisé grâce au contrôle de l'ajout de solutions titrantes permettant de compenser exactement les quantités d'ions consommées lors de la cristallisation du composé dans le réacteur. Ces conditions permettent de modéliser à partir d'un système très simplifié les conditions qui existent *in-vivo* (stabilité du pH, de la température et de la composition ionique du plasma sanguin).

La précipitation de nombreux composés s'accompagne d'une variation de pH qui peut être facilement détectée à l'aide d'un pH-mètre. Par exemple, la précipitation ou cristallisation d'un carbonate de calcium va libérer des ions H_3O^+ en solution, selon l'équation suivante :

$$HCO_3^- + H_2O \rightarrow CO_3^{2-} + H_3O^+ \qquad \text{(éq. V-2)}$$

Les ions carbonate présents en solution se trouvent en effet principalement sous forme de HCO_3^-. Ainsi, lorsque l'aragonite cristallise et consomme des ions CO_3^{2-}, cela provoque l'augmentation de la concentration en ions H_3O^+ et donc la diminution du pH de la solution de travail. La détection d'un changement de pH aussi petit que 0,003 unité pH entraîne l'ajout de deux solutions titrantes (une solution cationique et une anionique) dont les concentrations ont été calculées de façon à ce que leur ajout simultané compense exactement la quantité de cations (calcium) et d'anions (carbonate) précipités lors de la cristallisation du $CaCO_3$ (dans notre cas l'aragonite).
Les concentrations des ions dans la solution de travail comme dans les solutions titrantes ont été calculées en tenant compte des différents équilibres ioniques présentés dans l'annexe F et des équations présentées dans l'annexe G.

2.4.2. Appareillage

La technique de la C4 est basée sur des mesures précises de pH et nécessite un matériel à la fois sensible et précis.

Le montage expérimental est schématisé sur la figure V-3. Il comprend un réacteur à double paroi thermostaté par une circulation d'eau à 37°C (correspondant à la température physiologique), un pH-mètre, un impulsomètre, deux burettes titrantes couplées électroniquement et une interface permettant d'enregistrer les mesures de pH et de volume d'ajout des solutions titrantes.
La solution de travail, sursaturée vis-à-vis de l'aragonite, est placée sous agitation magnétique faible et un bullage d'argon est mis en place pour éviter la décarbonatation de la solution. De plus, le volume d'air au-dessus de la solution est minimisé et le réacteur est bouché le plus hermétiquement possible. Ce dispositif nous permet de ne pas prendre en compte l'équilibre entre les ions carbonate en solution et le CO_2 de l'air environnant : la concentration d'ions carbonate dans la solution de travail est ainsi maintenue constante.
Afin de rendre plus claire la figure V-3, le bouchon du réacteur n'a pas été représenté.

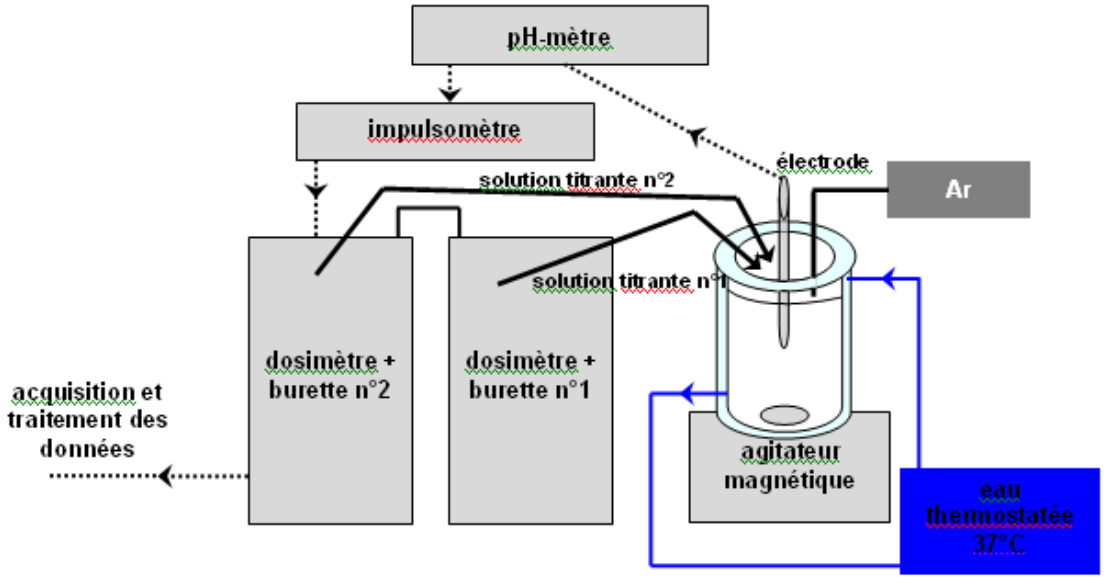


Figure V-3 : Schéma de l'appareillage de la C4.

2.4.3. Choix des conditions opératoires

Comme nous l'avons vu, la technique de croissance cristalline à composition constante est très sensible. Il est donc nécessaire de choisir soigneusement les conditions opératoires pour modéliser le plus fidèlement possible la prise du ciment $CaCO_3$ *in-vivo*.

La température expérimentale a donc été fixée à **37°C.**

Afin de choisir le pH de l'étude, la mesure du pH dans la pâte du ciment a été réalisée au cours de sa réaction de prise. Un échantillon de ciment a été préparé en suivant le protocole habituel. Après gâchage, le ciment a été inséré dans un moule dans lequel une électrode de pH de pénétration, adaptée aux formes semi-solides, a été plongée. L'ensemble du système a été mis dans une étuve à humidité contrôlée afin d'assurer la prise du ciment à 37°C et en atmosphère saturée d'humidité. La figure V-4 présente l'évolution du pH mesuré dans ces conditions en fonction du temps.

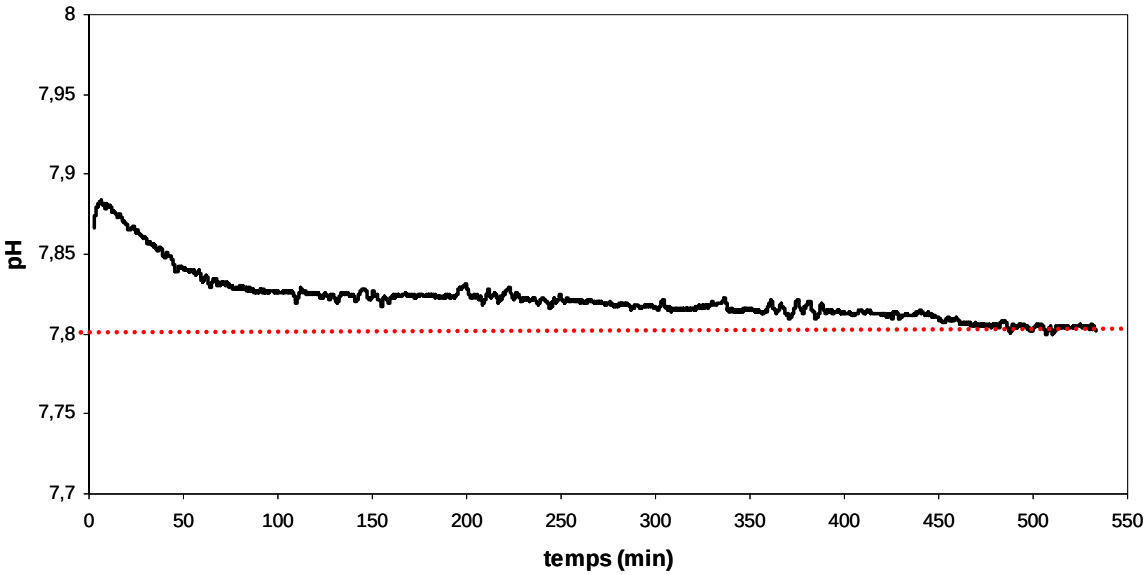


Figure V-4 : Évolution du pH à l'intérieur de la pâte du ciment $CaCO_3$ pendant sa prise.

Lors de la réaction de prise du ciment, le pH évolue peu et se stabilise après 50 minutes autour de **7,80**. Il est intéressant de noter que, contrairement aux ciments phosphocalciques très largement étudiés et actuellement sur le marché, le pH du ciment $CaCO_3$ reste stable et proche du pH physiologique (7,4) tout au long de la prise. Ces conditions sont particulièrement intéressantes et favorables en vue d'éviter ou de limiter les risques d'inflammation des tissus environnants lors de la prise du ciment *in-vivo*.
Par ailleurs, le suivi de la réaction de prise par spectroscopie infrarouge (cf. chapitre III, figure III-17) a montré qu'après une heure, la réaction de prise était à peine commencée. C'est donc un pH égal à 7,8 qui a été choisi pour les essais de croissance cristalline à composition constante de l'aragonite.

La force ionique de la solution de travail est également un facteur important qui peut influencer la cristallisation de l'aragonite. Nous avons donc fait le choix de travailler à la force ionique des fluides biologiques, c'est-à-dire : 0,15 $mol.L^{-1}$. Afin d'atteindre cette force ionique, du chlorure de sodium a été dissout dans la solution de travail.

Par ailleurs, tous les équilibres en solutions, ainsi que les phases solides susceptibles de se former ont été répertoriés dans l'annexe F. Celle-ci détaille également les constantes qui ont permis de calculer la force motrice pour la formation de ces phases à l'aide du logiciel MINEQL®.

En particulier, les constantes de solubilité des composés de carbonate de calcium ont été calculées à 37°C d'après les travaux de Plummer et Busenberg [1982] et sont répertoriées dans le tableau V-1 :

Tableau V-1 : Constantes de solubilité à 37°C des trois principales variétés cristallisées du $CaCO_3$

phase	**log $K_{37°C}$**
calcite	- 8,56
aragonite	- 8,42
vatérite	- 8,02

La calcite est un composé plus stable que l'aragonite. Autrement dit, la solution de travail qui sera sursaturée vis-à-vis de l'aragonite le sera également vis-à-vis de la calcite. Cependant, nous allons introduire dans cette solution des germes d'aragonite synthétisés au laboratoire qui favoriseront la germination et la croissance cristalline de ce composé. On peut donc considérer que la précipitation d'aragonite sera favorisée d'un point de vue cinétique.

3. Étude expérimentale

La mise en œuvre de la technique C4 nécessite la préparation de la solution de travail (dans le réacteur), des solutions titrantes (cationique et anionique) et des cristaux d'aragonite qui vont nous servir à ensemencer la solution de travail et nous permettre d'étudier la cristallisation homogène de l'aragonite. Toutes ces préparations sont détaillées dans la partie suivante.

3.1. Synthèse et caractérisations de l'aragonite – $CaCO_3$

Ce paragraphe décrit le protocole de synthèse et les caractérisations physico-chimiques de l'aragonite qui sera introduite dans le réacteur en tant que semences pour favoriser la cristallisation de l'aragonite que nous souhaitons étudier à l'aide de la technique C4.

L'aragonite étant un polymorphe métastable du $CaCO_3$, il est nécessaire de prendre des précautions lors de sa synthèse. Elle est préparée par double décomposition (précipitation) de deux solutions (cationique et anionique) à 100°C ; il a en effet été montré qu'une température élevée favorise la précipitation d'aragonite [Tai et Chen, 1998 ; Hu et Deng, 2004 ; Chen et Xiang, 2009].

Dans le tableau V-2 sont indiquées les compositions des solutions A et B, préparées pour synthétiser l'aragonite.

Tableau V-2 : Composition des solutions cationique et anionique pour la synthèse de l'aragonite

solutions	**ions d'intérêt**	**préparation des solutions**
A	calcium	5.10^{-2} moles de $CaCl_2$, $2H_2O$ dans 500 mL d'eau désionisée
B	carbonate	5.10^{-2} moles de Na_2CO_3, 10 H_2O + 5.10^{-4} moles de $SrCO_3$ dans 500 mL d'eau désionisée

Le strontium est ajouté à la solution B pour favoriser la précipitation d'aragonite plutôt que de la calcite [Astilleros et coll., 2003 ; Lucas-Girot et coll., 2007]. Notons que la présence de strontium dans les germes d'aragonite pourrait affecter la cinétique de croissance lors de l'essai de C4. Étant donné la faible proportion de strontium vis-à-vis du calcium, nous considérerons son influence comme nulle dans la suite de l'étude.

Les solutions A et B sont chauffées séparément à 100°C puis la solution A est versée lentement dans la solution B. Le mélange est maintenu à 100°C et sous agitation pendant cinq minutes supplémentaires puis filtré sur Büchner, lavé avec 1 L d'eau désionisée. Le précipité obtenu est lyophilisé afin de retirer la totalité de l'eau et éviter toute évolution du produit. Ce protocole permet de synthétiser environ 4 grammes d'aragonite qui se présente sous forme d'une poudre blanche.

L'aragonite ainsi synthétisée est pure et bien cristallisée, comme le prouve le diffractogramme de rayons X (figure V-5). L'observation par microscope électronique à balayage (figure V-6) montre qu'elle cristallise sous forme d'aiguilles irrégulières.

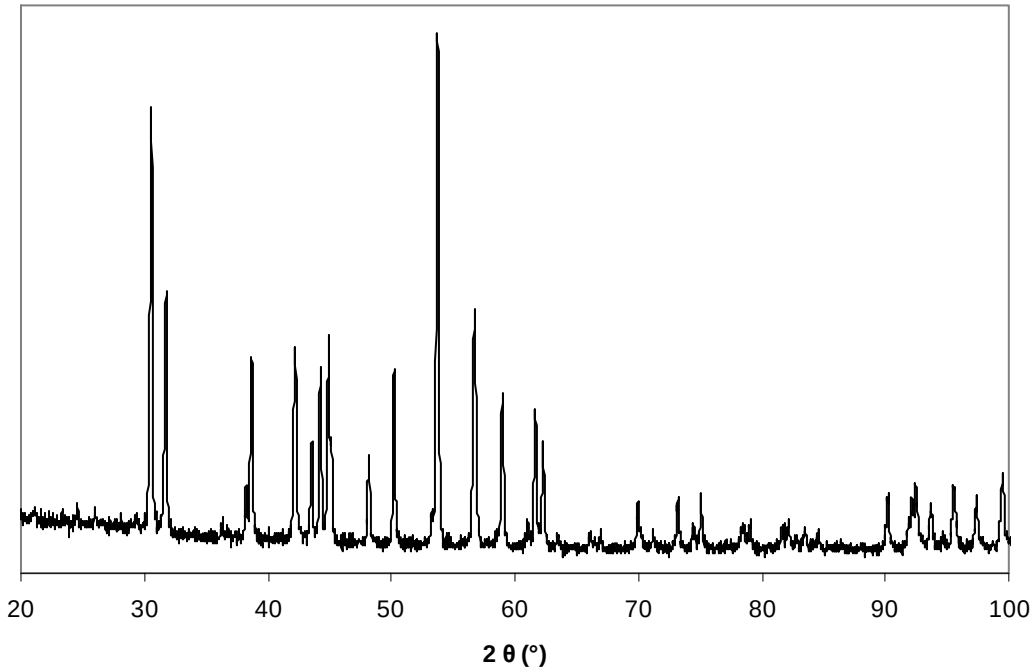


Figure V-5 : Diffractogramme de rayons X de l'aragonite synthétisée.

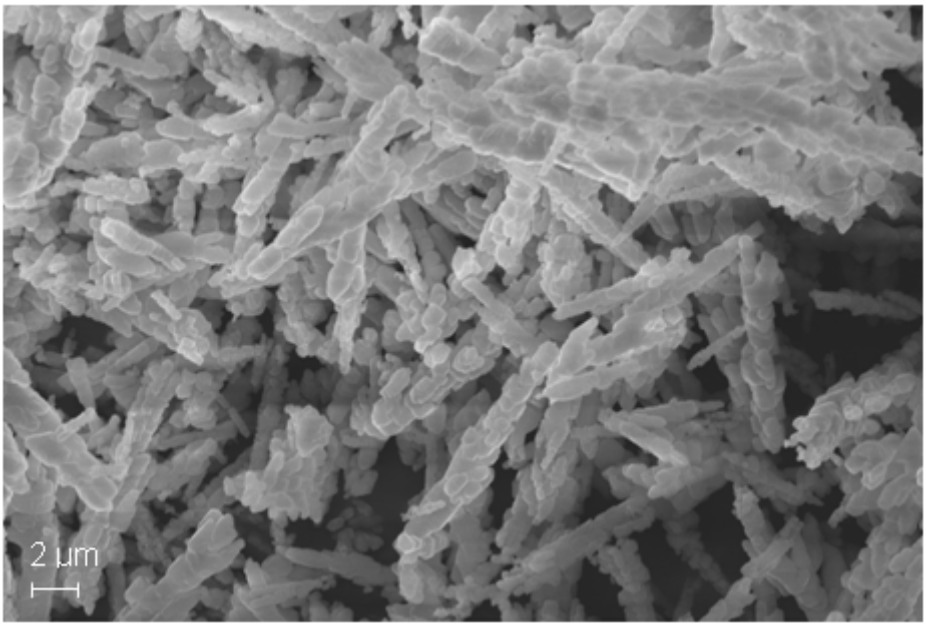


Figure V-6 : Cliché MEB de l'aragonite synthétisée.

De plus, des mesures de la surface spécifique des cristaux ont été réalisées par la méthode BET. La mesure de la surface spécifique est nécessaire car l'aire de la surface de contact des semences avec la solution sursaturée est un paramètre déterminant pour la vitesse de cristallisation. L'aragonite synthétisée a une surface spécifique de 3,05 m^2/g (moyenne sur trois mesures).

3.2. Préparation des solutions de travail et titrantes

Toutes les solutions utilisées dans le cadre de cette étude sont filtrées sur des filtres millipores (le diamètre des pores est de 0,45 μm) afin d'éliminer toute particule solide ou poussière qui pourrait jouer le rôle de germes pour la cristallisation (hétérogène) de l'aragonite.

