ANNÉE 2014

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1

sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Sciences des Matériaux

Ecole doctorale Sciences de la Matière

présentée par

Eric WERS

Préparée à l'unité de recherche UMR CNRS 6226
Institut des Sciences Chimiques de Rennes
Sciences et Propriétés de la Matière

Elaboration d'un biomatériau poreux à base d'une matrice vitreuse induisant le phénomène d'ostéoconduction

Thèse soutenue à Rennes
le 24 octobre 2014

devant le jury composé de :

Claudine FOLLET
Professeur, Université de Valenciennes / rapporteur

Hafedh EL FEKI
Professeur, Université de Sfax, Tunisie / rapporteur

Jean-Michel BOULER
Professeur, Université de Nantes / *examinateur*

Bruno BUREAU
Professeur, Université de Rennes 1 / *examinateur*

Sylvie JEANNE
Professeur, Université de Rennes 1 / *examinateur*

Pascal PELLEN
Ingénieur de Recherche, Université de Rennes 1/ *membre invité*

Hassane OUDADESSE
Professeur, Université de Rennes 1 / *directeur de thèse*

A ma famille,

A ceux qui m'ont soutenu et qui ont toujours cru en moi.

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu Monsieur Jean-Luc Adam, directeur de l'UMR CNRS 6226, et Madame Maryline Guilloux-Viry, responsable de l'équipe Chimie du Solide et des Matériaux, pour m'avoir accueilli au sein de leur unité et de leur équipe pendant la durée de ma thèse.

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à Monsieur Hassane Oudadesse, directeur de cette thèse, pour m'avoir accueilli dans son équipe. La confiance et la grande liberté qu'il m'a accordées m'ont permis de mener à bien ce travail de recherche. J'ai pu bénéficier, durant ces trois années, de son goût pour la recherche qu'il a su me communiquer sans se départir de ses qualités humaines. Qu'il reçoive, outre ma gratitude, toute mon estime et ma considération.

Je suis honoré que Madame Claudine Follet, Professeur au laboratoire des Matériaux Céramiques et des Procédés Associés de l'Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis ait accepté de participer à mon jury de thèse en tant que rapporteur.
Je suis reconnaissant envers Monsieur Hafedh El Feki, Professeur au laboratoire des Sciences des Matériaux et de l'Environnement de l'Université de Sfax en Tunisie, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail.

J'adresse mes remerciements à :
Madame Sylvie Jeanne, Professeur à la faculté d'Odontologie de l'Université de Rennes 1 ;
Monsieur Jean-Michel Bouler, Professeur au laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire de l'Université de Nantes ;
Monsieur Bruno Bureau, Professeur au laboratoire Verres et Céramiques de l'Université de Rennes 1 ;
Monsieur Pascal Pellen, Ingénieur de recherche à la faculté d'Odontologie de l'Université de Rennes 1.
Qu'ils reçoivent le témoignage de ma reconnaissance pour leur participation à mon jury de thèse.

J'exprime ma gratitude et mon amitié à Bertrand Lefeuvre, membre de l'équipe Biomatériaux, pour tous les moments passés ensemble. Je le remercie pour son aide, pour son soutien, pour sa gentillesse et pour sa bonne humeur. Je lui souhaite le meilleur.

Merci également aux collègues de la faculté d'Odontologie, membres de notre groupe de recherche Biomatériaux et de notre UMR CNRS 6226, pour la réalisation des tests de cytotoxicité.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Abdelfattah El Feki, Professeur à la faculté des sciences de Sfax, et Monsieur Hassid Keskes, Professeur au service d'orthopédie à la faculté de médecine de Sfax, pour la réalisation des expérimentations *in vivo*.

Un grand merci également à : Bruno Bureau, Claire Roiland, Odile Merdrignac et Joseph Le Lannic pour les analyses par RMN du Solide, par BET et par MEB.

J'adresse ma sympathie et mes remerciements à Monsieur Yvon Guyomard de l'IUT de Saint-Brieuc qui m'a tendu la main pour effectuer des enseignements. Il m'a fait confiance dans la préparation et l'exécution en solo des travaux pratiques de chimie donnés aux premières années de la section Génie Biologique. J'ai apprécié ses conseils, son soutien et sa grande gentillesse.

Je remercie Gwendoline avec laquelle je partage ma vie depuis quelques années maintenant. Je la remercie pour ses encouragements, pour sa patience, pour sa gentillesse et pour tout l'amour qu'elle m'apporte au quotidien.

J'exprime mes remerciements à tous mes amis : Nico K, Nico, Eug, Manu, Sylvain, Seb, Sarah, Nolwenn, Morgane, Cécile, Vincent avec lesquels j'ai partagé d'excellents moments en dehors du travail et qui m'ont rechargé les batteries quand il le fallait.

Enfin, je remercie mes parents pour leur soutien, leurs encouragements et pour leurs conseils. Un merci particulier à mon père qui m'a toujours poussé à aller plus loin dans les études. Je remercie ma sœur pour ses encouragements. Merci à mon frère pour ses encouragements et pour son soutien. Merci de m'avoir fait lâcher du lest avec notre passion commune qu'est le tennis. Un grand merci à vous tous pour tout !

Sommaire

Introduction 7

Chapitre 1 : Généralités sur le tissu osseux et les biomatériaux d'origine naturelle et synthétique. 11
I. Le tissu osseux 11
A. Rôles du tissu osseux 11
B. Organisation du tissu osseux 12
B.1. Organisation structurale 12
B.2. Organisation architecturale 12
B.3. Classification des os 14
C. Composition du tissu osseux 15
C.1. La matrice osseuse 15
C.2. Les cellules osseuses 16
D. Remodelage osseux 19
D.1. Les concepts et les bases cellulaires 19
D.2. L'adaptation aux contraintes mécaniques 21
II. Les biomatériaux d'origine naturelle et synthétique 22
A. Généralités sur les biomatériaux 22
B. Biomatériaux d'origine naturelle 23
B.1. Les greffes osseuses 24
B.2. Le corail 24
B.3. Le chitosan et les squelettes d'éponge 25
C. Biomatériaux d'origine synthétique 25
C.1. Classification des biomatériaux synthétiques 26
C.2. Le carbonate de calcium 27
C.3. Les phosphates de calcium 28
C.4. Les sulfates de calcium 30
C.5. Les biomatériaux à base de biopolymères 30
C.6. Nouveaux biomatériaux en développement 31
C.7. Les verres bioactifs 34
III. Les verres bioactifs : biomatériaux d'origine synthétique 36
A. Généralités sur les verres 36

A.1. Définitions du verre 36
A.2. Propriétés du verre 36
A.3. Structure et composition chimique du verre 37
B. Verres bioactifs et concept de bioactivité 40
B.1. Indice de bioactivité 40
B.2. Réactions chimiques à l'origine de la bioactivité 41
C. Synthèse d'un verre bioactif 43
Références Chapitre 1 44

Chapitre 2 : Protocoles de synthèse et techniques d'analyses physico-chimiques. 61
I. Synthèses des biomatériaux étudiés 61
A. Elaboration par fusion des verres bioactifs 61
B. Synthèse d'une vitrocéramique poreuse 62
B.1. Présentation de la méthode d'expansion 63
B.2. Principe général de la méthode de synthèse 63
B.3. Choix des espèces réactives 64
B.4. Protocole de synthèse 66
C. Conception de scaffolds chitosan/verre bioactif 67
II. Principes et protocoles des techniques de caractérisations physico-chimiques des biomatériaux élaborés 70
A. Technique de caractérisation structurale 70
A.1. La diffraction des rayons X (DRX) 70
A.2. La résonance magnétique nucléaire (RMN) 71
B. Techniques de caractérisation optique 71
B.1. La spectroscopie infrarouge (FT-IR) 71
B.2. La spectrométrie d'émission optique (ICP-OES) 72
B.3 La spectroscopie Ultraviolet-Visible (UV) 73
B.4. La granulométrie laser 73
C. Microscopie électronique à balayage (MEB) 74
D. Analyse thermique différentielle 76
E. Mesure de la porosité 76
E.1. La méthode d'Archimède 76
E.2. La porosimétrie à mercure 77
E.3. La méthode BET 77
III. Evaluation du comportement des matériaux élaborés après contact avec un liquide physiologique synthétique (SBF)-Interaction solide/liquide 79

A. Etude *in vitro* en l'absence de cellules 79
A.1. Présentation et choix du milieu 79
A.2. Protocole expérimental 80
B. Evaluation de la cytotoxicité des biomatériaux 84
B.1. Présentation des tests de viabilité cellulaire 84
B.2 Protocole expérimental 87
C. Protocole des expérimentations *in vivo* 88
C.1. Préparation des biomatériaux 89
C.2. Implantation des biomatériaux 89
Références Chapitre 2 91

Chapitre 3 : Etudes physico-chimiques et biologiques de verres bioactifs dopés au zinc, titane, cuivre et argent. 95
I. Caractérisations physico-chimiques des verres bioactifs pur et dopés 95
A. Compositions chimiques des verres étudiés et intérêts des éléments métalliques introduits 95
A.1. Compositions chimiques des verres élaborés 95
A.2. Intérêts biologiques des éléments métalliques introduits 97
B. Caractérisations physico-chimiques des verres pur et dopés 100
II. Comportement thermique des verres 105
A. Introduction 105
B. Analyse Thermique Différentielle 105
B.1. Influence des oxydes sur les caractéristiques thermiques des verres 107
B.2. Etude thermique des verres dopés - Effet de la teneur en éléments métalliques sur leurs températures caractéristiques. 109
C. Phénomène d'excès d'entropie dans les verres et influence des teneurs en éléments dopants. 116
C.1. Présentation 116
C.2. Formule établie pour le calcul de l'excès d'entropie 117
C.3. Excès d'entropie des verres dopés au zinc, au titane, au cuivre ou à l'argent 118
III. Etude *in vitro* sans cellules des verres dopés au zinc, au titane, au cuivre et à l'argent 122
A. Comportement *in vitro* des verres dopés au zinc 122
A.1. Caractérisations structurales des verres dopés au zinc après immersion dans le SBF 122
A.2. Morphologie de la surface des verres après immersion. 124
A.3. Composition ionique du SBF après immersion des verres dopés au zinc à différent délais. 127
B. Comportement *in vitro* des verres dopés au titane 133
B.1. Caractérisations structurales des verres dopés au titane après immersion dans le SBF .. 133

B.2. Morphologie de la surface des verres après immersion 136
B.3. Composition ionique du SBF après immersion des verres dopés au titane à différents délais 138
C. Comportement *in vitro* des verres dopés au cuivre, à l'argent et en cuivre/zinc 143
C.1. Caractérisations structurales des verres après immersion dans le SBF 143
C.2. Morphologie de la surface des verres après immersion 145
C.3. Composition ionique du SBF après immersion des verres à différents délais 147
IV. Etude de la cytotoxicité des verres dopés au zinc, au titane, au cuivre et à l'argent.....153
A. Résultats des tests colorimétriques de viabilité sur les verres dopés au zinc 153
B. Résultats des tests colorimétriques de viabilité sur les verres dopés au titane 156
C. Résultats des tests colorimétriques de viabilité sur les verres dopés au cuivre, au zinc et à l'argent. 158
Références Chapitre 3.....162

Chapitre 4 : Comportement *in vitro* et *in vivo* d'une vitrocéramique poreuse. 181
I. Caractérisations physico-chimiques d'une vitrocéramique poreuse 181
A. Caractérisations physico-chimiques du biomatériau poreux.....181
A.1. Diffraction des rayons X.....181
A.2. Analyse par résonance magnétique nucléaire 183
A.3. Analyse par thermo-diffractométrie.....185
A.4. Spectroscopie d'absorption infrarouge.....187
B. Evaluation de la porosité par différentes méthodes 188
B.1. Les différentes porosités.....188
B.2. Calcul du volume de porosité par la méthode d'Archimède.....189
B.3. Détermination de la surface spécifique et du type de porosité par la méthode BET 190
B.4. Répartition en taille des pores par porosimétrie à mercure.....193
B.5. Etude morphologique par MEB.....194
II. Comportement *in vitro* d'une vitrocéramique poreuse au contact d'un liquide physiologique synthétique. 198
A. Caractérisations structurales du biomatériau poreux après immersion dans le SBF.....198
B. Echange ionique entre le matériau poreux et le liquide physiologique synthétique 202
C. Etude morphologique des échantillons après immersion.....206
III. Tests colorimétriques de viabilité cellulaire d'une vitrocéramique poreuse.....209
A. Evaluation de la cytotoxicité du biomatériau poreux. 209
B. Résultats des tests au MTT 210
B.1. Sur la lignée ostéoblastique.....210

B.2. Sur la lignée endothéliale.....211
B.3. Comportement cellulaire à la surface des échantillons observé par microscopie électronique à balayage.....213
IV. Expérimentations *in vivo* de la vitrocéramique poreuse.....219
A. Etudes physico-chimiques de la cinétique d'ossification.....219
A.1. Etude radiologique.....220
A.2. Caractérisations structurales des explants.....222
A.3. Etudes morphologiques par MEB couplée à l'analyse chimique.....225
A.4. Etude par RMN du Solide.....230
Références Chapitre 4.....237

Chapitre 5 : Etudes de scaffolds chitosan-verre bioactif, support pour la vectorisation d'une substance médicamenteuse.....241
I. Etudes de scaffolds chitosan-verre bioactif pour l'ingénierie tissulaire.....241
A. Présentation des scaffolds chitosan-verre bioactif.....241
A.1 Définition d'un scaffold.....242
A.2. Critères idéaux pour les scaffolds.....242
A.3. Choix du polymère.....243
A.4. Choix de la substance médicamenteuse.....244
B. Caractérisations physico-chimiques des scaffolds.....244
B.1. Diffractions des rayons X.....245
B.2. Spectroscopie d'absorption infrarouge.....246
B.3. Evaluation de la porosité par la méthode BET.....247
B.4. Etude de la morphologie des scaffolds.....249
II. Comportement *in vitro* des scaffolds au contact d'un liquide physiologique synthétique (SBF) 252
A. Caractérisations physico-chimiques des scaffolds après immersion dans le SBF.....252
B. Composition chimique du SBF après immersion des scaffolds.....255
C. Morphologie et analyses des surfaces après immersion.....258
III. Les scaffolds : Support pour la vectorisation d'une substance médicamenteuse dans un milieu liquide.....265
A. Protocole de l'étude.....265
B. Etude de la cinétique de relargage par spectrophotométrie UV.....266
C. Modèle mathématique du relargage du médicament dans le milieu.....268
Références Chapitre 5.....273

Conclusion générale.....279

Perspectives.....281

Annexe 1 : Notions et principes de la diffraction des rayons X.....283
Annexe 2 : Notions et principes de la résonance magnétique nucléaire (RMN).....285
Annexe 3 : Principe et théorie de la spectroscopie infrarouge. 286
Annexe 4 : Principe de la spectrométrie d'émission optique – ICP-OES.....288
Annexe 5 : Principe de la spectrophotométrie UV 290
Annexe 6 : Principe de la granulométrie laser.....291
Annexe 7 : Principe de la microscopie électronique à balayage.....293
Annexe 8 : Principe de l'analyse thermique différentielle. 296
Annexe 9 : Principe de la méthode d'Archimède et formules mathématiques utilisées.....297
Annexe 10 : Principe de la porosimétrie à mercure. 299
Annexe 11 : Principe de la méthode BET.....301
Annexe 12 : Méthode de synthèse du SBF 305
Annexe 13 : Valeurs des moyennes et écart-types des tests de cytotoxicité. 306
Liste des publications à caractère international.....311

INTRODUCTION

Introduction

Le chirurgien est souvent confronté au traitement de pertes de substances osseuses, qu'elles soient d'origine congénitale, traumatique, orthopédique, infectieuse ou tumorale. Ces pertes peuvent altérer les fonctions du tissu osseux. Le chirurgien tente de remédier à ces problèmes par une reconstruction ou un remplacement du site osseux endommagé.

L'allongement de la durée de vie et l'exigence d'une bonne qualité de vie nécessitent entre autre des besoins en biomatériaux propres et efficaces. Les chirurgiens, les chimistes, les biologistes et les physiciens travaillent en étroite collaboration pour atteindre cet objectif par le biais de nouvelles générations de biomatériaux. Les progrès déjà réalisés permettent des interventions chirurgicales autrefois impossibles (implantation du premier cœur artificiel réalisée en décembre 2013). Cette tendance, à titre d'exemple, ne peut que s'affirmer dans l'avenir.

Parmi les biomatériaux utilisés, nous nous sommes intéressés aux biomatériaux en site osseux. Actuellement, lorsque les patients subissent des pertes osseuses, le meilleur biomatériau pour la restauration osseuse reste la greffe osseuse. Leur disponibilité limitée, le risque de transmission de virus et l'éventuelle morbidité (inflammation, infection, douleurs) du greffon sont des raisons qui ont poussé les chirurgiens à utiliser des biomatériaux d'origine synthétique qui présentent une meilleure sécurité clinique. Ces biomatériaux doivent être biocompatibles ; favoriser ou même induire la repousse osseuse ; posséder de bonnes qualités mécaniques ; être résorbables à moyen terme ; aisés à travailler et de coûts accessibles.
L'évolution technologique et une meilleure compréhension des phénomènes biologiques du tissu osseux ont largement contribué à résoudre de nombreux problèmes. Les chercheurs ont développé de multiples biomatériaux naturels et synthétiques, dont certains sont d'ores et déjà utilisés en clinique : biopolymères, céramiques et composites. Ces biomatériaux synthétiques présentent l'avantage de pouvoir être synthétisés en grande quantité, avec des propriétés chimiques et physiques contrôlées. Chirurgiens orthopédistes, chirurgiens dentistes, chimistes, biologistes et physiciens travaillent en collaboration sur différents types de matériaux de comblement osseux ou de substitution osseuse tels que les céramiques phosphocalciques

denses ou poreuses, les verres bioactifs et les composites. Ces progrès permettent à la médecine d'avancer continuellement dans le domaine de la restauration osseuse.

Le travail de recherche, présenté dans ce manuscrit, intervient après de nombreuses études menées dans le groupe Biomatériaux, au sein de l'équipe Chimie du Solide et des Matériaux de l'UMR 6226 à l'Université de Rennes 1. Les carbonates de calcium, les géopolymères et les verres bioactifs ont été particulièrement étudiés dans un contexte pluridisciplinaire.

Les verres bioactifs appartiennent à la famille des biocéramiques. Ils sont biocompatibles, c'est à dire qu'ils n'impliquent pas de réponse inflammatoire ou de rejet lorsqu'ils sont implantés dans un organisme vivant. Ils sont capables, lorsqu'ils sont immergés dans un liquide physiologique synthétique, d'engendrer une série de réactions chimiques pour former à leur surface, une couche de phosphate de calcium: l'hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Celle-ci constitue en majorité la partie minérale de l'os humain. Sa formation à la surface des verres, preuve de leur bioactivité, permet de créer un lien intime avec l'os et par conséquent, favoriser la croissance osseuse et la bioconsolidation. Cette bioactivité est donc intéressante en vue d'utiliser ces matériaux pour la substitution ou le comblement osseux aussi bien en chirurgie orthopédique qu'en chirurgie maxillo-faciale.

Dans un premier temps, l'objectif de ce travail de recherche a porté sur la faisabilité puis sur la reproductibilité de la synthèse d'une vitrocéramique poreuse. En effet, la porosité est une caractéristique importante pour une application médicale car elle permet aux cellules responsables de la formation du tissu osseux et du tissu vasculaire de coloniser les pores du biomatériau. Elle permet à la matière organique de s'y insérer et de servir à relarguer des substances médicamenteuses ou des molécules à usage thérapeutique. La méthode de synthèse a longuement été développée dans le but de disposer d'un grand nombre d'échantillons en vue des expérimentations *in vitro* et *in vivo*.
Les études biologiques ont été menées avec les biologistes de l'UFR Odontologie de l'UMR CNRS 6226 de l'Université de Rennes 1. Les expérimentations *in vivo* ont ensuite été entreprises, dans le cadre d'une collaboration internationale, à l'Université de Sfax en Tunisie.

En parallèle, le verre de référence 46S6 (en pourcentage massique : 46% SiO_2, 24% Na_2O, 24% CaO et 6% P_2O_5), déjà étudié au sein de notre groupe, a été dopé avec différents éléments chimiques présentant des intérêts physiologiques intéressants. Ainsi, le verre a été

dopé au zinc et au titane car ces deux éléments entrent dans la composition chimique de la vitrocéramique poreuse élaborée. Ils permettent, par réaction chimique, de former la porosité de la vitrocéramique. De plus, le zinc intervient dans différentes processus biologiques et le titane est connu pour être biocompatible. Les éléments cuivre et argent, présentant des propriétés antibactériennes et anti-inflammatoires, ont ensuite été introduits dans la matrice vitreuse du 46S6.

Enfin, nous nous sommes penchés sur l'élaboration d'un composite associant un polymère naturel biocompatible (chitosan), présentant des propriétés biologiques intéressantes, avec le verre bioactif de référence (46S6). Ces matériaux poreux ont été également associés à un antibiotique dans le but d'évaluer la cinétique de relargage du médicament en fonction de la teneur en chitosan et en verre bioactif.

Ce manuscrit est composé de 5 chapitres.

Le premier chapitre porte sur des généralités concernant le tissu osseux et les biomatériaux d'origine naturelle et synthétique. La présentation du domaine des biomatériaux utilisés pour la reconstruction osseuse y est développée

Le second chapitre présente les protocoles de synthèse des biomatériaux étudiés et les différentes techniques d'analyse physico-chimiques utilisées. Les détails techniques concernant la préparation des échantillons et l'utilisation des différentes techniques de caractérisation y sont développés.

Le troisième chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus à l'issue des études physico-chimiques des verres étudiés avant et après les tests *in vitro*. L'influence de la teneur des éléments chimiques introduits dans la matrice vitreuse sur les caractéristiques thermiques, sur la cinétique de bioactivité et sur la viabilité cellulaire est mise en évidence.

Le quatrième chapitre, constituant le cœur de ce travail de recherche, porte sur l'étude de la vitrocéramique poreuse, obtenue suivant une méthode de synthèse originale. Ses caractéristiques physico-chimiques, notamment la porosité (caractéristique importante pour la colonisation cellulaire et le dépôt de la matière organique) ont été déterminées en mettant en oeuvre plusieurs méthodes complémentaires. Le processus de bioactivité y est exposé de

façon détaillé en se basant sur les résultats obtenus lors des tests *in vitro*. Une partie est également consacrée à l'évaluation du comportement de cette vitrocéramique une fois implantée au niveau de la diaphyse fémorale du lapin. Des analyses physico-chimiques telles que la diffraction des rayons X, la spectroscopie infrarouge et notamment la RMN du Solide ont permis de comprendre le comportement de ce biomatériau une fois implanté.

Le cinquième chapitre présente la synthèse de scaffolds formés d'un biopolymère associé au verre 46S6. Le but de cette étude préliminaire est d'étudier l'effet de la teneur en chitosan et en verre bioactif sur le relargage d'une substance médicamenteuse pour pouvoir traiter localement un site suite à une infection éventuelle.

Enfin, une conclusion générale et les perspectives de ce travail de thèse sont exposées à la fin de ce manuscrit.

Chapitre 1

Généralités sur le tissu osseux et les biomatériaux d'origine naturelle et synthétique.

Chapitre 1 : Généralités sur le tissu osseux et les biomatériaux d'origine naturelle et synthétique.

I. Le tissu osseux

Le tissu osseux se caractérise par une matrice rigide et minéralisée. Pour constituer l'os, il est associé à d'autres tissus: moelle, périoste et cartilage ; et fait intervenir un ensemble de protéines et de cellules. Le tissu osseux est bien vascularisé et c'est un tissu en perpétuel remaniement. Cependant, il peut subir des traumatismes ou des pathologies responsables de pertes de substances osseuses. Ces pertes peuvent altérer une ou plusieurs fonctions du tissu osseux. Les chirurgiens tentent de remédier à ces problèmes par une restauration ou un remplacement du site endommagé.
Avant de présenter les biomatériaux de comblement ou de substitution osseux, il est nécessaire de comprendre les rôles, l'organisation et la composition du tissu osseux.

A. Rôles du tissu osseux

Le tissu osseux, de par sa structure et ses différentes fonctions, joue plusieurs rôles [1]:

- **Un rôle protecteur**: en effet, le système nerveux central est protégé par la boîte crânienne (cerveau) et les vertèbres (moelle épinière). Le squelette est également composé d'os pouvant être plus souple selon les organes vitaux à protéger comme la cage thoracique protégeant les poumons entre autres.
- **Un rôle métabolique**: il maintient l'équilibre phosphocalcique. Le squelette humain renferme 99% du calcium et 90% du phosphore de l'organisme jouant un rôle biologique prépondérant dans la vie cellulaire, la transmission nerveuse et la coagulation sanguine.
- **Un rôle hématopoïétique**: la moelle osseuse contient les cellules hématopoïétiques qui sont à l'origine de toutes les lignées de cellules sanguines, au sein de l'os spongieux.
- **Un rôle biomécanique**: l'os est à la fois solide et résistant (15 kg/mm² à la traction et 20 kg/mm² à la pression) mais c'est aussi un matériau anisotrope et viscoélastique [2]. Ces propriétés mécaniques lui permettent de supporter les effets de la pesanteur, de

résister aux contraintes mécaniques externes, ainsi qu'aux forces de contractions musculaires.

B. Organisation du tissu osseux

B.1. Organisation structurale

Le tissu osseux (figure 1) est composé d'une structure primaire et d'une structure secondaire [1].

La structure primaire est composée de l'os tissé fibreux et de l'os lamellaire.

L'os fibreux est caractérisé par une trame collagénique peu ordonnée et irrégulièrement minéralisée. Les fibres de collagène y sont inégales. Cet os se forme rapidement sans matrice préalable et il est mécaniquement faible. Il est présent chez le fœtus et dans la réparation des fractures. Au fur et à mesure de sa maturation, il est remplacé par de l'os lamellaire.

L'os lamellaire, mécaniquement résistant, est constitué de lamelles de 3 à 7 microns d'épaisseur, parallèles entre elles. Il renferme les ostéocytes (cellules osseuses entourées de matrice minéralisée). La presque totalité des os chez l'adulte est lamellaire [2].

La structure secondaire est constituée par l'assemblage d'unités de base de forme cylindrique disposée longitudinalement appelées "ostéons". Elles sont centrées sur des vaisseaux sanguins associés à des fibres nerveuses dont la forme dépend du type d'os auxquels elles appartiennent: os cortical ou os spongieux.

B.2. Organisation architecturale

On distingue ici l'os cortical (ou compact) et l'os trabéculaire (ou spongieux) [1].

L'os cortical représente 80% du squelette et constitue la paroi externe de toute pièce osseuse. Ses ostéons sont cylindriques (200 à 300 µm de diamètre) et centrés par un canal de Havers (50 µm de diamètre en moyenne) dont l'orientation est grossièrement parallèle à l'axe de la diaphyse. Ils sont reliés par des canaux transversaux de Volkmann. La résistance de l'os cortical dépend de plusieurs paramètres: extrinsèques (direction et vitesse d'application des contraintes exercées) ou intrinsèques (géométrie de la pièce osseuse et propriétés de la matrice minéralisée) [2].

L'os trabéculaire représente 20% du squelette adulte. Cet os représente une surface d'échanges importants avec les liquides interstitiels, avec un renouvellement plus rapide que celui de l'os cortical, jouant ainsi un rôle majeur dans l'équilibre phosphocalcique. Il favorise notamment la résistance aux contraintes mécaniques en compression.

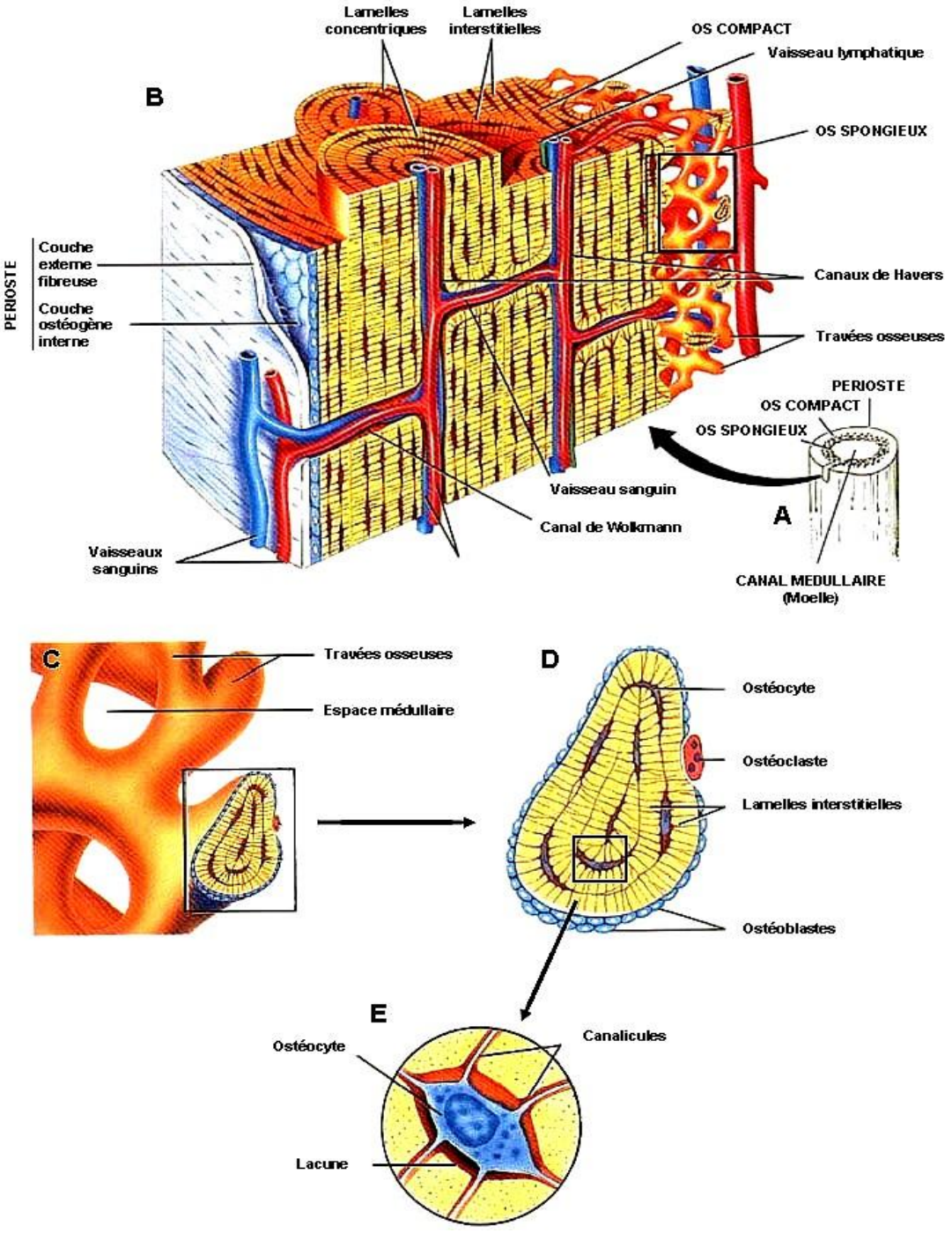


Figure 1 : Organisation structurale et architecturale du tissu osseux [3]

B.3. Classification des os

On distingue trois catégories d'os dans le corps humain : les os longs, courts et plats (figure 2).

Un os long comprend trois parties:

- **les épiphyses** : ce sont les deux extrémités, constituées de tissu osseux trabéculaire. Leur orientation assure la solidité face aux pressions qui s'exercent sur les épiphyses. Entre les travées, les espaces renferment de la moelle osseuse. En périphérie, l'os spongieux est entouré de tissu osseux dense, sauf au niveau de la surface articulaire, recouverte par du cartilage.
- **la diaphyse** : il s'agit de la partie médiane des os longs. C'est un cylindre creux d'os compact à orientation longitudinale. La cavité centrale renferme de la moelle osseuse.
- **les métaphyses** : ce sont les segments coniques situés entre les épiphyses et la diaphyse. Elles sont constituées de tissu osseux spongieux, entouré d'une lame d'os compact qui prolonge l'os de la diaphyse. Jusqu'à la fin de la croissance de l'os, elles restent séparées des épiphyses par le cartilage de croissance.

Les os courts sont les os du carpe et du tarse (main et pied principalement). Leur structure est comparable à celle de l'épiphyse des os longs. Ils sont formés d'os trabéculaire entouré d'une mince corticale de tissu osseux dense.

Les os plats sont les côtes, les omoplates et les os de la voûte crânienne. Une couche centrale de tissu osseux trabéculaire est entourée par du tissu osseux compact. Le tissu compact forme les tables externes et internes. Leur vascularisation, tout comme les os courts, se fait par des vaisseaux ou par une ou plusieurs artères nourricières.

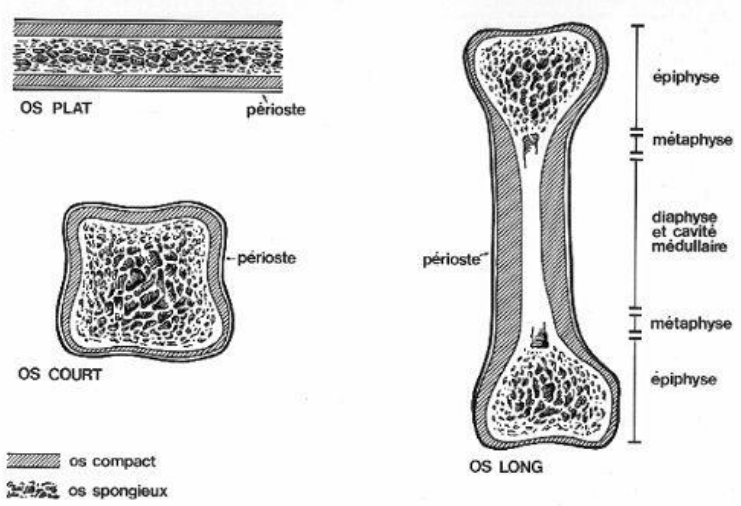


Figure 2 : Les différents os du corps humain.

C. Composition du tissu osseux

Il est composé d'une matrice osseuse, constituée d'une fraction organique et d'une fraction minérale, à l'origine de sa dureté et de sa résistance, ainsi que des cellules osseuses des lignées ostéoblastiques et ostéoclastiques.

C.1. La matrice osseuse

La matrice est pauvre en eau (le tissu osseux est le tissu le moins hydraté de l'organisme), mais riche en substance minérale qui représente environ 70% du poids d'un os dégraissé et sec. Elle comprend une trame de collagène, une substance fondamentale amorphe, peu abondante, et la substance minérale qui s'y dépose [1].
Après déminéralisation complète, la fraction organique de la matrice maintient la forme de l'os, la pièce osseuse devient flexible et présente une certaine élasticité.
La matrice osseuse est en perpétuel renouvellement. L'état du tissu osseux est le résultat d'un équilibre entre les activités des cellules de l'os [1].

La matrice organique du tissu osseux est constituée de :
- *le collagène de type I*, représentant 90% de la matrice organique. C'est une glycoprotéine fibreuse, rigide, formant une triple hélice de longueur 3000 Å et de diamètre 50 Å, riche en acides aminés. Leur calibre et leur orientation déterminent la morphologie des pièces osseuses et la variété du tissu osseux. Il existe également du collagène de type V en faible quantité [1].
- *les protéines non collagéniques* (PNC), représentant 10% du tissu organique et 2% du poids total de l'os. Nous distinguons les PNC osseuses (ostéocalcine), les protéines plasmatiques (albumine) et les facteurs de croissance [1].

La fraction minérale du tissu osseux, abondante, représente 99% du calcium et 90% du phosphore de l'organisme [1]. Elle est principalement constituée de complexes cristallins de calcium et de phosphore comme :
- *les cristaux d'hydroxyapatite* hydratée, formés de petites plaques hexagonales (figure 3) organisées en lamelles sur lesquelles se répartissent les groupements et ions OH^-, Ca^{2+} et PO_4^{3-} et ont pour formule chimique $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Leur surface globale est considérable

(130 m² par gramme). Leur superficie est hydratée et porte des ions Ca^{2+} labiles d'où la rapidité des échanges calciques dans le tissu osseux.

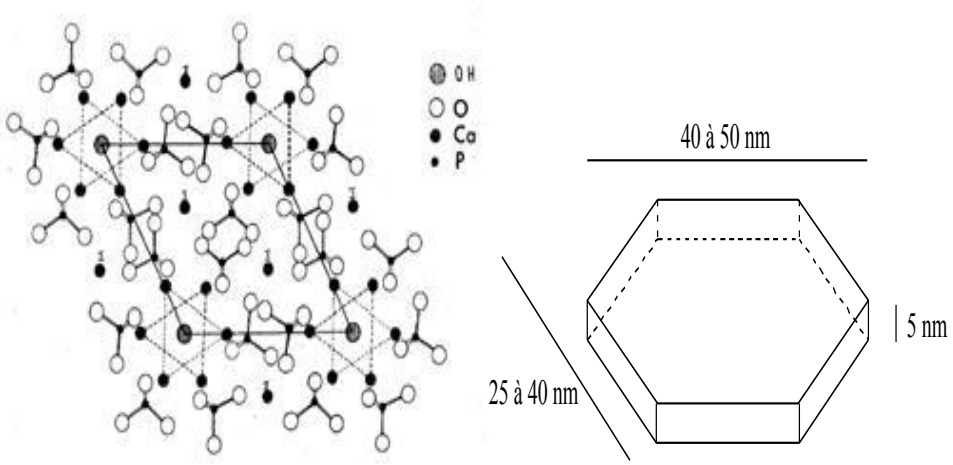


Figure 3 : Maille élémentaire de l'hydroxyapatite [4] et dimension d'un cristal

- *les sels de calcium* ; il s'agit principalement de phosphate amorphe de calcium, plus abondant dans le tissu jeune, mais aussi de bicarbonate, citrate et fluorure de calcium. Le fluor (F^-) remplace les ions OH^- et augmente la dureté de la matrice. On retrouve également des sels de magnésium et des traces de baryum et de strontium [1].

C.2. Les cellules osseuses

L'aspect du tissu osseux est le résultat d'un équilibre entre les activités de deux populations cellulaires: les cellules formatrices (ostéoblastes, ostéocytes, tissu osseux, les cellules bordantes et inactives) et les cellules destructrices du tissu osseux (ostéoclastes).

C.2.1. Origine

Les cellules osseuses trouvent leur origine dans la moelle qui produit deux grands groupes de cellules souches:

- Les cellules souches de la lignée hématopoïétique qui vont donner les cellules sanguines et immunitaires.
- Les cellules souches mésenchymateuses qui sont à l'origine des fibroblastes (cellules responsables du renouvellement du collagène), des cellules endothéliales (cellules

responsables de la formation d'une vascularisation) et de la lignée ostéoformatrice (ostéoblastes et chondroblastes).

C.2.2. Lignée ostéoclastique

L'ostéoclaste mature est une cellule géante multi nucléée (100 µm de diamètre en moyenne). Son pôle basal présente une membrane plissée appelée bordure en brosse au contact de laquelle la matrice est résorbée [1].

La résorption débute par l'adhérence de l'ostéoclaste sur la travée osseuse avec constitution d'une poche hermétique, entre la membrane plissée et l'os, dans laquelle l'ostéoclaste relargue notamment des ions H^+ (figure 4). Il s'ensuit une dissolution de la phase minérale du tissu osseux, suivie d'une élimination de la matrice collagénique sous l'effet d'enzymes [1]. L'os résorbé laisse peu à peu la place à une lacune de résorption (ou lacune de Howship). Le pH acide de cette lacune favorise l'activité de ces enzymes. La durée de vie moyenne d'un ostéoclaste humain est de 2 semaines après lesquelles il entre en apoptose (suicide de la cellule) [1].

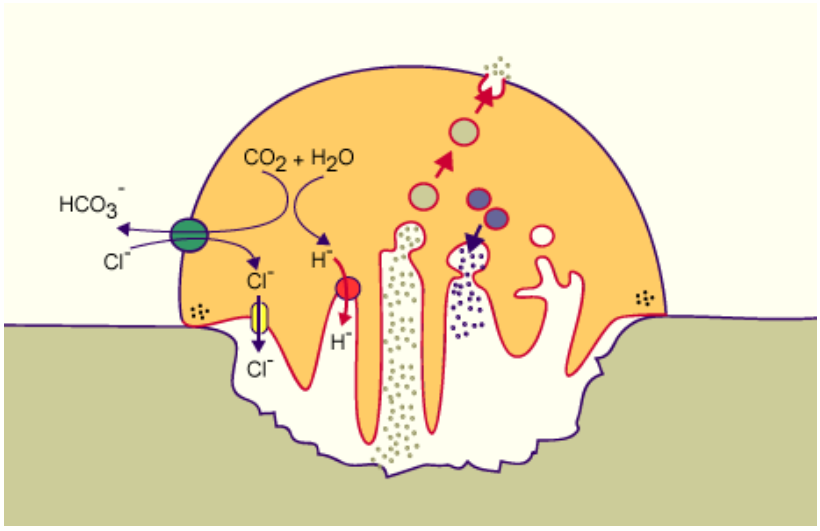


Figure 4 : Action d'un ostéoclaste sur la matrice osseuse [5]

C.2.3 Lignée ostéoblastique

C.2.3.1. L'ostéoblaste

Les ostéoblastes matures sont des cellules cuboïdales mononucléées de 20 µm de diamètre, alignées et attachées sur la matrice osseuse et caractérisées par une activité de 7 enzymes importantes [1]. Leur fonction principale est de synthétiser la matrice (ou tissu ostéoïde) et de participer à sa minéralisation. Au fur et à mesure que la matrice est synthétisée et minéralisée, les ostéoblastes deviennent moins actifs et s'aplatissent. Certains ostéoblastes s'incorporent à l'ostéoïde et deviennent des ostéocytes. D'autres deviennent des cellules bordantes (figure 5) [1].

C.2.3.2. L'ostéocyte

Un dixième environ des ostéoblastes matures se retrouvent piégés dans la matrice minéralisée, au sein de logettes appelées ostéoplastes, et deviennent alors des ostéocytes [1]. L'ostéocyte est une cellule étoilée possédant de très nombreux prolongements cytoplasmiques qui cheminent, au-delà de l'ostéoplaste, à travers un réseau de canalicules creusés dans la matrice osseuse et baignés de liquide extracellulaire (figure 5). Ce réseau permet de relier les ostéocytes entre eux et aux cellules de la surface (ostéoblastes et cellules bordantes), assurant ainsi la transmission de diverses informations chimiques (ions, hormones) et mécaniques (mouvement de fluides, déformations, gravité) par le biais de jonctions communicantes intercellulaires. Ces cellules sont également capables de synthétiser certaines molécules notamment en réponse à un stimulus mécanique et de jouer un rôle dans les échanges calciques entre le tissu osseux et le sang [1]. Enfin, les ostéocytes expriment spécifiquement la sclérostine, puissant agent inhibiteur de la formation osseuse.

C.2.3.3. Les cellules bordantes

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes devenus progressivement aplatis pour former une couche cellulaire attachée et alignée le long de surfaces osseuses dites inactives (figure 5). Différents rôles leur sont attribués. Unies entre elles et aux ostéocytes, elles pourraient ainsi participer au réseau de communications intercellulaires [1]. Elles pourraient également constituer une barrière fonctionnelle entre la moelle osseuse et l'os calcifié. Les cellules bordantes seraient également une source de cellules ostéoblastiques de réserve [1]. Enfin, elles pourraient jouer un rôle déterminant dans la modulation de l'activité ostéoclastique en

libérant lors de l'activation d'un cycle de remodelage des substances chimiotactiques reconnues par les précurseurs ostéoclastiques [1].

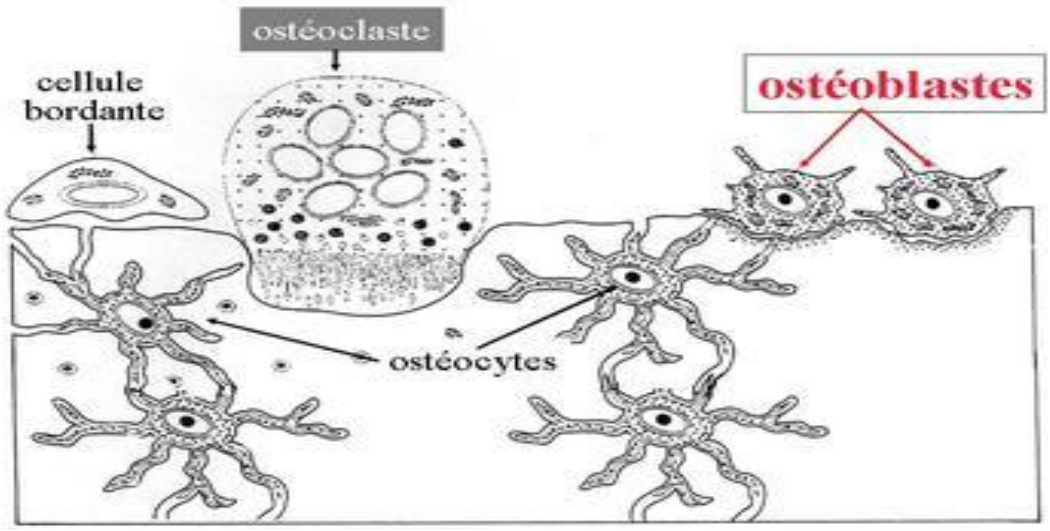


Figure 5: Les différentes cellules de l'os [6].

D. Remodelage osseux

Le squelette est une structure en perpétuel renouvellement avec, physiologiquement à l'âge adulte, un équilibre entre la construction (ostéoformation) et la destruction (résorption) du tissu osseux. Il est donc important de comprendre ce concept (figure 6).

D.1. Les concepts et les bases cellulaires

Le remodelage osseux accomplit trois principales fonctions [1]. Il permet tout d'abord à l'organisme de réguler l'équilibre minéral du calcium et du phosphore. Il constitue ensuite un mécanisme d'adaptation du squelette à son environnement mécanique, réduisant ainsi le risque de fracture. C'est enfin un mécanisme de renouvellement tissulaire et de réparation des dommages osseux créés notamment lors des contraintes cycliques. Le remodelage osseux est le résultat de l'activité de multiples équipes cellulaires appelées BMU (Basal Multi cellular Unit), au sein desquelles agissent de manière séquentielle et couplée dans le temps et l'espace: les ostéoclastes qui résorbent l'os ancien, puis les ostéoblastes qui apposent une matrice qui se minéralisera. Chez l'adulte, le nombre d'unités actives à un instant donné est d'environ 1 million [1]. Dans l'os cortical, ces structures s'organisent autour de cylindres, les canaux de

Havers, plus ou moins ouverts suivant leur stade fonctionnel. Dans l'os trabéculaire, ces mêmes structures sont ouvertes sur la moelle [1]. Le taux de naissance des BMU est plus important dans l'os trabéculaire que dans l'os cortical; ainsi l'os trabéculaire se renouvelle, chez l'humain, 5 à 8 fois plus vite que l'os cortical. Dans un BMU, le remodelage commence par une activation des cellules bordantes qui recouvrent une surface osseuse inactive [1]. Ces cellules, tout en se rétractant, dégradent la couche collagénique sous-jacente et attirent par chimiotactisme les pré-ostéoclastes sur la zone osseuse ainsi exposée: c'est **la phase d'activation** [1]. Ces pré-ostéoclastes fusionnent pour devenir des ostéoclastes actifs et adhérents à la surface osseuse: c'est **la phase de résorption** du minéral osseux et de la matrice organique créant des lacunes [1]. La **phase d'inversion** correspond au remplacement des ostéoclastes par des cellules mononuclées. Puis survient le recrutement des ostéoblastes dans cette lacune qu'ils comblent en apposant une nouvelle matrice organique, le tissu ostéoïde, qui sera ensuite minéralisé: c'est **la phase de formation** [1]. Vient enfin une phase pendant laquelle la minéralisation secondaire de la matrice est parachevée. Cette étape correspond à une accumulation de minéral dans la matrice indépendamment des cellules osseuses avec un rôle fondamental dans la résistance mécanique des os. Le mécanisme cellulaire de renouvellement du tissu osseux est soumis à l'influence de facteurs exogènes et endogènes dont les plus importants, capables de moduler l'activité des cellules osseuses, sont des facteurs hormonaux (hormones calciotropes, sexuelles et thyroïdiennes) et locaux (protéines, facteurs de croissance…) ainsi que les contraintes mécaniques [1].

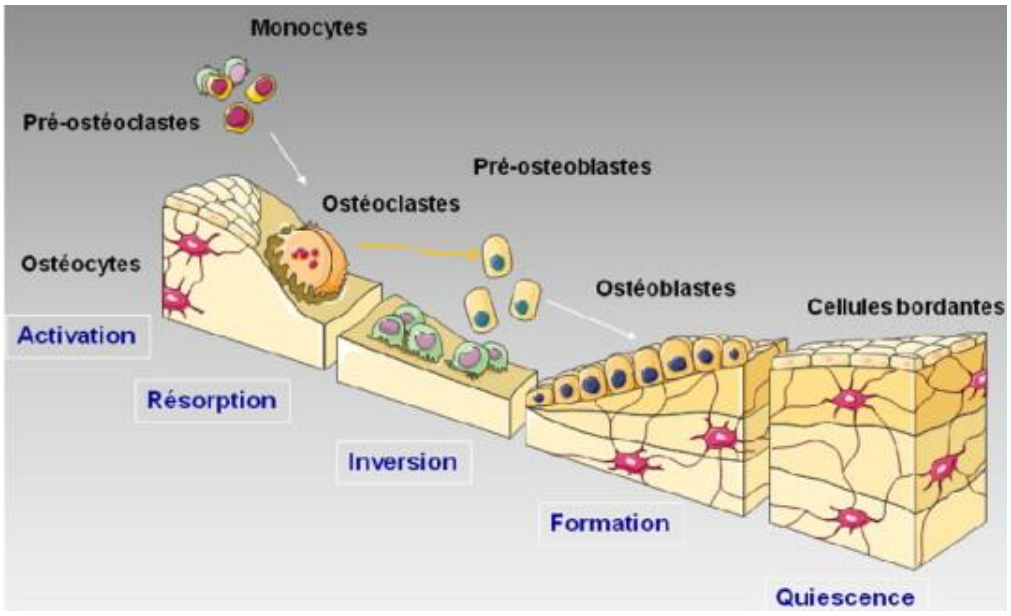


Figure 6: Cycle du remodelage osseux [7]

D.2. L'adaptation aux contraintes mécaniques

Les effets des contraintes mécaniques sur la masse et l'architecture du tissu osseux impliquent une modulation du remodelage osseux répondant au concept de mécanostat [1].
Les mécanismes contrôlant ce concept sont complexes. Ils font intervenir différents facteurs locaux déjà cités précédemment grâce à la mise en jeu de structures cellulaires mécano réceptrices [1]. Les ostéocytes, grâce à leur localisation intra-matricielle et au réseau de connexion qu'ils établissent avec les cellules de leur voisinage, semblent être les meilleurs candidats pour être les maîtres d'œuvre de cette adaptation [1].

Conclusion

Le tissu osseux ne représente donc pas que la charpente du corps humain. Il est un tissu d'une grande complexité mêlant la chimie, la physique et la biologie [8-18]. Il est en perpétuel renouvellement et fait intervenir des réactions chimiques diverses, des réactions et des changements biologiques faisant intervenir des cellules, des protéines, des facteurs de croissance, des hormones, des vitamines... Le domaine des biomatériaux est donc un domaine pluridisciplinaire qui nous amène à tenir compte de la complexité que représente le tissu osseux.

II. Les biomatériaux d'origine naturelle et synthétique

Les stratégies thérapeutiques ayant recours à des biomatériaux sont devenues de plus en plus importantes en l'espace de quelques décennies.
Que ce soit les valves cardiaques, les ligaments artificiels, les prothèses de hanche, du coude et du poignet, les vis et les plaques pour la réparation de fractures osseuses, les implants dentaires; il existe un grand nombre de biomatériaux pour des applications médicales variées que ce soit en chirurgie orthopédique, maxillo-faciale, cardiaque ou dentaire.

A. Généralités sur les biomatériaux

Les conférences de consensus de Chester (Royaume-Uni, 1986, 1991) ont proposé la définition suivante des biomatériaux, généralement admises par la communauté scientifique et médicale : « matériau non vivant, utilisé dans un dispositif médical et conçu pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un appareillage à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe, ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou assistance) fonctionnelle » [19].
Les biomatériaux doivent répondre à un certains nombre de critères qui peuvent avoir une influence sur la santé et la vie du patient. En effet, un biomatériau utilisé dans une application médicale est soumis à un grand nombre de contraintes. Par exemple, la prothèse ou l'implant ne doit pas susciter d'infection, de réaction inflammatoire ni de rejet (tolérance immunitaire), ne doit pas rejeter dans l'organisme des substances toxiques ou cancérigènes**.** Le biomatériau doit être stérilisé avant usage et doit, par conséquent, résister à certaines interventions physiques (radiations ionisantes), chimiques (oxyde d'éthylène par exemple) ou thermiques (autoclave)**.** Une fois implanté, ce matériau doit également faire face à des contraintes mécaniques selon le site d'implantation et le type de biomatériau (millions d'ouverture et fermeture d'une valve cardiaque, ou résistance d'une articulation de hanche à une charge représentant 3 à 10 fois le poids du corps selon le type de mouvement), ainsi que des contraintes chimiques et biochimiques (le milieu vivant est riche en eau et en substances corrosives ou oxydantes).
C'est dans cette optique que les chercheurs travaillant sur les biomatériaux de restauration osseuse essaient de concevoir des biomatériaux présentant des propriétés physico-chimiques adéquates et des propriétés mécaniques adaptées au site d'implantation: proche de celle de l'os

ou encore permettant une bonne biorésorbabilité afin de servir de support à la repousse osseuse. L'interface tissu vivant/implant fait l'objet d'une recherche pluridisciplinaire : les modèles mathématiques et informatiques, les sciences des matériaux, la mécanique des fluides et des solides, l'anatomie, la biologie moléculaire, cellulaire et structurale, la chirurgie. L'enjeu principal étant d'obtenir une biocompatibilité active, c'est-à-dire une bonne adaptation de l'organisme à l'introduction de l'implant et une réponse appropriée en vue des fonctions déficientes à restaurer.

Ils existent plusieurs définitions de la notion de biocompatibilité. Lors d'une conférence de consensus réunie en Grande-Bretagne par la Société Européenne pour les biomatériaux en 1986, la biocompatibilité a été définie comme «la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse appropriée de l'hôte pour une application spécifique» [19]. En 1998, une définition plus détaillée a vu le jour: «la biocompatibilité d'un matériau est l'ensemble des interrelations entre ce matériau et le milieu environnant, et leurs conséquences biologiques locales ou générales, immédiates ou différées, réversibles ou définitives» [20].

La biocompatibilité d'un matériau est régie par deux mécanismes: les effets du matériau sur le milieu et les effets du milieu sur le matériau. Il faut suivre l'évolution de l'un et l'autre, sans oublier leur interface. Ces interactions se déroulent non seulement autour du matériau mais également à distance, suivant les éléments relargués. Elles se manifestent à court, moyen ou long terme selon le type de matériau. Elles peuvent être intenses ou modérées, brèves ou permanentes ou bien apportant soit une cicatrisation complète soit une nuisance chronique. Ces multiples facettes de la biocompatibilité nécessitent de se doter d'outils d'évaluation capables de les appréhender.

Plusieurs types de biomatériaux qu'ils soient naturels ou synthétiques sont étudiés et déjà utilisés dans le domaine médical et plus précisément dans le comblement et la substitution osseux.

B. Biomatériaux d'origine naturelle

Nous distinguons les greffes osseuses et l'utilisation du corail ou encore des polymères naturels (chitosan, collagène).

B.1. Les greffes osseuses

Les autogreffes : La greffe osseuse autologue peut être considérée comme le meilleur biomatériau en matière de restauration osseuse. Le greffon, prélevé sur le patient, permet de corriger n'importe quelle perte de substance osseuse. Elle possède l'ensemble des caractéristiques nécessaires à la croissance osseuse : ostéoconduction, ostéogenèse, ostéoinduction, compatibilité immunitaire. Mais la quantité d'os disponible peut être limitée et la morbidité sur le site donneur n'est pas négligeable (risques d'inflammation, d'infections, de douleurs).

Les allogreffes : Les allogreffes, prélevées sur des donneurs ou des cadavres, sont une alternative intéressante aux autogreffes [21-29]. Malgré leur stérilisation, le risque de transmission de maladies du donneur ne peut être complètement évité.

Les xénogreffes : La xénogreffe désigne la transplantation d'un greffon où le donneur est d'une espèce biologique différente de celle du receveur. Par exemple, le porc est l'un des meilleurs animaux donneurs d'organes pour l'humain, en raison notamment de sa disponibilité. Le critère le plus important à vérifier reste sa biocompatibilité car ce type de greffe pose le problème de faire courir un risque d'infection.

B.2. Le corail

Les coraux ont un squelette similaire à l'os cortical et spongieux avec une porosité interconnectée. Ce système fut approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) en 1992 [30].

Une hydroxyapatite cristallisée est obtenue par échange hydrothermal qui convertit le phosphate de calcium. Cette hydroxyapatite, appelée hydroxyapatite coralline [31], présente une structure similaire à celle de l'os trabéculaire humain.

Les performances cliniques de l'os spongieux autologue et de l'hydroxyapatite coralline sont similaires quand ils sont employés comme matériaux de comblement osseux.

Que ce soit sous forme granulaire ou en blocs de taille adaptée à la perte osseuse, l'utilisation de l'hydroxyapatite coralline permet donc d'éviter la morbidité; il est cliniquement effectif

pour de nombreuses applications (cavités osseuses, chirurgie de la main, chirurgie maxillo-faciale) et malgré sa résorption lente, ce matériau n'induit aucun effet néfaste.
Le corail naturel est purifié (élimination de la matrice organique) et stérilisé (rayons ionisants γ et autoclave). Ce matériau est un carbonate de calcium, cristallisé sous sa forme aragonite. Différentes espèces sont utilisées selon leurs caractéristiques structurales et les indications cliniques : le corail *Porites lutea* est préconisé en odontologie. D'une porosité de 100 à 200 microns, similaire à celles de l'os spongieux, le carbonate de calcium est biocompatible et résorbable. La cinétique de résorption dépend de l'espèce, du site d'implantation, du volume, de la taille et du volume des pores. Le processus est lié à l'action des cellules et des ostéoclastes, ainsi qu'à l'action des fluides interstitiels (dissolution de surface) [32].

B.3. Le chitosan et les squelettes d'éponge

Les squelettes naturels d'éponge marines et le chitosan se sont révélés être des biomatériaux efficaces pour l'ingénierie tissulaire. L'abondance et la diversité structurale des squelettes naturels d'éponges marines ainsi que leur potentiel multifonctionnel, leurs réseaux conducteurs et inducteurs cellulaires complétés de fibres de collagène en ont fait un matériau prometteur [33].
Le chitosan est un dérivé du polysaccharide chitine. Ce biopolymère naturel abondamment disponible dans les exosquelettes de crustacés, d'insectes et dans certains champignons pourrait être un matériau efficace pour la réparation osseuse en raison de sa biocompatibilité.
Les composites hydroxyapatite/chitosan ont un bon effet ostéoconducteur à condition d'être en contact intime avec l'os receveur. Ils pourraient alors trouver toute leur place en application clinique.

C. Biomatériaux d'origine synthétique

Face aux risques de transmission de virus par les biomatériaux d'origine naturelle, les biomatériaux synthétiques sont de plus en plus utilisés. En effet, leur préparation et leurs propriétés physico-chimiques et biologiques peuvent être contrôlées pour être adaptées à des applications médicales variées.
Les céramiques représentent près de 60% des biomatériaux pour la restauration osseuse, qu'elles soient pures ou en combinaison avec d'autres matériaux. Les phosphates de calcium

(hydroxyapatite, le β-tricalcium phosphate) et les bioverres sont les plus utilisés. Ils possèdent des propriétés ostéoconductrices et ostéointégrantes. Dans certains cas, ils peuvent être ostéo-inducteurs.

C.1. Classification des biomatériaux synthétiques

Les biocéramiques sont particulièrement utilisées pour la restauration osseuse. Larry Hench a classé ce type de biomatériaux en 4 catégories bien distinctes selon leur capacité à se lier aux tissus vivants [34]. Tous les matériaux implantés, quelle que soit leur catégorie, impliquent une réponse du tissu vivant avec lequel ils sont en contact. Mais selon leur catégorie, les réponses sont différentes [35]. Ainsi, les biocéramiques sont classées en tant que biomatériaux inertes (alumine, zircone), bioactifs (hydroxyapatite, verres bioactifs), résorbables (tricalcium phosphate) ou poreux (hydroxyapatite, carbonate de calcium).

Les biomatériaux inertes peuvent être qualifiés de biologiquement inactifs car il y a formation d'une encapsulation fibreuse non-adhérente lorsqu'ils sont implantés ne permettant pas la formation d'un lien intime avec le tissu vivant. Des études menées ont permis de démontrer que selon le type de biomatériau inerte et le site d'implantation, l'épaisseur de la couche fibreuse formée variait. A long terme, ces biomatériaux nécessitent une intervention chirurgicale car l'interface implant/tissu osseux se détériore [34].

Les biomatériaux bioactifs, lorsqu'ils sont implantés, engendrent une série de réactions chimiques à l'interface implant/tissus vivants aboutissant à la formation de liens intimes entre le biomatériau et le tissu osseux. On appelle ce phénomène: la fixation bioactive [34].
En 1994, une classification fut proposée, dans laquelle les matériaux bioactifs sont classés en 2 catégories [35]:
1) Classe A, les matériaux ostéoproducteurs. L'ostéoproduction a été défini comme étant un procédé par lequel une surface bioactive est colonisée librement par des cellules souches ostéogéniques dans un environnement défectueux après une intervention chirurgicale.
La bioactivité de classe A intervient lorsque le matériau implique à la fois des réponses intracellulaires et extracellulaires à son interface. Des verres bioactifs de classe A peuvent se lier à la fois à l'os et aux tissus mous.

2) Classe B, les matériaux ostéoconducteurs. Les implants ostéoconducteurs apportent simplement une interface biocompatible à travers laquelle l'os migre. La bioactivité ostéoconductrice apparait lorsqu'un matériau induit uniquement une réponse extracellulaire à son interface. Parmi ces matériaux bioactifs, nous retrouvons les verres bioactifs, les vitrocéramiques telles que l'apatite/wolastonite (A/W), des céramiques denses en phosphate de calcium telles que l'hydroxyapatite synthétique et des composites comme les mélanges polyéthylène-hydroxyapatite.

Les biomatériaux résorbables sont implantés dans le but d'être progressivement remplacés par le tissu vivant. Ce type de biomatériaux se dégrade grâce à aux activités cellulaires et enzymatiques. Les produits relargués suite à la dégradation du matériau sont évacués par voie naturelle (en général par voie rénale) et ne doivent engendrer aucune toxicité. Selon le site d'implantation, l'âge et le sexe du patient, la cinétique de dégradation du biomatériau doit être adaptée. En effet, le métabolisme osseux d'une personne âgée est beaucoup plus lent qu'une personne présentant un jeune âge [34].

Les biomatériaux poreux permettent, du fait de la présence d'une porosité, la colonisation des différentes cellules intervenant dans la formation osseuse et de la matière organique. Il y a interaction entre ces biomatériaux et le tissu osseux grâce à une fixation biologique qui ne peut être mise en place que si la taille des pores est égale ou supérieure à 100 µm. La porosité limite l'utilisation de ce type de biomatériaux car elle engendre de faibles propriétés mécaniques qui empêchent d'implanter ces matériaux dans les sites où la charge et les contraintes mécaniques sont importantes [34].

C.2. Le carbonate de calcium

Le carbonate de calcium $CaCO_3$ synthétique présente trois formes allotropiques: calcite, aragonite et vatérite. Le corail, carbonate de calcium naturel, possède la même structure cristallographique que l'aragonite (système cristallin orthorhombique). Au sein de notre groupe Biomatériaux, la synthèse de ce substitut osseux est maîtrisée [36]. Le carbonate de calcium synthétique est obtenu par double précipitation de sels de chlorure de calcium ($CaCl_2$) et d'hydrogénocarbonate de potassium ($KHCO_3$). Après filtration et séchage, le matériau obtenu présente une granulométrie d'environ 20 µm. Le matériau de comblement final est

obtenu par compactage isostatique et présente des pourcentages de porosité variables en fonction du pourcentage de porogène introduit avant compactage [37]. Ce carbonate de calcium synthétique a été également étudié comme vecteur d'antibiotique (sulfate de gentamicine, utilisé en orthopédie pour le traitement d'éventuels foyers infectieux) [38-39].

C.3. Les phosphates de calcium

C.3.1. L'hydroxyapatite (HA)

L'HA est chimiquement similaire à la matrice minérale de l'os, d'où son potentiel ostéoconducteur et son excellente biocompatibilité [40-41]. Sa formule est $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ avec un rapport atomique calcium/phosphate de 1,67. De par sa structure hautement cristalline, l'HA est peu résorbable. Elle est reconnue comme étant un excellent porteur de facteurs de croissance et de cellules ostéogéniques. Elle peut servir de véhicule à la délivrance d'agents bioactifs [42-43].

L'ostéointégration est meilleure avec des mélanges d'HA (70%) et d'os autologue (30%) [44] qu'avec l'HA pure [45].

L'HA, avec sa structure fortement poreuse interconnectée, donne des résultats très prometteurs en produisant des zones riches en cellules à forte viabilité [46-47].

La bonne cytocompatibilité de l'HA en fait un matériau courant de recouvrement des implants dentaires et orthopédiques. Mais sa faible solubilité dans l'organisme et ses propriétés mécaniques (différentes de celles de l'os) limitent les applications cliniques [48].

Il a été prouvé que les tiges des prothèses fémorales recouvertes d'HA stimulent l'intégration osseuse quels que soit le type d'os ou les conditions de charge et limitent les risques d'infection et de descellement [49-50].

C.3.2. Le tricalcium phosphate (TCP)

Comme l'HA, le TCP est biorésorbable et biocompatible. Sa composition chimique et sa cristallinité sont proches de la phase minérale de l'os. Sa formule chimique est $Ca_3(PO_4)_2$ avec un rapport atomique calcium/phosphate de 1,50. On distingue deux formes de cristallinité: α ou β. Sa biodégradation est plus rapide que celle de l'HA, par dissolution et par résorption ostéoclastiques [51].

Les implants en TCP sont utilisés depuis plus de 20 ans pour les comblements osseux orthopédiques et dentaires [52]. Leur petite taille et la microporosité interconnectée des particules favorisent une bonne ostéoconductivité, avec une résorption qui a lieu en même temps que le remodelage osseux [53].

De nombreuses études ont été réalisées sur le TCP. L'association du TCP avec d'autres éléments chimiques ou organiques ont montré un intérêt [53-58]. Par exemple, Zhang a montré que la combinaison du β-tricalcium phosphate avec des cellules souches de la moelle osseuse (BMSCs) améliorée la repousse osseuse [54].

C.3.3. Les ciments de phosphate de calcium (CPC)

Les céramiques en phosphate de calcium sont considérées depuis plus de 30 ans comme des matériaux parfaitement biocompatibles. Les CPC offrent l'avantage d'être modelables et de s'adapter à la forme de la perte de substance osseuse.

Les ciments, mélange de tetracalcium phosphate (Tet CP) et de dicalcium phosphate anhydre (DCPA), proposé par Brown et Chow [59] sont définis comme « des poudres ou mélanges de poudres qui, après addition d'eau ou d'une solution aqueuse, forment à température ambiante ou corporelle des précipités contenant des cristaux de un ou plusieurs phosphates de calcium pour former par leur enchevêtrement une masse consistante ».

Après implantation, cette composition forme de l'HA en présence des fluides corporels.

De plus, la croissance osseuse reste très limitée du fait de la non-ostéo-inductivité de ces matériaux. C'est pour surmonter cette limitation qu'un certain nombre de facteurs de croissance d'origine osseuse ont été appliqués pour stimuler la croissance osseuse, la synthèse de collagène et la réparation des fractures, tant *in vitro* qu'*in vivo*.

La haute biocompatibilité, la facilité de moulage et la capacité de l'auto-formation sous des conditions ambiantes en ont fait des matériaux de choix pour la réparation des tissus durs [60], d'ailleurs, le secteur recherche et développement a trouvé un grand intérêt dans ce domaine ces dernières années.

Les CPC se présentent sous forme liquide au moment de leur application. Ils sont utilisés comme biomatériau injectable en chirurgie vertébrale ou en traumatologie faciale. Un des inconvénients est le manque de microporosité pour une meilleure invasion tissulaire. La taille des pores et la qualité mécanique jouent donc un rôle majeur dans l'utilisation des CPC.

C.4. Les sulfates de calcium

Le sulfate de calcium hémihydraté ($CaSO_4$, ½ H_2O) a été utilisé comme biomatériau pour la première fois en 1892. Il correspond au plâtre de Paris.
L'entreprise Osteoset® utilise ce matériau sous forme de billes [61]. Il se résorbe en 4 à 12 semaines (produit à résorption la plus rapide de tous les substituts ostéoconducteurs disponibles) et peut inclure des antibiotiques [61]. Il présente de faibles propriétés mécaniques c'est pourquoi son utilisation en zone de charge est à éviter [61].
Le sulfate de calcium est utilisé comme matériau de comblement osseux avec une résorption totale, remodelant l'os avec sa forme anatomique et ses propriétés structurales. Les applications du sulfate de calcium sont essentiellement le comblement de kystes, de cavités osseuses, de lésions bénignes et le comblement de sites de prélèvements osseux (autogreffes).

C.5. Les biomatériaux à base de biopolymères

Les biopolymères présentent des caractéristiques chimiques, physiques et mécaniques différentes des autres matériaux. On peut les regrouper en deux catégories : les polymères biodégradables et les polymères non-biodégradables. Ils sont de plus en plus utilisés dans l'ingénierie tissulaire dans la restauration de tissus vivants organiques et inorganiques.
Les polymères dégradables, naturels ou synthétiques, sont résorbés par l'organisme. Ils le laissent s'assurer de la guérison en évitant la présence de résidus étrangers. Les principaux polymères dégradables comme l'acide polylactique et polylacto-co-glycolique sont utilisés comme dispositifs autonomes ou en composites avec l'acide hyaluronique.
Beaucoup de biopolymères sont utilisés dans la réparation tissulaire du foie [62], des nerfs [63], des os [64], du cartilage [65]. Ces biopolymères dégradables sont de bons matériaux pour la vectorisation de substances médicamenteuses ou de molécules à usage thérapeutiques. Le chitosan [66], l'alginate et le collagène et d'autres polymères synthétiques comme le poly-coprolactone [66], le polyéthylène glycol [67] et le polyvynilalcohol [68] sont principalement utilisés pour le relargage de médicaments [69-70].

C.6. Nouveaux biomatériaux en développement

Malgré les avancées des biomatériaux pour le comblement ou la substitution osseux, de nouveaux matériaux sont en plein développement et en cours d'expérimentation comme les matériaux hybrides inorganique/organique associés à des protéine, des facteurs de croissance ou encore des cellules. L'ingénierie tissulaire est de plus en plus sollicitée car elle développe l'application de principes biologiques, chimiques et d'ingénierie à la réparation, la restauration ou la régénération de tissus vivant en utilisant à la fois des biomatériaux, des cellules ou facteurs de croissance de manière autonome ou combiné.

Des matrices biocompatibles et biodégradables possédant des propriétés essentielles pour la guérison osseuse sont de plus en plus étudiées (microsphères poreuses servant de matrice biomimétiques par exemple).

Ces différentes matrices de base peuvent être combinées avec des biocéramiques pour former des matrices composites ce qui impliquerait un double bénéfice pour une application médicale. En effet, le composite polymère/céramique stimulerait la minéralisation pour la néoformation osseuse. Le polymère servirait de support à l'attachement cellulaire entre autre.

C.6.1. Biomatériaux poreux

Le développement d'une nouvelle structure poreuse d'implants à partir de verre bioactif pour une application en tant que substitut osseux permet de remédier aux inconvénients rencontrés avec les substituts osseux biphasés en hydroxyapatite ou en phosphate tricalcique par exemple. Une alternative prometteuse est alors la réalisation de verre bioactif poreux, plus facilement résorbables en surface, et qui permettent alors les processus de dissolution de calcium et phosphore, puis de reprécipitation en surface de l'hydroxyapatite de composition plus proche de la partie minérale de l'os.

Ces verres bioactifs, sont déjà utilisés dans le domaine dentaire comme granulés et dans le revêtement de prothèses métalliques, notamment en chirurgie orthopédique pour le revêtement de prothèses de hanche et de tiges fémorales [71-72]. Ils ne sont cependant pas encore utilisés en chirurgie orthopédique pour la réalisation de substituts poreux, à cause de verrous technologiques à leur fabrication. L'utilisation d'implant poreux permettrait à l'os d'être guidé dans sa reconstruction et de stimuler sa croissance. En effet, la présence d'une

porosité favoriserait la colonisation cellulaire et la formation d'une vascularisation au cœur du matériau implanté [73]

L'avantage de ces implants poreux en verre bioactif est qu'ils peuvent être façonnés pour obtenir la forme désirée.

A titre d'exemple, la société NORAKER développe un procédé de fabrication permettant de réaliser des verres bioactifs poreux avec une porosité contrôlée, à l'échelle nanométrique, micrométrique et macroscopique. Les résultats montrent des propriétés mécaniques supérieures à celles des hydroxyapatites poreuses pour un même taux de porosité, ainsi que des propriétés biologiques plus intéressantes, de part la formation d'hydroxyapatite naturelle à leur surface. En effet, il a été prouvé que la porosité, aussi bien la taille des pores que leur distribution, avait une influence sur la biocompatibilité lors d'expérience *in vitro* et *in vivo* [73].

Cependant, les biomatériaux poreux doivent répondre à un certain nombre de critères en vue d'être utilisés pour des applications médicales.

C.6.1.1. Critères idéaux pour un biomatériau poreux

Dans le but de combler une lourde perte osseuse ou de restaurer un site osseux, un biomatériau poreux doit présenter des critères dits « idéaux ».

Ces critères sont les suivants [74] :

1) Il agit tridimensionnellement comme support de la croissance osseuse. Pour répondre à ce critère, le matériau doit posséder un réseau de pores ouverts permettant la pénétration des cellules, la croissance tissulaire et la mise en place d'une vascularisation. De nombreux débats ont eu lieu concernant la taille minimale du diamètre des pores et il est reconnu qu'une taille de 100 µm est le minimum pour l'implantation et pour encourager la formation d'une vascularisation qui est un critère essentiel pour la régénération osseuse [75]. Beaucoup de recherches sont en cours concernant l'orientation des pores, la migration cellulaire et l'écoulement des liquides physiologiques à travers eux [74]

2) Sa cinétique de résorption doit être similaire à la cinétique de croissance osseuse; sa dégradation ne doit pas être toxique pour l'organisme et il doit être facilement extrait du corps si besoin. Les biomatériaux poreux résorbable à base de polymère peuvent répondre à ce critère. En effet, les cellules osseuses peuvent s'attacher à ce type de biomatériau lorsque

celui-ci contient des protéines spécifiques à sa surface [74-76]. L'inconvénient est qu'il ne répond pas aux critères **3)**, **4)** et **5)** suivants.

3) Il présente une biocompatibilité et entraine l'adhésion et l'activité cellulaire et stimule le phénomène d'ostéogénèse. Les matériaux bioactifs en général répondent à ce critère. En effet, lorsqu'ils sont implantés dans le corps, les matériaux bioactifs stimulent une réponse biologique qui aboutit à la création d'un lien intime avec l'os [77]. Un point important est leur produit de dissolution (en particulier le silicium et le calcium) qui permet de réguler sept familles de gène dans les ostéoblastes [78-81].

4) Il doit se lier à l'os sans formation d'interface fibreuse mais créant une interface stable.

5) Il exhibe des propriétés mécaniques proches de celles du site osseux à restaurer.

6) Il est conçu à partir d'une technique qui peut produire un matériau façonnable dans le but de s'adapter à la forme du site osseux défectueux ou malade.

7) Il a le potentiel d'être produit dans un but commercial et doit pouvoir être stérilisable selon les normes internationales standards requises pour une utilisation clinique.

C.6.1.2. Différents procédés de synthèses

Différents procédés existent pour obtenir des céramiques synthétiques. En effet, des matériaux à structure poreuse peuvent être obtenus par introduction d'agents moussants au sein de suspensions céramiques [82-86], par imprégnation de mousses polymériques [87-89], par introduction de porogènes organiques au sein des poudres [90-93], par mélange polymères/suspensions céramiques [94], par stéréolithographie [95], par atomisation électrostatique [96], par réactions entre poudres avec dégagement gazeux [97], ou encore par prototypage rapide [98-99]. Une distribution aléatoire de la porosité est obtenue avec la plupart de ces méthodes, tant en terme de réseau interconnecté que de volume de pores.

C.6.2. Scaffolds pour l'ingénierie tissulaire

Le manque de tissu et/ou d'organes disponibles a contribué à l'émergence de l'ingénierie tissulaire. Depuis les deux dernières décennies, la recherche et le développement dans le champ de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénérative a progressé très rapidement [100]. L'ingénierie tissulaire est un champ interdisciplinaire qui applique le principe de l'ingénierie et des sciences vivantes à travers le développement de substituts biologiques qui

restaurent, maintiennent ou améliorent les fonctions d'un tissu ou d'un organe dans son ensemble. L'ingénierie tissulaire a émergé comme une nouvelle méthode impliquant la combinaison de cellules, d'un scaffold et d'agents bioactifs pour fabriquer un nouveau tissu ou remplacer un tissu endommagé. Les scaffolds tridimensionnel sont des outils fondamentaux pour guider la formation du tissu en *in vitro* ou en *in vivo*. Dans le corps humain, les cellules et les tissus sont organisés suivant une architecture en 3 dimensions. Pour réparer ces tissus, des scaffolds peuvent être fabriqués suivant différentes méthodes de synthèse pour faciliter la distribution cellulaire et guider la croissance tridimensionnelle du tissu.

De nombreuses techniques des synthèses ont déjà été utilisées pour la conception de scaffolds. Dans la littérature, les méthodes telles que la coulée de solvant [101] ; la technique de lessivage particulaire [102-103] qui utilise un porogène comme le sel ou le sucre ; la technique de moussage [104] qui est obtenue grâce au dioxyde de carbone sous pression ; la séparation de phase [101,104-106] ; l'électrofilage [107-112] qui utilise la force électrostatique pour produire des fibres de polymère allant de la nano à la micro échelle et pouvant être tissées ; la technique de lyophilisation [113-114] qui, par sublimation d'un solvant, permet d'obtenir un matériau poreux tridimensionnel et le prototypage rapide [115-119] qui est une technique assistée par ordinateur et qui peut produire des objets en 3D (impression 3D) par une méthode couche par couche. Cette dernière technique est de plus en plus utilisée en chirurgie réparatrice pour que le biomatériau comble parfaitement le défect osseux à restaurer. Cela permet de s'adapter rapidement au besoin du patient.

C.7. Les verres bioactifs

Appartenant à la famille des biomatériaux céramiques, les verres bioactifs sont particulièrement indiqués pour une utilisation en tant que substituts osseux en chirurgies orthopédique, dentaire ou maxillo-faciale car ils présentent une grande réactivité lorsqu'ils sont en contact avec le milieu biologique.

C.7.1 Histoire du verre bioactif

Le premier verre bioactif a été inventé par Hench à l'Université de Floride en 1969. Suite à une conversation avec un colonel de l'armée américaine, le professeur Hench a commencé son travail sur la recherche d'un matériau qui pourrait se lier à l'os. Ce colonel, tout juste rentré de

la guerre du Vietnam, lui a demandé si un matériau pouvait être développé pour survivre à l'agressivité des conditions biologiques du corps humain. Le problème était que tous les implants utilisés à l'époque, comme certains métaux et biopolymères, engendraient la formation d'une encapsulation fibreuse qui ne permettait pas aux matériaux d'interagir avec le tissu vivant. Dans le but de former un lien intime avec le tissu vivant, Hench a synthétisé un verre dégradable dans le système Na_2O-CaO-SiO_2-P_2O_5 avec une teneur élevée en calcium [120].

C.7.2 Le premier verre bioactif : 45S5

La découverte majeure était qu'un verre, nommé 45S5 puis plus tard, Bioglass®, de composition molaire suivante : 46,4% SiO_2, 24,4% Na_2O, 26.9% CaO et 2,6% P_2O_5, pouvait former un lien intime avec l'os de sorte qu'il fallait briser celui-ci pour pouvoir retirer le matériau [121].

Le domaine des céramiques bioactives était lancé et les synthèses de nombreux matériaux comme les verres bioactifs [120], les vitrocéramiques [122], l'hydroxyapatite synthétique et les phosphates de calcium [123], basés sur l'étude et la modification du premier verre bioactif 45S5, allaient être mis en œuvre.

Le verre 45S5 se lie très rapidement au tissu osseux et stimule la croissance osseuse à l'interface os/implant.

Le mécanisme de cette liaison os/verre 45S5 est attribué à la formation d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée (HCA) à la surface du verre bioactif suite à sa dissolution [121]. Les étapes de cette bioactivité sont décrites dans la partie III de ce chapitre. Les éléments relargués comme le silicium et le calcium stimulent les cellules ostéogéniques qui contribuent à la formation du tissu osseux [124].

Il existe de nombreux types de verres bioactifs: les verres les plus répandus à base de silicates; les verres à base de phosphates et récemment, les verres à base de borates [125-126].

Après 40 années de recherche sur les verres bioactifs, entreprises par des équipes dans le monde entier, aucun autre verre bioactif, présentant de meilleures propriétés biologiques que le verre 45S5, n'a été trouvé [127].

III. Les verres bioactifs : biomatériaux d'origine synthétique

A. Généralités sur les verres

A.1. Définitions du verre

Ils existent plusieurs définitions du verre.

A l'école de soufflage du verre à Paris, le verre est considéré comme une solution solide en état de surfusion provenant de la fonte d'un mélange homogène comprenant principalement de la silice, de la soude et de la chaux.

Mais la définition la plus commune du verre est celle de Zarzycki [128]: « un verre est un solide non cristallin présentant le phénomène de transition vitreuse ». Le verre est donc un matériau solide, qui n'a, contrairement aux matériaux cristallins, pas d'ordre atomique à longue distance.

A.2. Propriétés du verre

Le verre est utilisé essentiellement en optique pour ses propriétés réfringentes (lentille, verre de lunette).

Les verres d'oxydes sont connus pour leur application en optique dans le visible et le proche infrarouge (lentilles, prismes, fibres, miroir) et en télécommunication (fibre optique). La transparence des verres silicatés en font un élément majeur dans le développement de l'énergie solaire [129-130].

Les verres de chalcogénures se développent aujourd'hui pour des applications d'optique infrarouge, dont la vision nocturne, la spectroscopie infrarouge par onde évanescente [131], des applications d'holographie, d'optoélectronique [131-133]. Les verres de chalcogénures sont également massivement utilisés dans les DVD où ils sont supports de l'information [131].

Le verre est également utilisé en chimie et dans l'industrie agroalimentaire car il réagit très peu avec la plupart des composés utilisés dans ces domaines, c'est donc un matériau idéal pour les contenants (pots de yaourt, bouteille, bécher, tube à essai). Néanmoins, le verre peut être dissous par un seul liquide: l'acide fluorhydrique.

Dans le domaine du nucléaire, le verre est utilisé pour confiner les déchets radioactifs de haute activité. En effet la structure désordonnée du verre permet d'absorber une partie des radiations.

Le verre est aussi un matériau de construction qui a fait ses preuves que ce soit dans le domaine de l'architecture ou le domaine automobile. Il est utilisé comme isolant sous forme de laine de verre (isolant léger et ininflammable) ou comme verres autonettoyants (grandes baie vitrées).

L'émergence des verres métalliques a permis d'introduire des verres comme matériaux de structure, du fait de leurs extraordinaires propriétés mécaniques, en particulier sous forme de fibres ou de rubans de renfort pour des bétons hautes performances [134]. Les verres métalliques se sont également introduits dans les articles de sports (raquettes, skis, batte) [135].

Le verre peut se rencontrer sous forme de microbilles, de fibres (coupées ou non), de mats (fibres disposées «en vrac») ou de tissus (mode de tissage, « taffetas », par exemple). Incorporées dans la matrice polymère ou déposées en surface, ces présentations sont utilisées notamment comme renfort de résines thermoplastiques (polyamide), durcissables (époxyde) dans les plastiques, ainsi que dans les matériaux composites.

A.3. Structure et composition chimique du verre

A.3.1. Structure chimique du verre

Le verre présente un important désordre structural. Sa structure microscopique est telle qu'il n'existe aucun ordre à grande distance dans un verre. Il peut être vu comme un «réseau» tridimensionnel, semblable à celui d'un cristal, mais dans lequel seul l'ordre à courte distance est conservé (figure 1).

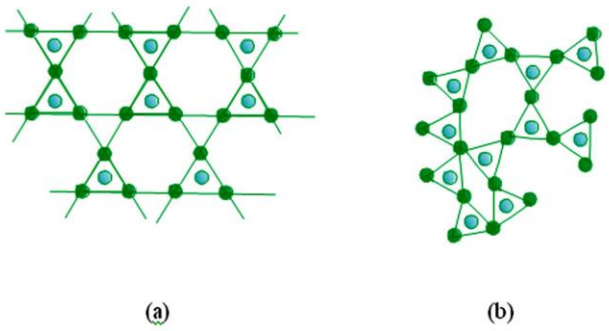


Figure 1 : Représentation bidimensionnelle de la silice.
(a): Silice sous sa forme cristobalite; (b) Silice amorphe [136]

Dans les deux cas, chaque atome de silicium est lié avec quatre atomes d'oxygène, formant ainsi des tétraèdres SiO_4; chaque tétraèdre pouvant être considéré comme une «brique» de l'édifice final. Mais tandis que la cristobalite peut être définie comme un empilement régulier de ces briques SiO_4, la silice vitreuse peut être considérée comme un empilement anarchique de ces mêmes briques SiO_4. Cette différence peut s'observer par diffraction des rayons X (figure 2).

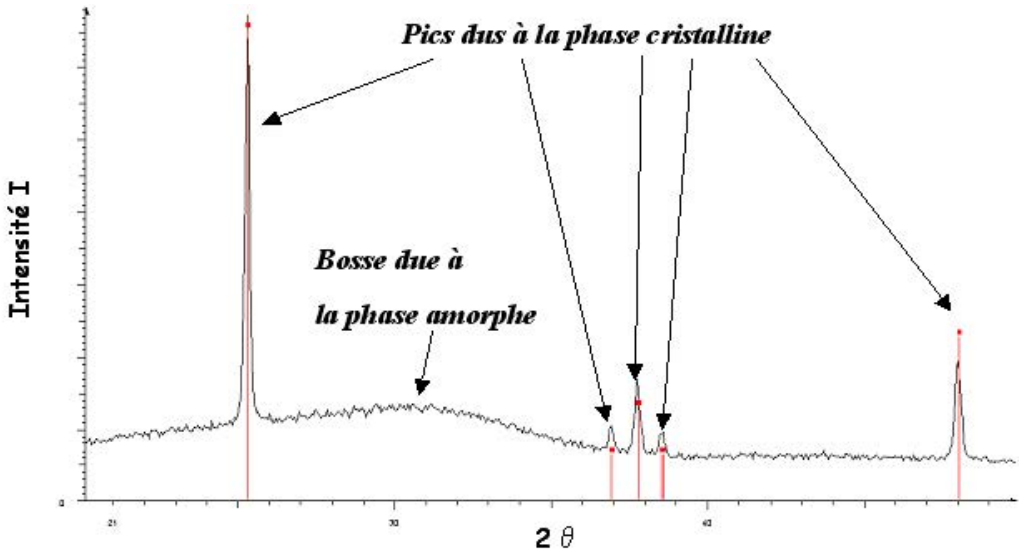


Figure 2: Diffractogramme d'un mélange de deux matériaux, l'un cristallin, l'autre amorphe [137]

A.3.2. Composition chimique du verre

En raison de sa structure amorphe, le verre est soumis à très peu de contraintes stœchiométriques. De ce fait, un verre peut inclure en son sein une très grande variété d'éléments chimiques et présenter des compositions chimiques très variées.

Dans un verre d'oxydes, ces différents éléments sont sous une forme cationique, afin de former des liaisons avec l'anion oxygène O^{2-}.

Les cations intervenant dans la composition de verres peuvent être classés en trois catégories (détaillées dans la partie suivante) selon le rôle structural qu'ils jouent lors de la vitrification (formation du verre): les formateurs de réseau, les modificateurs de réseau et les éléments dits intermédiaires. Les critères structuraux de cette classification prennent en compte le nombre de coordination (nombre d'atomes d'oxygène auquel est lié le cation) et les forces de liaisons.

Les formateurs de réseau sont des éléments qui peuvent à eux seuls former un verre. Les éléments formateurs les plus courants sont le silicium Si (sous sa forme oxyde SiO_2), le bore B (sous sa forme oxyde B_2O_3), le phosphore P (sous sa forme oxyde P_2O_5), le germanium Ge (sous sa forme oxyde GeO_2) et l'arsenic As (sous sa forme oxyde As_2O_3).
Ce sont des éléments métalliques de valence assez élevée (généralement 3 ou 4, parfois 5), qui forment des liaisons iono-covalentes (mi-covalente, mi-ionique) avec les atomes d'oxygène. Ils donnent des polyèdres de faible coordinence (3 ou 4), comme SiO_4, BO_4 ou BO_3. Ces polyèdres sont liés par leurs sommets et forment le réseau vitreux [138].

Les modificateurs de réseau ne peuvent pas former de verre à eux seuls. Ce sont essentiellement les alcalins et les alcalino-terreux.
Ils sont habituellement plus volumineux (rayon ionique plus important) que les formateurs de réseau, faiblement chargés et donnent des polyèdres de grande coordinence. Leurs liaisons avec les atomes d'oxygène sont plus ioniques que celles établies par les formateurs.
Ils peuvent avoir deux rôles structuraux bien distincts, soit modificateurs de réseau vrais, soit compensateurs de charge.

- *Les modificateurs de réseau vrais* cassent les liaisons entre les polyèdres du réseau vitreux provoquant une dépolymérisation de ce dernier. Ils transforment alors les oxygènes pontants, qui lient deux éléments formateurs de réseau, en oxygènes non-pontants, liés à un seul formateur de réseau. Ceci se traduit à l'échelle macroscopique par une diminution du point de fusion et de la viscosité.
- *Les compensateurs de charge* quant à eux compensent une charge négative sur un polyèdre formateur de réseau, par exemple BO_4^-, lui permettant d'être stable dans cette configuration [138].

Les éléments intermédiaires ont différents comportements: certains de ces éléments sont soit formateurs, soit modificateurs selon la composition du verre tandis que d'autres n'auront ni l'une ni l'autre de ces fonctions mais un rôle intermédiaire.
Les principaux éléments intermédiaires dans les verres d'oxydes sont l'aluminium Al, le fer Fe, le titane Ti, le nickel Ni et le zinc Zn [138].

B. Verres bioactifs et concept de bioactivité

B.1. Indice de bioactivité

La bioactivité a été définie comme étant une réponse biologique spécifique à l'interface du matériau implanté qui conduit à la formation d'un lien intime entre le tissu vivant et l'implant. Il y a alors création d'un environnement compatible à la croissance osseuse (ostéogenèse) avec le développement d'une interface minérale qui joue le rôle de lien naturel. Tous les résultats des tests *in vitro* et *in vivo* montrent que la caractéristique commune aux matériaux dits bioactifs est la couche biologiquement active d'hydroxyapatite carbonatée qui se forme à leur surface [140-142].

Selon les compositions chimiques des verres bioactifs, les mécanismes, la vitesse de formation de l'hydroxyapatite ou la force des liaisons à l'interface os/tissu osseux sont différents.

Hench a introduit un indice de bioactivité qui peut être corrélé au temps pour lequel plus de 50% de l'interface de l'implant est lié à l'os [143]. Cet indice de bioactivité est donné par la relation suivante:

$$I_B = \frac{100}{t_{0,5}bb}$$

Où I_B : indice de bioactivité et $t_{0,5bb}$: le temps (en jours) pour lequel plus de 50% de l'interface de l'implant est liée à l'os (bb signifie « bone bonding »)

De nombreux verres dans le système SiO_2-Na_2O-CaO-P_2O_5 ont été étudiés avec une concentration en P_2O_5 constante et égale à 6% en masse. L'influence de la composition chimique des verres est illustrée par la figure 3 donnant la relation entre l'indice de bioactivité et la composition chimique.

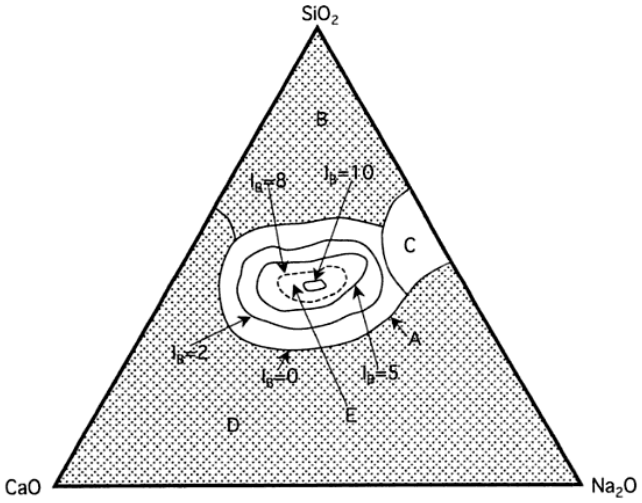


Figure 3 : Triangle de Hench et indice de bioactivité dans le système SiO_2-CaO-Na_2O et 6% de P_2O_5 [144].

Dans la région A, les verres sont bioactifs et se lient à l'os. L'indice I_B varie entre 2 et 12,5 et les verres dont la teneur est comprise entre 40 et 52% en masse de SiO_2 ont un indice compris entre 10 et 12,5. Dans la région d'indice 8, les constituants du collagène du tissu mou peuvent adhérer fortement aux verres bioactifs [144]. L'introduction d'autres éléments chimiques comme le strontium ou le magnésium peut avoir une influence sur cet indice de bioactivité [145].

Les verres situés dans la zone B sont quasi inertes et entrainent la formation d'une encapsulation fibreuse empêchant la création d'un lien intime entre l'os et l'implant.

Dans la région C, les verres sont totalement résorbés entre 10 et 30 jours selon leur composition [144].

Enfin, les verres dont la composition se situe dans la zone D ne sont techniquement pas synthétisables et n'ont jamais fait l'objet d'études *in vivo* [144].

B.2. Réactions chimiques à l'origine de la bioactivité

Le processus de bioactivité, selon la composition du verre bioactif, répond à une certaine cinétique et suit une série de réactions chimiques aboutissant à la formation de l'hydroxyapatite. Ce processus se décompose en 11 étapes [146-147]:

Etape 1: Echange rapide de cations alcalins avec les H_3O^+ du milieu physiologique.

$$Si\text{-}O\text{-}Na^+ + H^+ + OH^- \Longrightarrow Si\text{-}OH + Na^+_{solution} + OH^-$$

Etape 2: Perte de silice soluble sous forme de $Si(OH)_4$ vers la solution. Les liaisons Si-O-Si se rompent et des groupements silanols SiOH se forment à la surface du verre.

$$2\ (Si\text{-}O\text{-}Si) + 2\ (OH) \Longrightarrow Si\text{-}OH + HO\text{-}Si$$

Etape 3: Condensation et repolymérisation d'une couche à la surface riche en SiO_2 qui est appauvrie en cation alcalins ou alcalino-terreux.

$$2\ (Si\text{-}OH) \Longrightarrow -Si\text{-}O\text{-}Si\text{-}O\text{-}Si\text{-}O\text{-}Si\text{-}O-$$

Etape 4: Migration de Ca^{2+} et PO_4^{3-} vers la surface à travers la couche riche en SiO_2 pour former un film riche en $CaO\text{-}P_2O_5$ sur cette même couche de SiO_2. Cette migration est suivie par la croissance d'un film amorphe riche en $CaO\text{-}P_2O_5$ par incorporation progressive de calcium et de phosphate provenant de la solution.

Etape 5: Cristallisation du film amorphe riche en $CaO\text{-}P_2O_5$ par incorporation d'OH-, CO_3^{2-} pour former une couche d'hydroxyapatite carbonatée.

Etape 6: Adsorption de substances biologiques (protéines, facteur de croissance) par la couche d'hydroxyapatite.

Etape 7: Action des macrophages.

Etape 8: Adhésion des cellules souches.

Etape 9: Différenciation des cellules souches en ostéoblastes et prolifération de ces derniers.

Etape 10: Génération de la matrice osseuse par formation d'une matrice minérale par agglomération de cristaux d'apatite liés entre eux par l'intermédiaire de fibres de collagène.

Etape 11: Cristallisation de la matrice minérale.

Les étapes 1 à 5 peuvent être étudiées lorsque le verre est immergé dans un liquide physiologique synthétique (SBF) [138]. Les étapes 6 à 11 sont quant à elles observées en

milieu biologique, sont nécessaires pour avoir une liaison intime avec le tissu osseux et sont similaires au remodelage osseux.

C. Synthèse d'un verre bioactif

Différents procédés peuvent être utilisés pour l'élaboration d'un verre.

La méthode la plus « classique » d'élaboration est la fusion. Elle consiste à porter un mélange d'oxydes à des températures comprises entre 800°C et 1600°C. En général, la synthèse est effectuée dans des creusets en platine, métal présentant une forte température de fusion.

Une autre méthode de synthèse est la voie sol-gel. C'est une voie de synthèse qui, après des réactions de polymérisation, forme un gel [148], composé inorganique humide, constitué de liaisons covalentes, qui peut être séché et chauffé au alentour de 600°C pour devenir un verre. Ce processus chimique est mené à basse température ce qui autorise un meilleur contrôle de la cinétique de la réaction. Il est, de plus, avantageux en terme de coût [149]. Les verres synthétisés par voie sol-gel ont démontré une meilleure bioactivité du fait de leur propriétés texturales uniques telles qu'une porosité interconnectée [150-152]. L'inconvénient de cette voie de synthèse réside dans le fait que de nombreux paramètres sont à contrôlés (température, pH, temps d'agitation) et le risque de pollution est plus important que la synthèse par fusion.

Références Chapitre 1

[1] T. Thomas, A. Martin, M-H. Lafage-Proust. *Physiologie du tissu osseux*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Appareil locomoteur, 14-002-B-10, (2008).

[2] P. Meyrueis, A. Cazenave, R. Zimmermann. *Biomechanics of bones and treatment of fractures*. EMC-Rhumatologie Orthopédie 1 (2004) 64-93.

[3] http://amar-constantine.e-monsite.com/pages/anatomie-physiologie/osteologie.html-Site visité le 06/08/2013

[4] A.S. Posner, A. Perloff, A.F. Dioro. *Refinement of the hydroxyapatite structure.* ActaCryst 11 (1958) 308.

[5] http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/francais/stuetzgewebe/knochen/zellen/f osteoklast.php-Site visité le 06/08/2013

[6] http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-osseux-2009-Site visité le 06/08/2013

[7] T. Funck-Brentano, M. Cohen-Solal. *Bone aging: new actors of bone cell communication*. Médecine et Longévité 2 (2010) 200-204.

[8]http://umvf.biomedicale.univparis5.fr/wiki/index.php?title=Livre_Multi%C3%A9dia_de_S%C3%A9miologie_Ost%C3%A9o-articulaire#Livre-Site visité le 27/07/2013

[9] N.C Blumenthal, F. Betts, A.S. Posner. *Formation and structure of Ca-deficient hydroxyapatite*. Calcif Tissue Int 33 (198) 111-117.

[10] G. Penel, G. Leroy, C. Rey, E. Bres. *MicroRaman spectral study of the PO_4 and CO_3 vibrational modes in synthetic and biological apatites*, Calcif Tissue Int. 63 (1998) 475–481.

[11] J. Green. *The physicochemical structure of bone: cellular and noncellular elements*. Miner. Electrolyte Metab. 20 (1994) 7–15.

[12] T. Kobayashi, H. Kronenberg. *Minireview: transcriptional regulation in development of bone.*Endocrinology 146 (2005) 1012–1017.

[13] J. Gokhale, P.G. Robey, A.L. Boskey.The *Biochemistry of Bone*. in: R. Marcus, D. Feldman, J. Kelsey (Eds.), 2nd Ed., Osteoporosis, volume 1, Academic Press, San Diego, (2001) 107–189.

[14] N.P. Camacho, C.M. Rimnac, R.A. Meyer Jr., S. Doty, A.L. Boskey. *Effect of abnormal mineralization on the mechanical behavior of X-linked hypophosphatemic mice femora.* Bone 17 (1995) 271–278.

[15] H.C. Anderson, D. Harmey, N.P. Camacho, R. Garimella, J.B. Sipe, S. Tague, X. Bi, K. Johnson, R. Terkeltaub, J.L. Millan. *Sustained osteomalacia of long bones despite major improvement in other hypophosphatasia-related mineral deficits in tissue nonspecific alkaline phosphatase/nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 double-deficient mice.* Am. J. Pathol. 166 (2005) 1711–1720.

[16] H.C.Anderson, J.B. Sipe, L.Hessle, R.Dhanyamraju, E.Atti, N.P. Camacho, J.L.Millan. *Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice.* Am. J. Pathol. 164 (2004) 841–847.

[17] L.C. Gowen, D.N. Petersen, A.L.Mansolf, H. Qi, J.L. Stock,G.T. Tkalcevic, H.A. Simmons, D.T. Crawford, K.L. Chidsey-Frink, J.D. McNeish, T.A. Brown. *Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bonemass.* J. Biol. Chem. 278 (2003) 1998–2007.

[18] M. Goldberg, A.L. Boskey. *Lipids and biomineralizations.* Prog. Histochem. Cytochem. 31 (1996) 1–187.

[19] D.F. Williams. *Definitions in Biomaterials*. Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, UK, (1986).

[20] D. Hartmann. *Interactions (directes et indirectes) matériau/vivant*. Colloque C-BIOSENSS 16/09/201, http://cbiosenss.u-clermont1.fr/IMG/pdf/hartmann.pdf.

[21] JM. Katz, C. Nataraj, R Jaw, E Deigl, P. Bursac. *Demineralised bone matrix as an osteoinductive biomaterial and in vitro predictors of its biological potential.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater 89 (2009) 127-134

[22] JC. Wang, A. Alanay, D. Mark, LE. Kanim, PA. Campbell, EG. Dawson. *A comparison of commercially available demineralised bone matrix for spinal fusion.* Eur Spine J 16 (2007) 1233-1240

[23] SM. Tuli, AD. Singh. *The osteoinductive property of decalcified bone matrix. An experimental study.* J Bone Joint Surg Br 60 (1978) 116-123

[24] PL. Docquier, C. Delloye. *Treatment of aneurysmal bone cysts by introduction of demineralised bone and autogenous bone marrow.* J.Bone Joint Surg Am 87 (2005) 2253-2288

[25] JR. Tynan, NS. Schachar, GB. Marshall, RR. Gray. *Pathologic fracture through a unicameral bone cyst of the pelvis: CT-guided percutaneous curettage, biopsy, and bone matrix injection.* J Vasc Interv Radiol 16 (2005) 293-296

[26] CJ. Damien, JR. Parsons, AB. Prewett, DC. Rietveld, MC. Zimmerman. *Investigation of an organic delivery system for demineralised bone matrix in a delayed- healing cranial defect model.* J Biomed Mater Res 28 (1994) 553-561

[27] UR. Knothe, DS. Springfield. *A novel surgical procedure for bridging of massive bone defects.* World J Surg Oncol 3 (2005) 7-11

[28] JF. Connolly. *Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair.* Clin Orthop Relat Res (1995) 8-18

[29] JR. Lieberman, SC. Ghivizzani, CH. Evans. *Gene transfer approaches to the healing of bone and cartilage.* Mol Ther 6 2(002) 141-147.

[30] RT. Chiroff, EW. White, KN. Weber, DM. Roy. *Tissue ingrowth of replamine form implants.* J Biomed Mater Res 9 (1975) 29-45

[31] J. Colas-Parros, F. Jordana. *Société Francophone de Biomatériaux Dentaires.* Université Medicale Virtuelle Francophone. (2009) 5-6.

[32] E.C. Elsinger, L. Leal. Coralline hydroxyapatite bone graft substitutes. J. Foot Ankle Surg 5 (1996) 396-399.

[33] DP. Mukherjee, AS. Tunkle, RA. Roberts, A. Clavenna, S. Rogers, D. Smith. *An animal evaluation of a paste of chitosan glutamate and hydroxyapatite as a synthetic bone graft material.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater 67 (2003) 603-609

[34] L.L. Hench. *Bioceramics: From Concept to Clinic*. Journal of the American Ceramic Society 74 (1991) 1487-510.

[35] L.G. Donamura. *Biomaterials-an interface approach.* In: L.L. Hench and E.C. Ethridge, Academi, London; (1982) 385 Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition, 21 (1983) 677.

[36] A. Lucas-Girot. *Elaboration d'un composite macroporeux associant carbonate de calcium et antibiotique. Tolérance immunologique locale d'un biomatériau implantable: corail/collagène*. Thèse n° d'ordre 1511, Université de Rennes, (1996).

[37] A. Lucas-Girot, P. Langlois, JC. Sangleboeuf, A. Ouammou, T. Rouxel, J. Gaude. *A synthetic aragonite-based bioceramic: influence of process parameters on porosity and compressive strength.* Biomaterials 23 (2002) 503-510

[38] A. Lucas-Girot, MC. Verdier, O. Tribut, JC. Sangleboeuf, H. Allain, H. Oudadesse. *Gentamicin-loaded calcium carbonate materials: Comparison of two drug-loading modes.* J. Biomed. Mat. Res. Part B: Applied Biomaterials 73B (2005) 164-170

[39] A. Lucas-Girot, J. Gaudé, C. Carel, J. F. Michel, G. Cathelineau. *A synthetic aragonite-based ceramic as a bone graft substitute and substrate for antibiotics.* International Journal of Inorganic Materials 3 (2001) 87-94

[40] SK. Gosh, SK. Nandi, B. Kundu, S. Datta. *In vivo response of porous hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 86 (2008) 217-227

[41] SK. Nandi, SK. Kundu, SK. Gosk. *Efficacy of nanohydroxyapatite prepared by an aqueous solution combustion technique in healing bone defects of goat*. J Vet Sci 9 (2008) 183-191

[42] Noshi T, Yoshikawa T, Ikeuchi M, Dohi Y, Ohgushi H, Horiuchi K. *Enhancement of the in vivo osteogenic potential of marrow/hydroxyapatite composites by bovine bone morphogenetic protein.* J Biomed Mater Res 52 (2000) 621-630

[43] Lepretre S, Chai F, Hornez JC, Vermet G, Neut C, Descamps M. *Prolonged local antibiotics delivery from hydryapatite functionalised with cyclodextrin polymers.* Biomaterials 30 (2009) 6086-6093

[44] Toth JM, Lim TH, Ran Y, Weiss NG, Lundberg WR. *Evaluation of porous biphasic calcium phosphate ceramics for anterior cervical interbody fusion in a caprine model* Spine 20 (1995) 2203-2210

[45] Johnson KD, Frierson KE, Keller TS, Cook C, Scheinberg R, Zerwekh J. *Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: a biomechanical, histological, and radiographic analysis.* J Orthop Res 14 (1996) 351-369

[46] Kaito T, Mukai Y, Nishikawa M, Ando W, Yoshikawa H, Myoui A. *Dual hydroxyapatite composite with porous and solid parts: experimental study using canine lumbar interbody fusion model* J Biomed Mater Res B Appl Biomater 78 (2000) 378-384

[47] Motomiya M, Ito M, Takahata M, Kadoya K, Irie K, Abumi K. *Effect of hydroxyapatite porous characteristics on healing outcomes in rabbit posterolateral spinal fusion model.* Eur Spine J 16 (2007) 2215-2224

[48] Braye F, Irigaray JL, Jallot E, Oudadesse H, Weber G, Deschamps N. *Resorption kinetics of osseous substitute: natural coral and synthetic hydroxyapatite.* Biomaterials 17 (1996) 1345-1350

[49] Hayashi K, Uenoyama K, Mashima T, Sugioka Y. *Remodelling of bone around hydroxyapatite and titanium in experimental osteoporosis* Biomaterials 15 (1994) 11-16

[50] Nguyen HQ, Deporter DA, Pilliar RM, Valiquette N, Yakubovich R. *The effect of the sol-gel-formed calcium phosphate coatings on bone ingrowth and osteoconductivity of porous-surfaced Ti alloy implants.* Biomaterials 25 (2004) 865-876

[51] Daculzi G, Legeros RZ, Heughebaert M, Barbieux I. *Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate-ceramics.* Calcif Tissue Int 46 (1990) 20-27

[52] Shigaku S, Katsuyuki F. *Beta-tricalcium phosphate as a bone graft substitute*
Jikeikai Med J 52 (2005) 47-54

[53] Nandi SK, Kundu B, Gosh SK, De DK, Basu D. *Evaluation of new porous beta-tricalcium phosphate ceramic as bone substitute in goat model* Small. Rumin Res 75 (2008) 144-153

[54] Zhang H, Ye XJ, Li JS. *Preparation and biocompatibility evaluation of apatite/wollastonite-derived porous bioactive glass ceramic scaffolds.* Biomed Mater 4 (2009) 045007

[55] Cameron HU, Macnab I, Pilliar RM. *Evaluation of biodegradable ceramic.* J Biomed Mater Res 11 (1977) 179-186

[56] Breitbart AS, Staffenberg DA, Thorne CH, Glat PM, Cunningham NS, Reddhi AH. *Tricalcium phosphate and osteogenin: a bioactive onlay bone graft substitute.* Plast Reconstr Surg 96 (1995) 699-708

[57] Gao TJ, Tuominen TK, Lindholm TS, Kommonen B, Lindholm TC. *Morphological and biomechanical difference in healing in segmental tibial defects implanted with Biocoral or tricalcium phosphate cylinders.* Biomaterials 18 (1997) 219-223

[58]Yoneda M, Terai H, Imai Y, Okada T, Nozaki K, Inoue H. *Repair of an intercalated long bone defect with a synthetic biodegradable bone-inducing implant.* Biomaterials 26 (2005) 5145-5152

[59] Brown WE, Chow LC. *A new calcium phosphate setting cement.* J Dent Res 62 (1983) 672

[60] Cameron HU, Macnab I, Pilliar RM. *Evaluation of biodegradable ceramic* J Biomed Mater Res 11 (1977) 179-186.

[61] Osteoset® Medical Bone graft substitute. *Technical monograph*. p.3-15: http://www.ossano.se/produkter/bensubstitut/Osteoset/6511097%20R5.06%20OSTEOSET%20T%20Tech%20Monograph.pdf.

[62] U. Kneser, P. M Kaufmann, H. C. Fiegel, J. M. Pollok, D. Kluth, H. Herbst, X. Rogiers. *Long-term differentiated function of heterotopically transplanted hepatocytes on three-dimensional polymer matrices.* J. Biomed. Mater. Res. 47 (1999) 494.

[63] T. Hadlock, C. Sundback, D. Hunter, M. Cheney, J.P Vacanti. *A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration.* Tissue Eng. 6 (2000) 119.

[64] S. L. Ishaug, G. M. Crane, M. J. Miller, A. W. Yasko, M. J. Yaszemski, A. G. Mikos. *Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds.* J. Biomed. Mater. Res. 36 (1997) 17

[65] L. E. Freed, J. C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanual, A. C. Mikos, R. Langer. *Neocartilage Formation In Vitro and In Vivo Using Cells Cultured on Synthetic Biodegradable Polymers* J. Biomed. Mater. Res. 27 (1993) 11.

[66] I. Y. Kim, S. J. Seo, H. S. Moon, M. K. Yoo, I. Y. Park, B. C. Kim, C. S. Cho. *Chitosan and its derivatives for tissue engineering.* Biotechnology Advances 26 (2008) 1-21.

[67] M. A. Barbosa, P. L. Granja, C. C. Barrias, I. F. Amaral. *Polysaccharides as scaffolds for bone regeneration.* ITBM-RBM 26 (2005) 212-217.

[68] H. Yun, S. Kim , E. K. Park. *Bioactive glass–poly (ε-caprolactone) composite scaffolds with 3 dimensionally hierarchical pore networks.* Materials Science and Engineering C 31 (2011) 198–205.

[69] J.B. Leach, C.E. Schmidt. *Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds.* Biomaterials 26 2 (2005) 125–135.

[70] L. Nie, D. Chen, J. Suo, P. Zou, S. Feng, Q. Yang, S. Yang, S. Ye. *Physicochemical characterization and biocompatibility in vitro of biphasic calcium phosphate/polyvinyl alcohol scaffolds prepared by freeze-drying method for bone tissue engineering applications.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 100 (2012) 169– 176.

[71] J. Druon, M. Aubault, L. Le Nail, P. Rosset. *Modular distal-locking femoral revision stem with complete hydroxyapatite coating. Prospective series of 47 stems at a minimum 5 years' follow-up.* Revue de chirurgie orthopédique et traumatologique 99 (2013) 572-576.

[72] G.E. Stan, A.C. Popa, A.C. Galca, G. Aldica, J.M.F. Ferreira. *Strong bonding between sputtered Bioglass-ceramic films and Ti-substrate implants induced by atomic inter-diffusion post-deposition heat-treatments.* Applied Surface Science 280 (2013) 530-538.

[73] H.S Yun, J.W Park, S.H Kim, Y.J Kim, J.H Jang. *Effect of the pore structure of bioactif glass balls on biocompatibility in vitro and in vivo.* Acta biomaterialia 7 (2011) 2651-60.

[74] J.R Jones, P.D. Lee and L. Hench. *Hierarchical porous materials for tissue engineering.* Phil. Trans. R. Soc. A 364 (2006), 263-281.

[75] N. Okii, S. Nishimura, K. Kurisu, Y. Takeshima, T. Uozumi. *In vivo histological changes occuring in hydroxyapatite cranial reconstruction*. Neurol. Med. Chir 41 (2001) 100-104.

[76] C.E. Holy, J.A. Fialkov, J.E. Davies, M.S. Shoichet. *Use of a biomimetic strategy to engineer bone.* J. Biomed. Mater. 65A (2003) 447.

[77] L.L. Hench, J. Wilson. *Introduction to bioceramics.* Singapore: World Scientific. 1993

[78] I.D. Xynos, M.V.J. Hullanen, J.J Batten, L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak. *Bioglass® 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: implications and applications for bone tissue engineering.* Calcif. Tissue Int.67 (2000) 321-29.

[79] I.D. Xynos, A.J Edgar, L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak. *Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 276 (2000) 461-65.

[80] I.D. Xynos, A.J Edgar, L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak. *Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution.* J. Biomed. Mater. Res. 155 (2000) 151-57.

[81] L.L. Hench, I.D. Xynos, L.D.K. Buttery, J.M. Polak. *Bioactive materials to control cell cycle.* J. Mater. Res. Innov 3 (2000) 313-23.

[82] E. Ryshkewitch.*Compression strength of porous sintered alumina and zirconia.* J. Am. Ceram. Soc., 36 (1953) 65-68.

[83] B.V. Rejda, J.G. Peelen, K.D. Groot. *Tri-calcium phosphate as a bone substitute.* J. Bioeng. 1 (1977) 93-97.

[84] A.A. Driessen, C.P.A.T. Klein, K. De-Groot. *Preparation and some properties of sintered beta-whitlockite.* Biomaterials, 3 (1982) 113-116

[85] P. Sepulveda, J.G. Binner, S.O. Rogero, O.Z. Higa, J.C. Bressiani. *Production of porous hydroxyapatite by the gel-casting of foams and cytotoxic evaluation* J. Biomed. Mater. Res., 50 (2000) 27-34.

[86] N. Tamai, A. Myoui, T. Tomita, T. Nakase, J. Tanaka, T. Ochi, H. Yoshikawa. *Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo.* J. Biomed. Mater. Res. 59 (2002) 110-117.

[87] A. Almirall, G. Larrecq, J.A. Delgado, S. Martinez, J.A. Planell, M.P. Ginebra. *Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis α-TCP paste*. Biomaterials, 25 (2004) 3671-3680.

[88] J.S. Woyansky, C.E. Scott, W.P. Minnear. *Processing of porous ceramics.* Am. Ceram. Soc. Bull. 71 (1992) 1674-1682.

[89] M. Milosevski, J. Bossert, D. Milosevski, N. Gruevska. *Preparation and properties of dense and porous calcium phosphate.* Ceram. Int. 25 (1999) 693-696.

[90] B.S. Chang, C.K. Lee, K.S. Hong, H.J. Youn, H.S. Ryu, S.S. Chung, K.W. Park. *Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations.* Biomaterials 21 (2000) 1291-1298.

[91] J.M. Bouler, M. Trecant, J. Delecrin, J. Royer, N. Passuti, G. Daculsi. *Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: Influence of five synthesis parameters on compressive strength.* J. Biomed. Mater. Res. 32 (1996) 603-609.

[92] E. Tsuruga, H. Takita, H. Itoh, Y. Wakisaka, Y. Kuboki. *Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis.* J. Biochem. 121 (1997) 317-324.

[93] D.S. Metsger, M.R. Rieger, D.W. Foreman. *Mechanical properties of sintered hydroxyapatite and tricalcium phosphate.* J. Mater. Sci.: Mater. Med. 10 (1999) 9-17.

[94] M. Milosevski, J. Bossert, D. Milosevski, N. Gruevska. *Preparation and properties of dense and porous calcium phosphate.* Ceram. Int. 25 (1999) 693-696.

[95] L.H. Li, J.R.d. Wijn, P. Layrolle, K.D. Groot. *Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering.* J. Biomed. Mater. Res. 61 (2002)109-120.

[96] S. Limpanuphap, B. Derby. *Manufacture of biomaterials by a novel printing process.* J. Mater. Sci.: Mater. Med. 13 (2002) 1163-1166.

[97] S.N. Jayasinghe, M.J. Edirisinghe. *A novel method of forming open cell ceramic foam.* J. Porous Mater. 9 (2002) 265-273.

[98] S. Bose, J. Darsell, M. Kintner, H. Hosick, A. Bandyopandhyay. *Pore size and pore effects on alumina and TCP ceramic scaffolds.* Mater. Sci. Eng. C23 (2003) 479-486.

[99] C.E. Wilson, J.D.d. Bruijin, C.A.V. Blitterswijk, A.J. Verbout, W.J.A. Dhert. *Design and fabrication of standardized hydroxyapatite scaffolds with a defined macro-architecture by rapid prototyping for bone-tissue engineering research.* J. Biomed. Mater. Res., 68A (2003) 123-132.

[100] J.D. Kretlow, A.G. Mikos. *From material to Tissue: Biomaterial Development, Scaffold Fabrication, and Tissue Engineering*. AIChe J. 54 (2008) 3048-3067.

[101] A.G. Mikos, J.S. Temenoff, J.K. Temmser. *Synthetic Bioresorbable polymer scaffold.* In: *An introduction to material in medicine*, Ratner, Hoffman, Schoen, Lemons, Elsevier Academic Press USA (2004) 743.

[102] L. Lu, S. Peter, L. Lyman, H. Lai, S. Leite, J. Tamada, S. Uyama, J. Vacanti, R. Langer, A. Mikos. *In vitro and in vivo degradation of porous poly (DL-lactic-coglycolic acid) foams.* Biomaterials 21 (2000) 1595-1605

[103] P. Plikk, S. Malberg, A.C. Albertsson. *Design of resorbable porous tubular copolyester scaffolds for use in nerve regeneration*. Biomacromolecules 10 (2009) 1259-1264.

[104] E. Sachlos, J.T. Czernuska. *Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid free form fabrication technologyto the production of tissue engineering scaffolds*. European cells and materials 5 (2003) 29-40

[105] F.J. Hua, G.E. Kim, J.D. Lee, Y.K. Son, D.S. Lee. *Preparation of a macroporous scaffold by liquid-liquid phase separation of a PLLA-dioxane-water system*. J. Biomed. Mater. Res 63 (2002) 161-167.

[106] L.A. Smith, J.A. Beck, P.X. Ma. *Nano fibrous scaffolds and their biological effects* In: Tissue Cell and Organ Engineering, C.Kumar, Edition Wiley-VCH (2006) 195.

[107] J.A Matthews, G.E Wnek, D.G Simpson, G.L Bowlin. *Electrospinning of collagen nanofibers.* Biomacromolecules 3 (2002) 232-238.

[108] K. Ohkawa, D. Cha, H.Kim, A. Nishida, H. Yamamoto. *Electrospinning of Chitosan.* Macromolecular Rapid Communications, 25 (2004) 1600-1605.

[109] Z. Ma, M. Kotaki, R. Inai, S. Ramakrishna. *Potential of nanofiber matrix as tissueengineering scaffolds*. Tissue Engineering, 11 (2005) 101–109.

[110] W.J. Li, R.S. Tuan. *Fabrication and application of nanofibrous scaffolds in tissue engineering.* Curr. Protoc. Cell. Biol. 25 (2009) Unit 25.2

[111] D. Liang, B.S. Hsiao, B. Chu. *Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications.* Adv. Drug Deliv. Rev. 59 (2007) 1392–1412.

[112] M.F. Leong, M.Z. Rasheed, T.C Lim, K.S. Chian. *In vitro cell infiltration and in vivo cell in filtration and vascularization in fibrous highly porous poly (D,L-Lactic acid) scaffold fabrication by electrospining technique.* J. Biomed. Res. A, 91 (2009) 231-240

[113] H. Schoof, J. Apel, I. Heschel, G. Rau. *Control of pore structure and size in freezedried collagen sponges.* J. Biomed Mater Res. 58 (2001) 352–357.

[114] E.D. Boland, P.G. Espy, G.L. Bowlin. *Tissue engineering scaffolds.* In Encyclopaedia of Biomaterials and biomedical engineering. Wenk, Bowlin, Edition Richmong, Verginia, USA, (2004) 1633-1635.

[115] L. Lin, S. Ju, L.Cen, H. Zhang, Q.Hu. *Fabrication of porous, TCP scaffolds by combination of rapid prototyping and freeze drying technology.* In: Y. Peng, X.Weng Edition Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, IFMBE Proceedings 19 (2008) 88-91.

[116] T.B. Woodfield, M. Guggenheim, B. von Rechenberg, J. Riesle, C.A. van Blitterswijk, V. Wedler. *Rapid prototyping of anatomically shaped, tissue engineered implants for restoring congruent articulating surfaces in small joints.* Cell Prolif. 4 (2009) 485-497

[117] H. Kai, X. Wang, K.S. Madhukar, L. Qin, Y. Yan, R. Zhang, X. Wang. *Fabrication of two-level tumor bone repair biomaterial based on rapid prototyping technique.* Biofabrication (2009), doi: 10.1088/1758-5082/1/2/025003.

[118] D.W Hutmacher. *Scaffold in tissue engineering bone and cartilage.* Biomaterials 21 (2000) 2529-2543.

[119] D.W Hutmacher. *Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues-state of the art and future perspectives.* J Biomat Sci. Polym. Ed. 12 (2001) 107-124.

[120] Hench LL. *The story of Bioglass.* J Mater Sci – Mater Med 17 (2006) 967–78.

[121] Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. *Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials.* J Biomed Mater Res Symp 334 (1971) 17–41.

[122] Kokubo T. *Bioactive glass-ceramics – properties and applications.* Biomaterials 12 (1991) 155–63.

[123] LeGeros RZ. *Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates.* Clin Orthop Relat Res 395 (2002) 81–98.

[124] Hench LL, Polak JM. *Third-generation biomedical materials.* Science 295 (2002) 1014–1017.

[125] Rahaman MN, Day DE, Bal BS, Fu Q, Jung SB, Bonewald LF, et al. *Bioactive glass in tissue engineering.* Acta Biomater 7 (2011) 2355–2373.

[126] Jung SB, Day DE, Day T, Stoecker W, Taylor P. *Treatment of non-healing diabetic venous stasis ulcers with bioactive glass nanofibers.* Wound Repair Regen 19 (2011) A30.

[127] Julian R. Jones. *Review of bioactive glass: From Hench to hybrids.* Acta Biomaterialia 9 (2013) 4457-86.

[128] J. Zarzycki. *Le verre et l'état vitreux*. Ed. Masson (1982)

[129] J. Deubener, G. Helsch, A. Moiseev, H. Bornhöft. *Glasses for solar energy conversion system*. Journal of the European Ceramic Society 29 (2009) 1203-10.

[130] J. Korecko, V. Jirka, B. Sourek, J. Cerveny. *Module greenhouse with high efficiency of transformation of solar energy, utilizing active and passive glass optical rasters*. Solar Energy 84 (2010) 1794-1808.

[131] B. Bureau, J. Lucas. *Verres et optiques*. Bulletin de l'Union des Physiciens (BUP) 100 (2006) 581-598

[132] Victor I. Mikla, Victor V. Mikla. *Introduction: the past, present and future.* Amorphous Chalcogenides (2012) 13-18.

[133] Ravi Chander, R. Thangaraj. *Optical and electrical properties of Te-substituted Sn-Sb-Se semiconducting thin film*. Thin Solid Films 520 (2012) 1757-61.

[134] Jo Perez. *Matériaux non cristallins et science du désordre*. Presses Polytechniques et universitaires romandes (2001)

[135] Patel AT, Pratap A. *Study of kinetics of glass transition of metallic glasses*. J Therm Anal Calorim. 110 (2012) 567–571.

[136] http://umvf.univ-nantes.fr/odontologie/enseignement/chap1/site/html/6.html. Site visité le 29/08/2013

[137] http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DRX_amorphe.png. Site visité le 29/08/2103

[138] J. Barton, C. Guillemet. Le verre: science et technologie. Les Ulis: EDP Sciences; 2004.

[139] E. Carliste. *In silicon biochemistry.* Wiley, New York, 1986, p 123-136.

[140] L.L. Hench. *Life and death: the ultimate phase transformation*. Thermochimica Acta. 1996 (280-281) 1-13.

[141] L.L. Hench. *Bioactive materials; The potential for tissue regeneration*. Journal of Biomedical Materials Research. 41 (1998) 511-518.

[142] L.L. Hench. *Biomaterials: a forecast for the future*. Biomaterials. 19 (1998) 1419-1423.

[143] L.L. Hench. *Bioactive Ceramics*. In *Bioceramics: Materials characteristics versus in vivo behaviour*, vol. 523, ed P. Dusheyne and J. Lemons. Annal of New York Academy od Sciences, New York, 1988, p54.

[144] L.L. Hench. *Bioactive materials.* Ceramics International 22 (1996) 493-507.

[145] E. Dietrich, H. Oudadesse, A. Lucas-Girot, Y. Le Gal, S. Jeanne, G. Cathelineau. *Effects of Mg and Zn on the surface of doped melt-derived glass for biomaterials applications.* Applied Surface Science 255 (2008) 391–395.

[146] L.L. Hench. *Bioceramics: from concept to clinic*. Journal of American Ceramic Society. 74 (1991) 1487-510.

[147] J.R. Jones. *Review of bioactive glass: From Hench to hybrids.* Acta Biomaterialia 9 (2013) 4457-4486.

[148] L.L. Hench, J.K. West. *The sol-gel process*. Chem Rev 90 (1990) 33-72

[149] J. Lao. *Caractérisation par micro-faisceau d'ions des réactions physico-chimiques induites in vitro par des verres bioactifs nanostructurés élaborés par la méthode sol-gel.* Thèse de l'Université Blaise Pascal soutenue le 17 juillet 2007. Numéro d'ordre: DU 1763.

[150] M.M Pereira, L.L. Hench. *Mechanisms of hydroxyapatite formation on porous gel-silica substrates*. J. Sol-Gel Sci. Tech. 7 (1996) 59-68.

[151] J.P. Zhong, D.C. Greenspan. *Processing and properties of sol-gel bioactive glasses*. J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater., 53 (2000) 694-701.

[152] M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench. *Calcium phosphate formation on sol-gel derived bioactive glasses in vitro.* J. Biomed. Mater. Res. 28 (1994) 693-698.

Chapitre 2

Protocoles de synthèse et techniques d'analyses physico-chimiques.

Chapitre 2 : Protocoles de synthèse et techniques d'analyses physico-chimiques.

I. Synthèses des biomatériaux étudiés

A. Elaboration par fusion des verres bioactifs

Pour la synthèse des verres bioactifs, nous avons choisi la méthode par fusion. C'est une méthode rapide qui réduit les risques de pollutions et permet la synthèse de quantités de verre relativement importantes.

Le verre pur de référence 46S6 a été synthétisé à partir des oxydes suivants : la silice (SiO_2), l'oxyde de calcium ou chaux (CaO), l'oxyde de sodium (Na_2O) et le pentaoxyde de diphosphore (P_2O_5). Ils ont été obtenus en mélangeant et en fondant le silicate de calcium ($CaSiO_3$), le silicate de sodium pentahydraté (Na_2SiO_3, $5H_2O$) et le phosphate de sodium ($Na_3P_3O_9$). Ce verre présente la composition chimique suivante, en pourcentage massique : 46% SiO_2, 24% CaO, 24% Na_2O et 6% P_2O_5.

Les différentes poudres ont été mélangées dans des conteneurs en polyéthylène lavées trois fois à l'eau distillée préalablement puis séchées. Ils ont été ensuite placés pendant 1 heure dans un mélangeur planétaire pour homogénéisation. Une fois les poudres homogénéisées, le mélange a été introduit dans des creusets en platine pouvant résister à une température allant jusqu'à 1760 °C environ. Le traitement thermique dans de tels creusets permet également d'éviter toute sorte de pollution, le platine ne réagissant pas avec nos poudres.
Ainsi, les creusets ont été chauffés selon 2 étapes (voir schéma 1):

- une étape de calcination à 900°C pendant 1 heure ayant pour but de séparer les oxydes qui n'ont pas été introduits dans leur état pur:

$$CaSiO_3 \Longrightarrow CaO + SiO_2$$

$$Na_2SiO_3, 5H_2O \Longrightarrow Na_2O + SiO_2 + 5H_2O_{gaz}$$

$$Na_3P_3O_9 \Longrightarrow Na_2O + P_2O_5$$

- une étape de fusion à 1350°C pendant 3 heures.

A l'issue des 3 heures, le mélange fondu est coulé dans des moules en laiton préchauffés à 565°C. Les verres synthétisés sont ainsi recuits pendant 4 heures à une température supérieure

à la température de transition vitreuse du verre de référence 46S6 afin de supprimer toutes contraintes mécaniques résiduelles. Les moules sont ensuite refroidis lentement jusqu'à température ambiante. Les verres denses obtenus présentent alors une forme massive et cylindrique de 13 mm de diamètre et d'une dizaine de millimètres de hauteur.

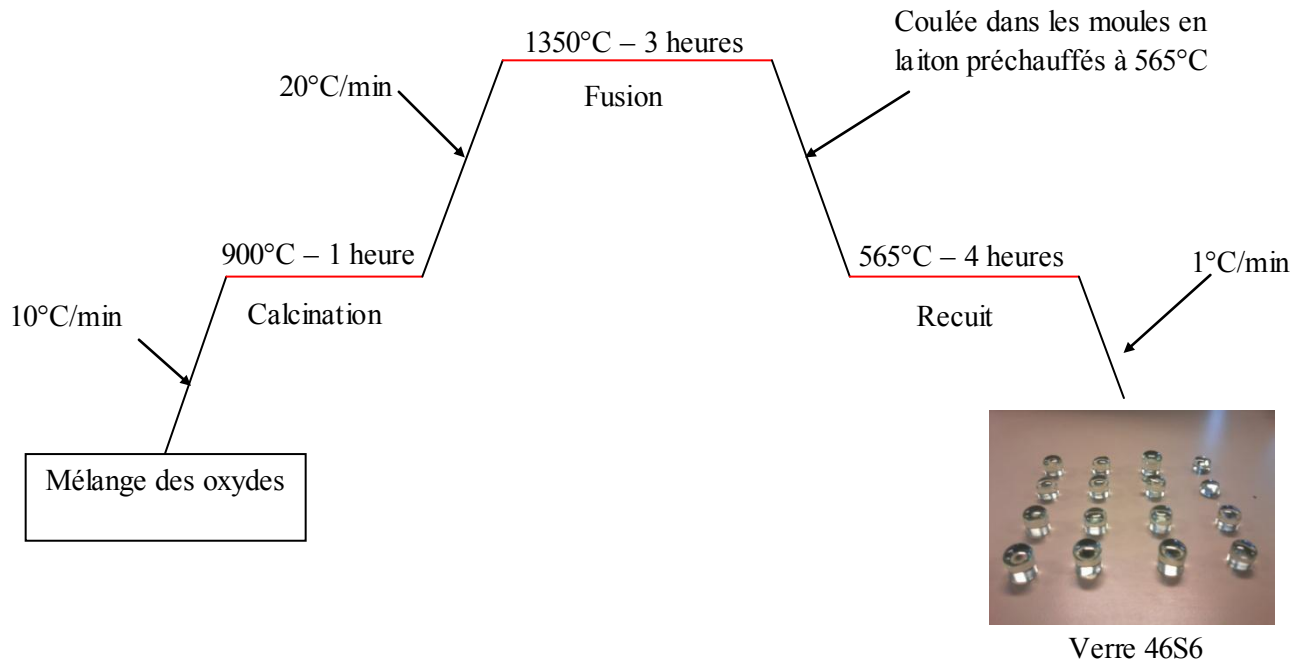


Schéma 1 : Synthèse par fusion des verres bioactifs purs et dopés.

B. Synthèse d'une vitrocéramique poreuse

Les vitrocéramiques sont des matériaux mis en forme à l'état de verre puis traité thermiquement pour obtenir une cristallisation contrôlée et partielle [1]. Il s'agit de céramiques constituées de microcristaux dispersés dans une matrice vitreuse.

Le protocole que nous avons mis en place à nécessiter une grande période de ce travail de recherche. La reproductibilité de la synthèse et l'étude de ce matériau constitue le cœur de ce projet.

Cette synthèse est une méthode originale qui fait intervenir une réaction chimique entre un verre et un nitrure métallique dans le but de former un matériau poreux. La porosité est en effet une caractéristique importante pour un biomatériau car elle permet la colonisation des cellules responsables de la formation osseuse et de la matière organique. C'est dans cette

optique que nous avons développé cette méthode. La bioactivité et la cytotoxicité de ce matériau ont été évaluées puis celui-ci a été implanté chez le lapin. Tous les résultats sont présentés au chapitre 4.

B.1. Présentation de la méthode d'expansion

Cette méthode de synthèse a particulièrement été utilisée pour la conception du verre cellulaire. Ce verre, sous forme de plaques rigides, de blocs ou encore sous forme de coude et de coquille, est utilisé pour ses propriétés d'isolation [2-5].
Issu le plus souvent de verre de bouteille recyclé, le verre cellulaire est obtenu par traitement thermique. Un agent porogène est ajouté au verre broyé provoquant un dégagement de dioxyde de carbone CO_2. Au refroidissement, ce gaz se retrouve enfermé dans des millions de micro-cellules, ce qui donne un matériau «moussé» aux propriétés isolantes et dimensionnellement stables [6].

B.2. Principe général de la méthode de synthèse

Comme énoncé dans le Chapitre 1, de nombreuses méthodes (voie sol-gel, introduction de porogène, stéréolithographie...) permettent de synthétiser un biomatériau poreux à base de verre bioactif.

Dans notre procédé, le dégagement gazeux responsable de la réaction d'expansion provient d'un nitrure métallique (l'azote du nitrure de titane), mélangé à la poudre de verre broyé, par traitement thermique. Le nitrure peut être oxydé soit par l'oxygène de l'air, soit par les oxydes entrant dans la composition du verre. Lorsque l'oxydation a lieu avec les oxydes composant le verre, la réaction est dite *in situ*. C'est ce dernier cas qui nous intéresse ; le phénomène d'expansion a lieu lorsque l'état du milieu fondu permet le piégeage et le développement du dégagement gazeux formé *in situ*. Grâce à la viscosité du verre, le gaz ne peut pas s'échapper facilement et reste emprisonné. Les bulles d'azote font gonfler l'ensemble de la masse lorsque l'on maintient pendant un certain temps la température constante. On obtient alors un matériau poreux [2-5].

Les paramètres de synthèse principaux intervenant sont [2-3] :

- la nature et la teneur en espèces réactives dans le verre,
- la quantité de nitrure utilisé,
- la granulométrie et l'homogénéité des poudres mélangées,
- la température et la durée du traitement thermique.

Le choix des différents paramètres de synthèse a nécessité de multiples essais durant une longue période de ce travail de recherche.

B.3. Choix des espèces réactives

Pour la synthèse de notre biomatériau poreux, le verre 46S6 a été dopé avec 8% en masse de zinc (soit 10% de ZnO). Ce verre a été mélangé avec le nitrure de titane qui est connu pour ses propriétés mécaniques. Le zinc et le titane, présentés au chapitre 3, possède des propriétés chimiques et physiologiques intéressantes en plus de leur rôle dans l'élaboration du matériau poreux. En effet, l'oxyde de zinc et le nitrure de titane peuvent interagir entre eux pour former la porosité de notre biomatériau. Le diagramme d'Ellingham (figure 1), nous donnant l'enthalpie libre standard de réaction en fonction de la température, ci-après, le démontre:

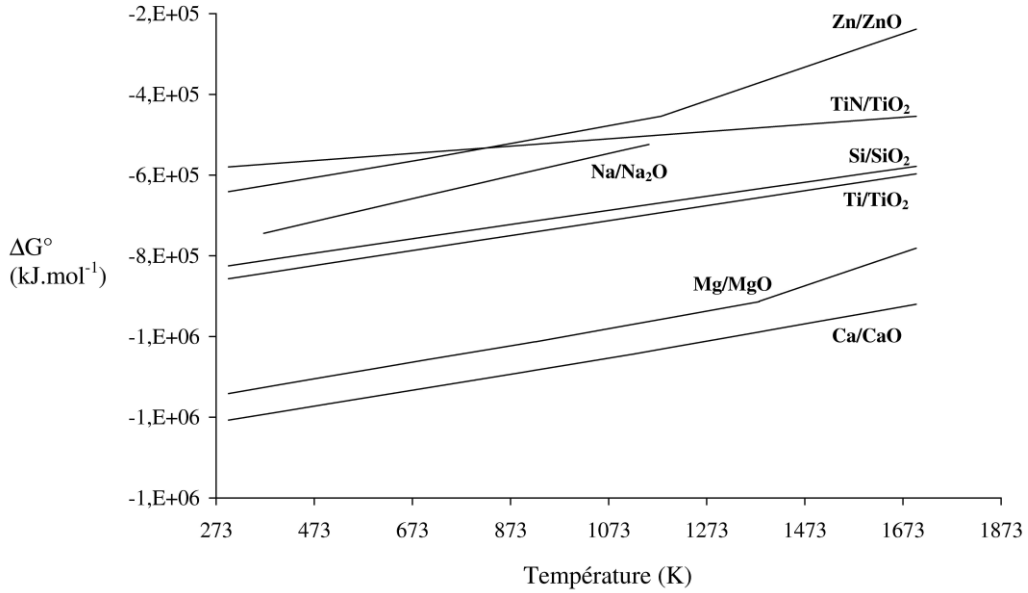


Figure 1: Evolution de l'enthalpie libre ΔG° en fonction de la température.

En effet, dans le cas de systèmes métalliques, il est souvent intéressant de pouvoir se rendre compte rapidement si un métal peut être oxydé ou si, au contraire, un oxyde métallique peut être réduit d'où l'intérêt des diagrammes d'Ellingham.

Le principe de ces graphiques consiste à représenter l'enthalpie libre standard de réactions d'oxydation par le dioxygène en fonction de la température, en prenant soin, lorsqu'un même métal peut présenter plusieurs niveaux d'oxydation, de représenter préférentiellement les réactions qui font intervenir des niveaux redox immédiatement successifs.

La combinaison de ces réactions permet de savoir, par exemple, si un oxyde métallique donné peut être réduit par un autre métal; mais il faut, pour que la comparaison des enthalpies libres $\Delta rG°$ puisse être effectuée simplement, que le dioxygène qui intervient dans les deux équations de réaction s'élimine au moment de leur soustraction. Pour cela, il convient que les enthalpies libres standard reportées correspondent à des équations bilan écrites de manière telle que le coefficient stœchiométrique du dioxygène soit toujours le même. On choisit donc d'écrire les équations en attribuant la valeur -1 au coefficient stœchiométrique algébrique du dioxygène.

Si la droite représentative de la réaction 1 se trouve en dessous de la droite correspondant à la réaction 2 alors le métal de la réaction 1 pourra réduire l'oxyde de métal de la réaction 2 quelle que soit la température [7].

Il peut arriver que les droites représentatives des deux systèmes se coupent. La température de croisement est alors appelée la température d'inversion T_i. Ainsi le métal de la réaction 1 réduit l'oxyde métallique en dessous de T_i. Alors que c'est le métal de la réaction 2 qui réduit l'oxyde de métal de la réaction 1 au dessus de T_i. [7].

Ainsi, dans notre cas, la température d'inversion des systèmes (Zn/ZnO) et (TiN/TiO_2) est de 873 K (= 600°C) environ. C'est à dire, qu'en dessous de 873 K, l'élément Zn va réduire le dioxyde de titane TiO_2 et qu'au-dessus de 873 K, l'élément Ti va réduire l'oxyde de zinc ZnO.

B.4. Protocole de synthèse

Pour l'élaboration du biomatériau poreux, plusieurs paramètres de synthèse ont été étudiés: le taux de zinc dans le verre bioactif, le taux de TiN introduit, la température et la durée du traitement thermique ainsi que la méthode d'homogénéisation. Après de nombreux essais, la méthode de synthèse a pu être établie et le biomatériau poreux reproduit en grande quantité en vue des études i*n vitro* sans et avec cellules puis des études *in vivo*.

Le protocole de synthèse est le suivant:

1ère étape: Synthèse du verre 46S6-8Zn

La synthèse des verres a été décrite précédemment.

Sa composition chimique est la suivante (en pourcentage massique): 46% SiO_2, 19% CaO, 19% Na_2O, 6% P_2O_5 et 10% ZnO.

Les verres massifs obtenus ont été broyés tout d'abord à l'aide d'un mortier puis d'un broyeur mécanique (Retsch Bioblock RM100). La poudre obtenue a été ensuite tamisée (Retsch Bioblock AS200) dans le but d'obtenir une poudre de granulométrie inférieure à 40 µm.

2ème étape: Ajout du nitrure de titane

Le TiN utilisé (Sigma Aldrich) présente une granulométrie de 3 µm.

Pour synthétiser le biomatériau poreux, nous avons mélangé dans un bécher le verre 46S6-8Zn préalablement broyé à 2% en masse de ce nitrure de titane.

3ème étape: Homogénéisation des poudres

Dans le bécher, un barreau aimanté et un volume suffisant de cyclohexane (solvant particulièrement volatile) ont été ajouté. Le mélange a été agité pendant une durée de 2 heures dans le but d'avoir un mélange homogène. Celui-ci est considéré comme tel lorsque le mélange est de couleur gris foncé.

4ème étape: Séchage du mélange

Une fois l'homogénéisation effectuée, le surplus de cyclohexane a été retiré à l'aide d'une pipette Pasteur et le bécher a été placé à l'étuve à 70°C pendant 1 heure pour éliminer la totalité de cyclohexane.

5ème étape: Traitement thermique

Une fois séché, le mélange a été introduit dans des moules en quartz de forme cylindrique de 3 cm de diamètre, résistant à plus de 1600°C et préalablement enduit d'un agent démoulant à base d'eau déminéralisée, de carbonate de calcium et de silicate de sodium. Le traitement thermique a été effectué à 925°C pendant 30 minutes suivant une montée en température de 5°C.min^{-1} et une descente libre jusqu'à température ambiante.

Le matériau obtenu se présente sous la forme d'un « dôme ». La photo 1 ci-dessous représente une pastille prélevée au cœur du matériau en vue des tests de cytotoxicité.

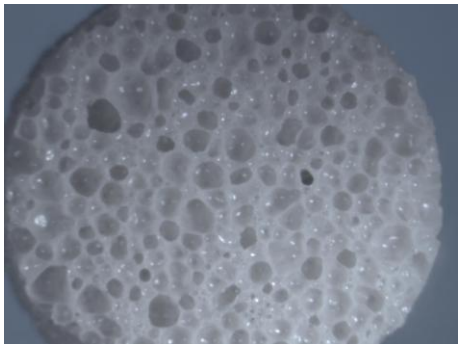


Photo 1 : Vitrocéramique poreuse obtenue après traitement thermique à 925°C pendant 30 minutes.

C. Conception de scaffolds chitosan/verre bioactif

Trois types de scaffold, de concentrations en chitosan et en verre bioactif variées, ont été synthétisés. Le but est d'utiliser ces scaffolds comme vecteur d'une substance médicamenteuse. Leur synthèse est présentée dans le schéma 2.

Dans un premier temps, 3g de poudre de chitosan (Aldrich) ont été dissous dans une solution d'acide acétique à 1% dans un bécher. Le tout a été mélangé par agitation magnétique à température ambiante pour obtenir la dissolution totale de la poudre de chitosan et une homogénéisation complète de la solution. Une solution d'aspect gélifié de couleur orange était obtenue. Le verre bioactif 46S6, synthétisé par fusion et sous forme de poudre de granulométrie inférieure à 40 µm, a été ajouté à la solution de chitosan préalablement obtenue.

Les scaffolds ont été nommés *x*CH-*y*BG où *x* correspond à la proportion de chitosan et *y* à celle de verre bioactif. Le tableau 1 résume les masses utilisées pour obtenir chaque type de scaffold.

Scaffolds	Teneur en chitosan (g)	Teneur en verre bioactif (g)
2CH-1BG	3	1,5
1CH-1BG	3	3
1CH-2BG	3	6

Tableau 1 : Teneur en chitosan et verre bioactif des scaffolds

Après ajout du verre bioactif dans la solution de chitosan, le mélange a été homogénéisé par agitation magnétique pendant 24 heures. Durant ces 24 heures, les éventuels agrégats formés dans la solution ont été dissous dans un bain à ultrason. Le mélange est considéré comme homogène lorsque plus aucun agrégat n'est présent dans le bécher.
Une fois l'homogénéisation terminée, la solution a été laissée au repos quelques minutes puis le surplus de solvant a été éliminé par aspiration à la pipette Pasteur. La solution visqueuse finale a ensuite été coulée dans des moules cylindriques de 1,5 cm de diamètre et 2 cm de hauteur. Les moules ont ensuite été insérés dans un congélateur à -20°C durant une nuit pour que le cœur de chaque scaffold soit parfaitement congelé. Une fois la congélation obtenue, les moules ont été placés dans un lyophilisateur sous une pression de 0,65 mbar et une température de -60°C.
Les scaffolds sont obtenus lorsqu'ils présentent un aspect sec et qu'ils peuvent se retirer aisément des moules. Ils ont ensuite été lavés 3 fois dans une solution de soude puis rincés 3 fois à l'eau distillée dans le but d'éliminer les résidus d'acide acétique. Ils ont été une nouvelle fois congelés puis lyophilisés selon les paramètres cités précédemment. A la fin, les scaffolds présentent un aspect spongieux (photo 2).

Pour synthétiser des scaffolds contenant un médicament, après avoir homogénéisé le verre bioactif et la solution de chitosan, celui-ci peut être ajouté. Dans notre étude, deux concentrations en médicament ont été étudiées : 1% (soit 10 $mg.mL^{-1}$) et 3% (soit 30 $mg.mL^{-1}$). L'homogénéisation a été faite par agitation magnétique, et par ultrason si besoin, puis suivent les étapes de congélation et de lyophilisation.

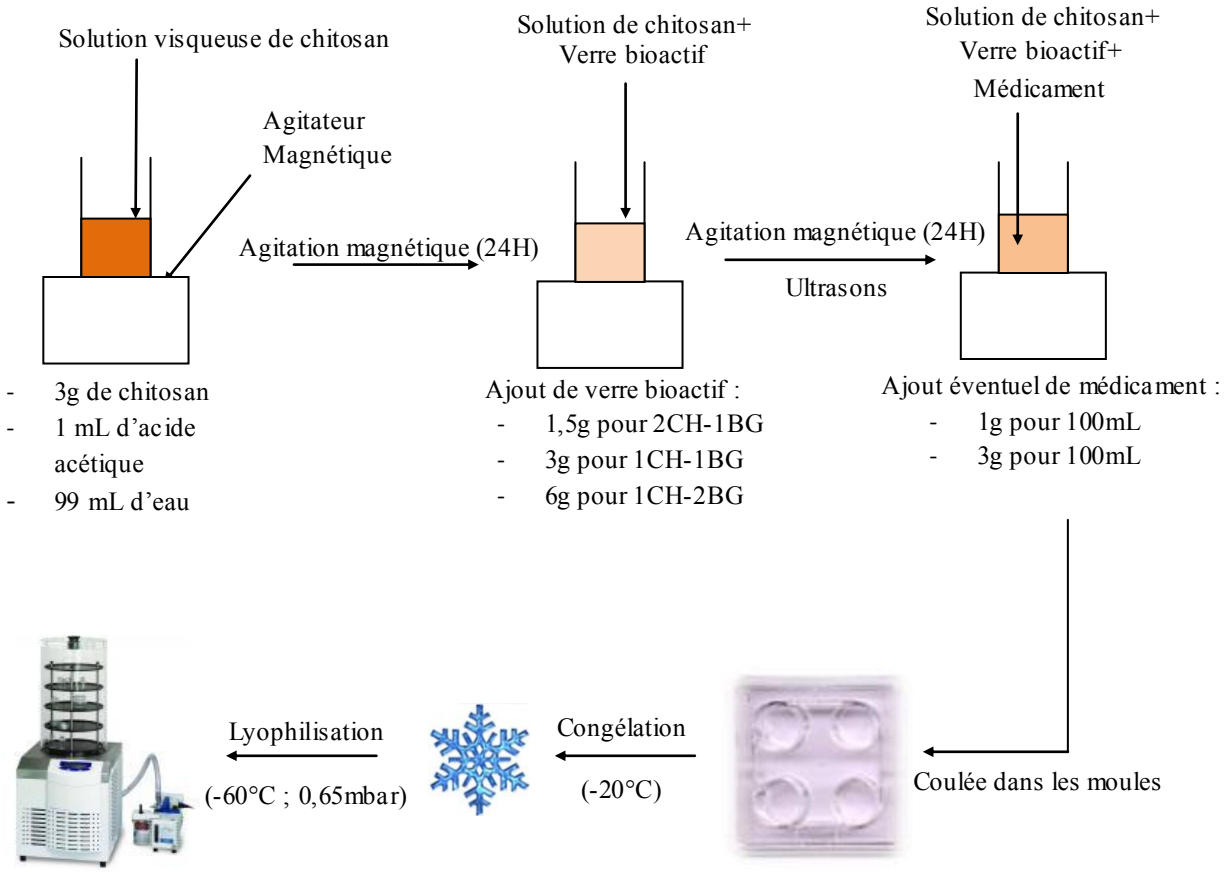


Schéma 2 : Etape de la synthèse des scaffolds chitosan-verre bioactif avec ou sans substance médicamenteuse.



Photo 2 : Scaffolds obtenus après lyophilisation.

II. Principes et protocoles des techniques de caractérisations physico-chimiques des biomatériaux élaborés

Cette partie regroupe les principales techniques expérimentales utilisées lors de ce travail de recherche. Une brève description des techniques et des préparations des échantillons est donnée.
La granulométrie laser est une méthode spécifique qui nous a renseignés sur la taille des grains après broyage des matériaux.
Nous présentons également les techniques de caractérisation structurales qui permettent de comprendre les structures de nos matériaux et d'appréhender la couche de phosphate de calcium formée à la surface des biomatériaux lors des tests *in vitro*. Les techniques de caractérisations optiques, infrarouge et ICP-OES, viennent approfondir ces études pour, respectivement, analyser les liaisons chimiques formées et les échanges ioniques entre les biomatériaux et le SBF. La microscopie électronique à balayage nous a permis d'étudier la morphologie des biomatériaux après les expérimentations *in vitro*.
La spectroscopie UV-Visible a été utilisée lors de l'étude du relargage d'un médicament dans un milieu liquide. Les concentrations du médicament relargué ont pu être déterminées par cette méthode.
L'analyse thermique différentielle est une méthode d'analyse thermique qui nous a permis de constituer une base de données des températures caractéristiques et de l'excès d'entropie de tous les verres synthétisés. Ces caractéristiques constituent les spécificités de chaque verre.
Différentes méthodes complémentaires d'analyse de la porosité sont également présentées.

A. Technique de caractérisation structurale

A.1. La diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X est une méthode non destructive et peut être appliquée pour déterminer les structures cristallines des métaux et alliages, des minéraux, des composés inorganiques, des fluides, des semi-conducteurs, des céramiques, des polymères et des matières organiques. Elle permet également d'obtenir des informations telles que la taille des cristallites, la composition chimique et l'orientation des cristaux [8-9].

Les diffractogrammes présents dans ce manuscrit ont été obtenus à l'aide du diffractomètre Bruker AXS D8 Advance en montage de type θ-2θ en géométrie Bragg-Brentano (annexe 1).
Les matériaux, sous forme de poudre de granulométrie inférieure à 40 µm, ont été analysés avant et après les analyses *in vitro*. Pour réaliser une analyse, la poudre a été placée sur des supports circulaires en plastique après avoir été trempée dans du cyclohexane. Ainsi, en séchant, le cyclohexane fixe la poudre sur le support qui forme une couche plane. Un léger

film de graisse a également pu être déposé sur le support pour « coller » la poudre notamment dans le cas des analyses de polymères.
Les données ont été acquises dans l'intervalle 5-80° (2θ) pendant 20 minutes.

A.2. La résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN est une technique locale d'analyse structurale qui met à profit la présence de spins nucléaires non nuls, portés par de nombreux noyaux [10].

Les spectres RMN-MAS ^{29}Si et ^{31}P ont été mesurés grâce au spectromètre haute résolution de RMN du solide Bruker Advance III SB 600MHz (14T).
Les expériences ont été réalisées en rotation à l'angle magique (MAS, fréquence MAS : 15kHz) et avec un champ statique B_0 égale à 14T (600MHz). Dans ces conditions, les fréquences de Larmor de ^{29}Si et ^{31}P sont respectivement de 59,6 et 121,4 MHz. Les déplacements chimiques ^{29}Si et ^{31}P sont respectivement normalisés par H_3PO_4 et le tetraméthylsilane (TMS) $Si(CH_3)_4$. Les spectres sont déconvolués pour identifier les composantes chimiques à l'aide du logiciel dmfit32 développé par le groupe de Dominique Massiot du CRMHT à Orléans [11]. Le principe de la RMN est présenté en annexe 2.
L'originalité de cette méthode, appliquée dans ce travail, consiste en particulier à évaluer l'évolution structurale d'un biomatériau poreux après implantation via les analyses des spectres RMN du phosphore (indicateur de la formation d'hydroxyapatite) et du silicium (indicateur de la dissolution du biomatériau).
Pour ce faire, les biomatériaux ont été finement broyés puis la poudre obtenue a été introduite dans des rotors en zircone de 2,5 mm de diamètre et 5 mm de hauteur. Les rotors ont été ensuite placés dans le spectromètre et mis en rotation.

B. Techniques de caractérisation optique

B.1. La spectroscopie infrarouge (FT-IR)

Elle repose sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau à analyser. Elle permet, du fait de la détection de vibrations caractéristiques, d'identifier les fonctions

chimiques présentes. On accède ainsi directement aux liaisons chimiques des matériaux analysés [12-13]. La théorie et le principe de cette méthode sont développés en annexe 3.

Les analyses ont été réalisées sur un spectromètre à transformée de Fourier Bruker Equinox 55. La transmission infrarouge a été déterminée pour le domaine de nombre d'ondes 4000-400 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1}.
Pour réaliser une mesure, les échantillons doivent se présenter sous forme de pastille. Pour se faire, nous avons utilisé du bromure de potassium (KBr), transparent dans l'infrarouge et qui sert ici de support pour l'analyse. Une « pointe de spatule » de matériau finement broyé, pour supprimer les effets de diffusion des gros cristaux, a alors été mélangée avec 200 mg de KBr. Une presse a ensuite permis de compacter la poudre pour former une pastille. Cette pastille a été introduite dans un support spécial pour l'analyse.
Les résultats ont pu être obtenus et traités grâce au logiciel OPUS.

B.2. La spectrométrie d'émission optique (ICP-OES)

Cette technique permet de déterminer les concentrations de la plupart des éléments dans des solutions contenant plusieurs éléments qu'ils soient à l'état de traces ou majeurs. Elle est quantitative et présente une sensibilité inférieure au ppm selon la matrice analysée [14-16]. Son principe est développé en annexe 4.

Avant d'effectuer une analyse, un étalonnage doit être effectué. L'ICP-OES est une méthode comparative. Pour chaque série d'analyse, six solutions étalons, de concentrations en éléments à doser connues entourant les valeurs théoriques à mesurer, ont été préparées. Cette étape permet de tracer des droites d'étalonnage pour chaque élément à analyser. Les longueurs d'onde caractéristiques de chaque élément sont ensuite choisies afin de minimiser les interférences.

Les échantillons, généralement présentés sous forme de solution, ont été mélangés à une solution d'acide nitrique à 2 % et ont été dosés. Les résultats en concentration sont alors obtenus après traitement informatique.

Si toutefois les échantillons sont sous une forme solide, ces derniers sont dissous dans de l'acide fluorhydrique en général (ou acide nitrique ou encore chlorhydrique) pour se présenter sous forme de solution.

B.3 La spectroscopie Ultraviolet-Visible (UV)

La spectroscopie UV est une technique mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (200 - 400 nm), du visible (400 - 750 nm) ou du proche infrarouge (750 -1 400 nm). Son principe est développé en annexe 5.

Pour réaliser ces analyses, nous avons utilisé un spectrophotomètre UV Jenway 6705. Ce dernier permet des mesures sur une échelle de longueurs d'onde comprises entre 190 et 1100 nm avec une résolution de 0,1 nm. L'absorbance mesurée est comprise entre -0,300 et 3.000 avec une erreur de ±0,001. Les concentrations mesurées nous sont données ensuite en mg/mL.

Avant de démarrer les mesures, une courbe d'étalonnage a été tracée en mesurant les concentrations connues des étalons préparés. Nos échantillons, sous forme de solution, ont ensuite été introduits dans des cuves en quartz puis soigneusement placés dans le spectrophotomètre. Nos analyses ont été réalisées à la longueur d'onde 277 nm car le médicament utilisé dans notre étude absorbe à cette longueur d'onde.

B.4. La granulométrie laser

Nous avons utilisé la technique de granulométrie laser afin de déterminer la distribution granulométrique de nos poudres après broyage dans un broyeur mécanique. La distribution granulométrique est déduite de l'interaction entre un ensemble de particules et le faisceau laser incident par l'analyse de la tache de diffraction du faisceau [17-19]. La gamme de tailles accessibles est comprise entre 0,05 et 900 µm, ce qui est bien plus précis que la technique de tamisage. Les mesures peuvent être réalisées en voie sèche ou en voie liquide [17]. Le principe est présenté en annexe 6.

L'échantillon à étudier, préalablement dispersé dans un milieu liquide (sous ultra-sons) ou mis en suspension dans un courant d'air, circule à travers une cellule de verre à faces parallèles

éclairée par un faisceau de lumière laser (633 et 466 nm). En voie liquide, le liquide porteur doit être transparent à la longueur d'onde utilisée, neutre chimiquement, et d'indice de réfraction différent de celui de la particule. Il peut contenir un dispersant (ex : hexamethaphosphate), mais ne doit pas dissoudre les particules. Pour les poudres nanométriques, il est nécessaire d'utiliser les ultrasons afin d'éliminer les agglomérats. Les particules ne sont pas analysées individuellement, mais dans leur ensemble. Il est nécessaire de faire appel à des algorithmes de traitement d'image pour convertir le signal en informations granulométriques, distribution en taille et nombre de particules correspondant à chaque taille. La grandeur mesurée est un "diamètre équivalent de diffraction". Le premier résultat fourni par le granulomètre est la répartition en volume dans la population (échantillon), c'est-à-dire la répartition des sphères équivalentes qui, pour le même volume occupé que par l'échantillon mesuré, conduit au même spectre. Les résultats sont fournis de façon numérique et graphique, donnant à la fois l'histogramme de répartition des classes, et la courbe du cumulé.

Enfin, lors de l'utilisation d'un granulomètre laser, il faut toujours garder en mémoire les hypothèses des théories mises en œuvre, notamment l'hypothèse des particules sphériques. Par ailleurs, de manière à valider les résultats obtenus, il est toujours préférable de les comparer à des observations en microscopie électronique.

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un granulomètre laser CILAS 1180 au Centre de Recherche en Archéologie, Archéosciences, Histoire (CreAAH) de l'Université de Rennes 1.

C. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est une technique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière. Le principe est expliqué en annexe 7. Les études présentes dans cette thèse ont été réalisées au Centre de Microscopie Electronique à Balayage et micro-Analyse (C.M.E.B.A.) de l'Université de Rennes 1. Les appareils utilisés, JEOL JSM 6400 et JEOL JSM 6301F, permettent l'accès à la taille des particules jusqu'à 10 nm. Equipé d'un spectromètre de dispersion d'énergie (E.D.S.) OXFORD Link INCA, l'appareil JEOL JSM 6400 permet, de plus, une microanalyse (qualitative, quantitative) des échantillons.

Le MEB impose peu de contraintes pour la préparation de l'échantillon ; cependant celui-ci doit être conducteur électrique, ou rendu conducteur par métallisation (or-palladium) de la

surface afin d'éviter les effets d'accumulation de charges. Tous les échantillons (poudres et céramiques) étudiés sont des isolants électriques et ont été métallisés par pulvérisation cathodique à l'or palladium à l'aide de l'appareil JEOL JFC 1100.

Dans le cas d'un échantillon biologique, la préparation de celui-ci doit suivre une procédure rigoureuse. Par nature, les échantillons biologiques contiennent de l'eau et sont plus ou moins mous. Ils nécessitent donc une préparation plus attentive qui vise à les déshydrater sans en détruire la paroi des cellules. Comme dit précédemment, tous les échantillons destinés à être observés dans un MEB, doivent être conducteurs. Pour cela, les échantillons biologiques doivent subir une préparation spécifique en plusieurs étapes.

La première étape est une étape de fixation qui vise à tuer les cellules tout en s'efforçant d'en conserver les structures pour que l'on puisse observer l'échantillon dans un état aussi proche que possible de l'état vivant.

La seconde étape consiste à extraire de l'échantillon les éléments destinés à l'observation. Cette étape est présente dans le cas où un organe, par exemple, aurait besoin d'être observé plus qu'un autre dans le cadre d'une dissection.

Une condition nécessaire à tous les échantillons mais plus particulièrement les échantillons biologiques est la propreté. La surface de l'échantillon biologique à étudier doit contenir le moins d'impuretés possible, pour permettre une netteté parfaite même avec des agrandissements importants. Pour cela, il existe trois principales techniques : le nettoyage manuel, mécanique ou chimique.

Les échantillons doivent être absolument secs et ne comporter aucune trace d'eau. En effet, la pression dans la chambre d'observation est très faible et les molécules d'eau contenues dans l'échantillon risqueraient de détruire les cellules en s'évaporant ou de polluer la chambre d'observation. Il existe également différentes méthodes pour y parvenir suivant la nature de l'échantillon biologique : séchage à l'air, par la méthode du point critique ou par déshydratation chimique. Dans notre cas, la méthode du point critique a été utilisée avec l'appareil à point critique Balzers CPD 010.

Une fois nettoyé, séché, rendu conducteur, l'échantillon est prêt à être monté sur le porte-objet et à être placé dans la chambre d'observation.

D. Analyse thermique différentielle

Un grand nombre de transformations (fusion, cristallisation, transition vitreuse…) ne s'accompagnent pas de variations de masse. Ces transitions, qui ne sont donc pas détectées par l'analyse thermogravimétrique, le sont par analyse thermique différentielle [20]. Le principe de l'ATD est développé en annexe 8.

Les thermogrammes présents dans ce manuscrit ont été enregistrés à l'aide d'un appareil Setaram Labsys 1600TG-DTA/DSC sous un balayage d'azote réglé à une pression de 1 bar. Les matériaux ont été étudiés suivant une montée en température de 5 °C.min^{-1} allant de la température ambiante jusqu'à 1400°C. La descente en température s'est effectuée à 20 °C.min^{-1} jusqu'à température ambiante. Pour chaque analyse, 40 mg de poudre de nos matériaux, de même granulométrie, ont été introduits dans une nacelle en platine à fond plat. Une autre nacelle vide nous a servi de référence.

Les résultats et les thermogrammes ont été traités grâce au logiciel SETSOFT2000.

E. Mesure de la porosité

E.1. La méthode d'Archimède

De nombreuses propriétés physiques et mécaniques sont fonction de la densité du produit obtenu après frittage. La détermination de ces caractéristiques (densité apparente, porosité ouverte et fermée) est donc d'une grande importance. La méthode d'Archimède permet de déterminer la masse volumique apparente ainsi que la répartition de porosité ouverte, fermée et totale. Cette méthode et les différentes formules mathématiques utilisées sont détaillées en annexe 9.

Avant essai, les éprouvettes doivent être séchées à 110°C ± 5°C jusqu'à poids constant. Avant chaque pesée, les éprouvettes sont placées dans un dessiccateur jusqu'à refroidissement à température ambiante. Les éprouvettes sèches refroidies sont placées dans un récipient étanche. Après fermeture du récipient, un vide de 20 Torr est créé. On s'assure que le dégazage des éprouvettes est bien terminé en isolant le récipient de la pompe à vide et en vérifiant au manomètre que la pression ne remonte pas.

Après quoi, on introduit progressivement le liquide d'imbibition de sorte que les éprouvettes soient après 3 minutes, recouvertes d'environ 20 mm de liquide. Ce liquide peut être de l'eau distillée ou des solvants organiques (kérosène, xylène…). Pour notre expérience, nous avons

choisi l'hexane car pour un grand nombre d'autres solvants, notre échantillon flottait. Le vide est maintenu pendant 30 minutes après introduction du liquide, mais au cours de cette période, la pression atmosphérique est rétablie 3 fois pendant 10 à 15 secondes pour accélérer la pénétration du liquide dans les pores. Après quoi, le vide est supprimé pour ouvrir le récipient. Les éprouvettes sont alors extraites du liquide et épongées rapidement à l'aide d'une éponge pour éliminer les gouttelettes et le film de liquide superficiel. Elles sont immédiatement pesées dans l'air. On s'assurera que l'évaporation du liquide d'imbibition ne provoque pas de pertes de masses appréciables pendant les opérations de pesée. Les mesures ont été réalisées en triplicata afin d'éliminer les éventuelles erreurs.

E.2. La porosimétrie à mercure

La mesure expérimentale consiste à mesurer la quantité de liquide disparue dans les pores en fonction de la pression appliquée. On obtient alors la courbe de répartition du volume poreux en taille de pores. Le principe de cette méthode est détaillé en annexe 10.
La préparation de l'échantillon comprend un dégazage effectué par passage à l'étuve dans des conditions standardisées. L'échantillon est ensuite soumis à un traitement « basse pression » jusqu'à environ 2 bar puis à une étape de haute pression (4000 bar pour les appareils les plus performants). La montée en pression se fait par paliers selon un tableau adapté à la porosité du solide examiné.
Pour nos mesures, le porosimètre Micromeritics Autopore IV 9500 a été utilisé.

E.3. La méthode BET

La méthode BET nous permet de mesurer la surface spécifique et de nous renseigner sur les tailles de pores d'un matériau présentant une certaine porosité à partir des phénomènes d'adsorption/désorption physique de gaz [21-22]. Les informations obtenues sont ensuite interprétées selon le modèle de Brunauer, Emmett et Teller (BET). Le principe de cette méthode est développé en annexe 11.

Les isothermes d'adsorption physique obtenues permettent, outre la détermination de la surface spécifique, d'apporter des informations sur la porosité du solide. On distingue ainsi les solides :

- microporeux (pores de diamètre inférieur à 2 nm),
- mésoporeux (pores de diamètre compris entre 2 et 50 nm),
- macroporeux (pores de diamètre supérieur à 50 nm).

Les types d'isothermes correspondants sont identifiés suivant la classification de l'IUPAC [23-24], présentées en annexe 11. Il est fréquent d'observer une hystérésis de la courbe de désorption par rapport à la courbe d'adsorption. Les différentes formes de la boucle d'hystérésis ont été schématisées et classées par l'IUPAC : cette classification est présentée en annexe 11.

Les mesures BET multipoints ont été réalisées avec un analyseur Micromeritics ASAP 2010. L'adsorbat est un mélange hélium-azote ayant une teneur de 30% en azote. Avant d'effectuer la moindre mesure, l'échantillon doit être dégazé à 250°C. Cette étape est extrêmement importante pour obtenir des analyses reproductibles. Elle est nécessaire de façon à ôter de l'échantillon toutes les espèces (eau, CO_2...) susceptibles de se fixer durant son stockage. Ce dégazage se fait classiquement par une mise sous vide de l'échantillon, à température contrôlée. Il faut ici faire attention à ce que la température choisie soit la moins dommageable possible pour l'échantillon.
Lors de la mesure, la cellule contenant l'échantillon est immergée dans l'azote liquide ; l'échantillon ainsi refroidi adsorbe l'azote dont la concentration diminue dans le gaz effluent. Après réchauffement de l'échantillon à température ambiante, l'azote adsorbé est libéré, augmentant ainsi sa concentration dans l'effluent.
Les processus d'adsorption et de désorption sont représentés par des pics sur l'enregistreur. Les surfaces de ces pics sont directement proportionnelles à la quantité d'azote adsorbé ou désorbé par l'échantillon. En vue de la détermination de la surface spécifique, le pic de désorption est généralement utilisé. En effet, celui-ci est beaucoup plus étroit et plus symétrique que celui correspondant au phénomène d'adsorption. Un circuit électronique calcule, suivant l'équation BET, le volume adsorbé de gaz puis la surface totale développée par l'échantillon. La surface spécifique est alors obtenue en divisant la surface totale par la masse de l'échantillon.

III. Evaluation du comportement des matériaux élaborés après contact avec un liquide physiologique synthétique (SBF)-Interaction solide/liquide

L'étude *in vitro* des biomatériaux synthétisés a pour but d'évaluer leur cinétique de bioactivité. Les méthodes physico-chimiques complémentaires utilisées permettent d'analyser les éventuelles modifications structurales et morphologiques de la surface ainsi que les échanges ioniques entre ces matériaux et le SBF.

A. Etude *in vitro* en l'absence de cellules

A.1. Présentation et choix du milieu

Il est clairement établi que la faculté d'un biomatériau à se lier aux tissus vivants est dépendante de sa capacité à relarguer des concentrations ioniques adéquates et de sa capacité à former une couche d'hydroxyapatite à sa surface lorsqu'il est immergé dans un liquide physiologique synthétique. Les essais *in vitro* sont donc une méthode appropriée pour évaluer la bioactivité des matériaux.
Pour réaliser ces tests, ils ont été étudiés immergés dans un liquide physiologique synthétique plus communément appelé Simulated Body Fluid (SBF) et dont la synthèse est décrite en annexe 12. Ce liquide a été élaboré en 1990 par Kokubo [26]. Le tableau 1 présente la composition ionique du SBF proche de celle du plasma sanguin.

Ions	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	HCO_3^-	HPO_4^{2-}	SO_4^{2-}
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Plasma	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

Tableau 1 : Concentrations ioniques du SBF et du plasma sanguin humain (mM)

Les différences notables entre le SBF et le plasma sanguin humain se situent au niveau de la concentration en ions Cl^- et HCO_3^-. En effet, le SBF a une concentration plus importante en Cl^- et une concentration moindre en HCO_3^-. La diminution de la concentration en HCO_3^- s'explique par le fait que le carbonate de calcium précipite dans le SBF. Le fait de réduire la concentration dans le SBF tend à supprimer cette précipitation. Pour les ions Cl^-, aucune différence n'a été observée même en ayant la même concentration que le plasma sanguin. Ces différences de concentration permettent d'apporter un équilibre des charges dans notre

solution. Cette composition ionique a donc été conservée par Kokubo. La synthèse du SBF est reproductible [26-27]. En annexe 14, la synthèse du SBF est détaillée.

A.2. Protocole expérimental

Nos matériaux ont été étudiés sous forme de poudre et sous forme de pastilles de 13 mm de diamètre et 3 mm de hauteur. Ils sont susceptibles d'être utilisé sous ces deux formes lors d'applications cliniques, il est donc préférable d'étudier ces deux types d'échantillons.

A.2.1. Biomatériaux sous forme de poudre

Une fois obtenu sous leur forme massive cylindrique, les verres ont été broyés au mortier puis à l'aide d'un broyeur mécanique pendant 30 minutes. La poudre a ensuite été tamisée pour obtenir une granulométrie inférieure à 40 µm. La taille des grains a été analysée par granulométrie laser. Les résultats sont présentés sur la figure 2 et illustrés par les micrographies (photo 3).

La taille des grains a été déterminée dans une fenêtre comprise entre 0,6 et 56 µm. Cette famille de grain est centrée sur une taille de 15 µm, valeur représentant la plus forte population après passage au broyeur mécanique.

De manière globale, nous pouvons annoncer que la taille des grains de nos matériaux varie en majorité entre 13 et 32 µm après broyage.

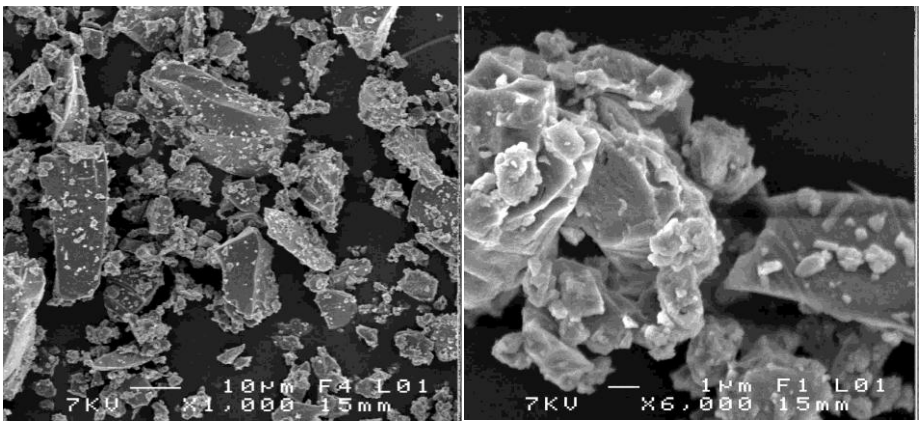


Photo 3 : Micrographies (x1000 et 6000) de la taille et de la forme des grains après broyage.

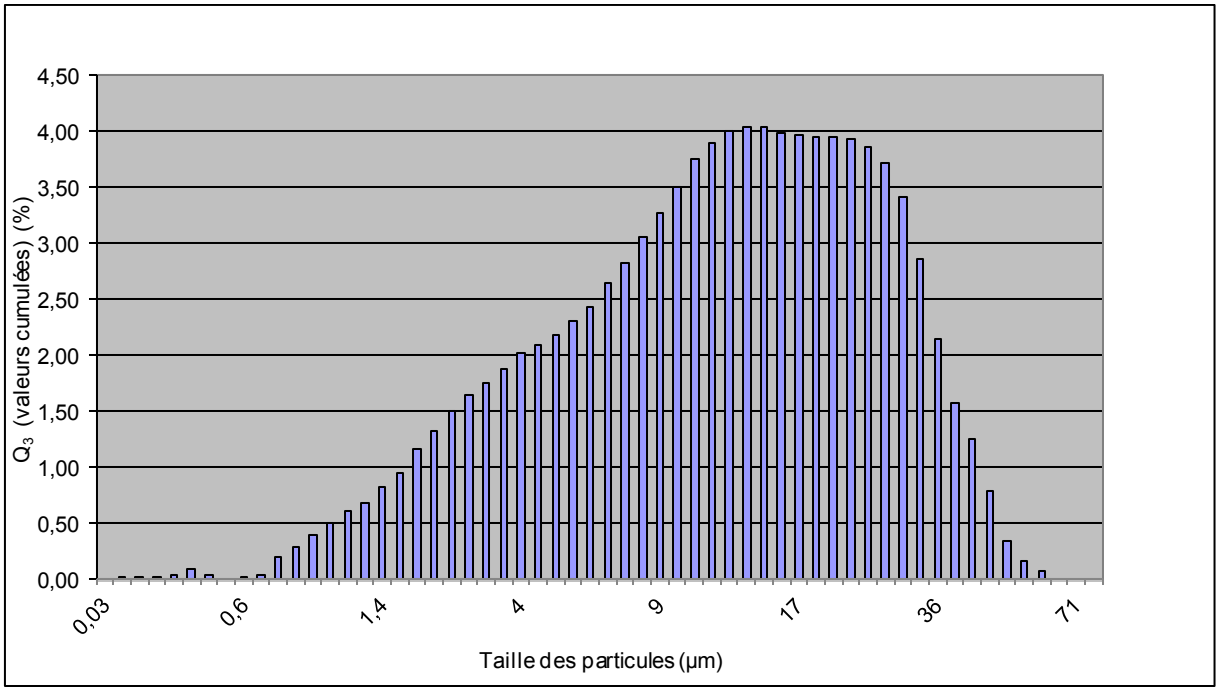


Figure 2 : Distribution de la taille des grains de la poudre des verres obtenus par fusion après broyage mécanique et tamisage à tamis 40 µm.

Pour chaque verre, 30 mg de poudre ont été immergés dans 60 mL de SBF dans des flacons en plastique hermétiques (schéma 3). Le choix de ce rapport 30mg/60mL a nécessité de nombreux essais avant de pourvoir obtenir de l'hydroxyapatite. Avec d'autres rapports (250mg/50mL), le carbonate de calcium sous sa forme calcite était obtenu. Sous cette forme cristalline, le carbonate de calcium présente une mauvaise résorption malgré une biocompatibilité comparable à celle du corail [28-30]. Les temps d'immersion dans le SBF ont été les suivants : 2, 4, 8 et 16 heures puis 1, 2, 7, 15 et 30 jours. Les flacons ont été placés dans des incubateurs à 37°C et sous agitation contrôlée (50 rpm) dans le but de simuler la circulation des liquides corporels.

Après immersion, une partie du SBF a été prélevé pour être dosé par spectrométrie optique (ICP-OES) pour analyser les échanges ioniques entre les verres et le SBF. Les poudres ont été rincées 3 fois à l'eau distillée dans le but d'éliminer toute trace de sel puis séchées à l'étuve à 70°C. Une fois séchées, les poudres ont été analysées par diffraction des rayons X et par spectroscopie infrarouge pour observer les éventuelles modifications structurales.

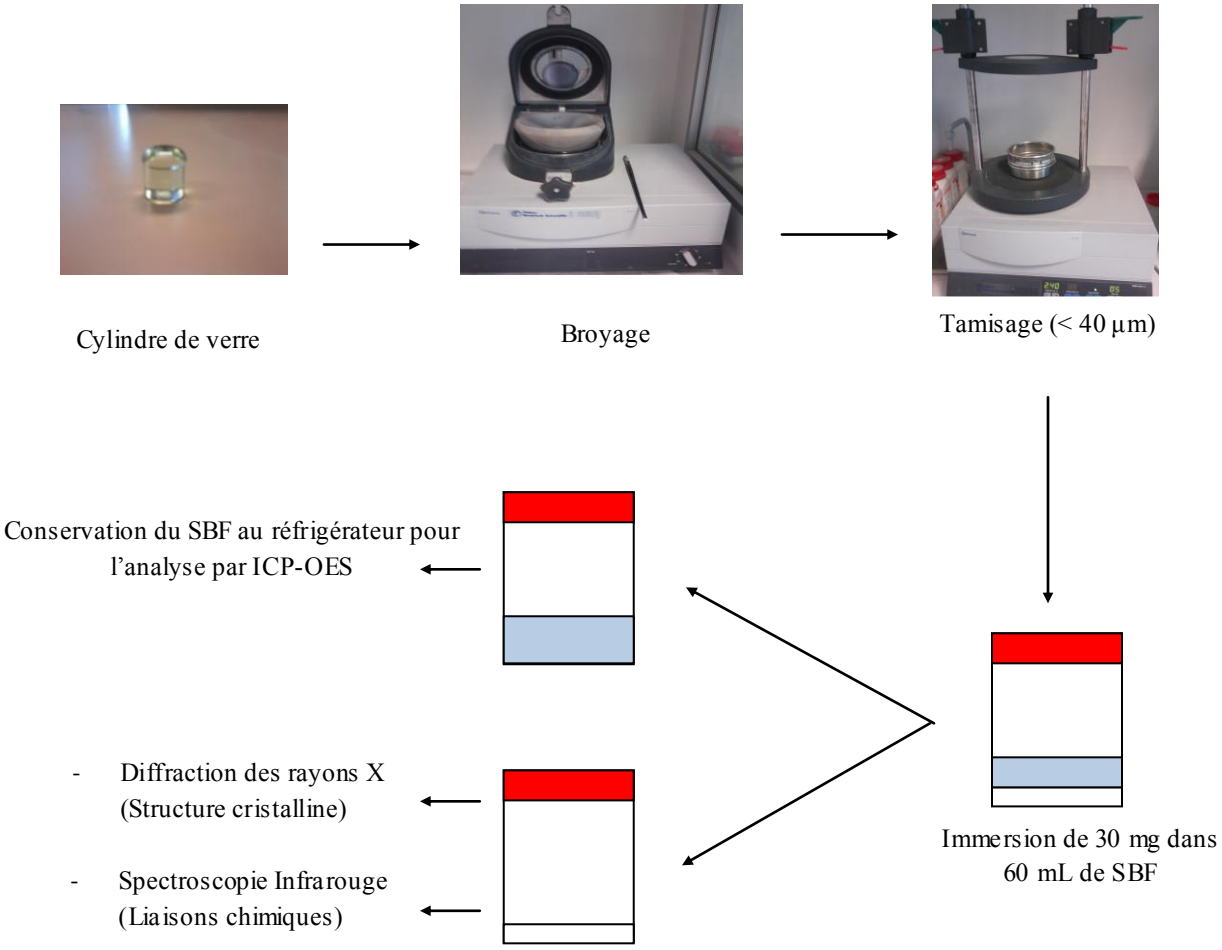


Schéma 3 : Etape du protocole d'immersion des poudres de verre bioactif

A.2.2 Biomatériaux sous forme massive

Les pastilles de verre de 13 mm de diamètre et de 3 mm de hauteur ont été obtenues par découpe des cylindres de verre obtenus après la synthèse des verres. Une tronçonneuse de précision a été utilisée à cet effet.

Pour les immersions, les pastilles ont été incluses dans de la résine organique. Seule une face est restée libre pour être en contact avec le SBF. Le schéma 3 présente la méthode employée. Les pastilles ont été introduites dans des moules en téflon préalablement enduits d'un agent démoulant (graisse) puis la résine et un durcissant ont été introduits. Après 24 heures de séchage à l'étuve, des blocs de résine cylindriques ont été obtenus. Les blocs ont alors été polis au papier de carbure de silicium en milieu humide afin d'obtenir une seule des faces de la pastille. Les blocs ont ensuite été rincés à l'éthanol, plusieurs fois à l'eau distillée pour

supprimer les éventuelles pollutions puis séchés. Ainsi, pour chaque essai et pour chaque délai, une seule et même surface de verre a été en contact avec le SBF.

Pour les tests *in vitro*, les blocs ont été introduits dans de petits flacons en plastique hermétiques puis immergés sous 8 mL de SBF, à 37°C et sous agitation contrôlée (50 rpm). Les délais d'immersion retenus pour l'étude des pastilles ont été : 1, 2, 7, 15 et 30 jours.
Après immersion, les pastilles ont été retirées du SBF, rincées 3 fois à l'eau distillée puis séchées à l'étuve à 70°C. Les blocs contenant la pastille de verre ont été analysés par microscopie électronique à balayage pour observer les modifications de surface et l'éventuelle formation d'une hydroxyapatite.

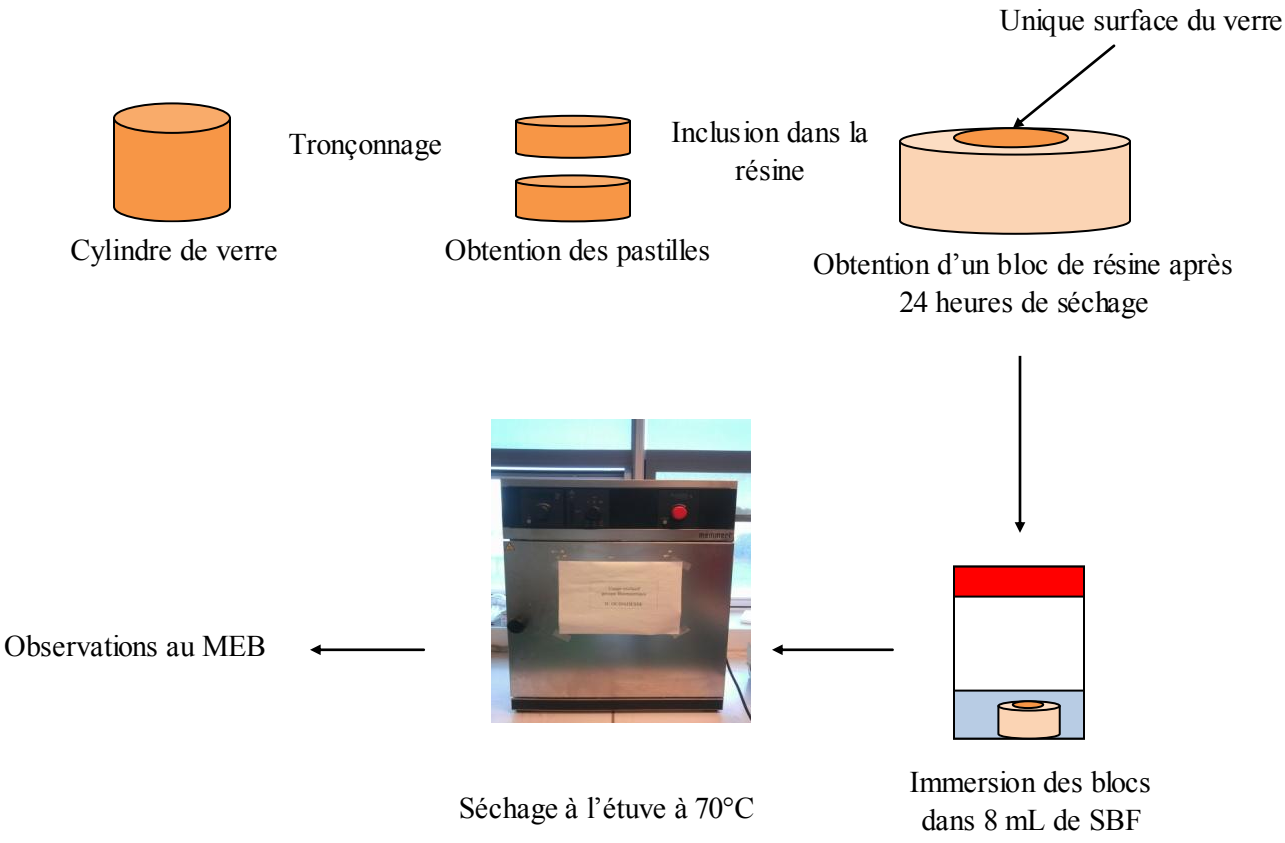


Schéma 4 : Inclusion d'une pastille de verre dans la résine organique et immersion dans le SBF.

Les mêmes techniques d'analyse que les biomatériaux sous forme de poudre ont été utilisées pour ceux sous forme massive pour déterminer l'évolution de leurs propriétés physico-chimiques.

B. Evaluation de la cytotoxicité des biomatériaux

L'étape logique et nécessaire après les études *in vitro* sans cellules est l'étude biologique. Ces tests ont pour but d'étudier la cytotoxicité de nos biomatériaux.
Pour réaliser ces études, des tests colorimétriques au MTT ont été entrepris pour l'ensemble des biomatériaux synthétisés.
Ces études ont été menées par les biologistes de l'UFR Odontologie du groupe Biomatériaux de l'UMR CNRS 6226.

B.1. Présentation des tests de viabilité cellulaire

B.1.1 Aspects des études de biocompatibilité

Les études de biocompatibilité *in vitro* revêtent plusieurs aspects :

- Adhérence qui signe l'interaction entre la cellule et le substrat (biomatériau). C'est généralement l'étape cruciale de l'intégration tissulaire.
- La viabilité cellulaire qui atteste d'un effet non néfaste du matériau soit par contact direct soit par contact indirect (produits de dissolution).
- La prolifération : la multiplication des cellules impliquées dans la réparation tissulaire, comme la réparation du tissu osseux, est indispensable pour obtenir une bonne cicatrisation après l'implantation du biomatériau.
- La différenciation : L'idéal est que le substitut osseux adresse des signaux de différenciation aux cellules immatures pour qu'elles acquièrent leurs fonctions, par exemple : synthétiser du nouvel os (néo-os)
- L'effet mutagène : le matériau ne doit pas perturber le programme génétique des cellules sous peine d'avoir un effet cancérogène par exemple.

Schématiquement, les verres bioactifs présentent deux caractéristiques biologiques : un effet direct : interface d'hydroxyapatite carbonatée responsable de leur bioactivité qui autorise l'interaction avec les cellules et avec les tissus péri-implantaires. Et un effet indirect c'est à dire à distance avec les produits de dissolution relargués.
Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur les tests colorimétriques de cytotoxicité qui mettent en évidence des différences en termes de nombre de cellules entre le contrôle et les biomatériaux étudiés. Dans cette étude, nous avons porté notre attention sur les milieux

conditionnés c'est-à-dire aux effets biologiques des produits de dissolution des biomatériaux (méthode indirecte).

B.1.2 Stérilisation des matériaux et obtention de milieux conditionnés

La stérilisation des poudres a été effectuée par autoclavage (20 min à 121°C). Ces poudres ont ensuite été mises au contact de milieu de culture DMEM pendant 24h dans l'incubateur de cellules. Le pourcentage est de 1% (w/v) conformément à la littérature. Après centrifugation (2000 rpm, 10 min) le surnageant a été filtré sur pastilles de 0,22 µm afin d'éliminer le plus de particules. Ce surnageant a ensuite été complété par du Sérum de Veau Fétal et le pH a été équilibré par addition d'HEPES. Ces « milieux conditionnés » ont été stabilisés au moins une heure, dans l'incubateur de culture cellulaire, avant la mise en contact avec les lignées cellulaires.

B.1.3 Les lignées cellulaires

Notre choix s'est porté sur deux lignées humaines immortelles (dites établies). Ce type de cellules qui possèdent une croissance constante est particulièrement adapté aux expériences de détermination de la viabilité. Nous avons opté pour des cellules fortement impliqués dans la réparation osseuse (vascularisation et ostéogénèse) : des cellules endothéliales humaines (EAHY 926) et des ostéoblastes humains ($SaOS_2$).

Les cellules ont été cultivées à 37°C sous atmosphère humide (hygrométrie >90%) en présence de 5% de CO_2. Ce taux a permis au tampon carbonate/bicarbonate présent dans le milieu de culture de stabiliser le pH à 7,4 (pH physiologique).

Le milieu de culture utilisé pour chacun de ces types cellulaires est constitué de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM de chez Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) auquel nous avons ajouté 10% de Fetal Bovine Serum FBS (FBS de chez Gibco Laboratories), P/S (Pénicilline 100UI/ml et Streptomycine 100µg/ml), glutamine (2mM) et HEPES (Solution Tampon ; 20mM).

B.1.4 Entretien des cellules

Les cellules ont été entretenues en croissance exponentielle par deux repiquages hebdomadaires.

Les cellules ont été lavées deux à trois fois avec du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}, puis décollées avec de la trypsine-EDTA. Le décollement cellulaire a été suivi sous microscope, l'addition d'un volume égal de DMEM complet inhibe l'action de la trypsine. La suspension cellulaire a été centrifugée (1000 rpm pendant 3 min), le culot a été repris dans du DMEM complet et une numération électronique (Auto T4) a été effectuée.

B.1.5 Test colorimétrique de viabilité au MTT

Ce test permet une quantification rapide et sensible du nombre de cellules, reflet de la viabilité et la prolifération cellulaires. Ce test est basé sur l'activité d'une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. En présence du substrat MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5 diphényltétrazolium bromide), les sels de tétrazolium du substrat sont transformés en cristaux insolubles de Formazan (de couleur bleu-violet) grâce à l'activité de la succinate déshydrogénase. La quantité de sel Formazan produite par les cellules à partir du MTT est mesurée par spectrophotométrie à 550 nm après dissolution des cristaux par du diméthylsulfoxide (DMSO) ou d'autres solvants comme l'isopropanol ou le dodécylsulfate de sodium (SDS). L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes.

B.1.6 Réactifs

Pour la préparation d'une solution mère de MTT à 5 mg/mL, 500 mg de MTT ont été ajoutés dans 100 mL de solution tampon (PBS). Le tout a été chauffé entre 30 et 40°C pour dissoudre la totalité des cristaux. La solution a ensuite été filtrée sur filtre 0,22µm pour stériliser le milieu. Cette solution-mère a été conservée au congélateur (-20°C). Une fois décongelée, celle-ci est stable à l'abri de la lumière pendant 8 jours à 4°C.

Du DMSO commercial a été utilisé pour dissoudre les cristaux de Formazan.

B.2 Protocole expérimental

Les cellules ont été ensemencées la veille du test colorimétrique afin de permettre leur adhérence. Le surnageant a ensuite été délicatement enlevé pour être remplacé par du milieu conditionné. Les lignées sont restées au contact de ces milieux durant 24 à 72h au terme desquelles a été réalisé le test de viabilité.

La solution mère de MTT a été ajoutée au surnageant de culture de façon à obtenir une concentration finale de 1 mg/mL (dilution au 1/5 ; soit 250 µL par puit pour une plaque de 24 puits).

Le tout a été laissé à incuber 2 à 4 heures dans une étuve de culture. A l'issue de ce temps d'incubation, le surnageant a été retiré puis de 300 à 400 µL de DMSO ont été ajoutés par puit pour une plaque de 24 puits. Ce DMSO a pour but de faire éclater les cellules pour qu'elles libèrent leurs cristaux de Formazan qui vont ensuite se dissoudre. L'ensemble a été mis sous agitation entre 5 et 15 minutes sur un plateau pour obtenir une solution homogène. La densité optique (DO) a alors pu être lue à la longueur d'onde 550 nm.

Lors des tests, il faut tenir compte du témoin qui est le milieu de culture sans cellules. Ceci permet d'évaluer le bruit de fond c'est-à-dire la coloration non spécifique qui n'est pas due à la présence des cellules. Généralement le bruit de fond est faible voire négligeable.

Le polystyrène de culture ainsi que le verre non dopé 46S6 ont servi de référence pour chaque étude des différents verres synthétisés. Des essais préliminaires ont permis de déterminer la concentration cellulaire de l'ensemencement de 4.10^4 cellules/mL pour ces études. En effet il faut éviter que les cellules soient confluentes le jour du test de viabilité ce qui pourrait constituer un artéfact.

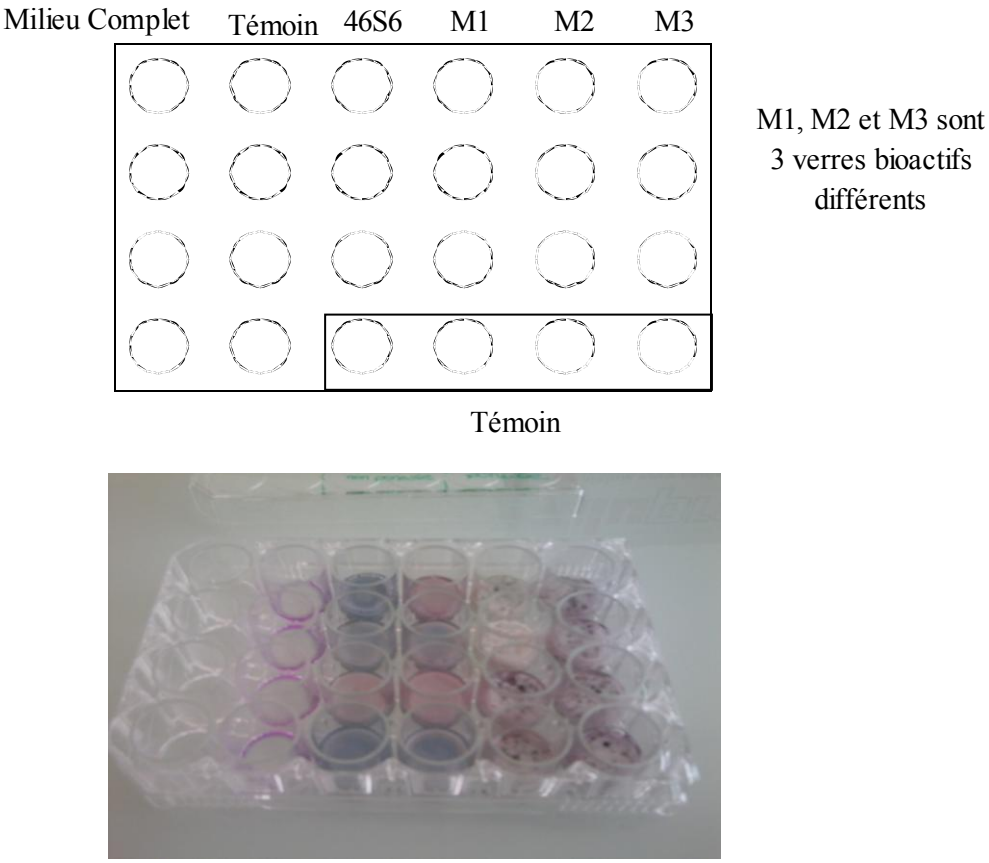


Schéma 3 : Plaque de culture pour l'étude de cytotoxicité et photo illustrant l'étude.