La solution de travail, de 200 ml, est sursaturée et donc métastable. Par conséquent, deux solutions sont préparées : l'une cationique (contenant le calcium), l'autre anionique (contenant le carbonate) et elles ne sont mélangées qu'au dernier moment. Une fois homogénéisées, elles constituent la solution de travail, que l'on ajuste à un pH = 7,8 grâce à l'addition d'acide chlorhydrique. Ensuite les germes d'aragonite sont versés dans la solution au temps t = 0 et la cristallisation débute.

Les solutions titrantes doivent compenser la perte d'ions calcium et carbonate consommés lors de la croissance de l'aragonite, ainsi que le pH et la force ionique. Elles sont très concentrées. Pour éviter la précipitation spontanée du $CaCO_3$, deux solutions sont préparées, dont les concentrations sont régies par les équations données dans l'annexe G. Les solutions sont ajoutées séparément à l'aide de deux dosimètres (cf. figure V-3).
Notons que pour les expériences menées en présence d'ions phosphate, ceux d'entre eux qui sont éventuellement consommés ne sont pas compensés.

3.3. Croissance de l'aragonite sur l'aragonite

L'étude expérimentale que nous avons menée a consisté à étudier la cristallisation de l'aragonite sur une semence d'aragonite (cristallisation homogène) à l'aide de la technique de

croissance cristalline à composition constante en présence ou non d'ions phosphate. Dans un premier temps, il est nécessaire de comprendre le mécanisme de croissance de l'aragonite en l'absence de tout additif.

3.3.1. Influence de la sursaturation sur la vitesse de croissance cristalline

Pour ces premiers essais, 20 mg de germes d'aragonite ont été introduits dans 200 ml de solution de travail sursaturée, ce qui correspond, d'après les analyses BET, à une surface totale de 0,061 m^2.

Les essais de C4 réalisés permettent de tracer l'évolution du volume d'ajout des solutions titrantes en fonction du temps, comme présenté sur la figure V-7 pour une sursaturation relative (σ) en aragonite de 1,5. L'enregistrement en continu du pH de la solution de travail (données non présentées) montre que ce dernier reste à la valeur consigne de 7,8 tout au long de l'expérience.

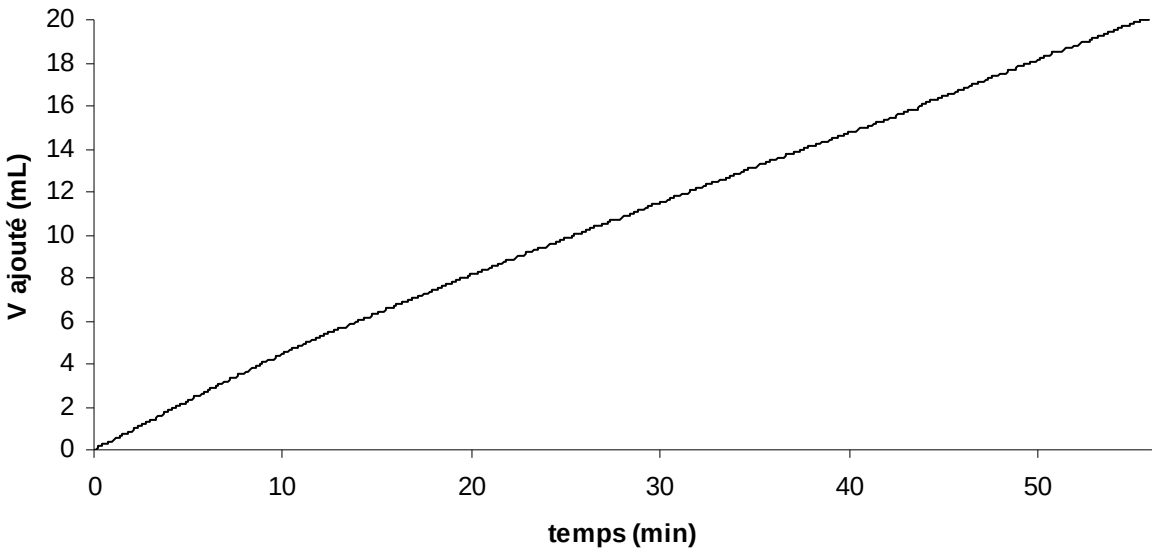


Figure V-7 : Enregistrement du volume d'ajout des solutions titrantes en fonction du temps lors de la cristallisation de l'aragonite à σ = 1,5.

Connaissant le volume ajouté et la concentration des solutions titrantes, il est possible de déterminer quelle est la quantité d'ions calcium et carbonate qui a été consommée lors de la

cristallisation de l'aragonite. Ainsi, la pente à t = 0 de la courbe présentée figure V-7 permet de calculer le taux de cristallisation initial. Le taux est normalisé par la surface des germes introduits et on obtient, dans ces conditions, un taux de $3{,}6.10^{-5}$ $g.s^{-1}.m^{-2}$.

Afin de déterminer l'influence sur le taux de cristallisation de la sursaturation de la solution par rapport à l'aragonite, la concentration en ions calcium dans la solution de travail a été modifiée. Nous avons ainsi étudié la cristallisation de l'aragonite à quatre sursaturations différentes ($\sigma = 0{,}8$; $\sigma = 1{,}2$; $\sigma = 1{,}5$; $\sigma = 1{,}8$) et calculé, pour chaque sursaturation, le taux de croissance du $CaCO_3$. La figure V-8 présente l'évolution de ce paramètre en fonction de la sursaturation relative.

Nous constatons que le taux augmente de manière linéaire avec σ ($R^2 = 0{,}9943$), ce qui signifie que le mécanisme de croissance de l'aragonite est contrôlé soit par le transport de masse au sein de la solution vers la surface du cristal, soit par la diffusion de surface.

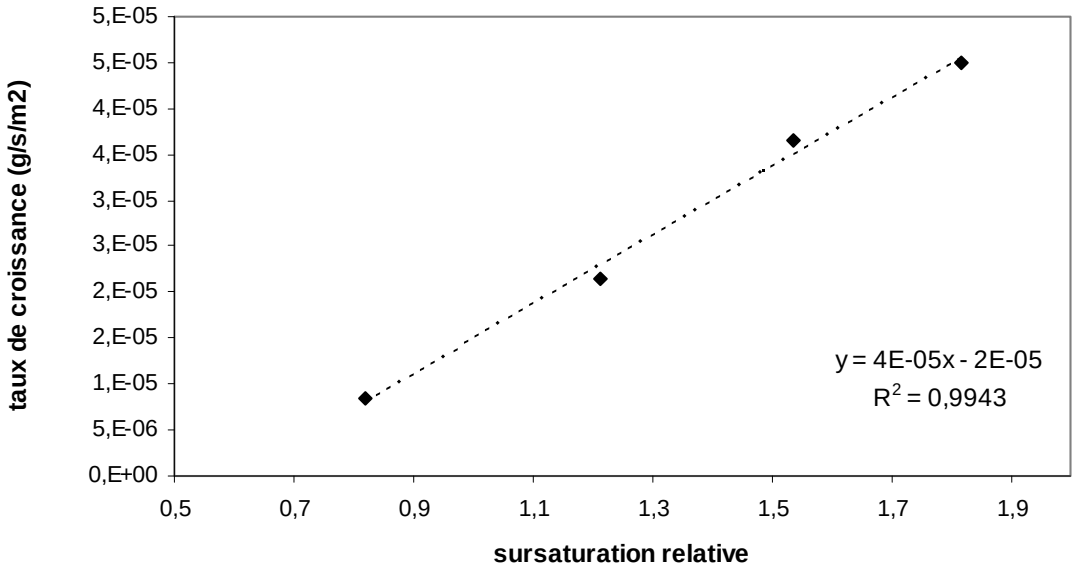


Figure V-8 : Évolution de la vitesse de croissance cristalline de l'aragonite en fonction de la sursaturation relative de la solution de travail σ.

Quelles que soient les conditions testées, nous avons systématiquement vérifié que seule l'aragonite avait cristallisé. La caractérisation du solide récupéré est présentée dans la suite du chapitre.

3.3.2. Choix d'une sursaturation et d'une masse de germes

Pour la suite de l'étude, nous avons fait le choix de travailler toujours à $\sigma = 1,5$, que ce soit en présence ou non de phosphates.

Nous avons alors fait varier la masse de germes introduites dans le réacteur, afin de vérifier que le taux de cristallisation, une fois normalisé par la surface des germes, ne varie pas avec la masse introduite (résultats non présentés). Cette étude nous a également permis de choisir, pour la suite des essais, d'introduire dans la solution de travail 40 mg de germes d'aragonite, ce qui correspond à une surface de 0,12 m^2.

Dans ces conditions, les résultats obtenus ont montré que nous avons précipitation d'un composé. Il est alors nécessaire de caractériser le précipité obtenu et de vérifier s'il s'agit bien d'aragonite.

3.3.3. Caractérisation du composé précipité

Les analyses physico-chimiques par spectroscopie d'absorption infrarouge (non présentée) et diffraction des rayons X (figure V-9) prouvent que la phase précipitée est bien de l'aragonite pure et bien cristallisée.

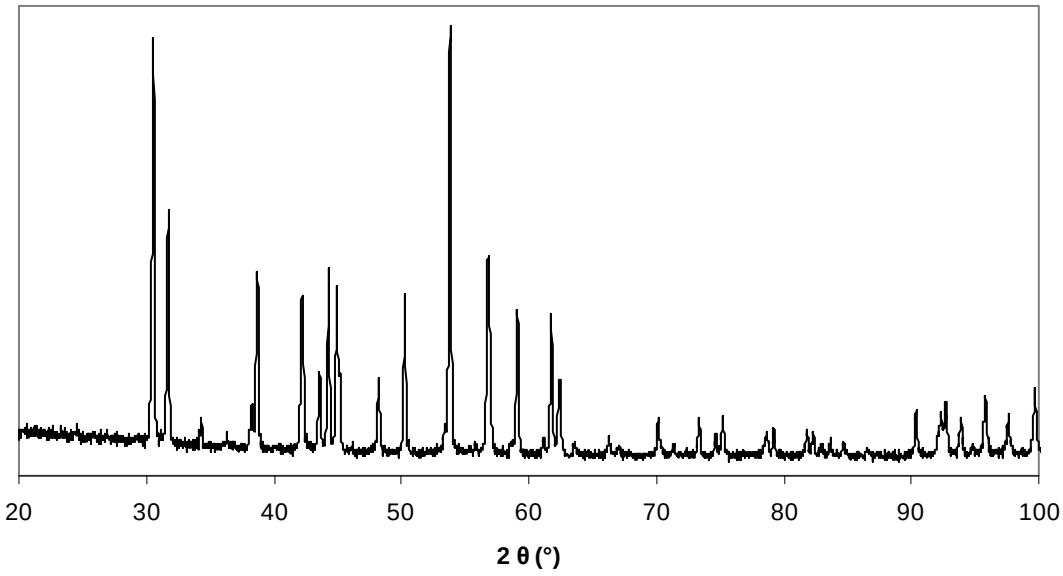


Figure V-9 : Diagramme de diffraction de rayons X du précipité récupéré après croissance cristalline à composition constante.

L'observation des cristaux par microscopie électronique à balayage (figure V-10) montre qu'il y a bien eu croissance des cristaux d'aragonite : ces derniers se sont élargis et certaines aiguilles se sont collées les unes aux autres, formant ainsi des faisceaux.

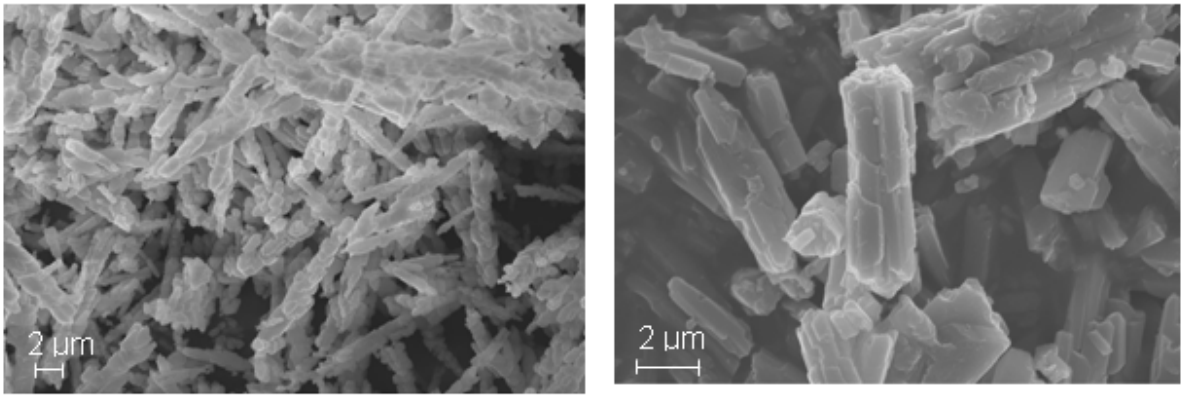


Figure V-10 : Cliché MEB des cristaux d'aragonite a). avant et b). après croissance cristalline à composition constante.

3.4. Influence des ions phosphate sur la cristallisation de l'aragonite

Afin d'étudier l'influence des ions phosphate sur la cristallisation de l'aragonite, nous avons dissous dans la solution de travail du Na_2HPO_4 à diverses concentrations comprises entre 0,25 µM et 1 mM. Cette dernière valeur correspond à la concentration en ions phosphate dans le plasma sanguin.

Cette étude a permis de mettre en évidence deux comportements en fonction de la concentration en ions phosphate dans la solution ; nous présenterons tout d'abord les résultats obtenus pour de faibles concentrations (< 8 µM), puis les résultats obtenus pour des concentrations en phosphate plus élevées (entre 8 µM et 1 mM). Dans tous les cas, nous avons vérifié notamment par spectroscopie d'absorption infrarouge que l'aragonite était bien le seul composé à avoir cristallisé.

3.4.1. Concentrations en ions phosphate < 8 µM

Les courbes d'ajout des solutions titrantes sont présentées sur la figure V-11. Lorsque la concentration des ions phosphate en solution augmente, on observe une diminution de la pente initiale, ce qui se traduit directement par une baisse du taux de croissance cristalline, reportée dans le tableau V-2. De plus, au-delà de 3 µmol.L^{-1} d'ions phosphate dans la solution de travail, nous pouvons remarquer que la croissance cristalline est précédée d'un temps d'induction τ qui correspond à la durée écoulée entre le temps initial et le début de l'ajout des solutions titrantes c'est à dire au début de la croissance cristalline.

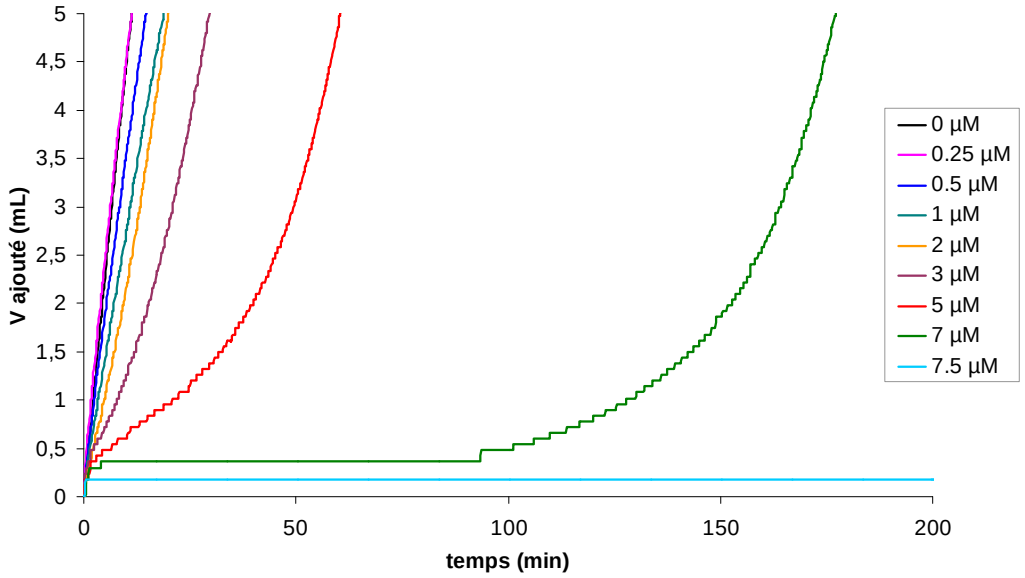


Figure V-11 : Évolution de l'allure des courbes d'ajout des solutions titrantes en fonction de la concentration en ions phosphate dans la solution de travail.

Les deux courbes obtenues à partir d'une solution de travail de référence (sans ions phosphate) ou contenant 0,25 µmol.L^{-1} d'ions phosphate sont confondues. De plus, le calcul du rapport entre les deux taux de croissance (tableau V-2) montre que l'écart de vitesse n'est pas significatif par rapport à la précision de la technique (environ 10 %).

On peut donc conclure que, dans ces conditions opératoires, les ions phosphate diminuent la vitesse de cristallisation de l'aragonite dès 0,5 µmol.L^{-1} et inhibent complètement toute croissance pour une concentration égale à 7,5 µmol.L^{-1}.

Tableau V-2 : Rapport des taux de cristallisation de l'aragonite et temps d'induction observés pour différentes concentrations en ions phosphate dans la solution de travail

$[PO_4^{3-}]$ (µM)	**0,25**	**0,5**	**1**	**2**	**3**	**5**	**7**	**7,5**
rapport $\frac{\textit{taux cristallisation}}{\textit{taux cristallisation sans } PO_4^{3-}}$	0,92	0,77	0,64	0,47	0,23	0,10	0,04	0
temps d'induction τ (secondes)	0	0	0	25	35	90	240	/

En conclusion, en présence d'une faible concentration d'ions phosphate en solution, la précipitation d'aragonite est à la fois moins rapide (diminution du taux de croissance) et retardée (prolongation de la durée d'induction correspondant au temps nécessaire pour former des germes stables).