Deux temps ont été retenus : un temps court 24h (qui évalue essentiellement les capacités d'adhérence au substrat) et un temps moyen de 72h (qui met essentiellement en évidence la multiplication des cellules).

Les cellules cultivés dans du milieu complet sans biomatériaux constituent le contrôle de viabilité (100%). La viabilité cellulaire, donnée en pourcentage, est calculée avec la formule :

$$\%viabilité = \frac{DO_{traitement}}{DO_{contrôle}} \times 100$$

Les expériences ont été répétées trois fois de façon indépendante.

C. Protocole des expérimentations *in vivo*

Ces expérimentations ont été entreprises dans le cadre d'une collaboration internationale. Elles ont été réalisées suivant les normes d'éthique exigées à la faculté des sciences de Sfax,

laboratoire du Professeur Abdelfattah El Feki et à la faculté de médecine de Sfax, service d'orthopédie du Professeur Hassid Keskes.

C.1. Préparation des biomatériaux

Après synthèse, à la sortie du four, les biomatériaux poreux présentaient une forme cylindrique de 3 cm de diamètre et d'épaisseur comprise entre 1 et 3 cm. Des échantillons cylindriques de 0,5 cm de diamètre et de 1 cm de hauteur ont été prélevés dans chaque échantillon synthétisé.

Le prélèvement a été fait par le verrier de l'UMR CNRS 6226 à l'aide d'une perceuse à colonne à laquelle un foret diamanté a été adapté pour obtenir les échantillons de dimensions souhaitées.

Au final, plus d'une centaine d'échantillons ont été obtenus. Leur aspect et leur morphologie sont présentés sur la photographie ci-après.

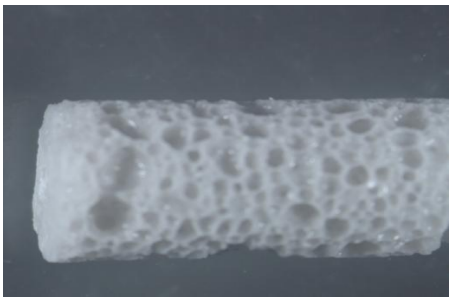


Photo 1 : Photographie représentant les échantillons poreux avant implantation.

C.2. Implantation des biomatériaux

Les implantations ont été réalisées au niveau de la diaphyse fémorale de lapins Néo-Zélandais mâles, âgés de 16 à 18 semaines et pesant entre 3 et 4 kilogrammes. Le but a été de combler, avec le biomatériau poreux, une perte osseuse créée préalablement (schéma 5).

Les délais d'implantation étudiés ont été les suivants : 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 9 mois. Pour chaque délai, 5 lapins ont été nécessaires. Les témoins de ces expérimentations ont été représentés par 5 lapins ayant subi une perte osseuse non comblée et par 5 lapins n'ayant subi aucune perte osseuse.

Pour chaque implantation, une épilation du fémur droit du lapin a été réalisée. Après désinfection de la zone d'implantation par de la bétadine, le lapin a été anesthésié par injection.

Un mini fixateur externe a alors été mis en place. Il s'agit d'un procédé chirurgical d'ostéosynthèse (fixation de l'os) utilisant des fiches métalliques implantées dans l'os à travers la peau, reliées par une barre métallique solidarisée aux fiches par des étaux, serrés lors de la mise en place en salle d'opération.

Une perte osseuse diaphysaire de 0,2 cm^3 correspondant au volume d'un échantillon poreux a été créée puis comblée par le biomatériau poreux préalablement stérilisé par un traitement aux rayons γ.

Le lapin a ensuite été recousu puis pansé et réintroduit dans son environnement.

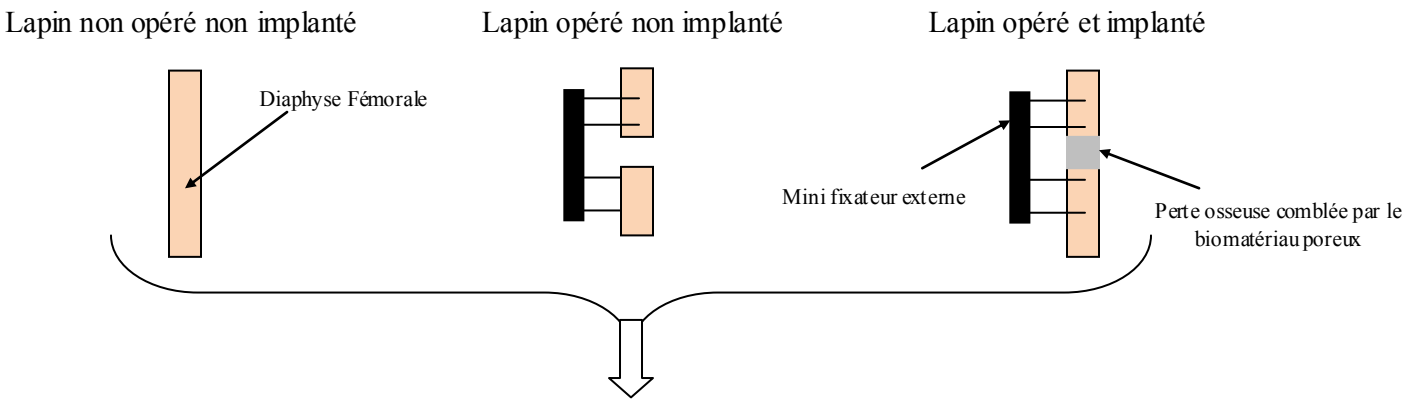


Schéma 5 : Protocole des expérimentations *in vivo*.

A l'issu des délais d'implantation, les lapins ont été sacrifiés par injection d'un produit euthanasiant. Les fémurs ont été récupérés puis conservés dans un liquide constitué de 90% de formol et 10% d'eau distillée en vue des différentes études physico-chimiques et biologiques.

Références Chapitre 2

[1] J. Dejou. *Les céramiques*. Société Francophone de Biomatériaux Dentaires (2010).

[2] M. Tasserie, D. Bideau, J. Rocherullé, P. Verdier, Y. Laurent. *New expanded material based on industrial glass. I. Effect of the quality of powders and their mixing on properties of the material*. Verre 6 (1992) 9-15

[3] M. Tasserie, D. Bideau, P. Verdier, Y. Laurent. *New expanded material based on industrial glass. II. Role and effect of the amount of an expensive additive on the characteristics of the material*. Verre 6 (1992) 103-107.

[4] H.R. Fernandes, D.U. Tulyaganov, J.M.F. Ferreira. *Preparation and characterization of foams from sheet glass and fly ash using carbonates as foaming agents.* Ceramics International 35 (2009) 229–235.

[5] R. Lebullenger, S. Chenu, J. Rocherullé, O. Merdrignac-Conanec, F. Cheviré, F. Tessier, A. Bouzaza, S. Brosillon. *Glass foams for environmental applications*. J Non Cryst Solid 356 (2010) 2562-2568.

[6] http://www.crma-limousin.fr/portals/66/basedoc/Environnement/VERRE_CELLULAIRE.pdf

[7] René Gaboriaud. *Thermodynamique: éléments fondamentaux de l'énergétique et de la cinétique chimique*. Ellipses Editeur; 1998.

[8] H.P. Klug, L.E. Alexander. *X-ray diffraction procedures.* 2nd edition, Wiley and Sons, New-York 1974.

[9] R. Jenkins, R.L. Snyder. *Introduction to X-ray Powder Diffractometry*. Wiley and Sons, New-York 1996.

[10] M. Mehring. *Principles of High Resolution NMR in Solids*. Springer Verlag. Berlin 1983.

[11] D. Massiot, F. Fayon, M. Capron, I. King, S. Le Calvé, B. Alonso, J.O. Durand, B. Bujoli, Z. Gan and V. Hoaston. *Modeling one and two-dimensional solid-state NMR spectra.* Magnetic Resonance in Chemistry 40 (2002) 70-76.

[12] R.J. Bell. *Introductory Fourier transform spectroscpy.* Academic, New-York 1972.

[13] P.R. Griffith, J.A. De Haseth. *Chemical infrared Fourier transform spectroscopy.* Wiley, New York 1986.

[14] C. Trassy, J.M. Mermet. *Les applications analytiques des plasmas HF*. Lavoisier, Paris, 1984

[15] A. Montaser, D.W. Golightly. *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry.* VCH Publishers, Inc., New York, 1992

[16] R. Barnes. *Emission spectroscopy.* Halsted, New York, 1976

[17] C. Chlique. *Préparation et caractérisation de poudres et céramiques (oxy)sulfures pour applications en optique passive et active.* Thèse Université de Rennes 1, n° d'ordre : 4412.

[18] J. Chatelet. *Systèmes optroniques semi-actifs - Application du laser à la granulométrie.* Référence E4410, (1996)

[19] S. Gutierrez. *Granulométrie laser* Mastersizer 2000 Malvern, présentation PowerPoint http//www.ccm.usherbrooke.ca/fr/services/ccm/LCG/pdf/granulom%C3%A9trie%20laser.pdf

[20] R.F. Speyer. *Thermal analysis of materials.* Lavoisier, Paris, 1993

[21] F. Rouquerol, J. Rouquerol and K. Sing. *Adsorption by powders and porous solids principles, methodology and applications.* Chapitre 1. Academic Press 1999; 1-25.

[22] S. Brunauer, P. Emmett and E. Teller. *Adsorption of gases in multimolecualr layers.* Journal of the American Chemical Society 60 (1938) 309-319.

[23] G.H. Findenegg. *Fundamentals of Adsorption.* Engineering Foundation. New York (1984) 207-218.

[24] IUPAC Recommendations. Pure and Applied Chemistry 57 (1985) 603-619.

[25] IUPAC Recommendations. Pure and Applied Chemistry 66 (1994) 1739-1758.

[26] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro. *Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W.* Journal of Biomedical Materials Research 24 (1990) 721-34.

[27] T. Kokubo, H. Takadama. *How useful is SBF in predicting in vivo bioactivity.* Biomaterials, 27 (2006) 2907-915.

[28] G. Guillemin. *Etude comparative de l'évolution de différents carbonates de calcium après implantation en tissu osseux*. Rapport scientifique CNRS, 1987, AIP N6931/N110.

[29] G. Guillemin, J. Fournie, JL Patat, M. Chetail. *Contribution à l'étude du devenir d'un fragment de corail madréporaire implanté dans la diaphyse des os longs chez le chien.* CR Acad Sci, Paris (1981), 293, 371-376.

[30] G. Guillemin, A. Meunier, P. Christel, JC. Pouliquen, L. Sedel. *Résorption corallienne et remplacement osseux*. Biomat 87, Bordeaux, décembre 1987.

Chapitre 3

Etudes physico-chimiques et biologiques de verres bioactifs dopés au zinc, titane, cuivre et argent.

Chapitre 3 : Etudes physico-chimiques et biologiques de verres bioactifs dopés au zinc, titane, cuivre et argent.

I. Caractérisations physico-chimiques des verres bioactifs pur et dopés

Le verre dit « de référence » que nous avons synthétisé par fusion est le 46S6. Il a été étudié pur puis dopé avec différents éléments chimiques (Zn, Ti, Cu, Ag) présentant des caractéristiques biologiques et physico-chimiques intéressantes. Ces éléments, présentés dans ce chapitre, ont été introduits séparément ou en association dans la matrice vitreuse.

Ainsi, les verres dopés au zinc et au titane ont été synthétisés. Le zinc et le titane interviennent dans l'élaboration de la vitrocéramique. Ces deux éléments présentent des propriétés physiologiques intéressantes en plus de leur rôle à induire la porosité du biomatériau.

Les verres dopés au cuivre seul puis en association avec le zinc, puis des verres dopés à l'argent ont été également synthétisés dans le but d'améliorer les propriétés biologiques du verre 46S6.

A. Compositions chimiques des verres étudiés et intérêts des éléments métalliques introduits

A.1. Compositions chimiques des verres élaborés.

Les compositions chimiques des différents verres synthétisés sont résumées dans le tableau 1. Les éléments chimiques dans la matrice vitreuse ont été introduits suivant des teneurs proches de celles présentes dans le tissu osseux humain. Ils ont aussi été introduits à teneurs plus importante pour évaluer leurs effets sur les caractéristiques physico-chimiques et biologiques des verres.

Verre de référence: le 46S6

	SiO_2	CaO	Na_2O	P_2O_5
46S6	46	24	24	6

Verres dopés au zinc

	SiO_2	CaO	Na_2O	P_2O_5	ZnO	% Zn
46S6-0,1Zn	46	23,94	23,94	6	0,12	0,1
46S6-1Zn	46	23,38	23,38	6	1,24	1
46S6-5Zn	46	20,89	20,89	6	6,22	5
46S6-8Zn	46	19	19	6	10	8
46S6-10Zn	46	17,78	17,78	6	12,44	10

Verres dopés au titane

	SiO_2	CaO	Na_2O	P_2O_5	TiO_2	% Ti
46S6-0,1Ti	46	23,92	23,92	6	0,16	0,1
46S6-1Ti	46	23,17	23,17	6	1,66	1
46S6-5Ti	46	19,83	19,83	6	8,34	5
46S6-10Ti	46	15,66	15,66	6	16,68	10

Verre dopé au cuivre

	SiO_2	CaO	Na_2O	P_2O_5	CuO	% Cu
46S6-0,1Cu	46	23,94	23,94	6	0,13	0,1

Verre dopé à l'argent

	SiO_2	CaO	Na_2O	P_2O_5	Ag_2O	% Ag
46S6-0,2Ag	46	23,90	23,90	6	0,42	0,2

Verre dopé au zinc et au cuivre

	SiO_2	CaO	Na_2O	P_2O_5	CuO	% Cu
46S6-0,1Cu+0,1Zn	46	23,88	23,88	6	0,13	0,1

Tableau 1 : Compositions chimiques en % massique des verres bioactifs synthétisés.

Pour les verres dopés au cuivre, à l'argent et en cuivre/zinc, des teneurs plus importantes ont été introduites (jusqu'à 10% en masse) pour évaluer leurs effets sur les propriétés thermiques. La composition chimique de tous ces verres a été vérifiée par ICP-OES.

A.2. Intérêts biologiques des éléments métalliques introduits

Suite à la découverte du 45S5 par Hench, de nombreuses études ont été réalisées à travers le monde sur des verres bioactifs, de compositions chimiques variées, obtenus par fusion ou par voie sol-gel. Ces différents verres ont été dopés avec différents éléments chimiques présentant des intérêts physiologiques intéressants et leurs applications médicales ont été étudiées.

La majeure partie du corps humain ainsi que les différentes cellules sont composés essentiellement d'eau. Par conséquent, il n'est pas surprenant que l'élément le plus présent en masse dans le corps humain soit l'oxygène. Le carbone, l'élément de base des cellules organiques vient en deuxième position. 98.5% de la masse du corps humain sont représentés par seulement six éléments: oxygène, carbone, hydrogène, azote, calcium, phosphore. Le corps humain représente à lui seul une grande partie du tableau périodique. On distingue les éléments majeurs, les éléments mineurs, ceux à l'état de trace et les éléments présents à l'état de trace infime (tableau 2):

Eléments à l'état majeur		**Eléments à l'état mineur**		**Eléments à l'état de trace**		**Eléments à l'état d'ultra trace**	
Oxygène	Calcium	Potassium	Magnésium	Cuivre	Fluor	Silicium	
Carbone	Phosphore	Fer	Iode	Zinc	Manganèse	Strontium	
Hydrogène		Sodium				Aluminium	
Azote		Chlore					

Tableau 2: Eléments chimiques à l'état majeur, mineur, de trace et d'ultra trace, présents dans l'os humain [1].

Dans ce travail de recherche, nos choix se sont portés sur le zinc, le titane, le cuivre et l'argent.

A.2.1. Le zinc

Le zinc a une fonction physiologique bien définie dans le corps humain. Les grandes fonctions de l'organisme ne sont actives qu'en présence d'un stock de zinc suffisant.
Il est un élément chimique présentant un fort intérêt physiologique dans le domaine médical. Le zinc est un élément trace essentiel qui intervient dans la croissance osseuse [2-3]. En effet, il favorise la prolifération des ostéoblastes [4]. Il améliore la croissance osseuse autour de l'implant utilisé pour la restauration osseuse, inhibe la résorption osseuse et accélère la guérison du patient [5]. De plus, c'est un élément vital pour les cellules, à la fois pour leur développement mais aussi pour leur différentiation [6]. Le zinc intervient dans l'activité de plus de 200 enzymes et joue un rôle fondamental dans chacun des compartiments biologiques liés à la perturbation de la vie. Il stimule la synthèse de protéines et est essentiel dans la réplication de l'ADN [7-11]. Une déficience en zinc peut causer un ralentissement de la croissance osseuse et altérer la calcification du tissu osseux [8-11]. Il se retrouve essentiellement dans les muscles, les os, la peau, le foie, le cerveau, la prostate, les cheveux et les yeux. C'est le plus abondant des métaux à l'état de trace dans le tissu osseux, il est présent à des concentrations supérieures à 117 µg/g [12]. En dehors des très nombreuses enzymes utilisant le zinc comme activateur, il existe au moins deux douzaines de métallo enzymes le requérant comme l'anhydrase carbonique (enzyme jouant un rôle dans le remodelage osseux).
Le zinc est absorbé au niveau de la bordure en brosse de l'intestin grêle, son absorption dépend des protéines auxquelles il est lié. Le foie joue également un rôle très important dans l'utilisation et le stockage du zinc.
Il est fortement utilisé en chirurgie dentaire [9-11]. De plus, l'introduction de zinc améliore la durabilité chimique des verres bioactifs en milieux aqueux et leurs propriétés mécaniques. [10-11]. Il a été prouvé qu'une forte teneur en zinc dans un verre bioactif ralentit la formation d'hydroxyapatite lorsqu'il est immergé dans un liquide physiologique synthétique [13].

A.2.2. Le titane

Le titane est principalement utilisé dans les matériaux bioinertes comme les prothèses de hanche en alliage de titane, les agrafes et les plaques pour la réparation de fractures. Le titane poreux est, entre autre, utilisé depuis 1993.

Le titane sous sa forme TiO_2 introduit dans des verres de phosphate a montré son efficacité dans l'amélioration de la durabilité chimique des verres et de leurs propriétés mécaniques [13-16]. Cette durabilité chimique améliorée dans la matrice des verres de phosphate a lieu par la formation de liaisons Ti-O-P [17-18]. Le titane permettrait également d'augmenter la formation osseuse [19]. L'addition de titane dans un verre bioactif peut provoquer une amélioration de sa biocompatibilité. Celle-ci se traduit par une meilleure adhésion, une meilleure viabilité et une meilleure prolifération cellulaire [20].
Les animaux de laboratoire (rats) exposés au dioxyde de titane par l'intermédiaire de l'inhalation ont développé des petits secteurs foncés localisés dans les poumons. L'exposition excessive chez l'homme peut apporter de légers changements dans les poumons.

A.2.3. Le cuivre

Le cuivre est un élément naturellement présent dans l'environnement où il se diffuse dans par des phénomènes naturels.
Il est reconnu que son utilisation dans les hôpitaux et dans les lieux publics réduit le risque d'infection. En effet, le cuivre est un élément chimique connu pour ses propriétés anti-inflammatoire et anti-infectieuse. Il est nécessaire pour beaucoup de processus biologiques (enzymatiques principalement) dans le corps humain. Le cuivre est également un élément qui intervient dans le phénomène d'angiogenèse qui est un processus permettant la formation de nouveaux tissus biologiques [21-24]. Aussi, des études *in vivo* ont permis de prouver que le cuivre intervient dans la prolifération des cellules endothéliales (responsable de la formation de tissus vasculaires) [25].
L'absorption de cuivre est donc nécessaire et essentielle pour la santé. Des quantités excessives peuvent cependant causer des problèmes de santé importants (fièvre des fondeurs, problèmes rénaux).

A.2.4. L'argent

Les propriétés antibactériennes de l'argent sont utilisées en médecine depuis plusieurs années [26]. Elles ont été confirmées par de nombreuses études réalisées sur 12 espèces de bactérie dont E.Coli [27-31]. L'introduction d'argent dans les implants est une méthode prometteuse pour réduire le risque d'infections [32-33]. De plus, l'argent est utilisé dans la conception de

matériels chirurgicaux, tels que les scalpels ou les vis pour la réparation de fractures osseuses, pour diminuer le risque de colonisations bactériennes et d'infections [31-33]. L'incorporation de cet élément chimique antibactérien dans une matrice vitreuse permet sa libération contrôlée aux abords d'un site osseux malade [29]. De nouvelles études sur des verres bioactifs dopés à l'argent ont montré que les verres possèdent un potentiel bactériostatique et qu'ils induisent des réactions antibactériennes [26-30].

Comme tout élément chimique, l'argent, à fortes doses, peut avoir des effets néfastes sur la santé (anémie, problèmes rénaux, cérébraux ou encore cardiaques).

B. Caractérisations physico-chimiques des verres pur et dopés

Dans cette partie, cinq verres synthétisés : le verre pur 46S6 et 4 autres verres présentant la plus forte teneur en éléments chimiques dopants (46S6-10Zn, 46S6-10Ti, 46S6-10Cu et 46S6-10Ag), sont présentés.

Le but est d'observer d'éventuels changements de structure chimique au sein de la matrice vitreuse du fait de l'introduction de différentes teneurs en éléments dopants.

Les diffractogrammes, présentés sur la figure 1, présentent chacun un halo de diffraction entre 25 et 40° (2θ). Cet halo de diffraction est caractéristique d'un matériau amorphe et souligne donc le désordre atomique dans la matrice vitreuse.

Les diagrammes de diffraction des seuls verres dopés au plus forte teneur en zinc, en titane, en cuivre et en argent sont représentés ici car pour les plus faibles teneurs en dopant, des profils similaires sont observables.

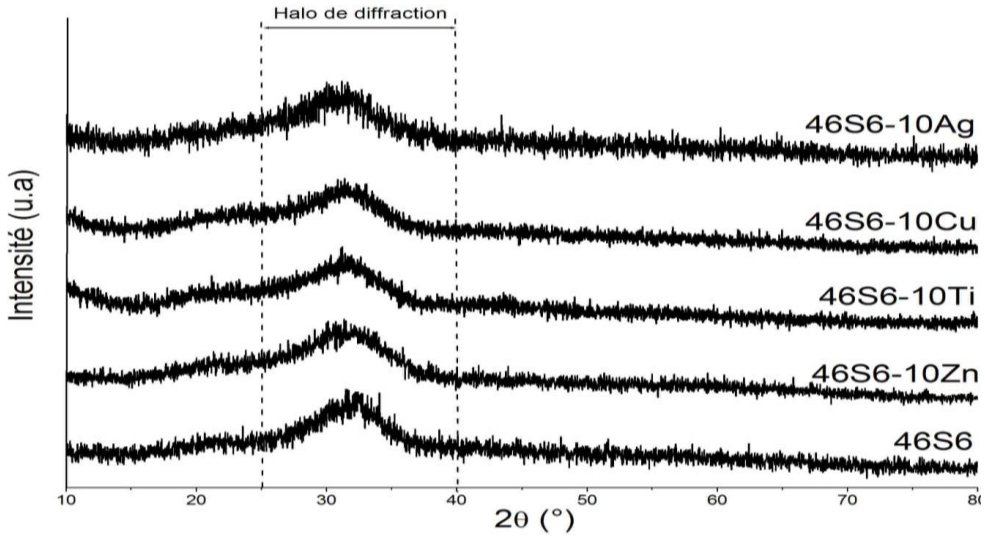


Figure 1 : Diffractogrammes des verres pure et dopés au plus forte teneur en Zn, Ti, Cu et Ag.

Ainsi, aucune modification structurale n'est détectable par diffraction des rayons X jusqu'à 10% en masse d'éléments dopants introduits dans la matrice vitreuse du verre 46S6. El-Kadhi et al ont retrouvé des résultats similaires sur des nanoparticules de verre dopés jusqu'à 10% en masse d'argent [34].

Les spectres obtenus par spectroscopie infrarouge révèlent des résultats similaires à ceux obtenus pour le 46S6 dopé avec du strontium et du magnésium [35] et sur des verres dans le système P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2 [36]. Les spectres sont présentés sur la figure 2. Seuls les verres ayant la plus faible et la plus grande teneur en éléments métalliques sont représentés [37-39].

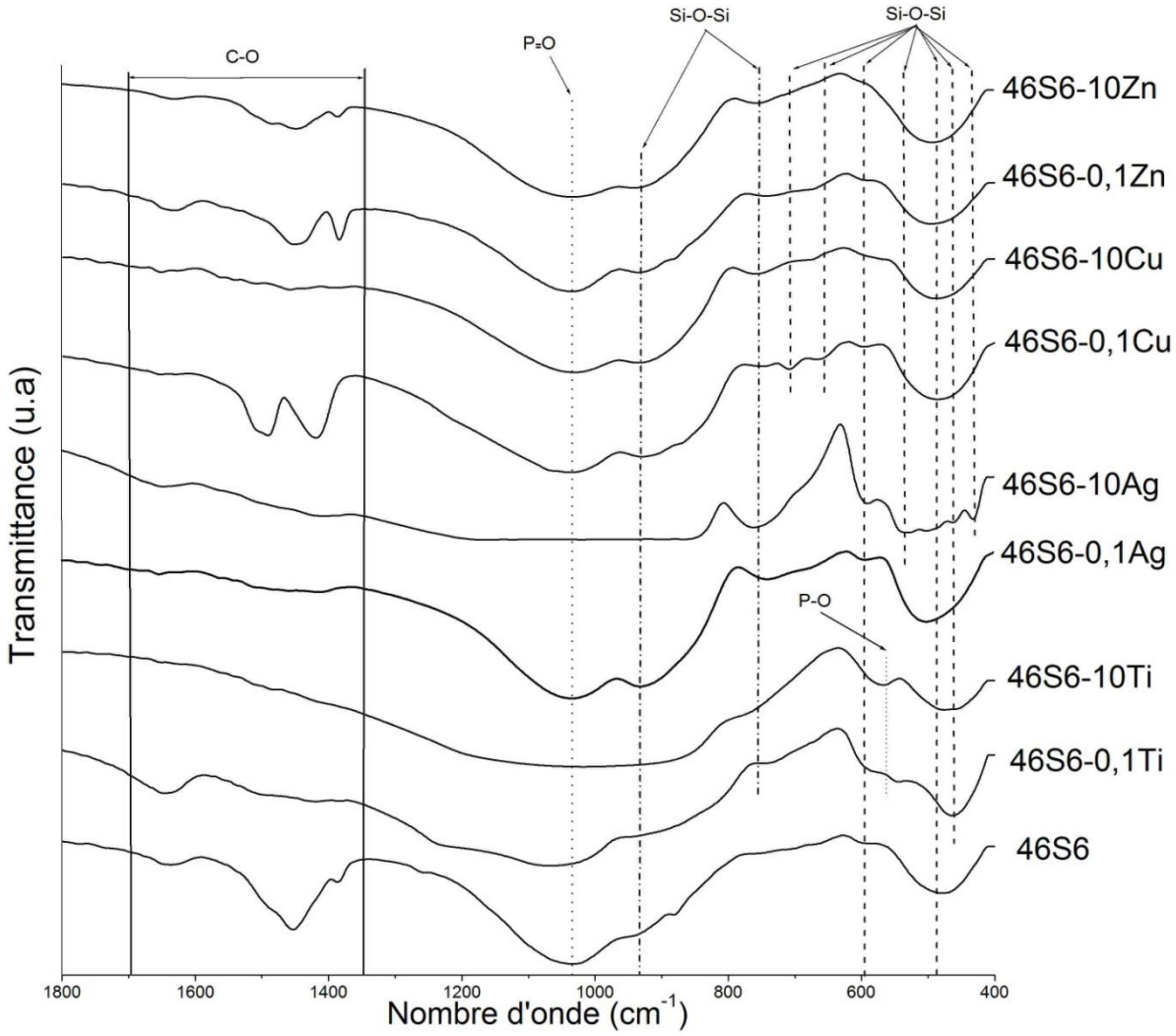


Figure 2: Spectres infrarouge des verres purs et dopés.

De nombreuses études par spectroscopie infrarouge ont été réalisées sur des verres de phosphates. Jastrzebski et al [40] ont montré que certains cations ont une influence sur la forme des spectres infrarouges et sur les positions des bandes caractéristiques des liaisons P-O. Dans les verres de silicate, Sitarz [41] a montré que la présence d'ions alcalins dans la matrice vitreuse conduit à l'élimination de défauts de structure ce qui signifie que ces ions se situent dans des domaines ordonnés.

Pour toutes les compositions chimiques des verres, des bandes caractéristiques des liaisons coudées Si-O sont visibles à 479 et 595 cm^{-1} [41]. Entre 1350 et 1600 cm^{-1}, des vibrations de liaisons C-O sont dues au dioxyde de carbone présent lors de l'analyse. A 757 et 924 cm^{-1}, des bandes caractéristiques des vibrations des liaisons Si-O-Si formant les tétraèdres SiO_4 sont présentes excepté pour le verre 46S6 où la bande à 757 cm^{-1} n'est pas présente, certainement du aux éléments métalliques introduits qui induisent la formation de nouvelles liaisons. Une vibration d'étirement d'une liaison P=O est visible par la bande présente à 1050 cm^{-1} pour le verre pure et les verres dopés. Mais l'introduction d'éléments métalliques dopants, selon leur nature et leur caractéristique chimique, apporte des modifications dans la matrice vitreuse du verre 46S6.

L'élément zinc, une fois introduit dans la matrice vitreuse du verre 46S6, n'apporte que de faibles modifications dans les liaisons chimiques. En effet, nous retrouvons les mêmes bandes caractéristiques que le verre de référence. Les seuls changements sont visibles au niveau de l'intensité de la bande de la liaison P=O à 1050 cm^{-1} qui perd en intensité lorsque la teneur en zinc augmente. Au contraire, les liaisons Si-O-Si des tétraèdres SiO_4 gagnent en intensité à 757 cm^{-1} et certaines liaisons coudées Si-O apparaissent à 667 et 706 cm^{-1} avec une plus faible intensité que pour les verres dopés au cuivre.

Pour les verres dopés au titane, à 567 cm^{-1}, il y a une bande caractéristique d'une vibration de liaison coudée P-O qui apparait. Cette liaison, non présente dans les autres verres dopés, pourrait être due à la rupture d'une liaison P=O. En effet, Silva et al [42] expliquent que dans le verre dopé avec une faible teneur en dioxyde de titane les unités métaphosphate sont dominantes. Si la teneur en titane augmente, ces unités sont alors remplacées par des unités pyrophosphate. Cela pourrait expliquer les formations de liaisons P-O pour les verres dopés au titane. De plus, des études RMN sur des verres de phosphate de calcium contenant du titane ont montré que l'introduction de cet élément était responsable de la formation de liaisons Ti-O-P [42]. L'augmentation de la teneur en titane pourrait alors permettre le remplacement d'une liaison P-O-P par une liaison Ti-O-P d'où l'augmentation de l'intensité de la bande à 567 cm^{-1}.

Pour les verres dopés au cuivre, à 667 and 706 cm^{-1} comme pour les verres dopés au zinc, des bandes de vibration de liaisons coudées Si-O sont présentes. L'ajout du cuivre dans le réseau amorphe conduit à une dépolymérisation du réseau c'est-à-dire qu'il y a des ruptures des liaisons Si-O-Si pontantes permettant l'augmentation de liaisons Si-O- non pontantes [41]. De plus, la présence de l'élément cuivre, dont l'électronégativité (tableau 3) est quasi identique à celle du silicium peut favoriser la rupture des liaisons Si-O-Si et crée de nouvelles liaisons métal-oxygène Si-O-Cu [41] ce qui expliquerait l'apparition de nouvelles liaisons coudées Si-O.

Pour les verres dopés à l'argent, plusieurs modifications apparaissent sur le verre 46S6-10Ag. En effet, plusieurs liaisons Si-O coudées sont formées à 431, 497 et 536 cm^{-1}. La bande à 595 cm^{-1} révélant une liaison coudée Si-O est bien plus prononcée que pour les autres verres ; de même pour la bande à 757 cm^{-1}. Au contraire, la bande à 1050 cm^{-1} caractéristique d'une liaison P=O est beaucoup moins prononcée et presque inexistante à la fois pour 46S6-10Ag et 46S6-10Ti. L'ajout d'une forte teneur en argent forme donc de nouvelles liaisons chimiques dans la matrice vitreuse au dépend d'autres liaisons chimiques.

Elément chimique	Rayon atomique (pm)	Electronégativité
Ag	160	1,93
Ti	176	1,54
Cu	145	1,90
Zn	135	1,65

Tableau 3 : Rayon atomique et électronégativité des éléments dopant les verres bioactifs.

Conclusion: L'ajout d'éléments métalliques dans la matrice vitreuse, selon l'élément, entraine des modifications structurales. L'introduction d'argent, de cuivre et de zinc forme de nouvelles liaisons Si-O dont les intensités sont plus ou moins intenses tandis que le titane forme des liaisons P-O.

Ces différences dans les spectres infrarouges sont certainement dues à la nature du dopant introduit. En effet, selon qu'il soit un modificateur de réseau ou un intermédiaire, les positions atomiques, leurs caractéristiques atomiques (électronégativité, rayon atomique) et les environnements atomiques varient et engendrent des modifications dans les bandes d'absorption par spectroscopie infrarouge. En effet, l'élément silicium présente une électronégativité de 1,90. Celles de l'argent et du cuivre sont de 1,93 et 1,90 donc quasi

identique à celle du silicium. Cette caractéristique peut expliquer les différentes modifications observées. Ces éléments peuvent ainsi rompre des liaisons Si-O-Si pour en former de nouvelles qui apparaissent sur les spectres infrarouges. L'élément zinc permet également de former de nouvelles liaisons à partir du silicium mais ces liaisons, moins intenses s'explique par le fait que l'électronégativité du zinc est moins importante (1,65) que celle du silicium. Quant à l'élément titane dont l'électronégativité est la plus faible (1,54), le remplacement des unités métaphosphate par des unités pyrophosphate explique les modifications observées.

Cependant, le réseau vitreux du verre 46S6, qu'il soit pur ou dopé, constitue majoritairement un réseau de silice où le phosphore est présent en petite quantité. Et selon l'élément dopant introduit, ce réseau peut subir une ou plusieurs modifications.

II. Comportement thermique des verres

Ce chapitre est consacré à l'analyse thermique différentielle (ATD) des différents verres synthétisés. Le but de cette étude consiste à observer l'effet des éléments métalliques et leurs teneurs sur les caractéristiques thermiques des verres.
Pour chaque verre, les températures caractéristiques ont été déterminées. Le but étant de calculer l'excès d'entropie de chaque verre pour obtenir des informations sur l'effet des métaux introduits sur l'arrangement atomique dans la matrice vitreuse [37-39]. Cette étude thermique nous donne des informations permettant de comprendre la réactivité chimique des verres une fois immergé dans le SBF et leur cinétique de bioactivité.

A. Introduction

Le verre est un matériau amorphe c'est à dire qu'il présente une structure désordonnée. Il n'est exposé à aucune contrainte stœchiométrique et peut de ce fait, inclure une grande variété d'éléments chimiques dans sa composition chimique. Les oxydes utilisés pour synthétiser un verre sont classés en 3 catégories (Chapitre 1):

- les formateurs de réseau
- les modificateurs de réseaux dont l'introduction forme des discontinuités dans le réseau vitreux, implique une baisse de la viscosité [38] et peuvent avoir une influence sur la température de transition vitreuse [39].
- les éléments intermédiaires dont les principaux sont : Al, Fe, ti, Ni et Zn [43]. L'introduction de certains métaux induit des modifications dans le comportement thermique des verres.

B. Analyse Thermique Différentielle

Les verres BG1, BG2, BG3 et BG4, élaborés lors de travaux antérieurs dans le groupe [44], ont été étudiés pour mesurer l'influence de la variation des teneurs en oxydes sur le comportement thermique. Les verres dopés avec 1, 5 et 10 % en masse de cuivre et d'argent ont été synthétisés pour cette étude. Les compositions chimiques sont données dans le tableau 1, celles des autres verres sont regroupées dans la partie I de ce chapitre.

Verre de référence : le 46S6

	SiO_2	CaO	Na_2O	P_2O_5
46S6	46	24	24	6

Verres présentant différentes teneurs en SiO_2, CaO et Na_2O

	SiO_2	CaO	Na_2O	P_2O_5
BG1	46,5	28	19,5	6
BG2	47	26	21	6
BG3	46,5	23	24,5	6
BG4	45,5	10	38,5	6

Verres dopés au cuivre

	SiO_2	CaO	Na_2O	P_2O_5	CuO	% Cu
46S6-1Cu	46	23,35	23,35	6	1,3	1
46S6-5Cu	46	20,85	20,85	6	6,3	5
46S6-10Cu	46	17,75	17,75	6	12,5	10

Verres dopés à l'argent

	SiO_2	CaO	Na_2O	P_2O_5	Ag_2O	% Ag
46S6-1Ag	46	22,9	22,9	6	2,2	1
46S6-5Ag	46	18,65	18,65	6	10,7	5
46S6-10Ag	46	13,25	13,25	6	21,5	10

Tableau 1 : Compositions chimiques des verres synthétisés pour l'étude (% massique).

L'ATD a été utilisée pour déterminer les températures caractéristiques des différents verres : la température de transition vitreuse T_g, la température du maximum de cristallisation T_p et la température du maximum de fusion T_f. La stabilité thermique (TS), selon la formule de Dietzel, a été calculée pour chaque type de verre. Cette formule fait intervenir T_g et $T_c$onset (la température de début de cristallisation) [45-47] :

$$\mathbf{TS = T_conset - T_g}$$

Le principe de l'analyse thermique différentielle et le protocole sont détaillés page 75 et en annexe 8.

B.1. Influence des oxydes sur les caractéristiques thermiques des verres

Les 4 verres BG1, BG2, BG3 et BG4 ont été analysés. Les valeurs indiquées sont tirées des travaux de recherche antérieurs effectués au laboratoire [44]. Les rapports SiO_2/CaO, SiO_2/Na_2O et CaO/Na_2O ont été modifiés (tableau 2) dans le but d'évaluer l'effet de la teneur en oxyde sur les caractéristiques thermiques des verres.

	SiO_2 / CaO	**SiO_2 / Na_2O**	**CaO / Na_2O**
BG1	1,7	2,4	1,4
BG2	1,8	2,2	1,2
BG3	2	1,9	0,9
BG4	4,6	1,2	0,3

Tableau 2 : Variations des rapports SiO_2/CaO, SiO_2/Na_2O et CaO/Na_2O.

Les résultats obtenus montrent que l'augmentation du rapport CaO/Na_2O induit une augmentation de T_g qui passe de 434 à 566°C, de T_p qui passe de 550 à 770°C et de T_f qui passe de 1095 à 1215°C (figure 1.a). Une augmentation de la température de fusion est observée quand la teneur en Na_2O diminue par rapport à la teneur en CaO et SiO_2. Les mêmes changements sont observés quand le rapport SiO_2/Na_2O augmente (figure 1.b). Cependant, le comportement thermique est inversé lorsque le rapport SiO_2/CaO est élevé (figure 1.c).

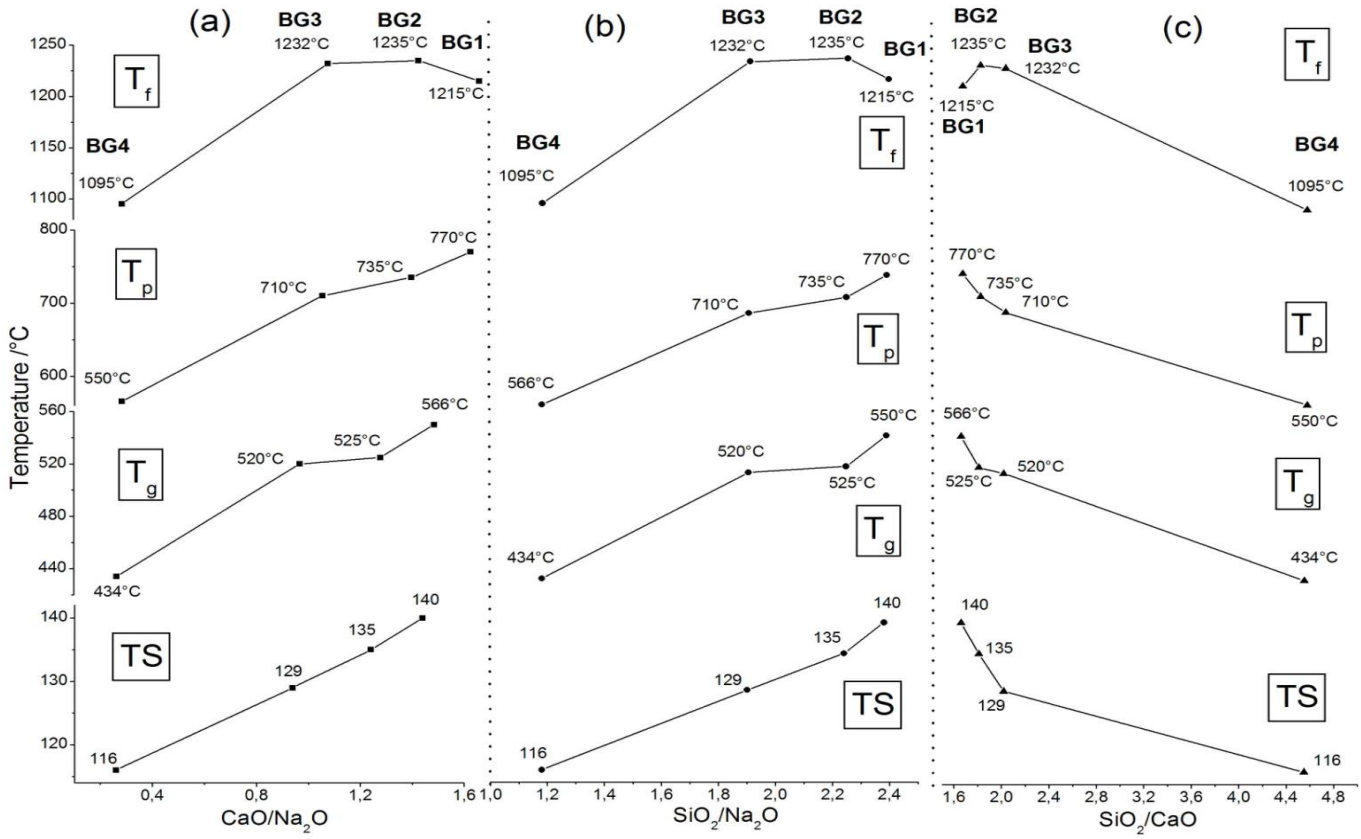


Figure 1 : (a) Caractéristiques thermiques en fonction du rapport CaO/Na_2O. (b) Caractéristiques thermiques en fonction du rapport SiO_2/Na_2O. (c) Caractéristiques thermiques en fonction du rapport SiO_2/CaO.

En comparant l'effet des variations des rapports, nous pouvons conclure qu'une faible teneur en Na_2O et une forte teneur en CaO participent à l'augmentation des températures caractéristiques.

L'introduction de Na_2O crée deux oxygènes pontants dans la matrice vitreuse. Les deux charges négatives des oxygènes sont équilibrées par les charges positives d'une paire d'ions Na^+ formant une matrice électrostatique neutre. De cette manière, en augmentant la teneur en Na_2O ou en diminuant celle de CaO, la structure du réseau est modifiée et les propriétés du verre changent comme par exemple cette diminution de la température de fusion.

Dans la littérature, il a été vu que l'introduction de Na_2O réduit la température de fusion et augmente la solubilité des verres. Ce phénomène constitue un paramètre important pour la création d'un lien intime entre l'os et l'implant [48-51]. L'oxyde CaO permet de réduire la température de fusion sans affecter la durabilité chimique du verre. L'addition simultanée de Na_2O et CaO induit une amélioration de la durabilité chimique [52].

B.2. Etude thermique des verres dopés - Effet de la teneur en éléments métalliques sur leurs températures caractéristiques.

Pour les verres dopés en éléments métalliques, le rapport CaO/Na_2O a été maintenu à 1 dans le but de ne pas avoir les effets des oxydes vu précédemment. Les quantités de CaO et Na_2O diminuent au profit de la quantité d'oxyde de métal introduite.

L'impact du zinc, du titane, du cuivre et de l'argent sur les températures caractéristiques a été étudié [37-39].

B.2.1. Impact de la teneur en zinc sur les températures caractéristiques du verre 46S6.

Les courbes d'analyse thermique différentielle des verres dopés au zinc sont présentées en Figure 2.

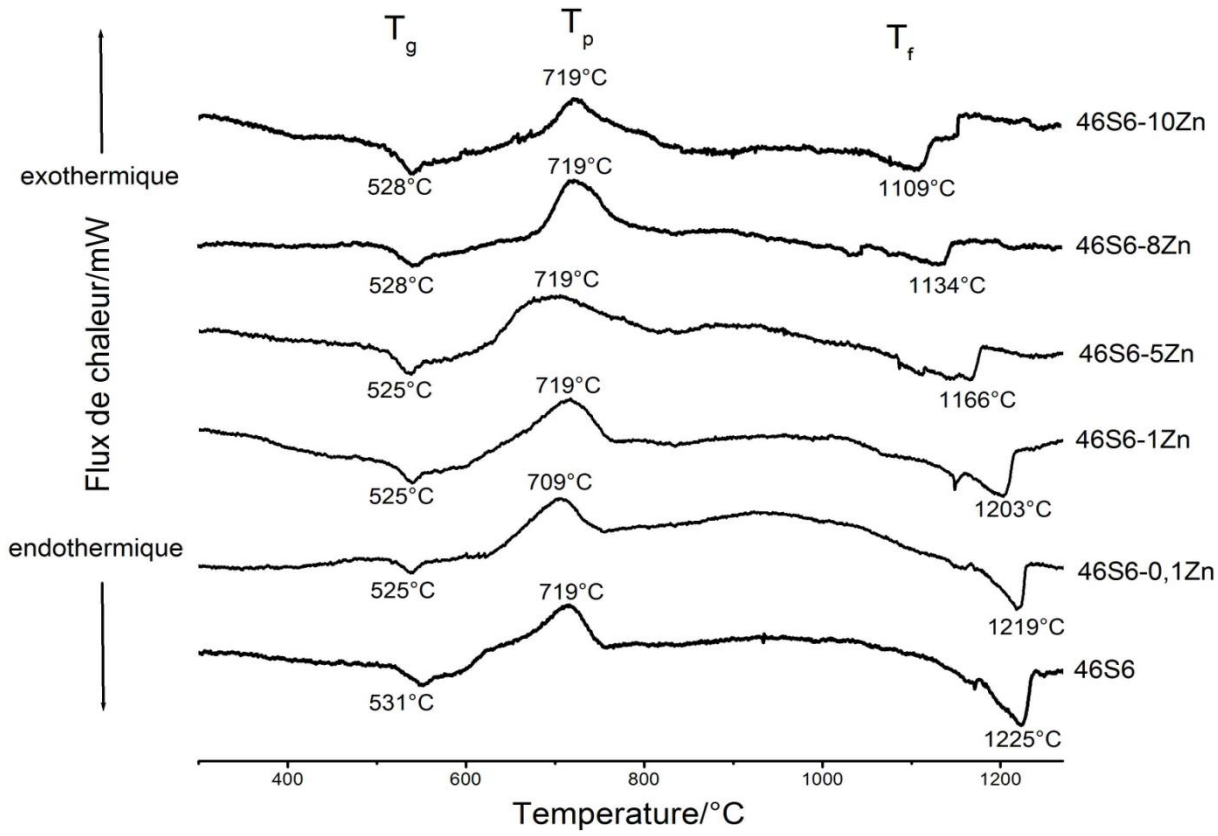


Figure 2 : Thermogrammes des verres dopés au zinc.

Les courbes obtenues montrent que le zinc, pour les températures de transition vitreuse et de cristallisation, n'implique que de très faibles variations, non significatives. En revanche, lorsque la teneur en zinc augmente, la température de fusion T_f diminue et passe de 1219 à 1109°C ($|\Delta T_f| = 110$°C). La relation mathématique entre T_f et la teneur en zinc τ_{Zn} est :

$$\mathbf{T_f = 1230 - 10{,}9.\tau_{Zn}}$$

Où τ_{Zn} est la teneur en zinc introduite dans le verre.

La valeur 1230°C est proche de la température de fusion du verre 46S6 non dopé. Cette correspondance est représentée dans la figure 3.

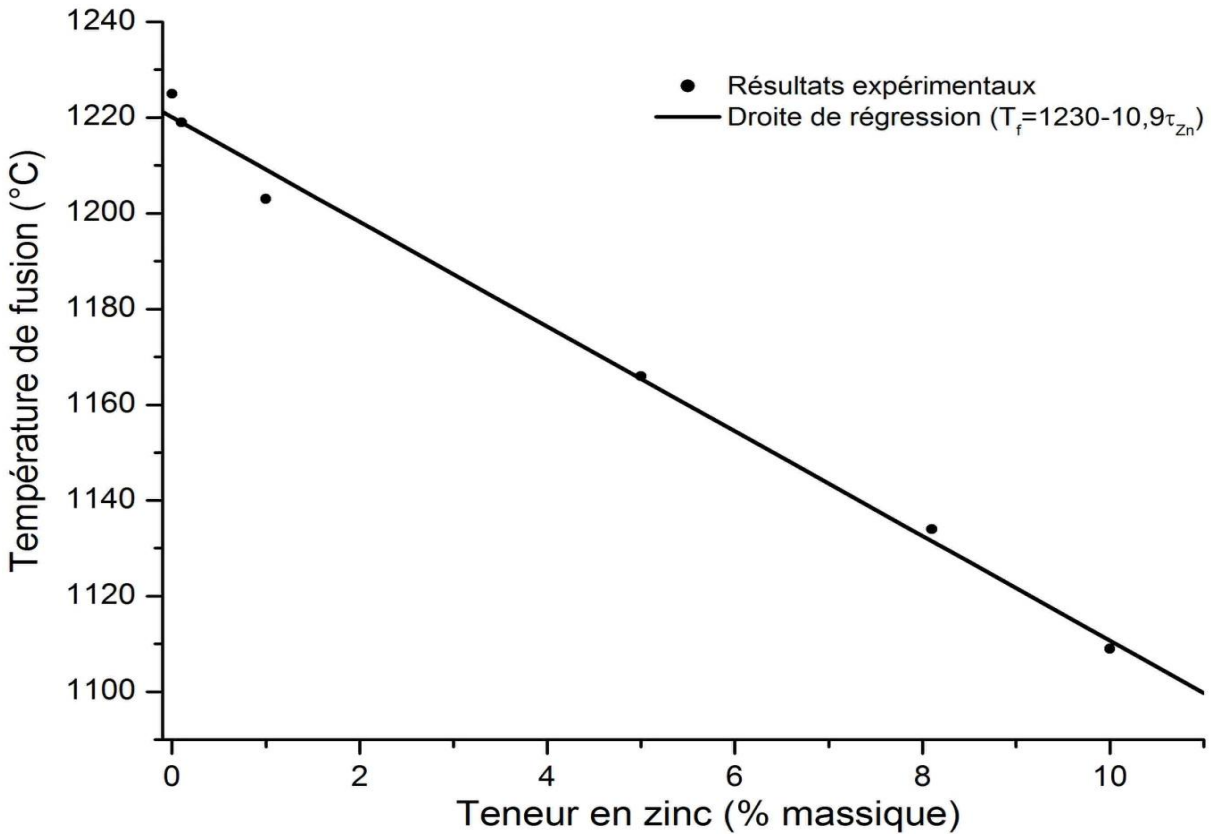


Figure 3 : Variations de la température de fusion en fonction de la teneur en zinc.

Cette étude nous a permis de démontrer que l'introduction d'une certaine teneur en Na_2O, égale à celle de CaO, ne produit pas de variations sur T_g et T_p. Etant un élément intermédiaire dans les verres bioactifs, l'augmentation de la teneur en oxyde de zinc implique une

diminution de la température de fusion du verre 46S6 suivant une relation linéaire. La stabilité thermique augmente également avec la teneur en zinc.

Des verres phosphosilicatés ont déjà été étudiés [53-65]. Lusvardi et al [60-61], par exemple, ont évalué l'effet du fluor et du zinc sur ce type de verre.
Pour le zinc, de nombreuses études ont été entreprises pour observer son influence sur le comportement thermique. Il a été montré que l'addition des ions zinc dans les verres de silicates ou de borosilicates améliore les propriétés thermiques (isolant thermique) et mécaniques et réduit la température de fusion [43,66-71].

B.2.2. Impact de la teneur en titane sur les températures caractéristiques du verre 46S6.

La figure 4 présente les thermogrammes des verres dopés au titane.

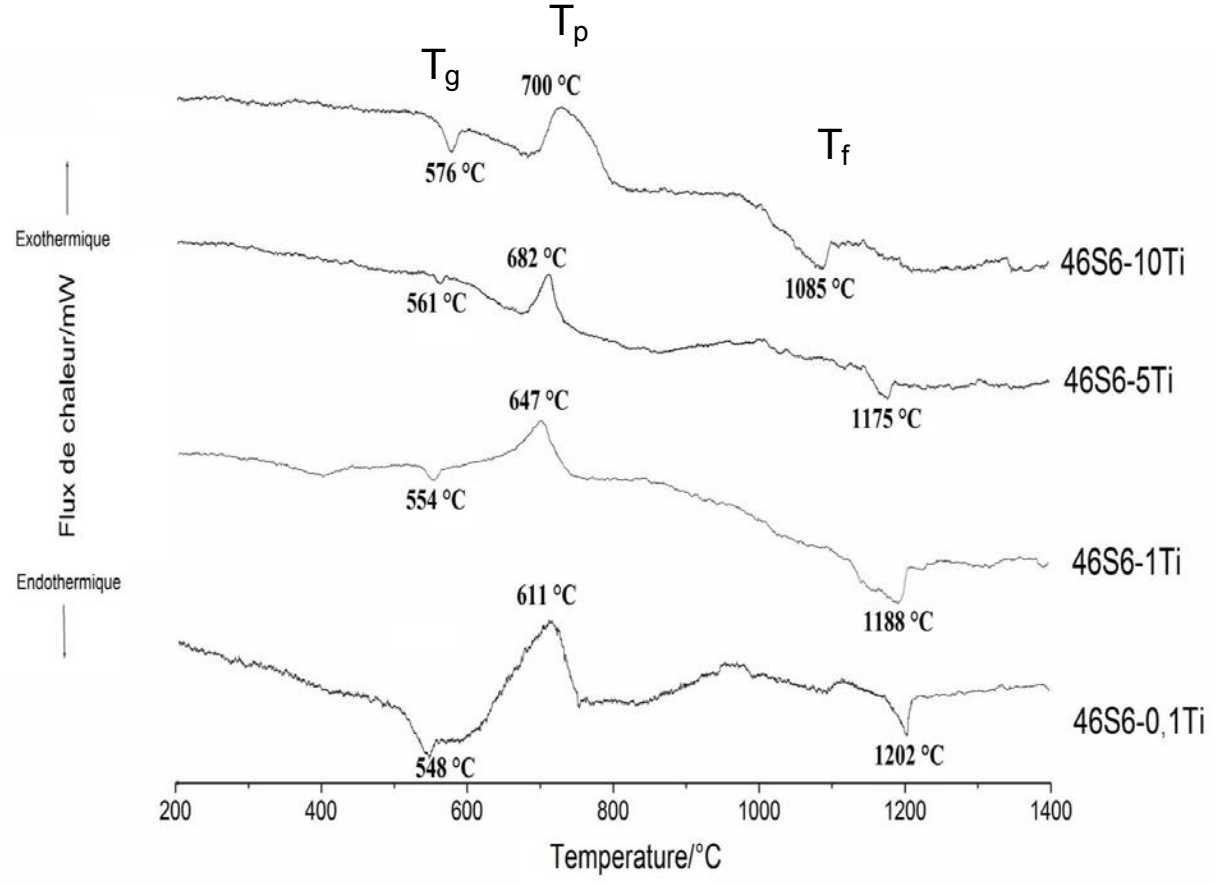


Figure 4 : Thermogrammes des verres dopés au titane.

Pour les verres dopés au titane, des variations sont observées pour les trois températures caractéristiques. En effet, T_g augmente de 548 à 576 °C (ΔT_g = +28°C) et T_p augmente de 611 à 700°C (ΔT_p = +89°C) alors que la température de fusion diminue de 1202 à 1085°C ($|\Delta T_f|$ = 117°C). Ces variations interviennent lorsque la teneur en titane est de plus en plus importante. Pour les températures de transition vitreuse et de cristallisation, la même tendance est observée dans d'autres verres de phosphate [72].
Concernant l'évolution de la stabilité thermique, nous remarquons qu'elle est de plus en plus importante au fur et à mesure que la teneur en titane augmente. Elle passe de 77 à 115 K (ΔTS = 38 K). A partir de 5% en masse de titane introduit, une stabilisation de TS a l'air de se mettre en place autour de 115 K.

L'ajout de titane, sous sa forme TiO_2, contribue à la stabilisation de la structure chimique des verres et à l'amélioration de certaines propriétés comme la durabilité chimique, les propriétés mécaniques ou encore la conductivité électrique [73]. Par exemple, dans les verres borophosphatés, l'addition de TiO_2 a pour conséquence d'augmenter de façon non-linéaire la température de transition vitreuse du verre [74]. Le même phénomène est observé pour les verres dans le système Na_2O-TiO_2-P_2O_5 dont la teneur en TiO_2 est comprise entre 0 et 5 % molaire. C'est ce que l'on observe pour nos verres. L'augmentation de la teneur en TiO_2 est également responsable de l'augmentation de la contribution du mécanisme de cristallisation de surface. La durabilité chimique des verres sans oxyde de titane est faible mais avec le remplacement de Na_2O ou P_2O_5 par TiO_2, cette dernière augmente fortement [75], ce qui expliquerait les variations de la température de cristallisation de nos verres.

B.2.3. Impact de la teneur en cuivre sur les températures caractéristiques du verre 46S6.

La figure 5 présente les thermogrammes des verres dopés au cuivre.

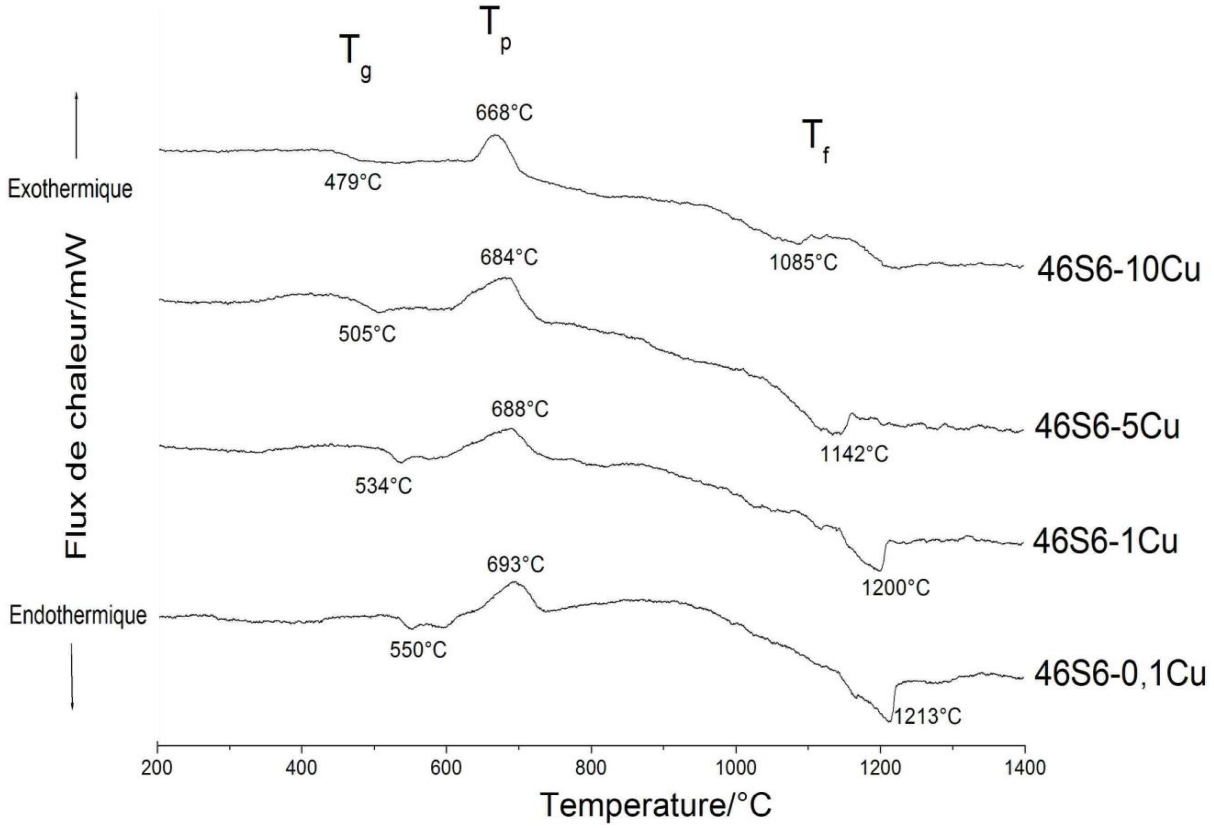


Figure 5 : Thermogrammes des verres dopés au cuivre.

Des variations sont observées pour les trois températures caractéristiques des verres en fonction de la teneur en cuivre introduite.

Pour les verres dopés au cuivre, une diminution de T_g et T_p est observée quand la teneur en cuivre augmente. T_g passe de 550 à 479°C ($|\Delta T_g|$ = 71°C) et T_p passe de 693 à 668°C ($|\Delta T_p|$ = 25°C). Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Sulowska et al [84]. En effet, l'augmentation du taux de cuivre introduit dans la matrice amorphe de verre au dépend de la teneur en CaO est responsable de l'augmentation d'une relaxation du stress interne dans le réseau vitreux et cela implique une diminution de la température de transition vitreuse [84]. Ce même phénomène est donc observé pour nos verres.

La stabilité thermique des verres dopés au cuivre augmente également avec la teneur en cuivre introduite. Elle passe de 83 à 129 K pour respectivement 46S6-0,1Cu et 46S6-10Cu (ΔTS= 46 K).

La température de fusion suit en effet une loi mathématique qui est une fonction de la teneur en cuivre (figure 6):

$$\mathbf{T_f = -13.\tau_{Cu} + 1225}$$

Où τ_{Cu} est la teneur en cuivre en % massique.

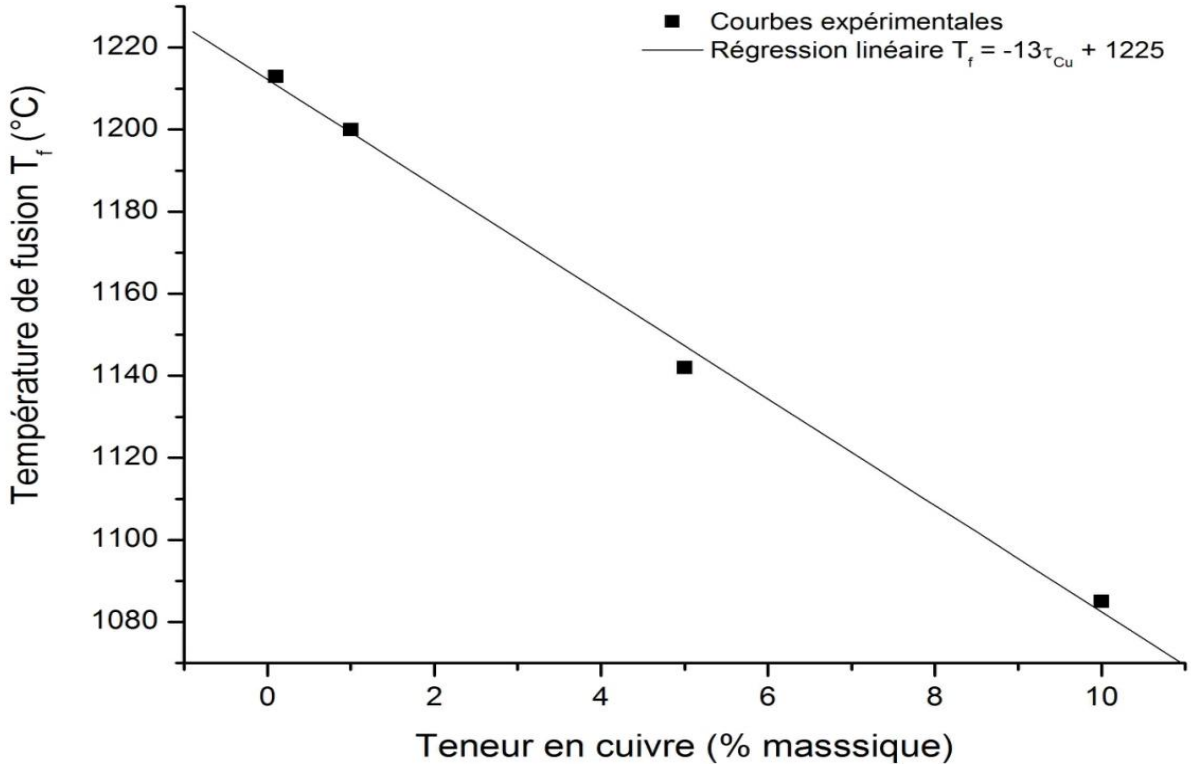


Figure 6 : Variation linéaire de T_f des verres dopés au cuivre.

La température de fusion est linéaire et diminue lorsque la teneur en cuivre augmente.

Dans les verres phosphosilicatés, l'introduction de cuivre a un impact sur les caractéristiques thermiques. En effet, une relation entre les paramètres caractérisant les transformations du verre et la teneur en phosphore et en cuivre formant la structure du verre, a montré qu'une augmentation de la teneur en phosphore entrainait une augmentation de la solubilité du cuivre dans la matrice vitreuse. Des changements dans la température de transition de vitreuse étaient plus importants dans les verres avec une forte teneur en P_2O_5 et en CuO [77]. De plus, dans ces verres, la température de cristallisation a tendance à diminuer avec l'augmentation de la teneur en cuivre [78]. De nombreuses études ont été entreprises pour évaluer les propriétés thermiques des verres contenant du cuivre [79].

B.2.4. Impact de la teneur en argent sur les températures caractéristiques du verre 46S6.

Les analyses thermiques des verres dopés à l'argent sont présentées en figure 7.

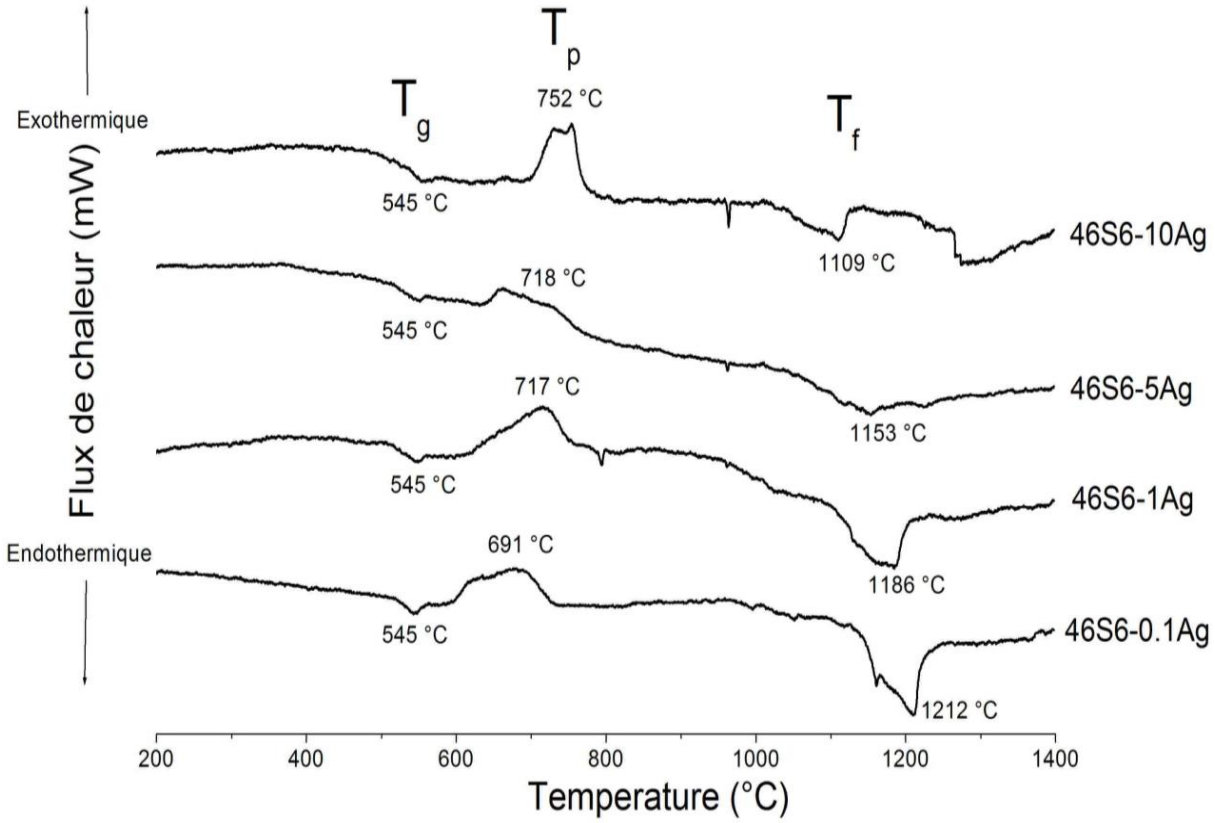


Figure 7 : Thermogrammes des verres dopés à l'argent.

Pour la température de transition de vitreuse, celle-ci semble indépendante de la teneur en argent introduite dans le verre. En effet, que ce soit à 0,1 ou 10% en masse introduit, la température de transition vitreuse reste constante et égale à 545°C.

L'ajout d'argent a pour effet d'augmenter la température de cristallisation du verre ; elle passe de 691 à 752°C (ΔT_p = 61°C).

L'augmentation de la teneur en argent a une incidence sur la température de fusion. Celle-ci passe de 1202°C à 1109°C ($|\Delta T_f|$ = 93°C).

Pour la stabilité thermique, nous observons une augmentation lorsque la teneur en argent augmente. Elle passe de 55 à 148 K (ΔTS = 93 K).

Dans les verres de chalcogénures, l'introduction d'une teneur en argent cause des changements dans le comportement thermiques de ces verres [37, 80-81]. Des résultats ont montré que des verres dans la composition: $Se_{80.5}Bi_{1.5}Te_{16}Ag_2$ étaient thermiquement plus stable et avaient une faible tendance à cristalliser par comparaison à des verres ayant une composition chimique sans argent. En effet, la stabilité thermique et la capacité à former le verre augmentent avec la teneur en argent. L'augmentation de la stabilité thermique avec

celle de la teneur en argent est attribuée à l'augmentation de l'énergie de cohésion dans le verre [82-85]. De plus, il a été prouvé que la température de transition vitreuse est indépendante de la teneur en argent [84].

Autant pour leurs caractéristiques biologiques que pour leur capacité à modifier les comportements thermiques des verres ; les effets de la teneur en zinc, titane, argent et cuivre sur les caractéristiques thermiques ont été étudiés. Les résultats obtenus sont présentés.

Conclusion sur le comportement thermique des verres :

L'ajout de zinc, de cuivre, de titane ou d'argent dans la matrice vitreuse du verre implique clairement une diminution de la température de fusion quel que soit l'élément introduit. Cependant, diverses évolutions sont observées sur les températures de transition vitreuse et de cristallisation. En effet, le zinc n'a pas d'influence sur ces deux températures ; l'argent n'a pas d'influence sur la T_g mais augmente la T_p ; le titane augmente ces deux températures et le cuivre les diminue. Enfin, ces 4 éléments permettent d'accroitre la stabilité thermique des verres.

Quand les éléments dopants sont introduits dans la matrice amorphe, les liaisons chimiques covalentes Si-O-Si se cassent pour former des liaisons ioniques métal-oxygène. Ainsi, les liaisons covalentes étant 20 fois plus énergétiques que les liaisons métal-oxygène formées, nous observons des changements dans les caractéristiques thermiques des verres. Pour les verres dopés à l'argent, de nombreuses liaisons Si-O coudées (voir page 100) se sont formées avec l'augmentation de la teneur en argent. Les caractéristiques de chaque élément comme l'électronégativité, le rayon atomique ou encore le point de fusion peuvent avoir une influence sur le comportement thermique des verres [37-39]. Sitarz et al [86-87] ont montré sur des verres de phosphate, qu'il était possible que les cations Ca^{2+} aient été remplacés par des ions Cu^{2+} conduisant à la diminution de la résistance thermique des verres qui pourrait expliquer la diminution des températures de transition vitreuse, de cristallisation ou de fusion. Les domaines structuraux changeant dans le réseau vitreux expliquent les changements dans les comportements thermiques.

C. Phénomène d'excès d'entropie dans les verres et influence des teneurs en éléments dopants.

C.1. Présentation

En général, l'étude de l'état vitreux est une approche dans la description du désordre structural. C'est la définition générale de l'entropie. Dans la littérature récente, concernant le comportement des verres, plusieurs auteurs supposent que la formation du verre est obtenue à partir d'un état liquide et d'une perte d'entropie à la température de transition vitreuse [88-89]. L'application de la thermodynamique à l'état vitreux a été reconnue dans les premiers articles publiés et est maintenant considérée comme classique [90]. Il a été vu que l'entropie d'un verre est plus grande que celle d'un cristal présentant la même composition chimique à T = 0 K [91]. De plus, la température durant la synthèse des verres pourrait avoir un impact sur l'entropie. En effet, Tropin et al [92] ont prouvé que la production d'entropie devient plus importante avec l'augmentation de la loi de chauffe. De plus, les approches mécaniques et thermodynamiques confirment le point de vue qu'une entropie résiduelle est « gelée » dans le système au cours de la transition vitreuse [92]. Les valeurs respectives des entropies résiduelles augmentent avec l'augmentation des lois de chauffe [92].

C.2. Formule établie pour le calcul de l'excès d'entropie

L'entropie du liquide S_l à une température $T > T_f$ par la voie cristal-liquide est [93] :

$$S_l = S_0 + \int_0^{T_f} Cp_s \frac{dT}{T} + \frac{\Delta H_f}{T_f} + \int_{T_f}^{T} Cp_l \frac{dT}{T}$$

Où Cp_s est la chaleur spécifique du solide, Cp_l celle du liquide, liquide surfondu ou verre.
S_0 corresponds à l'entropie du cristal à T = 0 K. S_0 = 0 selon le troisième principe de la thermodynamique. De la même manière S_l est obtenue par la voie verre-liquide [93].
L'équation correspondante est :

$$S_l = S'_0 + \int_0^{T_g} Cp_l \frac{dT}{T} + \int_{T_g}^{T_f} Cp_l \frac{dT}{T} + \int_{T_f}^{T} Cp_l \frac{dT}{T}$$

Où S'_0 représente l'entropie du verre à T = 0 K.

L'indentification des deux équations conduit à l'établissement de l'entropie S'_0 du verre à T = 0 K. Cette relation est la suivante :

$$S_0' = \frac{\Delta H_f}{T_f} - \int_0^{T_f} (Cp_l - Cp_s)\frac{dT}{T}$$

La variation d'entropie peut être déduite par la relation suivante :

$$\Delta S = S\ (liquide\ ou\ verre) - S\ (cristal)$$

Et à une température $T < T_f$:

$$\Delta S = \frac{\Delta H_f}{T_f} - \int_{T_g}^{T_f} (Cp_l - Cp_s)\frac{dT}{T}$$

La formule établie pour le calcul de l'excès d'entropie des verres est donc la suivante :

$$\Delta S = \frac{\Delta H_f}{T_f} - 2.09 Ln\frac{T_f}{T_g} + 0.48 \times 10^{-3}[T_f - T_g]$$

C.3. Excès d'entropie des verres dopés au zinc, au titane, au cuivre ou à l'argent.

Cette partie est consacrée au calcul de l'excès d'entropie à la température T = 0 K pour les verres dopés en éléments métalliques. Le but est d'évaluer l'effet de la teneur en métal sur cette grandeur. La formule, donnant ΔS, précédemment établie, nous permet de calculer cette grandeur pour chaque type de verre. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 2.

	46S6	**46S6-0.1Zn**	**46S6-1Zn**	**46S6-5Zn**	**46S6-8Zn**	**46S6-10Zn**
L_f **/J.kg^{-1}**	120.2	118.3	77.8	61.8	57.9	56.2
T_g **/K**	804	798	798	798	801	801
T_f **/K**	1498	1492	1476	1439	1407	1382
ΔS **/J.K^{-1}**	79.27	78.31	51.75	42.02	40.3	39.80

	46S6-0.1Ag	**46S6-1Ag**	**46S6-5Ag**	**46S6-10Ag**
L_f **/J.kg^{-1}**	100	64	38	28
T_g **/K**	818	818	818	818

T_f /K	1485	1459	1426	1382
ΔS /J.K^{-1}	66	45	26	18

	46S6-0.1Ti	46S6-1Ti	46S6-5Ti	46S6-10Ti
L_f /J.kg^{-1}	110	51	23	9
T_g /K	821	827	834	849
T_f /K	1475	1461	1448	1358
ΔS /J.K^{-1}	73	36	15	5

	46S6-0.1Cu	46S6-1Cu	46S6-5Cu	46S6-10Cu
L_f /J.kg^{-1}	57	40	34	22
T_g /K	823	807	778	752
T_f /K	1486	1473	1415	1358
ΔS /J.K^{-1}	37	28	23	14

Tableau 2 : Caractéristiques thermiques des verres dopés en éléments métalliques

La figure 8 suivante présente l'évolution de l'excès d'entropie des verres dopés en fonction de la teneur en éléments métalliques.

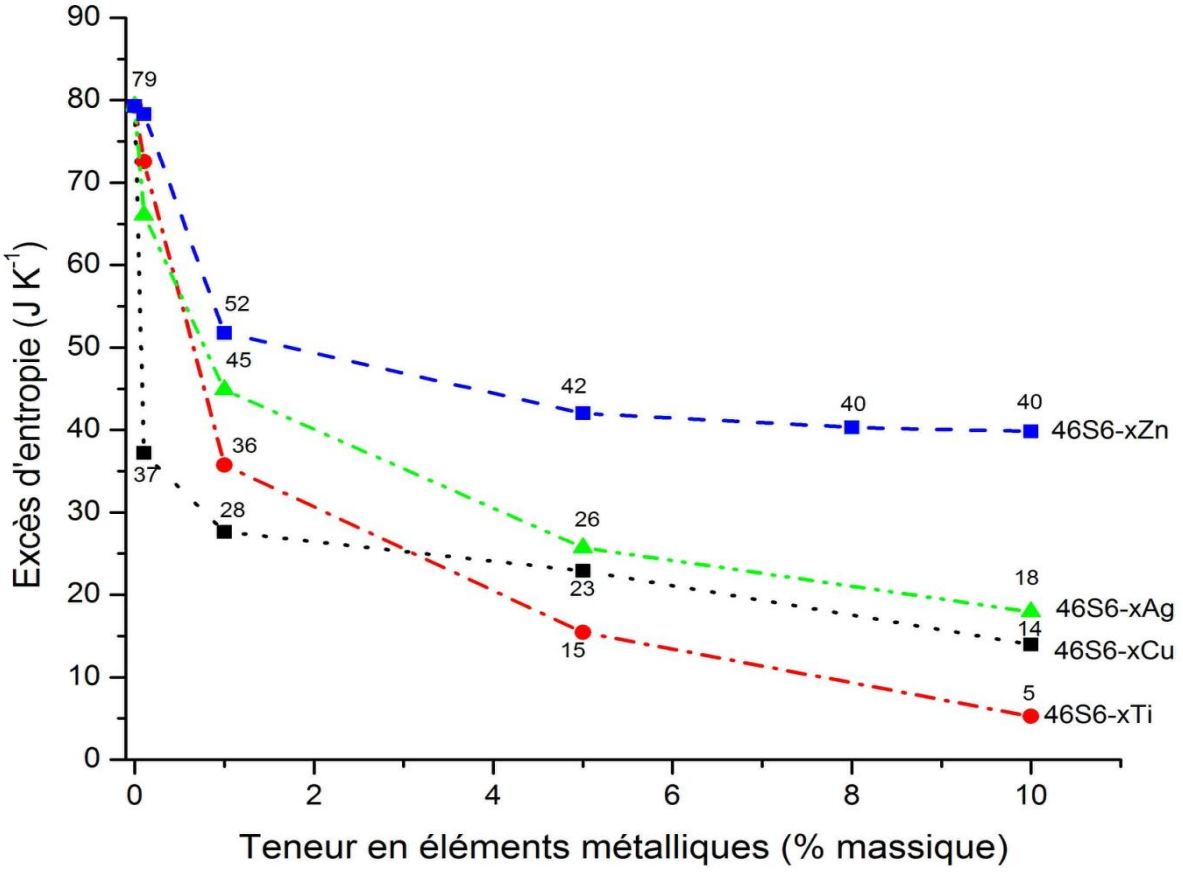


Figure 8 : Excès d'entropie des verres dopés en fonction de la teneur en éléments métalliques

Les résultats obtenus montrent une même évolution de l'excès d'entropie quel que soit l'élément métallique introduit dans le réseau vitreux. En effet, plus la teneur en élément augmente dans le verre, et plus l'excès d'entropie diminue.

Les valeurs obtenues pour les verres sont différentes de 0. L'excès d'entropie du verre pure est de 79 $J.K^{-1}$. Pour les verres dopés au zinc, l'excès d'entropie va de 78 à 40 $J.K^{-1}$; pour les verres dopés au titane, l'excès d'entropie est compris entre 73 et 5 $J.K^{-1}$; pour les verres dopés au cuivre, l'excès d'entropie va de 37 à 14 $J.K^{-1}$ et enfin pour les verres dopés à l'argent, l'excès d'entropie est compris entre 73 et 18 $J.K^{-1}$.

Conclusion sur le phénomène d'excès d'entropie des verres :

Les résultats sont en accord avec la théorie de Zarzycki. Le troisième principe de la thermodynamique ne peut donc pas être appliqué pour les verres élaborés dans le système quaternaire SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5. La cinétique de diminution est différente selon l'élément introduit. Cela peut s'expliquer par les nouvelles liaisons chimiques formées après introduction des éléments métalliques.

Les cristaux présentent une entropie nulle à 0 K, c'est-à-dire qu'il n'y a aucune agitation thermique des atomes qui restent immobiles. La diminution de l'entropie des verres avec l'augmentation de la teneur en éléments métalliques signifie donc que le désordre est réduit dans le réseau vitreux et les atomes présents deviennent de plus en plus immobiles. La diminution du désordre est à mettre en lien avec la taille des atomes (leur rayon atomique) constituant le réseau vitreux et leur électronégativité qui joue un rôle dans la formation de nouvelles liaisons chimiques. Le titane par exemple, connu pour améliorer les propriétés mécaniques du verre, crée des liaisons chimiques plus forte et va donc diminuer le désordre et donc l'excès d'entropie du verre d'où un excès d'entropie bien moindre pour le verre 46S6-10Ti.

Cependant, le changement d'entropie peut aussi être attribué à des problèmes de stress thermique résiduel qui peut exister dans les biomatériaux. Cela peut contribuer à des changements d'entropie lorsque l'on ajoute de fortes concentrations en Zn, Ti, Ag ou Cu. En effet, les propriétés mécaniques et thermiques dépendent non seulement de la composition chimique mais aussi des stress résiduels (stress en tension ou en compression) qui apparaissent durant le refroidissement de la matrice vitreuse. Le stress thermique résiduel peut apparaitre durant un refroidissement non-homogène [94]. Tejedor et al [95], en étudiant des verres métalliques, ont prouvé que la diminution du stress résiduel commence avec un processus de recuit. Pour son étude, Tejedor a recuit son verre pendant 30 minutes à différentes températures jusqu'à trouver le couple temps/température idéal [94]. Une fois le couple trouvé, le stress résiduel était complètement éliminé. Pour nos verres, la coulée à 1350°C a été faite dans des moules en laiton préchauffés à 565°C ($\Delta T = +20°C$ avec la T_g du verre 46S6). Les verres ont ensuite été recuits à 565°C pendant 4 heures et la descente en température jusqu'à la température ambiante a été réalisée selon une loi de chauffe de $1°C.min^{-1}$. Le temps de recuit long et une descente en température lente ont permis d'éliminer les stress thermiques résiduels puisque nos verres ont pu être coupés, tranchés, percés et usinés. Ainsi, le stress thermique résiduel, s'il est présent, est négligeable pour évaluer le changement d'entropie.

III. Etude *in vitro* sans cellules des verres dopés au zinc, au titane, au cuivre et à l'argent

A. Comportement *in vitro* des verres dopés au zinc

L'étude du verre 46S6 a été réalisée lors de précédents travaux de recherche effectués au laboratoire [96-97]. Les verres ont été immergés sous forme massive et sous forme de poudre dans le SBF comme expliqué pages 78-80.
L'objectif de cette étude est de mieux comprendre l'effet des différents éléments chimique introduits sur la cinétique de bioactivité.

A.1. Caractérisations structurales des verres dopés au zinc après immersion dans le SBF

La figure 1 présente les diffractogrammes obtenus après 30 jours d'immersion des poudres des verres dopés au zinc dans le SBF. Les diffractogrammes du verre 46S6 et de l'hydroxyapatite nous servent de référence pour l'ensemble des diffractogrammes présentés dans cette étude.

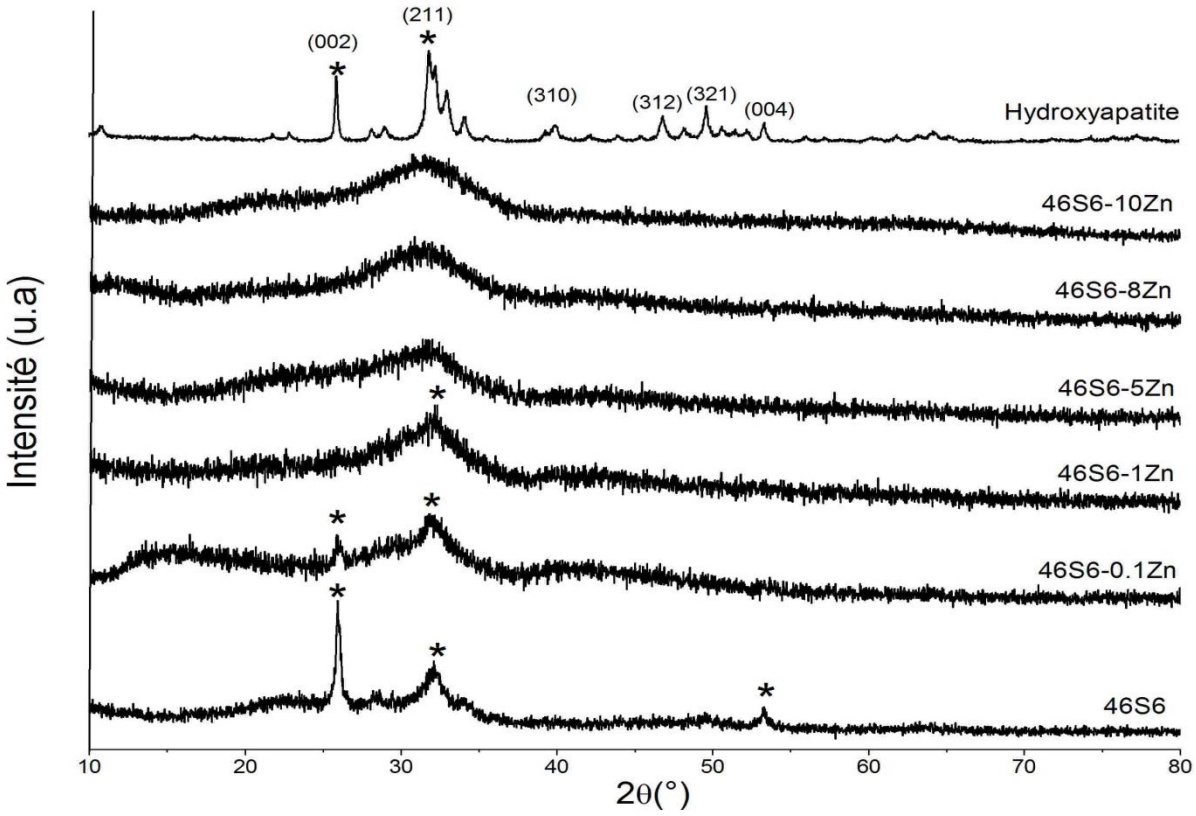


Figure 1 : Diffractogrammes des verres dopés au zinc après 30 jours d'immersion dans le SBF

Le diffractogramme du verre 46S6 dévoile, après 30 jours d'immersion, trois raies caractéristiques de l'hydroxyapatite à 25,9, 32,1 et 53,2 (2θ°) correspondant à l'orientation des cristaux selon les plans d'orientation (002), (211) et (004) respectivement.

L'introduction de 0,1 % en masse de zinc au sein de la matrice vitreuse du verre 46S6 ralentit la formation de l'hydroxyapatite car la raie à 53,2 (2θ°) a complètement disparu. Les raies à 25,9 et 32,1 (2θ°) apparaissent mais présentent une intensité moindre et une largeur de raie plus importante, synonyme d'une hydroxyapatite mal cristallisée.

Pour le verre 46S6-1Zn, un début de raie à 32,1 (2θ°) commence à apparaitre. Pour les verres 46S6-5Zn, 46S6-8Zn et 46S6-10Zn, un halo de diffraction, comme avant immersion, est observé entre 25 et 40 (2θ°). Il se peut, pour ces trois derniers verres qu'une couche de silice amorphe ou d'un phosphate de calcium amorphe se soit formé lors des étapes de bioactivité.

Les spectres infrarouges des verres dopés au zinc après 30 jours d'immersion sont présentés sur la figure 2.

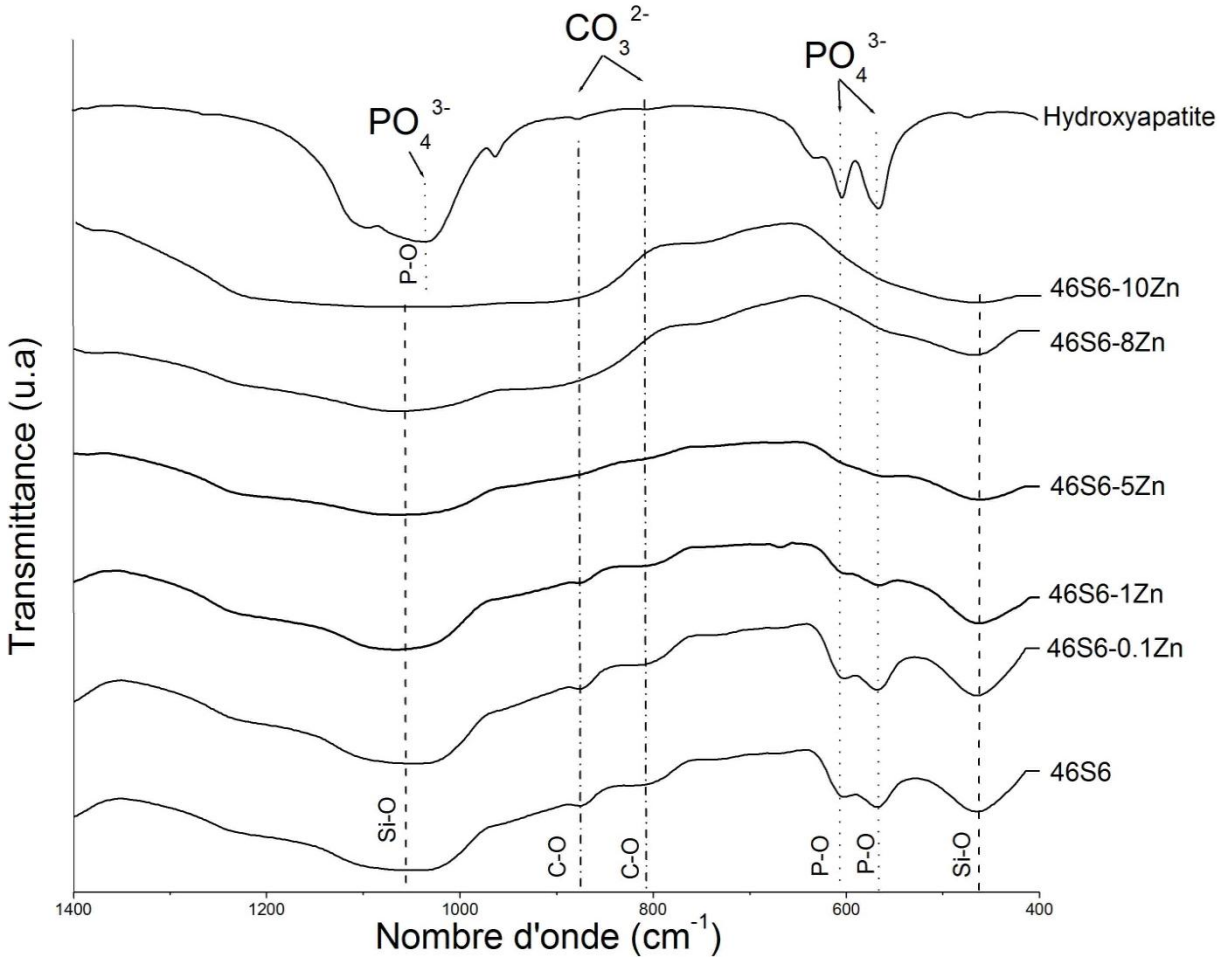


Figure 2 : Spectre infrarouge des verres dopés au zinc après 30 jours d'immersion.

Pour les verres 46S6, 46S6-0,1Zn et 46S6-1Zn, des bandes à 570 et 607 cm^{-1}, caractéristiques des liaisons P-O des groupements phosphate de l'hydroxyapatite, sont observées. Ces bandes sont peu visibles pour 46S6-5Zn et inexistantes pour 46S6-8Zn et 46S6-10Zn. Ces observations sont synonymes d'un ralentissement de la formation de la couche d'hydroxyapatite lorsque la teneur en zinc augmente.

Les bandes caractéristiques des liaisons C-O à 807 et 875 cm^{-1} sont dues soit à la présence d'une hydroxyapatite carbonatée [98], soit au dioxyde de carbone présent dans l'air ambiant ou soit à la présence de trace de carbonate de calcium sous sa forme calcite qui peut se former lors des immersions dans le SBF [99]. L'hypothèse de l'hydroxyapatite carbonatée est la plus probable étant donné que les bandes disparaissent au fur et à mesure que la teneur en zinc augmente.

Les principales bandes caractéristiques des liaisons Si-O de la couche de silice préalablement formée avant l'hydroxyapatite sont observées à 462 et 1055 cm^{-1}. L'intensité de ces bandes ainsi que celles caractéristiques des liaisons C-O diminue lorsque la teneur en zinc augmente.

Bilan des caractérisations structurales :

Le phénomène de bioactivité est visible pour le verre 46S6 avec l'apparition de raies de cristallisation et de bandes caractéristiques de liaisons chimiques de l'hydroxyapatite.

L'introduction du zinc diminue cette cinétique de bioactivité. En effet, la disparition de certaines raies de cristallisation, la diminution des intensités d'autres raies de cristallisation et l'apparition de bandes caractéristiques des liaisons chimiques de l'hydroxyapatite montrent parfaitement ce phénomène de ralentissement.

Les études morphologiques par microscopie électronique à balayage (MEB) et l'analyse des échanges ioniques par ICP-OES ont été entreprises pour mieux comprendre ce phénomène.

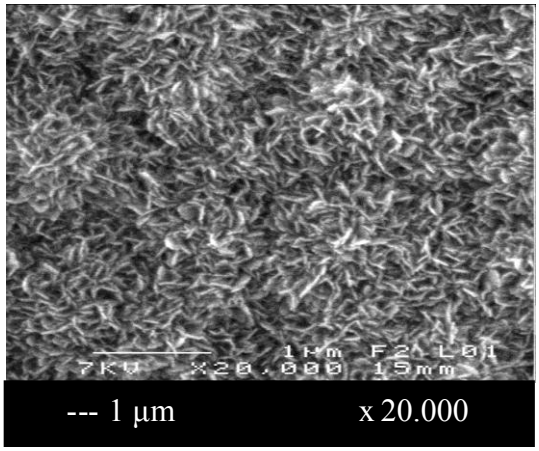
A.2. Morphologie de la surface des verres après immersion.

Les micrographies (grossissement x 20.000) de la surface du verre 46S6 et des verres dopés au zinc après 30 jours d'immersion dans le SBF sont présentées dans la figure 3.

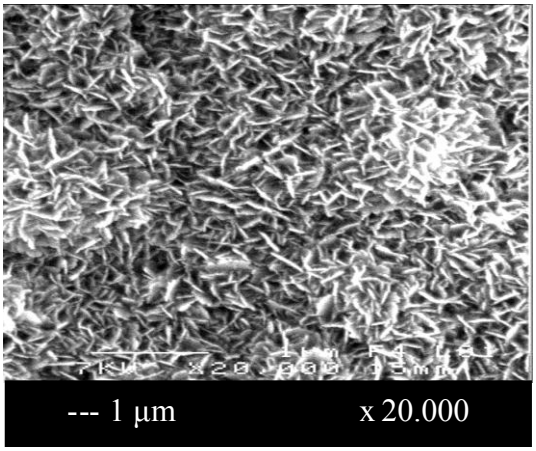
Après ce temps d'immersion, la surface du verre 46S6 et celle du 46S6-0,1Zn sont recouvertes d'une couche d'hydroxyapatite dont l'aspect fait penser à de petites aiguilles entremêlées.

Cette couche est homogène et recouvre la totalité de la surface de ces deux verres. L'introduction du zinc n'affecte pas la morphologie des cristaux formés.
En ce qui concerne les verres 46S6-1Zn et 46S6-5Zn, nous pouvons observer comme un dépôt d'aspect “crémeux” sur leur surface. Cette couche est certainement due à la formation de la couche de silice qui apparait lors d'une des étapes de bioactivité. Sur la surface du verre 46S6-1Zn, de plus grosses particules sphériques sont visibles et laissent penser à une formation : soit de la couche de silice, soit d'un début de cristallisation (hypothèse la plus probable au regard des résultats obtenus par diffraction des rayons X et par spectroscopie infrarouge)
Les verres 46S6-8Zn et 46S6-10Zn présentent une surface d'aspect « bouillonnante ». Des petites particules sphériques semblent collées les unes aux autres faisant penser à la dégradation progressive de la surface des verres. Les zones sombres présentes sur la surface du verre 46S6-8Zn montrent que celui-ci a tendance à se dégrader plus “rapidement” que le verre 46S6-10Zn.