3.4.2. Concentration en ions phosphate ≥ 8 µM

Nous avons également souhaité étudier le comportement de l'aragonite en solution en présence d'une plus grande quantité de phosphates afin de modéliser plus précisément ce qu'il est susceptible de se produire *in-vivo*.

Pour une concentration en ions phosphate supérieure à 7,5 µmol.L^{-1}, le pH de la solution n'est pas constant mais augmente dès l'introduction des semences d'aragonite dans la solution de travail. Le pH atteint ensuite un palier puis rediminue jusqu'au pH de consigne (7,8), pH à partir duquel l'ajout des solutions titrantes est commandé automatiquement. La figure V-12 présente les courbes obtenues pour une concentration en ions phosphate de 8 µmol.L^{-1}.

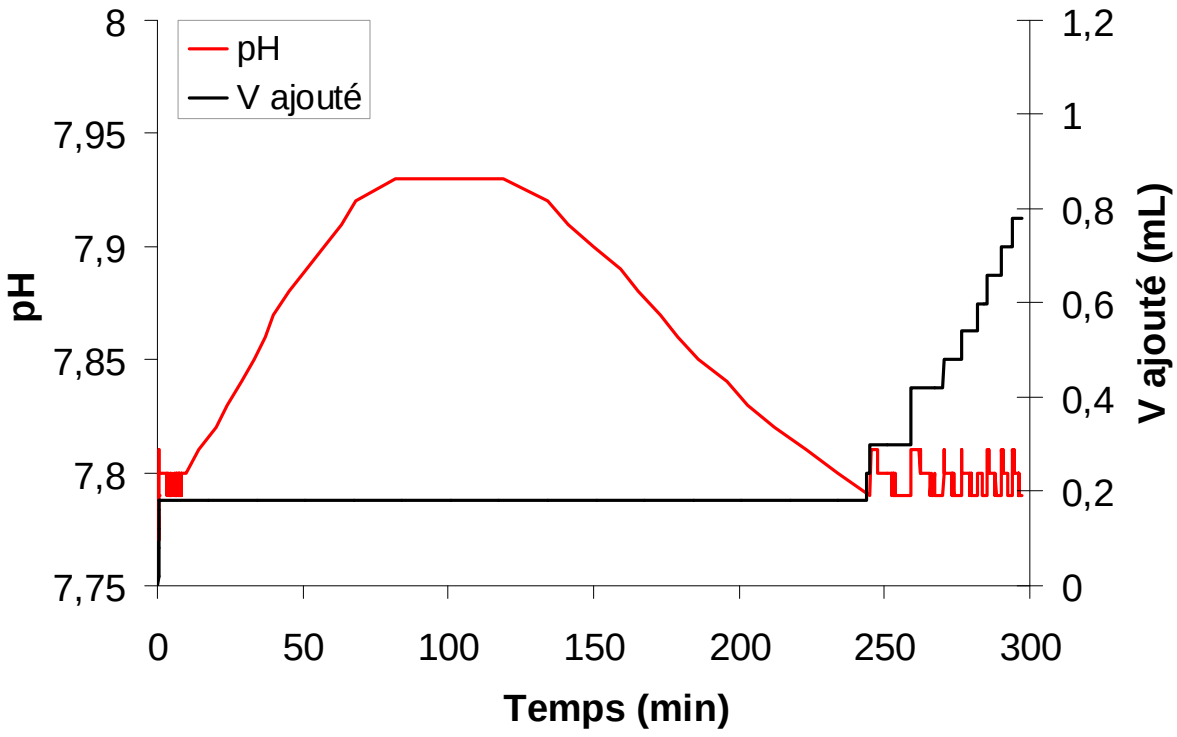


Figure V-12 : Courbes de pH et de volume de titrant ajouté pour une concentration en ions phosphate de 8 µmol.L^{-1} dans la solution de travail.

Ce comportement est observé pour toute concentration en ions phosphate supérieure ou égale à 8 µmol.L^{-1}. Par exemple, pour une concentration de 1 mmol.L^{-1}, correspondant à celle des fluides biologiques, les courbes obtenues sont présentées sur la figure V-13. De manière générale, la période pendant laquelle le pH augmente est prolongée lorsque la concentration en phosphates augmente : elle passe de 80 à 130 minutes pour des concentrations respectives de 8 µmol.L^{-1} et de 1 mmol.L^{-1}.

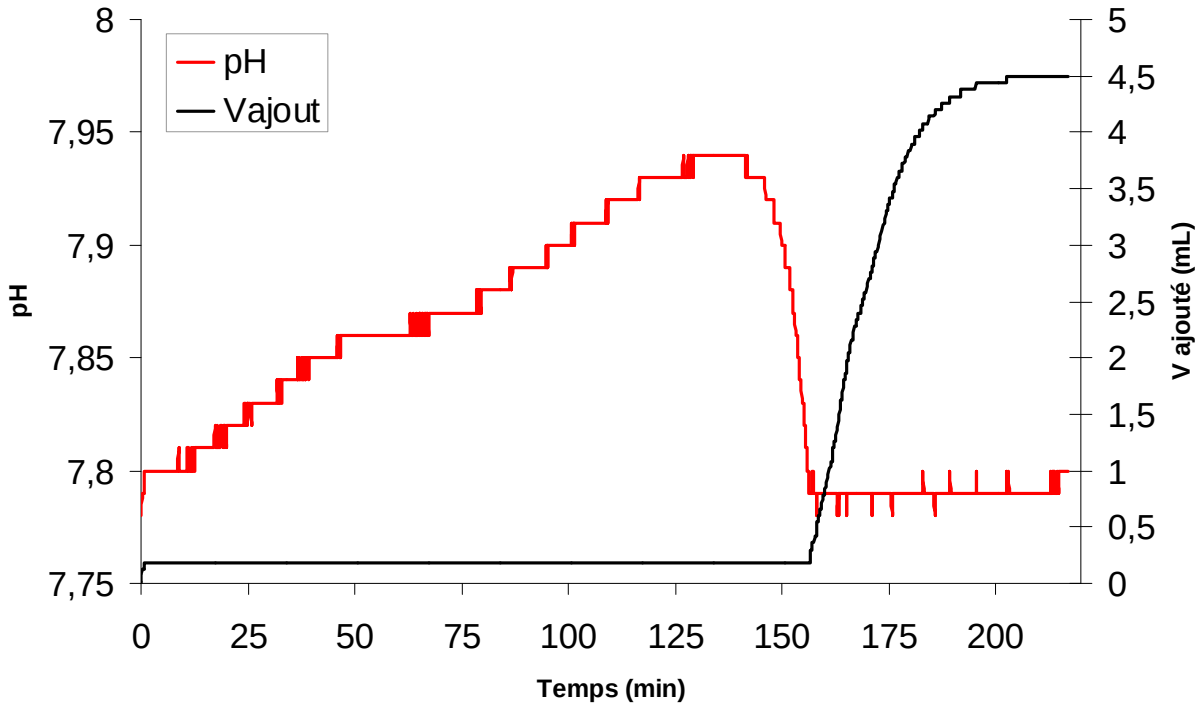


Figure V-13 : Courbes de pH et de volume ajouté pour une concentration en ions phosphate de 1 mmol.L^{-1} dans la solution de travail.

Il est délicat d'analyser ce qu'il se produit dans ces conditions. En effet l'augmentation de pH pourrait provenir d'une dissolution des germes d'aragonite introduits, auquel cas, la solution de travail n'est pas maintenue à composition constante.
Des études supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre les mécanismes mis en jeu et pourquoi on observe une montée de pH.

3.4.3. Caractérisations de l'aragonite précipitée en présence de phosphates

A la fin de l'expérience de C4, la solution de travail est filtrée, ce qui permet de récupérer le solide et d'analyser ainsi le précipité par spectroscopie infrarouge et par diffraction de rayons X (données non présentées). La figure V-14 présente les spectres d'absorption infrarouge des précipités recueillis pour diverses concentrations en ions phosphate dans la solution de travail. Jusqu'à 0,5 mmol.L^{-1} de phosphate, le solide n'est constitué que d'aragonite ; on observe sur les spectres les bandes d'absorption caractéristiques des groupements carbonate dans l'aragonite, notamment à 855, 713 et 700 cm^{-1}.

Par ailleurs, on peut remarquer la présence des bandes d'absorption caractéristiques des groupements phosphate entre 500 et 650 cm^{-1} ainsi qu'entre 950 et 1200 cm^{-1} et ce, seulement pour les essais réalisés en présence d'1 mM d'ions phosphate en solution. Il semble que la présence d'ions carbonate en grande quantité dans la solution de travail ait inhibé la précipitation d'un sel de phosphate pour des concentrations inférieures à 1mM.

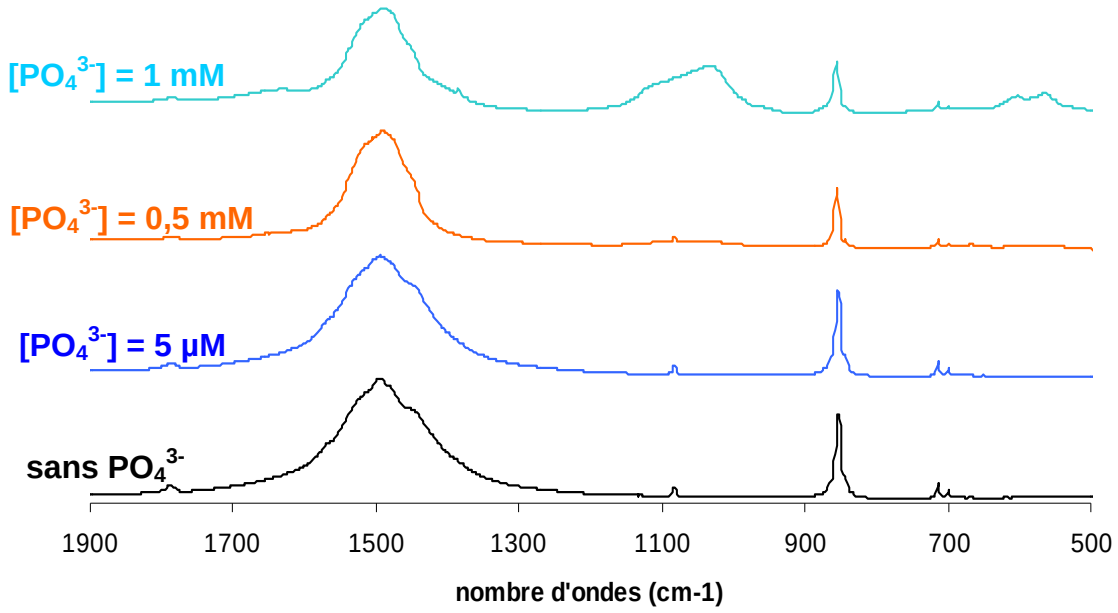


Figure V-14 : Spectres d'absorption infrarouge des précipités pour diverses concentrations en ions phosphate dans la solution de travail.

Quelle que soit la concentration d'ions phosphate ajoutée en solution, les précipités recueillis à la fin des essais de C4 ont également été observés par microscope électronique à balayage : les clichés sont présentés sur la figure V-15 et sont tout à fait cohérents avec les résultats obtenus d'un point de vue de la cinétique de cristallisation : pour de faibles concentrations en phosphate (< 7,5 µM), les aiguilles d'aragonite ont grossi et sont enchevêtrées (figure V-15-a, b, c et d). Lorsque l'on augmente la concentration en ions phosphate, les particules sont de plus en plus fragmentées ; à 7,5 µM, après près de 6 heures d'expérience, on retrouve la morphologie des particules d'aragonite introduites initialement en tant que semences. Ces dernières n'ont donc pas grossi mais ne semblent pas non plus s'être dissoutes.

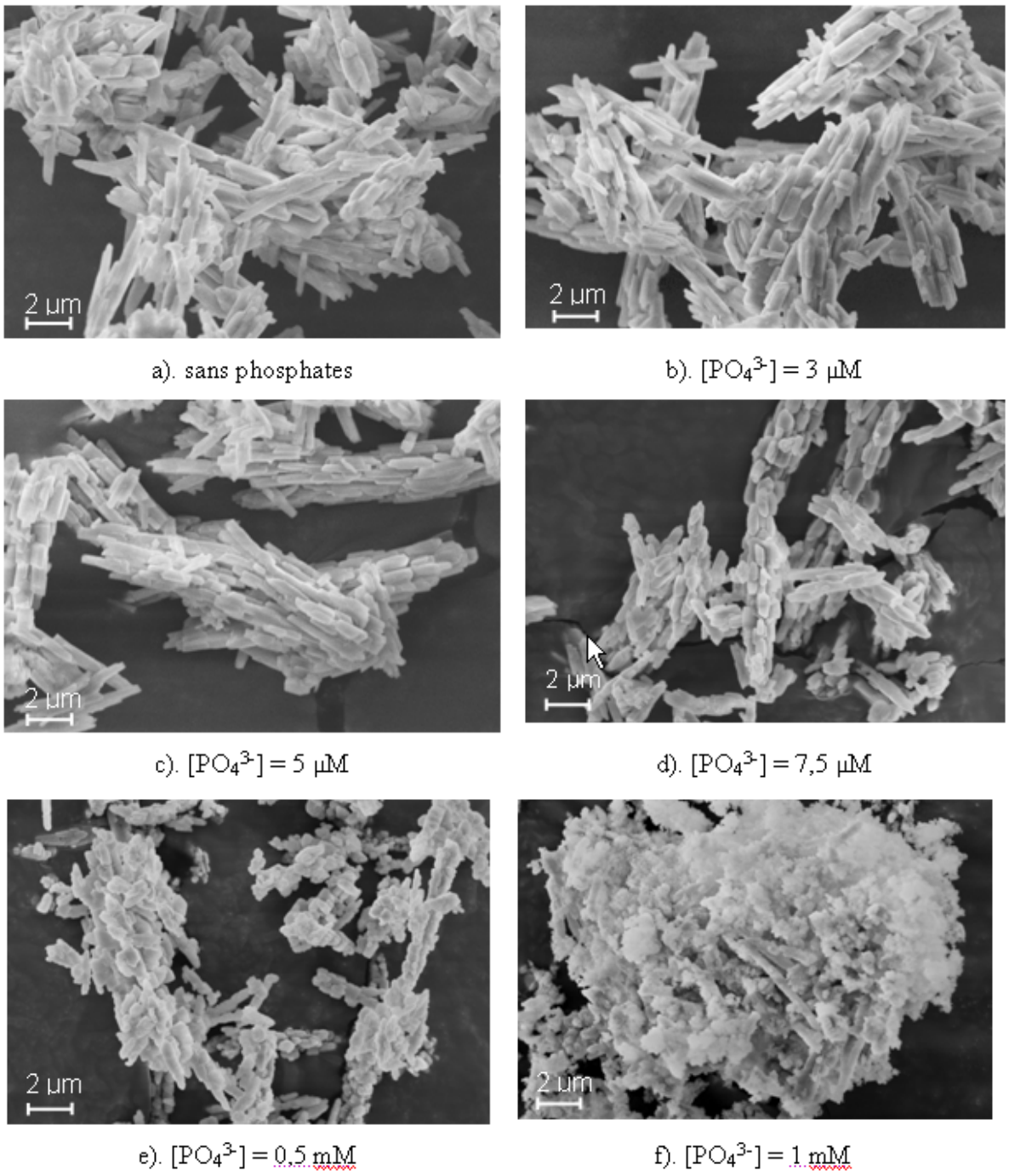


Figure V-15 : Clichés MEB du solide récupéré à la fin des essais pour diverses concentrations en ions phosphate dans la solution de travail.

Pour des concentrations en phosphate encore plus élevées, par exemple 0,5 mM, les fragments d'aiguilles semblent émoussés. Cette observation peut s'expliquer par la période initiale durant laquelle le pH de la solution de travail augmente et qui pourrait être due à une dissolution des germes introduits dans la solution de travail. Il serait nécessaire de confirmer cette hypothèse, par exemple en prélevant une petite quantité de la solution à intervalles de

temps réguliers pendant cette période de montée du pH, et en dosant les ions calcium. Si la concentration de ces derniers augmente, c'est que l'aragonite introduite est dissoute puisque pendant cette période, aucune solution titrante n'est ajoutée. Notons cependant que des études réalisées sur d'autres polymorphes du $CaCO_3$, et notamment sur la vatérite, ont montré l'effet inverse : la présence de phosphates tendait à bloquer la dissolution du carbonate de calcium [Sabbides et Koutsoukos, 1996 ; Katsifaras et Spanos, 1999].

A 1mM d'ions phosphate en solution, on observe quelques aiguilles d'aragonite prises dans des particules qui ont une morphologie très différente et qui pourraient être de l'apatite mal cristallisée, responsable de l'apparition des bandes d'absorption des groupements phosphate visibles sur le spectre infrarouge.

3.4.4. Mécanisme d'inhibition de la cristallisation de l'aragonite

Afin d'étudier les mécanismes d'interaction entre les particules de carbonate de calcium et les ions phosphate en solution, nous avons plongé des germes d'aragonite dans des solutions contenant de 0 à 1.10^{-4} $mol.L^{-1}$ d'ions phosphates pendant 15 heures et à 37°C. Au bout d'un jour, nous avons filtré la solution afin de récupérer le solide d'un côté, et la solution de l'autre. La quantité d'ions phosphate restant en solution au terme de cette expérience a été dosée et le potentiel zêta a été mesuré.

La figure V-16 présente l'évolution du potentiel zêta avec la concentration en phosphates de la solution dans laquelle les particules d'aragonite ont été immergées. Le potentiel zêta des particules est modifié ce qui semblerait signifier que **des ions phosphate sont adsorbés en surface des cristaux d'aragonite**. Ceci serait cohérent avec la diminution de la quantité de phosphates dans les solutions (données non présentées) et avec les études antérieures réalisées sur des polymorphes du carbonate de calcium.

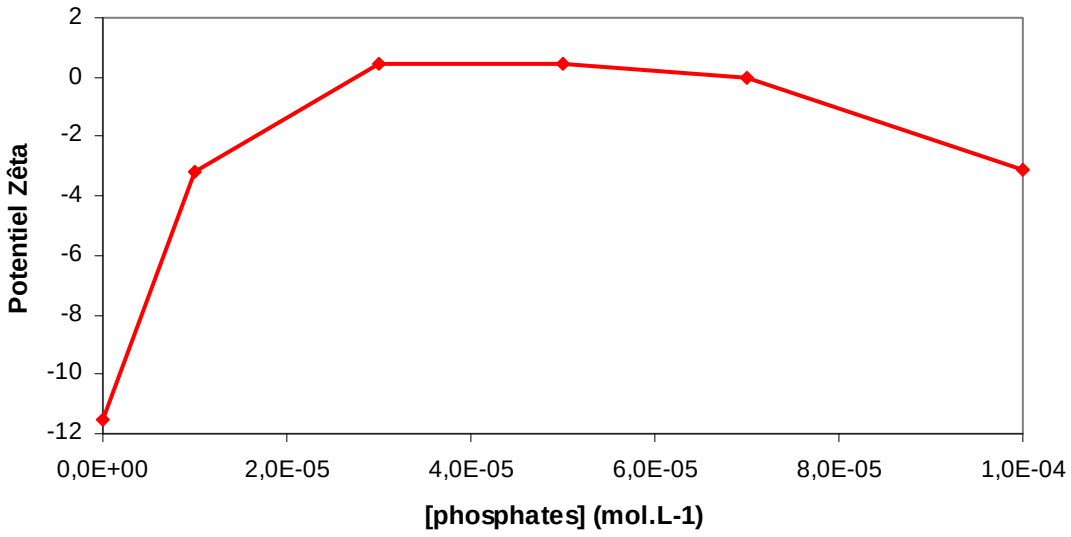


Figure V-16 : Évolution du potentiel zêta de l'aragonite en suspension dans une solution d'ions phosphate à différentes concentrations.

Cependant, il est nécessaire de compléter ces premiers résultats, notamment pour comprendre pourquoi le potentiel zêta évolue de cette manière.

4. Discussions et Conclusions

L'objectif de cette étude était de parvenir à modéliser la croissance d'aragonite dans les conditions physiologiques (et par extrapolation la prise du ciment $CaCO_3$) par un système *in-vitro* simplifié. En particulier, l'influence des ions phosphate sur la cinétique de croissance devait être évaluée.

Cette étude a permis de montrer qu'il est possible de précipiter de l'aragonite pure et bien cristallisée grâce à la technique de croissance cristalline à composition constante ; à notre connaissance, aucun travail n'avait encore été publié à ce sujet.
De plus, nous avons montré l'effet inhibiteur des ions phosphate, même présents en faible concentration, sur la cristallisation de l'aragonite. Deux effets dose-dépendants directs ont été démontrés : lorsque la concentration en ions phosphate en solution augmente, le temps d'induction est prolongé et la vitesse de formation est diminuée.

Les résultats préliminaires de cette étude fondamentale nous apportent des éléments importants pour expliquer les phénomènes observés ou attendus d'un point de vue plus pratique lors d'une implantation *in-vivo* du ciment $CaCO_3$: la prolongation du temps d'induction (avant la cristallisation de l'aragonite et donc avant que le ciment ne prenne) risque d'entraîner la dissolution et/ou la désintégration de la pâte du ciment au contact des fluides biologiques avant que le ciment n'ait eu le temps de prendre. La diminution de la vitesse de cristallisation pourrait avoir pour effet d'augmenter le temps de prise du ciment.

Notons que nous ne nous sommes intéressés dans cette étude qu'à la cinétique de cristallisation de l'aragonite. Des études antérieures ont montré que la présence de phosphates ralentit également la dissolution de la vatérite [Sabbides et Koutsoukos 1996, Katsifaras et Spanos 1999]. Or le ciment $CaCO_3$ prend par un processus de dissolution-reprécipitation (cf. Chapitre III) et la dissolution de la vatérite est nécessaire afin de libérer les ions qui participeront à la formation de l'aragonite. Il est donc vraisemblable que la présence d'ions phosphate dans les fluides biologiques puisse doublement gêner la prise du ciment : lors de la dissolution de la vatérite et lors de la cristallisation de l'aragonite. Ceci serait d'ailleurs cohérent avec le fait que l'on retrouve, après une semaine d'implantation, des lentilles de vatérite entières qui n'ont pas réagi (figure V-1).

L'étude a permis de montrer deux comportements différents selon la concentration en ions phosphate dans la solution de travail. À des concentrations supérieures à 8 µM, on observe une augmentation du pH avant que la précipitation de l'aragonite ne démarre. Il serait nécessaire de comprendre le processus responsable de cette augmentation de pH pour étudier de manière plus détaillée le comportement de l'aragonite à la concentration physiologique.

De plus, d'autres composés que les phosphates (protéines,…) sont présents dans les fluides biologiques et peuvent à leur tour soit favoriser, soit inhiber la prise du ciment. La présence des ions phosphate est une des causes probables de la non – prise du ciment $CaCO_3$ *in-vivo* mais il est possible qu'elle ne soit pas la seule responsable. Il pourrait être intéressant d'étudier l'influence des autres composés sur la cristallisation de l'aragonite, tels que l'albumine qui est la protéine la plus abondante dans le plasma sanguin.

Une autre perspective de cette étude est de modifier en partie la formulation du ciment $CaCO_3$ pour que sa réaction de prise puisse se dérouler de manière rapide et complète dans les conditions physiologiques. Une des solutions que l'on peut envisager est l'introduction, dans la formulation du ciment, d'un composé qui complexerait les ions phosphate présents dans les fluides biologiques et les empêcherait ainsi d'inhiber la prise du ciment *in-vivo*.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier les propriétés physico-chimiques et biologiques de deux ciments à base de carbonate de calcium pour application biomédicale ; l'optimisation de leurs formulations devait permettre de mieux répondre aux exigences des praticiens, notamment en vue de rendre leur utilisation possible pour des techniques de chirurgies peu invasives.

Les deux formulations de ciments avaient déjà été mises au point auparavant. La phase solide du premier ciment, noté « ciment $CaCO_3$-CaP », consiste en un mélange équi-massique de phosphate dicalcique dihydraté et de vatérite. Le second ciment, noté « ciment $CaCO_3$ », est uniquement composé de carbonate de calcium ; un mélange de vatérite et de carbonate de calcium amorphe compose sa phase solide. Toutes ces poudres réactives ont été synthétisées et caractérisées dans le cadre de ce travail de thèse. En particulier, un nouveau protocole de synthèse de la vatérite a été mis au point ; il permet d'obtenir de manière reproductible une quantité de produit pur deux fois plus importante.

L'étude a débuté par l'implantation *in-vivo* chez le rat des deux ciments étudiés, ce qui a permis de montrer qu'ils sont tous deux biocompatibles mais que certaines de leurs propriétés méritaient d'être améliorées.

A cette fin, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, au traitement de la phase solide par broyage et co-broyage des poudres réactives. Nous avons choisi d'arrêter le traitement des poudres lorsque la valeur minimale de taille moyenne des particules était atteinte (avant agglomération).
Nous avons montré que les poudres ont des comportements différents au broyage : alors que la taille moyenne des particules de brushite est significativement diminuée de 9,2 à 2,7 µm et que les plaquettes sont fragmentées, les particules de vatérite en forme de lentilles et les particules de CCA sont principalement désagglomérées.
Pour les deux formulations de phases solides, le co-broyage favorise le contact entre les deux constituants et permet d'homogénéiser le mélange.
De manière générale, les traitements de broyage et de co-broyage n'ont engendré aucune modification de composition ou transformation de phases.

Nous nous sommes également intéressés aux propriétés d'usage des deux ciments.
En ce qui concerne le ciment $CaCO_3$-CaP, nous avons montré, en accord avec des études antérieures, que la réaction de prise peut être assimilée à une réaction acide-base qui met en jeu la dissolution du DCPD et de la vatérite et conduit à une apatite carbonatée mal cristallisée analogue au minéral osseux. Le dioxyde de carbone dégagé pendant la réaction induit une microporosité du ciment et l'eau formée durant la réaction participe à la formation d'une couche hydratée à la surface des nanocristaux d'apatite. Cette couche devrait accroître la réactivité et la bioactivité du ciment *in-vivo*. Nos résultats montrent que cette couche est déstructurée lors du séchage du ciment.

Les mesures de temps de prise montrent que la réaction est plus rapide lorsque le DCPD a été préalablement broyé et encore plus rapide lorsque la phase solide est co-broyée, car l'hydratation des particules et les contacts entre les deux constituants sont alors favorisés. Au final, le temps de prise est divisé par un facteur deux, passant de 140 minutes pour le ciment de référence à 70 minutes pour le ciment préparé à partir de la phase solide co-broyée.

Par ailleurs, un nouveau protocole a été mis au point pour mesurer l'injectabilité de ciments hydrauliques. Il permet non seulement de mesurer la charge nécessaire pour déplacer une colonne de ciment, mais également de quantifier le phénomène de séparation de phases qui peut se produire lors de l'extrusion d'une pâte à l'aide d'une seringue. Nous avons montré que ce protocole est discriminant et sa mise au point participe ainsi à l'effort de standardisation nécessaire dans ce domaine.

Les mesures d'injectabilité réalisées ont permis de montrer que la charge d'injection est diminuée lorsque la brushite a été préalablement broyée et qu'elle l'est plus encore lorsque la phase solide a été co-broyée. Dans ce cas, la charge nécessaire est divisée par un facteur 100 par rapport au ciment de référence. De plus, le co-broyage de la phase solide permet de diminuer notablement voire d'éliminer le phénomène de démixtion qui avait lieu entre la phase liquide et la phase solide au cours de l'extrusion de la pâte de référence (poudres non broyées).

Nous avons également montré que la résistance en compression du ciment est légèrement augmentée grâce au co-broyage des poudres réactives, ce qui pourrait être dû à la disparition

de la microporosité, concomitante à la réduction de taille des particules de la brushite. De plus, les propriétés mécaniques du ciment peuvent être augmentées davantage en optimisant le rapport L/S.

L'étude réalisée sur le ciment $CaCO_3$ corrobore les résultats obtenus pour le ciment $CaCO_3$-CaP. La réaction de prise, qui s'effectue par un mécanisme de dissolution-reprécipitation est plus rapide et plus complète lorsque la phase solide du ciment est co-broyée. De plus, ce ciment a la propriété d'être rhéofluidifiant ; il est donc facilement injectable, même sans aucun traitement préalable des poudres réactives.

Nous nous sommes également intéressés à l'addition de l'élément strontium dans la formulation des deux ciments afin de les rendre radio-opaques et d'augmenter leur potentiel ostéogène. Deux voies d'incorporation ont été étudiées pour les deux ciments : sous forme de $SrCO_3$ ajouté à la phase solide ou sous forme de $SrCl_2$ dissous dans la phase liquide.
Les résultats obtenus montrent que, quel que soit le ciment, le $SrCO_3$ introduit en phase solide ne participe pas ou très peu à la réaction de prise et se retrouve piégé tel quel dans le ciment. La répartition non homogène du strontium se traduit alors par une radio-opacité améliorée mais irrégulière. L'homogénéité peut être améliorée par co-broyage de la phase solide contenant du strontium et conduit de façon synergique à une augmentation de l'opacité et de l'injectabilité de la pâte.
Lorsque le strontium est introduit en phase liquide, il participe, pour les deux ciments, à la réaction de prise et entre en substitution des ions calcium dans le réseau de l'apatite ou de l'aragonite. Cette substitution permet d'obtenir un contraste uniforme aux rayons X. Cependant, en raison de la solubilité limitée du sel de strontium ($SrCl_2$, $6H_2O$) dans l'eau, il n'est pas possible d'introduire autant de strontium dans le ciment par cette voie que via la phase solide.

La quantité de strontium à ajouter dans le ciment $CaCO_3$-CaP pour le rendre suffisamment radio-opaque au regard de la norme en vigueur a été déterminée : elle est de 8 % massique de strontium dans la pâte.

De plus, nous avons étudié le comportement du ciment $CaCO_3$-CaP, contenant ou non du strontium, en solution tamponnée à pH = 7,4 et à température physiologique (37°C). Deux mécanismes de dissolution ont été identifiés : les ciments qui contiennent du $SrCO_3$ sont

principalement dissouts par un mécanisme de diffusion. La vatérite résiduelle est dissoute plus rapidement, ce qui mène à la formation d'une couche plus concentrée en phosphore à la périphérie du ciment. Il semblerait en revanche que le ciment dans lequel le strontium a été introduit en phase liquide soit dissout par dégradation de l'apatite strontiée (mécanisme d'érosion prépondérant).
Ces essais nous ont permis de montrer que la dissolution du ciment $CaCO_3$-CaP induit la libération prolongée de strontium sur plusieurs semaines et ce, quel que soit le mode d'ajout du strontium. Par ailleurs, la dose journalière de strontium libéré *in-vitro* reste largement en dessous du seuil de toxicité du strontium.

Des essais de culture cellulaire *in-vitro* réalisés sur ces ciments ont confirmé leur biocompatibilité. L'ajout de strontium, et particulièrement sous forme de $SrCO_3$, favorise la prolifération et la différentiation de cellules humaines.

De plus, nous avons montré grâce à une étude fondamentale menée à l'aide de la technique de croissance cristalline à composition constante que la présence d'ions phosphate, même en faible quantité, inhibe la cristallisation de l'aragonite en solution. Il est probable que ces ions agissent en s'adsorbant à la surface des cristaux.
Ces résultats peuvent expliquer pourquoi la réaction de prise du ciment $CaCO_3$ n'a pas été complète *in-vivo*, puisque les fluides biologiques présentent une concentration de 1 $mmol.L^{-1}$ en ions phosphate.
Par conséquent, il serait nécessaire de modifier la composition du ciment uniquement $CaCO_3$ pour faciliter sa prise *in-vivo*. Une des voies envisagées est d'ajouter un composant qui complexera préférentiellement les ions phosphate.

Enfin, les objectifs fixés ont été atteints puisque ce travail a permis non seulement de proposer des améliorations pour la formulation du ciment $CaCO_3$ mais aussi d'optimiser celle du ciment $CaCO_3$-CaP : lorsque du carbonate de strontium est ajouté à la phase solide et que cette dernière est co-broyée, le ciment est à la fois injectable et radio-opaque. En outre, ce système est élaboré à partir de matières premières synthétiques et de procédés à bas coûts, ce qui constitue deux autres avantages non négligeables, notamment en vue de son éventuel développement industriel et plus largement vis-à-vis du coût pour notre société. Par ailleurs, les résultats prometteurs obtenus par culture cellulaire permettent d'envisager de nouveaux tests *in-vivo* des ces ciments.

Enfin, l'ensemble de ce travail a pu être réalisé grâce à l'initiation et/ou au développement de nombreuses collaborations scientifiques à l'échelle locale (Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse, Département de Mécanique des Structures et Matériaux de l'ISAE à Toulouse et Faculté de Chirurgie Dentaire de Toulouse), nationale (INSERM U 577 à Bordeaux) et internationale (Laboratory of Inorganic and Analytical Chemistry, University de Patras, Grèce).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Akhtar S., Barralet J.E., Farrar D., Wright A.J., Influence of phosphate ions on the stability of amorphous calcium carbonate, Key Engineering Mater. 309-311 (2006), pp. 179-182

Alia J.M., Diaz de Mera Y., Edwards H.G.M., González Martin P., López Andrés S., FT-Raman and infrared spectroscopic study of aragonite-strontianite ($Ca_xSr_{1-x}CO_3$) solid solution, Spectrochimica Acta A 53 (1997), pp. 2347-2362

Alkhraisat M.H., Moseke C., Blanco L., Barralet J.E., Lopez-Carbacos E., Gbureck U., Strontium modified biocements with zero order release kinetics, Biomaterials 29 (35) (2008), pp. 1-7

Aoyagi Y., Takahashi H., Iwasaki N., Honda E., Kurabayashi T., Radiopacity of experimental composite resins containing radiopaque materials, Dent. Materials J. 24 (3) (2005), pp. 315-320

Arnaud E, De Pollak C, Meunier A, Sedel L, Damien C, Petite H., Osteogenesis with coral is increased by BMP and BMC in a rat cranioplasty., Biomaterials 20 (1999), pp. 1909-1918

Astilleros J.M., Pina C.M., Fernández-Diaz L., Putnis A., Metastable phenomena on calcite $\{10\bar{1}4\}$ surfaces growing from Sr^{2+}-Ca^{2+}-CO_3^{2-} aqueous solutions, Chemical Geology 193 (2003), pp. 93-107

Bachra B.N., Trautz O.R., Simon S.L., Precipitation of calcium carbonates and phosphates. I. Spontaneous precipitation of calcium carbonates and phosphates under physiological conditions, Archives of Biochem. and Biophysics 103 (1963), pp. 124-138

Bain S.D., Gross T.S., Structural Aspects of Bone Resorption, Bone Resorption chapitre 4, Springer London (2005)

Baroud G., Cayer E., Bohner M., Rheological characterization of concentrated aqueous β –tricalcium phosphate suspensions : the effect of liquid-to-powder ratio, milling time, and additives, Acta Biomat. 1 (2005), pp 357-363

Barralet J.E., Grover L.M., Gbureck U., Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part II : hypodermic injection and strength improvement of brushite cement, Biomaterials 25 (2004), pp 2197-2203

Begley C.T., Doherty M.J., Mollan R.A.B., Wilson D.J., Comparative study of the osteoinductive properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes. Biomaterials 16 (1995), pp.1181-1185.