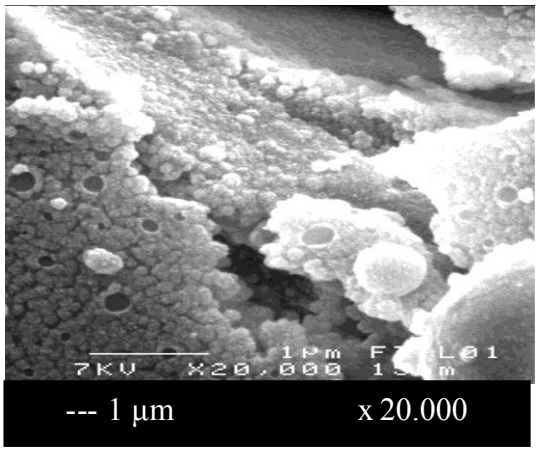
Finalement, les observations faites par MEB confirment les résultats obtenus par diffraction des rayons X et par spectroscopie infrarouge. L'introduction du zinc, lorsque sa teneur augmente, ralentit la réactivité chimique des verres et la formation de l'hydroxyapatite.



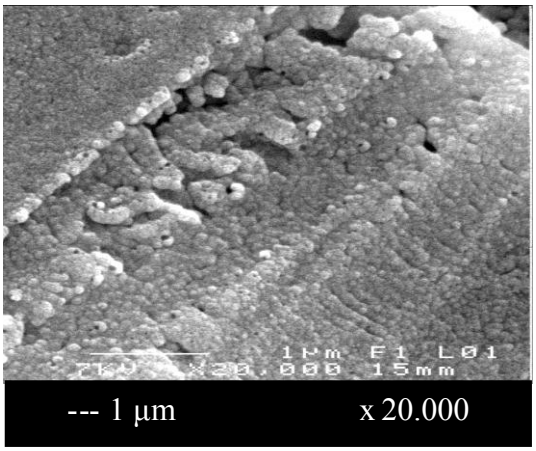
46S6 après 30 jours d'immersion



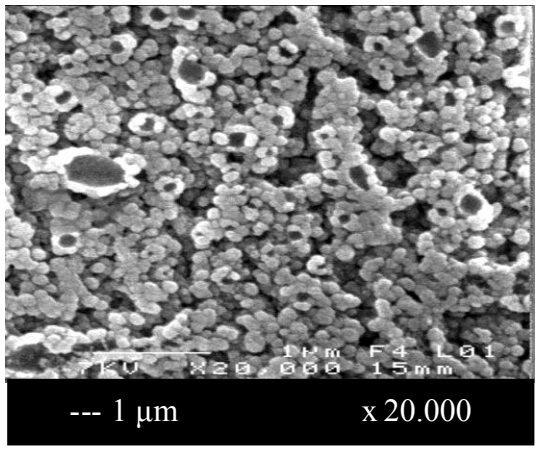
46S6-0,1Zn après 30 jours d'immersion



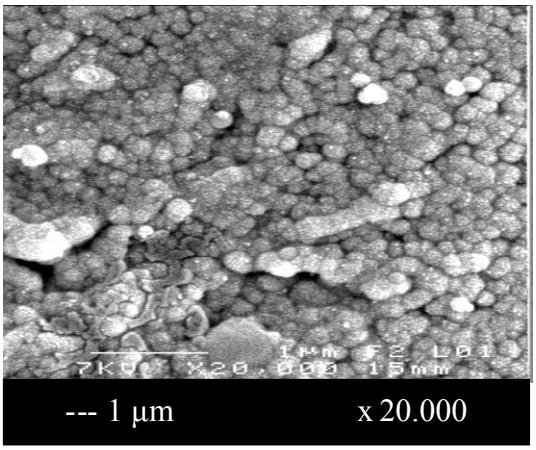
46S6-1Zn après 30 jours d'immersion



46S6-5Zn après 30 jours d'immersion



46S6-8Zn après 30 jours d'immersion



46S6-10Zn après 30 jours d'immersion

Figure 3 : Morphologie de surface du verre 46S6 et des verres dopés au zinc après 30 jours d'immersion dans le SBF (grossissement x 20.000)

A.3. Composition ionique du SBF après immersion des verres dopés au zinc à différent délais.

Pour comprendre ces différentes réactivités chimiques, la solution SBF a été étudiée pour chaque délai d'immersion des matériaux. Les concentrations des éléments dans le SBF : silicium (figure 4), indicateur de la dissolution de la matrice vitreuse; calcium et phosphore (figure 5 et 6), élément nécessaire pour la formation des cristaux d'hydroxyapatite et zinc (figure 7), élément dopant, ont été mesurées par ICP-OES.

Les courbes présentées correspondent aux concentrations des éléments dans le SBF et provenant des verres.

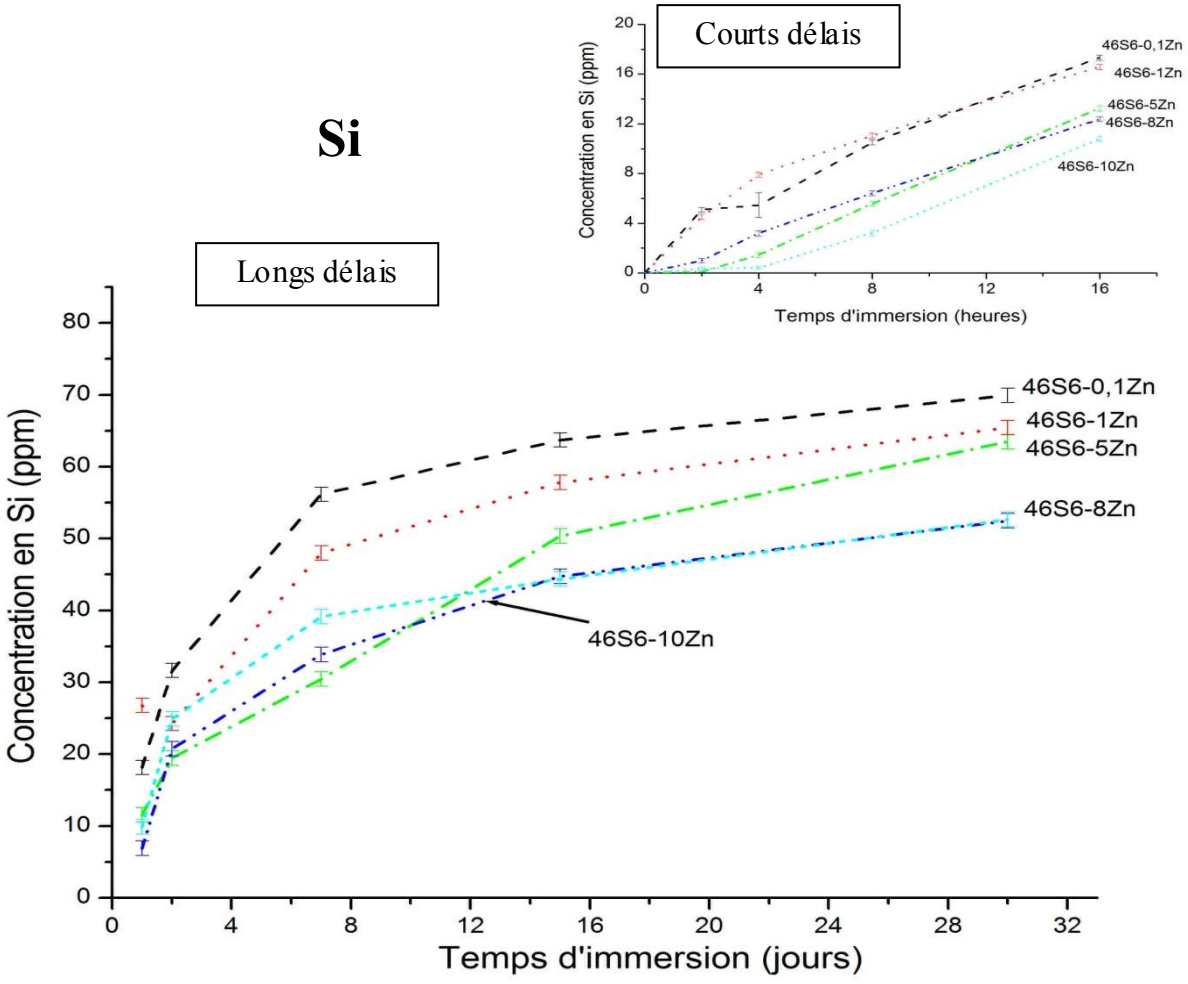


Figure 4: Concentration en silicium dans le SBF après immersion des verres dopés au zinc

Lors des seize premières heures d'immersion, nous constatons que les verres relarguent très rapidement l'élément silicium. Nous voyons que les verres contenant moins de zinc relarguent plus rapidement et en plus grande concentration le silicium. En effet, après 16 heures

d'immersion dans le SBF, le verre 46S6-0,1Zn a relargué 17 ppm de silicium quand le verre 46S6-10Zn a relargué 10 ppm.

La même tendance est observée lors des plus longs délais d'immersion. Les verres présentant une plus faible teneur en zinc voient leur matrice vitreuse se dégrader plus rapidement. Pour tous les verres, la concentration en silicium augmente dans le SBF et tend à se stabiliser lorsque les délais augmentent. Après 30 jours d'immersion, le SBF en contact avec le 46S6-0,1Zn présente une concentration en silicium de 70 ppm tandis que celui en contact avec le 46S6-10Zn contient 51 ppm.

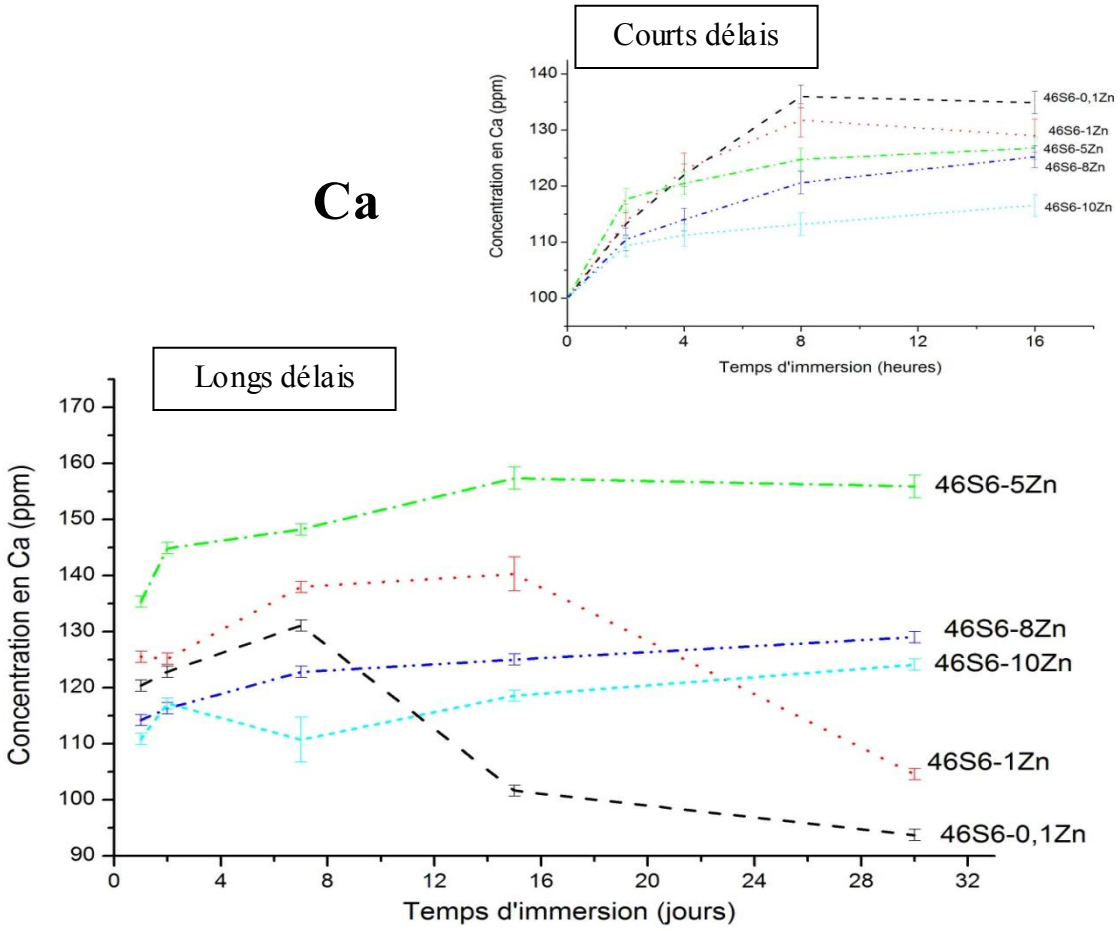


Figure 5 : Concentration en calcium dans le SBF après immersion des verres dopés au zinc

Avant immersion des verres, le SBF présente une concentration en calcium de 100 ppm. Ce sera donc pour nous la valeur référence pour comprendre les échanges en calcium entre les verres et le liquide physiologique synthétique.

Durant les premières heures d'immersion, le calcium est relargué par tous les verres. La cinétique de relargage présente une même allure et les verres contenant moins de zinc relarguent plus de calcium. Ceci va dans le sens d'une meilleure dissolution de la matrice

vitreuse observée par dosage du silicium. La concentration en calcium passe de 100 à 135 ppm après 16 heures d'immersion pour le 46S6-0,1Zn tandis qu'elle passe de 100 à 116 ppm pour le verre 46S6-10Zn.

Pour les longs délais d'immersion allant de 1 jour à 30 jours, des comportements différents sont observés pour chaque verre.

Les verres 46S6-8Zn et 46S6-10Zn continuent de relarguer très lentement le calcium. Les concentrations varient entre 110 et 120 ppm entre 1 jour et 30 jours d'immersion. Ils présentent donc une certaine stabilité en ce qui concerne les échanges en calcium.

Le même comportement est observé pour le 46S6-5Zn qui relargue encore son calcium jusqu'à 30 jours d'immersion mais en concentration plus importante par rapport aux 46S6-8Zn et 46S6-10Zn. En effet, la concentration passe de 135 ppm après 1 jour à 153 ppm après 30 jours d'immersion avec une stabilisation du relargage en calcium se met en place après 15 jours d'immersion.

Pour les verres 46S6-1Zn et 46S6-0,1Zn, les comportements sont différents puisque nous observons une diminution de la concentration en calcium dans le SBF. Pour le verre 46S6-1Zn, le relargage du calcium continue jusqu'à environ 15 jours d'immersion (143 ppm) puis la concentration chute rapidement après 30 jours d'immersion pour atteindre 105 ppm.

Le SBF correspondant à l'immersion du verre 46S6-0,1Zn voit sa concentration augmenter après 7 jours d'immersion (131 ppm) puis jusqu'à 30 jours d'immersion, la concentration diminue pour atteindre 101 ppm à 15 jours puis 98 ppm à 30 jours.

La consommation du calcium par le verre 46S6-0,1Zn est probablement responsable de la formation de la couche d'hydroxyapatite observée par MEB.

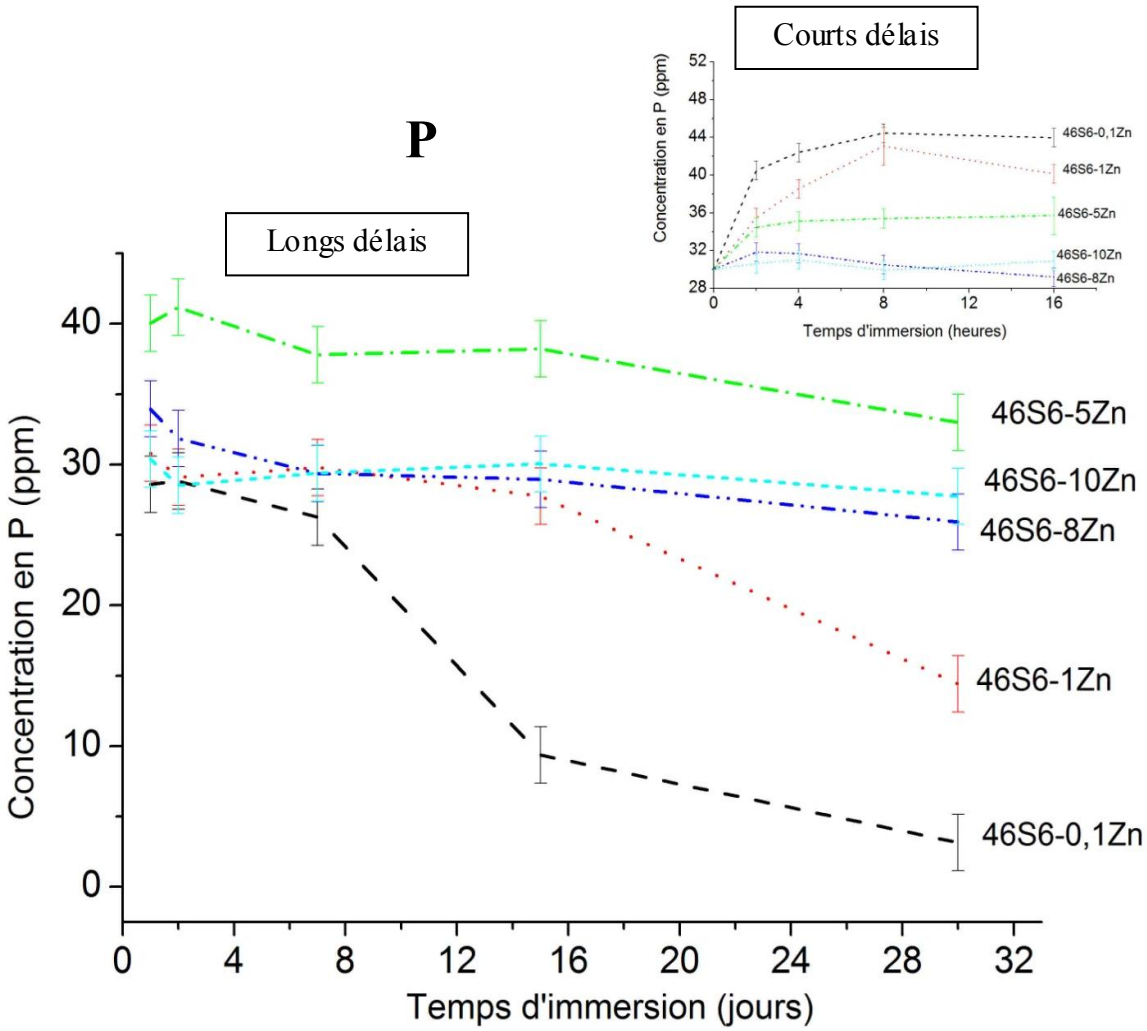


Figure 6 : Concentration en phosphore dans le SBF après immersion des verres dopés au zinc.

Pour le phosphore, des comportements différents sont visibles dès les premières heures d'immersion. En effet, jusqu'à 16 heures d'immersion, les verres 46S6-8Zn et 46S6-10Zn n'ont pas relargué de phosphore dans le SBF. La concentration ne varie pas et est comprise entre 29 et 31 ppm.

Le verre 46S6-5Zn relargue rapidement le phosphore après 2 heures d'immersion. Passé ce délai, le relargage continue très sensiblement jusqu'à 1 jour d'immersion.

Les verres 46S6-1Zn et 46S6-0,1Zn relargue rapidement le phosphore jusqu'à 16 heures d'immersion.

Pour les longs délais, nous retrouvons quasiment le même comportement que lors du dosage du calcium. Le SBF des verres 46S6-8Zn et 46S6-10Zn présentent une concentration constante en phosphore autour de 30 ppm après 30 jours d'immersion. Il n'y a donc ni relargage ni consommation du phosphore pour ces deux verres.

La concentration en phosphore pour le verre 46S6-5Zn diminue entre 1 jour et 30 jours d'immersion passant de 40 ppm à 1 jour à 33 ppm après 30 jours. Il y a donc une légère réabsorption du phosphore par ce verre entre ces deux délais. Les verres 46S6-0,1Zn et 46S6-1Zn présentent quand à eux une diminution de la concentration en phosphore après 1 jour d'immersion. Le relargage a lieu durant les premières heures puis le phosphore est rapidement réabsorbé. Ce phénomène est plus rapide dans le SBF du verre 46S6-0,1Zn dont la concentration en phosphore diminue très rapidement passant de 29 ppm à 4 ppm après 30 jours d'immersion. Cette forte consommation est à mettre en lien avec la consommation du calcium par ce même verre. Ces deux phénomènes sont responsables de la formation de la couche d'hydroxyapatite à la surface du verre. Le verre 46S6-1Zn réabsorbe moins de phosphore, la concentration passant de 31 à 15 ppm après 30 jours d'immersion.

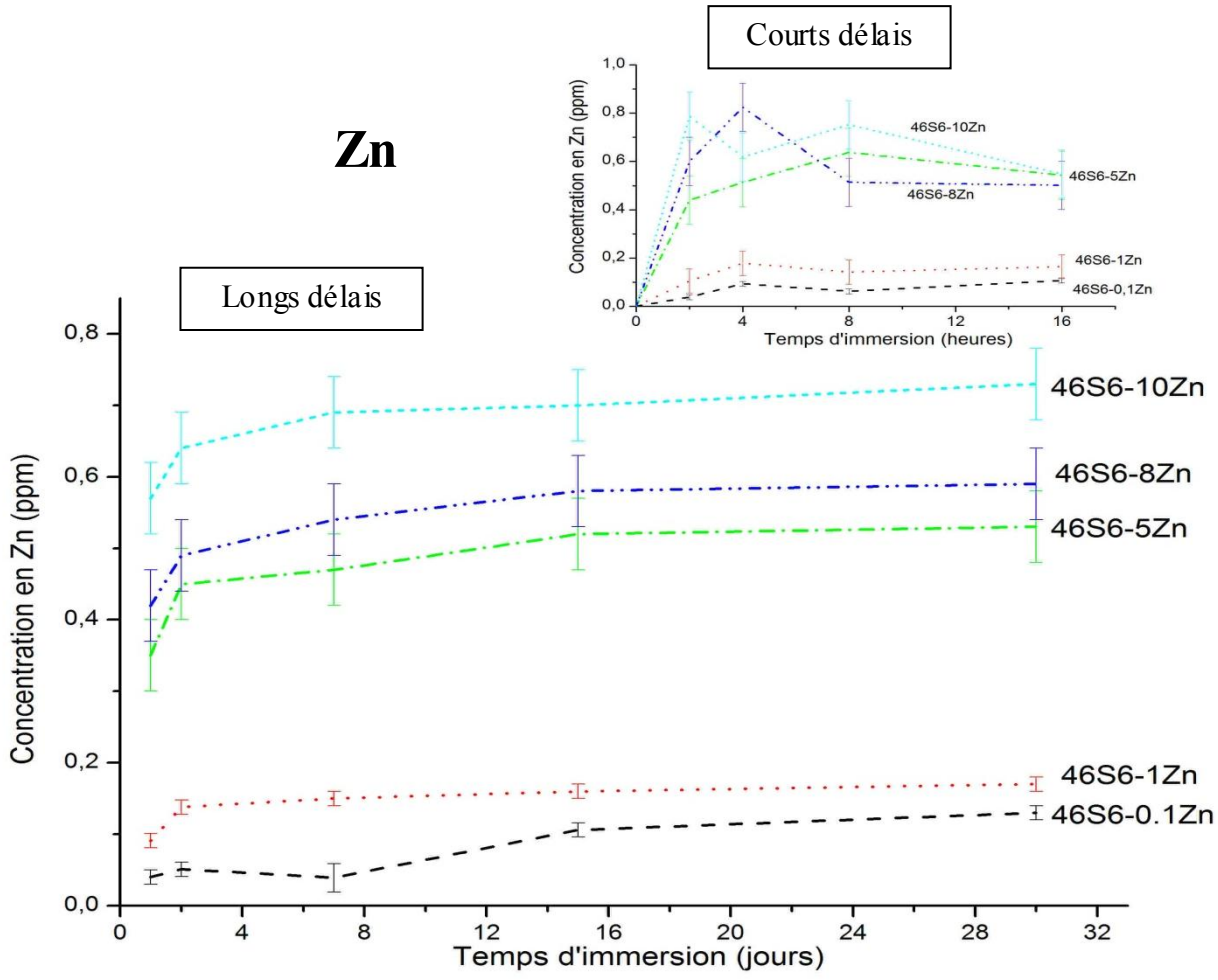


Figure 7 : Concentration en zinc dans le SBF après immersion des verres dopés au zinc

La concentration de l'élément zinc, présentant des propriétés physiologiques intéressantes, a été mesurée pour observer sa cinétique de relargage au cours du temps. Ces informations sont

nécessaires pour contrôler et adapter la cinétique de bioactivité à une éventuelle application médicale.

Lors des premières heures d'immersion, les verres 46S6-0,1Zn et 46S6-1Zn ont relargué jusqu'à 16 heures d'immersion environ 0,14 ppm de zinc. Pour les autres verres, aucune logique ne peut être tirée des valeurs obtenues. Nous pouvons dire qu'il y a une mise en place du relargage de l'élément zinc aux premières heures.

Après 1 jour d'immersion, une logique s'est installée. En effet, les verres possédant plus de zinc relarguent une plus grande concentration qui augmente sensiblement au cours du temps. En effet, les concentrations relarguées après 30 jours sont de 0,72 ppm pour 46S6-10Zn, 0,58 ppm pour 46S6-8Zn, 0,52 ppm pour 46S6-5Zn et les verres 46S6-1Zn et 46S6-0,1 présentent toujours une concentration de 0,15 ppm qui a augmenté sensiblement par rapport aux premières heures.

Plus la teneur en zinc est importante dans la matrice du verre et plus le zinc est présent en grande concentration dans le SBF à une même durée d'immersion. Cependant, malgré la forte dissolution de la matrice vitreuse pour les verres présentant une faible teneur en zinc, les concentrations en zinc restent faibles dans le SBF. Ceci peut s'expliquer par le fait que les verres possédant une forte teneur en zinc, présentent une plus grande concentration de zinc à leur surface et que lors de la faible dissolution de leur matrice dans le SBF, une plus grande concentration en zinc est relarguée.

Bilan des échanges ioniques (Si, Ca, P) entre les verres dopés au zinc et le SBF :

Nous avons pu observer un ralentissement de la dissolution de la matrice des verres accompagné d'une diminution dans la consommation du calcium et du phosphore lorsque la teneur en zinc augmente. Jusqu'à 1% en masse de zinc introduit dans la matrice du verre, une consommation du calcium et du phosphore a pu être détectée. Ces réabsorptions par les verres sont responsables de la formation de la couche d'hydroxyapatite à la surface des verres. L'introduction de zinc dans la matrice amorphe du verre 46S6 contribue donc à diminuer la cinétique de bioactivité du verre.

La diffraction des rayons X, la spectroscopie infrarouge et le MEB confirment ce phénomène de ralentissement.

Dans la littérature, des études ont démontré que le zinc, outre ces propriétés biologiques intéressantes, est connu pour augmenter la durabilité chimique des verres et leurs propriétés mécaniques [100-101]. De ce fait, la dissolution et les réactions ayant lieu dans le SBF sont ralenties et la formation d'hydroxyapatite également [101]. La présence de zinc induit une diminution dans la formation d'hydroxyapatite [102-104].
La réactivité chimique dépend de la composition et des liaisons formées dans la matrice vitreuse par introduction de zinc. Comme vu dans la partie I, l'ajout de ZnO modifie la densité électronique et les liaisons chimiques au sein des verres. La fraction d'oxygènes non-pontants diminue avec l'augmentation de la teneur en ZnO, ce qui a pour conséquence de rendre le réseau vitreux plus rigide [100,105-106]. L'utilisation d'une résine pour la chirurgie dentaire, contenant 10% en masse d'oxyde de zinc, a prouvé que la présence du zinc améliore la qualité et la longévité de la résine, favorise et stimule la minéralisation des tissus durs et de la dentine [105-111]. Nos résultats sont donc en accord avec ceux trouvés dans la littérature.

B. Comportement *in vitro* des verres dopés au titane

L'étude *in vitro* de verres dopés avec 0,1 ; 1 ; 5 et 10 % en masse de titane est présentée. Elle s'inscrit dans une suite logique après l'étude des verres dopés au zinc car ces deux éléments interviennent dans la synthèse de la vitrocéramique poreuse.

B.1. Caractérisations structurales des verres dopés au titane après immersion dans le SBF

La figure 8 présente les diffractogrammes des verres 46S6 et ceux dopés au titane après 30 jours d'immersion dans le SBF.
Les verres 46S6-0,1Ti et 46S6-1Ti présentent, après 30 jours d'immersion, 2 raies caractéristiques de l'hydroxyapatite à 25,9 et 32,1 (2θ°). La diminution des intensités des raies de diffraction par rapport à celles du verre 46S6 montre que la formation et la cristallisation de l'hydroxyapatite sont ralenties au fur et à mesure que la teneur en titane augmente dans la matrice vitreuse.
Pour les verres contenant 5 et 10% en masse de titane, un halo de diffraction apparait entre 25 et 40 (2θ°) comme avant immersion.

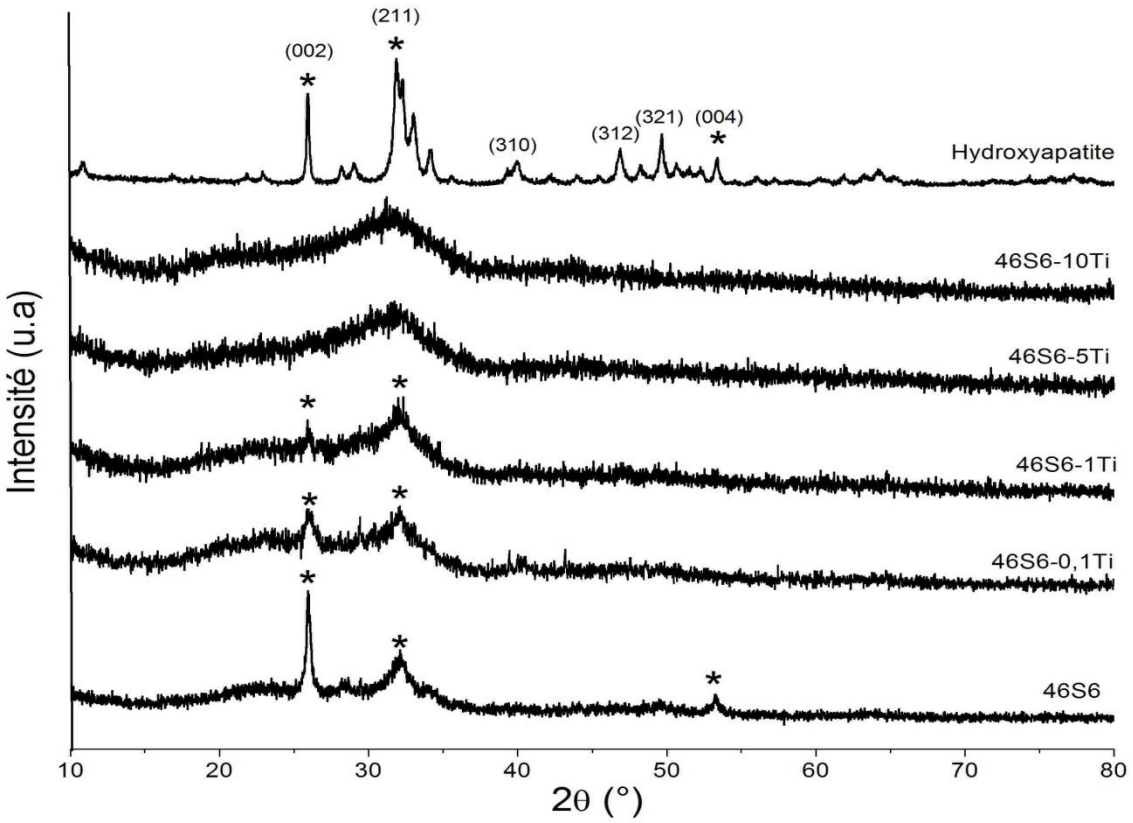


Figure 8 : Diffractogrammes des verres dopés au titane après 30 jours d'immersion dans le SBF

La figure 9 présente les spectres infrarouges des verres après 30 jours d'immersion dans le SBF.

Une bande caractéristique d'une liaison Si-O est présente à 462 cm^{-1}. Comme pour les verres dopés au zinc, des bandes caractéristiques des liaisons C-O sont observées à 805 et 873 cm^{-1}. L'hypothèse qu'il s'agisse de la formation d'une hydroxyapatite carbonatée est aussi retenue ici car ces bandes disparaissent lorsque la teneur en titane dépasse 1% en masse.

L'observation majeure est la formation de bandes à 563 et 605 cm^{-1} caractéristiques des liaisons P-O de l'hydroxyapatite. Ces bandes sont observées pour les verres 46S6, 46S6-0,1Ti, 46S6-1Ti et un début de formation pour le verre 46S6-5Ti. La non-présence de raies de diffraction, sur le diffractogramme du verre 46S6-5Ti, signifie donc qu'un phosphate de calcium amorphe commence à se former seulement après 30 jours d'immersion. Pour le verre 46S6-10Ti, une seule bande à 576 cm^{-1} est observée et est caractéristique d'une liaison P-O du réseau vitreux.

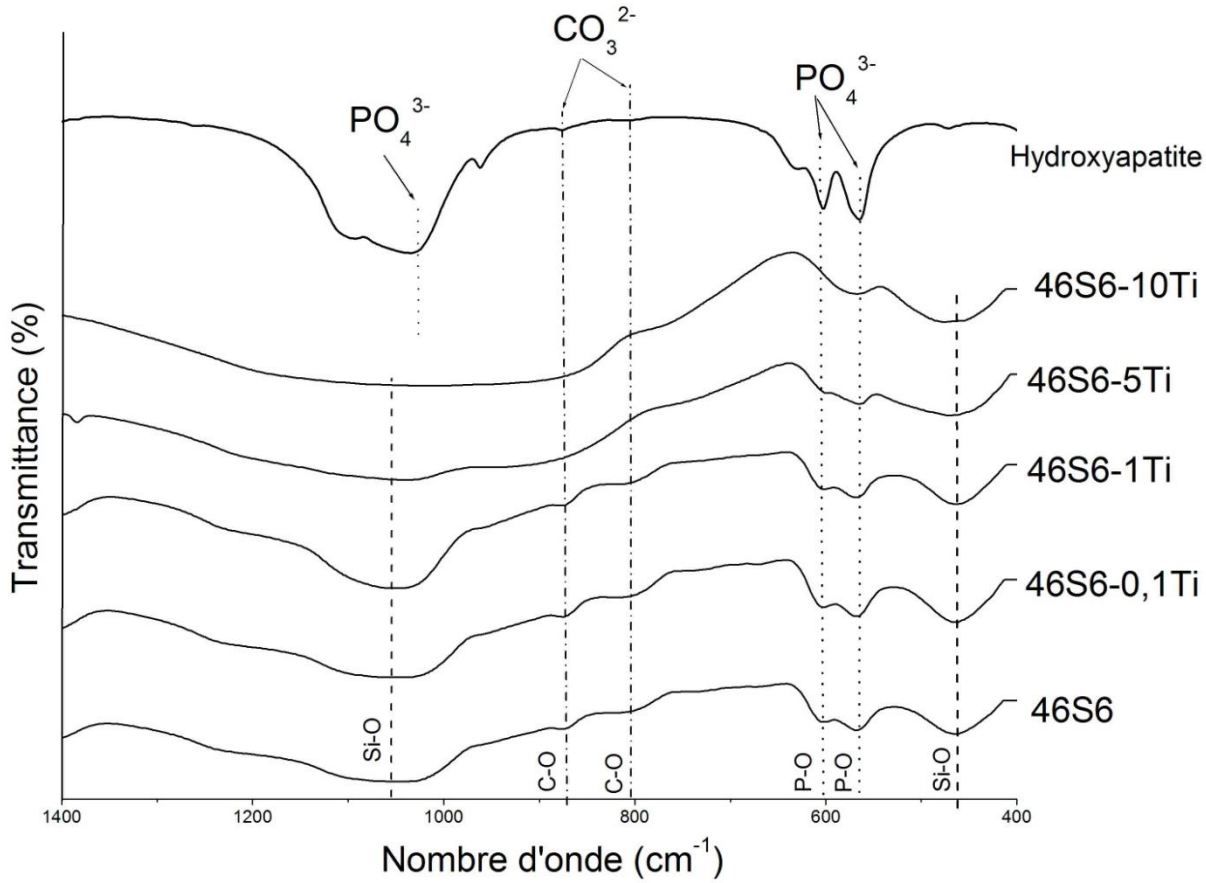


Figure 9 : Spectres infrarouge des verres dopés au titane après 30 jours d'immersion.

Bilan des caractérisations structurales :

L'introduction du titane ralentit à la fois la formation de la couche de silice amorphe (élargissement des bandes caractéristiques des liaisons Si-O) et la couche d'hydroxyapatite à la surface des verres (disparition progressive des bandes caractéristiques des liaisons C-O et P-O).

L'observation de la morphologie des surfaces des verres par MEB a été entreprise pour observer la formation d'hydroxyapatite.

B.2. Morphologie de la surface des verres après immersion

Les surfaces des verres dopés au titane, après 30 jours d'immersion dans le SBF, sont présentées dans la figure 10.

Le verre 46S6, tout comme le verre 46S6-0,1Ti, sont recouverts de façon homogène par une couche d'hydroxyapatite. Cette dernière, formée à la surface du verre 46S6-0,1Ti, est moins dense que le verre 46S6.

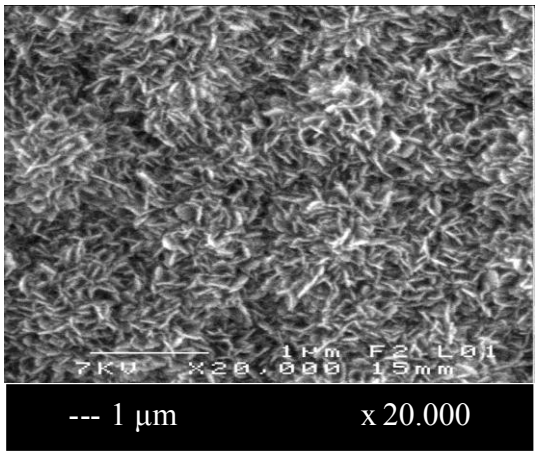
La surface du verre 46S6-1Ti présente un aspect gélifié qui correspond à la couche de silice.

Le verre 46S6-5Ti s'est dégradé. En effet, des fissures profondes se sont formées par un phénomène de rétractation dû au séchage de l'échantillon. Sa surface se rapproche de celle du verre 46S6-1Ti.

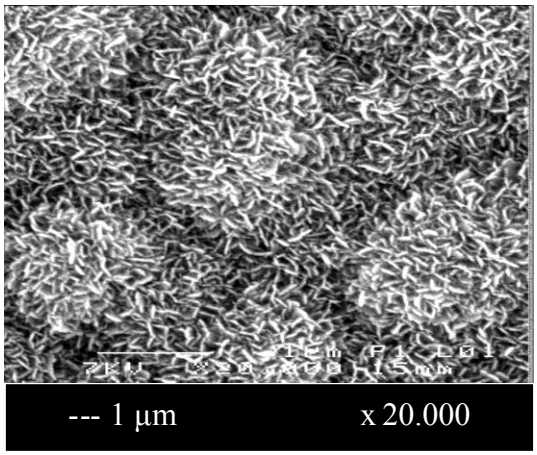
La surface du verre 46S6-10Ti est parsemée de « petites bulles » inférieure au micromètre et caractéristiques d'un début de dégradation de la matrice vitreuse.

Contrairement aux verres dopés avec 1, 5 et 10% en masse de zinc, les verres dopés au titane aux mêmes teneurs ne présentent pas de "bouillonnement" de surface.

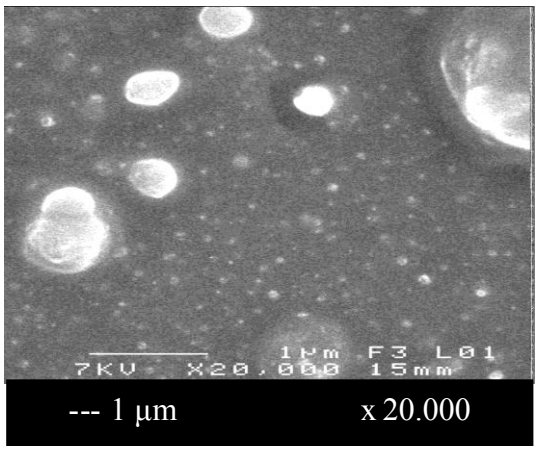
Le titane, lorsqu'il est introduit dans la matrice vitreuse d'un verre, a tendance à améliorer ses caractéristiques mécaniques et réduire la dégradation [112]. Cela explique la faible réactivité chimique des verres dopés avec 1, 5 et 10% en masse de titane.



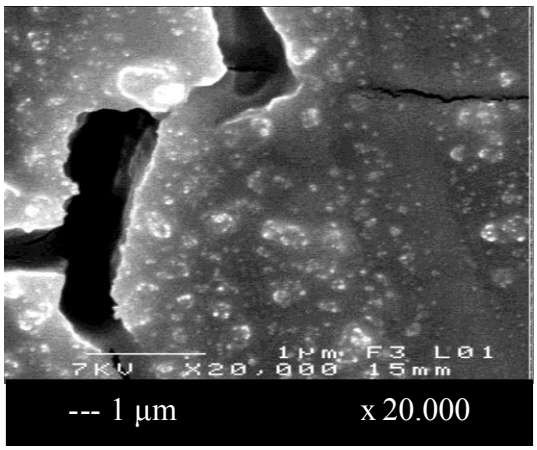
46S6 après 30 jours d'immersion



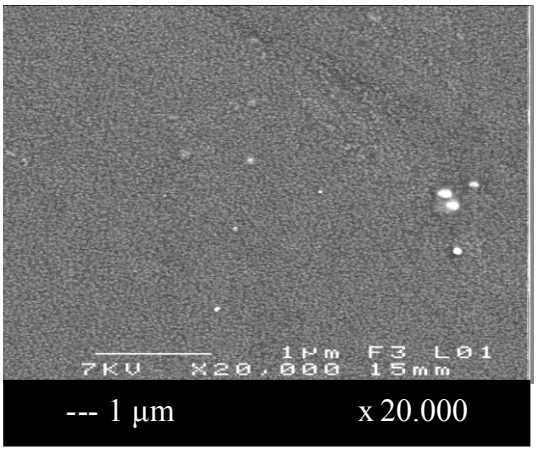
46S6-0,1Ti après 30 jours d'immersion



46S6-1Ti après 30 jours d'immersion



46S6-5Ti après 30 jours d'immersion



46S6-10Ti après 30 jours d'immersion

Figure 10 : Morphologie de surface du verre 46S6 et des verres dopés au titane après 30 jours d'immersion dans le SBF (grossissement x 20.000)

B.3. Composition ionique du SBF après immersion des verres dopés au titane à différents délais

Les concentrations des éléments présents dans le SBF : silicium (figure 11), calcium (figure 12), phosphore (figure 13) et titane (figure 14), ont été mesurées.

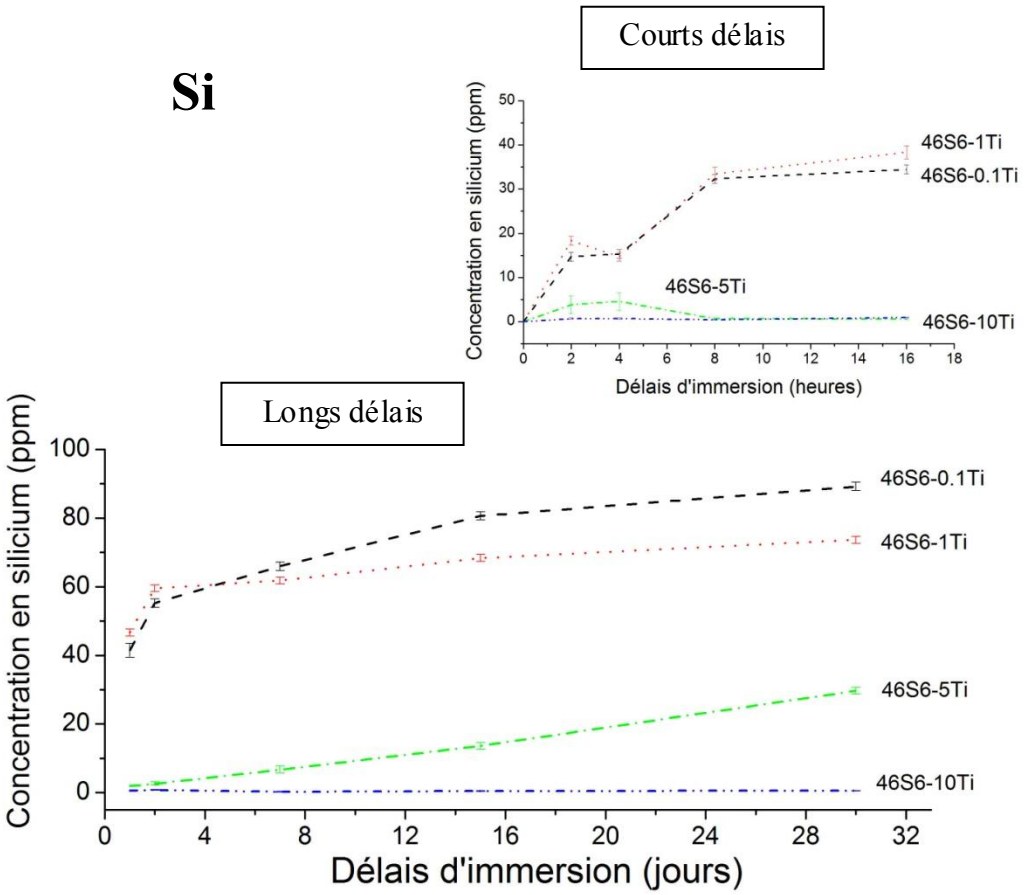


Figure 11 : Concentration en silicium dans le SBF après immersion des verres dopés au titane

Durant les premières heures d'immersion dans le SBF, les verres 46S6-0,1Ti et 46S6-1Ti relargue le silicium dont la concentration passe de 0 ppm avant leur immersion (le SBF ne contient pas de silicium) à 37 ppm après 16 heures d'immersion. La concentration en silicium dans le SBF pour ces deux verres augmente de manière continue jusqu'à 30 jours d'immersion allant de 40 ppm après 1 jour d'immersion à 90 ppm pour le verre 46S6-0,1Ti et 73 ppm pour le verre 46S6-1Ti.

Pour les verres 46S6-5Ti et 46S6-10Ti, le comportement est différent. En effet, jusqu'à 16 heures d'immersion, la concentration en silicium est quasi nulle (environ 0,7 ppm) pour ces deux verres et jusqu'à 30 jours d'immersion alors que celle en silicium pour le verre 46S6-

10Ti reste constante et proche de 0 ppm. En revanche, pour le verre 46S6-5Ti, la concentration du silicium commence à augmenter après 1 jour d'immersion passant de 2,5 ppm à 30 ppm après 30 jours d'immersion.

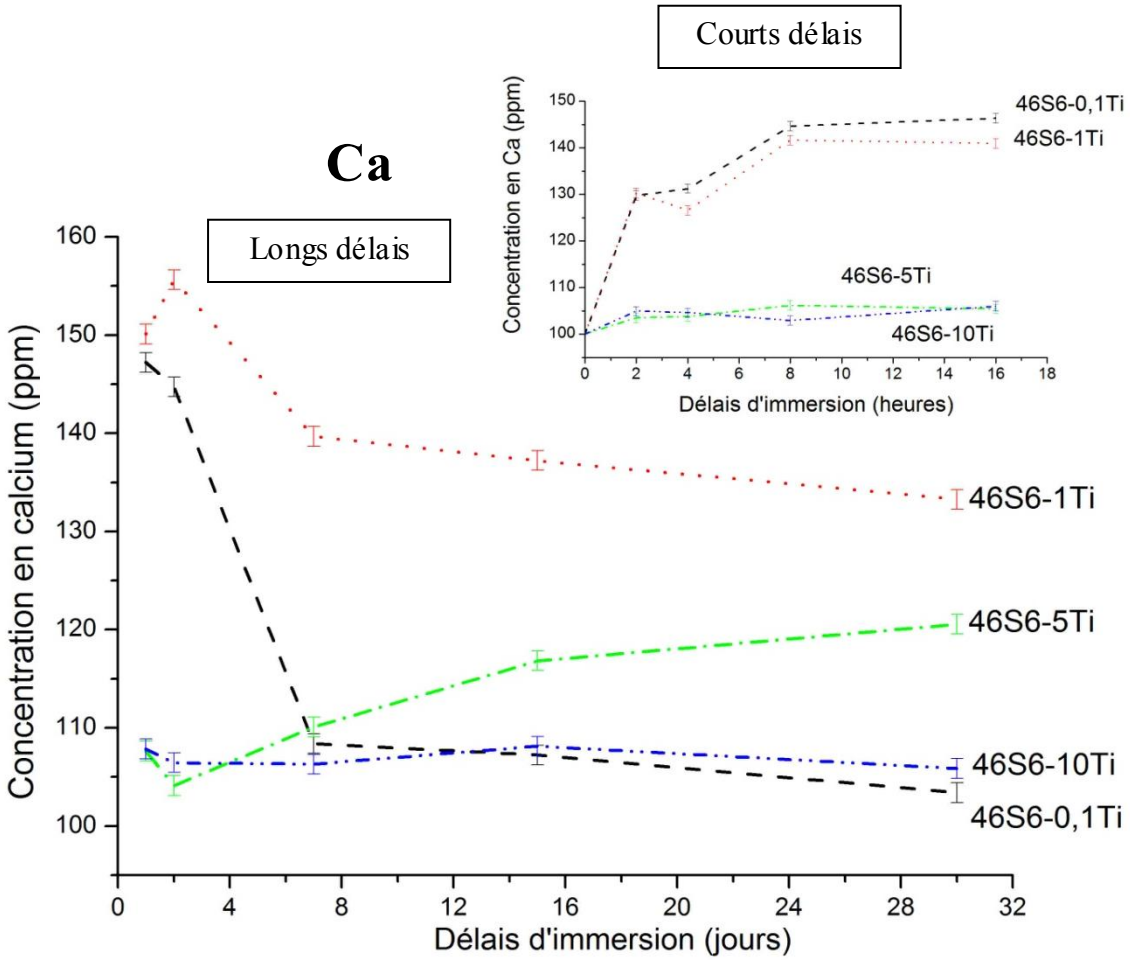


Figure 12 : Concentration en calcium dans le SBF après immersion des verres dopés au titane

Durant les premières heures d'immersion des verres, nous observons la même cinétique de relargage pour les verres 46S6-0,1Ti et 46S6-1Ti. Pour ces verres, la concentration en calcium dans le SBF passe de 100 ppm à 144 ppm après 16 heures d'immersion. Les verres 46S6-5Ti et 46S6-10Ti présentent également une même cinétique de relargage mais qui reste proche de 100 ppm, la concentration passant de 100 ppm à 105 ppm après 16 heures d'immersion.
Après 1 jour d'immersion, des comportements différents pour chaque verre apparaissent.
Pour le verre 46S6-10Ti, entre 1 jour et 30 jours d'immersion, la concentration varie entre 105 et 108 ppm. Il n'y a quasiment aucun échange de calcium entre le SBF et ce verre. Ceci est dû à la non-dissolution de la matrice vitreuse du verre 46S6-10Ti analysé précédemment.

Pour le verre 46S6-5Ti, la concentration en calcium augmente après 1 jour d'immersion passant de 107 ppm à 120 ppm.

Le SBF, après immersion du verre 46S6-0,1Ti, voit sa concentration diminuée au fur et à mesure que les délais d'immersion augmentent. La concentration passe de 147 ppm après 1 jour à 108 ppm après 15 jours d'immersion. Puis une zone de stabilisation apparait entre 15 et 30 jours car la concentration diminue très faiblement passant de 108 ppm à 105 ppm. Le verre 46S6-0,1Ti libère son calcium jusqu'à 16 heures d'immersion puis en consomme jusqu'à 30 jours d'immersion.

Pour le verre 46S6-1Ti, le même phénomène est observé. En effet, la concentration en calcium dans le SBF tend à diminuer à partir de 2 jours d'immersion. La concentration passe de 155 ppm après 2 jours à 140 ppm après 15 jours. Une zone de stabilisation est également présente entre 15 et 30 jours du fait de la consommation plus lente du calcium.

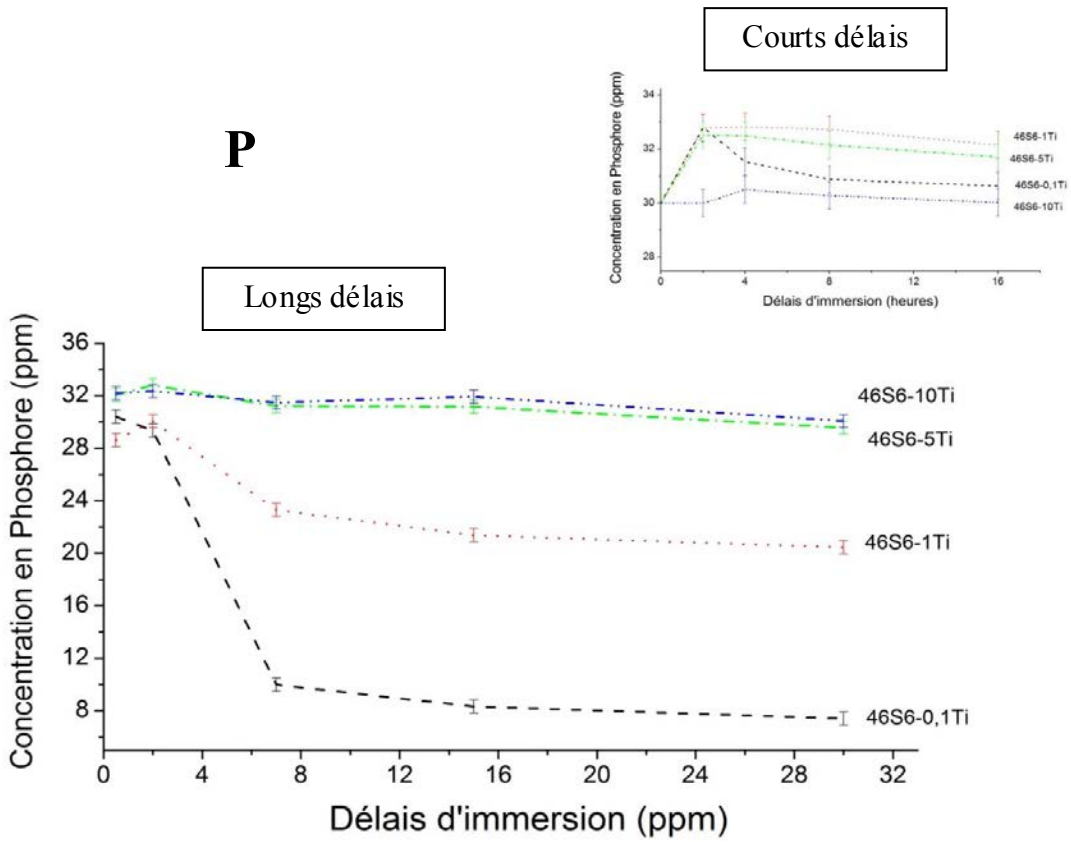


Figure 13 : Concentration en phosphore dans le SBF après immersion des verres dopés au titane

Durant les deux premières heures d'immersion, les verres 46S6-0,1Ti, 46S6-1Ti et 46S6-5Ti relarguent du phosphore, la concentration passe de 30 à 33 ppm. Ensuite, le verre 46S6-0,1Ti, jusqu'à 16 heures d'immersion, consomme le phosphore plus rapidement que les 2 autres

verres, la concentration passant de 33 à 31 ppm pour le 46S6-0,1Ti ; de 33 à 32 ppm pour le 46S6-1Ti et de 33 à 32 pour le 46S6-5Ti. Pour le verre 46S6-10Ti, le phosphore est peu relargué.

Entre 1 jour et 30 jours d'immersion, la concentration en phosphore pour les verres 46S6-5Ti et 46S6-10Ti reste constante au alentour de 32 ppm, ce qui signifie que le verre 46S6-10Ti a commencé à relarguer faiblement le phosphore à partir d'un jour d'immersion.

Pour le SBF des verres 46S6-0,1Ti et 46S6-1Ti, une même cinétique que celle du calcium est observée. En effet, la concentration en phosphore diminue à partir d'un jour pour le 46S6-0,1Ti passant de 30 à 7 ppm et à partir de 2 jours pour le 46S6-1Ti passant de 30 à 20 ppm. Une zone de stabilisation est observée à partir de 15 jours jusqu'à 30 jours.

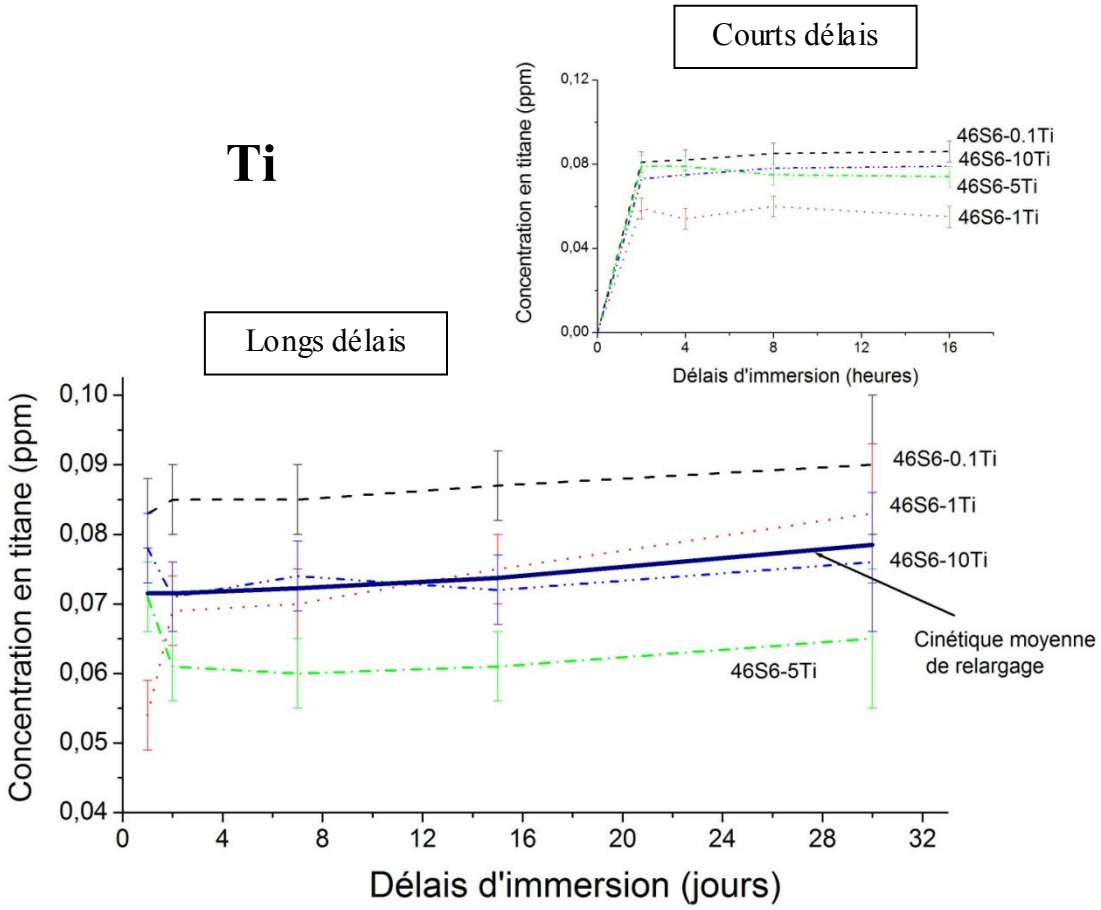


Figure 14 : Concentration en titane dans le SBF après immersion des verres dopés au titane

Le relargage du titane, quel que soit le verre dopé en titane, ne présente pas de régularité comme pour le silicium, le calcium et le phosphore. En effet, même si la matrice du verre 46S6-10Ti ne se dissout que très faiblement dans le SBF comme vu précédemment, durant les premières heures, ce verre relargue plus de titane que le verre 46S6-5Ti ou 46S6-1Ti. Cette

faible dissolution peut suffire à libérer le titane présent en grande concentration à la surface du verre. Cependant, tenant compte des barres d'erreur, les relargages du titane des verres restent très proches. En effet, les concentrations de cet élément entre 2 heures et 16 heures d'immersion restent constante entre 0,06 et 0,08 ppm (à ± 0,01 ppm). Nous pouvons dire que durant les deux premières heures, il y a une mise en place de la libération du titane présent en surface puis une stabilisation jusqu'à 16 heures.

Après 1 jour d'immersion, la même tendance est observée. Les concentrations en titane dans le SBF sont comprises entre 0,06 et 0,09 ppm. Une faible augmentation de la concentration est néanmoins observée pour les verres 46S6-0,1Ti et 46S6-1Ti due à la meilleure dissolution de leur matrice vitreuse. Les valeurs des concentrations en titane pour les verres 46S6-5Ti et 46S6-10Ti ne varient pas avec l'augmentation du temps d'immersion.

Les valeurs de concentrations restant proches, une droite, représentant la concentration moyenne relarguée, a été tracée pour estimer la tendance des verres à relarguer le titane. Pour notre gamme de titane comprise entre 0,1 % et 10 % en masse dans la matrice vitreuse, nous pouvons estimer que les concentrations de titane relarguées se situent sur cette droite moyenne à ± 0,01 ppm.

Conclusion sur les échanges ioniques entre les verres dopés au titane et le SBF :

Une teneur supérieure à 1% en masse de titane au sein de la matrice vitreuse du 46S6 ralentit la dissolution de celle-ci. Le calcium et le phosphore sont moins libérés dans le SBF et la consommation de ces éléments est soit ralentie soit inexistante. Au contraire, l'introduction jusqu'à 1% en masse de titane permet une dissolution plus rapide (par comparaison aux fortes teneurs) de la matrice vitreuse et d'avoir ce phénomène de libération/consommation expliquant la croissance cristalline de l'hydroxyapatite à la surface du verre 46S6-0,1Ti et un début de formation pour le verre 46S6-1Ti.

Dans la littérature, l'étude du titane dans les biomatériaux est surtout présente dans l'étude des métaux et des alliages métalliques. Cependant, les études trouvées sur le dopage au titane des verres de phosphate ont montré des résultats similaires. En effet, pour les verres de phosphate, dont la solubilité est due à la présence des liaisons P-O-P, la durabilité chimique et les propriétés mécaniques peuvent être améliorées par ajout d'oxyde de titane [113-116]. Il a été prouvé dans de nombreuses études que l'augmentation de la stabilité chimique des verres était due à l'introduction de TiO_2 dans la matrice vitreuse provoquant un changement dans la

structure chimique [112,117-121]. La densification de la structure du verre permet alors de ralentir le relargage des ions titane [122-124]. Abou Neel et al ont également observé cet effet [118-119] confirmant ainsi les résultats obtenus par dosage par spectrométrie optique.
Les verres dopés au titane pourraient alors être adaptés, du fait de leur cinétique de bioactivité variable, au site d'implantation, au sexe et à l'âge du patient.

C. Comportement *in vitro* des verres dopés au cuivre, à l'argent et en cuivre/zinc

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'étude du verre 46S6 dopés au cuivre, à l'argent et selon un mélange cuivre/zinc. Ces verres ont été synthétisés pour étudier leurs propriétés biologiques.

C'est dans l'optique d'améliorer les propriétés biologiques de nos verres que nous avons synthétisé les verres 46S6-0,1Cu, 46S6-0,2Ag et 46S6-0,1Cu+0,1Zn que nous nommerons 46S6-0,1CuZn. Les compositions chimiques de ces verres sont données page 94.

Ces teneurs ont été choisie car elles sont proches des teneurs en cuivre, en argent et en zinc présentes dans le tissu osseux et ne présentent pas de toxicité pour l'organisme humain.

C.1. Caractérisations structurales des verres après immersion dans le SBF

Les diffractogrammes des verres 46S6-0,1Cu, 46S6-0,2Ag, 46S6-0,1Zn et 46S6-0,1CuZn après 30 jours d'immersion dans le SBF sont présentés dans la figure 15.

.

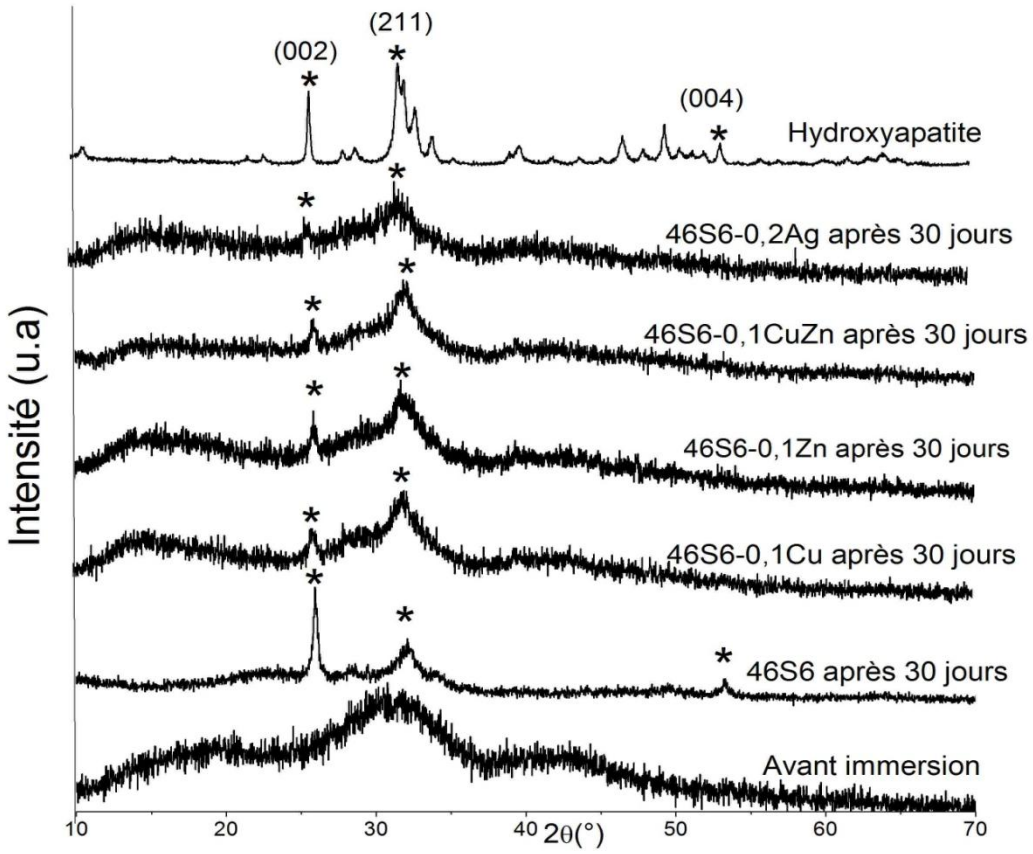


Figure 15 : Diffractogrammes des verres après 30 jours d'immersion dans le SBF

L'ensemble des verres présente 2 raies caractéristiques de l'hydroxyapatite à 25,9 et 32,1° (2θ) correspondant aux réflexions des plans (002) et (211) respectivement. Une troisième raie à 53,3° (2θ), correspondant à la réflexion du plan (004), n'apparait pas sur les diffractogrammes des verres dopés contrairement au verre 46S6. Les raies à 25,9 et 32,1° (2θ) sont plus larges et moins intenses que ceux obtenus pour le verre de référence. Ces observations sont caractéristiques d'une hydroxyapatite mal cristallisée à la surface des verres dopés. Le verre dopé à l'argent laisse apparaitre de faibles raies de diffraction aux mêmes angles.

La figure 16 regroupe les spectres infrarouges des verres 46S6-0,1Cu, 46S6-0,1Zn, 46S6-0,2Ag et 46S6-0,1CuZn après 30 jours d'immersion dans le SBF.

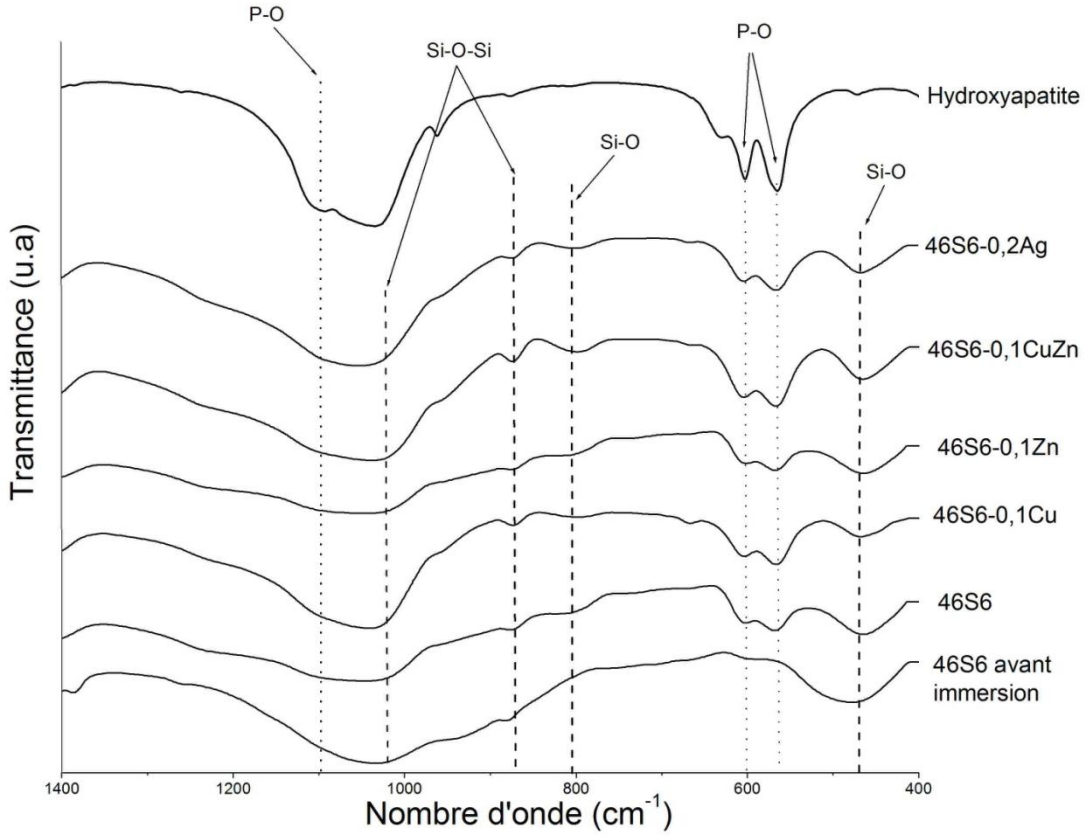
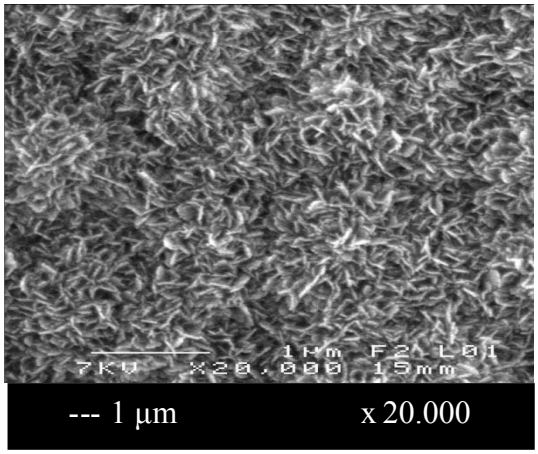


Figure 16 : Spectres infrarouges des verres 46S6-0,1Cu, 46S6-0,1Zn, 46S6-0,2Ag et 46S6-0,1CuZn après 30 jours d'immersion dans le SBF

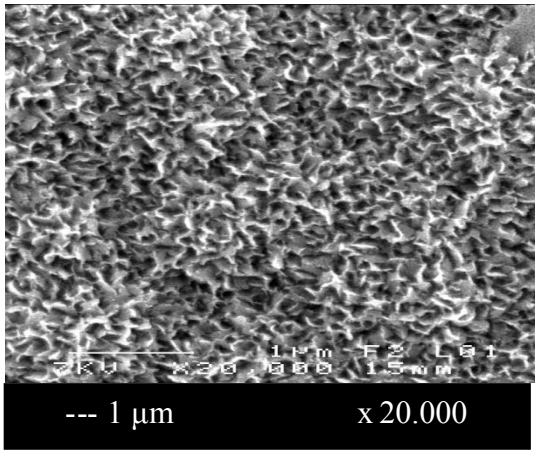
Ces spectres révèlent plusieurs modifications au sein du réseau vitreux des verres. En effet, 2 bandes apparaissent à 565 et 604 cm^{-1}. Elles sont caractéristiques de liaisons P-O des groupements phosphates de l'hydroxyapatite. L'intensité de ces bandes, pour le verre 46S6-0,1CuZn, se révèlent plus intenses que pour les autres verres, synonyme d'une meilleure cristallisation. Pour le verre 46S6-0,2Ag, l'infrarouge révèle les mêmes bandes, moins intenses, sont synonymes de la présence d'un phosphate de calcium en cours de cristallisation. Ce qui est confirmé par la présence de raies naissantes par diffraction des rayons X.

C.2. Morphologie de la surface des verres après immersion

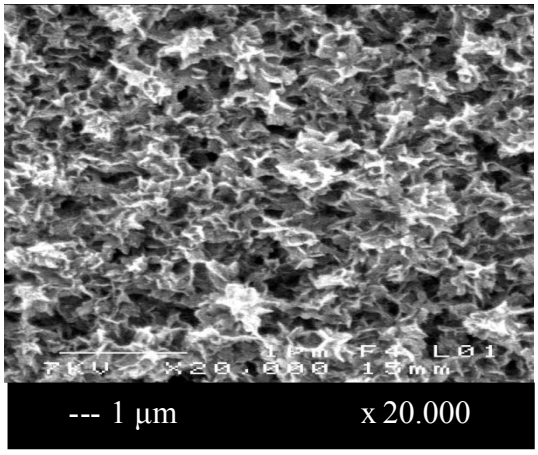
Les micrographies des verres, après 30 jours d'immersion dans le SBF, sont présentées en figure 17.



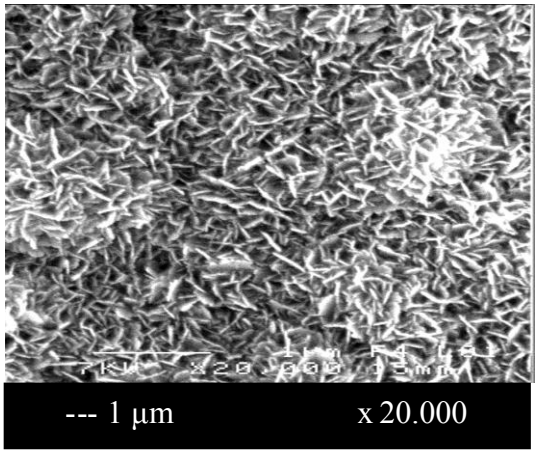
Verre 46S6 après 30 jours d'immersion



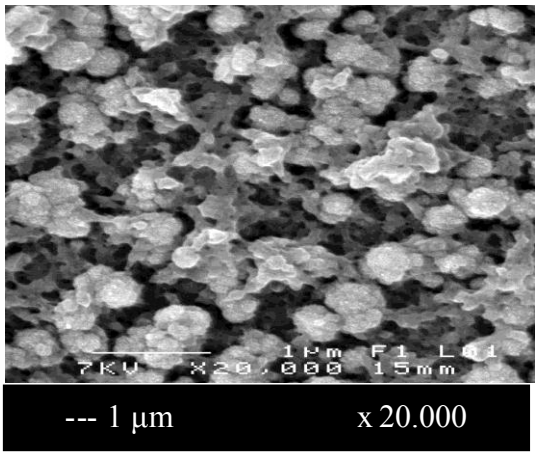
Verre 46S6-0,1CuZn après 30 jours d'immersion



Verre 46S6-0,1Cu après 30 jours d'immersion



Verre 46S6-0,1Zn après 30 jours d'immersion



Verre 46S6-0,2Ag après 30 jours d'immersion

Figure 17 : Micrographies des verres 46S6-0,1Cu, 46S6-0,1Zn, 46S6-0,2Ag et 46S6-0,1CuZn après 30 jours d'immersion.

Les micrographies révèlent la présence d'hydroxyapatite sur la surface de tous les verres. Cependant, la morphologie, la taille et le relief sont différents selon l'élément dopant introduit dans le réseau amorphe. En effet, pour les verres 46S6 et 46S6-0,1Zn, la couche d'hydroxyapatite est homogène, bien cristallisée et présente des formes d'aiguilles entremêlées. Pour les verres 46S6-0,1Cu et 46S6-0,1CuZn, nous retrouvons quasiment la même morphologie et un relief similaire. Leurs surfaces ont un aspect rugueux ; plus prononcé pour le verre 46S6-0,1Cu dont les cristaux présentent un aspect bourgeonneux. Le verre 46S6-0,1CuZn présente des cristaux en forme de feuillets qui poussent formant un aspect « floral ».

Pour le verre 46S6-0,2Ag, nous retrouvons l'aspect rugueux du verre 46S6-0,1Cu mais la surface est beaucoup moins cristallisée. Le bouillonnement et les bulles formés à la surface sont le signe d'un début de cristallisation.

Ces observations par MEB nous confirment les résultats obtenus par diffraction des rayons X et ceux obtenus par spectroscopie infrarouge. En effet, nous retrouvons une couche d'hydroxyapatite pour tous les verres hormis pour celui dopés avec 0,2% d'argent dont la bioactivité et la formation de l'hydroxyapatite sont ralenties.

Ainsi, selon l'élément dopant introduit dans le verre, la cinétique de bioactivité mais aussi la morphologie, le relief et la taille des cristaux d'hydroxyapatite sont différents. Cela est probablement du aux caractéristiques chimiques des éléments. L'électronégativité responsable de la formation des liaisons chimiques et de leur énergie peuvent être impliqués dans le relargage de ces éléments dans le SBF et favoriser ou non la dégradation du réseau vitreux. Les cinétiques d'échanges ioniques sont ainsi modifiées et la formation ainsi que la cristallisation d'hydroxyapatite également.

Le dosage des éléments silicium, calcium, phosphore et les éléments métalliques ont été dosés par ICP-OES.

C.3. Composition ionique du SBF après immersion des verres à différents délais

Les concentrations des éléments silicium, calcium, phosphore, et des éléments métalliques cuivre, argent et zinc ont été mesurées par ICP-OES. Les courbes sont présentées respectivement dans les figures 18, 19, 20 et 21.

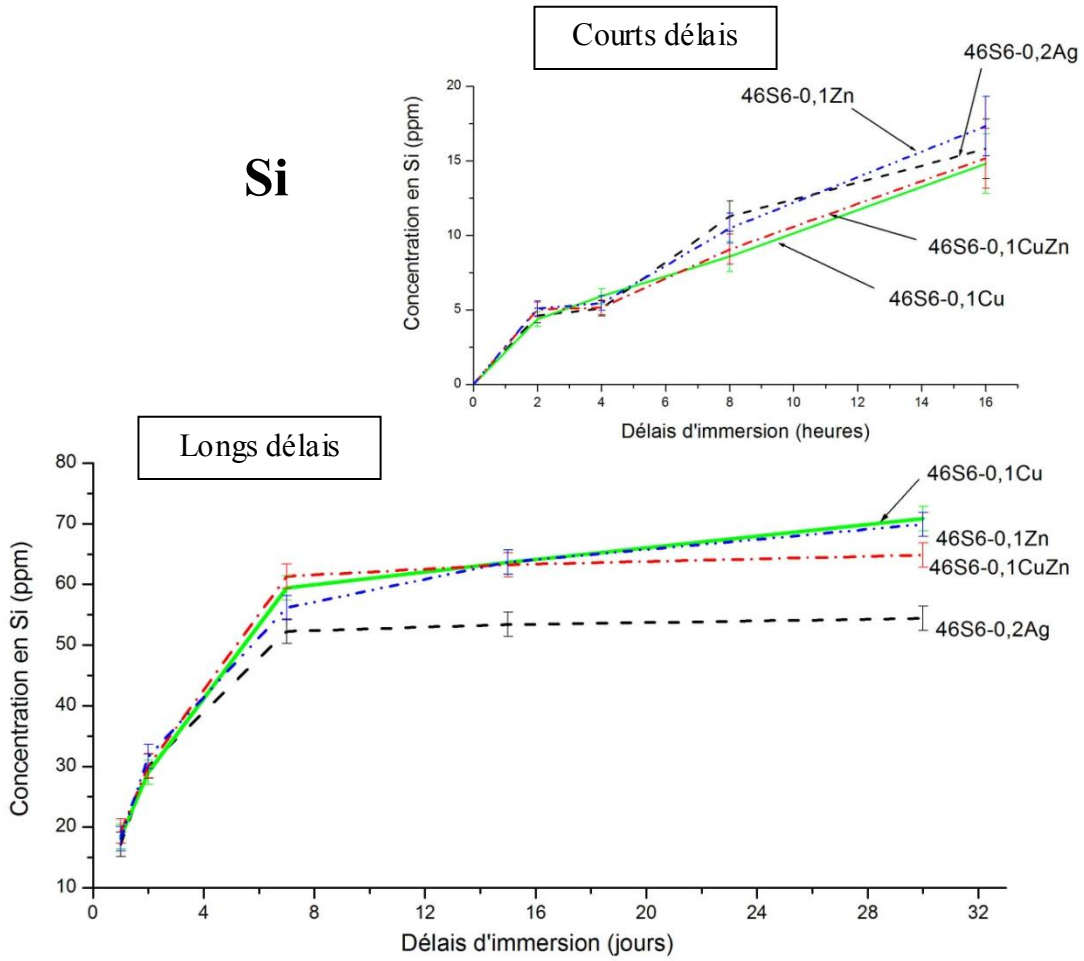


Figure 18 : Concentration en Silicium dans le SBF après immersion des verres dopés.

Le relargage du silicium se fait de manière identique pour chaque type de verre. Jusqu'à 16 heures d'immersion, les verres relarguent en moyenne 16 ppm de silicium. Ce n'est qu'à partir du 7ème jour d'immersion que nous observons une légère différence. En effet, les verres dopés à l'argent relarguent moins alors que les autres verres continuent à libérer du silicium jusqu'à 30 jours.

Au 7ème jour d'immersion, les verres ont relargué en moyenne 57 ppm de silicium.

Au 30ème jour d'immersion, les verres 46S6-0,1Zn et 46S6-0,1Cu en ont relargué 70 ppm alors que le verre 46S6-0,1CuZn en a relargué 64 ppm et le verre 46S6-0,2Ag 54 ppm.

L'argent, comparé aux autres éléments, ralentit la dégradation de la matrice du verre. Nous pouvons conclure que le mélange cuivre/zinc tend également à ralentir la dégradation de la matrice vitreuse comparé aux éléments zinc et cuivre introduits séparément et selon une teneur de 0,1% massique.

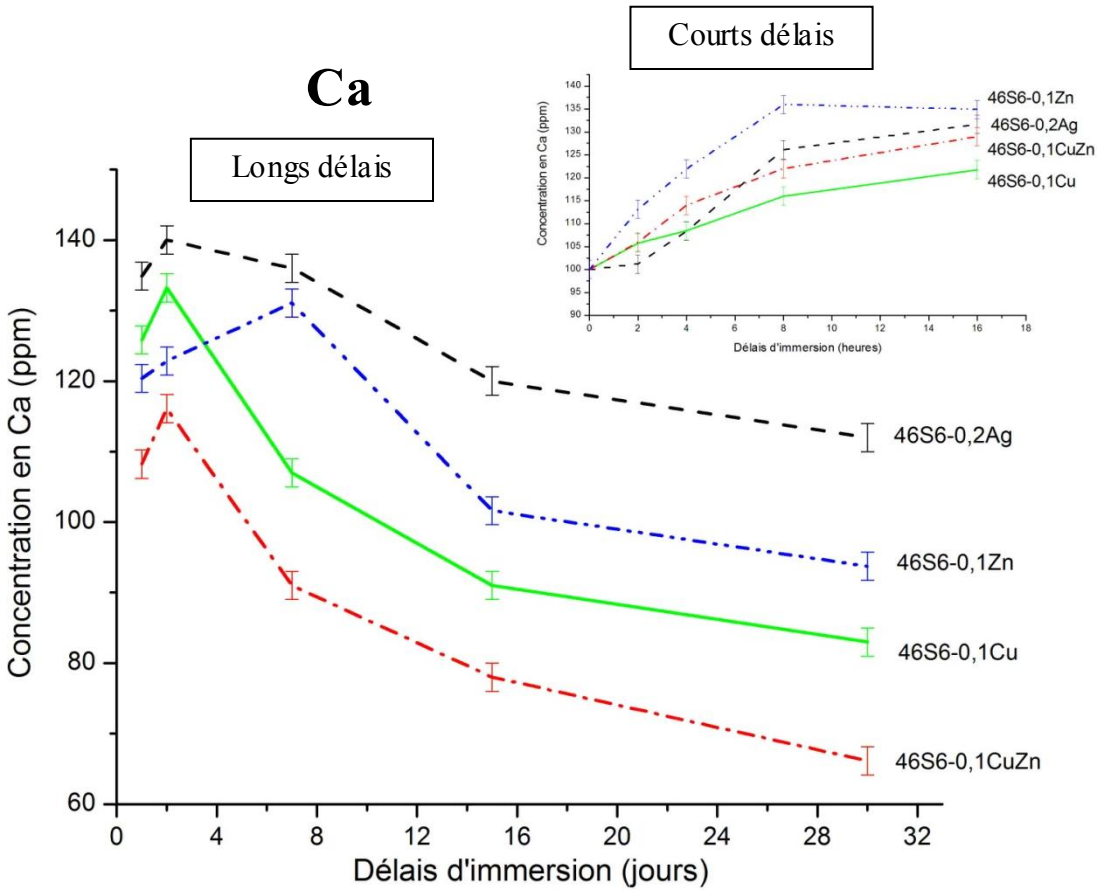


Figure 19 : Concentration en calcium dans le SBF après immersion des verres dopés.

Jusqu'à 16 heures d'immersion, les verres libèrent leur calcium dont la concentration passe de 100 à 130 ppm en moyenne. Le verre 46S6-0,1Cu relargue moins de calcium que le verre 46S6-0,1Zn, qui lui, en relargue jusqu'au 7ème jour d'immersion. C'est à partir du 2ème jour que le calcium commence à être consommé. En effet, les concentrations passent de 140 à 112 ppm pour 46S6-0,2Ag ; 131 à 94 ppm pour 46S6-0,1Zn ; 133 à 83 ppm pour 46S6-0,1Cu et 116 à 66 pour 46S6-0,1CuZn.

Nous observons que la courbe de relargage du verre 46S6-0,1CuZn est comprise entre celles des verres 46S6-0,1Zn et 46S6-0,1Cu, cela signifie que durant les premières heures, les effets du zinc et du cuivre sont moyennés dans la matrice vitreuse du verre 46S6-0,1CuZn. Une même observation est faite lors de la réabsorption du calcium. En effet, 46S6-0,1Zn 46S6-0,1Cu présentent une cinétique rapide de réabsorption ; leurs effets associés induisent une meilleure cinétique de réabsorption pour le verre 46S6-0,1CuZn.

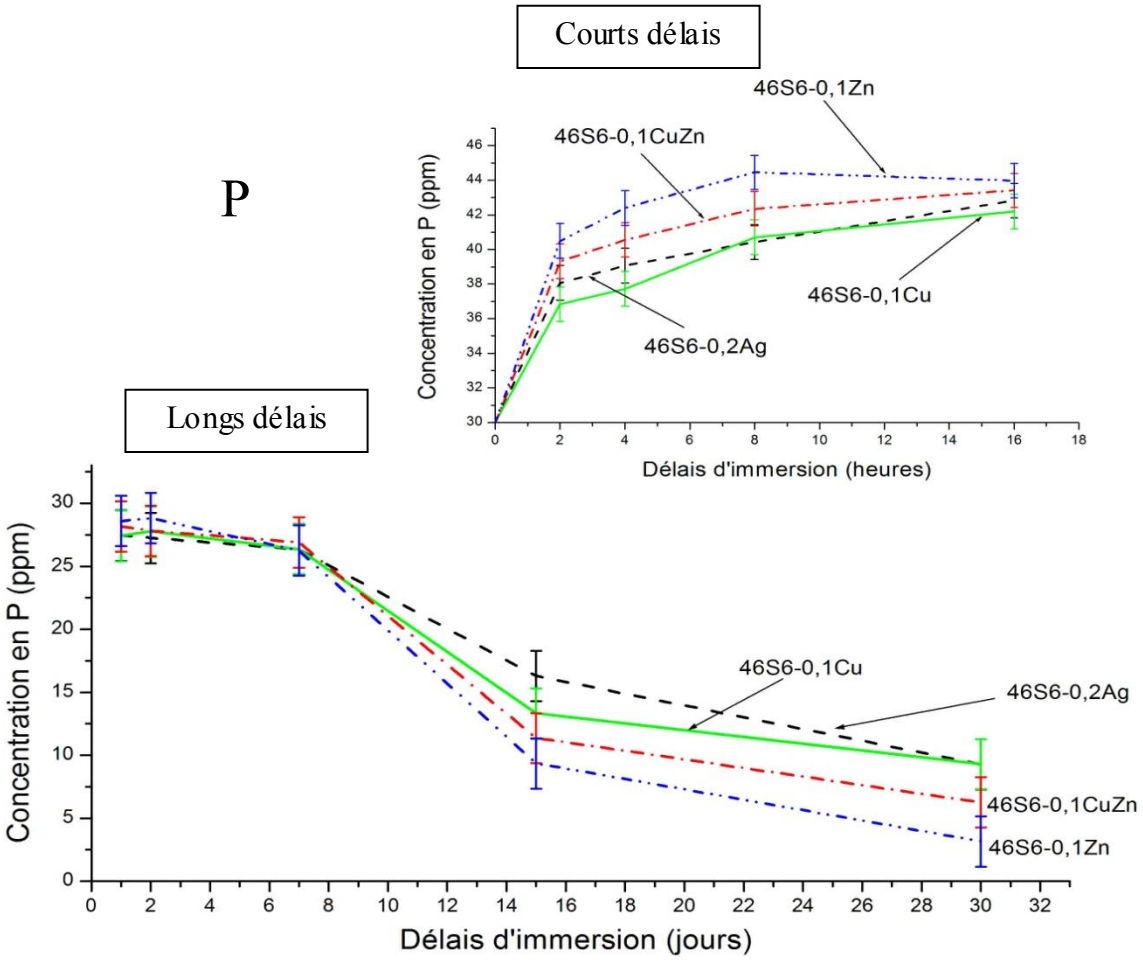


Figure 20 : Concentration en phosphore dans le SBF après immersion des verres dopés.

Les profils des cinétiques de libération/consommation du phosphore sont identiques pour chaque type de verre et suivent la même tendance que l'élément calcium. Néanmoins, sa consommation débute avant celle du calcium.

Le phosphore est relargué jusqu'à 16 heures d'immersion et commence à être consommé à partir du 1er jour d'immersion. Durant les premières heures, la concentration en phosphore passe de 30 à 43 ppm en moyenne. Puis, à l'issue des 30 jours d'immersion, la concentration en phosphore atteint en moyenne 6 ppm.

La cinétique de consommation du verre 46S6-0,1CuZn se situe entre celle de 46S6-0,1Cu et 46S6-0,1Zn. Les deux éléments associés semblent moyenner leurs effets.

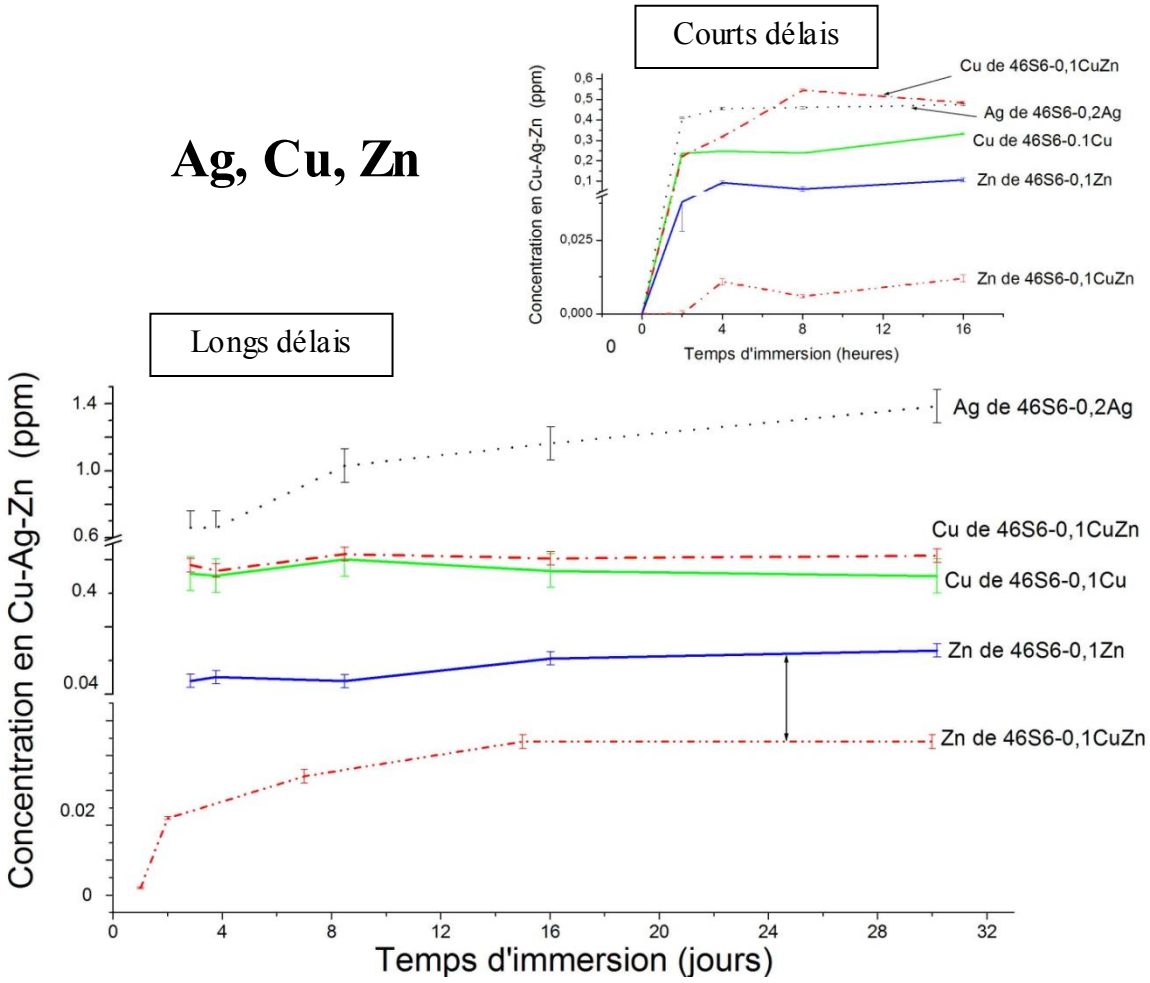


Figure 21 : Concentration en métaux dans le SBF après immersion des verres dopés.

Le relargage des métaux, quel que soit l'élément, a lieu très rapidement dès les deux premières heures d'immersion.

La concentration en argent augmente continuellement jusqu'au 30ème jour. Les concentrations en argent sont plus importantes que celles obtenus pour les autres métaux et ce, malgré avoir montré que 46S6-0,2Ag se dégradait moins vite. Ceci s'explique par la plus forte concentration utilisée en argent (0,2% massique) comparé aux autres verres (0,1% massique).

Pour le cuivre, une même cinétique est obtenue pour 46S6-0,1Cu et 46S6-0,1CuZn à partir du 1er jour d'immersion. Il y a comme une mise en place durant les premières heures puis un même comportement aux plus longs délais. La concentration en cuivre se maintient entre 0,36 et 0,40 ppm entre 16 heures et 30 jours d'immersion.

Pour le zinc, des différences sont observées entre le fait qu'il soit seul ou associé au cuivre. En effet, après 30 jours d'immersion les concentrations en zinc sont de 0,13 ppm et de 0,03 ppm pour 46S6-0,1Zn et 46S6-0,1CuZn respectivement (soit une concentration 4 fois plus importante apportée par le verre 46S6-0,1Zn dans le SBF).

Ainsi, le zinc associé au cuivre voit son relargage ralentit dans le SBF. Cela s'explique par le fait que le zinc, connu pour renforcer les propriétés mécaniques des verres, forme des liaisons chimiques plus fortes que le cuivre. Ainsi, le cuivre est plus rapidement relargué et à plus grande concentration que le zinc.

Conclusion sur les échanges ioniques entre les verres dopés avec Ag, Cu et Zn et le SBF :

Les mesures obtenues des concentrations du silicium, du calcium, du phosphore sont en accord avec les observations faites par diffraction des rayons X, spectroscopie infrarouge et MEB. En effet, le verre dopé à l'argent présente une dégradation plus lente de sa matrice et une consommation plus lente du calcium et du phosphore. C'est pourquoi à 30 jours, nous ne voyons pas de couche d'hydroxyapatite cristallisée à sa surface.

C'est le contraire pour les autres éléments qui présentent une dégradation plus rapide de leur réseau et une meilleure réabsorption du calcium et du phosphore. Les différences de cinétiques de libération/consommation expliquent les changements de morphologie, de relief et de cristallisation de l'hydroxyapatite à leurs surfaces.

Dans la littérature, les éléments cuivre et argent ont surtout été étudiés pour leurs propriétés biologiques [125-130]. Nous nous sommes intéressés ici à l'effet de ces éléments sur la cinétique de bioactivité ainsi que sur l'aspect morphologique de l'hydroxyapatite formée à leur surface. Ces résultats permettent de montrer que chaque verre, quelque soit l'élément dopant, peut être adapté à une situation clinique.

Les résultats de viabilité cellulaire de ces verres sont présentés dans la partie suivante.

IV. Etude de la cytotoxicité des verres dopés au zinc, au titane, au cuivre et à l'argent

Après avoir réalisé les études *in vitro* sans cellules et démontrer le caractère bioactif de nos verres, l'étape suivante consiste à étudier la toxicité des matériaux. Le but de cette étude est d'évaluer l'effet de la teneur en éléments dopants sur la biocompatibilité des verres bioactifs.
Les essais ont été réalisés sur deux types de cellules : les SaOS2 qui sont des ostéoblastes (responsable de la formation osseuse) et les EAHY926 qui sont des cellules endothéliales (responsable de la formation d'une vascularisation). Ils ont été réalisés à la faculté d'Odontologie de l'Université de Rennes 1 par les biologistes de notre groupe de recherche.