Behrens G., Kuhn L.T., Ubic R., Heuer A.H., Raman Spectra of Vateritic Calcium Carbonate, Spectroscopy Letters 28 (6) (1995), pp 983-995

Benjamin J.S., Dispersion strengthened superalloys by mechanical alloying, Metallurgical and Materials Transactions B 1 (1970), pp. 2394-2951

Berland S, Delattre O, Borzeix S, Catonné Y, Lopez E. Nacre/bone interface changes in durable nacre endosseous implants in sheep. Biomaterials 26 (2005), pp. 2767-2773.

Bohner M., Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements, Injury, Int. J. Care Injured 31 S4 (2000), pp. S-D37-47

Bohner M., Baroud G., Injectability of calcium phosphate pastes, Biomaterials 26 (2005-a), pp 1553-1563

Bohner M., Gbureck U., Barralet J.E., Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements : A critical assessment, Biomaterials 26 (2005-b), pp 6423-6429

Brown W.E., Chow L.C., Dental restorative cement pastes, US patent 4518430 (1985)

Brunner T.J., Grass R.N., Bohner M., Stark W.J., Effect of particle size, crystal phase and crystallinity on the reactivity of tricalcium phosphate cements for bone reconstruction, J. Mater. Chem. 17 (2007), pp. 4072-4078

Burguera E. F., Xu H.H.K., Weir M.D., Injectable and rapid-setting calcium phosphate bone cement with dicalcium phosphate dihydrate, J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 77 (2006), pp. 126-34

Burguera E.F., Xu H.H.K., Sun L., Injectable calcium phosphate cement: effects of powder-to-liquid ratio and needle size, J Biomed. Mater Res. B: Applied Biomater. 84 (2008), pp. 493-502.

Carter D.R., Hayes W.C., The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure, J. of Bone Joint Surgery 59A (1977), pp. 954-962

Cazalbou S., Échanges cationiques impliquant des apatites nanocristallines analogues au mineral osseux, thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (2000)

Cazalbou S., Eichert D., Drouet C., Combes C., Rey C., Minéralisations biologiques à base de phosphate de calcium, C.R. Palevol 3 (2004), pp. 563-572

Cazalbou S., Eichert D., Ranz X., Drouet C., Combes C., Harmand M.F., Ion exchanges in apatites for biomedical applications, J. of Materials Science : Mater. in Medicine 16 (2005), pp. 405-409

Chatainier S., Évaluation de ciments à base de carbonate de calcium synthétique en comblement osseux : étude expérimentale chez le rat, thèse d'exercice, faculté de chirurgie dentaire de Toulouse, UPS (2007)

Chen J., Xiang L., Controllable synthesis of calcium carbonate polymorphs at different temperatures, Powder Technology 189 (2009), pp. 64-69

Chiroff R.T., White E.W., Weber J.N., Roy D.M., Tissue ingrowth of Replamineform implants. J Biomed Mater Res 9 (1975), pp. 29-45

Christoffersen J., Christoffersen M.J., Kolthoff N., Bärenholdt O., Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection, Bone 20 (1) (1997), pp. 47-54

Chung-King H., The preparation of biphasic porous calcium phosphate by the mixture of $Ca(H_2PO_4)_2$, H_2O and $CaCO_3$, Materials Chemistry and Physics 80 (2003), pp. 409-420

Cohen-Solal M., Strontium overload and toxicity : impact on renal osteodystrophy, Nephrology Dialysis Tranplantation 17 (S2) (2002), pp. 30-34

Combes C., Miao B., Bareille R., Rey C., Preparation, physical-chemical characterisation and cytocompatibility of calcium carbonate cements, Biomaterials 27 (2006-a), pp 1945-1954

Combes C., Bareille R., Rey C., Calcium carbonate-calcium phosphate mixed cement compositions for bone reconstruction, J. Biomed Mater Res 79 A (2006-b), pp 318-328

Combes C., Tadier S., Galliard H., Girod-Fullana S., Charvillat C., Rey C., Auzély-Velty R., El Kissi N., Rheological properties of calcium carbonate self-setting injectable paste, Acta Biomaterialia 2009, doi : 10.1016/j.actbio.2009.08.032

Constantz B.R., Ison I.C., Fulmer M.T., Poser R.D., Smith S.T., VanWagoner M., Ross J., Goldstein S.A., Jupiter J.B., Rosenthal D.I., Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone, Science 267 (1995), pp. 1796-1799

Cruvinel D.R., Garcia L.F.R., Casemiro L.A., Pardini L.C., Pires-de-Souza F.C.P., Evaluation of radiopacity and microhardness of composites submitted to artificial aging, Mater. Research 10 (3) (2007), pp. 325-329

Curry N.A., Jones D.W., Crystal structure of brushite, calcium hydrogen orthophosphate dihydrate : a neutron-diffraction investigation, J. Chem. Society (1971), pp. 3725-3729

Daculsi G., Legeros R.Z., Heughebaert M., Barbieux I., Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics, Calcif. Tissue Int. 46 (1990), pp. 20-27

Damron T., RE : Calcium phosphate cement in musculoskeletal tumor surgery, by Matsumine A, Kusuzaki K, Matsubara T, et al., J. of Surgical Oncology 93 (2006), pp. 169-170

Dědek J., Le carbonate de chaux, Librairie Universitaire Louvain (1966)

Delgado J.A., Harr I., Almirall A., del Valle S., Planell J.A., Ginebra M.P., Injectability of a macroporous calcium phosphate cement, Key Eng. Mat. 284-286 (2005), pp 157-160

Demers C, Tabrizian M, Petit A, Hamdy RC, Yahia LH., Effect of experimental parameters on the in vitro release kinetics of transforming growth factor β1 from coral particles, Biomed Mater Eng 12 (2002), pp.15-35.

Devarajan A., Abdul Khadar M., Chattopadhyay K., Effect of ball milling on chemically synthesized nanoparticles of $CaCO_3$, Mater. Sc. And Eng. A 452-453 (2007), pp. 395-400

Dorozhkin S.V., Calcium orthophosphate cements for biomedical application, J. Mater Sci. 43 (2008), pp 3028-3057

Dorozhkin S.V., Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine, Materials 2 (2009), pp. 399-498

Eichert D., Étude de la réactivité de surface d'apatites de synthèse nanocristallines, thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (2001)

Eichert D., Combes C., Drouet C., Rey C., Formation and evolution of hydrated surface layers of apatites, Key Engineering Materials 284-286 (2005), pp. 3-6

Eichert D., Drouet C., Sfihi H., Rey C., Combes C., Nanocrystalline apatite-based biomaterials : synthesis, processing and characterization, Biomaterials Research Advances, editions JB Kendall, Nova Science Publishers (2007), pp. 93-143

Elliott J.C., Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates, Studies in Inorganic Chemistry 18, éd. Elsevier (1994)

Faatz M., Gröhn F., Wegner G., Amorphous calcium carbonate : synthesis and potential intermediate in biomineralization, Advanced Materials 16 (2004), pp. 996-1000

Fantozzi G., Le Gallet S., Nièpce J-C., recueil de l'école thématique « Science et Technologies Céramiques » organisé par le Groupe Français de la Céramique, (2009) Ouarzazate

Feydy A., Myélome – Fractures vertébrales et traitements percutanés, Actualités en vertébroplastie et en cyphoplastie, 23 mars 2009 (Paris)

Fontaine M.L., Combes C., Mounic S., Rey C., Composition de ciment hydraulique à base de carbonates de calcium, French Patent FR2830249 (2001)

Fricain JC, Roudier M, Rouais F, Basse-Cathalinat B, Dupuy B., Influence of the structure of three corals on their resorption kinetics. J Periodontal Res 31 (1996), pp. 463-469

Gbureck U., Barralet J.E., Spatz K., Grover L.M., Thull R., Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part I : hypodermic injection and strength improvement of apatite cement, Biomaterials 25 (2004), pp. 2187-2195

Gbureck U., Spatz K., Thull R., Barralet J.E., Rheological enhancement of mechanically activated α-tricalcium phosphate cements, J. of Biomed. Mat. Res. B : applied biomat. 73 B (1), (2005), pp.1-6

Ginebra M.P., Fernández E., Boltong M.G., Bermúdez O., Planell J.A., Driessens F.C.M., Compliance of an Apatitic Calcium Phosphate Cement with the Short-term Clinical Requirements in Bone Surgery, Orthopaedics and Dentistry, Clinical Mater. 17 (1994), pp. 99-104

Ginebra M.P., Rilliard A., Fernandez E., Elvira C., San Roman J., Planell J.A., Mechanical and rheological improvement of a calcium phosphate cement by the addition of a polymeric drug, J. Biomed Mater Res (2001) ; 57 (10), pp113-118

Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A., Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis, Biomaterials 25 (2004), pp. 3453-3462

Gisep A., Curtis R., Hänni M., Suhm N., Augmentation of implant purchase with bone cements : an in-vitro study of injectability and dough distribution, J Biomed. Mater Res. B (Applied Biomat.) 77B (1) (2006), pp. 114-119

Glimcher M.J., Bonar L.C., Grynpas M.D., Landis W.J., Roufosse A.H., Recent studies of bone mineral : is the amorphous calcium phosphate theory ?, J. Crystal Growth 53 (1981), pp. 100-119

Goncalves S., Élaboration d'un ciment phosphocalcique injectable : études physico-chimique, galénique et de biocompatibilité, thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (2001)

Grasby S., Naturally precipitating vaterite (μ-CaCO3) spheres : unusual carbonates formed in an extreme environment, Geochimica et Cosmochimica Acta 67 (2003), pp. 1659-1666

Greve K., Nielsen E., Ladefoged O., Evaluation of health hazards by exposure to strontium in drinking water, Abstracts – Toxicology Letters 172S (2007), p. S210

Guida A., Towler M.R., Wall J.G., Preliminary work on the antibacterial affect of strontium in glass ionomer cements, Journal of Materials Science Letters 22 (2003), pp. 1401-1403

Guillemin G, Meunier A, Dallant P, Christel P, Pouliquen JC, Sedel L., Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities, J Biomed Mater Res. 23 (1989), pp. 765-779

Guo D., Xu K., Zhao X., Han Y., Development of a strontium-containing hydroxyapatite bone cement, Biomaterials 26 (2005), pp. 4073-4083

Günther C., Becker A., Wolf G., Epple M., In-vitro synthesis and structural characterization of amorphous calcium carbonate, Z. Anorg. Allg. Chem. 631 (2005), pp. 2830-2835

Habib M., Baroud G., Gitzhofer F., Bohner M., Mechanisms underlying the limited injectability of hydraulic calcium phosphate paste, Acta Biomaterialia 4 (2008), pp. 1465-1471

Hanker J.S., Terry B.C., Ambrose W.W., Lupton C.R., Plaster of Paris as a bioresorbable scaffold in implants for bone repair, US patent 4-619-655 (1986)

Heaney R.P., Bone as the Calcium Nutrient Reserve, Calcium in Human Health chapitre 2, Humana Press (2006)

Hench L.L., Splinter R.J., Allen W.C., Greenlee T.K., Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials, J. Biomed. Mater. Res. Symposium (1971), pp. 117-141

Hernández L., Gurruchaga M., Goñi I., Influence of powder particle size distribution on complex viscosity and other properties of acrylic bone cement for vertebroplasty and kyphoplasty, Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials 77B(1) (2006), pp. 98-103

Heughebaert J.C., Zawacki S.J., Nancollas G.H., The Growth of Nonstoichiometric Apatite from Aqueous Solution a 37°C I. Methodology and Growth at pH 7.4, J. of Colloid and Interface Science, 135 (1) (1990), pp 20-32

Hu Z., Deng Y., Synthesis of needle-like aragonite from calcium chloride and sparingly soluble magnesium carbonate, Powder techn. 140 (2004), pp. 10-16

Huet H., Quelle est la place de la vertébroplastie en traumatologie ? Revue de littérature, techniques combines, concepts, Actualités en vertébroplastie et en cyphoplastie, 23 mars 2009 (Paris)

Integrated Risk Information System : base de données sur le strontium, fiche CASRN 7440-24-6 IRIS (révisée le 12 janvier 1996)

Jensen A.T., Rathlev J., Calcium hydrogen orthophosphate dihydrate and calcium orthophosphate, Inorg. Syntheses 4 (1953), pp. 19-22

Jones D.W., Smith J.A.S., The structure of brushite, $CaHPO_4$, $2H_2O$, J. Chem. Society (1962), pp. 1414-1420

Jones F.H., Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials, Surface Science Reports 42 (2001), pp 75-205

Katsifaras A., Spanos N., Effect of inorganic phosphate ions on the spontaneous precipitation of vaterite and on the transformation of vaterite to calcite, J. of Crystal Growth 204 (1999), pp. 183-190

Kay M.I., Young R.A., Posner A.S., Crystal structure of hydroxyapatite, Nature 204 (1964), pp. 1050-1052

Khairoun I., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Planell J.A., Effect of calcium carbonate on the compliance of an apatitic calcium phosphate bone cement, Biomaterials 18 (1997), pp. 1535-1539

Khairoun I., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Planell J.A., Some factors controlling the injectability of calcium phosphate bone cements, J. Materials Sc.: Mat. In Med. 9 (1998-a), pp 425-428

Khairoun I., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Planell J.A. Limited compliance of some apatitic calcium phosphate bone cements with clinical requirements, J. Materials Sc.: Mat. In Med. 9 (1998-b), pp 667 – 671

Khairoun I., Driessens F.C.M., Boltong M.G., Planell J.A., Wenz R., Addition of cohesion promotors to calcium phosphate cements, Biomaterials 20 (1999), pp 393-398

Kim Y.W., Kim J.J., Kim Y.H., Rho J.Y., Effects of organic matrix proteins on the interfacial structure at the bone-biocompatible nacre interface in vitro, Biomaterials 23 (2002), pp. 2089-2096

Lacout J.L., L'hydroxyapatite, un matériau de substitution de l'os par excellence, Le chirurgien dentiste de France 476 (1989), pp. 39-43

Lacout J.L., Frèche M., Gonçalves S., Rodriguez F., Procédé de préparation d'un matériau pâteux phosphocalcique injectable en vue de former un biomatériau apatitique et application chirurgicale ou dentaire, French patent CE 1489-BF 8378 (2000)

Landi E., Sprio S., Sandri M., Celotti G., Tampieri A., Development of Sr and CO_3 co-substituted hydroxyapatites for biomedical applications, Acta Biomaterialia 4 (3) (2008), pp. 656-663

Laredo J.D., Vertébroplastie et kyphoplastie : faut-il traiter toutes les fractures ?, Actualités en vertébroplastie et en cyphoplastie, 23 mars 2009 (Paris)

Legeros R.Z., Chohayeb A., Shulman A., Apatitic calcium phosphates : possible restorative materials, J. Dent. Res. 61 S (1982), pp. 343

Legeros R.Z., Daculsi G., Legeros J.P., Bioactive Bioceramics, Musculoskeletal Tissue Regeneration chapitre 8, Humana Press (2008)

Legros R., Apport de la physico-chimie à l'étude de la phase minérale des tissues calcifiés, Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse (1984)

Leroux L., Hatim Z., Frèche M., Lacout J.L., Effects of various adjuvants (lactic acid, glycerol, and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement, Bone 25 (2), supplement, (1999), pp 31S-34S

Leroux L., Caractérisation et propriétés d'hydroxyapatites calcostrontiques préparées par la voie des ciments phosphocalciques, thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (2000)

Levi-Kalisman Y., Raz S., Weiner S., Addadi L., Sagi I., Stuctural differences between biogenic amorphous calcium carbonate phases using X-ray absorption spectroscopy, Advanced Functional Materials 12 (1) (2002), pp. 43-48

Lewis G., Injectable bone cements for use in verteobroplasty and kyphoplasty : state-of-the-art review, J Biomed. Mater Res. B (Applied Biomat.) 76B (2) (2006), pp 456-468

Lewis G., Xu J., Madigan S., Towler M.R., Influence of strontia on various properties of Surgical Simplex® P acrylic bone cement and experimental variants, Acta Biomaterialia 3 (6) (2007), pp. 970-979

Liu C., Shao H., Chen F., Zheng H., Effects of the granularity of raw materials on the hydration and hardening process of calcium phosphate cement, Biomaterials 24 (2003), pp. 4103–4113

Liu C., Shao H., Chen F., Zheng H., Rheological properties of concentrated aqueous injectable calcium phosphate cement slurry, Biomaterials 27 (2006), pp. 5003-5013

Liu H., Li H., Cheng W., Yang Y., Zhu M., Zhou C., Novel injectable calcium phosphate/chitosan composites for bone substitute materials, Acta Biomat. 2 (2006-b), pp 557-565

Loste E., Wilson R.M., Seshadri R., Meldrum F.C., The role of magnesium in stabilising amorphous calcium carbonate and controlling calcite morphologies, J. of Crystal Growth 254 (2003), pp. 206-218

Lucas A., Gaudé J., Carel C., Michel J.F., Cathelineau G., A synthetic aragonite-based ceramic as a bone graft substitute and substrate for antibiotics, International J. of Inorganic Materials 3 (2001), pp. 87-94

Lucas-Girot A., Hernandez O., Oudadesse H., Re-examination of the structural properties of solid solutions $Sr_xCa_{1-x}CO_3$, Materials Research Bulletin 42 (2007), pp. 1061-1068

Ma H.Y., Lee I.S., Characterization of vaterite in low quality freshwater-cultured pearls, Materials Science and Engineering C 26 (2006), pp. 721-723

Marie P.J., Ammann P., Boivin G., Rey C., Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone, Calcified Tissue International 69 (2001), pp. 121-129