A. Résultats des tests colorimétriques de viabilité sur les verres dopés au zinc

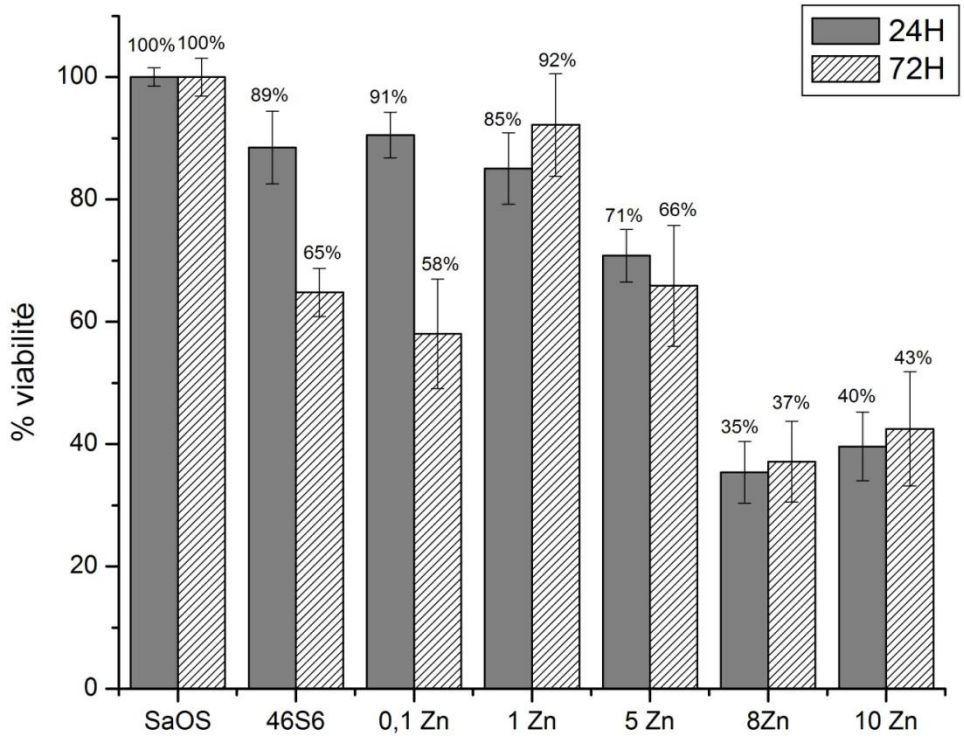


Figure 1 : Viabilité de la lignée ostéoblastique SaOS2 au contact des milieux conditionnés avec des verres dopés en différentes concentrations en zinc.

Les valeurs des moyennes et écart-types de ce test sont regroupés dans le tableau 1 de l'annexe13.

Après 24 heures d'incubation, nous observons deux phénomènes :

- Une viabilité cellulaire qui s'étend de 89 à 71% pour des concentrations respectives de 0 à 5% en zinc.
- Une viabilité cellulaire moins marquée au delà de la concentration de 5% avec environ 35 à 40% de cellules vivantes.

Cette toxicité aigüe peut être due un effet délétère direct du pH.

Après 72 heures d'incubation, une toxicité se développe au contact du verre bioactif avec une viabilité qui passe de 89% à 24h à 65% à 72h. Le même phénomène est observé au contact du verre bioactif additionné de 0,1% de zinc. Pour les autres concentrations, nous notons un rôle « protecteur » du zinc à partir de la concentration 1%. En effet, nous n'observons aucune différence significative entre le pourcentage d'ostéoblastes vivants à 24h et à 72h.

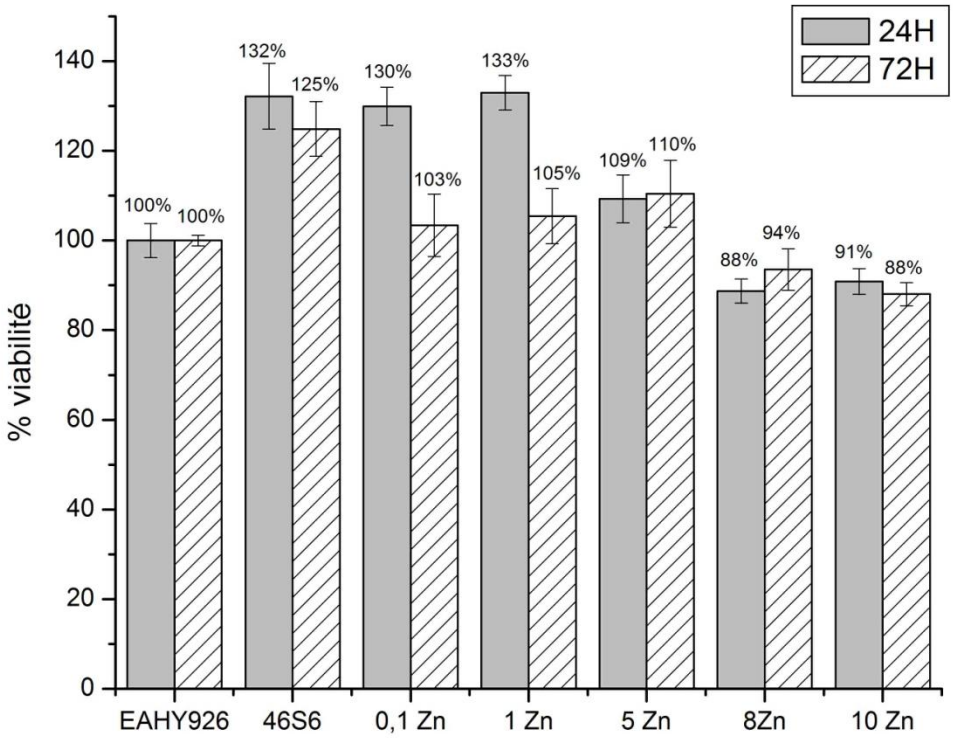


Figure 2 : Viabilité de la lignée endothéliale EAHY926 au contact des milieux conditionnés avec des verres dopés en différentes concentrations en zinc.

Les valeurs des moyennes et écart-types de ce test sont regroupés dans le tableau 2 de l'annexe13.

Après 24 heures d'incubation, un effet prolifératif est observé pour les concentrations de 0 à 5% en zinc. Cet effet est net pour le 46S6 seul et additionné de 0,1 à 1% de zinc (>30%). Pour les concentrations les plus fortes (8% et 10% en zinc), nous observons une toxicité modérée de 10 à 25% de mortalité cellulaire.

Après 72 heures d'incubation, au contact du verre bioactif 46S6 nous détectons une baisse de la prolifération mais qui n'est statistiquement pas significative comparé à 24h. Par contre, pour les concentrations 0,1 et 1% de zinc, la multiplication cellulaire chute au cours du temps mais reste comparable à la viabilité du témoin (100%). Pour les concentrations supérieures, aucune différence significative de viabilité n'est détectée entre les deux temps d'incubation. Il y a un effet dose dépendant dans ce cas.

Ces expérimentations mettent en évidence :

- Un effet cellule dépendant : la réaction de la lignée ostéoblastique et vasculaire est différente. La toxicité est enregistrée pour la lignée osseuse alors qu'il y a une prolifération pour la lignée endothéliale pour les faibles concentrations.
- Un effet dose dépendant pour les concentrations supérieures à 1% en zinc
- Un effet « protecteur » du zinc qui supprime la toxicité entre les 24 et 72h d'incubation pour les concentrations supérieures à 1%.

D'autres études ont montré que le zinc peut avoir un effet néfaste sur les ostéoblastes via un stress oxydatif [131]. Des résultats similaires ont été observés sur des cellules endothéliales en contact avec un verre de silice dopé avec 20% en masse de zinc où les effets ont montré une augmentation de l'adhésion mais une diminution de la prolifération cellulaire probablement du aux 2,7 ppm de zinc relargué dans le milieu de culture par le verre [132]. Au contraire, ce même verre mais dopé avec 5% en masse de zinc a amélioré aussi bien l'adhésion cellulaire que la prolifération cellulaire avec 1,1 ppm de zinc relargué [132]. L'effet dose dépendant est donc bien à prendre en considération dans l'étude des verres dopés au zinc.

B. Résultats des tests colorimétriques de viabilité sur les verres dopés au titane

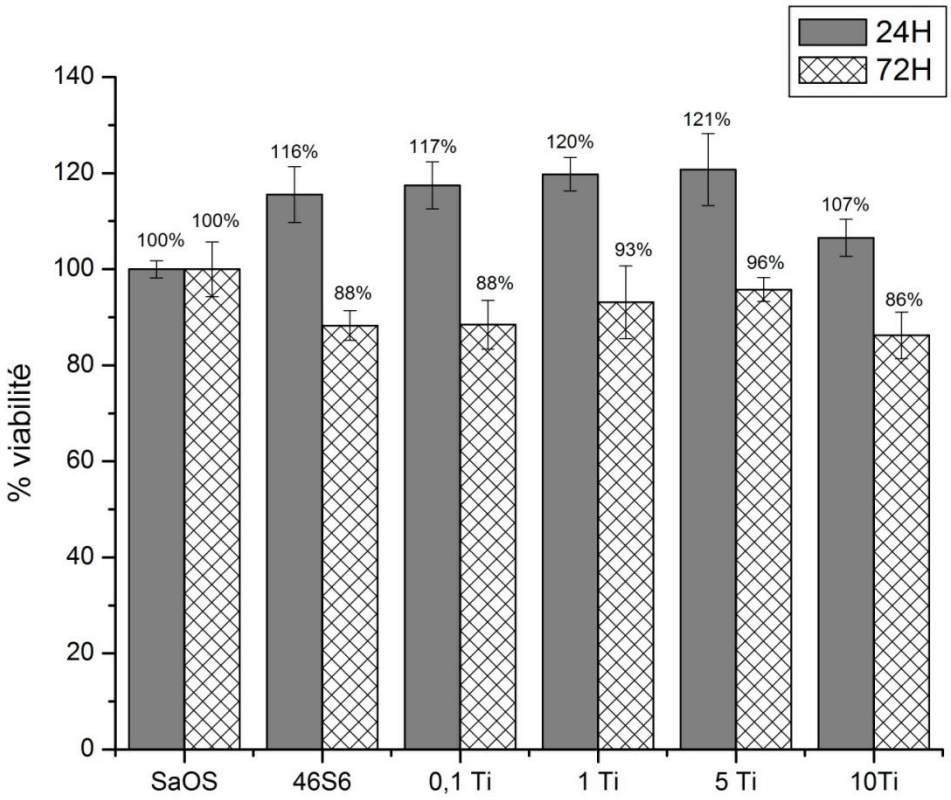


Figure 3 : Viabilité cellulaire de la lignée ostéoblastique SaOS2 au contact des milieux conditionnés par des verres dopés en différentes concentrations en titane.

Les valeurs des moyennes et écart-types de ce test sont regroupés dans le tableau 3 de l'annexe13.

Après 24 heures d'incubation, quel que soit le verre et la concentration en titane, un effet prolifératif est observé puisque les viabilités cellulaires dépassent les 100% du témoin.

Après 72 heures, une diminution de la viabilité souligne un effet toxique des verres. La viabilité la plus faible est de l'ordre de 86% ce qui dénote une faible toxicité de la concentration la plus forte en titane. Il y a sur la lignée ostéoblastique un effet temps dépendant puisque la toxicité n'apparait qu'après 72 heures d'incubation. Par contre, avec cette lignée osseuse, nous ne mettons pas en évidence un effet dose dépendant.

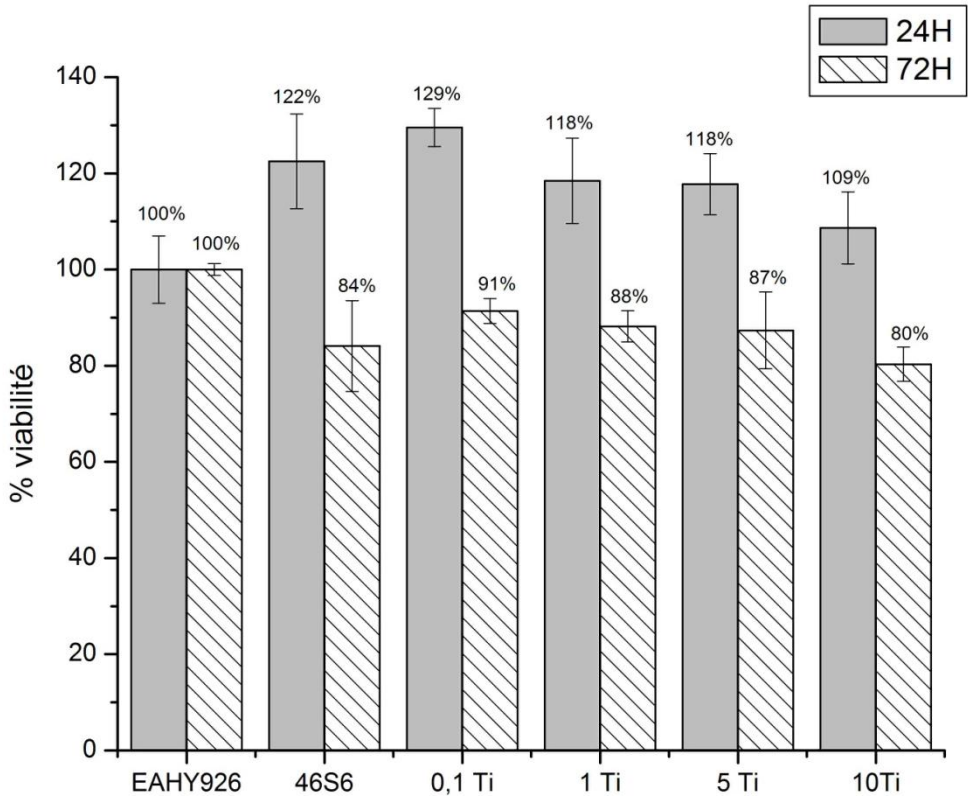


Figure 4 : Viabilité cellulaire de la lignée endothéliale au contact des milieux conditionnés par des verres dopés en différentes concentrations en titane

Les valeurs des moyennes et écart-types de ce test sont regroupés dans le tableau 4 de l'annexe13.

Nous observons la même tendance sur la lignée endothéliale. En effet, après 24 heures d'incubation, nous pouvons remarquer un effet prolifératif pour tous les verres. Cependant, cet effet diminue lentement au fur et à mesure que la concentration en titane augmente sans que ce phénomène soit réellement significatif.

Après 72 heures d'incubation, une chute importante de la prolifération cellulaire est notée. Une toxicité apparait (<100%), mais reste modérée. Elle augmente avec la concentration en titane, mais cette augmentation n'est pas significative hormis pour la concentration de 10% en titane.

Nous avons, comme pour la lignée ostéoblastique, un effet temps dépendant, la toxicité n'apparaissant qu'à l'issue des 72 heures d'incubation mais une absence d'effet dose dépendant.

L'effet cellule dépendant n'est pas à prendre en compte pour ce type de verres car quelle que soit la lignée, nous obtenons les mêmes effets.

Le titane est un élément chimique connu pour réduire la solubilité des verres, autrement dit leur durabilité chimique est plus importante et ils se dégradent moins vite une fois immergé dans un liquide physiologique. Tout cela affecte la réponse cellulaire [133]. Cependant le titane est considéré comme non toxique [134-136].

C. Résultats des tests colorimétriques de viabilité sur les verres dopés au cuivre, au zinc et à l'argent.

Pour les verres 46S6-0,2Ag, 46S6-0,1Cu et 46S6-0,1CuZn, quatre séries de mesure ont été réalisées, soit au total 36 mesures par biomatériau, par lignée cellulaire et par temps d'incubation. L'analyse statistique des résultats a été effectuée avec le logiciel Statview V : ANOVA suivie d'un test PLSD de Fisher pour déterminer les différences significatives (p = 0,05).

Les résultats obtenus sur la lignée ostéoblastique (figure 5) et la lignée de cellules endothéliales (figure 6) sont présentés.

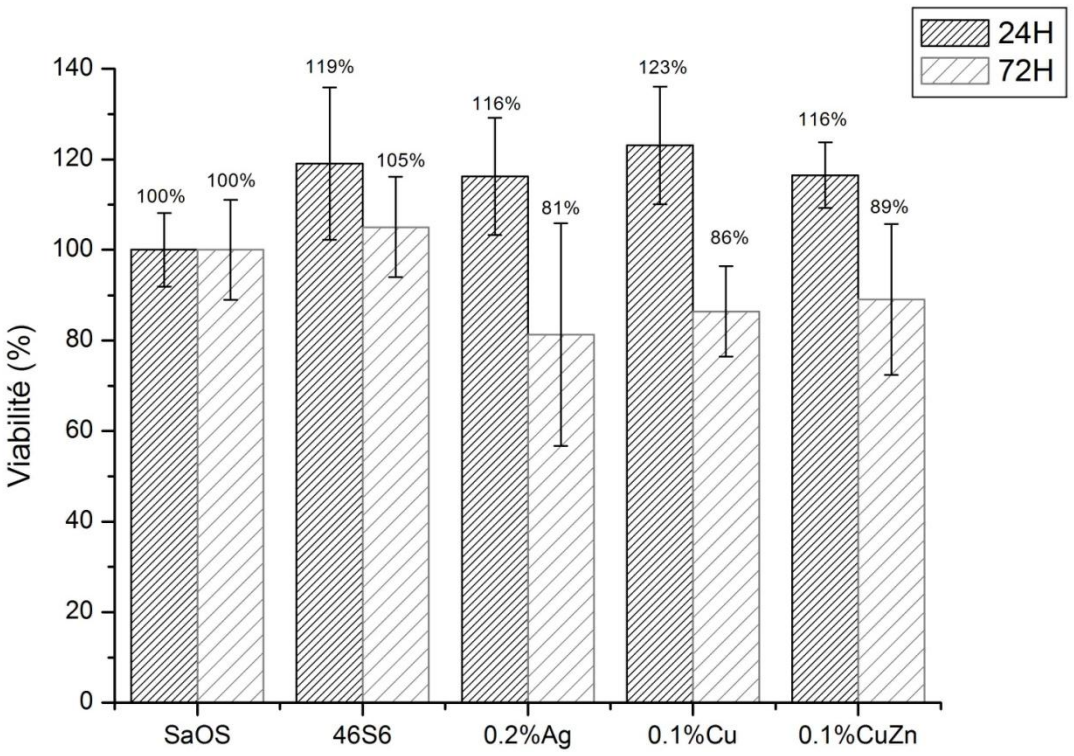


Figure 5 : Viabilité cellulaire de la lignée ostéoblastique SaOS2 au contact des milieux conditionnés par des verres dopés à l'argent, au cuivre/zinc et au cuivre.

Les valeurs des moyennes et écart-types de ce test sont regroupés dans le tableau 5 de l'annexe13.

Après 24 heures d'incubation, les biomatériaux quels qu'ils soient ont une action proliférative sur les cellules ostéoblastiques ($p < 1.10^{-4}$). Cette action est encore plus marquée avec 46S6-0,1Cu.

Après 72 heures d'incubation, cette tendance s'inverse. Cela pourrait être lié à l'adjonction de métaux puisque la prolifération cellulaire n'est pas affectée par la présence de biomatériau 46S6 sans métal ($p < 1.10^{-4}$). La cytotoxicité est plus marquée pour l'argent que pour les autres métaux qui restent sur un pourcentage de viabilité autour de 80%.

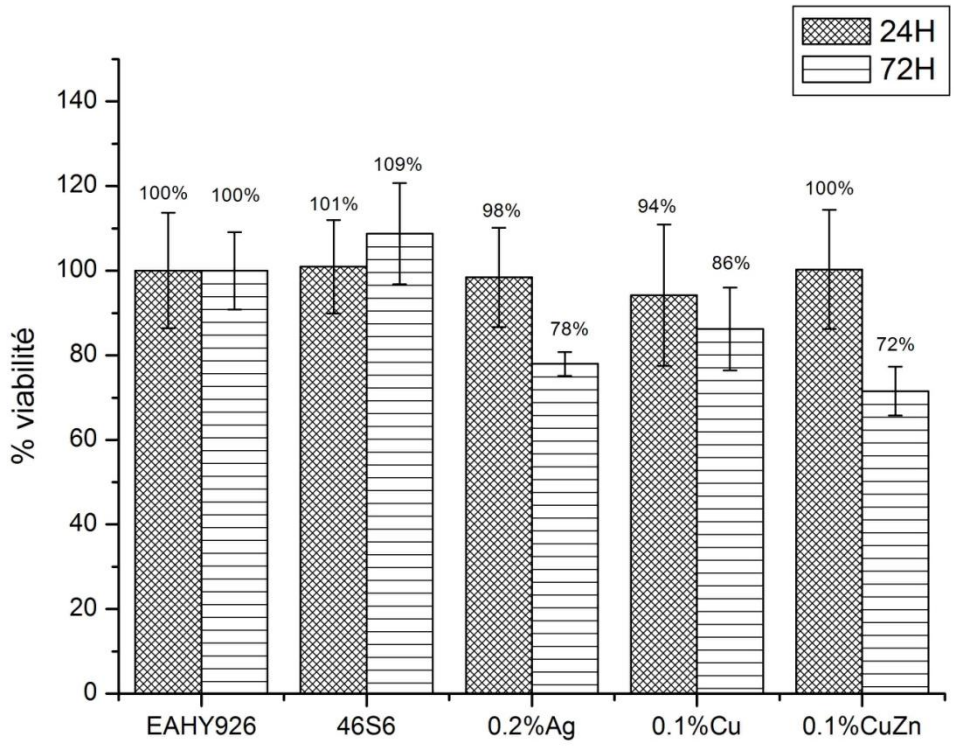


Figure 6 : Viabilité cellulaire de la lignée endothéliale EAHY926 au contact des milieux conditionnés par des verres dopés à l'argent, au cuivre/zinc et au cuivre.

Les valeurs des moyennes et écart-types de ce test sont regroupés dans le tableau 6 de l'annexe13.

Après 24 heures d'incubation, seul le 46S6 montre un effet cellulaire prolifératif. Les autres n'affectent pas la prolifération cellulaire: pas de différence significative avec le témoin cellules donc pas de cytotoxicité à 24 heures.

Après 72 heures d'incubation, la cytotoxicité apparaît, elle pourrait être liée à l'adjonction d'ions métalliques, elle reste modérée pour l'argent et de cuivre (autour de 80% de viabilité) mais est plus marquée pour le mélange cuivre-zinc. Le verre 46S6 a encore un effet cytoprolifératif significatif ($p = 0,03$).

Ainsi, pour les verres bioactifs dopés, nous avons observé le développement d'une cytotoxicité qui se manifeste après 72 heures et qui reste modérée. Les effets semblent être cellules dépendants : les SaOS2 sont plus sensibles (dans les deux sens : cytoprolifération/cytotoxicité) que les EAHY926. Les effets observés sont également temps dépendants puisque la cytotoxicité apparaît au bout de 72 heures de culture cellulaire. Dans la littérature, les études s'intéressent souvent aux nanoparticules [6-8] qui ont une diffusibilité cellulaire plus grande que celle liée aux biomatériaux de granulométrie inférieure à 40 µm et qui vont sédimenter dans le milieu de culture. La différence majeure est que nous avons travaillé à partir d'un éluat à 1%.

Quels que soient les lignées cellulaires ou les primo cultures de cellules testées, l'effet des ions métalliques est décrit, comme nous l'avons observé, cellules dépendant et temps dépendant [137 ; 139-142] tant pour l'argent que pour le cuivre et le zinc.
D'après Haase and al [137], une solution de nitrate d'argent serait toxique en culture cellulaire à 25 µM soit 4,24 mg/L. L'argent libre en solution est hémolytique (destruction des globules rouges de rat) à partir de 0,02 mM soit 2,16 mg/L [143]. Aucune de ces études n'utilise les mêmes cellules que les nôtres. Notre éluat est préparé à partir d'une solution à 1%. Il semble peu probable que l'argent relargué soit responsable de la cytotoxicité modérée observée à 72 heures. En effet, par comparaison, l'argent est relargué à 0,65 mg/L après 48 heures d'immersion dans le SBF (pour un ratio de 30 mg de 46S6-0,2Ag pour 60 mL de SBF).

En ce qui concerne le cuivre, la seule mesure de cytotoxicité trouvée dans la bibliographie est une DL50 (dose létale pour 50% des cellules) de 46 mg/L à 24 heures sur des fibroblastes (L929) de souris [139]. Le relargage de l'ion cuivre mesuré à partir de nos biomatériaux sur un mois est de l'ordre de 0,4 mg/L en moyenne pour 46S6-0,1Cu et 46S6-0,1CuZn (pour un

ratio de 30 mg dans 60 mL de SBF). La quantité relarguée à 24 heures (0,35 mg/L) semble donc être très en deçà de la dose cytotoxique et ce d'autant plus que notre solution de travail est à 1%.

Pour le zinc, les concentrations cytotoxiques retrouvées dans la littérature sont assez variables. Lodemann and al [140] notent un effet cytotoxique seulement à partir de 200µM de $ZnSO_4$ soit 32,4 mg/L sur des cellules épithéliales intestinales porcines et humaines. Zhang et al [137] observent une toxicité cellulaire dose dépendante pour ZnO à partir de 250 mg/L à 48 heures. Cette concentration laisse cependant 60% de viabilité des fibroblastes embryonnaires humains et demeure bien plus élevée que la notre (toujours à un mois : 0,03 ppm soit 0,03 mg/L que nous avons en plus diluée à 1%). Sous forme de nanoparticules, ZnO est plus toxique sur des cellules humaines nasales en culture primaire : 50 mg/L avec une détérioration de l'ADN à partir de 10 mg/L [144]. La dose sub-létale de $ZnCl_2$, réputé plus toxique, sur les cellules BEAS-2B, lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines est de 30 mg/L et laisse 65 à 70% de viabilité à 24 heures [145].

Références Chapitre 3

[1] http://www.lenntech.fr/francais/data-perio/taux-elements-corps-humain.htm. Site visité le 21/08/2013.

[2] WHO Expert Committee.
Trace element in human nutrition.
WHO Tech. Rep. 532 (1973) 9.

[3] M. Yamaguchi, H. Oishi, Y. Suketa,
Effect of essential trace metalson bone metabolism in weanling rats: comparison with zinc and other metal's action.
Res. Exp. Med. 186 (1986) 337.

[4] S. Kishi, M. Yamaguchi.
Inhibitory effect of zinc compounds on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures.
Biochem. Pharmacol. 48 (1994) 1225.

[5] A. Ito, H. Kawamura, M. Otsuka, M. Ikeuchi, H. Ohgushi, K. Ishikawa, K. Onuma, N.Kanzaki, Y. Sogo, N. Ichinos,
Zinc releasing calcium phosphate for stimulating bone formation.
Mater. Sci. Eng. C 22 (2002) 21.

[6] J. Brandao-Neto, V. Stefan, B.B. Mendonc, W. Bloise, A.V.B.Castro.
The essential role of zinc in growth
Nutr. Res. 15 (1995) 335–358.

[7] Z.-L. Tang, K.Wasserloos, C.M. St. Croix, B.R. Pitt
Role of zinc in pulmonary endothelial cell response to oxidative stress
Am. J. Physiol. (Lung) 281 (2001) 243–249.

[8] W.R. Holloway, F.M. Collier, R.E. Herbst, J.M. Hodge, G.C. Nicholson

Osteoblast-mediated effects of zinc on isolated rat osteoclasts: inhibition of bone resorption and enhancement of osteoclast number
Bone 19 (1996) 137–142.

[9] S.F. Rosenstiel, M.F. Land, B.J. Crispin
Dental luting agents: a review of the current literature
J. Prosth. Dent. 80 (1998) 280–301.

[10] G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M.C. Menziani,
Synthesis, characterization, and molecular dynamics simulation of Na_2O–CaO–SiO_2–ZnO glasses
J. Phys. Chem. B 106 (2002) 9753–9760.

[11] V. Aina, A. Perardi, L. Bergandi, G. Malavasi, L. Menabue, C. Morterra, D. Ghigo. *Cytotoxicity of zinc-containing bioactive glasses in contact with human osteoblasts.*
Chemico-Biological Interactions 167 (2007) 207–218.

[12] H. Oudadesse, S. Martin, A. Derrien, A. Lucas-Girot, G. Cathelineau, G. Blondiaux. *Determination of Ca, P Sr and Mg in the synthetic biomaterial aragonite by NAA.* J of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 262 (2004) 479-485.

[13] V. Aina, G. Malavasi, A. Fiorio, L. Munaron, C. Morterra.
Zinc-containing bioactive glasses: Surface reactivity and behaviour towards endothelial cells.
Acta Biomaterialia 5 (2009) 1211–1222.

[14] Y.B. Li, W.J. Weng, J.D. Santos, A.M. Lopes.
Structural studies of Na_2O-TiO_2-$CaOP_2O_5$ system glasses investigated by FTIR and FT-Raman.
Phys Chem Glasses Eur J Glass Sci Technol B 49 (2008) 41.

[15] E. Ali Abou Neel, J.C. Knowles.
Physical and biocompatibility studies of novel titanium dioxide doped phosphate-based glasses for bone tissue engineering applications.
J Mater Sci Mater Med 19 (2008) 377.

[16] A. Kiani, L.S. Cahill, E. Ali Abou Neel, J.V. Hann, M.E. Smith, J.C. Knowles.
Physical properties and MAS-NMR studies of titanium phosphate-based glasses.
Mater Chem Phys 120 (2010) 68.

[17] Y. Nan, P.F. Lee, J. James.
Crystallization behavior of CaO-P_2O_5 glass with TiO_2, SiO_2, and Al_2O_3 additions.
J Am Ceram Soc 75 (1992) 1641.

[18] M. Navarro, M. Ginebra, J. Clement, S. Martinez, G. Avila, J.A. Planell.
Physicochemical degradation of titania-stabilized soluble phosphate glasses for medical applications.
J Am Ceram Soc 86 (2003) 1345.

[19] A. Kiani, J.V. Hanna, S.P. King, G.J.R. Mark, E. Smith, N. Roohpour, V. Salih, J.C. Knowles.
Structural characterization and physical properties of P_2O_5–CaO–Na_2O–TiO_2 glasses by Fourier transform infrared, Raman and solid-state magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopies.
Acta Biomaterialia 8 (2012) 333–340

[20] E. Ali Abou Neel, W. Chrzanowski, J.C. Knowles.
Effect of increasing titanium dioxide content on bulk and surface properties of phosphate-based glasses.
Acta Biomaterialia 4 (2008) 532-534

[21] R. Barbucci, S. Lamponi, A. Magnani, F.M. Piras, A. Rossi, E. Weber.
Role of the Hyal-Cu(II) complex on bovine aortic and lymphatic endothelial cells behavior on microstructured surfaces.
Biomacromolecules 6 (2005) 212–219.

[22] A. Hoppe, N.S. Guldal, A.R. Boccaccini.
A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass–ceramics.

Biomater 32 (2011) 2757–2774.

[23] P. Giavaresi, P.M. Torricelli , R. Fornasari , R.B. Giardino , G. Leone .
Blood vessel formation after soft-tissue implantation of hyaluronan-based hydrogel supplemented with copper ions.
Biomater 26 (2005) 3001–3008.

[24] M.M. Erol, V. Mourino, P. Newby, X. Chatzistavrou, J.A. Roether, L. Hupa, A.R. Boccaccini.
Copper-releasing, boron-containing bioactive glass-based scaffolds coated with alginate for bone tissue engineering.
Acta Biomaterialia 8 (2012) 792–801.

[25] G.F. Hu.
Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture.
J Cell Biochem, 69 (1998) 326–335.

[26] M. Bellantone, N.J. Coleman, L.L. Hench.
Bacteriostatic action of a novel four-component bioactive glass.
J Biomed Mater Res 51 (2000) 484–490.

[27] G. Zhao, S.E. Stevens Jr.
Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of Escherichia coli to the silver ion.
Biomaterials 11 (1998) 27.

[28] A. Yoshiki, M. Hiroshi, N. Iwao, S. Nobuko, A. Tomonori, Yutaka, S. Takafumi, Masaki, M. Masaaki, H. Takao,
Calcium phosphate coating containing silver shows high antibacterial activity and low cytotoxicity and inhibits bacterial adhesion
Mater. Sci. Eng. C 30 (2010) 175–180.

[29] A.M. El-Kady, A.F. Ali, R. Rizk , M.M. Ahmed.

Synthesis, characterization and microbiological response of silver doped bioactive glass nanoparticles.
Ceramics International 38 (2012) 177–188.

[30] M. Bellantone, H.D. Williams, L.L. Hench.
Broad-spectrum bactericidal activity of Ag_2O-doped bioactive glass.
Antimicrob Agents Chemother 46 (2002) 1940–1945.

[31] M. Bosetti, A. Massè, E. Tobin, M. Cannas.
Silver coated materials for external fixation devices: "in vitro" biocompatibility and genotoxicity.
Biomaterials 23 (2002) 887–892.

[32] T. Toshikazu,
Antimicrobial agent composed of silica–gel with silver complex.
Inorg. Mater. 6 (1999) 505-511.

[33] L. Baoe, L. Xuanyong, M. Fanhao, C. Jiang, D. Chuanxian.
Preparation and antibacterial properties of plasma sprayed nano-titania/silver coatings.
Materials Chemistry and Physics 118 (2009) 99–104.

[34] Abeer M. El-Kady, Ashraf F. Ali, Rizk A. Rizk, Manar M. Ahmed
Synthesis, characterization and microbiological response of silver doped bioactive glass nanoparticles
Ceramics International 38 (2012) 177–188

[35] E. Dietrich, H. Oudadesse, A. Lucas-Girot, Y. Le Gal, S. Jeanne, G. Cathelineau.
Effects of Mg and Zn on the surface of doped melt-derived glass for biomaterials applications.
Applied Surface Science 255 (2008) 391-95.

[36] O. Peitl, E. Dutra Zanotto, L.L. Hench.
Highly bioactive P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2 glass ceramics.
J Non Crystalline Solids 292 (2001) 115-26.

[37] E. Wers, H. Oudadesse et al.
Thermal investigations of Ti and Ag doped bioactive glasses.
Thermochimica Acta (2014) doi:10.1016/j.tca.2014.02.001

[38] E. Wers, H. Oudadesse.
Thermal behavior and excess entropy of bioactive glasses and Zn-doped glasses.
J Therm Anal Calorim (2013) doi: 10.1007/s10973-013-3280-3

[39] E. Wers, H. Oudadesse et al.
Excess entropy and thermal behavior of Cu- and Ti-doped bioactive glasses.
J Therm Anal Calorim (2014) DOI 10.1007/s10973-014-3731-5

[40] Jastrzębski W, Sitarz M, Rokita M, Bulat K.
Infrared spectroscopy of different phosphates structures.
Spectrochimica Acta Part A 79 (2011) 722-727.

[41] M. Sitarz.
The structure of simple silicate glasses in the light of Middle Infrared spectroscopy studies.
J Non Cryst Solids 357 (2011) 1603-1608.

[42] A.M.B. Silva, R.N. Correia, J.M.M. Oliveira, M.H.V. Fernandes.
Structural characterization of TiO_2–P_2O_5-CaO glasses by spectroscopy.
J Eur Ceram Soc 30 (2010) 1253–1258.

[43] V. Martinez.
Influence des effets thermiques et mécaniques sur la relaxation structurale des préformes et des fibres optiques à base de silice. Etude par diffusion de la lumière et par diffusion des rayons X.
Thèse Université Lyon 1, numéro d'ordre 181; (2004) 8–10.

[44] M. Mami, H. Oudadesse, R. Dorbez-Sridi, H. Capiaux, P. Pellen-Mussi, D. Chauvel-Lebret, H. Chaair, G. Cathelineau.

Synthesis andin vitro characterization of melt derived 47S CaO-P2O5-SiO2-Na2O bioactive glass. Ceramics Silikaty 52 (2008) 121-129.

[45] P. Pascuta, M. Bosca, G. Borodi, E. Culea.
Thermal structural and magnetic properties of some zinc phosphate glasses doped with manganese ions.
J Alloys Compd. 509 (2011) 4314-4319

[46] A. Dietzel.
Glasstruktur und Glaseigenschaften.
Glass Technol. 22 (1968) 22-41

[47] V. Kumar, S. Sharma, O.P. Pandey, K. Singh.
Thermal and physical properties of $30SrO–40SiO_2–20B_2O_3–10A_2O_3$ (A = La, Y, Al) glasses and their chemical reaction with bismuth vanadate for SOFC.
Solid State Ionics. (2010) 181-187

[48] R.L. Siqueira, O. Peitl, E.D. Zanotto.
Gel-derived $SiO_2–CaO–Na_2O–P_2O_5$ bioactive powders: synthesis and in vitro bioactivity.
Mater Sci Eng. 31 (2011) 983–991

[49] L.L. Hench.
The story of Bioglass®.
J Mater Sci Mater Med. 17 (2006) 967–978

[50] L.L. Hench.
Genetic design of bioactive glass.
J Eur Ceram Soc. 29 (2009) 1257–1265

[51] J.R. Jones, E. Gentleman, J. Polak.
Bioactive glass scaffolds for bone regeneration.
Elements. 3 (2007) 393–399

[52] F. Angeli, D. Boscarino, S. Gin, G.D. Mea, B. Boizot, J.C. Petit.

Influence of calcium on sodium aluminosilicate glass leaching behaviour.
Phys Chem Glasses. 42 (2001) 279-286

[53] I. Kansal, D.U. Tulyaganov, A. Goel, M.J. Pascual, J.M.F. Ferreira.
Structural analysis and thermal behavior of diopside-fluorapatite- wollastonite-based glasses and glass-ceramics.
Acta Biomaterialia 6 (2010) 4380-4388.

[54] S.J. Watts, R.G. Hill, M.D. O'Donnell, R.V. Law.
Influence of magnesia on the structure and properties of bioactive glasses.
J Non Cryst Solids 356 (2010) 517-524.

[55] Y.C. Fredholm, N. Karpukhina, R.V. Law, R.G. Hill.
Strontium containing bioactive glasses: Glass structure and physical properties.
J Non Cryst Solids 356 (2010) 2546-2551.

[56] V. Aina, L. Bertinetti, G. Cerrato, M. Cerruti, G. Lusvardi, G. Malavasi, C. Morterra, L. Tacconi.
On the dissolution/reaction of small-grain Bioglass® 45S5 and F-modified bioactive glasses in artificial saliva (AS).
Appl Surf Sci 257 (2011) 4185-4195.

[57] D.S. Brauer, M. Mneimne, R.G. Hill.
Fluoride-containing bioactive glasses: Fluoride loss during melting and ion release in tris buffer solution.
J Non Cryst Solids 357 (2011) 3328-3333.

[58] A. Goel, R.R. Rajagopal, J.M.F. Ferreira.
Influence of strontium on structure, sintering and biodegradation behavior of CaO-MgO-SrO-SiO_2-P_2O_5-CaF_2 glasses.
Acta Biomaterialia 7 (2011) 4071-4080.

[59] R.G. Hill, A. Stamboulis, R.V. Law, A. Clifford, M.R. Towler, C. Crowley.
The influence of strontium substitution in fluorapatite glasses and glass-ceramics.

J. Non Cryst Solids 336 (2004) 223-229.

[60] G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, V. Aina, C. Morterra.
Fluoride-containing bioactive glasses: Surface reactivity in simulated body fluids solutions.
Acta Biomaterialia 5 (2009) 3548-3562.

[61] G. Lusvardi, D. Zaffe, L. Menabue, C. Bertoldi, G. Malavasi, U. Consolo.
In vitro and in vivo behaviour of zinc-doped phosphosilicate glasses.
Acta Biomaterialia 5 (2009) 419-428.

[62] M. Handke, M. Sitarz, M. Rokita, E.W. Galuskin.
Vibrational spectra of phosphate-silicate biomaterials.
J Mol Struct 39 (2003) 651-653.

[63] M. Sitarz, M. Handke, Z. Fojud, S. Jurga.
Spectroscopic studies of glassy phospho-silicate materials.
J Mol Struct. 621 (2005) 744-747

[64] M. Sitarz.
Influence of modifying cations on the structure and texture of silicate-phosphate glasses.
J Mol Struct 887 (2008) 237-248.

[65] M. Sitarz, K. Bulat, J. Olejniczak.
Structure and microstructure of glasses from a $NaCaPO_4$-SiO_2-BPO_4 system.
Vib. Spect. 61 (2012) 72-77.

[66] A.T. Patel, A. Pratap .
Study of kinetics of glass transition of metallic glasses.
J Therm Anal Calorim. 110 (2012) 567–571

[67] M. Szumera, I. Waclawska.
Effect of molybdenum addition on the thermal properties of silicate-phosphate glasses.
J Therm Anal Calorim. 109 (2012) 649-655.

[68] M.S. Gaur, P.K. Singh, Suruchi, R.S. Chauhan.
Structural and thermal properties of polysulfone-ZnO nanocomposites.
J Therm Anal Calorim. 111 (2013) 743-751.

[69] L. Linati, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M.C. Menziani, P. Mustarelli.
Qualitative and quantitative structure–property relationships analysis of multicomponent potential bioglasses.
J Phys Chem B 109 (2005) 4989-98

[70] P. Gao, Z. Xue, G. Liu, J. Zhang, M. Zhang.
Effects of Zn on the glass forming ability and mechanical properties of MgLi-based bulk metallic glasses.
J Non-Cryst Solids 358 (2012) 8–13

[71] M. Karbasi, S. Saidi, G. Aryanpour.
Study of structure and usage of mechanically alloyed nanocrystalline Ti–Cu–Zn powders in powder metallurgy.
Powder Metall. 51 (2008) 250-253

[72] E. Ali Abou Neel, W. Chrzanowski, J.C. Knowles,
Effect of increasing titanium dioxide content on bulk and surface properties of phosphate-based glasses.
Acta biomaterialia. 4 (2008) 523-534.

[73] P. Mosner, K. Vosejpkova, L. Koudelka.
Thermal properties and stability of lithium titano-phosphate glasses.
J Therm Anal Calorim. 95 (2009) 53-58.

[74] J. Pospisil, P. Mosner, L. Koudelka.
Thermal behaviour and crystallization of titanium–zinc borophosphate glasses.
J Therm Anal Calorim. 84 (2006) 479-482.

[75] P. Mosner, K. Vosejpkova, L. Koudelka.
Thermal behaviour and properties of Na_2O-TiO_2-P_2O_5 glasses.

J Term Anal Calorim. 96 (2009) 469-474.

[76] J. Sulowska, I. Waclawska, M. Szumera.
Effect of copper addition on glass transition of silicate–phosphate glasses.
J Therm Anal Calorim. 109 (2012) 705-10.

[77] J. Sulowska, I. Waclawska, M. Szumera.
Effect of copper addition on glass transition of silicate–phosphate glasses.
J Therm Anal Calorim. 109 (2012) 705-710.

[78] J. Sulowska, I. Waclawska, M. Szumera, J. Olejniczak.
Characterization of thermally induced of crystalline phases in CuO containing silicate-phosphate glasses.
J Therm Anal Calorim. 108 (2012) 657-663.

[79] X.C. Lu, H.Y. Li.
Kinetics of non-isothermal crystallization in $Cu_{50}Zr_{43}Al_7$ and $(Cu_{50}Zr_{43}Al_7)_{95}Be_5$ metallic glasses.
J Therm Anal Calorim. (2013) doi 10.1007/s10973-013-3364-0.

[80] P. Lucas, A.A. Wilhelm, M. Videa, C. Boussard-Plédel, B. Bureau. Chemical stability of chalcogenide infrared glass fiber. Corrosion Science 50 (2008) 2047-2052.

[81] J. Troles et al. Preparation and investigation of high purity Ge-Te-AgI glasses for optical application. J Non Cryst Solid 377 (2013) 1-7.

[82] A. Kumar, P.B. Barman, R. Sharman,
Crystallization kinetics of Ag-doped Se–Bi–Te chalcogenide glasses,
J Therm Anal Calorim. 114 (2013) 1003-1013.

[83] M. Iqbad, M. McCullough, A. Harris, S. Holger Eichborn,
Thermal conductivity of polyurethane composites containing nanometer- and micrometer-sized silver particles.
J Therm Anal Calorim. 108 (2012) 933-38.

[84] N. Zotov, C. Wagner, F. Bellido, L.M. Rodriguez, R. Jimenez-Garay,
Thermal analysis of Ag-As-Se chalcogenide glasses
Thermochim Acta. 296 (1997) 23-29.

[85] K. Chrissafis, E.Pavlidou, D.Gkogkou, D. Bikiaris,
Effect of Cu-nanofibers and Ag nanoparticles on syndiotactic polystyrene thermal stability and on its decomposition mechanism
Thermochim Acta. 561 (2013) 26-35.

[86] M. Sitarz, K. Bulat, M. Szumera.
Influence of modifiers and glass-forming ions on the crystallization of glasses of the $NaCaPO_4$–SiO_2 system.
J Therm Anal Calorim 119 (2012) 577-584.

[87] M. Szumera, I. Wacławska.
Spectroscopic and thermal studies of silicate-phosphate glass.
J Therm Anal Calorim 88 (2007) 151-156.

[88] D. Kivelson, H. Reiss.
Metastable systems in thermodynamics: consequences, role of constraints.
J Phys Chem 103 (1999) 8337-8343.

[89] P.K. Gupta, J.C. Mauro.
On the reality of residual entropies of glasses and disordered crystals.
J Phys Chem 129 (2008) 67-101.

[90] G.N. Lewis, M. Randall M, Thermodynamics, in: Nemilov SV.
Zero-point entropy of glasses as physical reality.
J Non Cryst Solid 355 (2009) 607-616.

[91] S.V. Nemilov.
Zero-point entropy of glasses as physical reality.
J Non Cryst Solid 355 (2009) 607-616.

[92] T.V. Tropin, J.W.P. Schmelzer, C. Schick.
On the dependence of the properties of glasses on cooling and heating rates: I. Entropy, entropy production, and glass transition temperature.
J Non Cryst Solid 357 (2011) 1291-1302.

[93] J. Zarzycki.
Les verres et l'état vitreux.
Paris: Masson; 1982

[94] L.H. Adams,
The annealing of glass as a physical problem.
Journal of the Franklin Institute 216 (1933) 39-71.

[95] M. Tejedor, J.A. Garc, J. Carrizo, L. Elbaile,
Influence of thermal treatments on the internal stresses of metallic glasses.
J Non Cryst Sol 235-237 (1998) 793-795.

[96] E. Dietrich.
Synthèse et études physico-chimiques de verres bioactifs denses et poreux. Applications en tant que biomatériaux en sites osseux.
Thèse de l'Université de Rennes 41, n°d'ordre 3767, 2008

[97] X.V. Bui.
Elaboration de biomatériaux verres-substances actives (zolédronate-Chitosan).
Thèse de l'Université de Rennes 1, n° d'ordre 4421, 2011.

[98] I. Lebecq.
Etude de bioverres à base de SiO_2, CaO, Na_2O non dopés et dopés par le phosphore.
Thèse, Université de Valenciennes, 2002.

[99] D. Ren, Q. Feng, X. Bourrat.
Effects of additives and templates on calcium carbonate mineralization in vitro.
Micron 42 (2011) 228–245.

[100] K. Sharma, S. Bhattacharya, K.G. Bhushan, M.N. Deo, G.P. Kothiyal
Structural and surface studies on calcium phospho-silicate glass-ceramics containing zinc and iron oxide
Journal of Non-Crystalline Solids 376 (2013) 221–228

[101] G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M.C. Menziani,
Synthesis, Characterization, and Molecular Dynamics Simulation Of Na_2O-CaO-SiO_2-ZnO Glasses
J. Phys. Chem. B 106 (2002) 9753-9760

[102] S. Hesaraki, M. Gholami, S. Vazehrad, S. Shahrabi
The effect of Sr concentration on bioactivity and biocompatibility of sol–gel derived glasses based on CaO–SrO–SiO_2–P_2O_5 quaternary system
Mater. Sci. Eng. C 30 (2010) 383–390.

[103] V. Aina, G.Malavasi, A. Fiorio Pla, L. Munaron, C. Morterra
Zinc-containing bioactive glasses: surface reactivity and behaviour towards endothelial cells
Acta Biomater. 5 (2009) 1211–1222

[104] G. Silva Lázaro, S. Caldas Santos, C.Xavier Resende, E. Araujo dos Santos
Individual and combined effects of the elements Zn, Mg and Sr on the surface reactivity of a SiO_2·CaO·Na_2O·P_2O_5 bioglass system
Journal of Non-Crystalline Solids 386 (2014) 19–28

[105] M. Toledano, S. Sauro, I. Cabello, T. Watson, R. Osorio
A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface
Dental Materials 29 (2013) 142-152.

[106] R. Osorio, M. Yamauti, E. Osorio, J.S. Román, M. Toledano
Zinc-doped dentin adhesive for collagen protection at the hybrid layer
European Journal of Oral Sciences, 119 (2011) 401–410

[107] R. Osorio, M. Yamauti, E. Osorio, M.E. Ruiz-Requena, D.H. Pashley, F.R. Tay, M. Toledano
Zinc reduces collagen degradation in demineralized human dentin explants
Journal of Dentistry, 39 (2011) 148–153

[108] M. Toledano, M. Yamauti, M. Ruiz-Requena, R. Osorio
A ZnO-doped adhesive reduced collagen degradation favouring dentine remineralization
Journal of Dentistry, 40 (2012) 756–765

[109] A. Hoppe, N.S. Güldal, A.R. Boccaccini
A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics
Biomaterials, 32 (2011) 2757–2774

[110] A.J. Smith, B.A. Scheven, Y. Takahashi, J.L. Ferracane, R.M. Shelton, P.R. Cooper
Dentine as a bioactive extracellular matrix
Archives of Oral Biology, 57 (2012) 109–121

[111] Y. Li, W. Maret
Transient fluctuations of intracellular zinc ions in cell proliferation
Experimental Cell Research, 315 (2009) 2463–2470

[112] E.A. Abou Neel, W. Chrzanowski, J. Knowles.
Effect of increasing titanium dioxide content on bulk and surface properties of phosphate-based glasses.
Acta biomaterialia 4 (2008) 523-534.

[113] D.S.L. Weiss, R.D. Torres, S. Buchner, S. Blunk, P. Soares
Effect of Ti and Mg dopants on the mechanical properties, solubility, and bioactivity in vitro of a Sr-containing phosphate based glass
Journal of Non-Crystalline Solids 386 (2014) 34-38.

[114] Clément, J., Avila, G., Navarro, M., Martinez, S., Ginebra, M. P., Planell, J. A.

Chemical durability and mechanical properties of calcium phosphate glasses with the addition of Fe_2O_3,TiO_2 and ZnO
Bioceramics, 13 (2000) 621-624

[115] M. Navarro, J. Clément, M.P. Ginebra, S. Martinez, G. Avila, J.A. Planell
Improvement of the stability and mechanical properties of resorbable phosphate glasses by the addition of TIO_2
Key Eng. Mater., 218–220 (2002) 275–278

[116] Delia S. Brauer, Natalia Karpukhina, Robert V. Law, Robert G. Hill
Effect of TiO_2 addition on structure, solubility and crystallization of phosphate invert glasses for biomedical applications
Journal of Non-Crystalline Solids 356 (2010) 2626–2633

[117] Nilay J. Lakhkar , In-Ho Lee , Hae-Won Kim , Vehid Salih , Ivan B. Wall , Jonathan C. Knowles
Bone formation controlled by biologically relevant inorganic ions: Role and controlled delivery from phosphate-based glasses
Advanced Drug Delivery Reviews 65 (2013) 405–420

[118] E.A. Abou Neel,W. Chrzanowski, S.P. Valappil, L.A. O'Dell, D.M. Pickup, M.E. Smith,
R.J. Newport, J.C. Knowles
Doping of a high calcium oxide metaphosphate glass with titanium dioxide
J. Non-Cryst. Solids 355 (2009) 991–1000.

[119] E.A. Abou Neel, J.C. Knowles,
Physical and biocompatibility studies of novel titanium dioxide doped phosphate-based glasses for bone tissue engineering applications
J. Mater. Sci.-Mater. Med. 19 (2008) 377–386.

[120] M. Navarro, M.P. Ginebra, J. Clement, S. Martinez, G. Avila, J.A. Planell,
Physicochemical degradation of titania-stabilized soluble phosphate glasses for medical applications,

J. Am. Ceram. Soc. 86 (2003) 1345–1352.

[121] V. Rajendran, A.V.G. Devi, M. Azooz, F.H. El-Batal,
Physicochemical studies of phosphate based P2O5-Na2O-CaO-TiO2 glasses for biomedical applications,
J. Non-Cryst. Solids 353 (2007) 77–84.

[122] A. Kiani, L.S. Cahill, E.A. Abou Neel, J.V. Hanna, M.E. Smith, J.C. Knowles
Physical properties and MAS-NMR studies of titanium phosphate-based glasses
Mater.Chem. Phys. 120 (2010) 68–74.

[123] R.M. Moss, E.A. Abou Neel, D.M. Pickup, H.L. Twyman, R.A. Martin, M.D. Henson, E.R. Barney, A.C. Hannon, J.C. Knowles, R.J. Newport,
The effect of zinc and titanium on the structure of calcium-sodium phosphate based glass
J. Non-Cryst.Solids 356 (2010) 1319–1324

[124] NJ. Lakhkar, JH Park, NJ. Mordan , V. Salih , IB. Wall, HW Kim, SP. King , JV. Hanna , RA. Martin , O. Addison , J. Fred, W. Mosselmans , JC. Knowles
Titanium phosphate glass microspheres for bone tissue engineering
Acta Biomaterialia 8 (2012) 4181–4190

[125] J.J. Blaker, S.N. Nazhat, A.R. Boccaccini
Development and characterization of silver-doped bioactive glass-coated sutures for tissue engineering and wound healing applications
Biomaterials 25 (2004) 1319–1329

[126] B. Jansen, M. Rinck, P. Wolbring, A. Strohmeier, T. Jahnns
In-vitro evaluation of the antimicrobial efficacy and biocompatibility of a silver-coated Central Venous Catheter
J Biomater Appl, 9 (1994) 55–70

[127] T.N. Kim, Q.L. Feng, J.O. Kim, J. Wu, H. Wang, G.C. Chen, F.Z. Cui
Antimicrobial effect of metal ions (Ag^{+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}) in hydroxyapatite
J Mater Sci Mater Med, 9 (1998) 129–134

[128] D.C. Clupper, L.L. Hench
Bioactive response of Ag-doped tape cast Bioglass® 45S5 following heat treatment
J Mater Sci Mater Med, 12 (2001) 917–921

[129] G. Lusvardi, C Leonelli, L. Menabue, M. Mortorsi, M. Saladini.
Reactivity of vitreous biocomposite system Na_2O–CaO–P_2O_5–Ag_2O–SiO_2.
Cimtec 98-Symposium XI, Materials in Clinical Applications, Firenze, Italy, (1998) p271.

[130] M. Bellantone, H.D. Williams, L.L. Hench
Broad-spectrum bactericidal activity of Ag_2O-doped bioactive glass
Antimicrob Agents Chemother, 46 (2002) 1940–1945

[131] V. Aina, G. Malavasi, A.F. Pla, L. Munaron, C. Morterra.
Zinc-containing bioactive glasses: surface reactivity and behaviour towards endothelial cells.
Acta Biomater 5 (2009) 1211-1222

[132] V. Aina, A. Perardi, L. Bergandi, G. Malavasi, L. Menabue, C. Morterra et al.
Cytotoxicity of zinc-containing bioactive glasses in contact with human osteoblasts.
Chem Biol Interact 167 (2007) 207-218.

[133] M. Navarro, M-P. Ginebra, J.A. Planell.
Cellular response to calcium phosphate glasses with controlled solubility.
J Biomed Mater ResA 67A (2003) 1009-1015.

[134] M. Navarro, Sd Valle, S. Martínez, S. Zeppetelli, L. Ambrosio, J.A. Planell et al.
New macroporous calcium phosphate glass ceramic for guided bone regeneration.
Biomaterials 25 (2004) 4233-4241.

[135] D.S. Brauer, C. Rüssel, W. Li, S. Habelitz.
Effect of degradation rates of resorbable phosphate invert glasses on in vitro osteoblast proliferation.
J Biomed Mater Res A 77A (2006) 213-219

[136] Z. Shavandi, T. Ghazanfari, K.N. Moghaddam.
In vitro toxicity of silver nanoparticles on murine peritoneal macrophages.
Immunopharmacol Immunotoxicol. 33 (2011) 135-140.

[137] A. Haase, A. Mantion, P. Graf, J. Plendl, A.F. Thuenemann, M. Meier, A. Taubert, A. Luch.
A novel type of silver nanoparticles and their advantages in toxicity testing in cell culture systems.
Arch Toxicol 86 (2012) 1089-1098.

[138] X.Q. Zhang, L.H. Yin, M. Tang, Y.P. Pu.
ZnO, Ti(O)2, Si(O)2 and Al2O » nanoparticles-induced toxic effects on human fetal lung fibroblasts.
Biomed Environ Sci. 24 (2011) 661-669.

[139] B. Cao, Y. Zheng, T. Xi, C. Zhang, W. Song, K. Burugapalli, H. Yang, Y. Ma.
Concentration-dependant cytotoxicity of copper ions on mouse fibroblasts in vitro : effects of copper ion release from TCu380A vs Tcu220C intra-uterine devices.
Biomed Microdevices. 14 (2012) 709-720.

[140] U. Lodeman, R. Einspanier, F. Scharfen, H. Martens, A. Bondzio.
Effects of zinc on epithelial barrier properties and viability in a human and a porcine intestinal cell culture model.
Toxicol In Vitro. 27 (2013) 834-843.

[141] N. Gheck.
Intérêt de la médication intracanalaire d'un verre bioactif 46S6 dopé à l'argent: étude de la diffusion et de la biocompatibilité sur modèle in vitro.
2012, thèse N° 42.20.12.

[142] R.A. Bozym, F. Chimienty, L.J. Giblin, G.W. Gross, I. Korichneva, Y. Li, S. Libert, W. Maret, M. Parviz, C.I. Frederickson, R.B. Thompson.
Free zinc ions outside a narrow concentration range are toxic to a variety of cells in vitro.
Exp Biol Med. 235 (2010) 741-750.

[143] S. Zhang, C. Du, Z. Wang, X. Han, K. Zhang, L. Liu.
Reduced cytotoxicity of silver ions to mammalian cells at high concentration due to the formation of silver chloride.
Toxicol In Vitro. 27 (2013) 739-744.

[144] S. Hackenberg, A. Sherzed, A. Technau, M. Kessler, K. Froelich, C. Ginzkey, C. Koehler, M. Burghartz, R. Hagen, N. Kleinsasser.
Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro.
Toxicol In Vitro 25 (2011) 657-663.

[145] B.C. Heng, X. Zhao, S. Xiong, Ng KW, F.Y. Boey, J.S. Loo.
Cytotoxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles is influenced by cell density and culture format.
Arch toxicol. 85 (2011) 695-704.

Chapitre 4

Comportement *in vitro* et *in vivo* d'une vitrocéramique poreuse.

Chapitre 4 : Comportement *in vitro* et *in vivo* d'une vitrocéramique poreuse.

I. Caractérisations physico-chimiques d'une vitrocéramique poreuse

Afin de permettre une colonisation cellulaire, un dépôt de la matière organique et la mise en place d'une vascularisation, les biomatériaux poreux sont de plus en plus utilisés en chirurgie réparatrice. La présence d'une porosité ouverte et interconnectée favorise également la circulation de liquides physiologiques qui sont responsables des échanges ioniques entre l'organisme et le biomatériau.

Cette partie concerne les caractérisations physico-chimiques du biomatériau poreux avant toute étude *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, la diffraction des rayons X, la spectroscopie infrarouge et la résonance magnétique nucléaire ont été utilisées pour déterminer la structure chimique du biomatériau et les différentes liaisons chimiques. De plus, des méthodes complémentaires comme la BET multipoints, la méthode d'Archimède et la porosimétrie à mercure ont permis d'évaluer le taux de porosité du matériau élaboré.

A. Caractérisations physico-chimiques du biomatériau poreux

A.1. Diffraction des rayons X

Le diffractogramme du biomatériau poreux avant immersion (figure 1) révèle des raies de cristallisation. Celles-ci sont caractéristiques d'une phase cristalline majoritaire: $Na_4Ca_4Si_6O_{18}$ (fiche JCPDS n°75-1686) et d'une seconde phase cristalline silicorhénanite: $Na_2Ca_4(PO_4)_2SiO_4$ (fiche JCPDS n°29-1193).

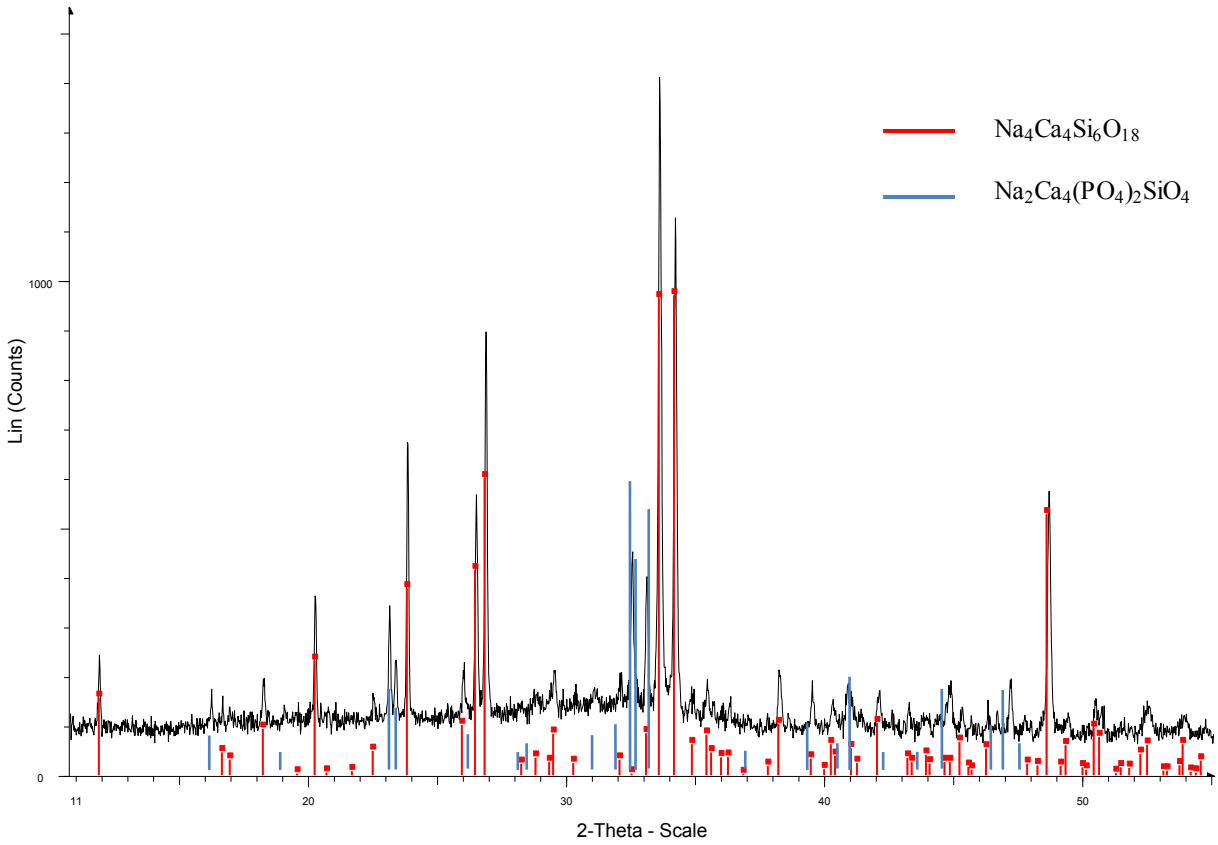


Figure 1: Diffractogramme de la vitrocéramique poreuse.

Dans la littérature, pour le verre 45S5, une cristallisation est observée à partir de 600°C et les phases identifiées sont les mêmes que celles trouvées pour notre biomatériau poreux [1]. Des questions se sont tout de même posées quant à la nature des cristaux formés. En effet, certaines études ont assimilé la phase $Na_2Ca_2Si_3O_9$ à la phase majoritaire [2]. D'autres résultats ont cependant penché en faveur de la phase $Na_2CaSi_2O_6$ car la composition du verre 45S5 est plus proche de cette phase. Toujours concernant le 45S5, entre 800-950°C, une seconde phase cristalline phosphatée apparait. Cette phase a été identifiée comme étant la phase silicorhénanite $Na_2Ca_4(PO_4)_2SiO_4$. Elle est isostructurelle à l'apatite et ne s'observe que pour des températures supérieures à 800°C [3]. Lin et al ont montré que dans le verre 45S5, le phosphore a le même comportement que dans la silice pure. Il tend à dépolymériser le réseau de silice, ce qui expliquerait la formation d'une phase cristalline phosphatée dans un réseau de silice [4].

Nous avons attribué les phases $Na_4Ca_4Si_6O_{18}$ et $Na_2Ca_4(PO_4)_2SiO_4$ par comparaison avec les fichiers JCPDS des phases cristallines répertoriées. Ces dernières correspondent aux raies de diffraction obtenues. La RMN du Solide des noyaux ^{29}Si et ^{31}P , dont l'originalité a porté sur

l'étude de la vitrocéramique après expérimentations *in vivo*, nous a cependant permis de confirmer la nature des phases cristallines. Celles-ci sont décrites à la suite de ce paragraphe.

A.2. Analyse par résonance magnétique nucléaire

Le spectre RMN-MAS ^{29}Si obtenu pour la vitrocéramique ainsi que le résultat de sa déconvolution (obtenu à l'aide du logiciel dmfit32 développé par le groupe de Dominique Massiot du CRMHT à Orléans [4]) sont présentés dans la figure 2.

Il met en évidence deux contributions distinctes situées à -79 et -89 ppm (largeur à mi-hauteur de 9 et 11 ppm respectivement). Ces dernières sont caractéristiques du silicium en environnement tétraédrique Q^2 et Q^3 respectivement : Q^2 représente une population de 21% de la population des tétraèdres SiO_4 et Q^3 une population de 79% [5]. Le verre 46S6 étudié par RMN dans les travaux antérieurs présente des populations en Q^2 et Q^3 de 80 et 20% à -78 et -87 ppm respectivement [6-7]. Nous observons une inversion dans les pourcentages de population. Le réseau de la vitrocéramique est donc plus condensé que celui du verre. Ceci est normal du fait de la cristallisation induite par le traitement thermique nécessaire à la synthèse de la vitrocéramique.

Les différences observées entre le verre et la vitrocéramique peuvent s'expliquer par des réarrangements atomiques, des distances ainsi que des angles des liaisons Si-O-Si modifiées. Les cations Ca^{2+} s'associent avec les espèces Q^2 alors que les cations Na^+ s'associent avec les espèces Q^3 [6, 8].

Le spectre du noyau ^{29}Si permet de confirmer la nature des phases cristallines observées par diffraction des rayons. En effet, les phases $Na_2Ca_2Si_3O_9$ et $Na_2CaSi_2O_6$ laisseraient apparaitre des populations Q^0. Or, nous n'observons que des Q^2 et des Q^3 et l'absence d'espèces Q^0 est caractéristique de la présence de la phase $Na_4Ca_4Si_6O_{18}$. Les espèces Q^2 représentent alors les espèces Q^2 de la phase amorphe et de la phase cristalline $Na_4Ca_4Si_6O_{18}$ de la vitrocéramique. L'espèce Q^3 caractérise une phase amorphe du fait de sa plus importante largeur à mi-hauteur et est caractéristique d'un désordre et d'une variation d'angle entre les tétraèdres SiO_4.

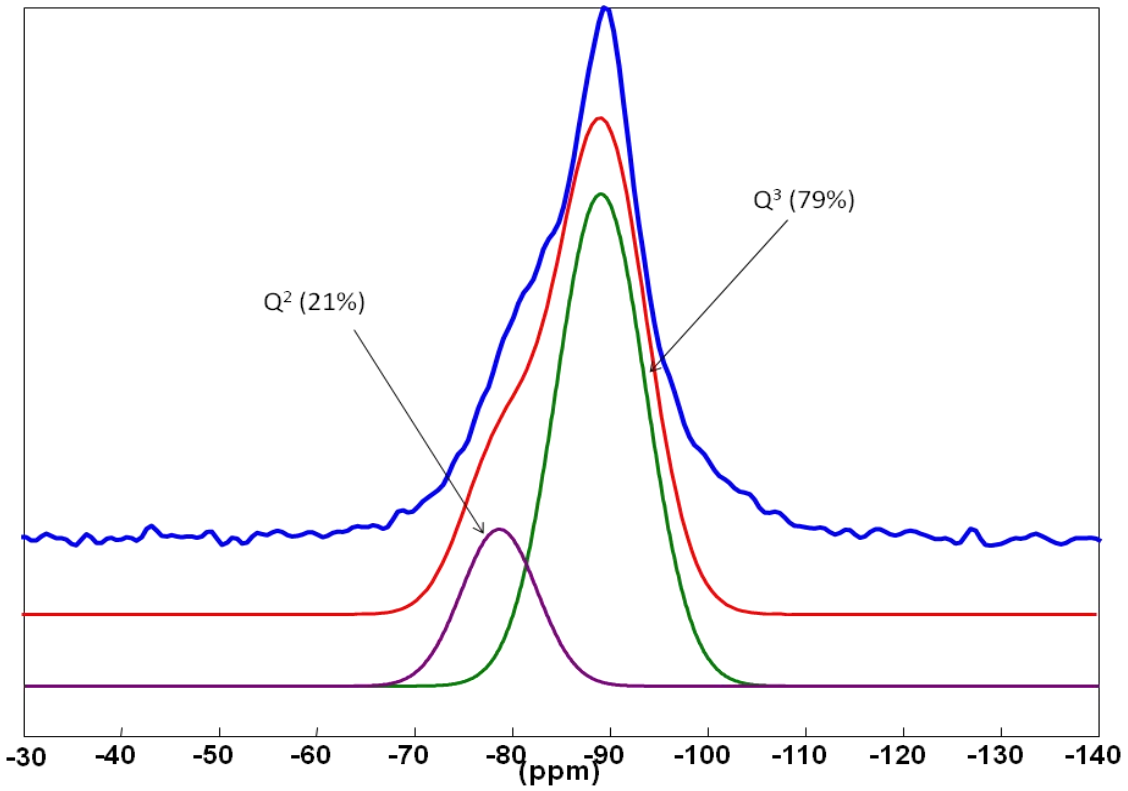


Figure 2: Spectre RMN-MAS ^{29}Si de la vitrocéramique poreuse

Le spectre RMN-MAS ^{31}P et les résultats de sa déconvolution obtenus pour la vitrocéramique poreuse sont présentés dans la figure 3. Il met en évidence deux résonances à 3 et 8 ppm caractéristiques des espèces du phosphore d'un environnement orthophosphate Q^0 [9]. Les largeurs à mi-hauteur de 1 et 15 ppm permettent d'attribuer la résonance à 3 ppm à une phase cristalline (notée Q^0_c) et celle à 8 ppm à une phase amorphe (notée Q^0_a). Nous avons, du fait des pourcentages des populations (52 et 48%), une répartition des phosphores équivalente entre la phase amorphe et la phase cristalline $Na_2Ca_4(PO_4)_2SiO_4$ formée.

Le verre 46S6 ne présente qu'une résonance à 7,5 ppm de 9 ppm de largeur à mi-hauteur, caractéristique de 100% d'espèce Q^0. Ces changements sont dus à la formation d'une phase cristalline. Dans la littérature, ont été mises en évidence des résonances caractéristiques d'un environnement sodium pyrophosphate $Na_4P_2O_7$ pouvant apparaitre entre 2 et 3 ppm [5, 9-10]. Le déplacement chimique en ^{31}P de $Ca_3(PO_4)_2$ est compris entre 0 et 4 ppm [5] et celui de $NaCaPO_4$ à 2 ppm. Il n'est donc pas aisé d'identifier exactement la résonance aux alentours de 3 ppm. Il est fort probable qu'elle soit due à la présence de la phase cristalline silicorhénanite $Na_2Ca_4(PO_4)_2SiO_4$.

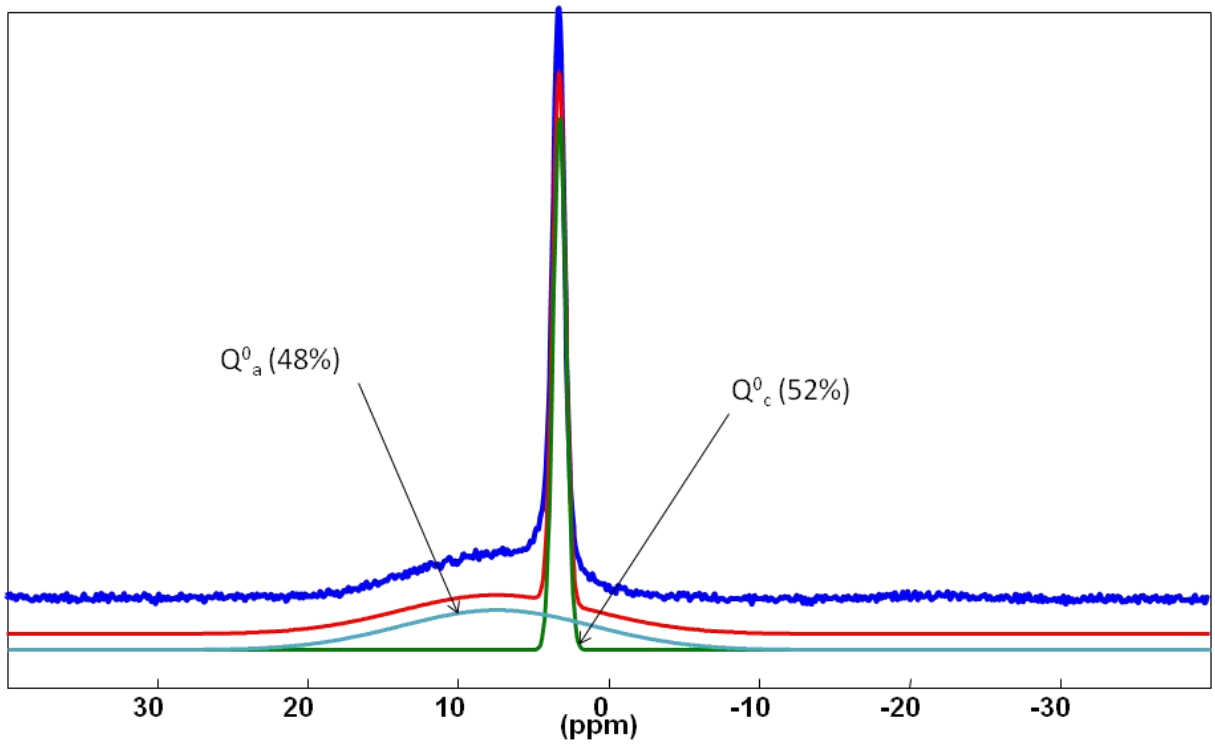


Figure 3 : Spectre RMN-MAS ^{31}P de la vitrocéramique poreuse.

A.3. Analyse par thermo-diffractométrie

Cette analyse a été entreprise sur le verre 46S6-8Zn utilisé pour synthétiser la vitrocéramique poreuse. Le but est d'étudier l'évolution des deux phases cristallines. L'étude a été effectuée entre 10 et 50° (2θ) avec un pas de 0,04° (2θ), jusqu'à 1000°C et suivant une montée en température de 35°C/heure. Les analyses par diffraction des rayons X ont été faites en continu et non par palier de température.

La figure 4 regroupe les thermo-diffractogrammes obtenus. Ils ont été enregistrés entre 25 et 1050°C. Il y a une différence de 15°C entre chaque diffractogramme. La figure 4 a été tracée en commençant par la mesure effectuée à 507°C présentant un halo de diffraction comme à température ambiante.

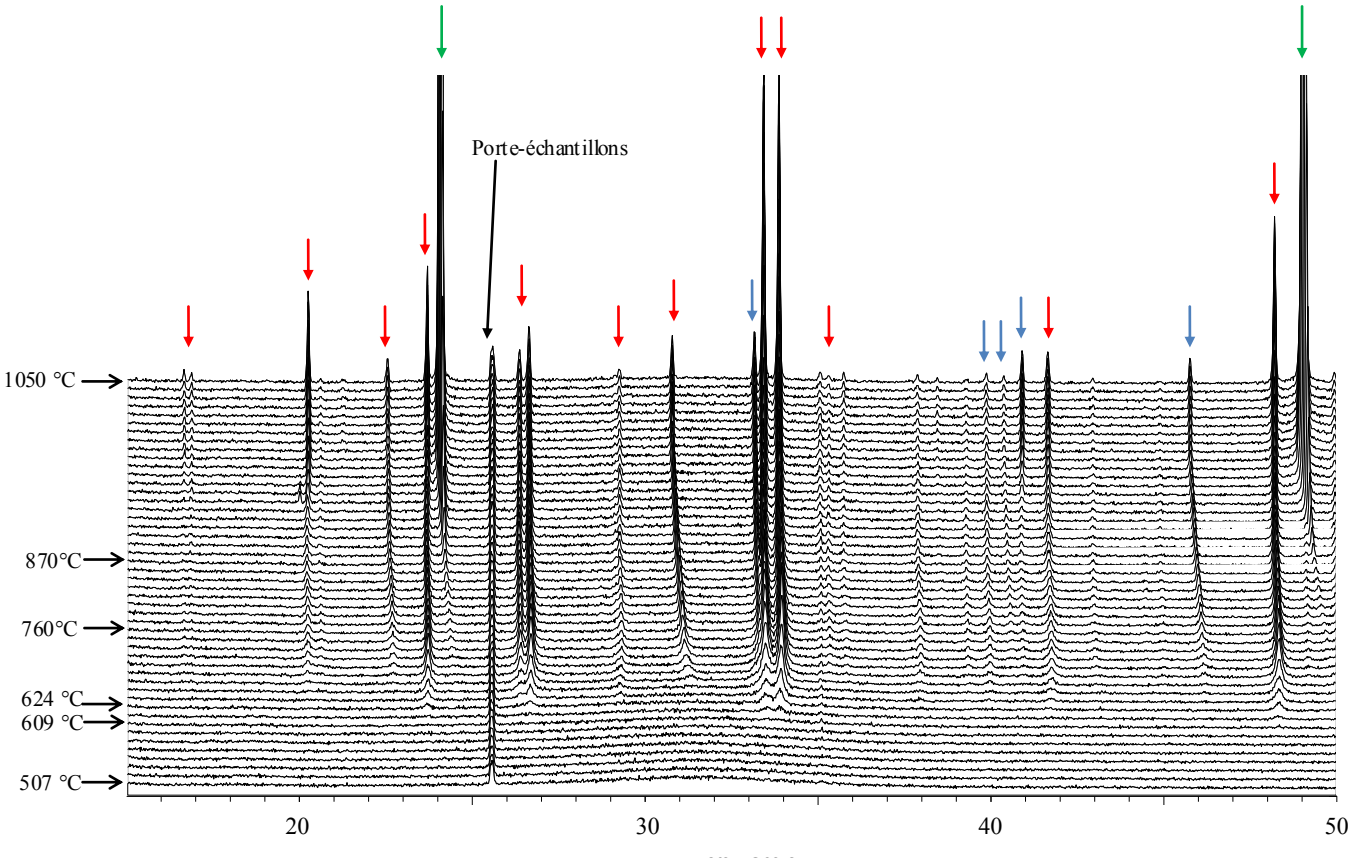


Figure 4 : Thermo-diffractogrammes du verre 46S6-8Zn.

Entre 507 et 609°C, un halo de diffraction, caractéristique d'un matériau amorphe, est observé. La cristallisation du verre 46S6-8Zn débute aux alentours de 624°C. Au cours du traitement thermique, la cristallisation augmente avec une première apparition de la phase $Na_4Ca_4Si_6O_{18}$ dès 624°C (flèches rouges) qui gagnera en intensité jusqu'à 1000°C. La seconde phase $Na_2Ca_4(PO_4)_2SiO_4$ cristallise aux alentours de 760°C (flèches bleues).

Cependant, nous pouvons distinguer deux raies de diffraction (flèches vertes) apparaissant lorsque la température atteint environ 870°C mais qui ne sont pas observées lors de l'analyse de la vitrocéramique à température ambiante. La phase $Na_2Ca_4(PO_4)_2SiO_4$ s'observe également mieux à température ambiante (figure 1 page 182).

Ces différences peuvent être attribuées à des substitutions d'éléments chimiques au sein du verre lorsqu'il est soumis à un traitement thermique. Des phases apparaissent alors à forte température et sont ensuite substituées, du fait d'un réarrangement atomique, par une autre phase. C'est pourquoi le diffractogramme du verre 46S6-8Zn chauffé à 1000°C et celui de la vitrocéramique présentent de légères différences. Et c'est également pour cette raison que

dans certains travaux, la phase majoritaire, que nous avons attribuée à $Na_4Ca_4Si_6O_{18}$, est attribuée à $Na_2CaSi_2O_6$.

A.4. Spectroscopie d'absorption infrarouge

Le spectre infrarouge du biomatériau poreux (figure 5), par comparaison avec celui du verre 46S6, montre l'apparition de nouvelles bandes. Celles-ci sont dues aux phases cristallines formées lors du traitement thermique nécessaire à l'élaboration de la vitrocéramique poreuse.
Les liaisons Si-O sont toujours majoritaires et apparaissent à 451 cm^{-1} et 526 cm^{-1} pour les vibrations angulaires, à 922 cm^{-1} pour les vibrations d'étirement et à 1037 cm^{-1} pour les vibrations des liaisons Si-O-Si formant les tétraèdres SiO_4 [11]. Cependant, nous observons des déplacements ainsi que de nouvelles liaisons caractéristiques d'une modification dans la structure chimique. Ces différences sont expliquées par la présence des phases cristallines dans la vitrocéramique.
Les mêmes observations sont faites pour le phosphore ; à 576 cm^{-1} et 620 cm^{-1}, les vibrations angulaires de liaisons P-O apparaissent [11] et confirment l'apparition d'une phase cristalline phosphatée.

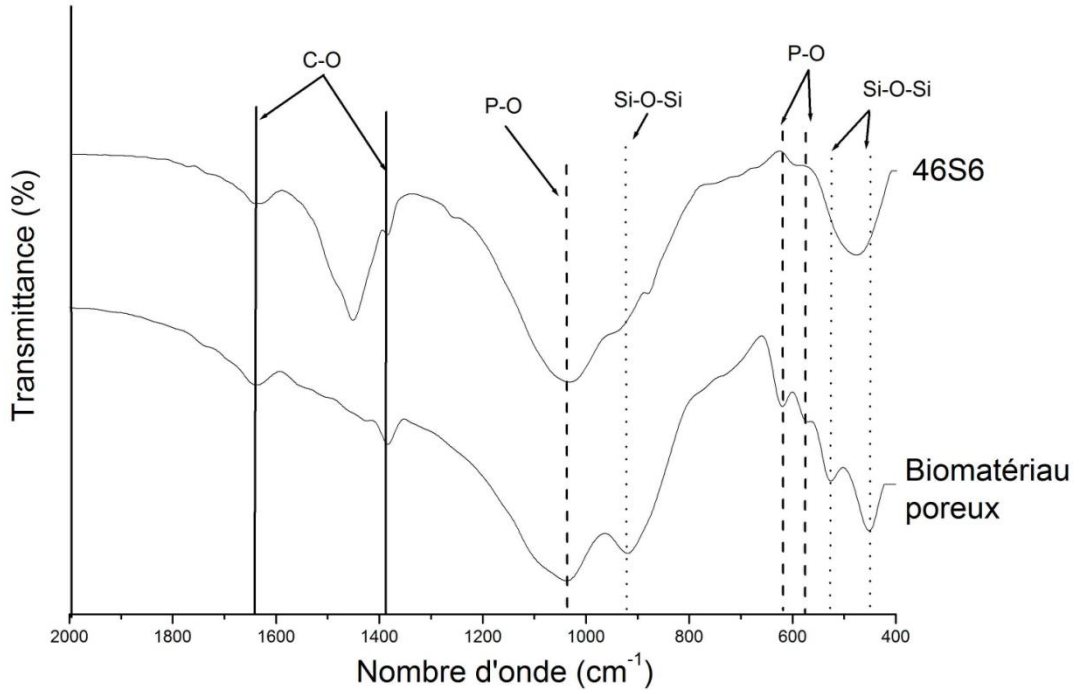


Figure 5 : Spectre infrarouge de la vitrocéramique poreuse et du verre 46S6.

B. Evaluation de la porosité par différentes méthodes

De plus en plus de biomatériaux poreux sont utilisés en chirurgie réparatrice. La porosité permet aux cellules de coloniser le biomatériau, aux fluides de circuler et favorise la colonisation du biomatériau par les cellules, par la matière organique et facilite la circulation des fluides physiologiques. Différentes porosités (nano, micro, méso et macroporosité) existent et différentes méthodes d'analyse permettent d'appréhender ces dernières.

B.1. Les différentes porosités

Par définition, un pore est une cavité plus profonde que large qui existe dans un matériau [12]. La figure 6 schématise un grain poreux ; il est formé par :

- les irrégularités se trouvant à la surface du grain (a) caractéristiques de sa rugosité ;
- **les pores ouverts** qui débouchent à la surface du grain (b, c, d, e) ou **fermés** (f) ; dans ce dernier cas, ils sont inaccessibles aux fluides.
- les pores **borgnes**, c'est-à-dire ouverts à une seule extrémité (b, e) ;
- les pores **en intercommunication** (c et d).

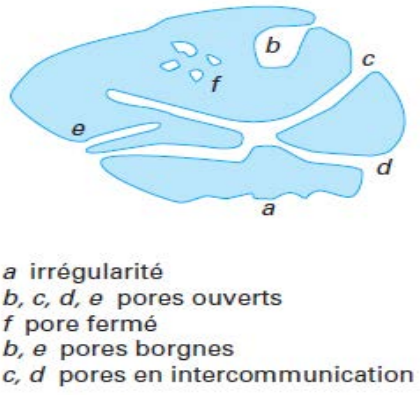


Figure 6 : Schéma des différentes porosités [6]

Notons que, dans tous les cas, l'accessibilité des pores ouverts à un fluide (gazeux ou liquide) dépend du rapport de la taille de la molécule à l'ouverture de celui-ci, c'est pourquoi nous avons utilisé différentes techniques pour la mesure de la porosité.

B.2. Calcul du volume de porosité par la méthode d'Archimède

Cette méthode permet de calculer le taux de porosité du biomatériau poreux en distinguant la porosité ouverte et la porosité fermée. Le principe et le protocole de cette méthode sont expliqués dans le chapitre 2 et en annexe 9. Les mesures ont été réalisées en triplicata pour s'assurer de la reproductibilité. Pour le biomatériau poreux, seul l'hexane a pu être utilisé pour immerger entièrement le matériau dans le solvant. Au préalable, la densité du matériau poreux (2,03 $g.cm^{-3}$) a été mesurée par pycnométrie à hélium pour pouvoir calculer les pourcentages des différentes porosités donnés par les formules décrite en annexe 9 :

$$P_{ouverte} = \frac{\left[m_h - m_s\right] / \rho_{Hexane}}{\left[\left(m_h - m_i\right) / \rho_{Hexane}\right]}$$

$$P_{\text{totale}} = \frac{\left[m_h - m_s\right] - \left[m_s \times \rho_{Hexane} / \rho_{théorique}\right]}{\left[m_h - m_i\right]}$$

Où : $\mathbf{m_s}$ masse de l'échantillon sec, $\mathbf{m_h}$ masse de l'échantillon imprégné, $\mathbf{m_i}$ masse de l'échantillon imprégné, $\boldsymbol{\rho}_{\mathbf{Hexane}}$ densité de l'hexane = 0,66 $g.cm^{-3}$, $\boldsymbol{\rho}_{\mathbf{Théorique}}$ densité théorique de l'échantillon = 2,03 $g.cm^{-3}$.

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 1 et 2:

	Expérience N°1	**Expérience N°2**	**Expérience N°3**
$\mathbf{m_s}$ **(g)**	1,58	2,31	2,09
$\mathbf{m_h}$ **(g)**	1,74	2,53	2,31
$\mathbf{m_i}$ **(g)**	0,31	0,57	0,48

Tableau 1 : Masse du biomatériau poreux sec (m_s), masse du biomatériau poreux humide (m_h) et masse du biomatériau imprégné (m_i)

Avec la densité de l'hexane, nous obtenons les valeurs de densité hydrostatique et de porosité suivantes :

	Expérience N°1	**Expérience N°2**	**Expérience N°3**	**Valeur moyenne**
Densité hydrostatique ($g.cm^{-3}$)	0,73	0,78	0,76	0,76
$P_{ouverte}$ %	10,94	11,25	10,84	11,01
$P_{fermée}$ %	52,98	50,18	51,82	51,66
P_{totale} %	63,92	61,43	62,66	62,67

Tableau 2 : Densité hydrostatique et valeurs des différentes porosités obtenues

La méthode d'Archimède nous a permis d'obtenir des informations sur les différents volumes de porosité du biomatériau poreux synthétisé. Ainsi, en moyenne, le biomatériau poreux présente 63% de porosité totale dont 11% de porosité ouverte et 52% de porosité fermée. Afin de connaître la répartition en taille des pores, la porosimétrie à mercure et la méthode BET ont été utilisées.

B.3. Détermination de la surface spécifique et du type de porosité par la méthode BET

La méthode et son principe sont décrits dans le chapitre 2 et en annexe 11.

Cette analyse a été menée pour nous permettre de disposer des informations sur la surface spécifique et la répartition en taille des pores du biomatériau poreux. Cette méthode repose sur les phénomènes d'adsorption et désorption du diazote et a déjà été utilisée pour mesurer la surface spécifique d'un verre expansé utilisé pour une application environnementale [13]. La courbe obtenue, figure 7 ($V_{adsorbé} = f(P/P_0)$), donne des informations sur le type de porosité présente dans le biomatériau.

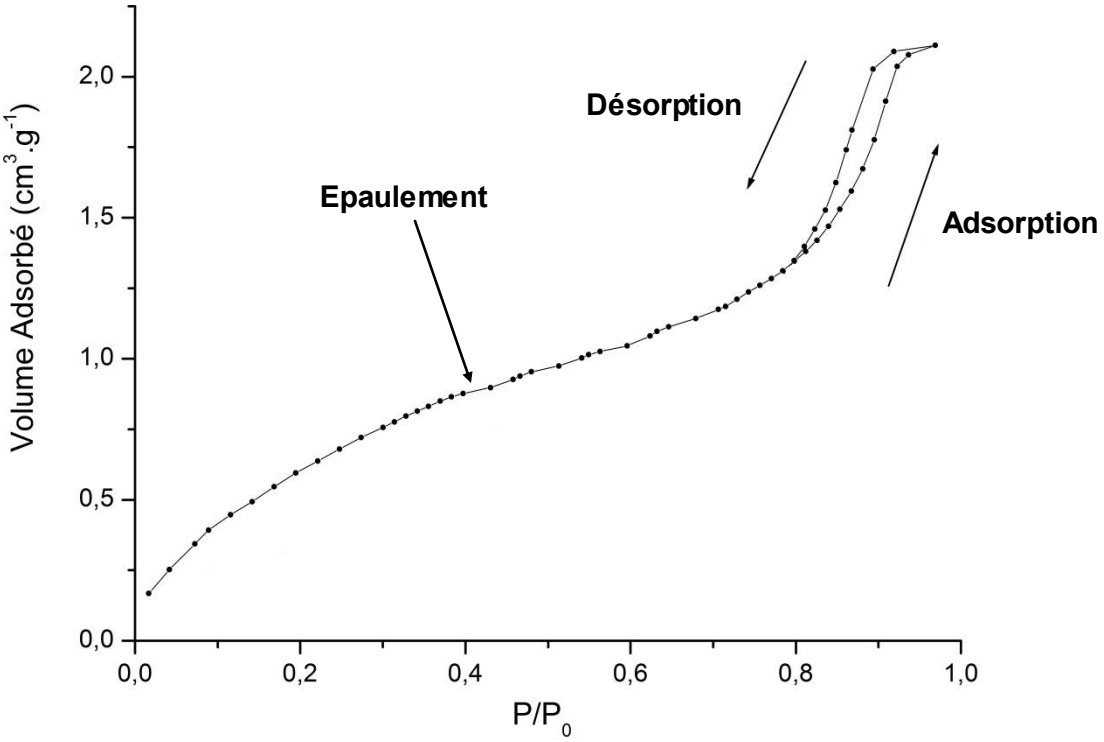


Figure 7 : Courbe adsorption/désorption obtenue pour le biomatériau poreux

Cette courbe adsorption/désorption laisse apparaître une hystérésis. Il est fréquent de voir une hystérésis de la courbe de désorption par rapport à la courbe d'adsorption. Les différentes formes de la boucle d'hystérésis ont été classées par l'IUPAC (annexe 11). Ici, il s'agit d'une hystérésis de type IV et de type H_1, caractérisée par un palier de saturation aux fortes pressions. La boucle d'hystérésis H_1 présente ici des branches d'adsorption et de désorption parallèles et presque verticales. Ce type d'hystérésis est observé dans le cas d'adsorbants ayant une texture rigide et une distribution très étroite de mésopores. La présence de l'hystérésis indique également un phénomène de condensation capillaire ayant lieu au niveau des mésopores et des macropores du matériau. De plus, l'épaulement aux alentours de la pression relative 0,4 indique la localisation de la formation de la première monocouche d'adsorbat. Le même type d'hystérésis est obtenu dans le cas des alumines mésoporeuses [12].

La droite BET obtenue (figure 8) permet, grâce à l'équation BET (1), d'obtenir la surface spécifique du biomatériau selon les formules données en annexe 11.

$$S_{BET} = \frac{V_{Mono} \times A_M \times N_A}{V_M} \quad (1)$$

Où $\mathbf{S_{BET}}$ surface spécifique ($m^2.g^{-1}$), $\mathbf{V_{Mono}}$ volume d'une monocouche adsorbée ($m^3.g^{-1}$), $\mathbf{N_A}$ le nombre d'Avogadro (6,023.1023 mol^{-1}) et $\mathbf{V_M}$ volume molaire du gaz (22414 $m^3.mol^{-1}$).

La relation (2) représente l'équation de la droite BET obtenue.

$$\frac{P}{[V_{Ads} \times (P_0 - P)]} = 0{,}10 + 1{,}55 \times \left(\frac{P}{P_0}\right) \quad (2)$$

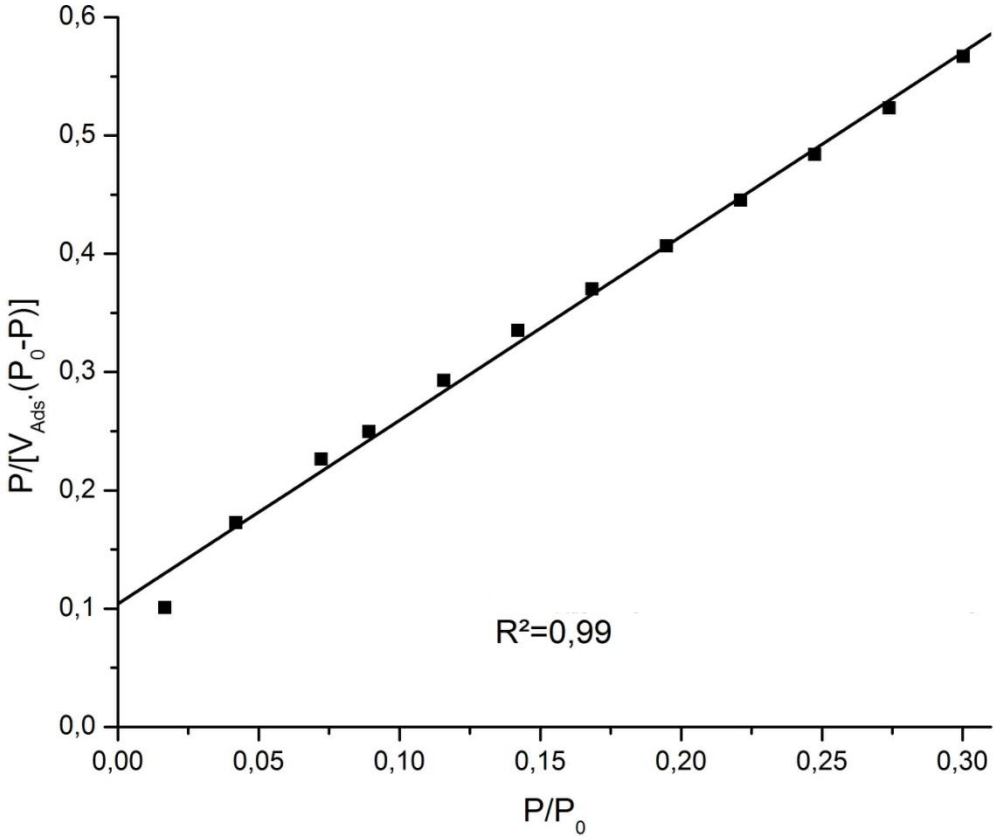


Figure 8 : Droite BET obtenue pour le biomatériau poreux

La surface spécifique trouvée S_{BET} vaut 2,63 (± 0,06) $m^2.g^{-1}$.

Le logiciel d'analyse de l'appareil de mesure peut également nous renseigner sur la taille moyenne des pores en supposant que la forme des pores soit cylindrique. Cette taille est

calculée à partir de la courbe de désorption car elle est représentative d'un équilibre entre adsorbat et adsorbant [14]. A partir de cette méthode, la taille moyenne des pores de notre échantillon est de 6 nm (mésoporosité).

B.4. Répartition en taille des pores par porosimétrie à mercure

L'analyse fine de la porosité par porosimétrie à mercure a été réalisée sur un appareil Autopore IV 9500 de chez Micromeritics.

Avant tout développement, il est nécessaire de rappeler que l'injection de mercure correspond à l'envahissement de l'espace poreux par un fluide non mouillant.

Cette méthode nous permet d'avoir le volume de porosité de l'échantillon ainsi que la répartition en taille des pores. En aucun cas, nous ne pouvons avoir une information sur l'intercommunication des pores. La figure 9 suivante présente les courbes cumulée et dérivée de distribution de pores du biomatériau poreux. L'analyse a été réalisée sur une pastille de biomatériau soigneusement découpée dont les dimensions sont les suivantes : r = 0,75 cm et h = 0,50 cm soit un volume apparent de 0,89 cm^3 et de masse m = 0,25 g.

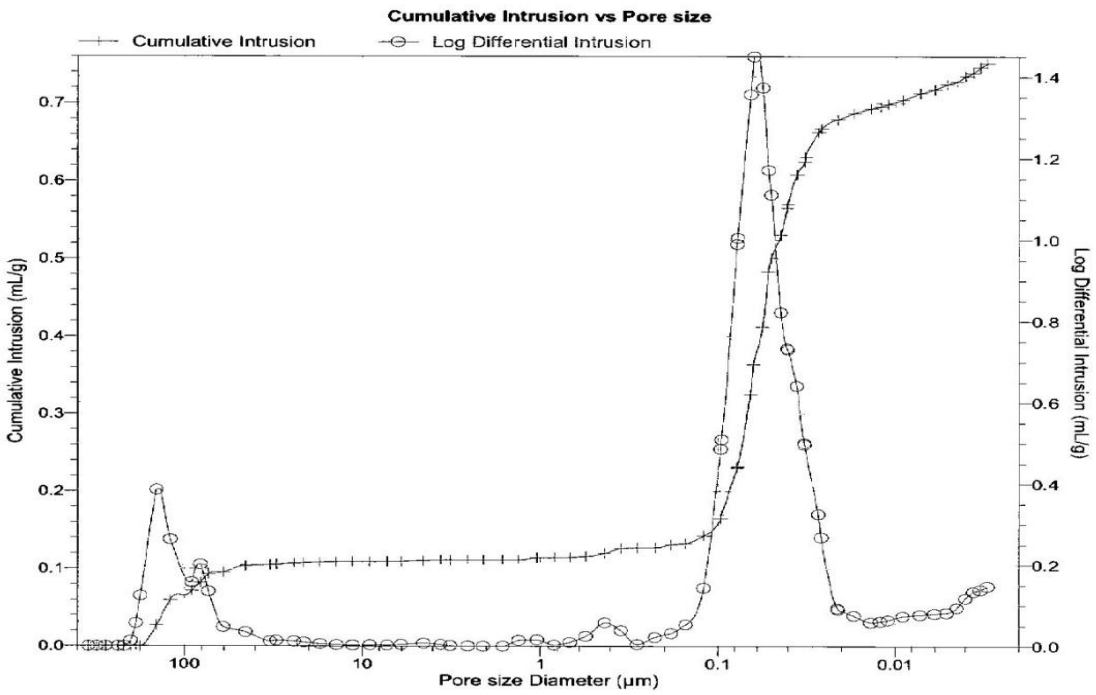
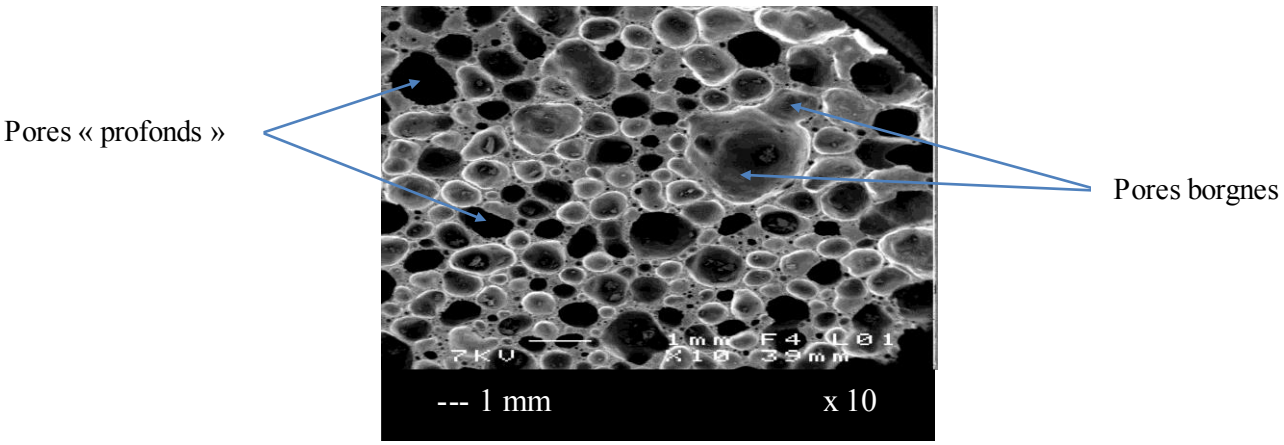


Figure 9 : Courbes cumulée et dérivée de la distribution des pores dans le biomatériau poreux.

La porosimétrie à mercure présente un volume d'intrusion de mercure de 0,75 $mL.g^{-1}$ pour un volume de biomatériau égal à 0,89 cm^3 et met en évidence une première classe de pores centrée sur un rayon moyen de 0,06 µm ; et une seconde classe de pores de rayon supérieur à 80 µm faible (classe centrée sur un rayon moyen de 81 µm et une autre classe centrée sur un rayon moyen de 143 µm).
De plus, la porosité totale, donnée directement après calcul du logiciel, est de 64%. Ce résultat est en accord avec la porosité totale obtenue par la méthode d'Archimède (63%).

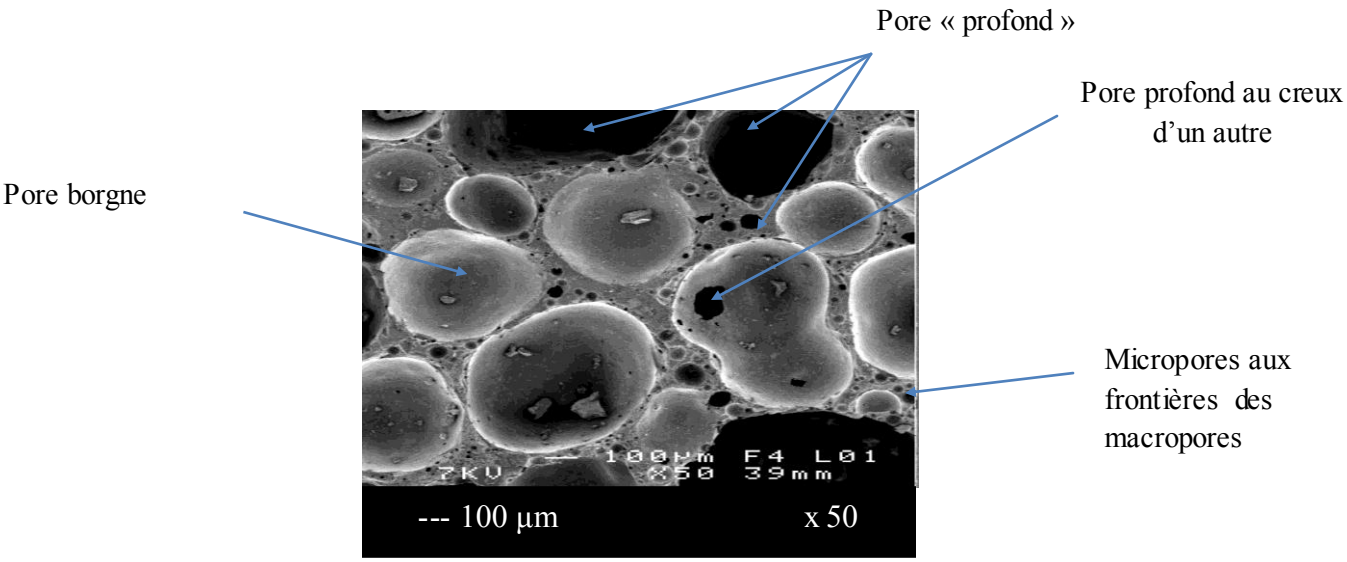
B.5. Etude morphologique par MEB

La microscopie électronique à balayage nous a permis d'observer l'aspect des pores et l'aspect de surface du biomatériau. Les micrographies suivantes ont été prises aux grossissements 10, 50, 300, 5000 et 20000.



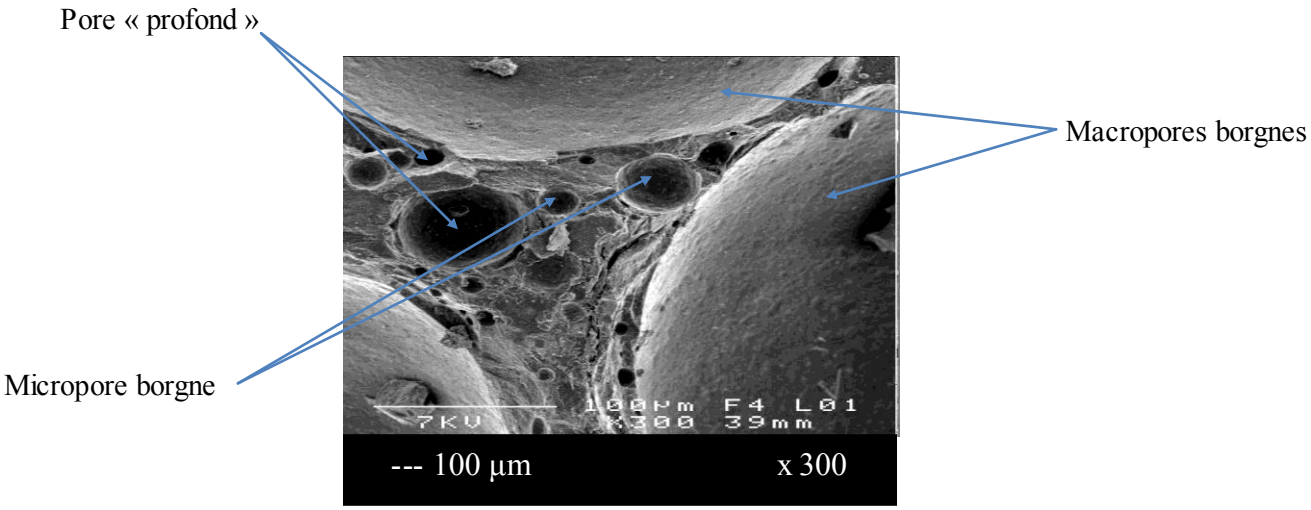
Biomatériau poreux (x10)

Ce grossissement nous permet d'avoir une vue d'ensemble de la surface du biomatériau poreux. Ici nous pouvons voir la présence de macropores de taille de l'ordre du millimètre. Les pores ayant une couleur gris clair sur la photographie sont des pores borgnes ouverts c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'interconnexion. Ceux en noir ,caractéristiques de pores plus profonds, peuvent être des pores en intercommunication, des pores ouverts ou des pores borgnes profonds.



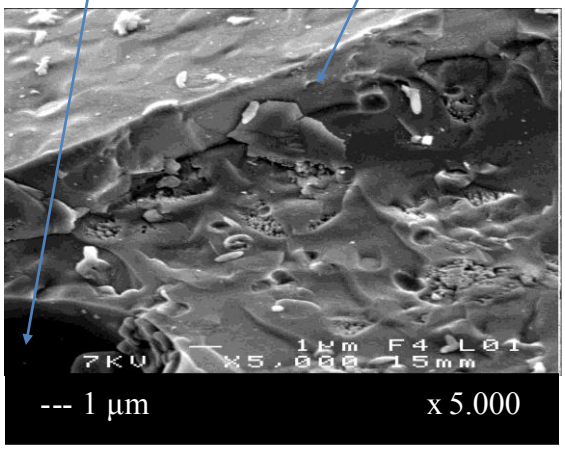
Biomatériau poreux (x50)

Sur cette micrographie, des pores borgnes d'une centaine de micromètres sont visibles ainsi que des pores « en noir », comme précédemment, que nous ne pouvons identifier. Certains pores borgnes, en leur creux, possèdent également d'autres pores qui laissent penser à une porosité interconnectée. Des pores de taille de l'ordre du micromètre sont observés à la frontière de plusieurs macropores.

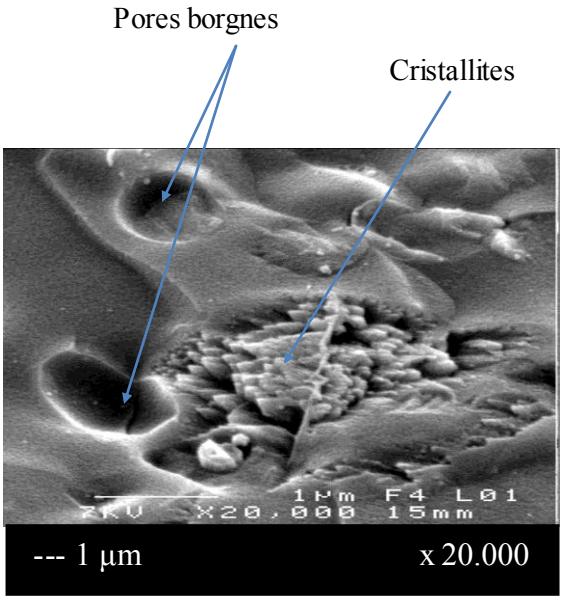


Biomatériau poreux (x300)

Sur cette micrographie au grossissement 300, nous observons, sur la frontière de plusieurs macropores borgnes, la présence de micropores profonds ou borgnes.



Biomatériau poreux (x500)



Biomatériau poreux (x20000)

Sur ces micrographies au grossissement 500 et 20000, nous observons la présence d'irrégularités de surface ainsi que de pores borgnes de taille égale ou inférieure au micromètre.

Le MEB nous donne par conséquent des indications sur le type de porosité présent au sein du biomatériau. Ici, il y a divers types de pores :

- des macropores et des micropores borgnes,
- des pores « profonds » de taille variée laissant apparaître une porosité ouverte et probablement en intercommunication.

Ces observations sont donc en accord avec les méthodes utilisées dans le sens où une diversité de pores est observée.

Conclusion :

La vitrocéramique poreuse présente deux phases cristallines bien distinctes : une phase cristalline majoritaire $Na_4Ca_4Si_6O_{18}$ et une seconde phase cristalline silicorhénanite: $Na_2Ca_4(PO_4)_2SiO_4$.

Les différentes analyses complémentaires de la porosité nous révèlent un biomatériau avec environ 63% de porosité totale dont 11% de porosité ouverte et 52% de porosité fermée. Par comparaison, l'os cortical présente une porosité allant de 5 à 30% et l'os spongieux entre 30 et 90% [15]

La méthode BET présente un biomatériau mésoporeux c'est-à-dire avec des tailles de pores comprises entre 2 et 50 nm avec une taille moyenne de 6 nm. La porosimétrie à mercure indique une classe majoritaire de pore centrée sur un rayon moyen de 0,06 µm avec une porosité supérieure à 80 µm plus faible.

Les méthodes complémentaires utilisées ne peuvent indiquer si les pores sont en intercommunication. Il serait intéressant, pour la suite de ces travaux de recherche, d'étudier le biomatériau poreux par tomographie X ou tomographie ultrasonore 3D par empilement d'image 2D dans le but d'avoir l'architecture du biomatériau en trois dimensions [14].

II. Comportement *in vitro* d'une vitrocéramique poreuse au contact d'un liquide physiologique synthétique.

Comme pour l'étude de la bioactivité des verres bioactifs, nous nous sommes intéressés à l'apparition en surface de l'hydroxyapatite et aux échanges ioniques ayant lieu entre la vitrocéramique poreuse et le SBF. Il s'agit d'une première étape nécessaire avant d'entreprendre les tests de viabilité cellulaire et les expérimentations *in vivo*.
Les caractérisations physico-chimiques de la vitrocéramique, obtenues après immersion dans le SBF, sont présentées dans cette partie.

A. Caractérisations structurales du biomatériau poreux après immersion dans le SBF.

Différentes techniques d'analyses physico-chimiques ont permis de suivre l'évolution de la structure chimique, de la morphologie et de la cinétique de bioactivité de la vitrocéramique poreuse.
Les analyses ont été réalisées pour les courts délais allant de 2 à 16 heures. Elles ont aussi été réalisées pour les longs délais allant de 1 à 60 jours.
La figure 1 représente les diffractogrammes de notre biomatériau poreux immergé de 1 à 60 jours.

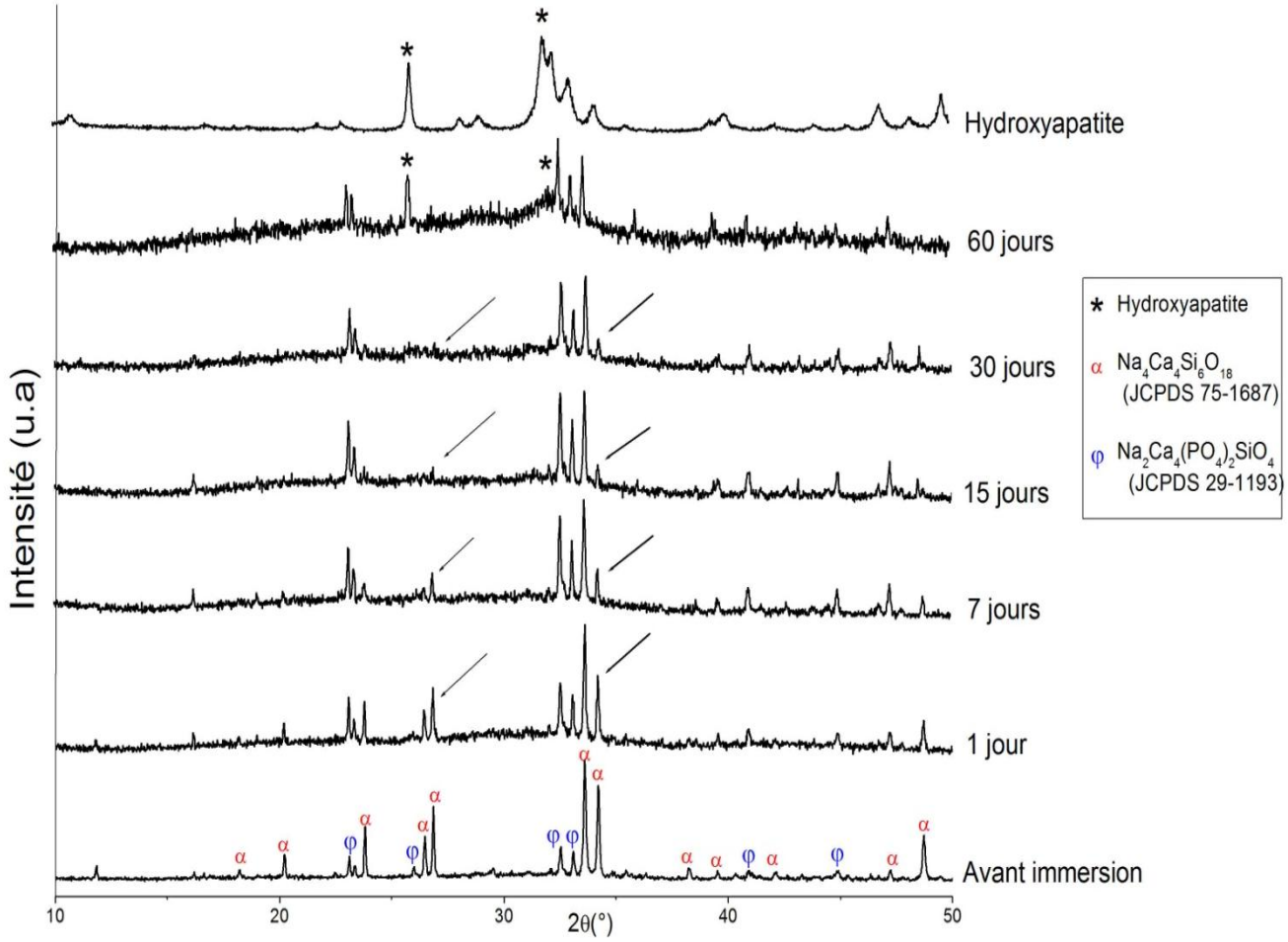


Figure 1 : Diffractogrammes du matériau poreux après immersion dans le SBF de 1 à 60 jours.

Avant immersion, nous avons décrit dans le chapitre précédent la présence de deux phases cristallines: $Na_4Ca_4Si_6O_{18}$ et $Na_2Ca_4(PO_4)_2SiO_4$.

A partir d'1 jour d'immersion, nous constatons que les raies de diffraction caractéristiques de la phase $Na_4Ca_4Si_6O_{18}$ entre 25 et 28 (2θ°) commencent à disparaître. Plusieurs raies caractéristiques de cette phase ont totalement disparu après 30 jours d'immersion.

D'un point de vue plus général, toutes les raies de diffraction, au fur et à mesure de l'augmentation du délai d'immersion, ont tendance à s'estomper. Après 60 jours d'immersion, la variation de l'intensité du fond continu des diffractogrammes montre une perte de densité du réseau cristallin, synonyme d'un phénomène d'amorphisation. La phase amorphe de la vitrocéramique apparaît au détriment des phases cristallines qui se dégradent dans le SBF. Cette amorphisation s'explique par l'existence d'une bioactivité en 4 étapes [16]:

- **Première étape**: Dissolution préférentielle aux interfaces verre/cristaux

- **Deuxième étape**: Introduction du liquide physiologique synthétique dans les défauts créés par cette dissolution.

- **Troisième étape**: Décomposition des cristaux en particules plus fines

- **Quatrième étape**: Dissolution continue de la matrice vitreuse. Puis, dégradation graduelle de la structure cristalline par l'augmentation de défauts ponctuels créés lors des échanges ioniques entre le matériau et le liquide physiologique synthétique. Et enfin, formation d'une couche amorphe de silice et d'hydroxyapatite.

Après 60 jours d'immersion, des raies caractéristiques de l'hydroxyapatite apparaissent à 26 et 32 (2θ). Cette apparition d'hydroxyapatite, comparé au 45S5 ou à notre verre de référence 46S6, est plus lente. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'introduction de 8% en masse de zinc ralentit la cinétique de bioactivité du 46S6 (voir chapitre 2). Au contraire, les 0,1% en masse de titane présents aboutissent à une formation d'hydroxyapatite après 15 jours d'immersion pour le verre 46S6. Les effets des deux éléments sont donc moyennés.
Cependant, dans la littérature, la phase rhénanite $NaCaPO_4$ a été étudiée et les résultats ont montré qu'elle avait une influence sur la cristallisation d'une hydroxyapatite carbonatée [17]. En effet, d'après certains travaux, la rhénanite joue le rôle de nucleis hétérogène et pourrait augmenter la bioactivité des matériaux. En effet, des expérimentations dans des alvéoles de dents de chien, d'un mélange d'hydroxyapatite et de rhénanite, pour des périodes de 3 à 6 mois, ont montré que la rhénanite se transforme totalement en hydroxyapatite. La phase rhénanite participerait activement au processus de corrosion par la réaction suivante [18-19]:

$$3NaCaPO_4 + H_2O + 2Ca^{2+} <==> Ca_5(PO_4)_3(OH) + 3Na^+ + H^+$$

Les mêmes échantillons ont été analysés par spectroscopie infrarouge dans le but de voir les éventuelles formations (ou disparitions) de liaisons chimiques. La figure 2 présente les spectres du matériau poreux immergé de 1 à 60 jours.

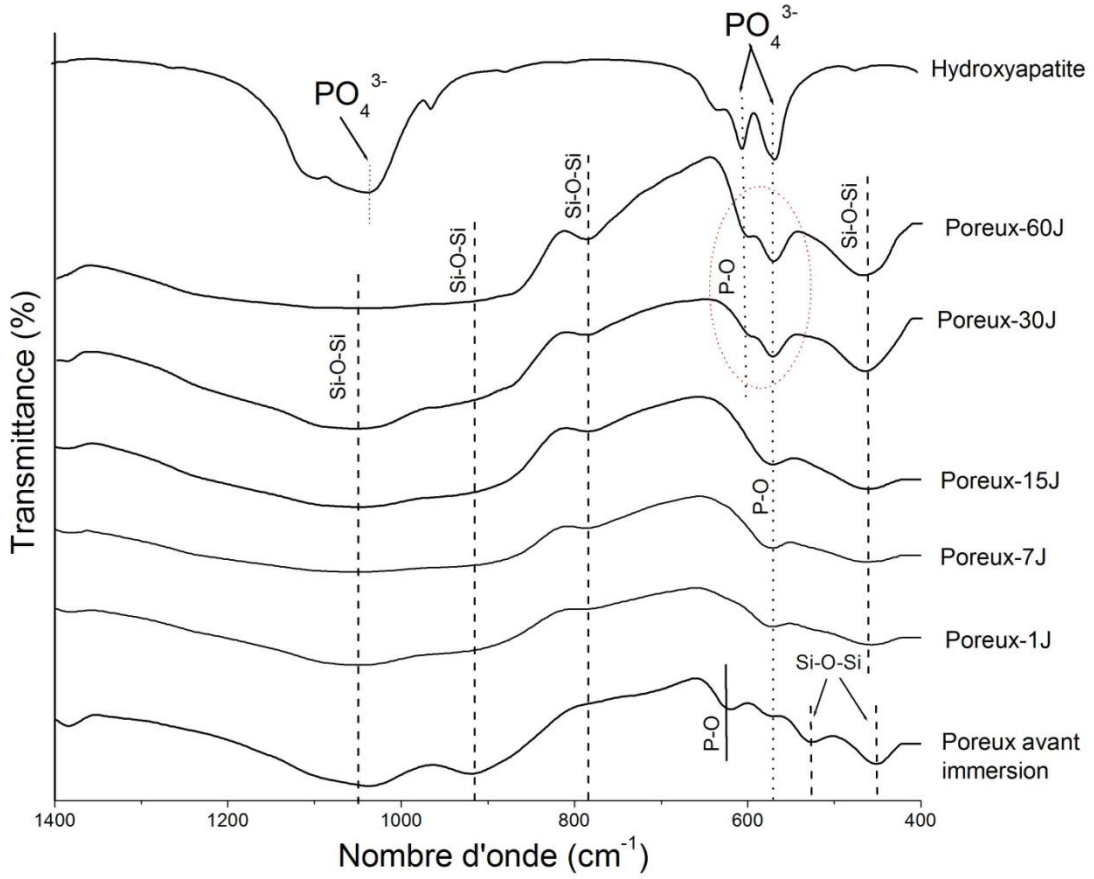


Figure 2 : Spectre infrarouge du matériau poreux après immersion dans le SBF de 1 à 60 jours

Avant immersion, le matériau poreux présente des liaisons Si-O à 451 cm^{-1} et 526 cm^{-1} pour les vibrations angulaires, à 922 cm^{-1} pour les vibrations d'étirement et à 1037 cm^{-1} pour les vibrations des liaisons Si-O-Si formant les tétraèdres SiO_4 [11]. A 576 cm^{-1} et 620 cm^{-1}, les vibrations angulaires de liaisons P-O apparaissent [11] et confirment donc l'apparition de la phase silicorhénanite.

A partir de 30 jours d'immersion, les liaisons P-O de la phase cristalline disparaissent au profit de la formation de liaisons P-O à 605 et 576 cm^{-1}. Ces dernières augmentent en intensité au cours du temps et sont caractéristiques d'une hydroxyapatite.

D'autres modifications apparaissent, particulièrement pour les bandes d'absorption caractéristiques de liaisons Si-O-Si à 462 et 785 cm^{-1}, qui, au fur et à mesure de l'immersion, augmentent en intensité. Cela peut s'expliquer par la quatrième étape du phénomène de bioactivité durant laquelle une couche de silice amorphe se forme en surface du matériau. L'augmentation de cette intensité est caractéristique de la croissance de cette couche.

Ces résultats confirment ceux obtenus par diffraction des rayons X.

B. Echange ionique entre le matériau poreux et le liquide physiologique synthétique

Dans le but de mieux appréhender la formation d'hydroxyapatite observée par diffraction des rayons X et par spectroscopie infrarouge, le calcium et le phosphore ont été dosés. La concentration en silicium, élément majoritaire dans la composition chimique de la vitrocéramique, a également été étudiée car elle permet de déterminer la cinétique de dissolution du matériau. De même, les éléments zinc et titane, physiologiquement intéressants, ont été analysés pour déterminer la concentration relarguée au cours du temps.
Les figures 3-4-5-6 et 7 représentent les variations respectives des concentrations en silicium, calcium, phosphore, zinc et titane, mesurées par ICP-OES pour des temps d'immersion allant de 0 à 16 heures (courts délais) et de 1 à 60 jours (longs délais). Chaque point des courbes obtenues représente une moyenne effectuée sur un ensemble de 3 échantillons par délai.

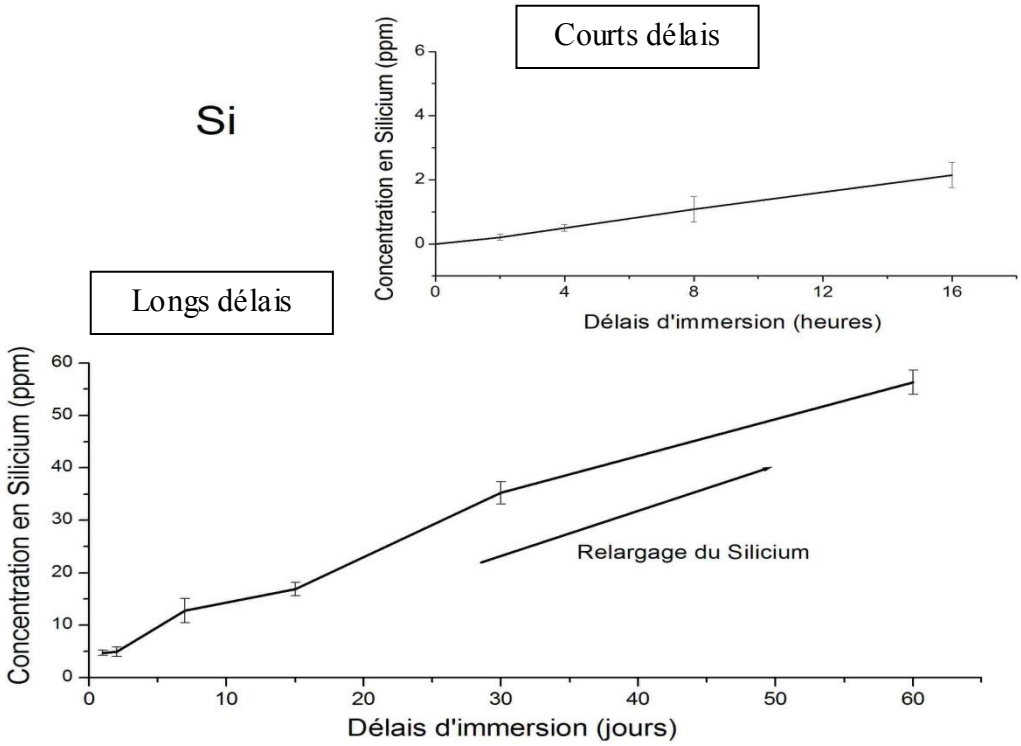


Figure 3 : Concentration en silicium dans le SBF après immersion de la vitrocéramique

Pour le silicium, la concentration augmente continuellement jusqu'à 60 jours d'immersion. Elle atteint 2 ppm après 16 heures d'immersion puis 56 ppm après 60 jours. Une dégradation progressive de la vitrocéramique est mise en évidence par ce résultat.

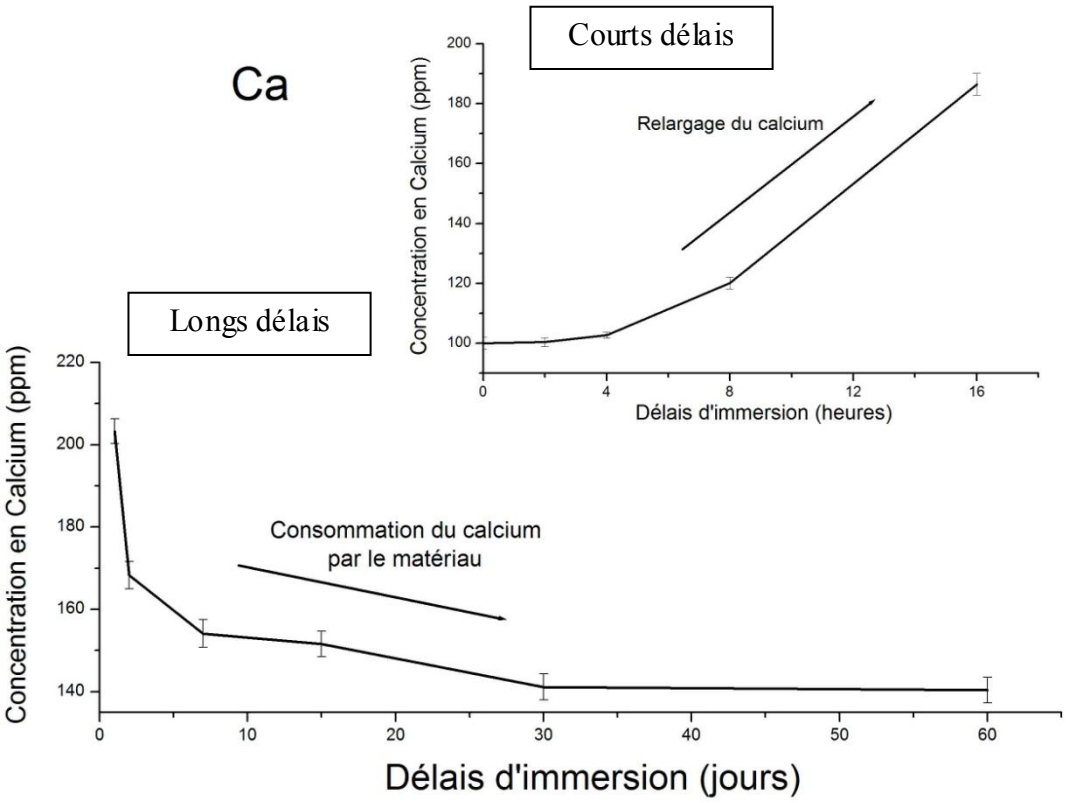


Figure 4 : Concentration en calcium dans le SBF après immersion de la vitrocéramique

Pour le calcium, nous distinguons deux phénomènes. Une modification importante a lieu durant les premières heures jusqu'à 16 heures d'immersion où le calcium est fortement relargué dans le SBF passant de 100 ppm à 186 ppm. Le deuxième phénomène a lieu au plus long délai jusqu'à 30 jours où le calcium est consommé par le biomatériau, la concentration passant de 206 ppm à 141 ppm. Puis une stabilisation apparait jusqu'à 60 jours d'immersion, le calcium n'est plus consommé du fait d'une saturation.

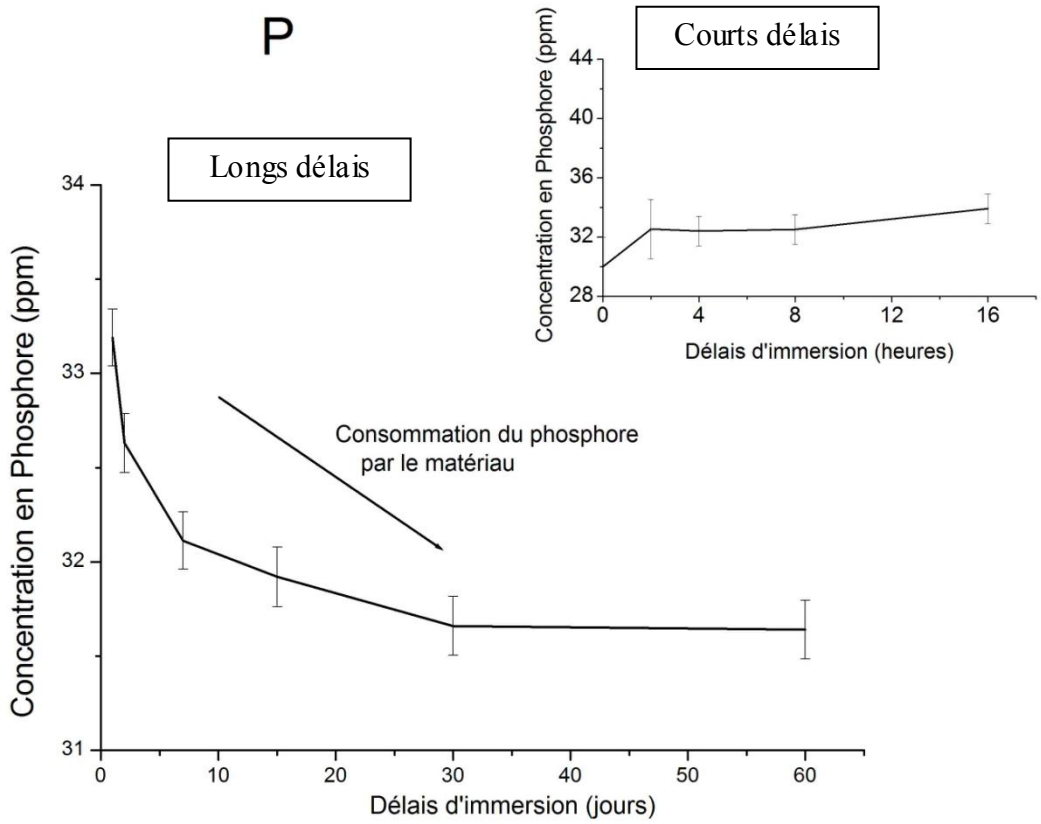


Figure 5 : Concentration en phosphore dans le SBF après immersion de la vitrocéramique.

Pour le phosphore, nous retrouvons un même profil de variation que le calcium. En effet, le phosphore est relargué plus lentement durant les premières heures passant de 30 ppm à 34 ppm. Puis à partir du 1er jour d'immersion jusqu'à 30 jours, le phosphore est consommé passant de 34 ppm à 31,5 ppm. Une stabilisation de la concentration, tout comme pour le calcium, est observée entre 30 et 60 jours d'immersion.

Les cinétiques de relargage des éléments zinc et titane ont été également étudiées. Ces éléments, physiologiquement intéressants, sont présents dans le biomatériau poreux. Connaitre leur concentration après immersion est une donnée nécessaire car un excès de concentration, relargué en un temps relativement court, pourrait éventuellement être toxique pour l'organisme.

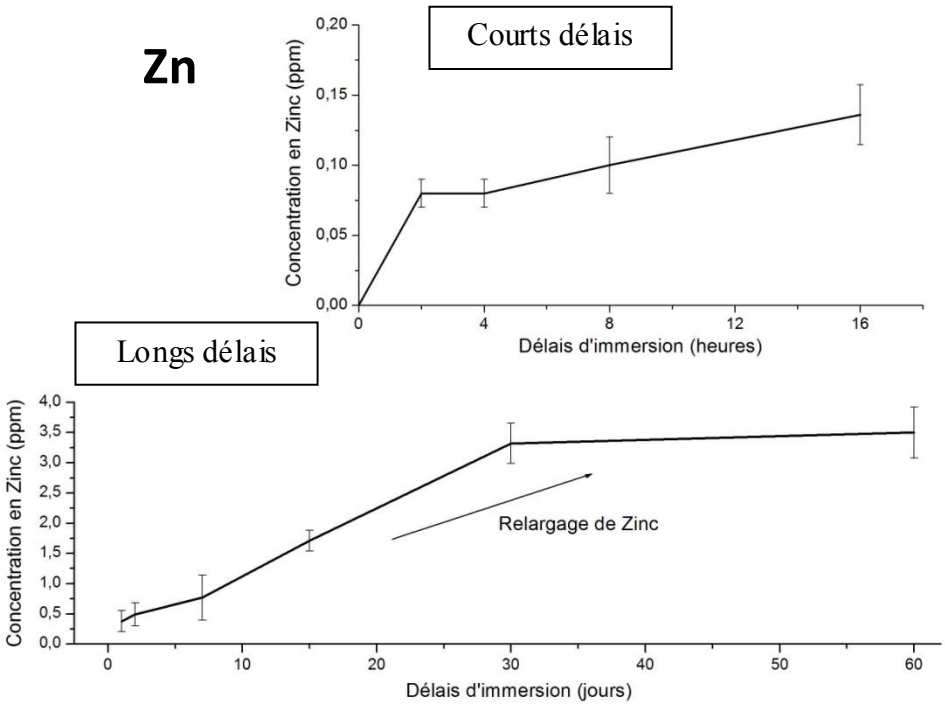


Figure 6 : Concentration en zinc dans le SBF après immersion de la vitrocéramique.

Le zinc est relargué continuellement durant les premières heures. Pour les plus longs délais, la concentration en zinc passe de 0,4 ppm après 1 jour d'immersion à 3,3 ppm après 30 jours d'immersion. La concentration se stabilise ensuite jusqu'à 60 jours.

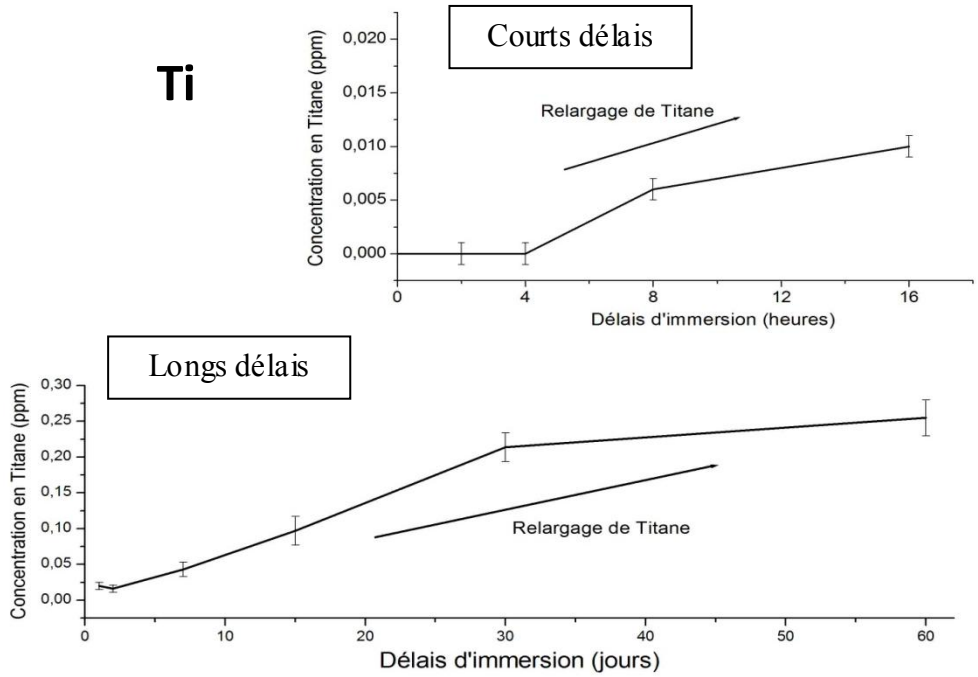


Figure 7 : Concentration en titane dans le SBF après immersion du matériau poreux.

Le titane est libéré continuellement jusqu'à 60 jours mais en faible quantité. Sa concentration atteint 0,25 ppm après 60 jours d'immersion dans le SBF.

C. Etude morphologique des échantillons après immersion

Les micrographies de la vitrocéramique immergée 1, 15, 30 et 60 jours sont présentées dans la figure 8. Les trois plus importants délais ont été privilégiés ici pour mettre en évidence la dégradation du biomatériau poreux en surface.

Après 1 jour d'immersion, le biomatériau présente un aspect identique à celui avant immersion. La surface présente une rugosité. Nous distinguons également la présence de cristallites. La micrographie au grossissement 5000 présente le bord et l'intérieur d'un pore.
Après 15 jours d'immersion, nous observons une surface dégradée. Le matériau se dégrade sous l'influence du SBF. A grossissement 10.000, des formes plus régulières sont visibles et sont, très probablement, les cristallites piégés sous la surface qui, du fait de la dégradation progressive du matériau, apparaissent.
La première et la seconde étape de la bioactivité en 4 étapes décrites en page 212 sont attribuées à ces observations : d'abord une dissolution préférentielle aux interfaces verre/cristaux a lieu faisant apparaitre des formes plus régulières en surface. Ensuite, le SBF s'est introduit dans les défauts créés, formant ainsi cet aspect « rongé » à la surface du matériau.

Après 30 jours d'immersion, ces cristallites sont nettement visibles sur les micrographies à grossissement 5000 et 10.000. Des particules blanchâtres en surface correspondent à la troisième étape de la bioactivité (décomposition des cristaux en particules plus fines). Elles forment une rugosité en surface augmentant ainsi la surface de contact entre le biomatériau et le SBF. De plus, l'intérieur du pore est nettement plus dégradé à 30 jours qu'à 1 jour.
Après 60 jours, l'hydroxyapatite forme une couche homogène à la surface du matériau. Elle a colonisé les défauts de surface et l'intérieur des différents pores.

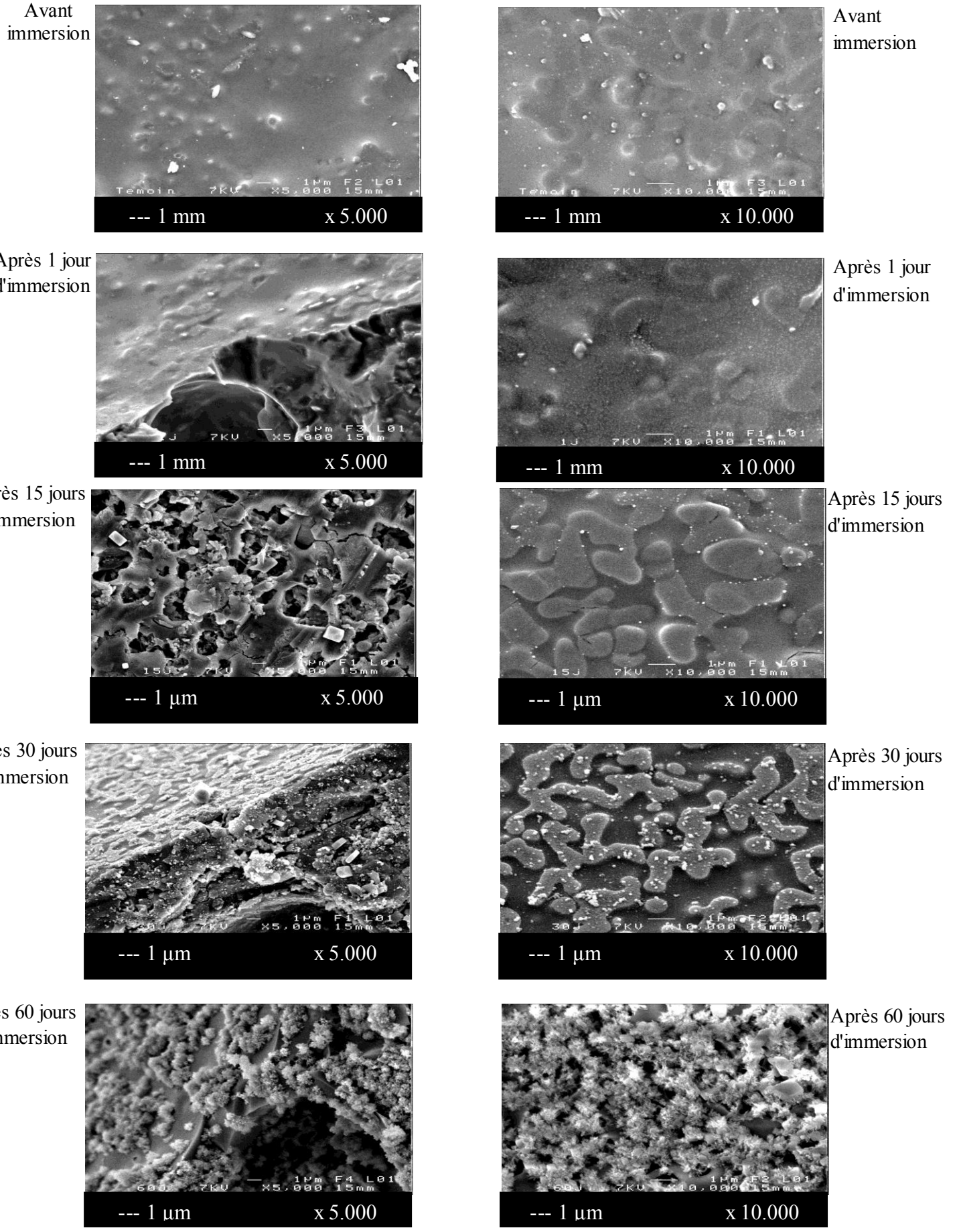


Figure 8 : Micrographies MEB du biomatériau poreux après immersion dans le SBF.

Conclusion :

Nous observons une dégradation progressive de la vitrocéramique dans le SBF puisque le silicium est relargué continuellement jusqu'à 60 jours d'immersion. Les éléments zinc et titane sont relargués progressivement, du fait de la dégradation du réseau silicaté, à des concentrations non toxiques pour l'organisme. Le biomatériau libère le calcium et le phosphore avant de les consommer à partir d'un jour d'immersion jusqu'à 60 jours. Ce phénomène de libération/consommation favorise la formation d'une couche d'hydroxyapatite que nous avons observée par diffraction des rayons X et par spectroscopie infrarouge. En effet, la variation de l'intensité du fond continu des diffractogrammes montre une perte de densité du réseau cristallin et est synonyme d'un phénomène d'amorphisation. La phase amorphe de la vitrocéramique apparaît au détriment des phases cristallines qui se dégradent dans le SBF. Cela est attribué à une bioactivité en 4 étapes dont nous pouvons suivre l'évolution par microscopie électronique à balayage et qui aboutit à la formation de cristaux d'hydroxyapatite à la surface du biomatériau et à l'intérieur des pores.

III. Tests colorimétriques de viabilité cellulaire d'une vitrocéramique poreuse

Il est nécessaire, avant de commencer toute expérimentation *in vivo,* de savoir si notre biomatériau présente une quelconque toxicité cellulaire. En effet, les biomatériaux en contact avec des tissus vivants peuvent être à l'origine d'effets cytotoxiques provoqués par le matériau lui-même ou par ses produits de dégradation. La biocompatibilité englobe toutes les réponses de l'organisme à la mise en place d'un biomatériau, elle ne peut donc pas être définie par un test unique, qui ne permettrait au mieux que de déterminer une seule de ses facettes. La détermination de la biocompatibilité est valable pour tous les dispositifs médicaux, quel que soit le domaine d'application.

L'étude de la cytotoxicité de la vitrocéramique a été confiée aux biologistes de la faculté d'Odontologie de l'Université de Rennes 1 de notre groupe de recherche.

A. Evaluation de la cytotoxicité du biomatériau poreux.

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés sur le biomatériau poreux sous forme massive. Le but étant de voir si la porosité et les éléments introduits dans le biomatériau ont une influence sur l'activité cellulaire. Le principe repose sur la mise en contact direct du substitut osseux avec les cellules cibles puis l'évaluation de leur viabilité.

Le protocole du test au MTT est expliqué au chapitre 2 page 83. Pour le réaliser, le matériau poreux a soigneusement été découpé pour obtenir des échantillons de 1,5 cm de diamètre (diamètre des puits de culture). Ils ont ensuite été découpés en tranche de 2 mm d'épaisseur. Les pastilles obtenues, après avoir été stérilisées à 120°C à l'autoclave pendant 20 minutes, ont ensuite été introduites dans les plaques de 24 puits de culture. Les solutions pour culture cellulaire ont également été filtrées à l'aide d'un filtre 22 µm pour éliminer les bactéries éventuelles.

Les puits de culture sont ensemencés par 1mL de suspension cellulaire comprenant 4.10^5 cellules.

De plus, des pastilles non poreuses présentant la même composition chimique que le biomatériau poreux ont servi de contrôles. Ceci nous permet de définir l'influence de la porosité sur la viabilité et la prolifération cellulaires.

Les pastilles ont été scellées au fond des puits avec de l'agarose à 1,5%. Cette « biocolle » empêche les matériaux de bouger et évite que les cellules prolifèrent en dehors de la surface du substitut.

Deux temps d'incubation ont été retenus : 24 heures et 72 heures à 37°C.

B. Résultats des tests au MTT

B.1. Sur la lignée ostéoblastique.

La figure 1 représente le résultat du test MTT sur les ostéoblastes au contact direct avec les pastilles non poreuses et poreuses.

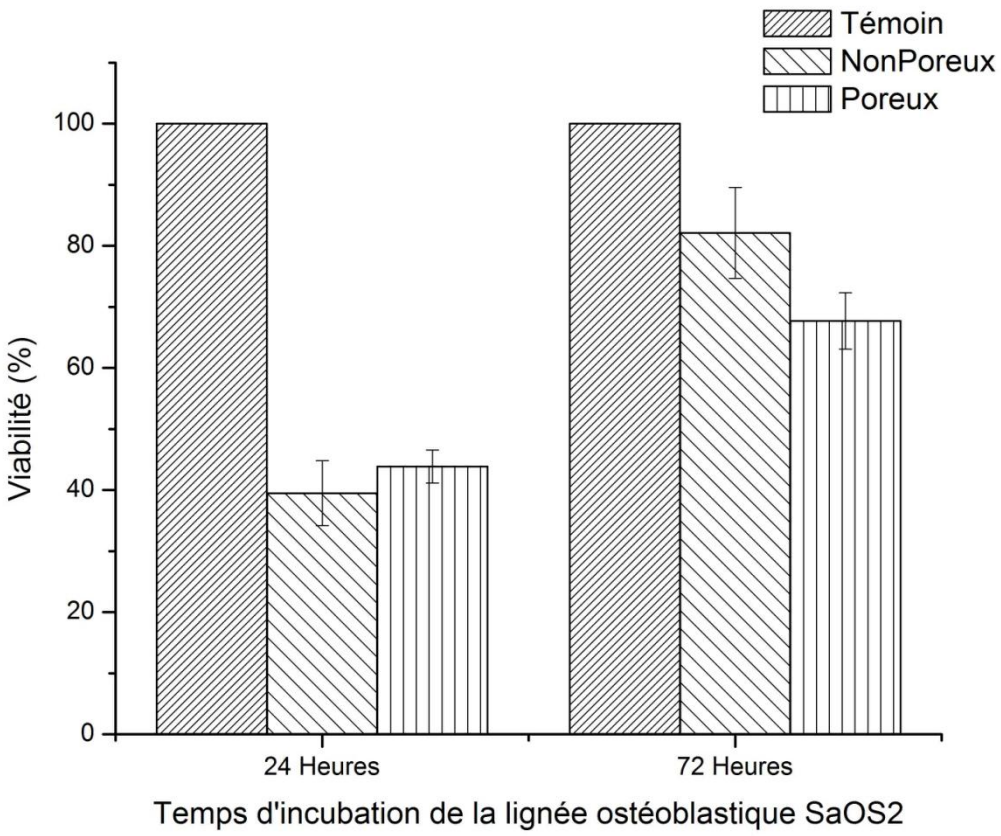


Figure 1 : Viabilité cellulaire de la lignée ostéoblastique SaOS2 sur les pastilles non poreuses et poreuses.

Les valeurs des moyennes et écart-types de ce test sont regroupés dans le tableau 7 de l'annexe 13.

Les premières 24 heures correspondent au temps d'adhésion des cellules sur le substrat. Ici que ce soit sur les pastilles poreuses ou non poreuses, nous avons: 44% des ostéoblastes qui adhérent aux pastilles poreuses et 40% pour les pastilles non poreuses.
Au total, après 24h de contact, la viabilité cellulaire est nettement moindre par rapport au polystyrène de culture (fixé à 100%), par contre aucune différence significative n'est mise en évidence entre les deux substrats expertisés.

Après 72 heures, la viabilité cellulaire augmente en fonction du temps sur les deux types de pastille mais de façon plus conséquente sur les pastilles non poreuses (82%) comparé aux poreuses (68%).

Cette différence peut s'expliquer par le test de détermination de la viabilité cellulaire. En effet le substitut osseux présente une porosité ouverte de 10% en moyenne. Des cellules ont certainement colonisé l'intérieur du substrat ; ce qui peut rendre difficile leur prise en compte pour le dénombrement de la totalité des cellules viables.

B.2. Sur la lignée endothéliale.

La figure 2 représente le test au MTT sur les cellules endothéliales déposées sur les pastilles non poreuses et poreuses.

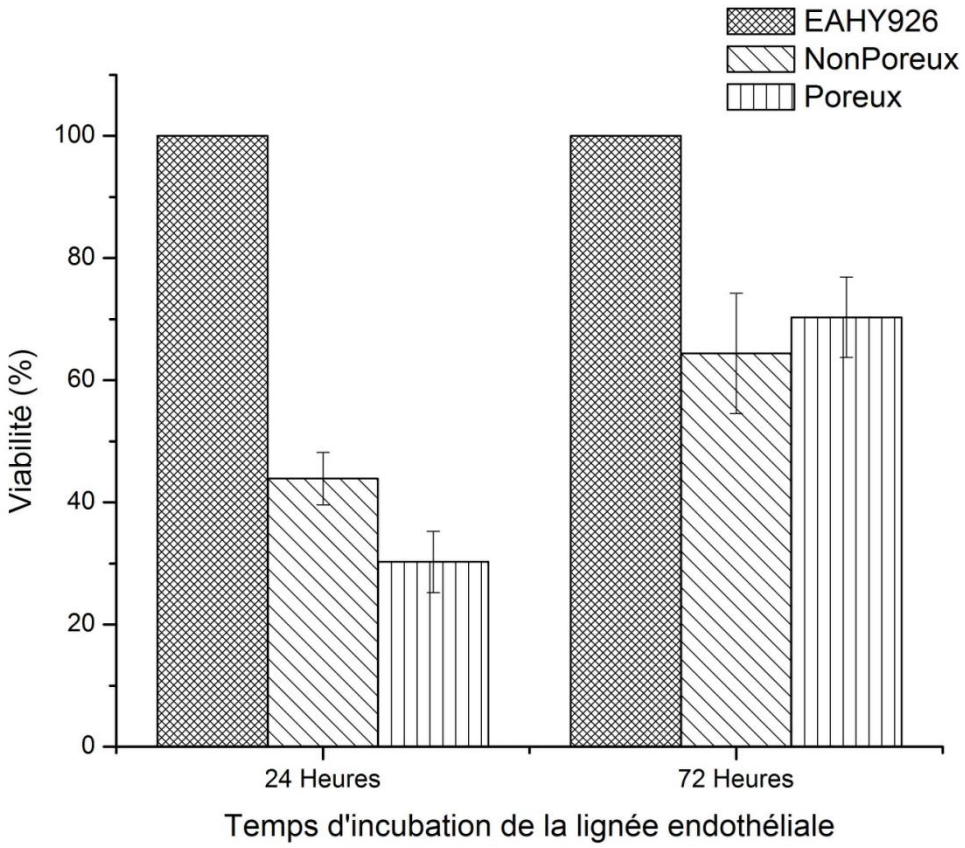


Figure 2 : Viabilité cellulaire de la lignée endothéliale EAHY926 sur les pastilles non poreuses et poreuses.

Les valeurs des moyennes et écart-types de ce test sont regroupés dans le tableau 8 de l'annexe13.

Tout comme le test sur la lignée ostéoblastique, une viabilité optimale est observée sur le polystyrène de culture. Après 24 heures d'incubation, une diminution de la viabilité est observée sur les pastilles poreuses et non poreuses. Pour ce temps d'incubation le nombre de cellules est moins important sur le matériel poreux.

Après 72 heures, la viabilité augmente sur les deux types de pastilles : 70% de viabilité sur les pastilles poreuses et 64% sur les pastilles non poreuses. Cette différence n'est pas significative.

Cependant, nous observons, par comparaison avec les résultats obtenus sur la lignée ostéoblastique, une diminution de la viabilité sur les pastilles non poreuses. Nous pouvons en

déduire qu'il y a également un effet lignée dépendant. Cela signifie que selon le type de cellules, l'adhérence peut varier d'où les différences dans les résultats obtenus.

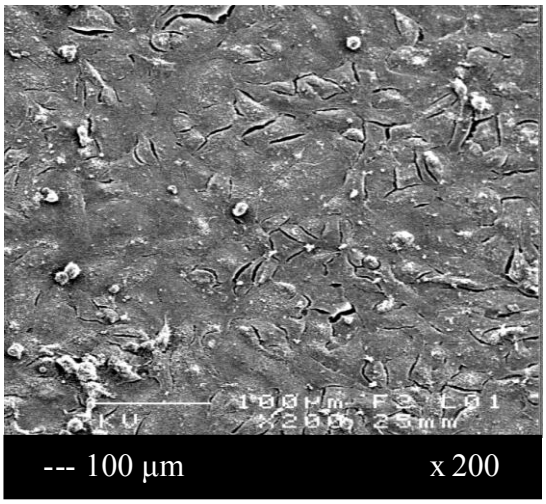
B.3. Comportement cellulaire à la surface des échantillons observé par microscopie électronique à balayage.

Afin d'observer de manière globale le tapis cellulaire sur le polystyrène de culture, les pastilles poreuses et les non poreuses, nous avons utilisé un faible grossissement (x200).
Pour affiner l'observation du comportement cellulaire à la surface de ces derniers, un grossissement x1000 a été utilisé.

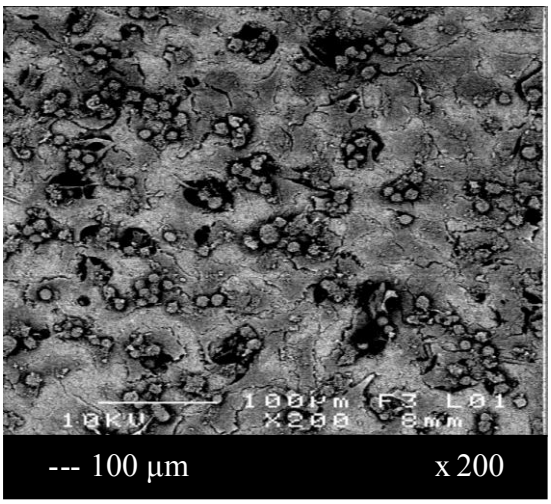
Les figures 3 et 4 regroupent les observations faites après 24 heures d'incubation. Les figures 5 et 6 présentent les micrographies prises après 72 heures d'incubation.

B.3.1. Après 24 heures d'incubation

Sur polystyrène de culture



Sur pastille non poreuse



Sur pastille poreuse

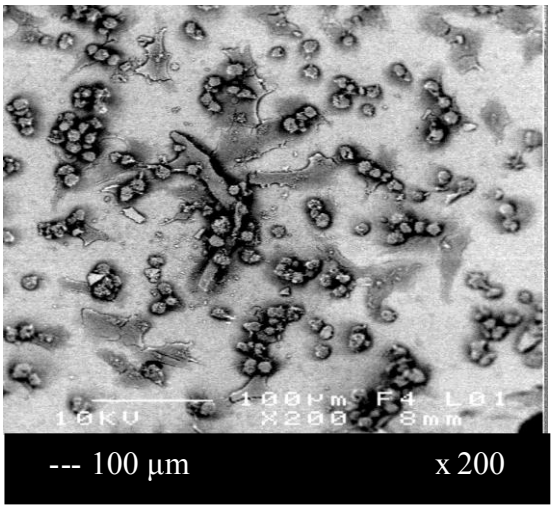
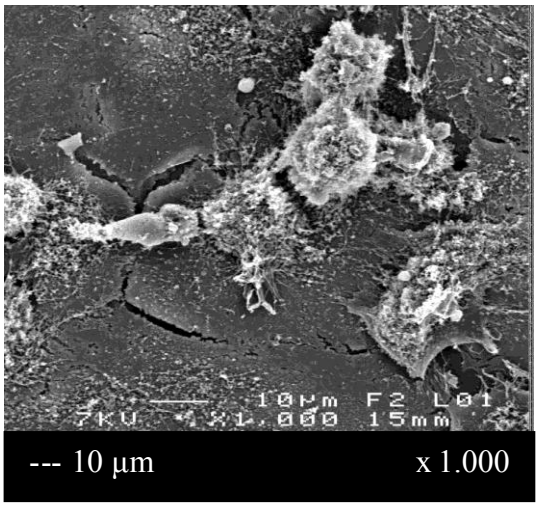
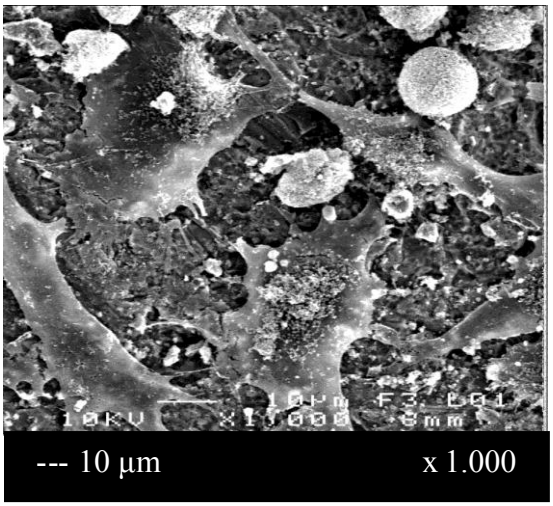


Figure 3 : Micrographies (grossissement 200) de l'aspect des cellules présentes sur le polystyrène de culture et à la surface des pastilles poreuses et non poreuses après 24h d'incubation.

Sur polystyrène de culture



Sur pastille non poreuse



Sur pastille poreuse

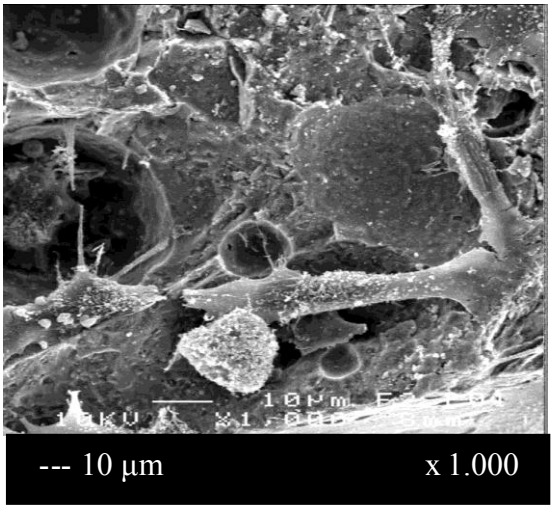


Figure 4 : Micrographies (grossissement 1000) de l'aspect des cellules présentes sur le polystyrène de culture et à la surface des pastilles poreuses et non poreuses après 24h d'incubation.

Les cellules sur polystyrène de culture apparaissent très étalées avec des systèmes d'adhérence au substrat nombreux. A plus fort grossissement, on objective des systèmes d'adhérence intercellulaires très nombreux. La densité cellulaire est importante sur ce substrat Néanmoins, une minorité de cellules présente une forme ronde et non étalée caractéristique d'une souffrance voire d'une mort cellulaire.

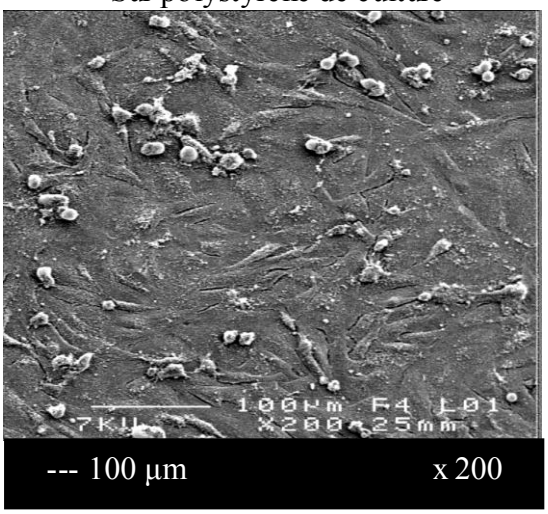
Sur les pastilles non poreuses, après 24 heures d'incubation, nous observons une densité cellulaire importante. Les « zones sombres » sur les micrographies au grossissement 200 représentent la matière organique. Ces dernières suggèrent des cellules étalées et vivantes. Les

cellules de forme ronde confirment la présence de cellules en souffrance sur le substrat. A plus fort grossissement, des cellules adhérentes au substrat non poreux sont visibles.

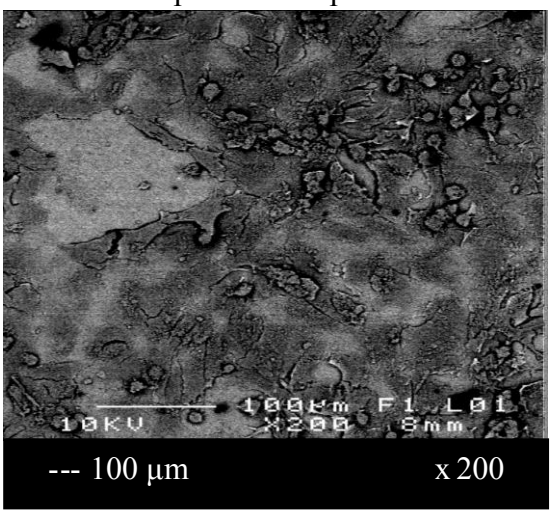
Sur les pastilles poreuses, une densité cellulaire est observée.
Au grossissement 1000, l'adhérence cellulaire au substrat est clairement observée puisque des cellules sont parfaitement étalées et accrochées via leurs lamellopodes. Des cellules ont colonisé la porosité et des adhérences intercellulaires sont visibles.

B.3.2. Après 72 heures d'incubation

Sur polystyrène de culture



Sur pastille non poreuse



Sur pastille poreuse

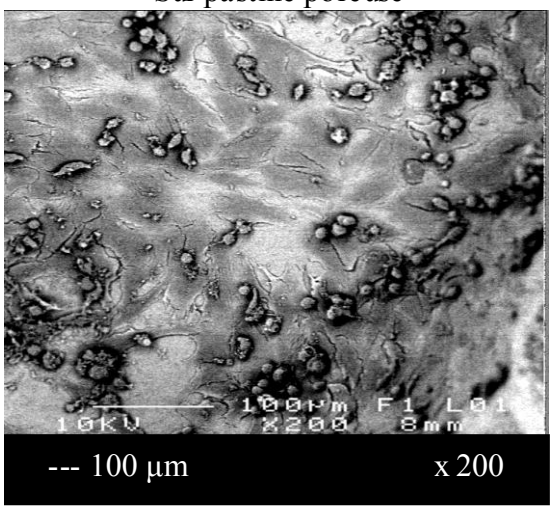
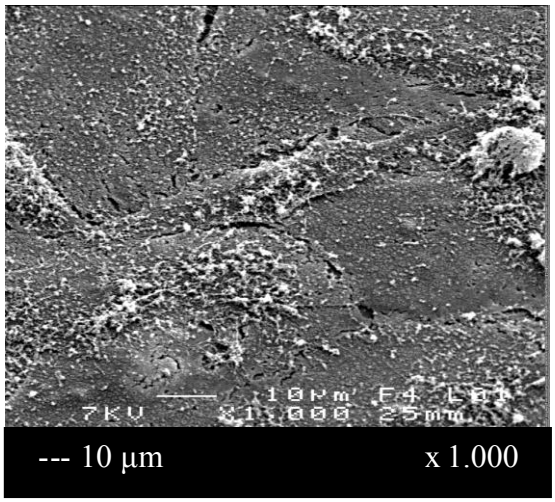
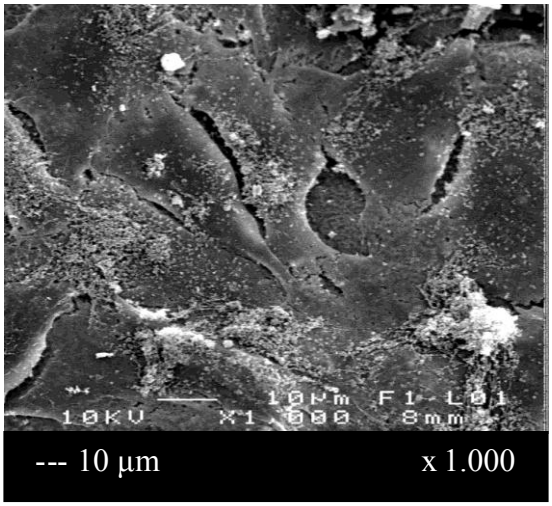


Figure 5 : Micrographies (grossissement 200) de l'aspect des cellules présentes sur le polystyrène de culture et à la surface des pastilles poreuses et non poreuses après 72h d'incubation.

Sur polystyrène de culture



Sur pastille non poreuse



Sur pastille poreuse

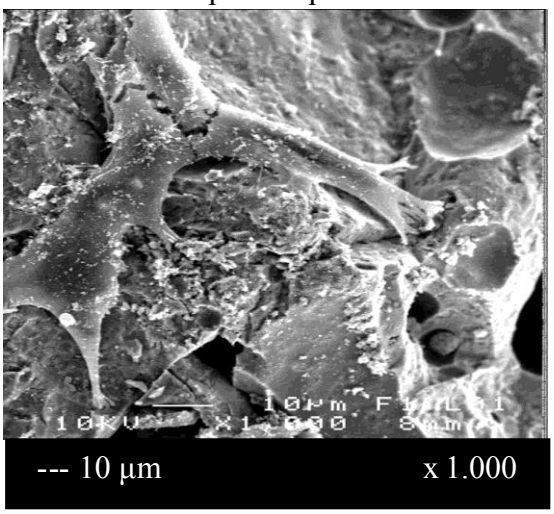


Figure 6 : Micrographies (grossissement 1000) de l'aspect des cellules présentes sur le polystyrène de culture et à la surface des pastilles poreuses et non poreuses après 72h d'incubation.

Après 72 heures, sur le polystyrène de culture, une densité cellulaire, avec plus de cellules en souffrance qu'à 24 heures, est observée.

Sur les pastilles non poreuses, un tapis cellulaire est visible avec peu de cellules en souffrance. Elles ont bien adhéré au substrat.

Pour les pastilles poreuses, à 72 heures, la densité cellulaire, observée à 24 heures, a fortement augmenté. En effet, les « zones sombres » se sont développées. Des cellules sont parfaitement

étalées et accrochées via leurs attaches cytoplasmiques. Elles ont également colonisé la porosité du biomatériau. Ces observations sont la preuve d'une prolifération cellulaire.

Conclusion :

Les tests de cytotoxicité mis en œuvre démontrent une viabilité optimale sur le polystyrène de culture avec une forte densité cellulaire et des systèmes d'adhérence abondants.

Sur le matériau poreux comme sur les pastilles non poreuses, la viabilité chute durant les premières 24 heures, ceci est caractéristique d'un effet temps-dépendant. Dans tous les cas, la composition chimique du matériau poreux ne semble pas altérer la viabilité cellulaire, bien au contraire, un effet prolifératif est observé puisqu'après 72 heures, la viabilité cellulaire augmente sur le matériau poreux comme sur les pastilles non poreuses. Cependant, des cellules colonisant les pores, donc l'intérieur du matériau, peuvent conduire à une sous estimation de la viabilité. La majorité des cellules ne présentent pas d'altération de leur morphologie: elles sont bien étalées et solidement ancrées au substrat. Seules quelques cellules sont arrondies, peu adhérentes et présentent des altérations morphologiques importantes avec un bouillonnement de leur membrane signe d'une souffrance cellulaire.

Ces observations préliminaires confirment une toxicité acceptable du biomatériau poreux et l'observation d'une colonisation cellulaire est également un résultat très positif en vue des expérimentations *in vivo*.

IV. Expérimentations *in vivo* de la vitrocéramique poreuse.

Les expérimentations *in vitro* ne sont qu'une première approche dans l'étude de tous les biomatériaux. Ces tests *in vitro* une fois validés, pour étudier le comportement réel, des expérimentations *in vivo* s'imposent. Elles nous renseignent sur l'aptitude du biomatériau à induire une néoformation osseuse et leurs interactions avec la matière organique et biologique.

Dans ce sens, nous avons travaillé en collaboration avec l'université de Sfax en Tunisie. Les implantations de la vitrocéramique poreuse ont été réalisées chez des lapins Néo-Zélandais. Les résultats obtenus sont décrits dans cette partie.

Le protocole d'implantation est présenté pages 88-89 du chapitre 2.

A. Etudes physico-chimiques de la cinétique d'ossification

Pour réaliser les différentes études, les échantillons mis à notre disposition sont résumés dans le tableau 1 :

Délais d'implantation (en mois)	1	2	4	6
Nombre d'échantillons disponibles	3	3	3	2

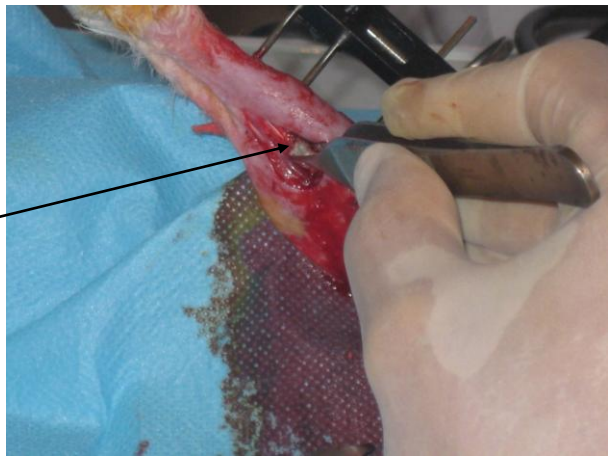
Tableau 1 : Nombre d'échantillons disponibles pour réaliser les différentes études.

Les délais d'implantation de 3, 5 et 9 mois n'ont pu être étudiés du fait du nombre d'échantillons disponibles. Les quantités de matériaux n'étaient pas suffisantes pour entreprendre toutes les études.

A.1. Etude radiologique

Cette étude a été réalisée à l'Université de Sfax en Tunisie. Les radiographies permettent de visualiser l'évolution générale de la résorption du biomatériau poreux et l'ossification progressive chez un sujet vivant.

Les radiographies (figure 1) ont été prises chez un lapin témoin opéré et non implanté (le site d'implantation est resté vacant). Un prélèvement osseux important (de telle sorte que l'os ne se reconsolide pas naturellement), de 0,2 cm^3 (volume apparent des échantillons à implanter), a été pratiqué puis des radiographies ont été effectuées à 1 jour, 1 mois et 2 mois après l'opération chirurgicale.



Après 2 mois, sans avoir comblé le vide créé au niveau du fémur, l'os ne s'est pas reconsolidé. Le remodelage et la présence d'un cal osseux, caractéristique d'une réparation osseuse, ne sont pas observés. En théorie, un cal osseux définitif est visible entre 21 et 60 jours après la fracture [20]. La perte osseuse est ici trop importante pour que l'os puisse se reconsolider de manière naturelle et sans guide de repousse osseuse. Ceci a été mené de manière volontaire afin de mettre en évidence les effets des implants qui ont été introduits au niveau de la diaphyse fémorale chez les autres lapins.

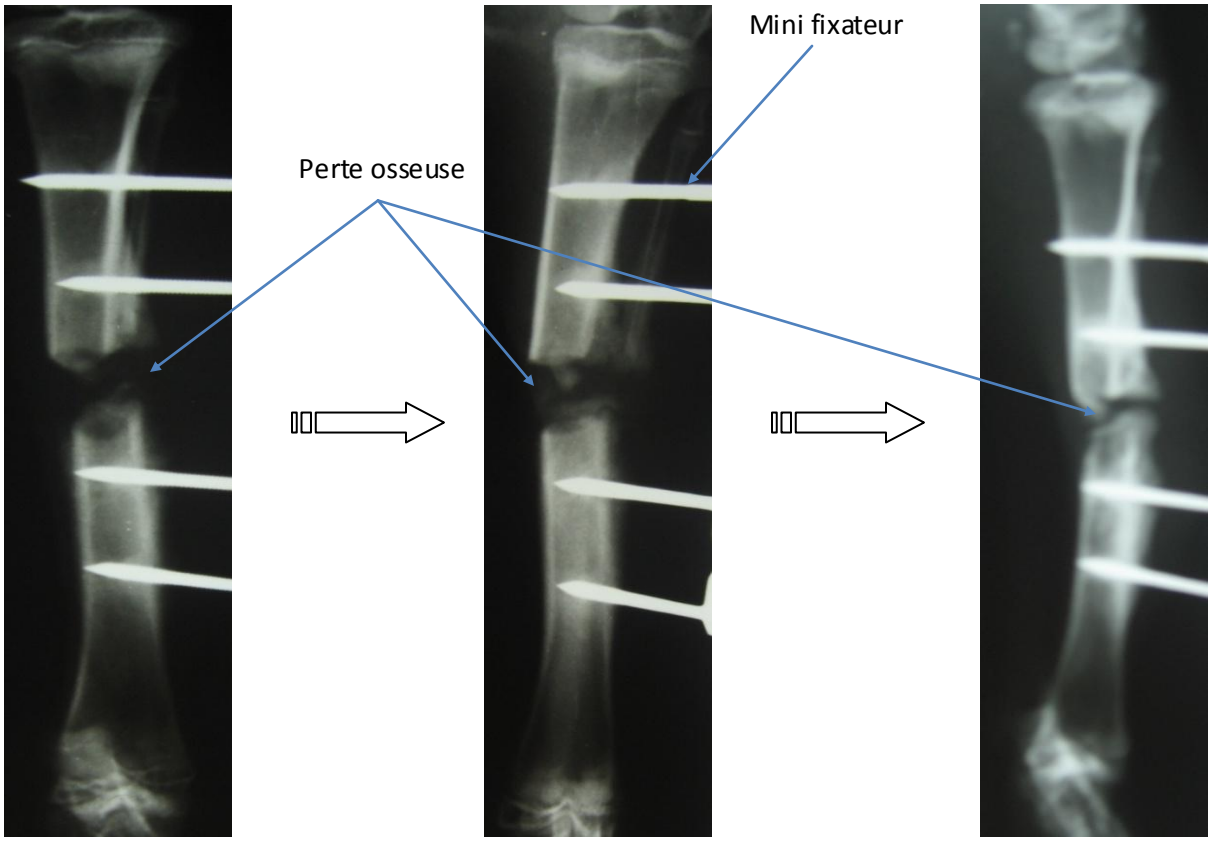


Figure 1 : Radiographie de la perte diaphysaire fémorale chez un lapin témoin à différents délais

Les radiographies (figure 2), après 1 mois et 4 mois, ont été prises chez un sujet opéré et implanté. Comme détaillé dans le protocole du chapitre 2, le biomatériau poreux est présent pour combler la perte diaphysaire fémorale.

Sur ces radiographies, nous pouvons voir l'évolution de la résorption du biomatériau poreux, en effet après 4 mois, des « tâches » plus blanches sur le biomatériau poreux et son aspect plus « blanchâtre » soulignent des modifications. De plus, l'interface os/implant également plus blanche après 4 mois est caractéristique d'une repousse osseuse et donc d'une fixation biologique entre le biomatériau et l'implant.



1 mois après implantation



4 mois après implantation

Figure 2 : Radiographies 1 mois et 4 mois après implantation du biomatériau poreux.

A.2. Caractérisations structurales des explants

Pour réaliser ces caractérisations, le biomatériau poreux a été retiré de l'os à l'aide d'une scie circulaire. Il a ensuite été fraisé pour éliminer l'os sur ses contours puis broyé pour être analysé par des techniques physico-chimiques.

A.2.1. Diffraction des rayons X

Les diffractogrammes (figure 3) présentent l'évolution et le comportement du biomatériau implanté au cours du temps entre 1 et 6 mois d'implantation.

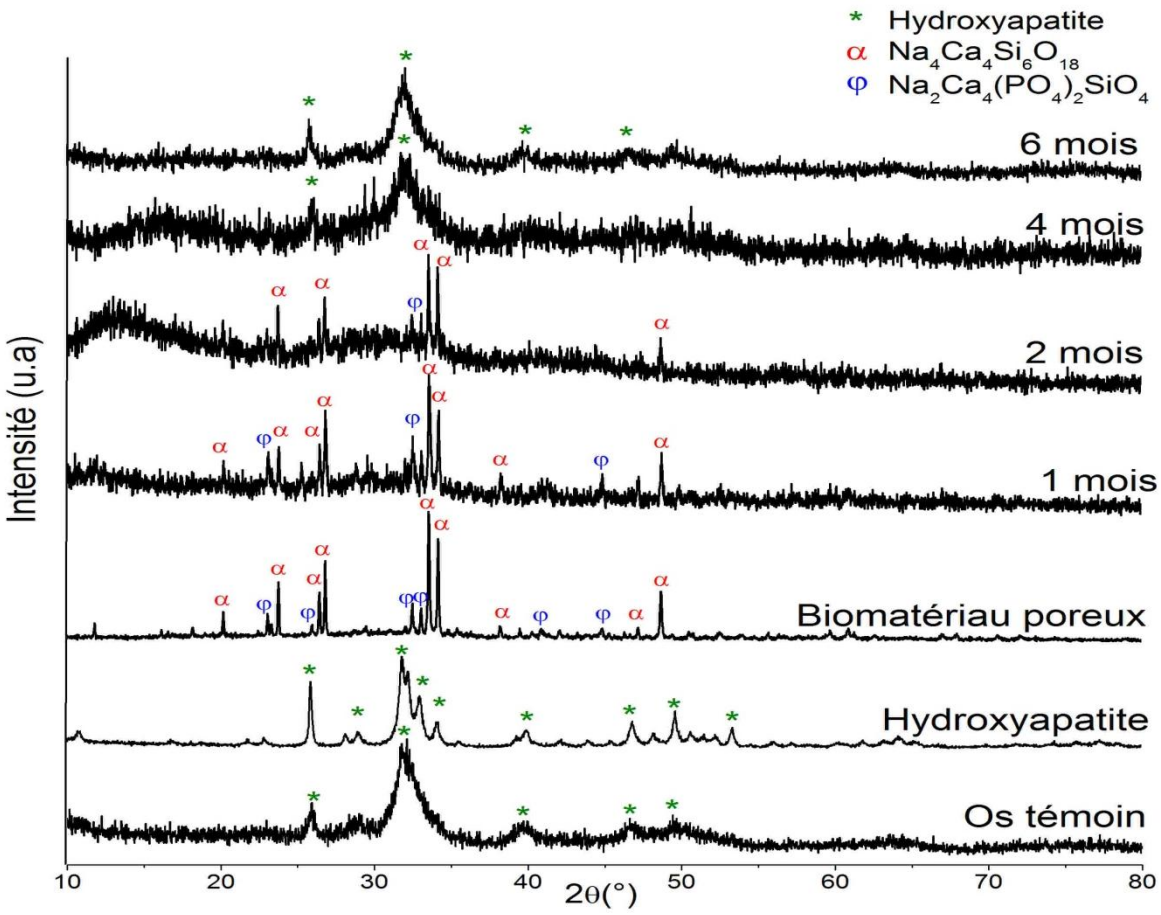


Figure 3 : Diffractogrammes du biomatériau poreux après 1, 2, 4 et 6 mois d'implantation.

Les résultats par diffraction des rayons X laissent apparaitre des changements progressifs. Les 2 phases cristallines de la vitrocéramique sont présentes jusqu'à 2 mois après implantation. Cela est synonyme d'une dégradation progressive du biomatériau poreux dans le milieu. La phase minoritaire $Na_2Ca_4(PO_4)_2SiO_4$ a complètement disparu après 2 mois d'implantation.

A 4 mois, le diffractogramme tend vers celui de l'os témoin et à 6 mois, les diffractogrammes sont identiques avec 4 raies caractéristiques de l'os.

La dégradation du biomatériau est donc bien avancée après 2 mois d'implantation puisque les raies de diffraction caractéristiques des phases cristallines de la vitrocéramique disparaissent. Le rapport signal/bruit est important et est synonyme d'une perte de densité structurale.

A 6 mois, le biomatériau s'est complètement transformé en une matrice osseuse.

A.2.2. Spectroscopie d'absorption infrarouge

Plusieurs changements apparaissent au fur et à mesure que la durée d'implantation augmente (figure 4).

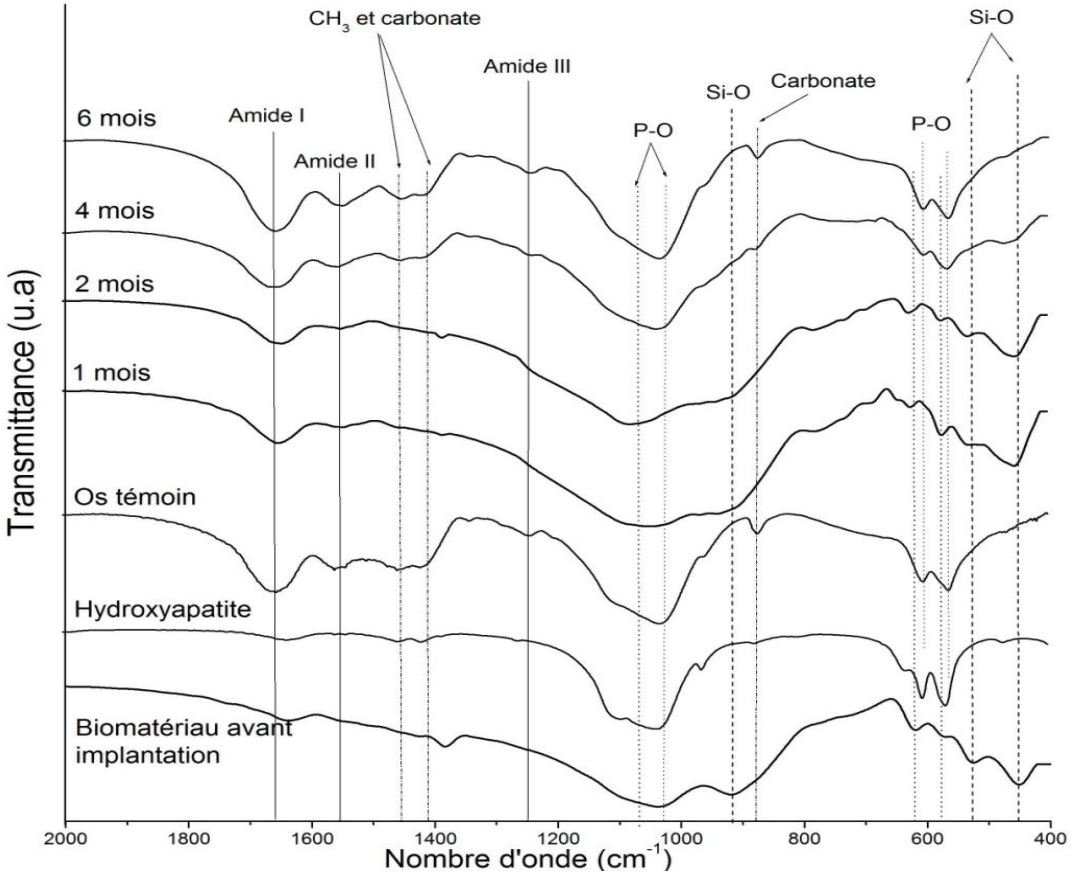


Figure 4 : Spectres infrarouges du biomatériau poreux après 1, 2, 4 et 6 mois d'implantation.

En effet, jusqu'à 2 mois d'implantation, les bandes caractéristiques des liaisons coudées Si-O du biomatériau poreux à 448 et 526 cm^{-1} sont encore visibles. Celle à 448 cm^{-1} est encore présente après 4 mois d'implantation mais avec une faible intensité. Il en est de même pour la bande à 913 cm^{-1}, caractéristique d'une liaison tétraèdrale Si-O-Si, qui tend à disparaitre complètement après 4 mois d'implantation. Cela est donc synonyme d'une dégradation progressive du biomatériau poreux implanté.

Cette dégradation est également observée par les liaisons P-O du biomatériau poreux soulignées par les bandes à 576, 620 et 1048 cm^{-1}. La bande à 1048 cm^{-1} se déplace à 1028 cm^{-1} ; elle devient de plus en plus intense, pour avoir, à 6 mois, la même forme et la même intensité que celle de l'os à 1028 cm^{-1}. De même, les bandes à 576 et 620 cm^{-1} du biomatériau

sont déplacées pour correspondre à partir du 4ème mois d'implantation, aux bandes caractéristiques des liaisons P-O de l'os et de l'hydroxyapatite présente à 563 et 604 cm^{-1}.
Nous pouvons donc dire que le réseau de silice du biomatériau poreux se dégrade. Les liaisons P-O correspondent à celle de l'os au fur et à mesure que la durée d'implantation augmente. Ceci est une preuve d'une repousse osseuse progressive qui est également validée par l'apparition à 4 mois de liaison C-O à 872 cm^{-1} caractéristique de groupement carbonate de l'os.

Des liaisons caractéristiques de l'os apparaissent également à partir de 1 mois d'implantation. C'est le cas pour la bande caractérisant une vibration d'étirement des liaisons C=O de la fonction Amide I à 1657 cm^{-1} [21-22]. Mais c'est véritablement à partir de 4 mois que toutes les bandes caractéristiques apparaissent avec une intensité plus importante. Ainsi, à 1551 cm^{-1}, la bande est caractéristique des liaisons coudées N-H et des vibrations d'étirement des liaisons C-N du groupement Amide II [21-22]. Les bandes présentes à 1454 et 1408 cm^{-1} sont représentatives des liaisons CH_3 et des vibrations de liaisons C-O du groupement carbonate (présent aussi à 872 cm^{-1}) respectivement [21-22]. Enfin à 1242 cm^{-1}, une bande caractéristique des vibrations des liaisons C-N et C-C puis des liaisons coudées N-H de la fonction Amide III [21-24].

Ainsi, ces résultats confirment ceux obtenus par diffraction des rayons X, nous observons une dégradation progressive du biomatériau poreux au profit d'une néoformation osseuse. Le réseau de silice se dissout. Les liaisons caractéristiques de l'os (organique avec les fonctions amides et inorganique avec les liaisons P-O de l'hydroxyapatite) apparaissent à partir du 4ème mois d'implantation.

A.3. Etudes morphologiques par MEB couplée à l'analyse chimique

Cette partie concerne les résultats obtenus par EDS et les observations faites par MEB. Le but de ces études étant de comparer trois zones bien distinctes sur les échantillons *in vivo* : le biomatériau seul, l'os seul et l'interface os/implant. Les analyses chimiques, pour chaque délai, nous permettent de voir l'évolution des teneurs en élément au sein des trois zones et d'observer une éventuelle fixation biologique. Nous avons mis en évidence sur ces micrographies l'os et le biomatériau puis les zones analysées.

Pour l'os (figure 5), l'analyse chimique a révélé la présence majoritaire des éléments calcium (78 % massique) et phosphore (22 % massique).

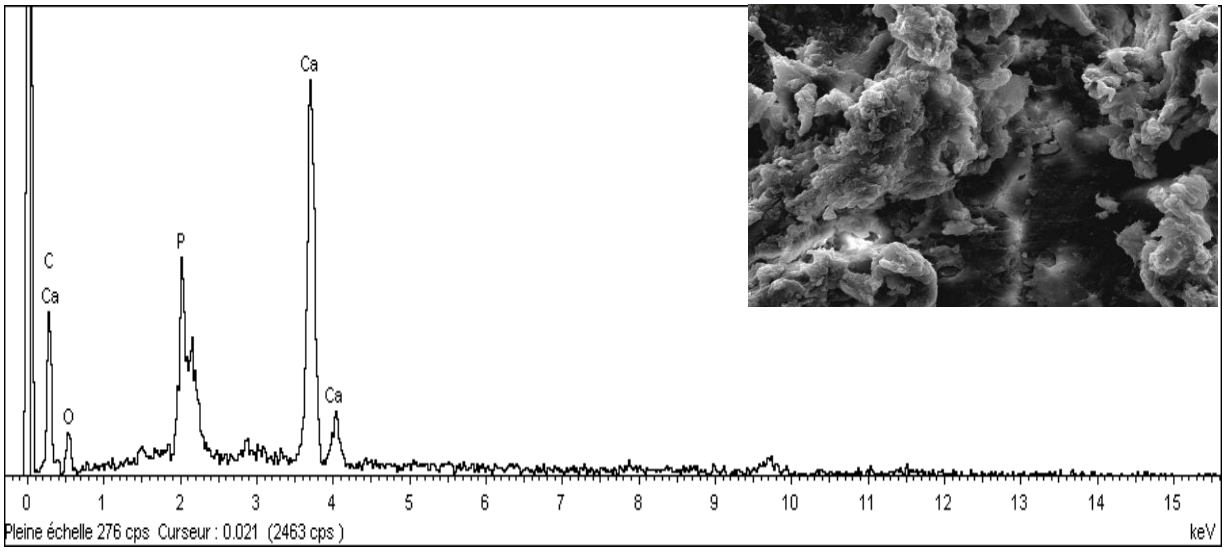


Figure 5 : Analyse chimique et micrographie de l'os témoin.

Pour la vitrocéramique poreuse (figure 6), nous retrouvons tous les éléments introduits au départ dans la matrice du verre 46S6-8Zn et le titane du nitrure (TiN) utilisé. Les teneurs en éléments présents dans les zones analysées sont regroupées dans le tableau 1.

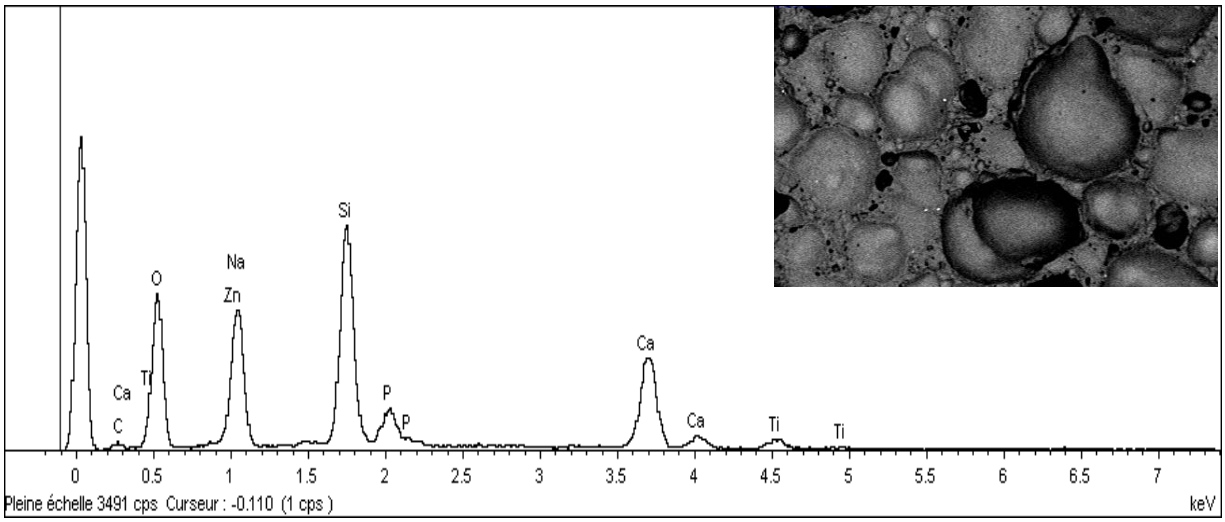


Figure 6 : Analyse chimique et micrographie de la vitrocéramique avant implantation.

L'idée est d'observer l'évolution de la composition chimique au niveau du biomatériau seul et de l'interface os/implant. Les micrographies et les spectres d'analyse sont présentés dans les figures 7 et 8.

.

Après 1 mois d'implantation

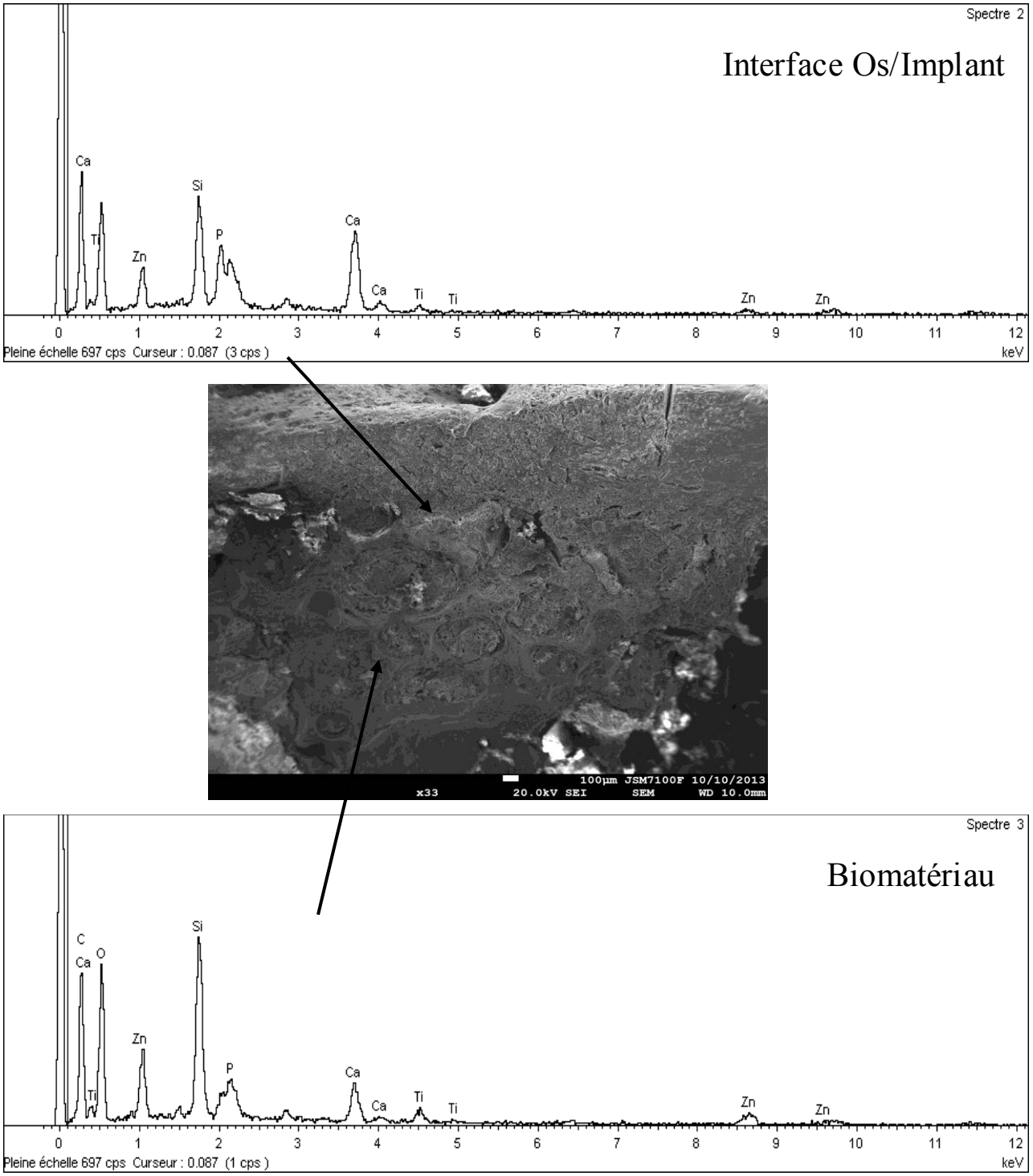


Figure 7 : Analyse chimique et micrographie de la vitrocéramique après 1 mois implantation.