Mendham J., Denney R.C., Barnes J.D., Thomas M., Analyse chimique quantitative de Vogel, 6ème édition (2006), éd. de boeck, p. 528

Meyer U., Wiesman H.P., Bone and Cartilage Engineering, Springer Berlin Heidelberg, chapitre 2 “Bone and Cartilage” (2006)

Miao B., Optimisation des propriétés physico-chimiques d’un ciment à base de carbonates de calcium: application en chirurgie dentaire, rapport de stage de DEA (2004)

Mirtchi A.A., Lemaître J., Terao N., Calcium phosphate cements : study of the β-tricalcium phosphate – monocalcium phosphate system, Biomaterials 10 (7) (1989), pp. 475-480

Mirtchi A.A., Lemaître J., Munting E., Calcium phosphate cements : study of the β-tricalcium phosphate – dicalcium phosphate – calcite cements, Biomaterials 11 (2) (1990), pp. 83-88

Monma H., Takahashi T., Ushio H., Soeda S., Kiyosawa T., Preparation and properties of porous apatite by the hydration and hardening method, Gypsum and Lime 212 (1988), pp. 25-28

NF EN ISO 9917-1:2008-04 Art dentaire - Ciments à base d’eau - Partie 1 : Ciments acido-basiques liquides/en poudre (avril 2008)

Présentation réalisée par la société Medtronic, Les nouveaux ciments osseux ActivOs™ et KyphOs™, Actualités en vertébroplastie et en cyphoplastie, 23 mars 2009 (Paris)

Northwood D.O., Lewis D., Transformation of vaterite to calcite during grinding, Mineralogical Notes 53 (1968), pp. 2089-2092

Ogino T., Suzuki T., Sawada K., The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water, Geochimica et Cosmochimica Acta 51 (1987), pp. 2757-2767

Orcel P., La fracture vertébrale ostéoporotique : fréquence, conséquences médicales et économiques, approche thérapeutique, Actualités en vertébroplastie et en cyphoplastie, 23 mars 2009 (Paris)

Oudadesse H., Étude des phénomènes physiques dans la transformation du corail implanté « in-vivo » par radioactivation nucléaire, par diffraction des rayons X et par spectrométrie infrarouge, thèse de doctorat de l'uniersité Clermont II (1989)

Ouizat S., Barroug A., Legrouri A., Rey C., Adsorption of bovine serum albumin on poorly crystalline apatite : influence of maturation, Materials Res. Bulletin 34 (14/15) (1999), pp. 2279-2289

Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemin G. Tissue-engineered bone regeneration, Nat Biotechnol. 18 (2000), pp. 959-963

Piattelli A., Podda G., Scarano A., Clinical and histological results in alveolar ridge enlargement using coralline calcium carbonate. Biomaterials 18 (1997), pp. 623-627.

Pina S., Torres P.M., Goetz-Neunhoeffer F., Neubauer J., Ferreira J.M.F., Newly developed Sr-substituted α-TCP bone cements, Acta Biomaterialia (2009), doi : 10.1016/j.actbio.2009.09.001

Pittet C., Uske A., Chevalley F., Lemaître J., Radio-opacité d'un ciment phosphocalcique pour la vertébroplastie, Actualité en biomatériaux, VI (2002), pp. 79-85

Plummer L.N., Busenberg E., The solubilities of calcite, aragonite and vaterite in CO_2-H_2O solutions between 0 and 90°C, and an evaluation of the aqueous model for the system $CaCO_3$-CO_2-H_2O, Geochimica et Cosmochimica Acta 46 (1982), pp. 1011-1040

Rey C., Collins B., Shimizu M., Glimcher M.J., Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopic study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age. I : Investigation in the υ_4 PO_4 domain, Calcif. Tissue INT. 46 (1990), pp. 384-394

Rey C., Renugopalakrishnan V., Collins B., Glimcher M.J., Fourier transform infrared spectroscopy study of the carbonate ions in bone mineral during ageing, Calcif. Tissue Int. 49 (1991), pp. 251-258

Rey C., Combes C., Drouet C., Sfihi H., Barroug A., Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites : implication for biominerals and biomaterials, Materials Science and Engineering C 27 (2) (2007), pp. 198-205

Rodrigues A., Lebugle A., Behavior in wet atmosphere of an amorphous calcium phosphate with an atomic Ca/P ratio of 1.33, J. of Solid State Chemistry 148 (1999), pp. 308-315

Roudier M., Bouchon C., Rouvillain J.L., Amédée J., Bareille R., Rouais F., Fricain J.C., Dupuy B., Kien P., Jeandot R. et coll. The resorption of bone-implanted corals varies with porosity but also with host reaction, J. Biomed Mater. Res. 29 (1995), pp. 909-915.

Roufosse A.H., Landis W.J., Sabine W.K., Glimcher M.J., Identification of brushite in newly deposited bone mineral from embryonic chicks, J. Ultrastruct. Res. 68 (1979), pp. 235-255

Sabbides Th.G., Koutsoukos P.G., The effect of surface treatment with inorganic orthophosphate on the dissolution of calcium carbonate, J. of Crystal Growth 165 (1996), pp. 268-272

Sarda S., Fernandez E., Nilsson M., Balcells M., Planell J.A., Kinetic study of citric acid influence on calcium phosphate bone cements as water-reducing agent, J. Biomed Mater Res. 61 (4) (2002), pp 653-659

Seyni A., Propriétés physico-chimiques et d'usages de matériaux composites à charge dégradable produits par co-broyage, thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (2008)

Souyris F., Pellequer C., Payrot C., Servera C., Coral, a new biomedical material. Experimental and first clinical investigations on Madreporaria. J Maxillofac Surg 13 (1985), pp. 64-69.

St Pierre P.D.S., The preparation of dicalcium phosphate dihydrate and calcium pyrophosphate, J. Am. Chem. Society 77 (1955), pp. 2197-2198

Tai C.Y., Chen F.B., Polymorphism of $CaCO_3$ precipitated in a constant-composition environment, AIChE Journal 44 (8) (1998), pp.1790-1798

Tang H., Yu J., Zhao X., Controlled synthesis of crystalline calcium carbonate aggregates with unusual morphologies involving the phase transformation from amorphous calcium carbonate, Materials Research Bulletin 44 (2009), pp. 831-835

Taylor R.S., Taylor R.J., Fritzell P., Balloon kyphoplasty for vertebroplasty for vertebral compression fractures : a comparative systematic review of efficacy and safety, Spine 31 (2006), pp. 2747-2755

Tofighi A., Palazzolo R., Calcium phosphate bone cement preparation using mechano-chemical process, Key Eng. Mater. 284-286 (2006), pp. 101-104

Ueno Y., Futagawa H., Takagi Y., Ueno A., Mizushima Y., Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for a new delivery system, J. of Controlled Release 103 (2005), pp. 93-98

Vrignaud S., Levaux-Faivre M.M., Clerc M.A., Ciments pour vertèbroplastie : étude comparative, poster accessible sur le site internet : http://www.apho.fr/posters/63/3.pdf

Wang X., Ye J., Wang H., Effects of additives on the rheological properties and injectability of a calcium phosphate bone substitute material, J. Biomed. Mat. Res. B : App. Biomat. 78 (2006), pp. 259-264

Wang X., Ye J., Wang Y., Influence of a novel radiopacifier on the properties of an injectable calcium phosphate cement, Acta Biomaterialia 3 (2007), pp. 757-763

Wang X., Ye J., Variation of crystal structure of hydroxyapatite in calcium phosphate cement by the substitution of strontium ions, J. Mater. Sci. : Materials in Medicine 19 (2008), pp. 1183-1186

Webster T.J., Ahn E.S., Nanostructured Biomaterials for Tissue Engineering Bone, Adv Biochem Engin/Biotechnol 103 (2006), pp 275–308

Wehrlé P., Pharmacie Galénique, Formulation et technologie pharmaceutique, éd. Maloine (2007), chapitre 3, pp. 96-103

Weiner S., Levi-Kalisman Y., Raz S., Addadi L., Biologically Formed Amorphous Calcium Carbonate, Connective Tissue Research 44 S.1 (2003), pp.214-218

Wu Y., Glimcher M.J., Rey C., Ackerman J., A unique protonated phosphate group in bone mineral not present in synthetic calcium phosphates, J. Mol. Biol. 244 (1994), pp. 423-435

Xu H.H.K., Weir M.D, Burguera E. F., Fraser A.M., Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffold, Biomaterials 27 (2006), pp 4279-4287

Yan G., Wang L., Huang J., The crystallization behaviour of calcium carbonate in ethanol/water solution containing mixed non-ionic/anionic surfactants, Powder Tech. 192 (2009), pp. 58-64

Young R.A., Some aspects of crystal structural modeling of biological apatites, Colloques internationaux C.N.R.S., Physico-chimie et cristallographie des apatites d'intérêt biologique (1973), pp. 21-40

Yu T., Ye J., Wang Y., Preparation and characterization of a novel strontium-containing calcium phosphate cement via the two-step hydration process, Acta Biomaterielia 5 (7) (2009), pp. 2717-2727

Zapata - Massot C., Synthèse de matériaux composites par co-broyage en voie sèche. Caractérisation des propriétés physico-chimiques et d'usages des matériaux, thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (2004)

Zapata - Massot C., LeBolay N., Le co-broyage en voie sèche : une alternative pour la formulation de mélanges de poudres et la production de matériaux composites, Acte du colloque Sciences et Technologie des poudres (2007), Albi

ANNEXES

ANNEXE A : Matériels et méthodes

A.1. Test de résistance à la compression

L'essai de compression consiste à soumettre une éprouvette de ciment de forme cylindrique à deux forces axiales opposées, en la plaçant entre les plateaux d'une presse. La déformation du matériau en fonction de l'effort de compression est enregistrée en continu par un appareil de type HOUNSFIELD Série S (cf. figure A-1). Le résultat est une courbe charge-déplacement sur laquelle on peut distinguer deux domaines distincts : le domaine élastique et le domaine plastique.

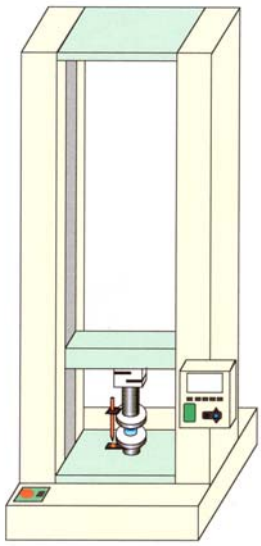


Figure A-1 : Appareil pour essais de compression de type Hounsfield Série S.

La déformation du ciment augmente jusqu'à la rupture. Cet essai permet donc de déterminer la valeur de la résistance à la compression $\sigma = Rc / S_0$ exprimée en Pascals, où S_0 est la section initiale de l'éprouvette (en m^2) et Rc la charge maximale (en N).

A.2. Mesure du temps de prise des ciments

La prise d'un ciment correspond à l'évolution d'un mélange pâteux vers un produit plus dur. Le temps de prise a été défini dans cette étude comme le temps nécessaire pour l'obtention d'une force de résistance à la pénétration de 600 g/mm^2. L'appareil de mesure utilisé est un TA- XT2 Texture Analyser, muni d'une aiguille de forme cylindrique de 0,8 mm de diamètre et de 15 mm de longueur (cf. figure A-2). La vitesse de descente (2 mm.s^{-1}) la vitesse de montée (2 mm.s^{-1}) ainsi que la profondeur de pénétration dans le ciment (5 mm) sont des consignes fixées.

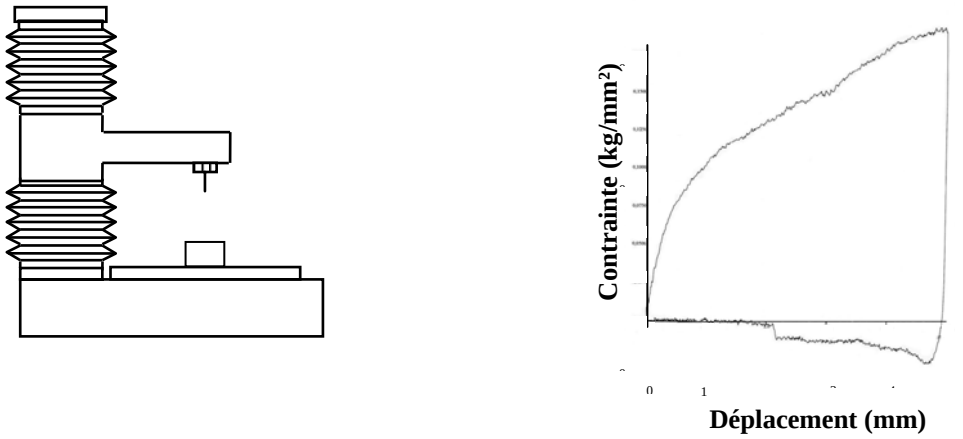


Figure A-2 : Schémas de l'appareil TA-XT2 et du type de graphique obtenu

Le ciment est préparé selon le protocole habituel, décrit dans le chapitre I. Après gâchage, la pâte est introduite dans un moule en polystyrène cristallisé, lui-même maintenu dans un bloc en acier de grande inertie thermique qui permet de garder la température du ciment constante pendant les mesures.

Ensuite, le système est placé dans une étuve à 37°C, dans une atmosphère saturée en humidité afin que la réaction de prise ait lieu dans les conditions habituelles. Des mesures sont réalisées à intervalles de temps réguliers, et à température ambiante. Pour chaque essai, la valeur maximale de la force de résistance exercée par le ciment sur l'aiguille est retenue. L'ensemble des valeurs permet de tracer la courbe de la cinétique de prise du ciment, présentée sur la figure III-13.

A.3. Mesure de surfaces spécifiques

Les mesures de surface spécifique des solides pulvérulents ont été effectuées par la méthode BET monopoint, à l'aide d'un appareil Quantachrom.

La méthode de Brunauer, Emmet et Teller est la procédure la plus utilisée pour déterminer la surface spécifique des solides. Par définition, la surface spécifique représente la surface totale par unité de masse du produit accessible aux atomes et aux molécules. Il s'agit donc de considérer toute la surface de chaque particule, porosité ouverte comprise.

Le cycle d'adsorption-désorption est réalisé grâce à la circulation d'un mélange gazeux He/N_2. Dans un premier temps, l'échantillon est refroidi à l'aide d'azote liquide. L'hélium permet alors de calculer le volume non occupé par l'échantillon dans le tube hermétiquement fermé (volume mort) et l'azote s'adsorbe à la surface de la poudre.
Dans un second temps, le bain réfrigérant se retire et le tube est chauffé, ce qui entraîne la désorption du gaz de la surface de la poudre.

L'appareil, en fin de mesure, donne la valeur de la surface mesurée. La surface spécifique de l'échantillon est alors calculée selon l'équation suivante :

Surface spécifique (m^2/g) = surface mesurée (m^2) / masse de l'échantillon introduite pesée (g)

A.4. Granulométrie laser

La granulométrie est l'étude de la distribution de la taille des particules d'une poudre. L'appareil utilisé pour les mesures est un granulomètre de type MALVERN MATERSIZER 2000 équipé du Scirocco comme accessoire de dispersion en voie sèche.

La mesure est basée sur la théorie de la diffusion simple et de la diffraction laser. Un faisceau laser est obtenu en collimatant un faisceau issu d'un tube à gaz Hélium - Néon. Ce faisceau est envoyé sur une cellule de mesure dans laquelle les particules sont maintenues en constante

circulation de façon à ce que chaque particule passe au moins une fois devant le rayon laser pendant la durée de la mesure.

Les particules passent à travers le Scirocco composé d'une trémie vibrante sur laquelle elles sont déposées. Une alimentation en air comprimé se fait à la sortie de la trémie et permet de créer la dépression entraînant les particules vers la cellule de mesure. Un aspirateur permet la récupération des particules en fin de circuit.

De manière générale, la granulométrie laser est sensible au volume des particules. Notons que la théorie mathématique interprétant la lumière dispersée par l'échantillon est modélisée pour des sphères opaques à la lumière.

A.5. Détermination la porosité des ciments

Un porosimètre à mercure de type Autopore 94XX, Micromeritics a été utilisé. La porosimétrie à mercure est basée sur la loi de la capillarité qui gouverne la pénétration des liquides dans les petits pores. Le volume de mercure qui pénètre dans les pores est mesuré et tracé en fonction de la pression appliquée. La relation pression–volume représente l'unique caractérisation de la structure des pores. Les pores sont rarement cylindriques, donc l'équation constitue un modèle spécial.

A.6. Spectroscopie d'absorption infrarouge

La spectrophotométrie d'absorption infrarouge fournit des renseignements précis sur la structure d'un composé. Lorsqu'une radiation infrarouge traverse une molécule, on constate une absorption sélective de la lumière aux fréquences de vibration caractéristiques des différentes liaisons.

L'analyse par spectroscopie infrarouge en transmission a été réalisée dans l'intervalle 400cm^{-1} – 4000cm-1, grâce à un spectromètre Nicolet série 5700 sur des pastilles constituées de 1 mg de produit dispersé dans 300mg de KBr.

Les analyses réalisées en réflexion l'ont été avec le même spectromètre, équipe d'un module ATR (pour « Attenuated Total Reflexion »). Dans ce cas, l'échantillon est directement déposé sur le cristal.

A.7. Diffraction des rayons X

Le matériel utilisé est un diffractomètre CPS 120 INEL. Il est constitué d'un générateur de rayons X, d'une anticathode en cuivre, d'un monochromateur et d'un compteur courbe.

A.8. Analyses chimiques par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (S.A.A.)

Lors de ce travail, la S.A.A. a été utilisée pour doser les ions calcium, magnésium et strontium. C'est une méthode de dosage en solution. Par conséquent, les échantillons solides (tels que les ciments) sont préalablement dissous.