Après 4 mois d'implantation

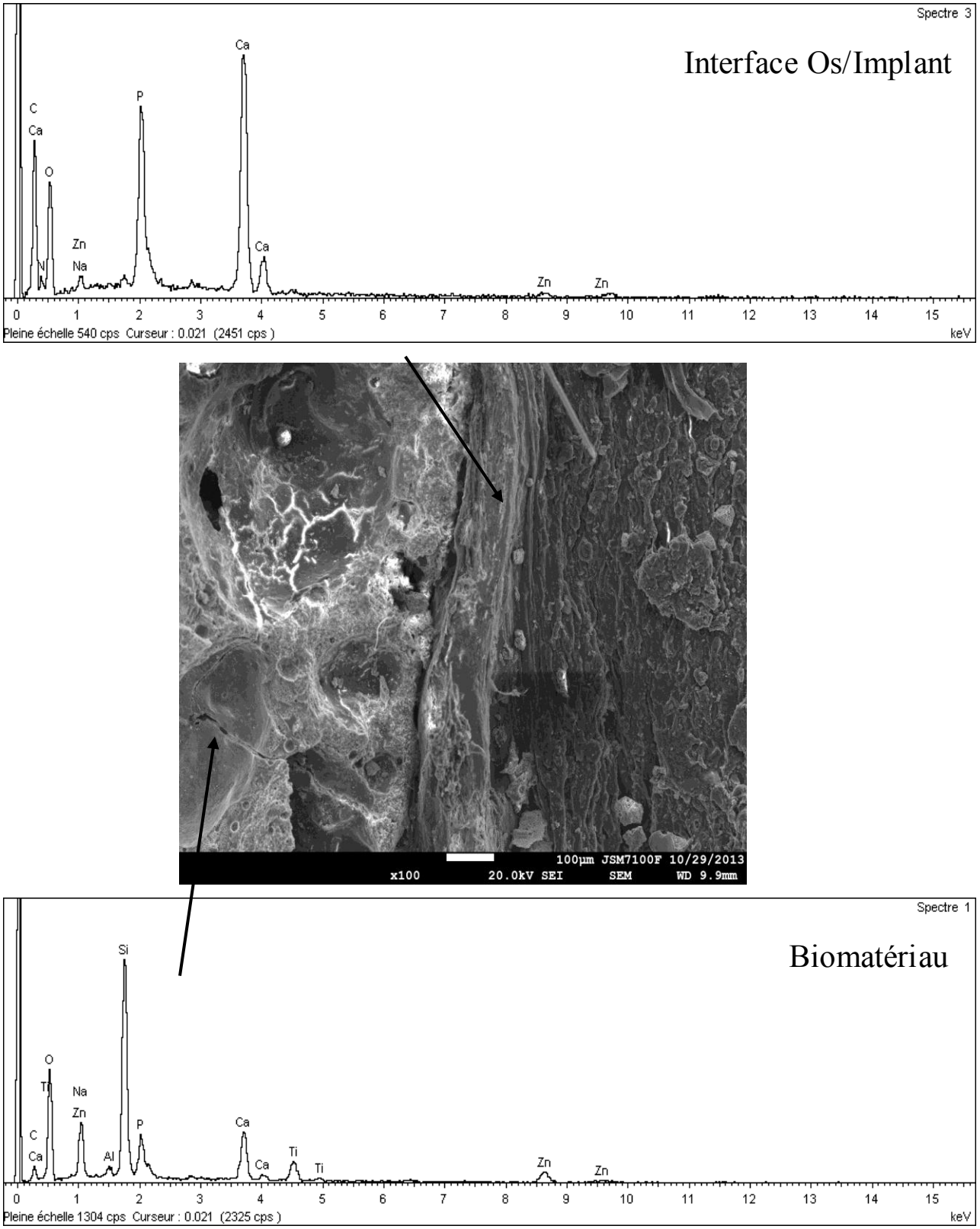


Figure 8 : Analyse chimique et micrographie de la vitrocéramique après 4 mois implantation.

Sur l'ensemble des analyses chimiques, le dépôt d'Or/Palladium utilisé n'est pas détecté. Cela est dû à la très fine couche déposée volontairement. L'énergie du faisceau utilisé permet de passer au travers de ce dépôt métallique et d'analyser les éléments présents dans notre échantillon.

Les pourcentages massiques des éléments analysés sont regroupés dans le tableau 2.

		% atomique					
Eléments		Si	P	Ca	**Ca/P**	Ti	Zn
Os		0	22	38	**1,72**	0	0
Vitrocéramique avant implantation	Vitrocéramique	47	3	8	**2,67**	5	9
Vitrocéramique après 1 mois d'implantation	**Interface Os/Implant**	**22**	**22**	**36**	**1,63**	**4**	**11**
	Vitrocéramique	45	8	14	**1,75**	7	25
Vitrocéramique après 4 mois d'implantation	**Interface Os/Implant**	**0**	**34**	**59**	**1,73**	**0**	**7**
	Vitrocéramique	40	14	25	**1,78**	7	17

Tableau 2 : Pourcentage atomique des éléments constituants la vitrocéramique avant et après implantation ainsi qu'à l'interface Os/Implant.

Après 1 mois d'implantation, le silicium de la vitrocéramique est présent en forte concentration, preuve que la dissolution de la matrice du biomatériau n'est pas avancée. Cependant, nous observons une augmentation de la teneur en calcium et en phosphore. Cela peut être attribué à la consommation de ces éléments, se trouvant dans le milieu biologique, par le biomatériau pour favoriser la formation d'hydroxyapatite, comme observé lors des essais *in vitro*.

Après 4 mois d'implantation, nous observons une baisse de la teneur en silicium du fait de la dégradation progressive du biomatériau. La teneur en calcium et en phosphore augmente progressivement, cela peut être dû soit à la formation d'un phosphate de calcium à la surface de la vitrocéramique, soit à un début de repousse osseuse. Les analyses à l'interface os/implant peuvent être un bon indicateur pour comprendre l'évolution du biomatériau dans le milieu biologique.

Après 1 mois d'implantation, la zone de l'interface os/implant analysée présente une teneur en silicium moindre que celle du biomatériau. Par comparaison à l'os, elle contient une forte teneur en phosphore et une, moins importante, en calcium. Les éléments titane et zinc sont également détectés.
Après 4 mois d'implantation, il n'y a plus de silicium, de titane au niveau de l'interface. Par contre, les teneurs en calcium et en phosphore ont fortement augmenté.
Nous pouvons donc dire que le biomatériau au niveau de l'interface est complètement dégradé et a laissé place à la repousse osseuse.

A.4. Etude par RMN du Solide

Cette partie concerne les analyses de la vitrocéramique, par RMN des noyaux ^{29}Si et ^{31}P, sous rotation à l'angle magique, après implantation au niveau de la diaphyse fémorale du lapin.
Les spectres RMN- MAS du ^{29}Si permettent de comprendre l'évolution du biomatériau dans le milieu biologique ; le silicium étant l'élément majoritaire dans la composition chimique initiale.
Quant aux spectres RMN-MAS du ^{31}P, ils contribuent à l'évaluation de la cinétique de formation d'un phosphate de calcium.
L'os et la vitrocéramique avant implantation nous ont servi de référence. L'analyse par RMN-MAS des noyaux ^{29}Si et ^{31}P de la vitrocéramique, avant implantation, est présentée dans la partie I de ce chapitre.

A.4.1.1. Analyse structurale de la vitrocéramique après expérimentation in vivo.

Nous rappelons que la vitrocéramique poreuse a été obtenue à partir d'un traitement thermique d'un verre phosphosilicaté contenant 46% de SiO_2, 24% de CaO, 24% de Na_2O, 6% de P_2O_5 et 10% de ZnO. La structure de ce verre est constituée par des tétraèdres SiO_4 et PO_4. Les analyses par RMN permettent d'avoir des renseignements sur les environnements des noyaux et plus précisément sur les proportions relatives des espèces Q^n où n est le nombre d'oxygènes pontants (Si-O-Si) portés par un tétraèdre : Q^o ne présente aucun oxygène

pontant, Q^1 est une extrémité de chaîne puisque le tétraèdre ne présente qu'un oxygène pontant et Q^4 présente un tétraèdre lié au réseau par 4 oxygènes pontants (figure 9).
De la même manière, la structure d'un verre de phosphate est également constituée par des tétraèdres PO_4. Q^o représente les orthophosphates, Q^1 est soit un tétraèdre de pyrophosphate soit une extrémité de chaîne, Q^2 est un milieu de chaîne, Q^3 représente les ultra-phosphates et Q^4 n'existe pas dans les verres de phosphate en raison de la charge +5 du phosphore [25-26].
Dans ce travail, les spectres obtenus ont été traités avec le logiciel dmfit [27] afin d'effectuer leur déconvolution et obtenir les différentes composantes présentes dans les spectres initiaux.

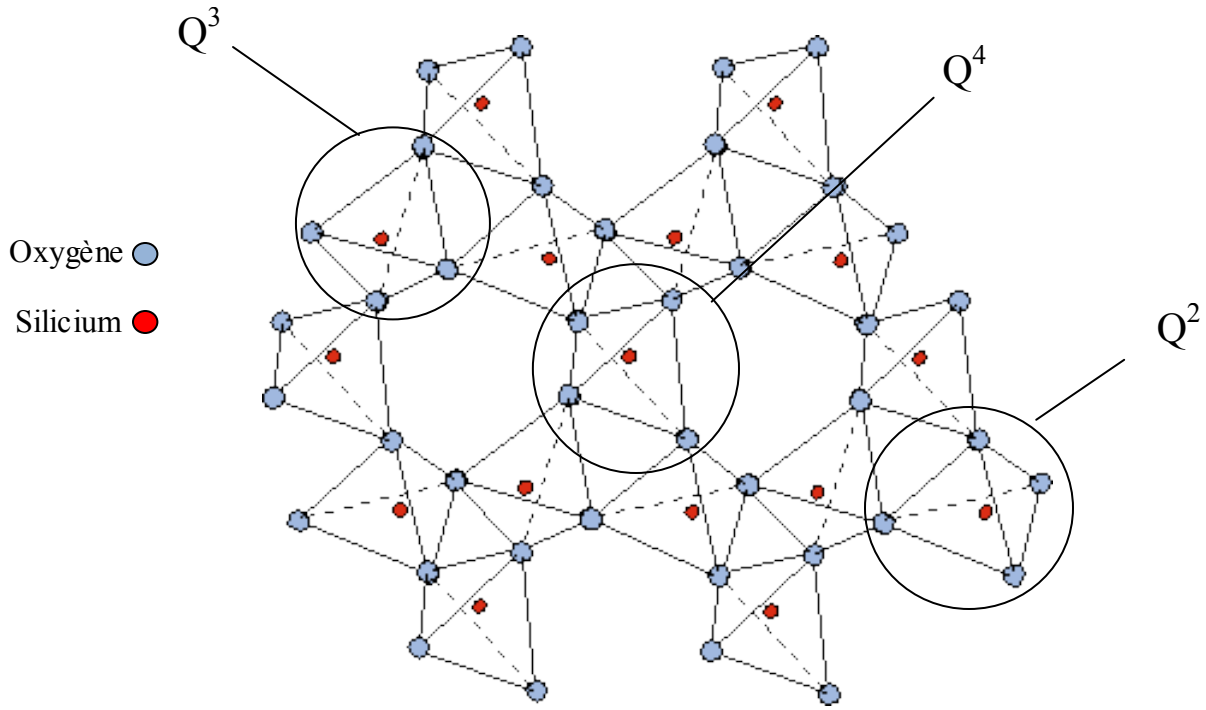


Figure 9: Différents environnements chimiques du silicium détectables par RMN du Solide.

A.4.1.2. Etude par RMN-MAS ^{29}Si de la vitrocéramique après implantation.

Les spectres RMN-MAS ^{29}Si sont présentés en figure 10.

Le tableau 3 regroupe les résultats obtenus après déconvolution des spectres avant et après différents délais d'implantation.

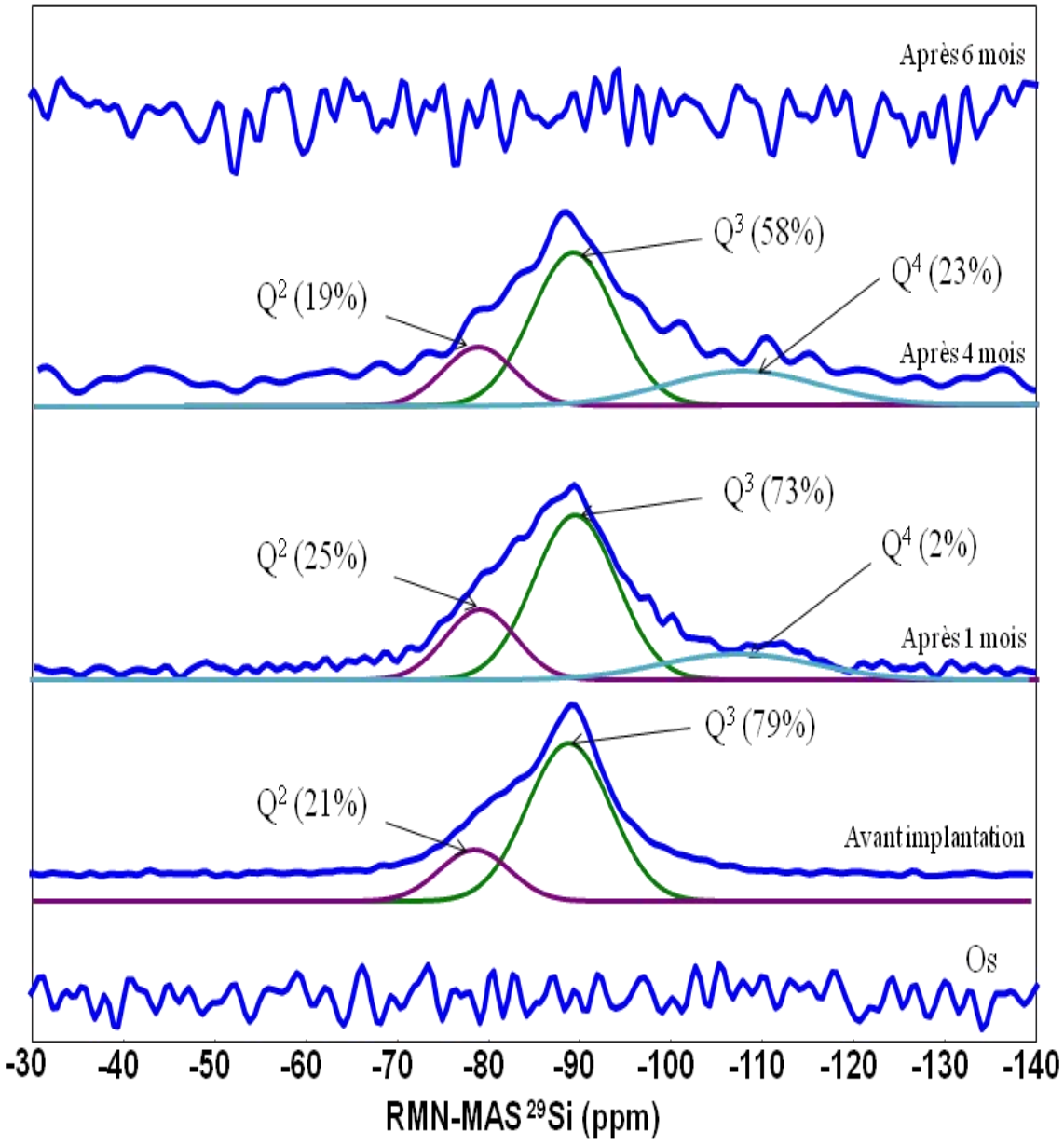


Figure 10 : Spectres RMN-MAS ^{29}Si de l'os, de la vitrocéramique poreuse avant et après implantation à différents délais.

In vivo Vitrocéramique poreuse	RMN ^{29}Si Population ±3% (déplacement chimique δ)						
Espèces	**Q^2**		**Q^3**		**Q^2+Q^3**	**Q^4**	
Verre 46S6	**80%** à -78 ppm		**20%** à – 87 ppm				
Largeur à mi-hauteur	**Fwhm = 9 ppm**		**Fwhm = 11 ppm**			**Fwhm = 20 ppm**	
	δ (ppm)	**%Population**	δ (ppm)	**%Population**		δ (ppm)	**%Population**
Avant Implantation	-79	**21**	-89	**79**	100	/	**0**
Après 1 mois	-79	**25**	-89	**73**	98	-108	**2**
Après 4 mois	-79	**19**	-89	**58**	77	-108	**23**
Après 6 mois	/	**0**	/	**0**	0	/	**0**
Os témoin	/	0	/	0		/	0

Tableau 3 : Résultats obtenus après déconvolution des spectres RMN-MAS ^{29}Si de la vitrocéramique poreuse avant et après implantation.

Le spectre de l'os ne présente aucune résonance du silicium. Il confirme ainsi l'absence de ce noyau dans la matrice osseuse. Pour la vitrocéramique après implantation, nous observons d'abord une augmentation de l'espèce Q^2 après 1 mois ; une diminution après 4 mois ; jusqu'à disparition à 6 mois.

Pour l'espèce Q^3, les populations diminuent au fur et à mesure que le temps d'implantation augmente jusqu'à disparition à 6 mois. Ces variations sont attribuées à la dégradation des phases cristallines et amorphes de la vitrocéramique dans le milieu environnant.

De plus, le rapport signal/bruit est d'autant plus important que la durée d'implantation est grande, ceci est caractéristique de la dégradation de la phase silicatée et de la phase amorphe. En effet, le manque de spin dans les échantillons, du fait de la résorption du biomatériau, augmente ce rapport.

A partir d'1 mois d'implantation, une réticulation se met en place avec l'apparition d'une espèce Q^4 à -110 ppm représentant 2% de la population. Cette population est à hauteur de 23% après 4 mois d'implantation et disparait après 6 mois. L'émergence de cette dernière

espèce caractérise soit une condensation du réseau soit une formation d'une couche riche en silice à la surface du biomatériau.

Pour le silicium, les espèces Q^4 naissent au détriment des espèces Q^3 dans un premier temps, jusqu'à 1 mois d'implantation. Puis l'augmentation des Q^4 se fait au détriment des deux espèces Q^2 et Q^3 après 1 mois d'implantation.

A.4.1.2 Etude par RMN-MAS ^{31}P de la vitrocéramique après implantation

Les spectres RMN-MAS ^{31}P sont présentés en figure 11.

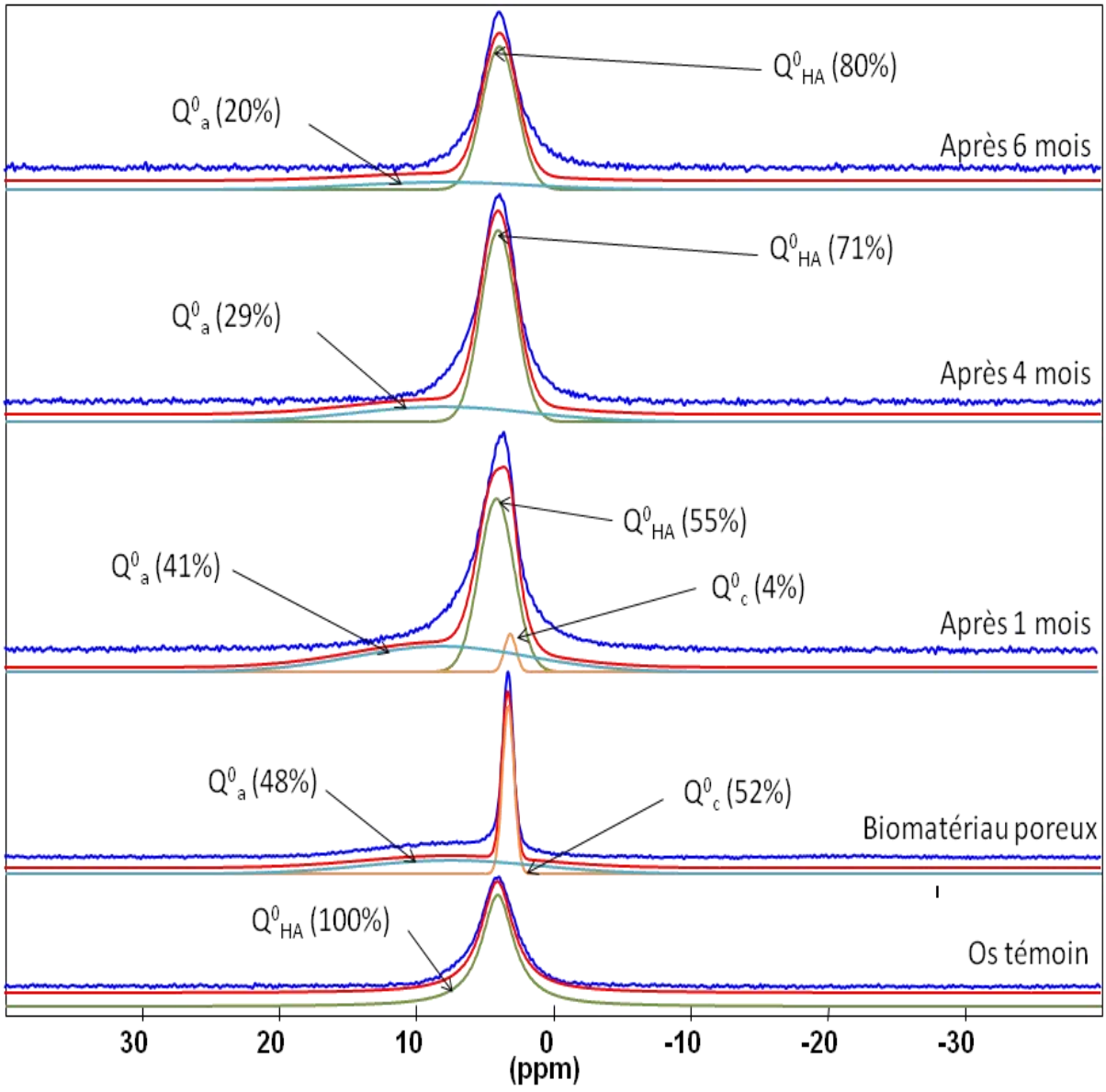


Figure 11 : Spectre RMN-MAS ^{31}P de l'os, de la vitrocéramique poreuse avant et après implantation à différents délais.

Le tableau 4 regroupe les résultats obtenus après déconvolution des spectres avant et après différents délais d'implantation. Nous présentons les espèces Q^0_c et Q^0_a de la vitrocéramique puis l'espèce Q^0_{HA} représentant les phosphores de l'hydroxyapatite.

In vivo Vitrocéramique poreuse	RMN ^{31}P Population ±3% (déplacement chimique δ)					
Espèces	**Q^0_c**		**Q^0_{HA}**		**Q^0_a**	
Verre 46S6	100% à 7,5 ppm (Fwhm= 9 ppm)					
Largeur à mi-hauteur	**Fwhm = 1 ppm**		**Fwhm = 3 ppm**		**Fwhm = 15 ppm**	
	δ (ppm)	**%Population**	δ (ppm)	**%Population**	δ (ppm)	**%Population**
Avant Implantation	3	**52**			8	**48**
Après 1 mois	3	**4**	4	**55**	8	**41**
Après 4 mois	3	**0**	4	**71**	8	**29**
Après 6 mois	3	**0**	4	**80**	8	**20**
Os témoin			4	**100**		

Tableau 4: Résultats obtenus après déconvolution des spectres RMN-MAS ^{31}P de la vitrocéramique poreuse avant et après implantation.

Le spectre de l'os révèle une résonance à 4 ppm et une largeur à mi-hauteur de 3 ppm caractéristique, en accord avec la littérature [28], à une hydroxyapatite carbonatée.

Nous observons une forte diminution des espèces Q^0_c à 3 ppm correspondant à un fort relargage du phosphore à partir de la phase cristalline de la vitrocéramique sous l'effet du milieu environnant. Après 4 mois, ces espèces ont totalement disparu.
Pour l'espèce Q^0_a à 8 ppm que nous avons attribuée à une phase amorphe, une diminution progressive est observée au fur et à mesure que les délais d'implantation augmentent. Cette diminution est plus lente que pour l'espèce présente à 3 ppm. Les deux phases amorphe et cristalline contribuent donc à la formation d'une couche de phosphate de calcium à la surface de la vitrocéramique [29]. Cependant, nous pouvons dire que la phase cristalline participe

davantage à la dégradation du biomatériau que la phase amorphe car la contribution fine se dégrade plus rapidement que la contribution plus large.

En parallèle, à partir de 1 mois, s'est formée une espèce caractéristique du phosphore d'un phosphate de calcium à 4 ppm. Cette population Q^0_{HA} augmente et atteint presque 80% après 6 mois d'implantation. Cette hausse est caractéristique de la croissance d'un phosphate de calcium, proche de la phase minérale de l'os.

Conclusion :

La RMN du Solide est une technique sensible permettant d'étudier la réactivité chimique et la bioactivité de la vitrocéramique après expérimentation *in vivo*.

Les spectres RMN-MAS ^{29}Si permettent de mieux comprendre la réactivité chimique de la vitrocéramique implantée. Ils confirment la diminution des espèces Q^2 et Q^3 ainsi que l'émergence d'une espèce Q^4 caractéristiques de la dissolution du biomatériau après implantation. L'apparition de cette espèce Q^4 est également le témoin de la formation d'une couche riche en silice.

Les spectres RMN-MAS ^{31}P permettent d'étudier l'évolution de la couche de phosphate de calcium formée sur la vitrocéramique en fonction du temps d'implantation. Ils montrent la disparition au cours du temps des deux différentes espèces Q^0 de la vitrocéramique ainsi que l'apparition progressive de la composante du phosphore détectée dans le spectre de l'os dû à la croissance d'un phosphate de calcium.

Références Chapitre 4

[1] L.C. Huang, C.C. Lin, P. Shen. *Crystallization and stoichiometry of crystals in $Na_2CaSi_2O_6$-P2O5 based bioactive glasses.* Mater Sci Eng A (2007) 326-333.

[2] H. Ohsato,Y. Takéuchi. *Structure of $Na_4Ca_4[Si_6O_{18}]$.* Acta Cryst, C42 (1986) 934-937.

[3] L. Lefebvre, J. Chevalier, L. Gremillard, R. Zenati, G. Thollet, D. Bernache-Assolant, A. Govin. *Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments.* 55 (2007) 3305-3313.

[4] J.P. Roberts, P. Popper *Glass ceramics.* New York: Academic Press; 1979. p.76.

[5] M.W.G. Lockyer, D. Holland, R. Dupree *NMR investigations of the structure of some bioactive glasses.* J. Non-Cryst. Solids 188 (1995) 207-219.

[6] E. Dietrich. *Synthèse et études physico-chimiques de verres bioactifs denses et poreux. Applications en tant que biomatériaux en sites osseux*. Thèse n° d'ordre 3767 de l'Université de Rennes 1 (2008)

[7] H. Oudadesse, E. Wers et al. *Chitosan effects on glass matrices evaluated by biomaterial. MAS-NMR and biological investigations.* Korean J. Chem. Eng., 30 (2013) 1775-1783

[8] G. Engelhardt, D. Michel. *High-resolution solid state NMR of silicates and zeolites.* Wiley, New-York, 1987.

[9] H. Grussaute, L. Montagne, G. Palavit, J.L. Bernard. *Phosphate speciation in Na_2O-CaO-P_2O_5-SiO_2 and Na_2O-TiO_2-P_2O_5-SiO_2 glasses.* J. Non-Cryst. Solids, 2000 (263-264) 312-317.

[10] M. D. O'Donnell, S. J. Watts, R. V. Law, R. G. Hill *Effect of P_2O_5 content in two series of soda lime phosphosilicate glasses on structure and properties – Part II: Physical properties*. J. Non-Cryst. Solids, 354 (2008) 3561-3566

[11] O. Peitl, E. Dutra Zanotto, L.L. Hench. *Highly bioactive P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2 glass ceramics.* J Non Crystalline Solids 292 (2001) 115-26.

[12] F. Rouquerol, L. Luciani, P. Llewellyn, R. Denoyel, J. Rouquerol. *Texture des matériaux pulvérulents ou poreux*. Techniques de l'ingénieur, 2013, p.1050.

[13] R. Lebullenger, S. Chenu, J. Rocherullé, O. Merdrignac-Conanec, F. Cheviré, F. Tessier, A. Bouzaza, S. Brosillon. *Glass foams for environmental applications*. J Non Cryst Solid 33 (2011) 706-712.

[14] J. Rouquerol, D. Avnir, C. W. Fairbridge, D. H. Everett, J. H. Haynes, N. Pernicone, J. D. F. Ramsay, K. S. W. Sing, K. K. Unger, *Recommendations for the characterization of porous solids,* Pure & Appl. Chem., 1994, vol. 66 n°8, 1739-1758.

[15] P. Lasaygues. *Tomographie ultrasonore osseuse : Caractérisation de la diaphyse des os par inversion d'un champ acoustique diffracté.* Rapport d'habilitation à diriger des recherches. Université de la Méditerranée Aix-Marseille II (2006).

[16] L. Lefebvre. *Développement de bioverre poreux ostéoinducteur pour application à l'orthopédie et à l'ingénierie tissulaire*. Thèse de l'INSA de Lyon, n° d'ordre 05ISALXXXX, 2007

[17] M. Holand, A. Dommann, W. Holand, E. Apel, and V. Rheinberger. *Microstructure formation and surface properties of a rhenanite type glass-ceramic containing 6.0 wt% P_2O_5.* Glass Science and Technology, 2005, vol.78, n° 4, p. 153-158.

[18] MMA. Ramselaar, PJ. Van Mullem, W. Kalk, FCM Driessens, JR. Dewijn, ALH. Stols. *In vivo reactions to particulate rhenanite and particulate hydroxyapatite after implantation in tooth sockets.* J. Mater. Sci.: Mater. Med., 1993, vol. 4, pp 311-317.

[19] MMA. Ramselaar, FCM. Driessens, W. Kalk, JR. De Wijn, PJ. Van Mullem. *Biodegradation of four calcium-phosphate ceramics: In vivo rates and tissue interactions.* J. Mater. Sci.: Mater. Med, 1991, vol. 2, pp. 63-70.

[20] www. unifr.ch/anatomy

[21] Chunju Gu, Dinesh R. Katti, Kalpana S. Katti. *Photoacoustic FTIR spectroscopic study of undisturbed human cortical bone*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 103 (2013) 25-37

[22] K. Singh, K.S. Lee, D. Lee, Y.K. Kim, K.C. Kim. *Spectroscopic techniques as a diagnostic tool for early detection of osteoporosis.* Journal of Mechanical Science and Technology 24 (2010) 1661–1668

[23] S. Garip, F. Severcan, *Determination of simvastatin-induced changes in bone composition and structure by Fourier transform infrared spectroscopy in rat animal model* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 52 (2010) 580–588

[24] N. Kourkoumelis, M. Tzaphlidou. *Spectroscopic assessment of normal cortical bone: differences in relation to bone site and sex*. The Scientific World Journal 10 (2010) 402–412

[25] E. Lippmaa, M. Maegi, A. Samoson, G. Engelhardt and A.R. Grimmer. *Structural studies of silicates by solid-state high-resolution silicon-29 NMR.* The Journal of the American Chemical Society 102 (1980) 4889-4893.

[26] J.R. Van Wazer. *Phosphorus and its compounds.* Interscience, New York 1961.

[27] D. Massiot, F. Fayon, M. Capron, I. King, S. Le Calvé, B. Alonso, J-O. Durand, B. Bujoli, Z. Gan, G. Hoatson. *Modelling one- and two-dimensional Solid State NMR spectra*. Magnetic Resonance in Chemistry, 2002 (40) 70-76

[28] K.S.K. Lin, Y.H. Tseng, Y. Mou, Y.C. Hsu, C.M. Yang, J.C.C. Chan. *Mechanistic study of apatite formation on bioactive glass surface using 31P Solid-State NMR Spectroscopy.* Chemistry of Materials 17 (2005) 4493-4501.

[29] P. Li, Q. Yang, F. Zhang, T. Kokubo. *The effect of residual glassy phase in a bioactive glass-ceramic on formation of apatite layer in vitro*. J. Mater. Sci. Mater. Medi., 13 (1992) 452-456.

Chapitre 5

Etudes de scaffolds chitosan-verre bioactif, support pour la vectorisation d'une substance médicamenteuse.

Chapitre 5 : Etudes de scaffolds chitosan-verre bioactif, support pour la vectorisation d'une substance médicamenteuse.

I. Etudes de scaffolds chitosan-verre bioactif pour l'ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire est un champ multidisciplinaire qui allie la science des matériaux à la biologie dans le but de développer des substituts biologiques permettant le maintien, la restauration ou l'amélioration des fonctions de tissus vivants ou d'organes. Les recherches actuelles portent sur les scaffolds à base de polymères biodégradables qui présentent des propriétés intéressantes et favorables pour une application médicale.

L'ingénierie tissulaire émerge depuis quelques années comme une nouvelle méthode impliquant la combinaison de cellules, d'un scaffold et d'agents bioactifs comme des molécules à usage thérapeutiques ou de facteurs de croissance pour fabriquer un nouveau tissu dans le but de remplacer le tissu endommagé.

Notre but, dans un premier temps, était de synthétiser par lyophilisation des scaffolds à base de chitosan et de verre bioactif en variant leurs teneurs. Le but étant de voir l'effet des teneurs sur le caractère bioactif des matériaux. Nous avons ensuite élaboré ces scaffolds en introduisant de la gentamicine. L'influence des teneurs en chitosan et en verre bioactif sur le relargage de cette substance médicamenteuse a été étudiée.

A. Présentation des scaffolds chitosan-verre bioactif

Dans le domaine de la chirurgie orthopédique ou maxillo-faciale, les céramiques et autres biomatériaux synthétiques sont largement utilisés pour remplacer l'os et promouvoir sa croissance. L'ingénierie tissulaire propose des alternatives intéressantes [1]. En effet, de nombreux scaffolds poreux ont déjà été synthétisés avec des polymères biodégradables et utilisés dans l'ingénierie tissulaire du foie [2], des nerfs [3], de l'os [4], du cartilage [5]. Leur dégradation dans l'organisme peut également servir de matériaux utilisés pour la vectorisation de substances médicamenteuses ou de molécules à usage thérapeutiques.

A.1 Définition d'un scaffold

Un matériau servant de support et qui induit une régénération du tissu *in vivo* est désigné par le terme générique de « scaffold » [6-10]. Le scaffold représente une structure extracellulaire qui doit permettre de conditionner la croissance tissulaire tout en conférant au tissu les propriétés mécaniques requises et en lui apportant les éléments nutritifs nécessaires tout au long de sa croissance [6-10]. Les cellules proviennent souvent du patient lui-même. Elles peuvent être des cellules souches ou d'autres types de cellules en fonction du tissu à réparer. Les scaffolds sont composés d'un matériau biologique ou d'un polymère non toxique pour l'organisme. Ils sont assemblés et sont implantés à l'intérieur du corps où ils se dégradent peu à peu laissant la place à un nouveau tissu. Le choix du matériau est critique et est souvent fait afin de simuler au mieux l'environnement cellulaire naturel. Un exemple de matériau est le collagène-glucosaminoglycane utilisé entre autre pour aider à la réparation du cartilage [5]. Certaines molécules régulatrices, comme les facteurs de croissance, peuvent être ajoutées afin d'assister la régénération du tissu vivant.

A.2. Critères idéaux pour les scaffolds

L'important challenge dans la synthèse d'un scaffold est le respect de plusieurs critères. Un scaffold idéal devrait présenter :

- Une biocompatibilité, c'est-à-dire que ni le polymère ni sa dégradation ne devraient présenter une quelconque toxicité ou provoquer une réponse inflammatoire lors d'un contact avec le tissu vivant [1].
- Un réseau de pore bien contrôlé en intercommunication qui faciliterait la migration des cellules, leur attachement et leur prolifération permettant la formation d'un tissu homogène. Cette porosité favoriserait le déplacement des cellules, des liquides, des métabolites et des nutriments [11].
- Une biodégradabilité d'une cinétique proche de la cinétique de formation du tissu vivant à renouveler [11].
- De bonnes propriétés mécaniques [11] proches du tissu vivant à remplacer.

A.3. Choix du polymère

De nombreux polymères ont déjà été utilisés pour synthétiser des scaffolds : des polymères naturels tels que le chitosan [11], l'alginate [12] et le collagène ; et des polymères synthétiques comme le polycaprolactone [13], le polyéthylène-glycol [14] ou encore le polyvynilalcohol [15].

Pour cette synthèse, nous avons choisi le chitosan (figure 1) car il possède des propriétés physiques, chimiques et physiologiques intéressantes.

Le chitosan est obtenu par déacétylation de la chitine, composant de l'exosquelette des crustacés ou encore de la paroi des champignons. Il présente l'avantage d'être soluble en milieu acide contrairement à la chitine. Le chitosan est un polysaccharide dont la structure est comparable à celle de la cellulose [16] (Figure 1).

Le chitosan présente d'importantes caractéristiques biologiques: il est biocompatible, biodégradable, non toxique, antibactérien, hémostatique, fongistatique, antitumoral et présente des affinités avec certaines protéines [17-20]. Il est déjà utilisé dans beaucoup d'applications médicales comme la conception de sutures, de pansements, de matériaux servant de support pour la vectorisation de médicaments [21].

Le chitosan est l'un des seuls polymères à présenter un caractère cationique. Ce dernier étant dû à son groupement amine primaire le rendant très apte à la délivrance de molécules spécifiques [22].

L'une des plus importantes caractéristiques du chitosan pour l'ingénierie tissulaire est sa capacité à pouvoir être mis sous de nombreuses formes : microsphères, membranes, éponges, fibres [23]. Cela permet de l'utiliser dans des applications médicales variées.

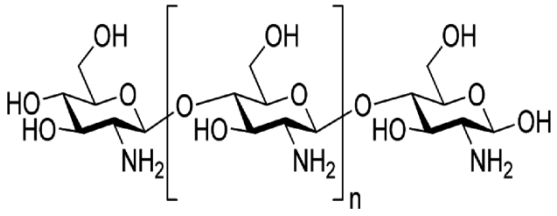


Figure 1 : Formule chimique du chitosan.

Les scaffolds sont des matériaux qui peuvent présenter de multiples architectures selon la méthode de synthèse utilisée. Ainsi, certaines méthodes permettent de contrôler la forme, la taille des pores et le taux de porosité d'un matériau.

A.4. Choix de la substance médicamenteuse

L'infection est l'un des risques majeurs durant l'implantation d'un biomatériau. Celle-ci peut apparaître de différentes manières : soit par l'intermédiaire de contaminants aériens dans la salle d'opération, soit par le biais de bactéries opportunistes responsables d'une infection post-opératoire.

Dans notre étude, le choix s'est porté sur la gentamicine (figure 2). Il s'agit d'un antibiotique de la famille des aminoglycosides utilisé pour le traitement de divers types d'infections bactériennes [24-25]. La gentamicine peut agir contre *Staphylococcus Aureus*, bactérie responsable de l'ostéomyélite, maladie qui atteint les métaphyses des os longs [26]. La bactérie est transportée jusqu'à l'os par voie sanguine. Au niveau de la métaphyse, le flux sanguin se ralentit ce qui favorise la fixation et le développement de la bactérie.

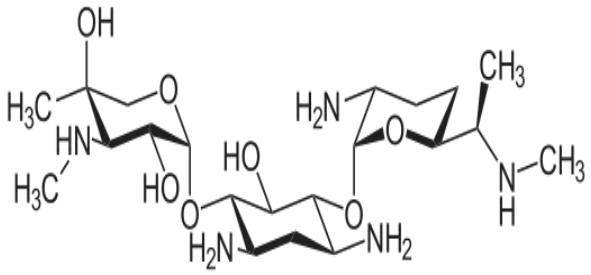


Figure 2 : Formule chimique de la gentamicine

Les antibiotiques de la famille des aminoglycosides ont largement été utilisés contre les infections de bactéries à Gram-négatif [27]. Les bactéries à Gram-négatif ont une structure bi-membranée contrairement aux bactéries à Gram-positif qui ont une structure uni-membranée.

En outre, la gentamicine a déjà été utilisée dans la conception de ciment, Palacos Genta® ou Cerafic Genta® [28-29], pour le scellement de prothèse.

B. Caractérisations physico-chimiques des scaffolds

Les scaffolds ont été renforcés par le verre bioactif 46S6 puis synthétisés avec la gentamicine. Leurs synthèses et leurs compositions chimiques sont décrites dans la partie I du chapitre 2. Les caractérisations physico-chimiques sont nécessaires dans le but de comprendre les différences entre les différents scaffolds synthétisés. Le tableau 1 rappelle les compositions chimiques des différents scaffolds.

Scaffolds	Teneur en chitosan (g)	Teneur en verre bioactif (g)
2CH-1BG	3	1,5
1CH-1BG	3	3
1CH-2BG	3	6

Tableau 1 : Teneur en chitosan (CH) et verre bioactif (BG) des scaffolds.

B.1. Diffractions des rayons X

La figure 3 présente les diffractogrammes des 3 types de scaffolds renforcés par le verre bioactif. En guise de témoin, les caractérisations par diffraction des rayons X du verre bioactif et d'un scaffold composé de chitosan seul ont été ajoutées. La gentamicine n'a pas été présentée car le résultat obtenu montre un enregistrement continu du bruit de fond, aucune raie caractéristique n'est visible.

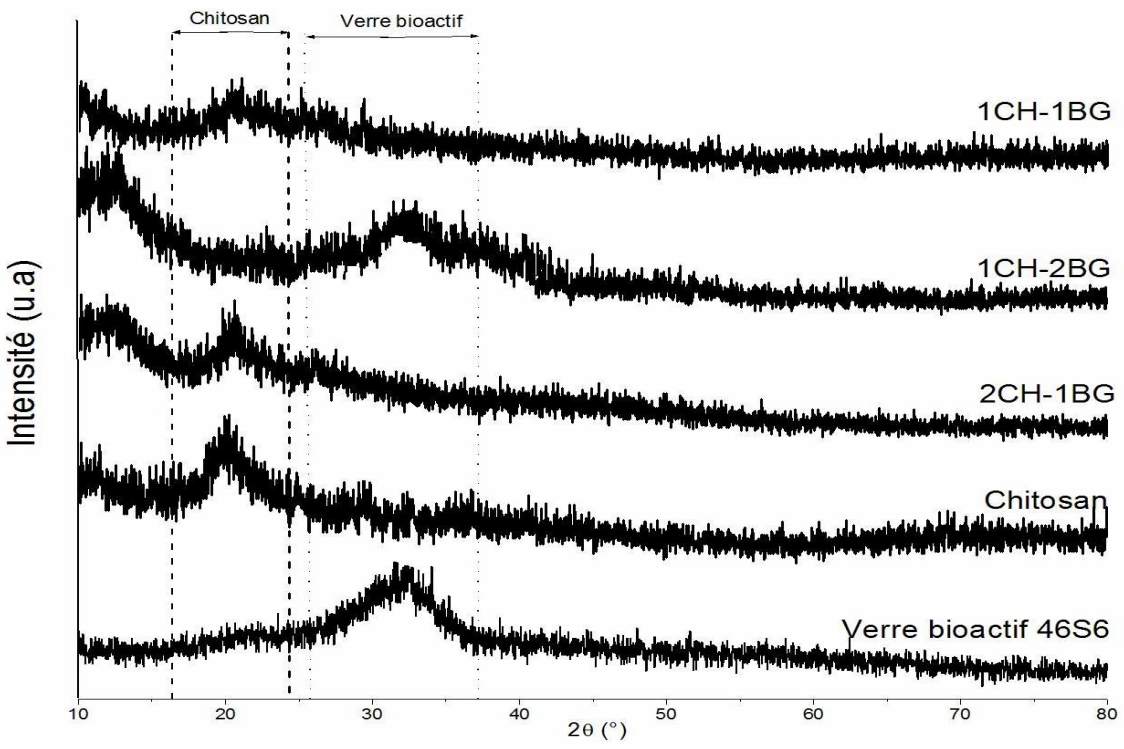


Figure 3 : Diffractogrammes des scaffolds associés à différentes teneurs en chitosan et en verre bioactif 46S6.

Les scaffolds 2CH-1BG présentent un halo de diffraction entre 16 et 24 (2θ°) que nous observons également sur le diffractogramme du chitosan seul. La forte teneur en chitosan introduite ne met pas en évidence la présence du verre bioactif ajouté en plus faible quantité.

Pour les scaffolds 1CH-2BG, la forte teneur en verre bioactif ajouté laisse apparaître un halo de diffraction entre 25 et 37 (2θ°) que nous retrouvons pour le verre bioactif 46S6 seul. Ici, la forte teneur en verre bioactif (66%) ne permet pas d'observer le chitosan présent (33%).
Enfin, pour les scaffold 1CH-1BG, un faible halo de diffraction est visible entre 16 et 24 (2θ°) et est caractéristique du chitosan. Par contre, celui du verre bioactif n'apparait pas. Il se peut, au vue de tous ces résultats, que le verre bioactif soit enrobé par le chitosan et par conséquent il devient inobservable par diffraction des rayons X.

B.2. Spectroscopie d'absorption infrarouge

Sur la figure 4, les spectres obtenus révèlent une même tendance que pour les diffractogrammes, à savoir que les bandes caractéristiques du verre bioactif sont plus intenses lorsque sa teneur est plus importante ; même observation pour le chitosan.

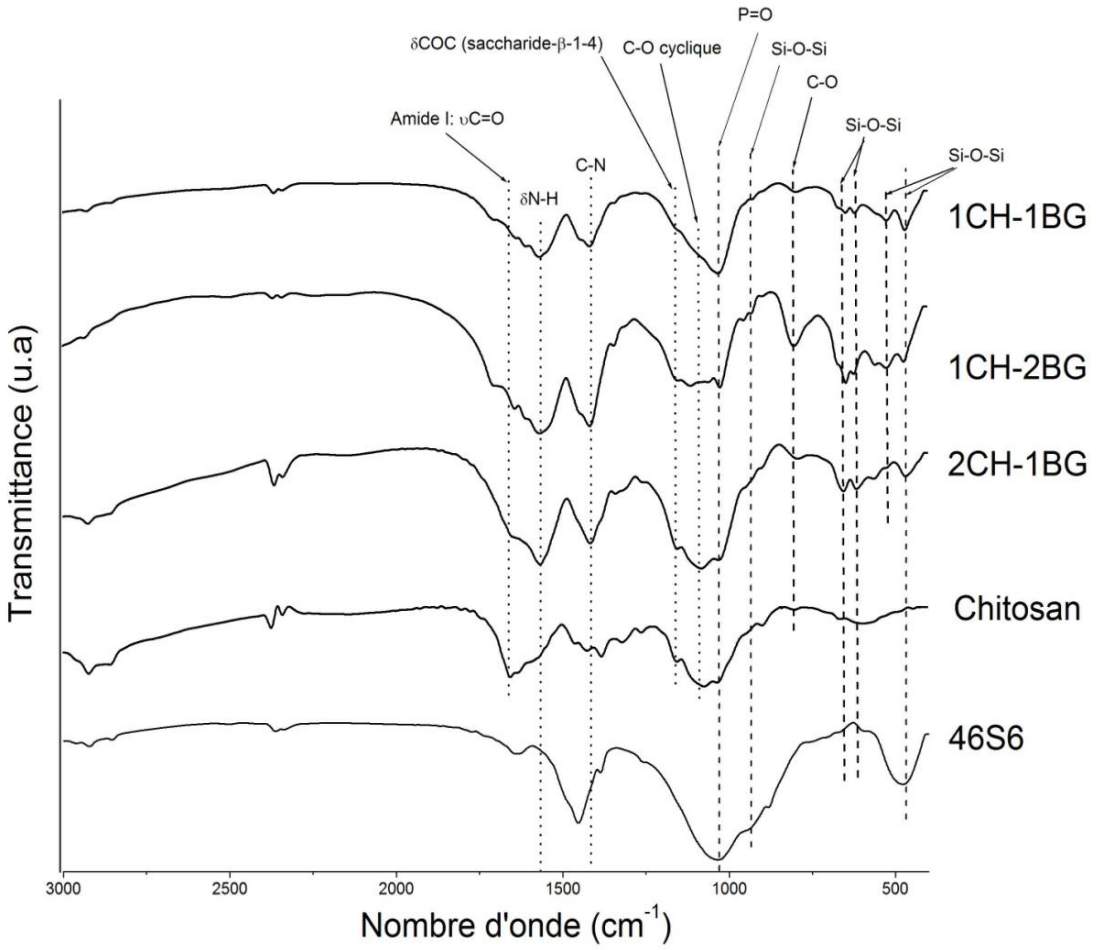


Figure 4 : Spectres infrarouge des scaffolds synthétisés.

Nous pouvons ainsi distinguer à 464 et 517 cm^{-1}, des bandes caractéristiques de liaisons coudées Si-O-Si ; à 616 et 656 cm^{-1}, des bandes caractéristiques des liaisons Si-O-Si formant les tétraèdres SiO_4 présents dans la matrice vitreuse du 46S6 et à 929 cm^{-1}, une bande caractéristique d'une vibration d'étirement d'une liaison Si-O-Si. La présence d'une liaison C-O est signalée par une bande caractéristique d'une vibration d'étirement à 803 cm^{-1}, de même à 1026 cm^{-1} où cette fois-ci il s'agit d'une liaison P=O.

En ce qui concerne les liaisons chimiques du chitosan, nous pouvons voir à 1086 cm^{-1}, une bande caractéristique d'une liaison C-O cyclique ; à 1158 cm^{-1}, une bande caractéristique d'un groupement δCOC saccharide-β-1-4 ; à 1411 cm^{-1}, une bande caractérisant une liaison C-N ; à 1562 cm^{-1}, une liaison N-H et enfin à 1657 cm^{-1}, une bande caractérisant une liaison Amide I : νC=O.

Toutes ces bandes sont visibles sur les spectres de chaque type de scaffold. Seules les intensités des bandes caractéristiques varient en fonction de la teneur en chitosan ou en verre bioactif.

B.3. Evaluation de la porosité par la méthode BET

Afin d'évaluer la porosité des différents scaffolds, des analyses BET ont été entreprises. Cette méthode d'adsorption-désorption est non destructrice et ne déforme pas l'échantillon durant la mesure contrairement à la porosimétrie à mercure, qui, sous l'effet de la pression appliquée au liquide aurait déformé nos échantillons. Les courbes d'adsorption-désorption sont regroupées en figure 5.

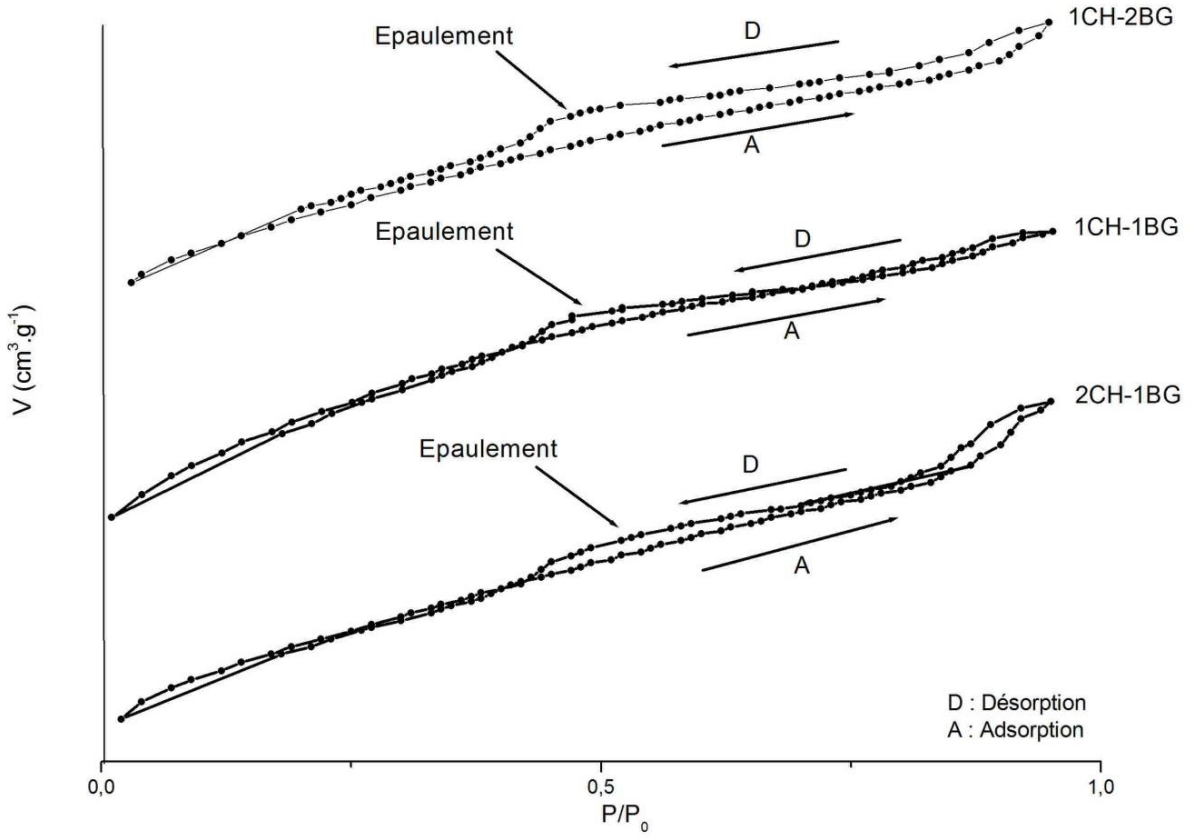


Figure 5 : Isothermes d'adsorption-désorption des scaffolds.

Selon la classification de l'IUPAC (annexe 11), les isothermes obtenues appartiennent au type H3. Sur chaque courbe, une boucle d'hystérésis est présente et d'aspect aplatie. Les isothermes d'adsorption et de désorption sont parallèles. La présence d'une boucle d'hystérésis signifie qu'il y a un phénomène de condensation capillaire caractéristique d'un matériau mésoporeux (pore compris entre 2 et 50 nm). De plus, sur chaque isotherme de désorption, un épaulement est visible à P/P_0=0,5. Il est représentatif de plusieurs familles de mésopores au sein de l'échantillon. La présence de plusieurs familles de mésopores peut être due à l'homogénéisation lors de la dissolution du chitosan, le temps de congélation, le solvant utilisé ou le temps de lyophilisation.

A partir des isothermes obtenues et selon la méthode BET et BJH, les surfaces spécifiques, la taille des pores et le volume de pores moyens ont pu être calculés. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Scaffolds	2CH-1BG	1CH-1BG	1CH-2BG
Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)	7,90 ± 0,08	7,60 ± 0,08	6,90 ± 0,07
Diamètre moyen des pores (nm)	5,20 ± 0,03	3,60 ± 0,03	4,00 ± 0,03
Volume de porosité ($mm^3.g^{-1}$)	8,10 ± 0,08	7,40 ± 0,07	7,00 ± 0,07

Tableau 1 : Surface spécifique, diamètre moyen des pores et volume de porosité des scaffolds.

La première observation est qu'une augmentation de la surface spécifique est visible lorsque la teneur en chitosan augmente. La même tendance est observée pour le volume de pore moyen. Dans la littérature, il a été trouvé que la surface spécifique ainsi que le volume poreux augmentaient lorsque la teneur en chitosan augmentait également [30]. De plus, les surfaces spécifiques du chitosan et du verre 46S6 sont respectivement de 0,7 et 0,9 $m^2.g^{-1}$. Ainsi, l'association des deux augmente la surface spécifique considérablement.

B.4. Etude de la morphologie des scaffolds

Cette analyse des scaffolds a pour but d'observer la porosité et la morphologie des échantillons mais aussi de comprendre l'association entre le verre bioactif et la matrice de chitosan.

Les surfaces des 3 types de scaffold sont présentées dans la figure 6.

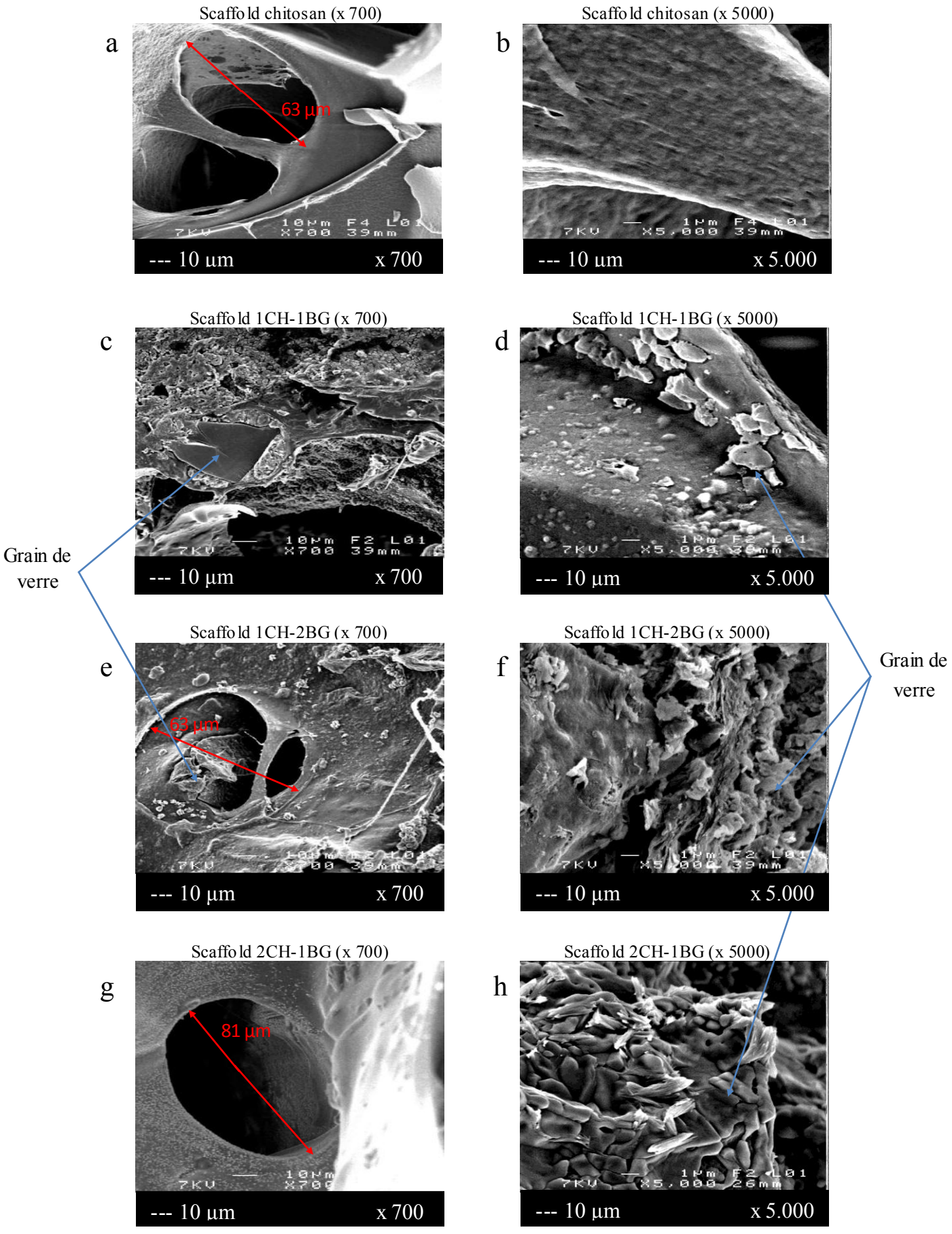


Figure 6 : Micrographies des scaffolds avant immersion.

L'ensemble des scaffolds présente des pores, de forme ronde, que l'on devine plus ou moins profonds et probablement en intercommunication. Ils sont formés par de fines parois de chitosan de l'ordre du micromètre. Ils présentent une taille variant entre 50 et 100 µm sur les micrographies.

En ce qui concerne la combinaison des grains de verre avec la matrice de chitosan, nous pouvons voir, sur les figures 6c et 6e et 6h des grains qui sont « enfermés » dans la matrice de chitosan. Sur les micrographies au grossissement 5000, les grains de verres sont comme « collés » sur les parois en chitosan. L'association du verre au chitosan se fait donc par enrobage des grains par la solution visqueuse de chitosan lors de leur homogénéisation. Le fait d'ajouter des grains de verre augmente la rugosité de surface. En effet, sur la micrographie 6b, le chitosan présente une surface plus lisse que les trois autres scaffolds. Cela peut être bénéfique pour augmenter la surface de contact avec le milieu environnant lors d'essais *in vitro* par exemple.

II. Comportement *in vitro* des scaffolds au contact d'un liquide physiologique synthétique (SBF)

L'objectif de cette étude est de voir l'influence des teneurs en chitosan et en verre bioactif sur la bioactivité. Pour ce faire, les cinétiques de relargage des éléments et le comportement de surface des matériaux, lorsqu'ils sont immergés dans le SBF, ont été étudiés.

A. Caractérisations physico-chimiques des scaffolds après immersion dans le SBF

Nos scaffolds sous forme de poudre ont été étudiés dans le but d'avoir un ratio (Masse/Volume de SBF) précis. Ils ont également été étudiés sous leur forme massive dans le but de pouvoir observer le comportement de surface. Tous les essais ont été réalisés en triplicata.

Le protocole est le même que celui utilisé pour les verres bioactifs et la vitrocéramique poreuse (30 mg dans 60 mL de SBF à 37°C sous agitation 50 rpm).

La figure 1 présente les diffractogrammes des scaffolds après 30 jours d'immersion dans le SBF. Les scaffolds, caractérisés avant immersion, pour comparaison, sont présentés dans la partie précédente (figure 3).

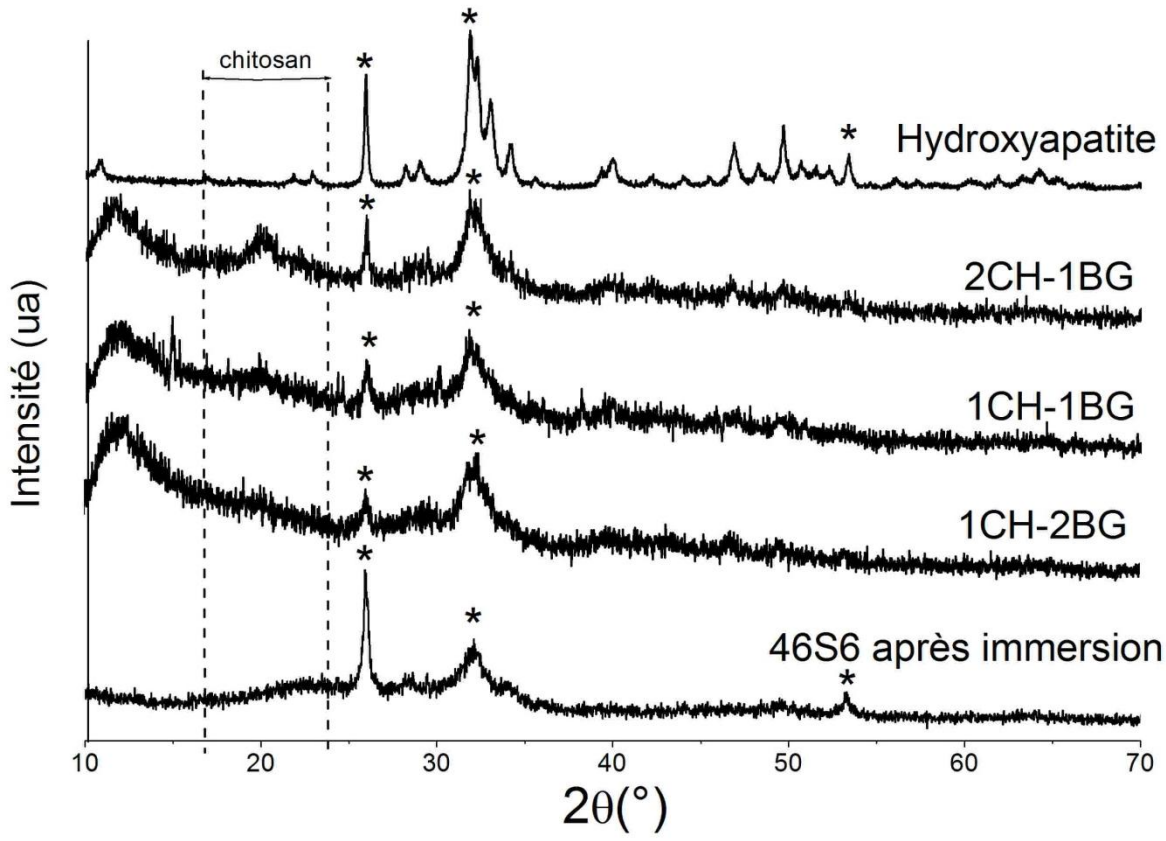


Figure 1 : Diffractogrammes des scaffolds après 30 jours d'immersion dans le SBF.

Après 15 jours d'immersion, pour chaque scaffold, une raie caractéristique de l'hydroxyapatite commence à apparaître. Après 30 jours d'immersion, la formation d'une hydroxyapatite mieux cristallisée est confirmée par l'apparition de deux raies de diffractions plus fins à 26 et 32 (2θ°) correspondant aux réflexions des plans (002) et (211) respectivement [31]. Un halo de diffraction entre 15 et 25 (2θ°) visible sur le diffractogramme du scaffold 2CH-1BG est du à la présence d'une plus forte teneur en chitosan.

Pour tous les scaffolds, la bioactivité apparait à partir de 15 jours d'immersion. L'introduction du verre 46S6 induit, quelle que soit sa proportion dans le scaffold, la formation d'hydroxyapatite. Le verre apporte les éléments nécessaires que sont le calcium, le phosphore et le silicium pour former une couche cristallisée d'hydroxyapatite. Cependant, le scaffold 2CH-1BG présente une meilleure cristallisation notamment en observant la raie à 26 (2θ°). Ce phénomène est à rapprocher des valeurs de surface spécifique et de volume poreux. En effet, la plus grande surface spécifique et le plus gros volume poreux que présente 2CH-1BG pourrait favoriser l'introduction du SBF à travers le matériau, favoriser les échanges ioniques et par conséquent, former une meilleure couche cristallisée d'hydroxyapatite.

L'analyse par spectroscopie infrarouge complète les résultats obtenus par diffraction des rayons X. Les changements structuraux et l'éventuelle formation de liaisons chimiques sont étudiés. La figure 2 présente les spectres infrarouges des scaffolds après 30 jours d'immersion dans le SBF. Les liaisons n'ont pas été indiquées par souci de visibilité mais sont présentées dans la partie précédente (figure 4).

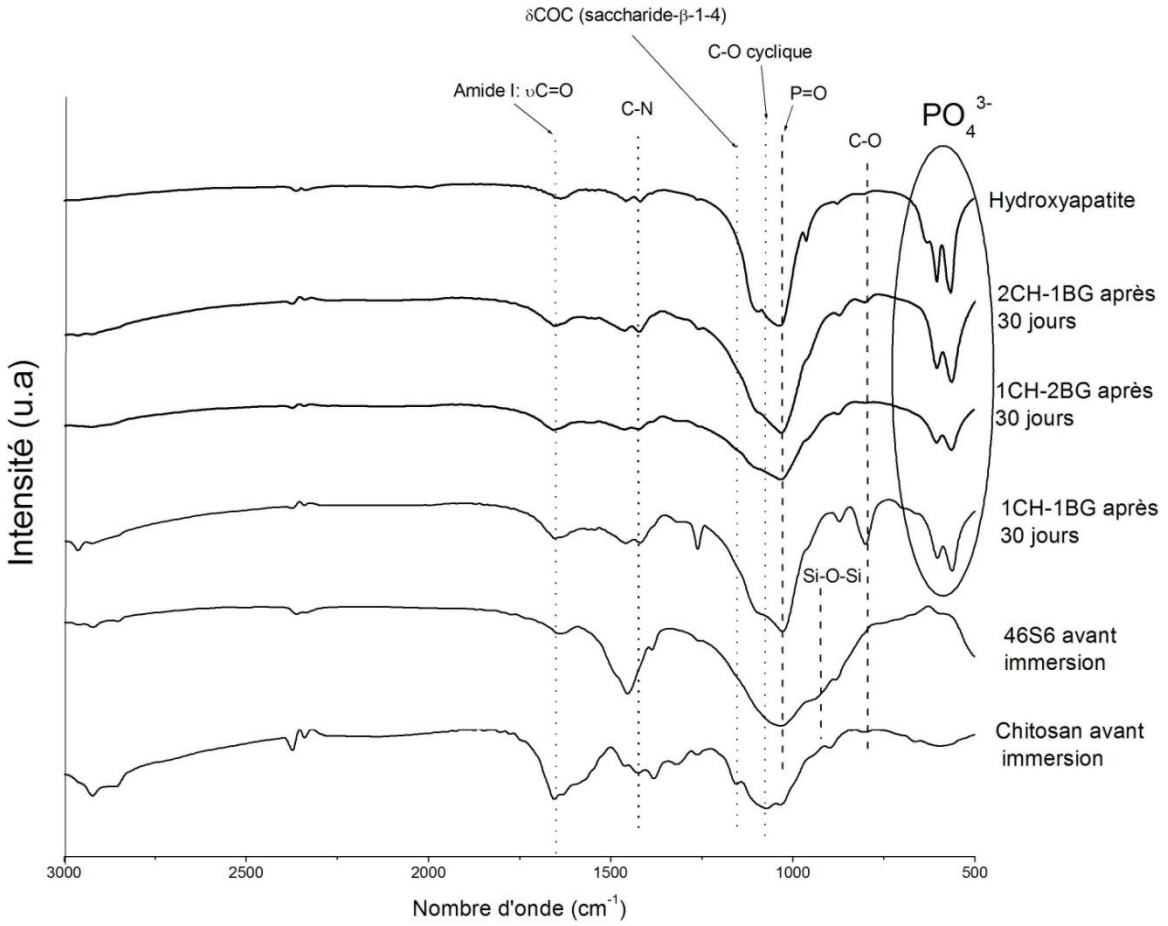


Figure 2 : Spectres infrarouge des scaffolds après 30 jours d'immersion.

Plusieurs modifications sont visibles pour chaque scaffold. En effet, les bandes caractéristiques des fonctions Amide I : νC=O, N-H, C-N, δCOC saccharide-β-1-4 et C-O cyclique visibles respectivement à 1657, 1562, 1411, 1158 et 1086 cm^{-1} sont beaucoup moins intenses et sont donc caractéristiques d'une dégradation de la matrice de chitosan.

Les bandes présentes à 464, 517, 616, 656 et 929 cm^{-1} et caractéristiques des liaisons Si-O-Si avant immersion ont disparu. Cependant, à 885 cm^{-1}, une liaison caractéristique d'une liaison Si-O-Si d'un tétraèdre SiO_4 apparait. La formation de la bande à 885 cm^{-1} peut être

caractéristique de la formation d'une couche de silice après 30 jours d'immersion dans le SBF.

Les changements notables dans les spectres infrarouges sont l'apparition de bandes à 563, 605 et d'un épaulement à 1095 cm^{-1} caractéristiques des liaisons P-O de l'hydroxyapatite [32]. De plus, la liaison P=O visible par la bande à 1026 cm^{-1} est plus intense après 30 jours.

Ces résultats prouvent que le réseau de silice du verre bioactif est dégradé lorsque les scaffolds sont immergés dans le SBF. La matrice de chitosan est également perturbée puisque des liaisons caractéristiques du chitosan sont moins intenses après 30 jours d'immersion. Finalement, la bioactivité est confirmée par l'apparition de liaisons P-O caractéristiques de l'hydroxyapatite. Il est à noter que les bandes à 563 et 605 cm^{-1} pour le scaffold 2CH-1BG sont plus intenses, cela est synonyme d'une meilleure cristallisation de l'hydroxyapatite et confirme également l'hypothèse émise à partir du résultat obtenu par diffraction des rayons X.

Pour mieux comprendre l'apparition de l'hydroxyapatite, le SBF, dans lequel les scaffolds ont été immergés, a été analysé par ICP-OES dans le but de mesurer les concentrations en silicium (pour la dégradation du verre), en calcium et en phosphore (pour la formation de l'hydroxyapatite) [33-35].

B. Composition chimique du SBF après immersion des scaffolds

Les figures 3.a, 3.b et 3.c présentent respectivement les concentrations en silicium, en calcium et en phosphore dans le SBF après immersion des scaffolds.

Les cinétiques de relargage de ces 3 éléments sont étudiées en fonction de la teneur en chitosan et en verre bioactif.

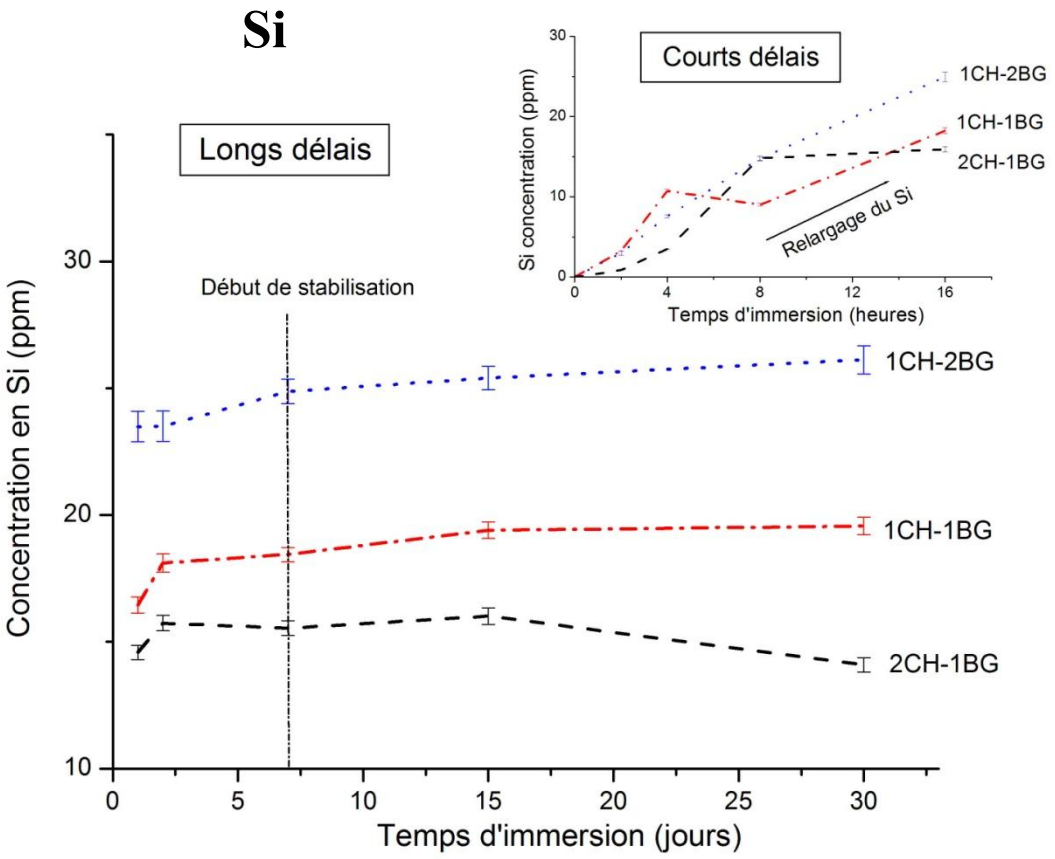


Figure 3.a : Concentration en silicium dans le SBF après immersion des scaffolds.

Durant les premières heures d'immersion, le silicium est relargué rapidement, la concentration passant de 0 à 19 ppm en moyenne après 16 heures d'immersion. Le silicium est ensuite relargué continuellement jusqu'à 30 jours mais une stabilité débute après 7 jours d'immersion. Le scaffold 1CH-2BG contenant plus de verre bioactif relargue plus de silicium (26 ppm) à l'issu des 30 jours d'immersion. 1CH-1BG et 2CH-1BG relarguent respectivement 19,5 et 14 ppm après 30 jours d'immersion.

Ainsi, nous pouvons conclure que lorsque la teneur en chitosan est importante, le relargage du silicium est ralentie. Les grains de verre enrobés dans la matrice de chitosan peuvent expliquer le ralentissement du relargage du silicium.

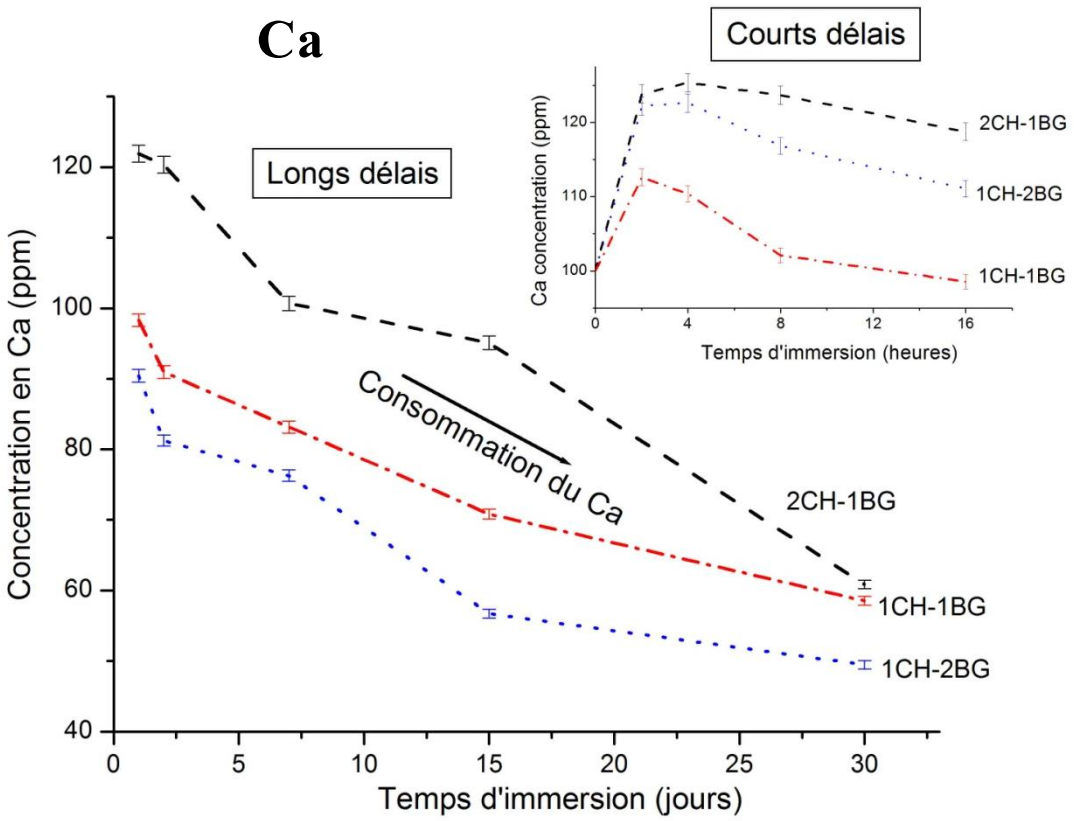


Figure 3.b : Concentration en calcium dans le SBF après immersion des scaffolds.

Pour le calcium, la concentration diminue continuellement à partir de 2 heures jusqu'à 30 jours d'immersion. Ce n'est que durant les 2 premières heures que le calcium est relargué passant de 100 ppm à 110 ppm pour 1CH-1BG et environ 120 ppm pour 1CH-2BG et 2CH-1BG.

Selon la teneur en verre bioactif dans le scaffold, nous pouvons remarquer que la cinétique de consommation du calcium par les scaffolds est différente. En effet, après 15 jours d'immersion, la concentration en calcium dans le SBF est de 95 ppm pour 2CH-1BG, 70 ppm pour 1CH-1BG et 57 ppm pour 1CH-2BG. Après 30 jours, les concentrations en calcium dans le SBF sont très proches : 61 ppm pour 2CH-1BG, 58 ppm pour 1CH-1BG et 50 ppm pour 1CH-2BG. Ainsi, une plus forte teneur en verre bioactif accélère la cinétique de consommation du calcium par les scaffolds. Autrement dit, une forte teneur en chitosan qui enrobe les grains de verre expliquent la consommation du calcium. A partir de 15 jours, une dégradation de la matrice de chitosan doit permettre une accélération de cette consommation, notamment pour 2CH-1BG.

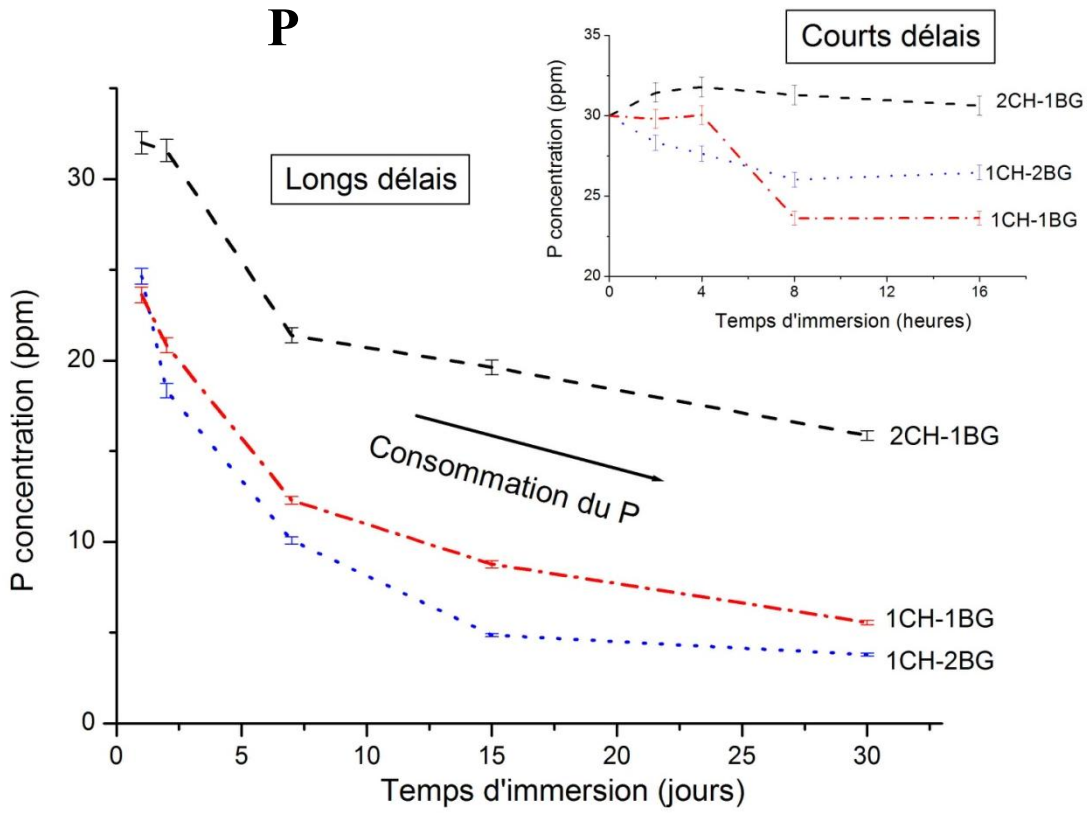


Figure 3.c : Concentration en phosphore dans le SBF après immersion des scaffolds.

Pour le phosphore, nous observons une même tendance que le calcium : une diminution continue de la concentration. Durant les premières heures, 1CH-1BG et 1CH-2BG consomment plus rapidement le phosphore que 2CH-1BG. Ce n'est vraiment qu'à partir d'un jour jusqu'à 30 jours d'immersion que les concentrations en phosphore suivent une même allure pour chaque scaffold. Néanmoins, le phosphore est consommé de manière plus lente par 2CH-1BG que par 1CH-1BG et que 1CH-2BG. Les concentrations après 30 jours d'immersion atteignent 16 ppm pour 2CH-1BG, 6 ppm pour 1CH-1BG et 4 ppm pour 1CH-2BG. L'effet de la teneur en chitosan et en verre bioactif sur la concentration en phosphore est le même que pour celle en calcium. Le chitosan ralentit la consommation du phosphore alors que le verre bioactif l'accélère.

C. Morphologie et analyses des surfaces après immersion

Dans le but de comprendre les comportements de surface, les échantillons ont été observés au MEB après 30 jours d'immersion (grossissement 1000 colonne de gauche et grossissement 5000 colonne de droite).

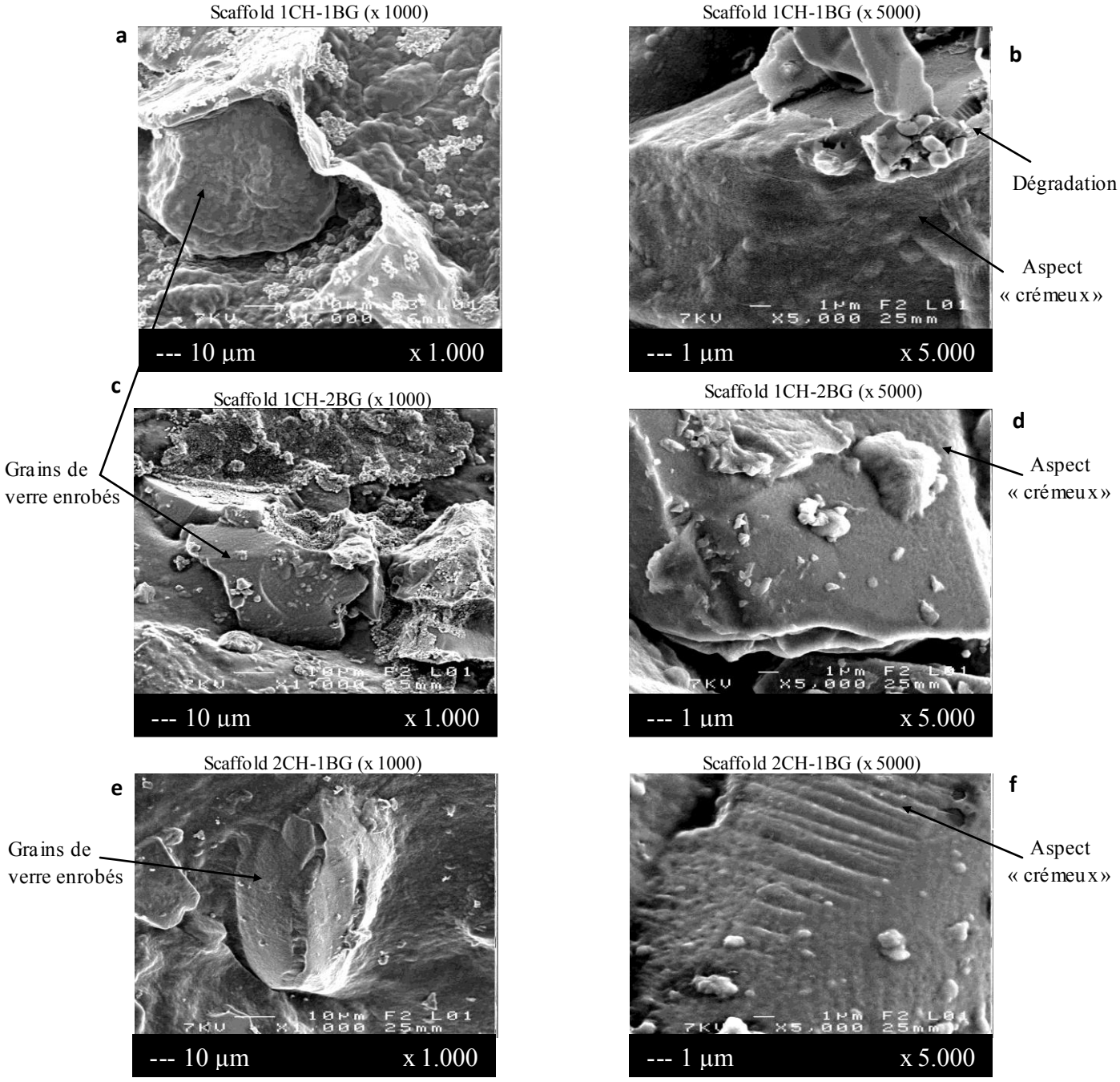


Figure 4 : Micrographies des scaffolds après 30 jours d'immersion dans le SBF

a et **b** 1CH-1BG ; **c** et **d** 1CH-2BG ; **e** et **f** 2CH-1BG

Les micrographies et les analyses des scaffolds après 30 jours d'immersion nous laissent observer deux phénomènes: le premier est que sur la majorité de la surface des scaffolds, nous n'avons pu observer de couche d'hydroxyapatite bien cristallisée comme attendu par les résultats obtenus par diffraction des rayons X et par spectroscopie infrarouge. Sur ces clichés, nous observons des grains de verres qui sont pour la plupart recouverts d'un film de chitosan.

Nous pouvons constater que sur certaines micrographies, ce film de chitosan est abîmé preuve qu'il y a une dégradation des matériaux dans le SBF. Lorsque nous regardons la surface de chaque scaffold, nous constatons une sorte de bouillonnement de surface qui apporte, à la matrice de chitosan, un aspect. Ainsi, il se peut que la couche d'hydroxyapatite se soit formée sous les parois de chitosan recouvrant ces grains de verre. Cet aspect crémeux est synonyme d'une dégradation dans le SBF.

L deuxième phénomène est la présence d'un début de cristallisation sur la surface des grains de verre qui ne sont pas recouverts par la matrice de chitosan. Nous avons entrepris les observations mais aussi les analyses chimiques pour comparer les teneurs en silicium, en calcium et en phosphore principalement (figures 5a, 5b et 5c). Les fortes teneurs en carbone et en oxygène sont essentiellement dues à la présence du chitosan.

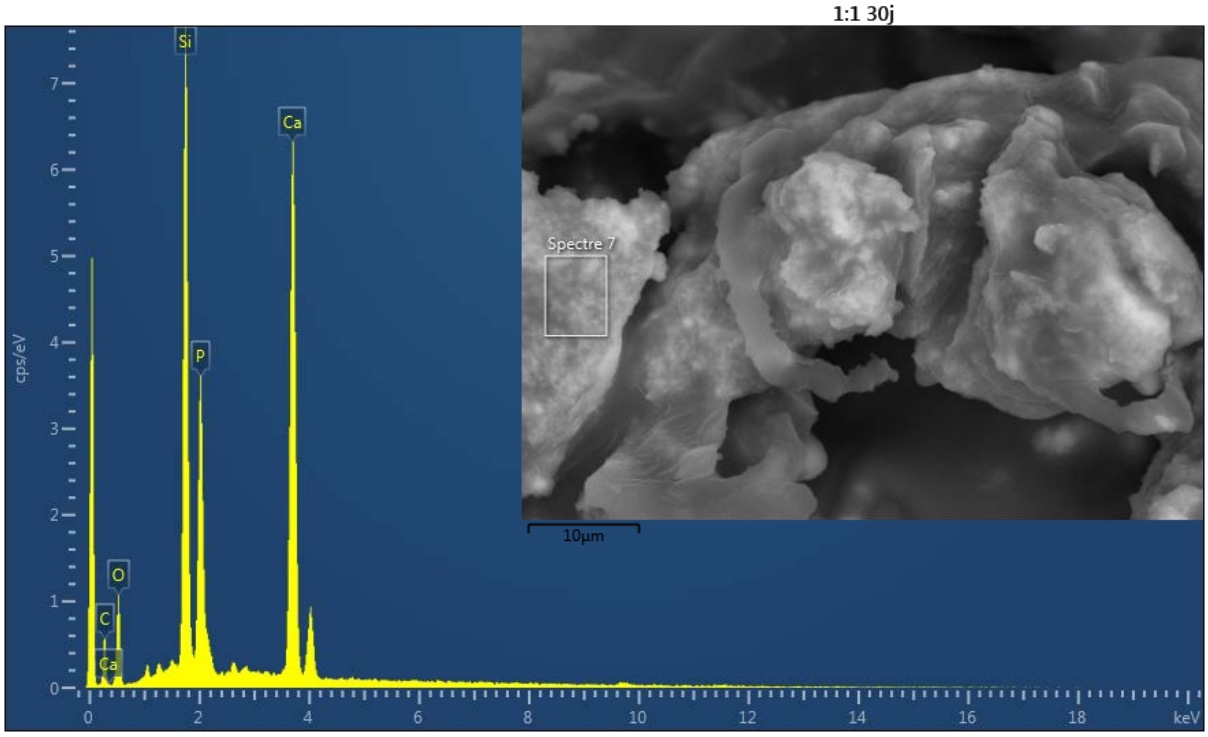


Figure 5.a : Analyses de la surface d'un grain de verre non enrobé présent dans les scaffolds 1CH-1BG après 30 jours d'immersion.

La surface du grain de verre présent dans le scaffold 1CH-1BG après 30 jours d'immersion présente un début de cristallisation sur une couche d'aspect amorphe. Nous attribuons cette observation à un début de cristallisation d'un phosphate de calcium (du fait de teneurs importantes en calcium et en phosphore) sur la couche de silice amorphe qui se forme lors du processus de bioactivité.

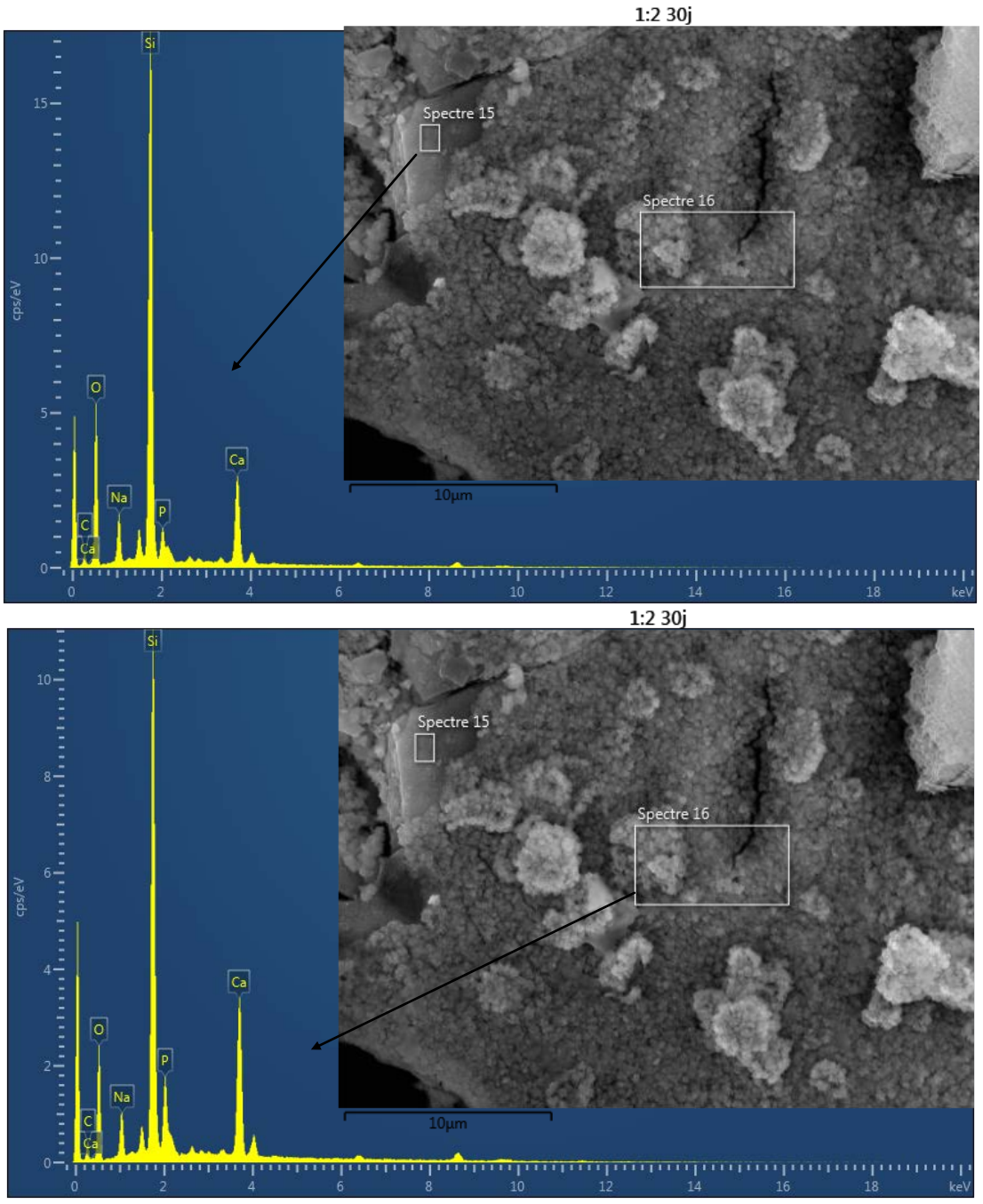


Figure 5.b : Analyses de la surface d'un grain de verre non enrobé présent dans les scaffolds 1CH-2BG après 30 jours d'immersion.

Nous avons analysé, sur le scaffolds 1CH-2BG, deux zones : une n'ayant pas subi de modification de surface et une autre présentant un dépôt de cristaux en début de formation. En effet, nous constatons nettement que des amas se sont formés sur la surface du grain de verre

que nous attribuons à la formation d'un phosphate de calcium en phase de cristallisation. Les teneurs en calcium et en phosphore sont d'ailleurs plus importantes que sur la zone non modifiée. Sur les 2 zones, la présence du silicium est également importante et correspond à la couche de silice sur laquelle les cristaux se sont formés.