L'appareil utilisé est d type modèle SAAF 300. L'analyse est basée sur l'absorption de photons par des atomes à l'état fondamental. Par conséquent, l'échantillon doit être atomisé. Pour cela il est porté à une température allant de 2 à 3000°C, ce qui a pour conséquence de faire passer les éléments présents à l'état de gaz atomique.
Les atomes obtenus se trouvent en grande majorité à l'état fondamental (ni excités, ni ionisés). Ils peuvent alors absorber des photons, apportés par des lampes à cathode creuse constituée de l'élément à doser et bombardées par des atomes d'un gaz rare. Les photons absorbés par l'échantillon sont caractéristiques de l'élément absorbant et leur quantité et proportionnelle au nombre d'atomes de l'élément absorbant. De ce fait, une mesure de l'absorption permet d'obtenir la concentration des éléments qui ont été dosés.

A.9. Analyse par Microscopie Électronique à Balayage (M.E.B.)

L'appareil utilisé lors de cette étude est un Leo 435 VP disposant de trois détecteurs : un détecteur à électrons secondaires, un détecteur à électrons rétrodiffusées et enfin un détecteur refroidi à l'azote liquide et permettant de réaliser l'analyse de l'échantillon en énergie dispersive à rayons X.

A.10. Le broyeur à boulets

Il s'agit d'un broyeur rotatif de petite taille, consistant en une chambre cylindrique remplie de corps broyants sphériques (les « boulets ») résistants à l'usure. La chambre de broyage, de volume 1 litre et de forme cylindrique, est fermée à l'aide d'un couvercle en céramique fixé par une barre en inox maintenue à l'aide de deux vis. Un joint en caoutchouc, placé entre le col de la cuve et la face inférieure du couvercle permet d'assurer l'étanchéité du système. Des boulets en céramique ont été utilisés comme corps broyants. Trois diamètres (19, 9,2 et 5,6 mm) ont été utilisés pour être adaptés à toutes les tailles de particules. Leurs proportions ont respectivement été fixées à ¼, ¼ et ½. Nous avons utilisé un taux de remplissage en boulets de 20 % du volume de la chambre. Quant au taux de remplissage en poudre il a été fixé à 10% du volume interstitiel entre les boulets.

L'opération de broyage en voie sèche commence lorsque l'on place la jarre remplie des boulets et de la poudre sur les rouleaux du broyeur qui sont mis en rotation, à une vitesse de 100 $tr.min^{-1}$.

A.11. Protocole de synthèse du carbonate de strontium ($SrCO_3$)

Cette synthèse a été réalisée par double décomposition, à l'aide de deux solutions dont les compositions sont détaillées dans le tableau A-1.

Tableau A-1 : Composition des solutions cationique et anionique pour la synthèse du $SrCO_3$

Solutions	**Ions d'intérêt**	**Composition des solutions**
A	strontium	8,43 g de $SrCl_2$, 6 H_2O dans 50 mL d'eau désionisée
B	carbonate	0,474 g de NH_4HCO_3 dans 100 mL d'eau désionisée

Une fois homogénéisée, la solution A est versée dans la solution B et le tout est mélangé avec un agitateur magnétique pendant environ 5 minutes. Le mélange est alors laissé pour maturation pendant 30 minutes, puis filtré sur Büchner et lavé avec 150 mL d'eau désionisée. Le produit obtenu est placé au lyophilisateur pendant 24 heures puis stocké à -20°C afin d'éviter toute évolution physico-chimique de cette phase avant son utilisation.

On obtient environ 0,5 g de poudre d'aspect granuleux ; les analyses par diffraction des rayons X (figure A-3) ont montré que le produit synthétisé est pur, mais que son état de cristallinité est médiocre. Un traitement ultérieur par calcination à 700°C pendant 5 heures permet d'améliorer ce paramètre, mais modifie la morphologie des particules : celle-ci est aciculaire après lyophilisation, et globulaire après calcination (données non présentées).
Étant donné que nous souhaitions garder des particules qui avaient la forme d'aiguilles, pour des raisons décrites dans le chapitre IV, nous avons utilisé uniquement le $SrCO_3$ non calciné.

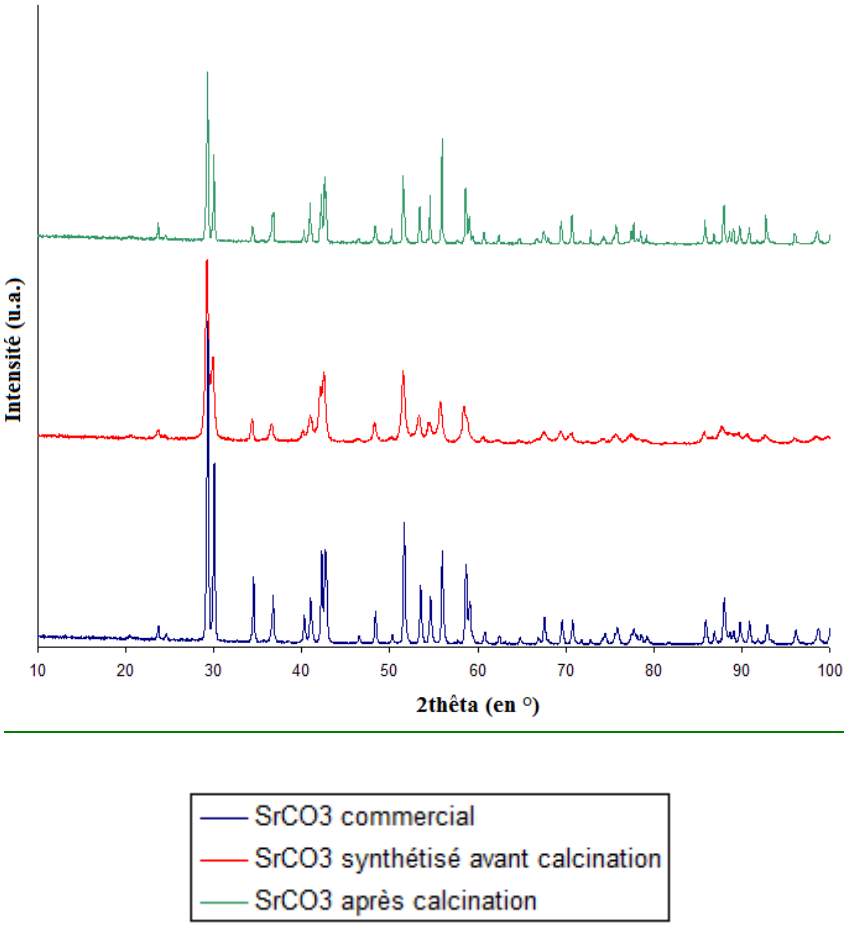


Figure A-3 : Comparaison des diffractogrammes de rayons X du carbonate de strontium commercial, synthétisé avant calcination et synthétisé après calcination.

A.12. Culture cellulaire *in-vitro*

A.12.1 Mise en culture de cellules ostéoprogénitrices (HOP)

Les prélèvements de la moelle osseuse humaine sont réalisés chez les patients sains âgés de 20 à 80 ans ayant donné leur consentement, lors d'interventions chirurgicales au niveau de la diaphyse fémorale après un traumatisme osseux, dans le service de traumatologie du Professeur Durandeau (CHU Pellegrin, Bordeaux).

Les cellules ostéoprogénitrices sont isolées à partir de cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine (appelées HOP pour « Human OsteoProgenitors »). Les cellules

ostéoprogénitrices humaines ont une morphologie de type fibroblastique, ce sont des cellules très étalées, allongées avec de longs prolongements cytoplasmiques. Dès l'obtention de la monocouche (entre 2 et 3 semaines), les cellules de la culture primaire sont détachées grâce à une solution de trypsine à 0,125 % (p/v) - EDTA 0,065% (p/v) dans du PBS 0,1M pH 7,5 sans calcium ni magnésium. La suspension cellulaire est répartie dans des boîtes filles à raison de 5000 cellules/cm^2 constituant ainsi la deuxième génération.

A.12.2. Viabilité cellulaire : technique de « *Live-Dead* »

Cette technique permet de contrôler la viabilité de cellules en culture. Dans les cellules vivantes, le substrat non fluorescent l'acétoxyméthyl calcéine (AM) est clivé par une estérase intracellulaire en calcéine fluorescente verte. Les cellules mortes, dont les membranes sont lésées, laissent entrer l'homodimère-1 d'éthidium (ETD-1) qui s'intercale entre les bases de l'acide nucléique ce qui a pour conséquence une amplification de la fluorescence rouge. Les substrats fluorescents de « Live/Dead » sont préparés à partir de la trousse «Viability/Cytotoxicity Kit for animal cells 1000 assays » selon les instructions données.

A.12.3. Suivi de la prolifération cellulaire : Test au MTT ou test d'activité métabolique

Le MTT ou Bromure de 3-(4-5 diméthylthiasol-2-yl) diphényl Tétrazolium (Sigma) est un sel de tétrazolium de couleur jaune en solution aqueuse à pH neutre. Il est réduit en cristaux bleus de formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. L'évaluation de la quantité de formazan générée par les cellules après leur incubation en présence des extraits de matériaux est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules vivantes.

Après 24 heures d'incubation des extraits en présence des cellules, les plaques de culture sont retirées de l'incubateur et chaque puits est rincé avec 200µL de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 (InVitrogen). La solution mère de MTT est diluée au 1/5 (v/v) dans du milieu sans rouge phénol (InVitrogen), 125 µL de la solution obtenue sont distribués dans chaque puits. Après 3 heures d'incubation à 37°C, le surnageant est éliminé et les cristaux de formazan formés sont

solubilisés par addition de 100 µl de DMSO (Diméthyl Sulfoxide Sigma). Les plaques sont lues rapidement (coloration stable 1 heure) au spectrophotomètre DYNEX MRX (Laboratoire Dynatech) à la longueur d'onde de 540 nm, la coloration s'étendant de l'incolore pour les dilutions entraînant 100% de cytotoxicité (témoin positif réalisé en présence de 0,1% (v/v) de Triton X 100) à une couleur violacée d'autant plus intense que les extraits sont moins toxiques. Les résultats seront exprimés en pourcentage par rapport au témoin qui représente le 100 % d'activité métabolique.

A.12.4. Caractérisation des modèles par analyse moléculaire : recherche de l'expression de gène spécifique par des techniques de biologie moléculaire

A confluence, traitées ou non les cellules sont récupérées après action de la trypsine et reprises dans du milieu supplémenté avec 10% de SVF, lavées avec du PBS 0,1M froid et centrifugées à basse vitesse. Le culot sec est conservé à -80°C si l'extraction d'ARN n'est pas immédiate.
Les ARN totaux sont extraits avec le kit Nucleospin RNA II. Un des aspects le plus important de l'extraction des ARN est de protéger cette protéine des nucléases.

Par cette méthode, les cellules sont lysées par incubation dans une solution contenant un grand taux d'ions chaotropiques : Urée 6-8M et chorure de guanidine 6M (l'urée étant une molécule non chargée et le chorure de guanidine étant un sel d'hydrochlorure). Ce tampon de lyse inactive immédiatement les RNases qui sont présentes dans tout matériel biologique et crée des conditions appropriées de liaison avec la membrane de silice. Les ADN contaminants seront dégradés par une solution de DNase directement appliquée sur la membrane pendant la préparation. Les étapes de lavages faites avec deux tampons différents enlèvent toute trace de sels et de débris cellulaires. L'ARN pur est finalement élué dans des conditions de basse force ionique avec de l'eau sans RNase. L'extraction d'ARN est réalisée à température ambiante, la stabilité de l'ARN est gardée intacte à-20°C pour une courte durée et à -80°C pour de plus longue période.

Avant de passer à l'étape de la synthèse des ADNc, nous devons calculer la concentration d'ARN que nous obtenons pour chaque échantillon dans l'eau. Pour cela nous utilisons un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260nm où 1 unité de DO correspond à 40µg/mL

d'ARN. Chaque échantillon est dilué au 1/10 pour la lecture.
Selon les données du fournisseur : 5 x 10^6 de cellules traitées donnent 50µg d'ARN. Notre expérience personnelle nous donne pour la même quantité de cellules, un maximum de 35µg d'ARN. Et ces taux sont très variables selon le type cellulaire utilisé.

A.12.5. Technique de la PCR

La PCR (pour « Polymerase Chain Reaction ») est par définition une réaction en chaîne au cours de laquelle les produits d'un cycle d'amplification servent de matrice pour le cycle suivant. Ainsi, la réaction en chaîne qui s'établit par la répétition des cycles de dénaturation-hybridation-élongation aboutit à une accumulation exponentielle théorique de 2^n fois par molécule d'ADN, c'est-à-dire la quantité de produits PCR double à chaque cycle d'amplification.

ANNEXE B : Noms et compositions de divers ciments phosphocalciques commercialisés

Nom du ciment	**Fabricant**	**Composition de la phase solide**	**Composition de la phase liquide**	**L/S**	**Produit final**
Bonesource	Stryker – Leibinger Corporation	TTCP + DCPA	mélange de Na_2HPO_4 + NaH_2PO4	0,25 (g/cm^3)	Apatite
Biocement D	Merck GmbH	α – TCP + DCP + $CaCO_3$ + pHA			Apatite carbonatée
Biopex	Mitsubishi Materials	α – TCP + TTCP + DCPD + HA + $Mg_3(PO_4)_2$	acide succinique + sulfate de chondroitine		Apatite
α – BSM (Biobon, Embarc)	ETEX	ACP + DCPD	sérum physiologique	0,67 (g/cm^3)	Apatite
Calcibon	Biomet	α – TCP + DCPA + $CaCO_3$ + pHA	Na_2SO_4		Apatite
Cerapaste (Primafix)	NGK Spark Plug	TTCP + DCPA	sulphate de sodium		Apatite
Cementek	Teknimed	TTCP + α – TCP + $Ca(OH)_2$ + glycerophoshate de sodium	$Ca(H_2PO_4)_2$	0,43 (g/cm^3)	Apatite
ChronOS	Synthes	β – TCP + MCPM + $MgHPO_4$ + $MgSO_4$ + $Na_2H_2P_2O_7$	hyaluronate de sodium		Brushite
Eurobone	Kasios	β – TCP + $Na_4P_2O_7$	eau + H_3PO_4 + H_2SO_4		Brushite

Fracture Grout	Norian (Synthes)	TTCP + $CaCO_3$	H_3PO_4		HA
KyphOs	Medtronic	α – TCP + $Mg_3(PO_4)_2$ + $MgHPO_4$ + $SrCO_3$	$(NH_4)_2HPO_4$	0,4 ($mL.g^{-1}$)	Apatite
Mimix	Biomet	TTCP + α – TCP + $C_6H_5O_7Na_3$, $2H_2O$	$C_6H_8O_7$		Apatite
Norian SRS	Synthes	α – TCP + $CaCO_3$ + MCPM	$Na_2H(PO_4)$	0,5	Apatite
Rebone	Shangai Rebone Biomaterials	TTCP + DCPA	eau		Apatite
VitalOs ♣	CalciOS	1 : β – TCP + $Na_2H_2P_2O_7$ 2 : MCPM + $CaSO_4$, $2H_2O$	1 : eau 2 : eau + H_3PO_4		Brushite

♣ le ciment est en fait composé de deux liquides dans lesquels sont répartis les constituants pulvérulents solides

La signification des acronymes utilisés est rappelée ci-dessous. Pour plus de précisions sur ces composés, se reporter au tableau I-1.

ACP : phosphate de calcium amorphe
DCPA : phosphate dicalcique anhydre
DCPD : phosphate dicalcique dihydraté
HA : hydroxyapatite
pHA : HA précipitée
MCPM : phosphate monocalcique monohydraté
α – TCP : phosphate tricalcique alpha
β – TCP : phosphate tricalcique beta
TTCP : phosphate tétracalcique

ANNEXE C : Revue bibliographique des principales stratégies employées pour la mesure de l'injectabilité de ciments hydrauliques

Plusieurs méthodes et protocoles de mesure de l'injectabilité ont été proposés. Cette annexe répertorie les différentes stratégies et le tableau détaille les différentes géométries de systèmes employés.

Notons que plusieurs auteurs ont réalisé des mesures rhéologiques sur des pâtes et des suspensions [Baroud et coll., 2005 ; Liu et coll., 2006-a ; Combes et coll., 2009]. Ces études ne seront pas détaillées dans cette partie.

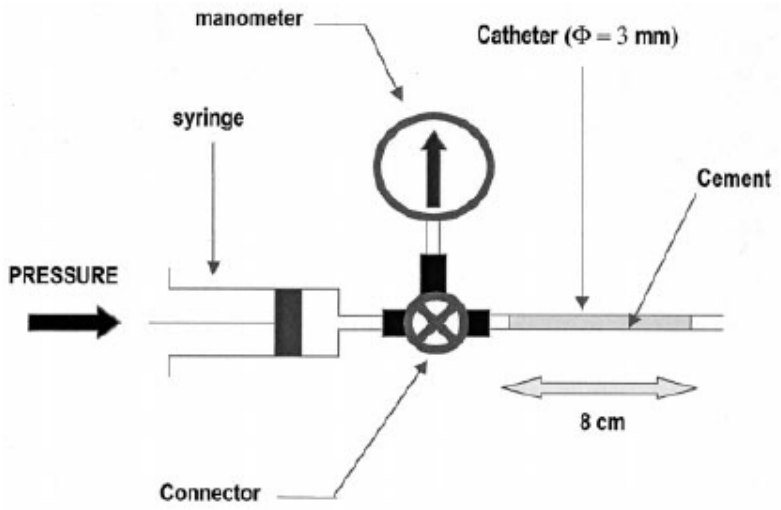
Méthode 1 : mesure du **pourcentage de pâte extrudé**

L'injectabilité est définie par l'absence de séparation de phase et est alors mesurée en pourcentage de pâte qu'il est possible d'extruder (en masse ou en volume), selon l'équation suivante :

$$Injectabilité\ (\%) = \frac{Masse\ (ou\ volume)\ de\ pâte\ extrudée\ de\ la\ seringue\ \times 100}{Masse\ (ou\ volume)\ totale\ de\ pâte\ insérée\ dans\ la\ seringue} \qquad \text{(éq. III-1)}$$

Méthode 2 : mesure de la pression d'injection

Le dispositif est constitué d'une seringue et d'un connecteur en « T », relié à un cathéter en polyéthylène de diamètre 3 mm et de longueur 8 cm et à un manomètre (voir schéma ci-dessous). La pression requise pour extruder la pâte est donc indiquée par le manomètre lorsque le ciment est injecté.



[Leroux et coll., 1999 ; Goncalves, 2001]

Méthode 3 : mesure de la charge d'injection

Après gâchage, le ciment est introduit dans une seringue de 2 ml reliée à un cathéter de 3 mm de diamètre et de 8 cm de long ; la seringue est placée sur le socle d'un analyseur de texture TA-XT2 relié à un logiciel qui enregistre la contrainte appliquée en fonction du déplacement du piston. A partir de ces courbes, il est possible de déterminer le maximum de contrainte en fonction du temps et donc de tracer une « courbe d'injectabilité » [Goncalves, 2001].

Référence	**Force exercée**	**Géométrie de la seringue**	**Quantité de ciment introduite dans la seringue**	**Vitesse de déplacement du piston**	**Mesure réalisée avec une machine (M) ou à la main (H)**	**Temps après mélange phase solide + phase liquide**	**Résultat**
[Barralet et coll., 2004]	Arrêt de la mesure à 300 N	5 mL Øint de l'aiguille : 800 µm, 32 mm	3 g de ciment	50 mm/min	M (Instron 5544)	nr	Pourcentage massique extrudé
[Bohner et Baroud, 2005-a]	Pas de maximum. La force d'injection est enregistrée à partir du moment où le piston est déjà descendu de 5 mm pour éviter les effets transitoires	Extrusion au travers d'un cathéter Øint du cathéter : « gauge »10 ou 14 (test de référence réalisé avec 10)	15 g de phase solide	24 mm/min ou 120 mm/min (test de référence réalisé à 120 mm/min)	M	Gâchage pendant 30 seconde puis extrusion directe	Courbe d'extrusion (force d'injection en fonction de la distance parcourue par le piston) + pourcentage massique extrudé
[Burguera et coll., 2006]	Arrêt de la mesure à 100 N	10 mL Ø seringue : 10 mm Øouverture : 2, 8 mm Pas d'aiguille	2 g de phase solide + 1 g de phase liquide	15 mm / min	M (machine de compression 5500R, MTS Systems Corp., Cary)	1,5 min	Pourcentage massique extrudé

Référence	**Force exercée**	**Géométrie de la seringue**	**Quantité de ciment introduite dans la seringue**	**Vitesse de déplacement du piston**	**Mesure réalisée avec une machine (M) ou à la main (H)**	**Temps après mélange phase solide + phase liquide**	**Résultat**
[Delgado et coll., 2005]	Arrêt de la mesure à 100 N	5 mL Ø de l'aiguille : 2 mm	nr sûrement 5 mL (seringue pleine)	nr	M (MTS 858 Bionix universal machine)	5 min	Pourcentage massique extrudé
[Gbureck et coll., 2004 ; Gbureck et coll., 2005]	Arrêt de la mesure à 300 N	10 mL Øint de l'aiguille : 800 µm	10 g de phase solide	20 mm / min	M (Zwick 1440)	nr	Pourcentage massique extrudé + courbe de la force d'injection en fonction du déplacement du piston
[Ginebra et coll., 2001]	Arrêt de la mesure à 100 N	20 mL Ø seringue : 20 mm Øouverture : 2 mm Pas d'aiguille	7,5 g de phase solide	15 mm / min	M (Servohydraulic testing machine)	160 s ou 210 s	Pourcentage massique extrudé
[Gisep et coll., 2006]	Arrêt de la mesure à 500 N	10 mL Cathéter attaché à la seringue Øint cathéter : G12 = 2, 4 mm L cathéter : 100 mm	10 mL de pâte (seringue pleine)	12 mm/min	M (Instron 5866 testing machine)	2 à 4 min suivant le ciment testé (en suivant les instructions données avec les ciments – déjà commercialisés)	Courbe de la force d'injection en fonction du déplacement du piston + mesure de la quantité de matériau injectable en-dessous de 200 N

Référence	**Force exercée**	**Géométrie de la seringue**	**Quantité de ciment introduite dans la seringue**	**Vitesse de déplacement du piston**	**Mesure réalisée avec une machine (M) ou à la main (H)**	**Temps après mélange phase solide + phase liquide**	**Résultat**
[Khairoun et coll., 1998 ; Khairoun et coll., 1999 ; Sarda et coll., 2002]	Arrêt de la mesure à 100 N (pour les essais à la machine)	20 mL Øouverture : 2 mm Pas d'aiguille	2 à 4 g de pâte de ciment	15 mm/min	H + M	Plusieurs essais Les tests de référence sont réalisés à 1,5 minutes	Pourcentage massique extrudé
[Wang et coll., 2006]	Poids compressif d'1 kg	nr Øint de l'aiguille : 1, 6 mm	nr	nr	M	2 min	Pourcentage volumique extrudé après 2 minutes d'extrusion
[Xu et coll., 2006]	Arrêt de la mesure à 100 N	10 mL Ø seringue : 10 mm Øint de l'ouverture : 2, 8 mm Pas d'aiguille	2 g de phase solide + 1 g de liquide	15 mm / min	M (5500 R, MTS Systems Corp., Cary)	1,5 ou 5 ou 10 ou 15 min (test de référence réalisé à 1,5 minutes) après gâchage automatique pendant 15 secondes	Pourcentage massique extrudé + Courbe de la force d'injection en fonction du déplacement du piston

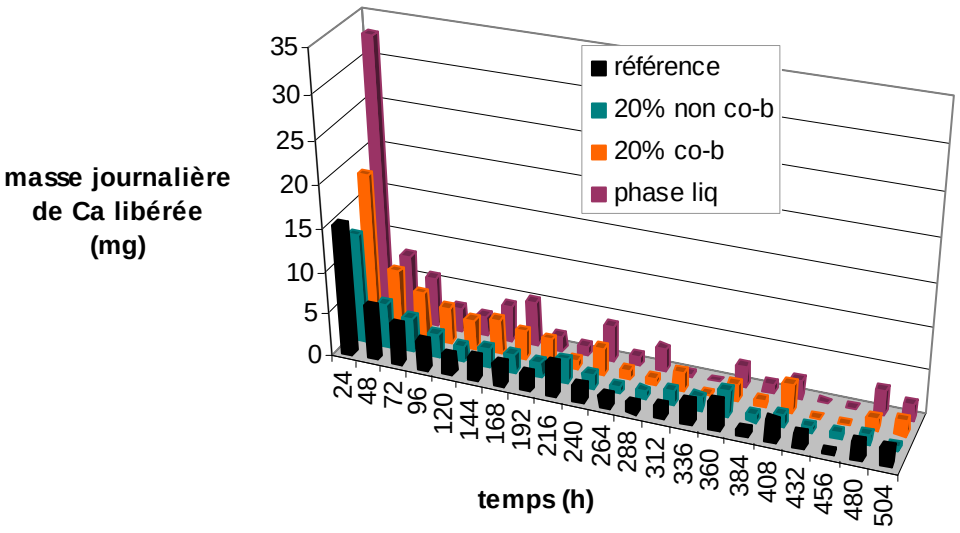
nr : non renseigné

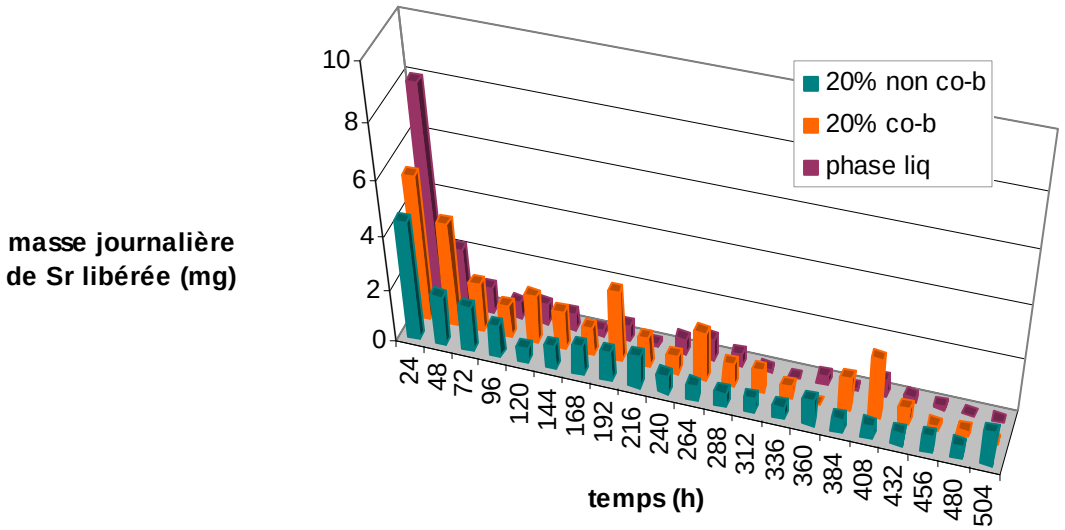
ANNEXE D : Solubilité de divers sels de strontium

sel de strontium	solubilité (g/cc d'eau)
$SrCO_3$	0,0011
$SrSO_4$	0,0113
$Sr(OH)_2$	0,41
SrO	0,69
$Sr(OH)_2$, 8 H_2O	0,90
$SrCl_2$	53,8
$Sr(NO3)_2$, 4 H_2O	60,43
$Sr(NO3)_2$	70,9
$SrCl_2$, 6 H_2O	106,2

d'après [Handbooks of Chemistry and Physics, 64th edition, pp. 83-84]

ANNEXE E : Doses journalières d'ions strontium et calcium libérés





ANNEXE F : Équilibres en solution

EQUILIBRES des phosphates et des carbonates EN SOLUTION	
$HCO_3^- \rightarrow CO_3^{2-} + H^+$	log $K_{40°C}$ = + 10,220
$H_2CO_3 \rightarrow HCO_3^- + H^+$	log $K_{40°C}$ = + 6,298
$NaCO_3^- \rightarrow Na^+ + CO_3^{2-}$	log $K_{25°C}$ = + 1,27
$NaHCO_3 \rightarrow Na^+ + HCO_3^-$	log $K_{25°C}$ = - 0,25
$CaCO_3 \rightarrow Ca^{2+} + CO_3^{2-}$	log $K_{25°C}$ = + 3,20
$CaHCO_3^+ \rightarrow Ca^{2+} + HCO_3^-$	log $K_{25°C}$ = + 1,27
$CaOH^+ \rightarrow Ca^{2+} + OH^-$	log $K_{25°C}$ = + 1,30
$H_2O \rightarrow OH^- + H^+$	log $K_{40°C}$ = + 13,544
$NaOH \rightarrow Na^+ + OH^-$	log $K_{25°C}$ = + 0,1
$HPO_4^{2-} \rightarrow PO_4^{3-} + H^+$	log $K_{25°C}$ = + 12,375
$H_2PO_4^- \rightarrow HPO_4^{2-} + H^+$	log $K_{40°C}$ = + 7,179
$H_3PO_4 \rightarrow H_2PO_4^- + H^+$	log $K_{40°C}$ = + 2,222
$CaHPO_4 \rightarrow Ca^{2+} + HPO_4^{2-}$	log $K_{37°C}$ = + 2,70
$NaPO_4^{2-} \rightarrow Na^+ + PO_4^{3-}$	log $K_{25°C}$ = + 1,43
$NaHPO_4^- \rightarrow Na^+ + HPO_4^{2-}$	log $K_{25°C}$ = + 1,07
$NaH_2PO_4 \rightarrow Na^+ + H_2PO_4^-$	log $K_{25°C}$ = + 0,3
$Na_2PO_4^- \rightarrow Na^+ + Na_2PO_4^-$	log $K_{25°C}$ = + 1,16
$Na_2HPO_4 \rightarrow H^+ + Na_2PO_4^-$	log $K_{25°C}$ = + 10,73
l'équilibre avec le CO_2 gazeux n'est pas pris en considération dans notre système	

SOLIDES

$Ca^{2+} + CO_3^{2-} \rightarrow CaCO_3$ (s)	[Plummer et Busenberg 1982]
	log $K_{37°C}$ (calcite) = -8,56
	log $K_{37°C}$ (aragonite) = -8,42
	log $K_{37°C}$ (vatérite) = -8,02
sels de phosphates	
	log $K_{37°C}$ (DCPD) = -6,67
	log $K_{37°C}$ (DCPA) = -7,04
	log $K_{37°C}$ (β-TCP) = -29,55
	log $K_{37°C}$ (OCP) = -49,3
	log $K_{37°C}$ (HA) = -58,63

ANNEXE G : Préparation des solutions titrantes

Deux solutions titrantes sont préparées, la première dite « cationique », la seconde « anionique ». Dans le cas de la cristallisation de $CaCO_3$, la solution titrante cationique devra apporter en solutions autant d'ions calcium qu'il n'en aura été consommé. La solution titrante cationique compense quant à elle les ions carbonate et maintient la force ionique constante au sein de la solution de travail.

Solution titrante T1 (compense pour le calcium) :

$$[Ca^{2+}]_{T1} = 10\,[Ca^{2+}] + 2\,[Ca^{2+}]$$

Solution titrante T2 (compense pour le carbonate et la force ionique) :

$$\begin{cases} [CO_3^{2-}]_{T2} = 10\,[Ca^{2+}] + 2\,[CO_3^{2-}] \\ [OH^-]_{T2} = 10\,[Ca^{2+}] - 2\,[H^+] \end{cases}$$

où les concentrations indexées « T1 » et « T2 » sont les concentrations des ions dans les solutions respectives et les concentrations non indexées correspondent aux concentrations introduites initialement dans la solution de travail.

Notons que les solutions titrantes ne contiennent pas d'ions phosphate et ne compensent donc pas ceux qui seront éventuellement consommés.

Résumé

L'implantation de matériaux pour reconstruction osseuse par des techniques chirurgicales peu invasives nécessite des substituts osseux synthétiques, résorbables, injectables et radio-opaques. C'est pourquoi le contrôle des propriétés de ces matériaux est primordial. Dans ce contexte, ce travail s'intéresse à la formulation de deux ciments, l'un uniquement à base de carbonate de calcium, le second composé d'un mélange de carbonate de calcium et de phosphate de calcium en quantités égales.

Le traitement des phases solides pulvérulentes de ces deux ciments par les procédés de broyage et de co-broyage a été étudié. Ces procédés permettent entre autres de diminuer la taille moyenne des particules. Un mélange intime et homogène entre les constituants de la phase solide est obtenu grâce au co-broyage et les propriétés des ciments sont très significativement améliorées. Le temps de prise est diminué et l'injectabilité de la pâte est fortement augmentée (facteur 100). Cette dernière propriété a pu être évaluée grâce à la mise au point d'un dispositif et d'un protocole de mesure adaptés à un analyseur de texture.

Dans le but de visualiser par radiographie aux rayons X l'introduction du ciment injectable dans le site osseux à réparer, du strontium a été introduit en tant qu'agent de contraste radio-opacifiant. Deux voies d'ajout à la formulation du ciment ont été étudiées : la première sous forme de $SrCO_3$ dans la phase solide, la seconde sous forme de $SrCl_2$ dans la phase liquide. Les études réalisées montrent que le co-broyage de la phase solide contenant du $SrCO_3$ est intéressant pour homogénéiser la dispersion de l'agent de contraste et ainsi optimiser la quantité de strontium à incorporer pour atteindre le niveau de radio-opacité requis par la norme en vigueur. De plus, il a été observé que l'ajout de $SrCl_2$ dans la phase liquide rend la pâte plus visqueuse et diminue son injectabilité. Par ailleurs, l'étude de la dissolution de ces ciments à pH physiologique a révélé une libération lente et prolongée du strontium. Enfin, des tests cellulaires *in-vitro* ont été réalisés sur ces ciments ; ils mettent en évidence l'excellent comportement de cellules ostéoprogénitrices vis-à-vis de ces formulations de ciment ainsi que l'intérêt d'utiliser le sel de $SrCO_3$ plutôt que de $SrCl_2$.

La dernière partie de ce travail concerne l'étude de la cristallisation de l'aragonite, variété polymorphe du carbonate de calcium, en présence d'ions phosphate, connus pour inhiber la cristallisation du $CaCO_3$. Grâce à une modélisation à l'aide de la technique de croissance cristalline à composition constante permettant de se placer dans des conditions proches de celles de la prise du ciment uniquement à base de carbonate de calcium *in-vivo*, il a été montré que la présence d'ions phosphate, même en très faible quantité (concentration < 0,5 µM) diminue à la fois la vitesse de germination et la vitesse de croissance cristalline de l'aragonite.

L'ensemble de ces travaux contribue à l'optimisation des propriétés de ces ciments biomédicaux et à mieux appréhender leur comportement que ce soit au moment de leur implantation *in-vivo* ou de leur évolution et suivi post-opératoires. D'un point de vue fondamental, ces travaux pluridisciplinaires menés dans des conditions modèles *in-vitro* mais également dans le cadre d'une expérimentation *in-vivo* ont mis en évidence l'intérêt de confronter ces deux approches pour identifier et comprendre les phénomènes et les réactions impliqués lors de la prise des ciments à base de carbonate de calcium *in-vitro* et *in-vivo*.

Mots – clés :
carbonate de calcium, phosphate de calcium, ciment osseux, co-broyage, injectabilité, radio-opacité, strontium, cristallisation