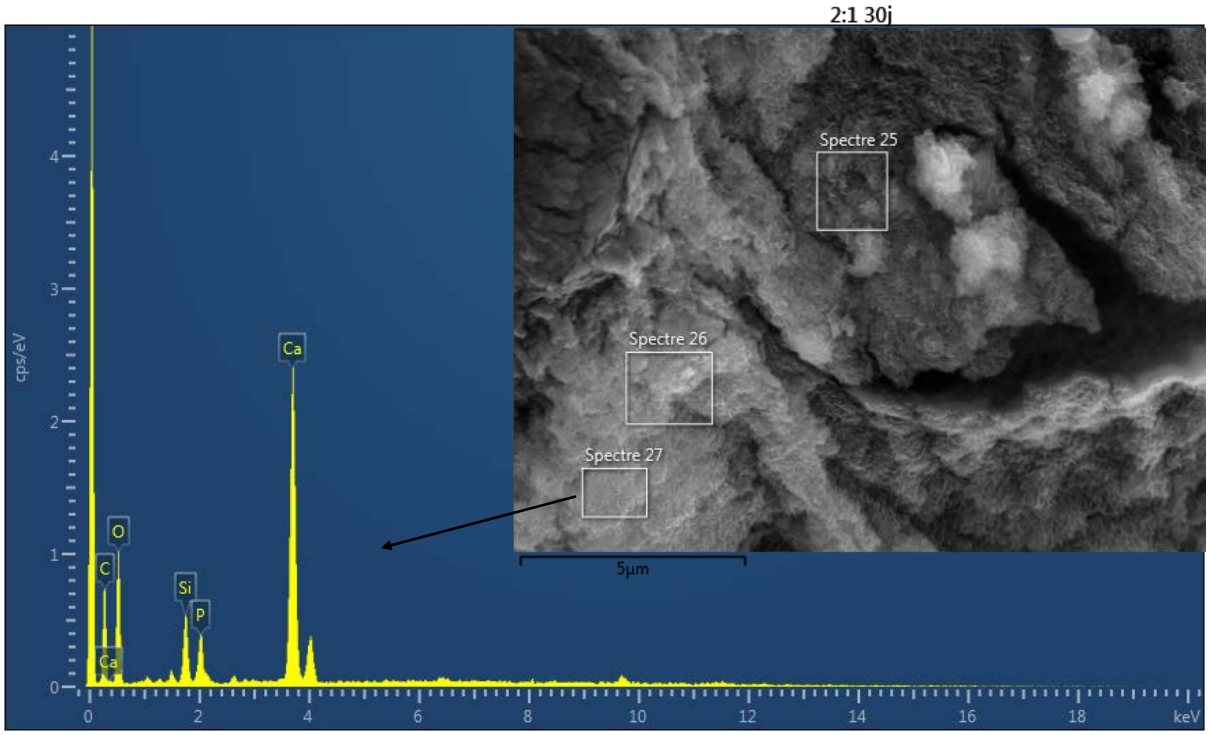


Figure 5.c : Analyses de la surface d'un grain de verre non enrobé présent dans les scaffolds 2CH-1BG après 30 jours d'immersion.

Comme lors de l'observation du grain du scaffold 1CH-2BG, nous voyons ici une modification de la surface du grain de verre. Des amas, mieux cristallisés que sur les précédents scaffolds, se sont formés. Le calcium est présent majoritairement et le silicium est moins détecté, soit parce qu'il a été libéré dans le milieu, soit parce que la couche de cristaux est trop épaisse pour pouvoir l'analyser.

Bilan des observations après immersion : Sur les 3 scaffolds synthétisés, après immersion, les grains de verres sont majoritairement enrobés par la matrice de chitosan. Il a été difficile de détecter des grains de verre « libres ». Ceux que nous avons appréhendés laissent apparaitre des modifications de surface : une couche de silice s'est formée sur laquelle croissent des cristaux de phosphate de calcium. Il est donc fort probable que les verres enrobés réagissent de la même manière sous la couche de chitosan.

Analyse chimique d'un scaffold contenant de la gentamicine :

Pour la suite de l'étude, nous avons analysé un scaffold avant immersion et contenant de la gentamicine. Nous nous sommes intéressés, à l'élément soufre car la gentamicine est introduite sou sa forme sulfate, et aussi car le verre et le chitosan n'en contiennent pas. Le résultat obtenu est présenté en figure 6.

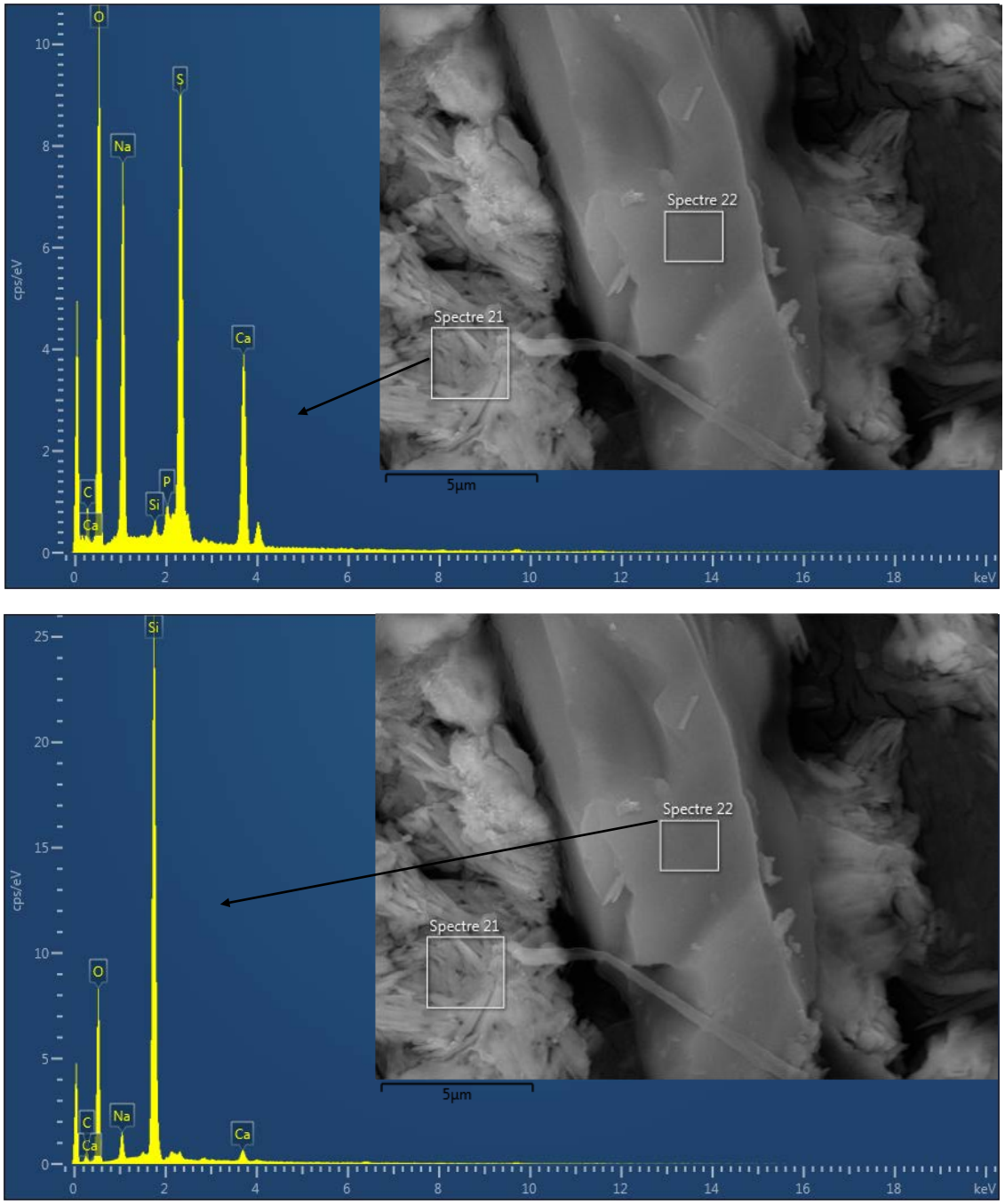


Figure 6 : Analyses de la surface d'un scaffold contenant de la gentamicine.

Sur les micrographies, nous distinguons deux zones : une zone de gentamicine fixée sur la matrice de chitosan et une autre représentant un grain de verre. L'analyse de la première laisse apparaitre une teneur importante en soufre prouvant la présence de la gentamicine sur nos matériaux. La deuxième zone est majoritairement composée de silicium caractéristique du grain de verre.

Ces analyses nous confirment que la gentamicine est bien présente à la surface des scaffolds et que celle-ci se répartit en amas sur toute la surface de chitosan.

Les résultats du relargage de cette molécule sont décrits dans la partie suivante.

III. Les scaffolds : Support pour la vectorisation d'une substance médicamenteuse dans un milieu liquide.

L'application *in situ* d'un agent antibiotique a déjà été réalisée dans plusieurs types d'infections osseuses.

Nos scaffolds ont été préparés avec des concentrations de départ de 10 et 30 $mg.mL^{-1}$ de gentamicine, soit à 1% et 3%. Il s'agit d'essai préliminaire en vue d'une amélioration de la synthèse des scaffolds et de leur capacité à relarguer le médicament.

La synthèse des scaffolds contenant de la gentamicine est décrite au chapitre 2.

A. Protocole de l'étude

Pour étudier le relargage de la gentamicine, des scaffolds de 300 mg (±10 mg) ont été immergés dans 10 mL de PBS qui est une solution tampon physiologique saline qui ne contient ni calcium ni magnésium. Cette solution (BioWhittaker® Dulbecco's PBS) a été choisie car elle n'implique pas de réactions de bioactivité avec nos matériaux. Elle est composée de chlorure de sodium, de phosphate de disodium et de phosphate de potassium. Les concentrations en sels dans la solution sont identiques à celles présentes dans le corps humain. Le pouvoir tampon du PBS est basé sur la paire dihydrogène/hydrogène qui est l'un des mécanismes qui maintient le pH du sang :

$$HPO_4^{2-} + H^+ = H_2PO_4^-$$

Le relargage de gentamicine a été étudié après 5, 10, 20, 30 minutes et 1, 2 et 6 heures d'immersion des scaffolds dans le PBS. Ces délais ont été choisis car la gentamicine commence à être éliminée après 6 heures par l'organisme [36]. De plus, différentes études ont montré que cet antibiotique était rapidement diffusé dans le milieu environnant. Chaque délai a été étudié en triplicata. Les solutions de PBS, après immersion des scaffolds, ont été analysées par spectrophotométrie UV (6705 Jenway) pour avoir la concentration en gentamicine qui absorbe à 256 nm. Au préalable, une droite d'étalonnage a été tracée à partir de 7 solutions étalons dont les concentrations en gentamicine étaient croissantes : 1, 2, 5, 8, 10, 15 et 30 $mg.mL^{-1}$. Un blanc, composé de PBS seul, a été analysé. Les résultats obtenus représentent une moyenne des triplicatas analysés pour chaque délai.

B. Etude de la cinétique de relargage par spectrophotométrie UV.

Les résultats obtenus après analyse par spectrophotométrie à 276 nm sont présentés dans les figures 1.a et 1.b. Le but étant de voir l'effet de la teneur en chitosan et en verre bioactif sur le relargage de cet antibiotique.

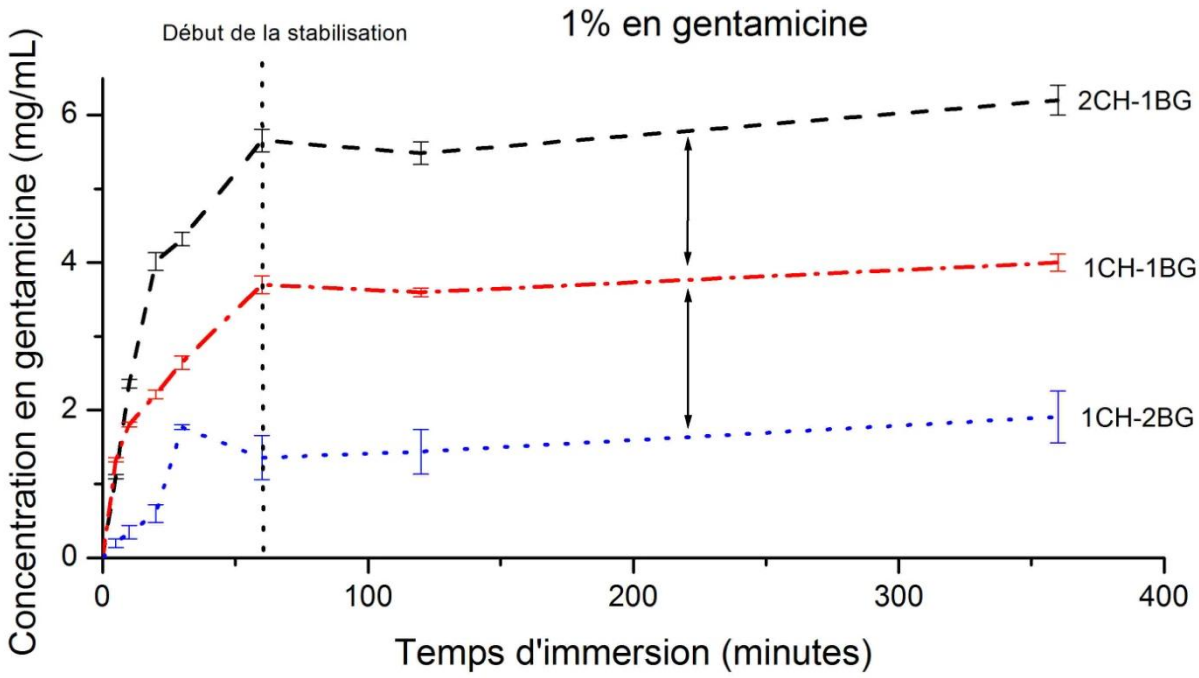


Figure 1.a : Concentration en gentamicine dans le PBS après immersion des scaffolds contenant 1% en gentamicine.

Pour les scaffolds chargés avec 1% en gentamicine, durant les premières minutes, il y a un relargage très important. La concentration passe de 0 à : 5,62 $mg.mL^{-1}$ pour 2CH-1BG, 3,66 $mg.mL^{-1}$ pour 1CH-1BG et 1,70 $mg.mL^{-1}$ pour 1CH-2BG après 60 minutes d'immersion. Après, une stabilisation est observée pour les trois scaffolds. Après 6 heures d'immersion, la concentration en gentamicine atteint 5,9 $mg.mL^{-1}$, 4,0 $mg.mL^{-1}$ et 1,9 $mg.mL^{-1}$ pour respectivement 2CH-1BG, 1CH-1BG et 1CH-2BG.

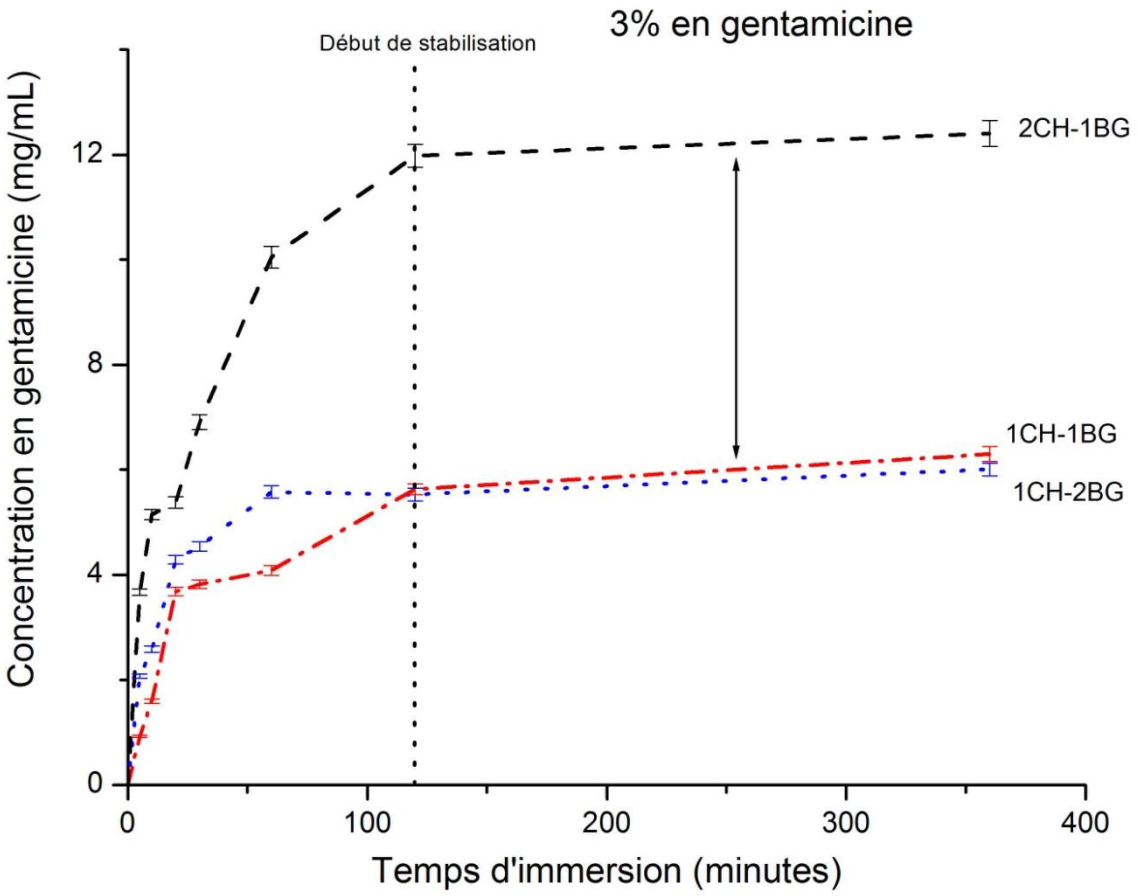


Figure 1.b : Concentration en gentamicine dans le PBS après immersion des scaffolds contenant 3% en gentamicine.

Concernant les scaffolds chargés avec 3% en gentamicine, durant les premières minutes jusqu'à 2 heures d'immersion, le relargage de gentamicine est rapide passant de 0 à 11,9 $mg.mL^{-1}$ pour 2CH-1BG, 5,6 $mg.mL^{-1}$ pour 1CH-1BG et 1CH-2BG. La stabilisation est observée ici après 2 heures d'immersion et les concentrations en gentamicine atteignent 12,3 $mg.mL^{-1}$ pour 2CH-1BG et 6,5 $mg.mL^{-1}$ pour les deux autres scaffolds.

Ces résultats sont intéressants car nous observons une même tendance de relargage quelle que soit la concentration en gentamicin de départ: 2CH-1BG > 1CH-1BG > 1CH-2BG (> signifie «relargue plus »).

Une différence d'un facteur 2 est observée entre les valeurs de concentrations en gentamicine pour les scaffolds chargés avec 1% en gentamicine et ceux chargés avec 3%. Nous pouvons dire également que la présence d'une plus grande quantité de verre bioactif tend à ralentir le

relargage de la gentamicine. Au contraire, une teneur en chitosan plus importante favorise un relargage plus rapide.

Plusieurs caractéristiques des scaffolds, mesurées dans le chapitre précédent, peuvent expliquer la délivrance du médicament comme leur porosité et leur surface spécifique [37]. En effet, 2CH-1BG, présentant une plus grande surface spécifique (7,9 $m^2.g^{-1}$) et un plus grand volume poreux (8,1 $mm^3.g^{-1}$), relargue plus de gentamicine que les deux autres types de scaffolds présentant des caractéristiques moindres.

Il se peut également que la nature de l'antibiotique soit impliquée dans la cinétique de relargage [37]. En effet, la gentamicine présente un relargage précoce du à son caractère hydrophile [37]. Une fois plongée dans le PBS, la gentamicine est immédiatement relarguée durant les premières heures d'immersion.

Le relargage instantané de la gentamicine peut également être expliqué par les liaisons qui se créent entre le chitosan et le médicament. La littérature ne mentionne pas les possibilités de liaisons chimiques. L'hypothèse la plus plausible serait que des liaisons hydrogènes soient formées entre les groupements OH du chitosan et de la gentamicine créant un « effet ZIP ». Le chitosan et la gentamicine seraient liés grâce à des liaisons hydrogènes qui sont vingt fois plus faibles que des liaisons covalentes d'où la rapide libération de la molécule dans le milieu.

C. Modèle mathématique du relargage du médicament dans le milieu.

Une fois les courbes de relargage obtenues, notre attention s'est portée sur l'allure de ces dernières. En effet, nous observons que quelle que soit la composition chimique des scaffolds, les courbes de relargage présentent une allure similaire.

A l'aide d'un logiciel informatique, nous avons pu tracer des courbes de régression (figure 2 et 3) et obtenir un modèle mathématique du relargage de la gentamicine dans le PBS.

Les relargages de la gentamicine pour les scaffolds synthétisés avec 1 et 3% suivent une loi du type :

$$C_g = C_0 \times \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)\right]$$

où $\mathbf{C_g}$ est la concentration en gentamicine ; $\mathbf{C_0}$ la concentration limite relarguée dans le milieu, **t** le temps d'immersion des scaffolds et $\boldsymbol{\tau}$ le temps de relaxation du système.

τ , le temps de relaxation ou constante de temps, est lié à la réponse du système étudié (ici les scaffolds) à une perturbation instantanée (l'immersion dans le PBS). τ représente l'ordre de grandeur du temps au bout duquel le nouvel équilibre est atteint (la concentration limite).
Pour chaque type de scaffold, les expressions mathématiques sont données dans les tableaux 1 et 2.

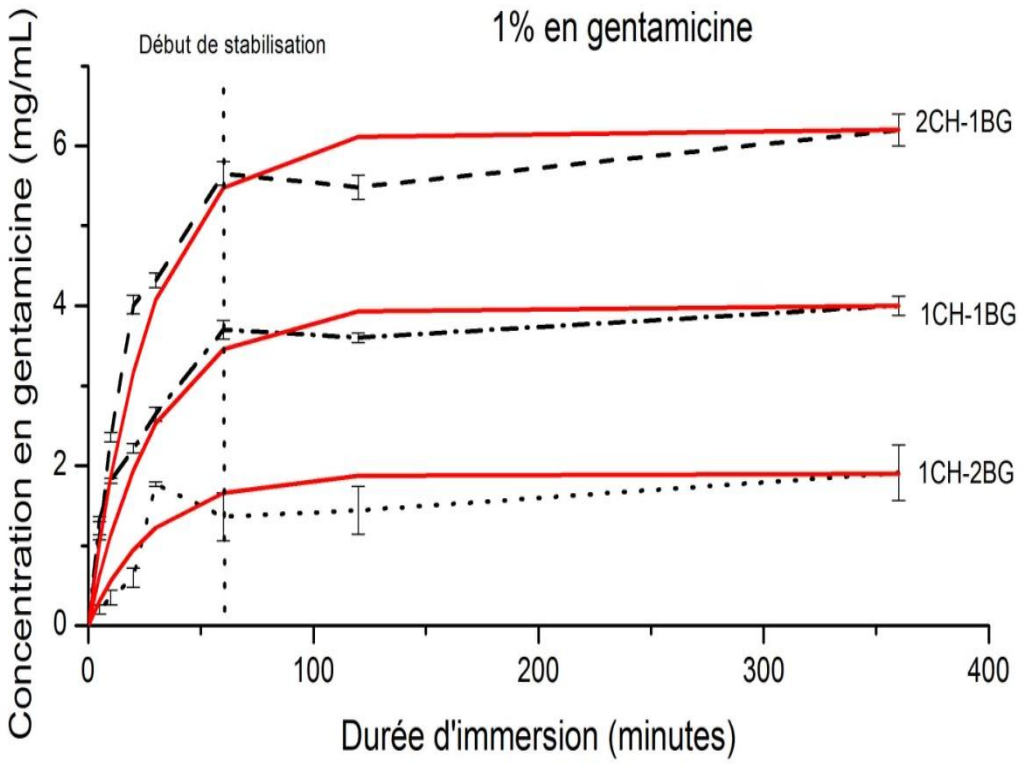


Figure 2 : Courbes de régression représentant la tendance de relargage par les scaffolds préparés avec 1% de gentamicine.

Pour les scaffolds synthétisés avec 1% de gentamicine, les temps de relaxation sont proches et se situent autour de 29 minutes, c'est donc le temps qu'il faut pour que les scaffolds, une fois immergés dans le PBS, retrouvent un nouvel équilibre. La teneur en chitosan ou en verre bioactif n'a pas d'influence sur le temps de relaxation. Elles en ont en revanche sur la quantité de gentamicine relarguée dans le milieu PBS. Pour un même temps de relaxation, la concentration en gentamicine relarguée est plus importante lorsque la teneur en chitosan est grande; ceci a déjà été décrit dans la partie précédemment.

Scaffolds 1%	$C_g = C_0 \times \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)\right]$		
	C_0 (mg/mL)	τ (minutes)	Loi
1CH:2BG	1.90 ± 0.01	29	$C_g = 1.90 \times \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{29}\right)\right]$
1CH:1BG	4.00 ± 0.01	30	$C_g = 4.00 \times \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{30}\right)\right]$
2CH:1BG	6.20 ± 0.01	28	$C_g = 6.20 \times \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{28}\right)\right]$

Tableau 1 : Expression mathématique du relargage de gentamicine par chaque type de scaffold.

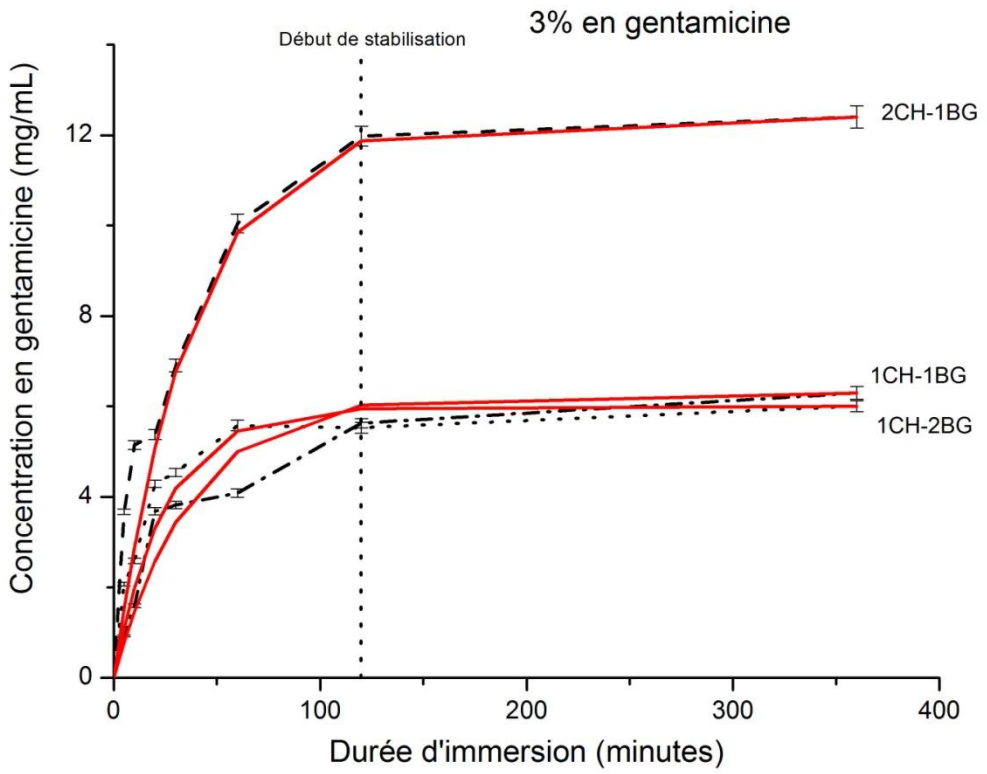


Figure 3 : Courbes de régression représentant la tendance de relargage par les scaffolds préparés avec 3% de gentamicine.

Pour les scaffolds synthétisés avec 3% de gentamicine, il faut 38 minutes pour qu'ils atteignent leur nouvel équilibre. Comme dans le cas précédent, la teneur en chitosan et en verre bioactif n'ont pas d'impact sur le temps de relaxation des scaffolds. Au contraire, l'ajout

d'une plus forte concentration en gentamicine permet d'augmenter la durée de relargage puisque le temps de relaxation est plus élevé.

Scaffolds 3%	$C_g = C_0 \times \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)\right]$		
	C_0 (mg/mL)	τ (minutes)	Equation
1CH :2BG	6.00 ± 0.01	38	$C_g = 6.00 \times \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{38}\right)\right]$
1CH :1BG	6.30 ± 0.01	38	$C_g = 6.30 \times \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{38}\right)\right]$
2CH :1BG	12.40 ± 0.01	38	$C_g = 12.40 \times \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{38}\right)\right]$

Tableau 2 : Expression mathématique du relargage de gentamicine par chaque type de scaffold.

Conclusion :

La combinaison du chitosan et du verre bioactif se fait par enrobage des grains de verre lors de la dissolution de la poudre de chitosan.

Les scaffolds, quelle que soit la teneur en verre bioactif, présentent un caractère bioactif à partir de 15 jours d'immersion dans le SBF. L'hydroxyapatite est détecté par spectroscopie infrarouge et par diffraction des rayons X. Le dosage des éléments silicium, calcium et phosphore montre, que selon la teneur en chitosan ou en verre bioactif, le phénomène de libération/consommation est plus ou moins accentué. En effet, la présence d'une forte teneur en chitosan, par rapport à celle en verre bioactif, a tendance à ralentir la cinétique de bioactivité. Au contraire, cela améliore la surface spécifique, le diamètre moyen des pores et le volume de porosité des scaffolds. Pour le relargage de la gentamicine, cela augmente la cinétique de relargage dans le milieu.

Un paramètre important de notre étude est le temps de relaxation des scaffolds. Des modèles mathématiques ont pu être établis et ont révélé que quelle que soit la composition chimique des scaffolds, les temps de relaxation ne varient pas, pour une même concentration en gentamicine introduite. C'est en faisant varier la concentration de médicament introduite que nous pouvons faire varier les temps de relaxation des scaffolds et ainsi adapter la cinétique de libération à une situation clinique.

Ces résultats sont importants dans la mesure où le type de scaffolds et la concentration en gentamicine pourraient être adaptés au type, à la gravité et à l'avancement d'une infection, au poids du patient (prescription en gentamicine), à son sexe et également au site à traiter.

Références Chapitre 5

[1] G.Chen, T. Ushida, T. Tateishi. *Scaffold design for tissue engineering.* Macromolecular Bioscience 2 (2002) 67-77.

[2] U. Kneser, P.M Kaufmann, H.C. Fiegel, J. M. Pollok, D. Kluth, H. Herbst, X. Rogiers. *Long-term differentiated function of heterotopically transplanted hepatocytes on three-dimensional polymer matrices*. J. Biomed. Mater. Res. 47 (1999) 494-503.

[3] T. Hadlock, C. Sundback, D. Hunter, M. Cheney, J.P Vacanti. *A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration.* Tissue Eng. 6 (2000) 119-127.

[4] S.L. Ishaug, G.M. Crane, M.J. Miller, A.W. Yasko, M.J. Yaszemski, A.G. Mikos. *Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds.* J. Biomed. Mater. Res. 36 (1997) 17-28.

[5] L.E. Freed, J.C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanual, A.C. Mikos, R. Langer. *Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymer.* J. Biomed. Mater. Res. 27 (1993) 11-23.

[6] R. Lanza, R. Langer, J.P. Vacanti. Principles of tissue engineering. Fourth Edition, Academic Press, 2014

[7] LE. Freed, GC Jr Engelmayr, JT Boltenstein, FT. Moutos, G. Guilak. *Advanced material strategie engineering scaffolds.* Adv Mater 21 (2009) 3410-3418.

[8] LE. Freed, DA. Grande, Z. Lingbin, J. Emmanuel, JC. Marquis, R. Langer. *Joint resurfacing allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds.* J Biomed Mater Res 28 (1994) 891-899.

[9] LE Freed, G. Vunjak-Novakovic, RJ. Biron, DB. Eagles, DC. Lesnoy, SK. Barlow, R. Langer. *Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering*. Bio/Technology 12 (1994) 689-693.

[10] E. Wintermantel, J. Mayer, J. Blum, KL. Eckert, P. Luscher. *Tissue engineering scaffolds using superstructures.* Biomaterials 17 (1996) 83-91.

[11] I.Y. Kim, S.J. Seo, H.S. Moon, M.K. Yoo, I.Y. Park, B.C. Kim, C.S. Cho. *Chitosan and its derivatives for tissue engineering*. Biotechnol. Adv. 26 (2008) 1-21.

[12] V. Sundararajan Madihally, W.T. Howard Matthew. *Porous chitosan scaffolds for tissue engineering.* Biomaterials 20 (1999) 1133-1142.

[13] M.A. Barbosa, P.L. Granja, C.C. Barrias, I.F. Amaral. *Polysaccharides as scaffolds for bone regeneration.* ITBM-RBM 26 (2005) 212-217.

[14] H. Yun, S. Kim , E.K. Park. *Bioactive glass–poly (ε-caprolactone) composite scaffolds with 3 dimensionally hierarchical pore networks.* Mat. Sci. Eng. C 31 (2011) 198–205.

[15] J.B. Leach, C.E. Schmidt. *Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds.* Biomaterials 26 (2005) 125–135.

[16] A. Berthold, K. Cremer, J. Kreuter. *Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs.* Journal of Controlled Release 39 (1996) 17-25.

[17] L. Nie, D. Chen, J. Suo, P. Zou, S. Feng, Q. Yang, S. Yang, S. Ye. *Physicochemical characterization and biocompatibility in vitro of biphasic calcium phosphate/polyvinyl alcohol scaffolds prepared by freeze-drying method for bone tissue engineering applications.* Colloid Surface B 100 (2012) 169– 176.

[18] K. Nishimura, S. Nishimura, N. Nishi, I. Saiki, S. Tokura, I. Azuma. *Immunological activity of chitin and its derivatives.* Vaccine 2 (1984) 93-99.

[19] T. Tanigawa, Y. Tanaka, H. Sashiwa, H. Saimoto, Y. Shigemasa. *Various biological effects of chitin derivatives.* In Advances in Chitin and Chitosan, Elsevier ed., C.J. Brine, P.A. Sanford and J.P. Zikakis. London, 1992, p.206-215.

[20] Y. Okamoto, M. Watanabe, K. Miyatake, M. Morimoto, Y. Shigemasa, S. Minami. *Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on migrations of fibroblasts andvascular endothelium*. Biomaterials 23 (2002) 1975-1979.

[21] T. Mori, Y. Irie, S.I. Nishimura, S. Tokura, M. Matsuura, M. Okumura. *Endothelial cell responses to chitin and its derivatives.* J. Biomed. Mater. Res. 43 (1998) 469-472.

[22] S. Jebahi, H. Oudadesse, XV Bui , H. Keskes, T. Rebai, A. el Feki, H. el Feki. *Repair of bone defect using bioglass-chitosan as a pharmaceutical drug: An experimental study in an ovariectomised rat model.* Afr. J. Pharm. Pharmacol. 6 (2012) 1276 – 1287.

[23] Costa-Pinto. AR, Reis. RL, Neves. NM. *Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan*. Tissue Eng Part B Rev 5 (2011) 331-347.

[24] C. Martinez-Salgado, F.J. Lopez-Hernandez, J.M. Lopez-Novoa. *Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides.* Toxicol. Appl. Pharmacol. 223 (2007) 86–98.

[25] P. Balakumar, A. Rohilla, A. Thangathirupathi. *Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it ?* Pharmacol. Res. 62 (2010) 179–186.

[26] Y. Zhang, M. Zhang. *Calcium phosphate/chitosan composite scaffolds for controlled in vitro antibiotic drug release*. J. Biomed. Mater. Res. 62 (2002) 378-386.

[27] S.Suzuki, S. Takamura, J. Yoshida, Y. Shinzawa, O. Niwa, R. Tamatani. *Comparison of gentamicin nephrotoxicity between rats and mice.* Comp Biochem Physiol 112 (1995) 15-28.

[28] J.B. Homs, G. O'tterbein. *Toxicité de la gentamicine administrée par autotransfusion du sang drainé après chirurgie prothétique du genou utilisant un ciment à la gentamicine.* Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation, DOI: 10.1016/S0750-7658(95)70027-2

[29] F. Langlais, L. Bunetel, A. Segui, N. Sassi, M. Cormier. *Ciments orthopédiques aux antibiotiques. Pharmacocinétique et taux osseux*. Rev. Chir. Orthop. 74 (1988) 493-503.

[30] H. Oudadesse et al. *Chitosan effects on glass matrices evaluated by biomaterial. MAS-NMR and biological investigations.* Korean J. Chem. Eng., 30 (2013) 1775-1783.

[31] M. Ashok, N. Meenakshi Sundaram, S. Narayana Kalkur. *Crystallization of hydroxyapatite at physiological temperature*. Mater. Lett. 57 (2003) 2066-2070.

[32] M. Handke, M. Sitarz, M. Rokita, E. Galuskin, *Vibrational spectra of phosphate–silicate biomaterials*. J. Mol. Struct. 651 (2003) 39-54.

[33] H. Oudadesse, E. Dietrich, X.V. Bui, Y. Le Gal, P. Pellen, G. Cathelineau. *Enhancement of cells proliferation and control of bioactivity of strontium doped glass.* Appl. Surf. Sci. 257 (2011) 8587-8593.

[34] E. Dietrich, H. Oudadesse. *Study of strontium effects on melt derived bioactive glasses.* Biomaterials: Chemistry and Physics (2008) 173-178.

[35] E. Dietrich, H. Oudadesse, A. Lucas-Girot, M. Mami. *In vitro bioactivity of melt-derived glass 46S6 doped with magnesium*. J. Biomed. Mater. Res. A 88 (2009) 1087-1096.

[36] Bochaton C, Rochegude S, Roubille R. *Les aminoglycosides.* Lyon Pharmaceutique 48 (1997) 226-239.

[37] Lambotte, J.C., Thomazeau, H., Cathelineau, G., Lancien, G., Minet, J., Langlais, F. *Phosphate tricalcique, vecteur d'antibiotiques: étude sur foyer d'ostéomyélite expérimentale chez le lapin.* Chirurgie 123 (1998) 572–579.

[38] A. Bernkop-Schnurch, S. Dunnhaupt. *Chitosan-based drug delivery systems.* European Journal of Pharmaceutics 81 (2012) 463-69

[39] M. Sivakumar, I. Manjubala, K. Panduranga Rao. *Preparation, characterization and in-vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-chitosan composite microspheres.* Carbohydrate Polymers 49 (2002) 281-288.

[40] Y. Zhang, M. Zhang. *Calcium phosphate/chitosan composite scaffolds for controlled in vitro antibiotic drug release*. J. Biomed Mater Res 62 (2002) 378-386.

[41] S. Brouard, J. Lelan, G. Lancien, M. Bonnaure, M. Cormier, F. Langlais. *Phosphate tricalcique vecteur d'antibiotiques : gentamicine et vancomycine. Caractérisations physico-chimiques in vitro, étude de la porosité du matériau et du relargage de la gentamicine et de la vancomycine*. Chirurgie 122 (1997) 397-403.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Durant les 30 dernières années, des avancées majeures ont eu lieu dans le domaine des biomatériaux pour la reconstruction osseuse. Les biomatériaux d'origine synthétique (phosphates de calcium, verres bioactifs, vitrocéramique, polymères...) sont toujours en voie de développement pour les adapter à différentes situations cliniques. De tels biomatériaux trouvent déjà des applications en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale. Le champ des biomatériaux est un domaine pluridisciplinaire qui nécessite l'intervention de chimistes, de biologistes, de physiciens et de chirurgiens pour contribuer à leur développement.

Dans le groupe Biomatériaux de l'Université de Rennes 1, nous avons étudié dans un premier temps le verre bioactif 46S6. Quatre éléments chimiques (Zn, Ti, Cu et Ag) ont été introduits dans sa matrice vitreuse. Ces éléments ont la particularité de présenter des propriétés physico-chimiques et biologiques intéressantes et permettent de développer différents verres bioactifs. Leurs caractéristiques thermiques ainsi que leurs comportements *in vitro* sans et en présence de cellules ont été évalués. L'influence de la teneur des éléments introduits, sur le comportement thermique, la réactivité chimique et la cinétique de bioactivité, a pu être étudiée.

Les résultats obtenus ont montré que les températures caractéristiques des verres varient selon la teneur des éléments présents et que l'excès d'entropie diminue au fur et à mesure que les teneurs augmentent dans la matrice vitreuse. Les réactivités chimiques et la cinétique de bioactivité sont également affectées par l'augmentation des teneurs en éléments dopants puisque la formation de la couche de phosphate de calcium à la surface des verres est ralentie. Cette couche d'hydroxyapatite formée présente également une morphologie (taille et forme des cristaux) différente selon l'élément introduit.
Les tests colorimétriques de viabilité cellulaire effectués sur nos verres ont montré une absence de cytotoxicité et une bonne prolifération cellulaire.
Ces résultats sont intéressants dans la mesure où nous pouvons contrôler la cinétique de bioactivité des verres selon l'élément introduit dans leur matrice. L'objectif de telles études est de pouvoir adapter les biomatériaux aux besoins des patients. En effet, le métabolisme osseux est différent selon l'âge, le sexe et le site d'implantation.

En parallèle, nous avons élaboré et mis en place un protocole de synthèse d'une vitrocéramique par une méthode d'expansion. Cette méthode originale fait intervenir une réaction entre l'oxyde de zinc et le nitrure de titane formant ainsi la porosité de notre matériau. Le but était de former un biomatériau capable de répondre aux exigences en terme de porosité et pouvant servir de support pour la repousse osseuse. Les résultats, lors des essais *in vitro,* ont montré une bioactivité avec formation d'une couche homogène d'hydroxyapatite après 60 jours d'immersion dans un liquide physiologique synthétique. L'absence de cytotoxicité, comme pour les verres, a été prouvée par des tests de viabilité cellulaire. De plus, cette vitrocéramique a pu être implantée au niveau de la diaphyse fémorale de lapins Néo-Zélandais. Les résultats obtenus, par diverses méthodes physico-chimiques, ont montré un phénomène d'ostéoconduction progressif, avec une absence du biomatériau, au niveau du site d'implantation, après 6 mois. Aucun rejet ni phénomènes inflammatoires n'ont été observés. Les études histologiques ont montré également un excellent comportement de ce biomatériau.

Nous avons enfin élaboré des scaffolds à partir d'un polymère naturel : le chitosan, et du verre bioactif 46S6. Ces matériaux ont été élaborés par lyophilisation puis leur comportement bioactif a été évalué selon la même méthode que pour les verres bioactifs et la vitrocéramique. L'objectif de ces essais préliminaires était de nous servir de ces scaffolds comme support pour la libération d'une substance médicamenteuse dans le but de traiter certaines infections *in situ*.

Les résultats obtenus ont montré que les teneurs en chitosan et en verre bioactif influent sur le caractère bioactif des matériaux. Les études sur la libération de médicament ont révélé que quelle que soit la composition chimique des scaffolds, la cinétique de libération suit une même loi mathématique. La différence entre elle réside dans le temps de relaxation τ que nous avons calculé pour chaque teneur. Ces dernières influent également sur les concentrations libérées dans le milieu.
Ces différences de cinétique de bioactivité observées sur nos biomatériaux et les variations de cinétiques de relargage de médicament par nos scaffolds sont des résultats intéressants. En effet, tous ces matériaux peuvent donc être utilisés pour des situations cliniques particulières. Selon le sexe, l'âge et le site d'implantation, le métabolisme osseux varie et les matériaux pourraient donc être adaptés.

PERSPECTIVES

Perspectives

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de cette thèse ouvrent la voie à de nombreuses possibilités d'investigation sur les biomatériaux, aussi bien au niveau de la synthèse que de leurs applications éventuelles.

En premier lieu, le développement de la synthèse de la vitrocéramique pourrait être complété. Il serait intéressant de pouvoir adapter la synthèse dans le but d'avoir des taux de porosité à la demande des chirurgiens et selon le site d'implantation.

Dans un second temps, de nombreuses méthodes de synthèses des scaffolds à base de polymères sont envisageables pour élargir le champ d'étude de l'ingénierie tissulaire. L'impression 3D, par exemple, est de plus en plus utilisée à travers le monde et montre des résultats tout aussi impressionnants qu'intéressants, pour la chirurgie réparatrice ou l'ingénierie tissulaire.
La partie étudiée sur les scaffolds, à base de chitosan et de verre bioactif, devra être développée et approfondie pour améliorer les cinétiques de libération des médicaments. Il serait intéressant d'essayer d'obtenir une libération progressive du médicament avec un temps de relaxation plus important.
D'autres médicaments, des protéines ou des facteurs de croissance pourraient être intégrés ou greffés dans ces matériaux pour développer leur capacité biologique et biochimique. La connaissance des propriétés mécaniques et de la biocompatibilité seront également nécessaires avant d'envisager de proposer ces matériaux pour des applications cliniques.

L'expérience acquise dans le domaine des biomatériaux, particulièrement dans la réparation osseuse, est basée sur un recul d'une trentaine d'années. Les indications thérapeutiques se sont peu à peu affinées. Les domaines de la recherche fondamentale et clinique tentent de répondre à des besoins de plus en plus exigeants.
Ils seraient judicieux de conférer aux futurs biomatériaux des propriétés thérapeutiques renforcées en développant des substituts capables de libérer un principe actif *in situ*.

Des améliorations dans la facilité d'utilisation devront être envisagées en développant des biomatériaux sous la forme de matériaux composites rendus injectables afin de faciliter leur implantation.

Leur biofonctionnalité pourrait également être améliorée en concevant, par exemple, des matériaux hybrides associés à des cellules autologues, facilitant la différentiation tissulaire dans le site implanté (réparation osseuse par thérapie cellulaire).

ANNEXES

Annexe 1 : Notions et principes de la diffraction des rayons X

Un cristal peut être décrit par une petite entité appelée : la maille élémentaire. Elle est elle-même définie par six paramètres : les tailles a, b et c des arêtes du parallélépipède et les angles formés par les arêtes entre elles α, β et γ. Elle est également caractérisée par un nombre de motif Z.

En fonction des valeurs que prennent ces paramètres ainsi que des relations existantes entre eux, la maille élémentaire peut être classée dans l'un des sept systèmes cristallins connus : les systèmes orthorhombique, hexagonal et cubique.

Selon leur place dans la maille, les atomes forment des plans réticulaires coupant les vecteurs unitaires a, b et c en des points repérés par les valeurs a/h, b/k et c/l où h, k et l sont des nombres entiers appelés indice de Miller. Ils définissent une famille de plans réticulaires distants d'une distance inter-réticulaire d.

Le cristal est souvent décrit par les différents réseaux auxquels il peut appartenir. Ces derniers sont définis par la nature des translations aboutissant à une position d'équilibre. Le type de réseau, appelé réseau de Bravais, est représenté par une lettre majuscule : P, I, F, C et R. Cette description est complétée par les éléments de symétrie rencontrés : axes de rotation simple, inverse, hélicoïdaux ; plans de symétrie simple, de glissement.

Le phénomène de diffraction est la conséquence de l'interaction d'une onde électromagnétique avec le milieu périodique de la matière cristallisée. La diffraction des rayons X sur poudre est utilisée couramment pour la caractérisation des solides. Le terme poudre traduit le fait que le faisceau X incident est envoyé sur un ensemble de cristallites, dont l'orientation est aléatoire, suffisamment nombreux pour que toutes les orientations soient réalisées.

Lorsqu'un rayon X monochromatique de longueur d'onde λ est envoyé sur un échantillon avec un angle d'incidence θ, les plans réticulaires (hkl) du cristal, équidistants de d_{hkl} (distance inter-réticulaire), vont se comporter comme des miroirs parallèles et réfléchir l'onde électromagnétique, induisant un phénomène de diffraction vérifiant la relation de Bragg :

$$\mathbf{2\, d_{hkl} \sin \theta = n\lambda}$$

Ainsi, sous un rayonnement X incident monochromatique (longueur d'onde λ fixée), des intensités diffractées ne peuvent être observée que sous certains angles 2θ qui représentent un cône de diffraction entre le rayon incident et le rayon diffracté.

Le montage Bragg-Brentano de type θ-2θ est le plus courant. Comme le tube à rayons X est la partie la plus lourde, on préfère souvent garder le tube fixe et faire bouger l'échantillon et le détecteur. On a alors le montage dit «θ-2θ» puisque le plan de l'échantillon fait un angle θ avec le faisceau incident, et le détecteur fait un angle 2θ avec le même faisceau (Figure 1).
La source des rayons X est un tube céramique à anode de cuivre. Le faisceau incident focalisant est monochromatique (raie $K_{\alpha 1}$ du cuivre, λ=1,54056Å). Le compteur à scintillations tourne à un angle 2θ lorsque le goniomètre effectue une rotation de θ. Le diagramme obtenu représente l'intensité diffractée en fonction de l'angle 2θ. Les acquisitions d'une durée de 20 minutes ont été effectuées entre 5 et 80 (2θ°) suivant un pas de 0,02° avec un temps de comptage de 0,5s.

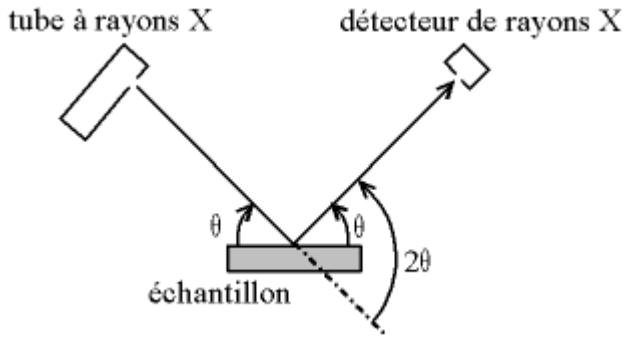


Figure 1 : Description des angles dans le montage Bragg-Brentano

Annexe 2 : Notions et principes de la résonance magnétique nucléaire (RMN)

Lorsque les noyaux de spin non nuls sont en rotation sur eux-mêmes, ils génèrent un moment magnétique de spin. En physique quantique, un moment magnétique de spin ½, placé dans un champ magnétique extérieur B_0, a deux états d'énergies possibles, appelés niveaux Zeeman. La RMN consiste alors à créer une transition d'un niveau à l'autre grâce à la mise en œuvre d'un champ radiofréquence. La condition de résonance est la suivante :

$$\nu_0 = \gamma \frac{B_0}{2\pi}$$

Où ν_0 est la fréquence du champ radiofréquence, γ le rapport gyromagnétique caractéristique de chaque noyau étudié et B_0 le champ magnétique principal.
Lorsque le noyau est entouré d'un cortège électronique, la fréquence de résonnance devient :

$$\nu_0 = \gamma \frac{B_0}{2\pi}(1-\sigma)$$

Où σ, coefficient d'écrantage, est la signature de l'environnement chimique local. Sur un spectre RMN, l'expérimentateur observe donc autant de raies de résonnance qu'il y a de site différent pour l'élément dont le noyau est sondé. De plus, le coefficient d'écrantage est sans unité et sa valeur est de l'ordre de 10^{-6}. Or, il est impossible de connaitre avec une telle précision le champ statique B_0. Aussi, la valeur de la fréquence ν est mesurée relativement à la fréquence $r_{éf}$ d'une substance de référence. Afin de pouvoir s'affranchir de la valeur du champ B0 et de ses fluctuations, une nouvelle grandeur δ a été définie :

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}}.10^6$$

Cette nouvelle échelle de mesure δ est appelée déplacement chimique et s'exprime en ppm.

Annexe 3 : Principe et théorie de la spectroscopie infrarouge.

Lorsque le faisceau IR apporte une longueur d'onde (énergie) voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise sera enregistrée. Le domaine infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules. Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie (groupements peu polaires, C=C, S-S). En spectroscopie infrarouge, la position des bandes de vibration va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse. Ainsi, un matériau de composition chimique et de structure donnée va générer un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques de la nature des liaisons chimiques, de leur proportion et de leur orientation.

Plusieurs modes de vibrations sont identifiables sur un spectre infrarouge : les vibrations d'élongation et de déformation où l'on distingue les déformations dans ou hors du plan.

Pour les vibrations d'élongation, pour un système à 3 atomes (X, A, Y) non alignés, il existe 2 modes : une vibration symétrique et une vibration asymétrique.

Vibration symétrique ν_s Vibration asymétrique ν_{as}



On distingue les déformations dans le plan (modification de l'angle de liaison) et les déformations hors du plan.

Vibrations dans le plan

Rotation β Cisaillement δ



Vibrations hors du plan

Balancement ω Torsion τ



Les vibrations de déformation nécessitent moins d'énergie que les vibrations d'élongation. Ainsi, les vibrations de déformation se situent en général pour un nombre d'onde compris entre 400 et 1500 cm^{-1}, tandis que les vibrations d'élongation se trouvent entre 1500 et 4000 cm^{-1}.

Annexe 4 : Principe de la spectrométrie d'émission optique – ICP-OES

L'ICP-OES est une technique utilisée pour mesurer les traces d'éléments en solution. L'échantillon est nébulisé dans un plasma d'argon où les atomes excités émettent leurs radiations caractéristiques (Figure 1) lorsqu'ils reviennent à leur état fondamental. Les radiations sont dispersées par un monochromateur et détectées par des tubes photomultiplicateurs. Les longueurs d'onde des radiations caractérisent les éléments et leur intensité la concentration.

La lumière émise par l'élément recherché est détectée et mesurée, et son intensité comparée à celle émise par le même élément contenu dans un échantillon de concentration connue (étalon), analysé dans les mêmes conditions.

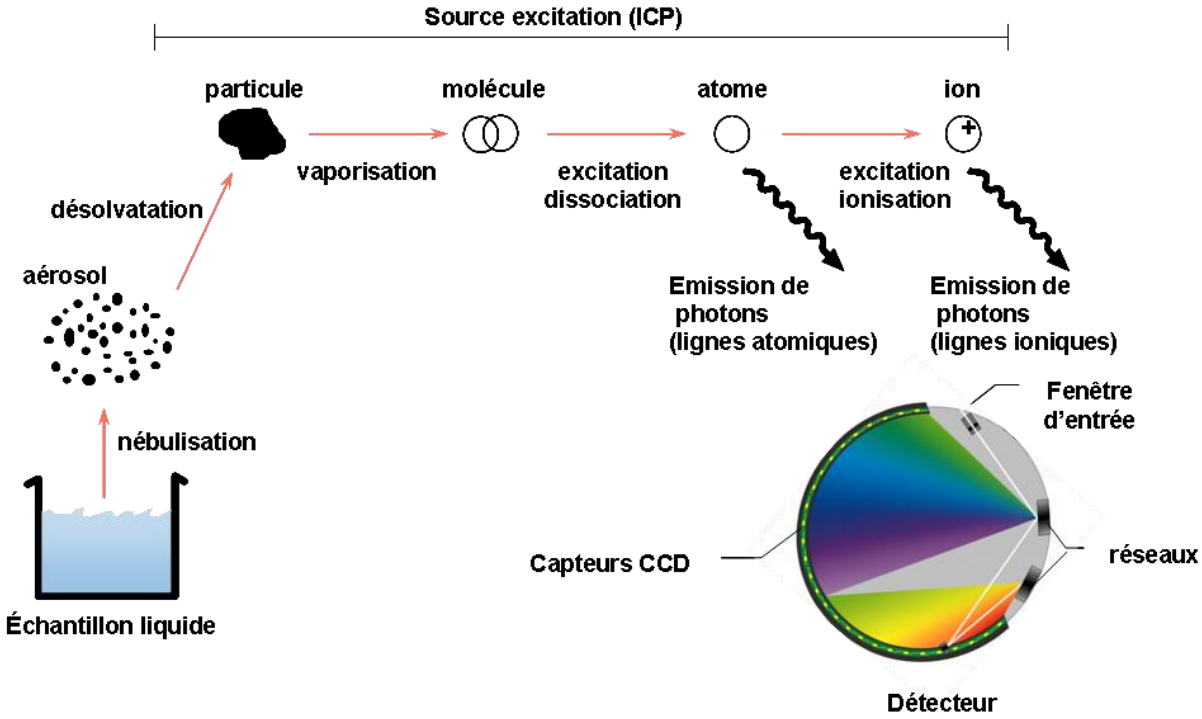


Figure 1 : Principe du dosage des éléments par ICP-OES.

Pour analyser les éléments traces ou majeurs après immersion de nos biomatériaux dans un liquide physiologique synthétique, nous avons utilisé un spectromètre Spectro Ciros Vision Ametek. Il combine la technologie de réseau circulaire et un logiciel d'analyse afin de déterminer les concentrations à l'état de traces de substances difficiles (tels que les halogènes, en présence des éléments majeurs). Il couvre les longueurs d'onde de 125 à 770 nm. Il élimine

les erreurs post-analyse et son logiciel simplifie le développement des méthodes et des modèles d'application.

L'appareil comprend les parties principales suivantes :

- La source d'excitation composée de la torche plasma, de la bobine d'induction reliée au générateur de radiofréquences et du système d'introduction des échantillons ou nébuliseur ;
- L'optique avec le système dispersif des rayonnements ;
- Le détecteur ;
- Le contrôle du fonctionnement de l'instrument et l'exploitation des données analytiques par ordinateur.

Annexe 5 : Principe de la spectrophotométrie UV

Soumis à un rayonnement dans une gamme de longueurs d'onde, les molécules, les ions ou les complexes sont susceptibles de subir une ou plusieurs transition(s) électronique(s). Les substrats analysés sont le plus souvent en solution, mais peuvent également être en phase gazeuse et plus rarement à l'état solide.

Le spectre électronique est la fonction qui relie l'intensité lumineuse absorbée par l'échantillon analysé en fonction de la longueur d'onde. Le spectre est le plus souvent présenté comme une fonction de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde. Il peut aussi être présenté comme le coefficient d'extinction molaire en fonction de la longueur d'onde.

La loi de Beer-Lambert ($A_\lambda = - \log_{10} (I/I_0) = \varepsilon_\lambda.l.C$) indique que l'absorbance d'une solution est proportionnelle à sa concentration et à la longueur de l'échantillon. La spectroscopie UV-visible peut donc être utilisée pour déterminer cette concentration. Cette détermination se fait dans la pratique soit à partir d'une courbe d'étalonnage qui donne l'absorbance en fonction de la concentration, soit quand le coefficient d'extinction molaire est connu.

Annexe 6 : Principe de la granulométrie laser

Lorsque la dimension de la particule est grande devant la longueur d'onde incidente, ou lorsque le matériau est très absorbant, l'effet de bord des particules contribue pour une part prépondérante à l'intensité totale diffusée. L'interférence provient alors principalement du contour de la particule, c'est-à-dire de la diffraction créée par la courbure de la lumière à l'interface. Dans ce cas, le modèle mathématique utilisé pour le calcul de la courbe granulométrique est la Théorie de Fraunhofer. Ce modèle présente l'intérêt de s'affranchir totalement des propriétés optiques de l'échantillon et du milieu porteur : il n'est pas nécessaire ici de connaître les indices de réfraction. En revanche, lorsque la dimension de la particule avoisine la longueur d'onde incidente, la théorie de Fraunhofer n'est plus adaptée à la description de la diffusion, car les phénomènes de réflexion et de réfraction interviennent pour une part non négligeable dans l'intensité diffusée. C'est alors la théorie de Mie qui s'applique, laquelle prend en compte les indices de réfraction de l'échantillon et du milieu porteur.

Du point de vue théorique, il est donc préférable de réaliser les mesures sur des particules :

• sphériques, non poreuses et opaques,
• d'un diamètre supérieur à la longueur d'onde utilisée,
• distantes entre elles,
• ayant un déplacement aléatoire,
• présentant une diffraction d'efficacité identique.

Un granulomètre laser est constitué de cinq sous-ensembles (Figure 1) :

• un système de dispersion de la poudre
• un système de mise en circulation de la poudre
• un ensemble électronique d'amplification des signaux de mesure
• un banc optique
• un micro-ordinateur

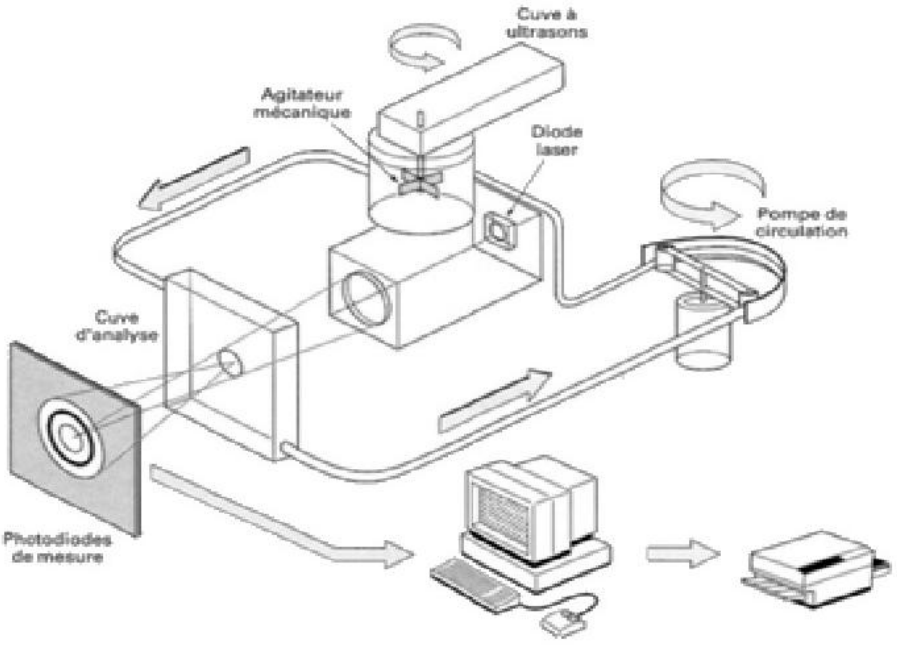


Figure 1 : Schéma du granulomètre laser utilisé.

Annexe 7 : Principe de la microscopie électronique à balayage

Un faisceau très fin d'électrons, monocinétique, balaie la surface d'un échantillon où se produisent des interactions détectées par un capteur qui contrôle la brillance d'un oscilloscope cathodique dont le balayage est synchronisé avec celui du faisceau d'électrons ; on peut ainsi comparer le MEB à un système de télévision en circuit fermé (Figure 1).

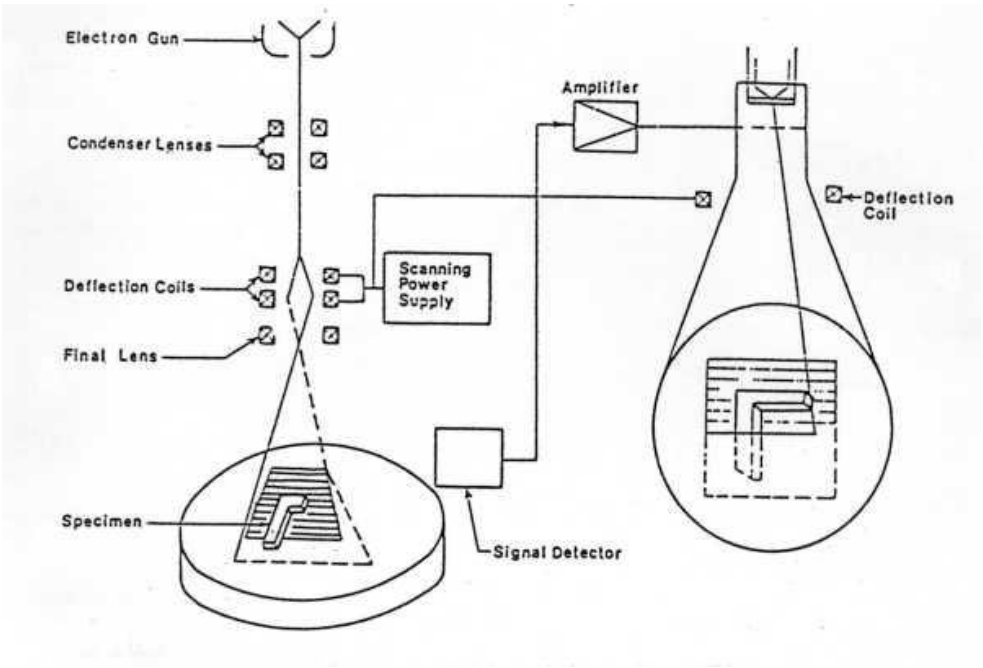


Figure 1 : Principe de base d'un Microscope Electronique à Balayage

Les principales interactions électrons-matière sont décrites ci-après et illustrées Figure 2 :

Les électrons rétrodiffusés : Les électrons rétrodiffusés sont des électrons résultant de l'interaction des électrons du faisceau primaire avec des noyaux d'atomes de l'échantillon et qui ont réagi de façon quasi élastique avec les atomes de l'échantillon. Les électrons sont réémis dans une direction proche de leur direction d'origine avec une faible perte d'énergie.

Ces électrons récupérés ont donc une énergie relativement élevée, allant jusqu'à 30 keV, énergie beaucoup plus importante que celle des électrons secondaires. Ils peuvent être émis à une plus grande profondeur dans l'échantillon. La résolution atteinte avec les électrons rétrodiffusés sera donc relativement faible, de l'ordre du micromètre ou du dixième de micromètre.

De plus, ces électrons sont sensibles au numéro atomique des atomes constituant l'échantillon. Les atomes les plus lourds (ceux ayant un nombre important de protons) réémettront plus d'électrons que les atomes plus légers. Cette particularité sera utilisée pour l'analyse en électrons rétrodiffusés. Les zones formées d'atomes avec un nombre atomique élevé apparaîtront plus brillante que d'autres, c'est le contraste de phase. Cette méthode permettra de mesurer l'homogénéité chimique d'un échantillon et permettra une analyse qualitative [1].

Les électrons secondaires : Lors d'un choc entre les électrons primaires du faisceau et les atomes de l'échantillon, un électron primaire peut céder une partie de son énergie à un électron peu lié de la bande de conduction de l'atome, provoquant ainsi une ionisation par éjection de ce dernier. On appelle électron secondaire cet électron éjecté. Ces électrons possèdent généralement une faible énergie (environ 50 eV). Chaque électron primaire peut créer un ou plusieurs électrons secondaires.

De par cette faible énergie, les électrons secondaires sont émis dans les couches superficielles proches de la surface. Les électrons qui peuvent être recueillis par les détecteurs sont souvent émis à une profondeur inférieure à 10 nanomètres. Étant donné qu'ils proviennent des couches superficielles, les électrons secondaires sont très sensibles aux variations de la surface de l'échantillon. La moindre variation va modifier la quantité d'électrons collectés. Ces électrons permettent donc d'obtenir des renseignements sur la topographie de l'échantillon. En revanche, ils donnent peu d'information sur le contraste de phase contrairement aux électrons rétrodiffusés [1].

Les électrons Auger : Lorsqu'un atome est bombardé par un électron primaire, un électron d'une couche profonde peut être éjecté et l'atome entre dans un état excité. La désexcitation peut se produire de deux façons différentes : en émettant un photon X (transition radiative ou fluorescence X) ou en émettant un électron Auger (effet Auger). Lors de la désexcitation, un électron d'une couche supérieure vient combler la lacune créée par l'électron initialement éjecté. Durant cette transition, l'électron périphérique perd une certaine quantité d'énergie qui peut être émise sous forme de photon X ou peut alors être transmise à un électron d'une orbite plus externe et donc moins énergétique. Cet électron périphérique se retrouve à son tour éjecté et peut être récupéré par un détecteur.

Les électrons Auger possèdent une très faible énergie et sont caractéristiques de l'atome qui les a émis. Ils permettent ainsi d'obtenir des informations sur la composition de l'échantillon

et plus particulièrement de la surface de l'échantillon ainsi que sur le type de liaison chimique, dans la mesure évidemment où le MEB est équipé d'un détecteur d'électrons réalisant une discrimination en énergie. Ce sont des MEB spécialisés qui sont équipés d'analyseurs en énergie (pour les analyses EDS) [1].

Les photons X : L'impact d'un électron primaire à haute énergie peut ioniser un atome à une couche interne. La désexcitation, le remplissage de l'ordre énergétique de la structure électronique, se produit avec émission de rayons X. L'analyse de ces rayons permet d'obtenir des informations sur la nature chimique de l'atome (EDS) [1].

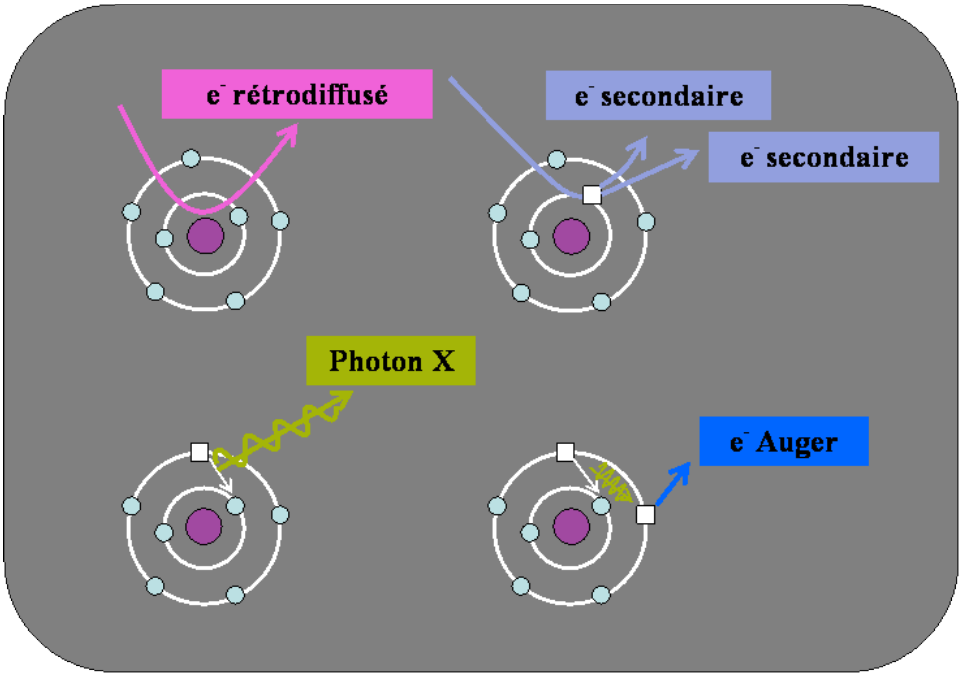


Figure 2 : Principales interactions électrons-matière du Microscope Electronique à Balayage

[1] Joseph Goldstein, Dale E. Newbury, Patrick Echlin, Charles E. Lyman, David C. Joy, Eric Lifshin, L. C. Sawyer, J. R. Michael. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. Springer Verlag, 1992

Annexe 8 : Principe de l'analyse thermique différentielle.

Le principe de cette méthode consiste à suivre l'évolution de la différence de température (DT) entre l'échantillon étudié et un corps témoin dépourvu d'effets thermiques dans le domaine de température étudié.

L'analyse thermique est la première méthode physique qui fut utilisée pour la recherche et la détection des changements de phases au cours de l'évolution d'un système chimique par variation de température. C'est une méthode calorimétrique, puisqu'elle met à profit les effets thermiques, positifs ou négatifs selon les cas, qui accompagnent ces changements.

Pour les mélanges, une détection des constituants n'est pas toujours réalisable car de nombreuses limitations empêchent l'ATD d'être une méthode générale d'analyse quantitative :

1) chevauchement des accidents caractéristiques.
2) réactions chimiques entre constituants solides du mélange.
3) apparition d'une phase liquide qui entraîne une réaction secondaire avec les autres corps.
4) influence de certaines impuretés sur la forme et la position des accidents.

L'intérêt de l'ATD pour l'étude des céramiques porte sur trois points essentiels :

- La mise en évidence des phénomènes de transition de phases.
- L'identification des phases cristallines mises en jeu après interprétation des phénomènes endothermiques ou exothermiques enregistrés à des températures caractéristiques.
- L'évaluation de la température de cuisson du matériel étudié en fonction des phases apparues.

L'ATD s'appuie sur la mesure de la chaleur libérée ou absorbée par la matière au cours des transformations physico-chimiques.

En dehors de l'aspect identification des espèces, l'ATD rend des services dans l'étude des comportements des minéraux vis-à-vis de la chaleur. Les changements de structure sont ainsi mis en évidence par recoupement avec les autres méthodes physico-chimiques, notamment la diffraction de rayons X.

Annexe 9 : Principe de la méthode d'Archimède et formules mathématiques utilisées.

Détermination de la masse volumique apparente

La masse volumique apparente est le rapport de la masse de matière *m* sèche à son volume apparent *V*. Elle peut être exprimée en g.cm-3. Le volume apparent comprend la somme des volumes de la matière solide, des pores ouverts et fermés. Il est délimité par la surface extérieure de l'échantillon. Pour sa détermination, on peut utiliser des morceaux cassés, des pièces entières, si elles sont de petites dimensions, ou des éprouvettes de forme cubique ou cylindrique.

Par cette méthode, nous obtenons ainsi la masse de l'éprouvette humide mh.

Les éprouvettes sont ensuite immergées dans de l'eau (non miscible avec l'hexane), amenées dans une balance hydrostatique et pesées. On obtient ainsi la masse de l'éprouvette immergée mi.

La masse volumique apparente est calculée par la formule :

$$\rho hydrostatique = \frac{[ms]}{\left[(mh - mi) \,/\, \rho Hexane(\theta)\right]}$$

Détermination des porosités ouverte, fermée et totale

La porosité ouverte est le rapport du volume de l'ensemble des pores ouverts au volume apparent du produit. Elle s'exprime en % du volume apparent. Les pores ouverts sont, par définition, ceux pénétrés par le liquide d'imprégnation au cours de l'essai décrit précédemment.

Les pores fermés sont, par définition, ceux qui ne sont pas pénétrés par le liquide d'imprégnation. La porosité fermée est exprimée par le rapport entre le volume total des pores défini ci-dessus et le volume apparent de l'échantillon.

La porosité totale est la somme de la porosité ouverte et de la porosité fermée. La porosité ouverte est calculée par la formule :

$$Pouverte = \frac{[mh - ms] \,/\, \rho Hexane(\theta)}{\left[(mh - mi) \,/\, \rho Hexane(\theta)\right]}$$

La porosité totale et fermée par les formules :

$$Ptotale = \frac{[mh - ms] - \left[ms \times \rho Hexane(\theta) \middle/ \rho théorique \right]}{[mh - mi]}$$

$$Pfermée = Ptotale - Pouverte$$

Densité de Hexane $\rho Hexane$ =0,6630g/Cm^3

Densité théorique de l'échantillon $\rho théorique$ =2,03g/Cm^3

ms : masse de l'échantillon sec

mh : masse de l'échantillon imprégné

mi : masse de l'échantillon immergé

Annexe 10 : Principe de la porosimétrie à mercure.

La pénétration d'un liquide non mouillant dans un pore n'est possible que sous l'action d'une force externe (pression), cette force s'opposant à la résistance créée par la tension superficielle du liquide. Le liquide pénètre dans un pore de rayon r_p sous l'effet d'une pression P donnée par l'équation de Washburn :

$$P = (-2.\gamma.\cos\theta) / (r_p)$$

avec γ : tension superficielle ($N.m^{-1}$) à l'interface liquide-gaz et θ : angle de mouillage du liquide avec le matériau.

Grâce à ses propriétés non mouillantes à l'égard de nombreux solides, le mercure a été choisi pour cette application. On peut noter que l'équation de Washburn est dérivée de l'équation plus générale proposé par Young-Laplace qui relie la différence de pression de part et d'autre d'un ménisque au rayon de ce dernier suivant l'expression :

$$\Delta P = -2\gamma/r$$

Avec r : rayon du ménisque et $\Delta P = P-P'$ gradient de pression

L'équation de Washburn se déduit en supposant, $P'=0$ (l'échantillon est mis sous vide avant la mesure), et $r_p = r \cos\theta$ (pores cylindriques).

La porosimétrie à mercure est un outil largement utilisé pour déterminer la surface spécifique et la répartition poreuse d'un matériau. Parmi ses principaux avantages, signalons qu'il s'agit d'une méthode rapide et relativement aisée à mettre œuvre, couvrant une très large gamme de tailles de pores pouvant aller de 2 nm jusqu'à 150 micromètres. La plupart des matériaux, à l'exception de certains métaux comme l'or susceptibles de former des amalgames avec le mercure, peuvent être étudiés quelle que soit leur mise en forme. Elle est particulièrement intéressante pour les échantillons macroporeux et pour la gamme supérieure des mésopores (20-50 nm) qui ne nécessitent pas des pressions de travail trop importantes en complémentarité avec les mesures d'adsorption physique. Toutes ces caractéristiques en font une technique incontournable pour toute analyse de routine. Parmi ses inconvénients et limitations, on peut citer le fait qu'elle soit destructive et qu'elle présente le risque d'écraser le matériau sous l'effet de la pression (dans le cas de matériau mou par exemple). On peut citer d'autres limitations :

- L'équation ne s'applique que pour des pores uniformément cylindriques ou en fente. La forme des pores sera donc très simplifiée et souvent peu représentative d'un solide réel (comme dans le cas de l'adsorption physique).
- La valeur de l'angle θ peut varier entre l'intrusion et l'extrusion du mercure ce qui rend l'interprétation de l'hystérésis assez délicate. De manière générale, seule la courbe d'intrusion du mercure est exploitée pour déterminer la répartition poreuse.

L'appareil de mesure comprend trois parties :

- Le pénétromètre ;
- L'étage basse-pression ;
- L'étage haute-pression.

Le pénétromètre est constitué d'une tige capillaire dont une extrémité est constituée par l'ampoule porte échantillon. L'étage basse-pression accueille le pénétromètre dans lequel est placé l'échantillon. Il permet d'assurer le dégazage du matériau et de retirer l'air présent dans la cellule. Le mercure est admis sous une pression légèrement supérieure à la pression atmosphérique, il remplit ainsi entièrement la cellule et enrobe le matériau.

L'ensemble pénétromètre-mercure-échantillon est alors placé dans la chambre « haute pression ». Une pression croissante est appliquée à l'entrée du capillaire par l'intermédiaire d'une huile de compression. Il en résulte une pénétration dans les pores du matériau et une descente du niveau du mercure dan la tige calibrée du pénétromètre. Ceci modifie la capacité électrique entre la colonne de mercure restante et la gaine capillaire, capacité qui est mesurée en permanence par une jauge de capacitance. Connaissant avec précision le diamètre de la tige, il est aisé de calculer, par comparaison avec le niveau précédent, la quantité de mercure qui a pénétré dans les pores. Les volumes de mercure qui pénètrent (intrusion) ou sont extraits (extrusion) du milieu poreux suivant des cycles de pressions croissantes puis décroissantes conduisent souvent à une boucle d'hystérésis.

Annexe 11 : Principe de la méthode BET.

La théorie BET constitue un modèle mathématique du processus d'adsorption des gaz. Cette adsorption physique d'un gaz sur toute la surface exposée d'une matière, avec le remplissage de ses pores, est appelée physisorption. Ce phénomène permet de mesurer la surface totale et d'analyser la taille des pores dans les matières nanoporeuses, microporeuses et mésoporeuses. Le procédé de mesure par physisorption implique le refroidissement de la surface du matériau mesurée, en utilisant de l'azote pour adhérer à la surface (adsorption), puis le réchauffement de la surface (désorption).

L'équation BET est donnée par la relation suivante :

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{V_M C} + \frac{C-1}{V_M C} \times \left(\frac{P}{P_0} \right)$$

Où :

- V est le volume de gaz adsorbé
- Vm est la capacité de la monocouche, c'est-à-dire le volume d'une simple couche de molécules adsorbées sur la surface,
- C est une constante,
- P est la pression d'équilibre du gaz,
- P_0 est la pression de vapeur saturante du gaz,
- P/P_0 est la pression relative

L'analyse consiste à mesurer, à une température donnée et dans un certain domaine de pression relative P/P_0, le volume V d'azote adsorbé à la surface d'un échantillon de masse connue. Le traitement analytique de l'isotherme d'adsorption obtenu ($V=f(P/P_0)$) permet de déterminer la surface spécifique S_{BET} du matériau. Pour ces mesures, les échantillons sont préalablement dégazés à 150°C sous vide secondaire. Cette procédure est appelée méthode multipoints où on fait varier P/P_0.

L'équation BET est en général applicable dans le domaine de pression relative (P/P_0) compris entre 0,05 et 0,35. Dans la méthode multipoints, on admet des quantités calibrées de gaz sur l'échantillon et on mesure à chaque fois la quantité de gaz adsorbée (augmentation de P/P_0). On détermine le volume de la monocouche V_{mono} à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine de la droite BET.

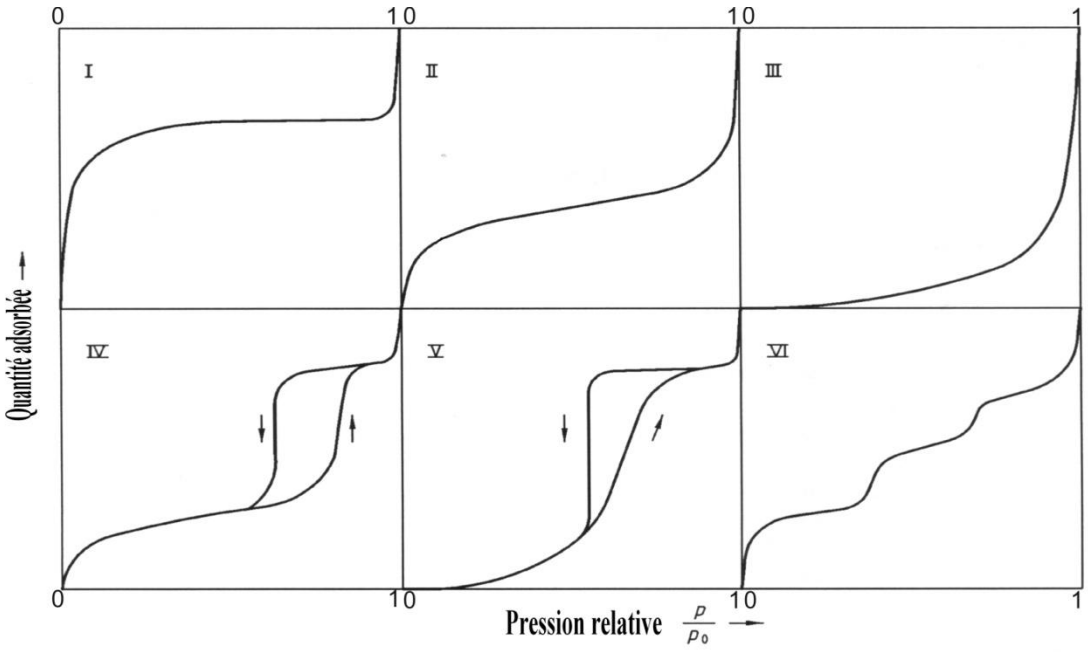
La surface spécifique est alors calculée suivant la relation : $S_{BET} = \frac{V_{Mono} \times A_M \times N_A}{V_M}$

Où : - S_{BET} est la surface spécifique BET (m^2/g)

- V_{mono} est le volume de la monocouche (cm^3/g)
- N_A est le nombre d'Avogadro (6,023 x 10^{23} mol^{-1})
- A_M est la surface occupée par une molécule d'azote (A=0,162 nm^2 à 77,4K)
- V_M est le volume molaire du gaz (22414 cm^3/mol)

Classification des isothermes d'adsorption physique

L'allure des isothermes d'adsorption physique est le meilleur révélateur des caractéristiques texturales du matériau étudié. C'est une donnée expérimentale objective qui doit être tout d'abord prise en considération avant de tenter d'obtenir des informations quantitatives. L'analyse peut en être faite à l'aide de la classification des isothermes d'adsorption physiques en cinq types distincts, décrite initialement par Brunauer, Deming et Teller [1] : c'est cette classification qui a été reprise par l'IUPAC en 1985 [2] et qui est présenté figure X, dans laquelle a été ajoutée une isotherme d'adsorption à marches, observée plus récemment, notée VI [3].



- L'isotherme d'adsorption du type I est caractérisée par l'existence d'une horizontale traduisant une saturation de l'adsorbant, malgré l'augmentation de la pression : cette isotherme est obtenue avec des adsorbants ayant uniquement des micropores qui se remplissent à des pressions d'autant plus basses que leur largeur est plus faible.

- L'isotherme d'adsorption du type II est caractérisée par une augmentation très progressive de la quantité adsorbée en fonction de la pression relative d'équilibre : cette isotherme est obtenue avec des adsorbants non poreux ou macroporeux à la surface desquelles la couche adsorbée s'épaissit progressivement. On dit que l'isotherme d'adsorption du type II est caractéristique d'une adsorption multimoléculaire.
- L'isotherme d'adsorption du type IV a la même allure que l'isotherme d'adsorption du type II pour les pressions relatives les plus basses (inférieures à 0,42 dans le cas de l'adsorption de diazote à 77K) ; pour les pressions relatives plus élevées, elle est caractérisée par un palier de saturation dont la longueur est très variable (parfois réduit à un point d'inflexion) : cette isotherme d'adsorption est obtenue avec des adsorbants mésoporeux dans lesquels se produit une condensation capillaire. La désorption de l'azote condensé par capillarité dans les mésopores n'est pas réversible : on observe généralement une hystérésis de la désorption par rapport à l'adsorption.
- Les isothermes d'adsorption du type III et V sont beaucoup plus rares : elles diffèrent des isothermes d'adsorption du type II et IV aux pressions les plus faibles. Ce changement de courbure du début de l'isotherme d'adsorption, interprété par le fait que les interactions adsorbant/adsorbat sont faibles, est observé dans le cas de l'adsorption de vapeur d'eau par une surface hydrophobe.
- L'isotherme d'adsorption à marches, du type VI, a été observée dans le cas de l'adsorption par des surfaces énergétiquement homogènes, sur lesquelles les couches adsorbées se forment l'une après l'autre.

Il est très important de souligner qu'il s'agit d'une classification qui vise à distinguer des adsorbants typiques. En réalité, les isothermes d'adsorption physique obtenues sont généralement des isothermes d'adsorption composites révélant la complexité des adsorbants étudiés.

Par ailleurs il convient aussi d'insister sur le fait qu'il est facile de prévoir l'allure de l'isotherme d'adsorption qui peut être obtenue sur un adsorbant connu mais qu'il n'est jamais facile d'interpréter, avec une certitude absolue, les données expérimentales obtenues sur un adsorbant inconnu. On est encore dans un domaine en pleine évolution où les perfectionnements technologiques et la découverte de nouveaux matériaux peuvent encore apporter des résultats surprenants.

Hystérésis de l'isotherme d'adsorption-désorption

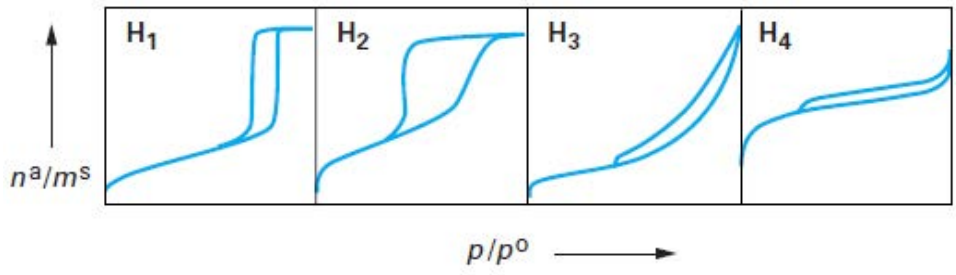


Figure X Classification des hystérésis de l'isotherme d'adsorption-désorption selon l'IUPAC.

- Les deux boucles d'hystérésis notées H1 et H2 apparaissent sur des isothermes du type IV, caractérisées par un palier de saturation et sont vraiment représentatives des adsorbants mésoporeux.
- La boucle d'hystérésis H1 présente des branches d'adsorption et de désorption parallèles et presque verticales : elle est observée dans le cas d'adsorbants ayant une distribution très étroite de mésopores.
- La boucle d'hystérésis H2 est observée dans le cas d'adsorbants ayant des mésopores en intercommunication.
- Par contre, les deux boucles d'hystérésis, notées H3 et H4, apparaissent sur des isothermes de type II qui ne présentent pas de palier de saturation. Dans ces conditions, la branche de désorption n'est pas toujours reproductible et dépend souvent de la valeur maximale de la quantité adsorbée aux pressions relatives voisines de 1.
- La boucle d'hystérésis H3, observée dans le cas où l'adsorbant forme des agrégats, peut être attribuée à une condensation capillaire s'effectuant dans une texture non rigide et n'est pas caractéristique d'une mésoporosité définie.

La boucle d'hystérésis H4 est souvent observée avec des adsorbants microporeux ayant des feuillets liés entre eux de façon plus ou moins rigide et entre lesquels peut se produire une condensation capillaire.

[1] Brunauer S, Deming LS, Deming WE, Teller E. *On a theory of the Van der Waals adsorption of gases*. J. Amer.Chem. Soc. 62, p. 1723-32 (juillet 1940).

[2] Sing KSW, Everett DH, Haul RAW, Moscou L, Pierotti RA, Rouquerol J, Siemeniewska T. *Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity*. IUPAC, Pure and Appl. Chem. 57, p. 603-19 (1985).

[3] F. Rouquerol, L. Luciani, P. Llewellyn, R. Denoyel, J. Rouquerol. *Texture des matériaux pulvérulents ou poreux*. Technique de l'ingénieur 2013 p1050.

Annexe 12 : Méthode de synthèse du SBF

Deux solutions distinctes (Ca-SBF et P-SBF) sont préparées dans ce protocole et c'est le mélange de ces deux solutions dans des proportions identiques qui nous permet d'obtenir le SBF, L'intérêt de ce protocole est de synthétiser deux solutions stables, pouvant être conservées quelques semaines, alors que le SBF ne peut être conservé que quelques jours.
Pour chaque solution, environ 990 mL d'eau sont chauffés dans un bécher au bain-marie et maintenus à 37°C pendant la durée de synthèse. On ajoute alors les réactifs dans les proportions suivantes, sous agitation magnétique :

	Solution de Ca-SBF (fiole de 1L)	**Solution de P-SBF (fiole de 1L)**
Tris $C_4H_{11}NO_3$ (trishydroxyméthylamine)	M=121,14g/mol m= 6,057g	M=121,14g/mol m=6,057g
$CaCl_2$	M=110,98g/mol m=0,5549g	
$MgCl_2,6H_2O$	M=203,30g/mol m=0,6095g	
$K_2HPO_4,3H_2O$		M=228,2g/mol m=0,4566g
$NaHCO_3$		M=84,01g/mol m=0,7056g
KCl		M=74,55g/mol m=0,4473g
NaCl		M=58,4g/mol m=16,1061g

On ajuste ensuite le pH de la solution à 7,4 à 37°C à l'aide d'une solution de HCl. On complète ensuite la fiole pour obtenir un litre de solution. Après utilisation, les solutions sont stockées au réfrigérateur, à une température comprise entre 5 et 10°C.

Annexe 13 : Valeurs des moyennes et écart-types des tests de cytotoxicité.

Temps d'Incubation	Après 24 Heures		Après 72 Heures	
	Moyenne	Ecart-Type	Moyenne	Ecart-Type
SaOS2	100,00	± 1,50	100,00	± 3,10
46S6	88,51	± 5,95	64,80	± 3,93
0,1 Zn	90,56	± 3,72	58,02	± 8,94
1 Zn	85,05	± 5,82	92,19	± 8,39
5 Zn	70,81	± 4,28	65,88	± 9,86
8 Zn	35,39	± 5,03	37,12	± 6,59
10 Zn	39,61	± 5,60	42,50	± 9,33

Tableau 1 : Valeurs des moyennes de viabilité cellulaire et écart-types des tests de cytotoxicité des verres dopés au zinc sur la lignée ostéoblastique SaOS2.

Temps d'Incubation	Après 24 Heures		Après 72 Heures	
	Moyenne	Ecart-Type	Moyenne	Ecart-Type
EAHY926	100,00	± 3,80	100,00	± 1,20
46S6	132,17	± 7,35	124,88	± 6,10
0,1 Zn	129,95	± 4,25	103,37	± 6,95
1 Zn	133,00	± 3,85	105,45	± 6,12
5 Zn	109,28	± 5,34	110,44	± 7,45
8 Zn	88,69	± 2,71	93,52	±4,61
10 Zn	90,83	± 2,85	88,04	± 2,56

Tableau 2 : Valeurs des moyennes de viabilité cellulaire et écart-types des tests de cytotoxicité des verres dopés au zinc sur la lignée endothéliale EAHY926.

Temps d'Incubation	Après 24 Heures		Après 72 Heures	
	Moyenne	Ecart-Type	Moyenne	Ecart-Type
SaOS2	100,00	± 1,79	100,00	± 5,69
46S6	115,53	± 5,82	88,26	± 3,09
0,1 Ti	117,47	± 4,89	88,45	± 5,09
1 Ti	119,77	± 3,48	93,11	± 7,57
5 Ti	120,74	± 7,51	95,76	± 2,50
10 Ti	106,54	± 3,86	86,22	± 4,83

Tableau 3 : Valeurs des moyennes de viabilité cellulaire et écart-types des tests de cytotoxicité des verres dopés au titane sur la lignée ostéoblastique SaOS2.

Temps d'Incubation	Après 24 Heures		Après 72 Heures	
	Moyenne	Ecart-Type	Moyenne	Ecart-Type
EAHY926	100,00	± 7,00	100,00	± 1,22
46S6	122,49	± 9,89	84,08	± 9,43
0,1 Ti	129,49	± 3,97	91,36	± 2,60
1 Ti	118,43	± 8,88	88,19	± 3,24
5 Ti	117,75	± 6,33	87,34	± 8,00
10 Ti	106,54	± 3,86	108,66	± 7,51

Tableau 4 : Valeurs des moyennes de viabilité cellulaire et écart-types des tests de cytotoxicité des verres dopés au titane sur la lignée endothéliale EAHY926.

Temps d'Incubation	Après 24 Heures		Après 72 Heures	
	Moyenne	Ecart-Type	Moyenne	Ecart-Type
SaOS2	100,00	± 8,14	100,00	± 11,05
46S6	119,07	± 16,79	105,05	± 11,11
0,2 Ag	116,26	± 12,92	81,30	± 24,58
0,1 Cu	123,07	± 12,99	86,44	± 9,97
0,1 (Cu+Zn)	116,49	± 7,24	89,04	± 16,64

Tableau 5 : Valeurs des moyennes de viabilité cellulaire et écart-types des tests de cytotoxicité des verres dopés au cuivre, au zinc et à l'argent sur la lignée ostéoblastique SaOS2.

Temps d'Incubation	**Après 24 Heures**		**Après 72 Heures**	
	Moyenne	Ecart-Type	Moyenne	Ecart-Type
EAHY926	100,00	± 13,65	100,00	± 9,15
46S6	100,95	± 11,08	108,79	± 11,96
0,2 Ag	98,41	± 11,74	77,97	± 2,86
0,1 Cu	94,19	± 16,73	86,21	± 9,83
0,1 (Cu+Zn)	100,32	± 14,08	71,50	± 5,74

Tableau 6 : Valeurs des moyennes de viabilité cellulaire et écart-types des tests de cytotoxicité des verres dopés au cuivre, au zinc et à l'argent sur la lignée endothéliale EAHY926.

Temps d'Incubation	**Après 24 Heures**		**Après 72 Heures**	
	Moyenne	Ecart-Type	Moyenne	Ecart-Type
Témoin	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00
Non Poreux	39,50	± 5,34	82,10	± 7,45
Poreux	43,86	± 2,71	67,71	± 4,61

Tableau 7 : Valeurs des moyennes de viabilité cellulaire et écart-types des tests de cytotoxicité de la vitrocéramique poreuse sur la lignée ostéoblastique SaOS2

Temps d'Incubation	Après 24 Heures		Après 72 Heures	
	Moyenne	Ecart-Type	Moyenne	Ecart-Type
Témoin	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00
Non Poreux	43,89	± 4,28	64,41	± 9,86
Poreux	30,25	± 5,03	70,31	± 6,59

Tableau 8 : Valeurs des moyennes de viabilité cellulaire et écart-types des tests de cytotoxicité de la vitrocéramique poreuse sur la lignée endothéliale EAHY926.

Liste des publications à caractère international

En tant que principal auteur :

- *Effect of copper and zinc on the bioactivity and cells viability of bioactive glasses.*
  Bioceram Dev Appl (2013), S:1
  http://dx.doi.org/10.4172/2090-5025.S1-013

- *Thermal behavior and excess entropy of bioactive glasses and Zn-doped glasses*.
  J Therm Anal Calorim **(IF = 2,206)** (2014) 115:2137–2144
  DOI 10.1007/s10973-013-3280-3

- *Excess entropy and thermal behavior of Cu- and Ti-doped bioactive glasses*.
  J Therm Anal Calorim **(IF = 2,206)** (2014)
  DOI 10.1007/s10973-014-3731-5

- *Thermal investigations of Ti and Ag-doped bioactive glasses*.
  Thermochimica Acta 580 **(IF = 2,185)** (2014) 79–84
  http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2014.02.001

En tant que co-auteur :

- *Chitosan effects on glass matrices evaluated by biomaterial. MAS-NMR and biological investigations.*
  Korean J. Chem. Eng. **(IF = 1,241)** (2013) 30 (9), 1775-1783
  DOI: 10.1007/s11814-013 0104-x

Résumé

Ce travail de thèse concerne les verres bioactifs purs et dopés pour des applications en tant que biomatériaux en site osseux. Ils sont synthétisés par fusion dans le système SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5. Quatre éléments métalliques (Zn, Ti, Cu et Ag), présentant des caractéristiques chimiques et physiologiques intéressantes, ont été introduits dans la matrice vitreuse. Leur réactivité chimique et leur cytotoxicité ont été évalués lors de tests *in vitro*. L'introduction de ces éléments métalliques influe sur les caractéristiques thermiques des verres ainsi que sur la dissolution de la matrice vitreuse, la cinétique et la cristallisation de la couche d'hydroxyapatite. Une bonne prolifération cellulaire a été mise en évidence. En parallèle, une méthode de synthèse d'une vitrocéramique, présentant une microporosité, a été développée par réaction entre TiN et ZnO. Des essais *in vitro* ont montré un caractère bioactif après 60 jours d'immersion et une absence de cytotoxicité. Ce biomatériau a ensuite été implanté au niveau de la diaphyse fémorale de lapins. Différentes études structurales ont montré la résorption progressive du biomatériau jusqu'à 6 mois d'implantation. Des scaffolds chitosan/verre bioactif ont également été synthétisés et obtenus par lyophilisation. Ils ont été étudiés lors d'essais *in vitro*. Ils ont servi de support pour la vectorisation de gentamicine. Les résultats obtenus montrent que les teneurs en chitosan et en verre bioactif ont une influence sur la cristallisation de l'hydroxyapatite et le relargage du médicament. Les modèles mathématiques établis montrent que le temps de relaxation des scaffolds dépend de la concentration de départ en gentamicine.

Mots-clés : Verres bioactifs, vitrocéramique, scaffolds, hydroxyapatite, gentamicine, chitosan, porosité, réactivité chimique, excès d'entropie, temps de relaxation, fusion, lyophilisation

Summary

This research work focuses on the pure and doped bioactive glasses for use as bone biomaterial. They are synthesized by the melting method in the system SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5. Four metallic elements, presenting interesting chemical and physiological properties, have been introduced in the amorphous matrix. Their chemical reactivity and their cytotoxicity have been evaluated during *in vitro* assays in simulated body fluid and cell culture media. The introduction of these metallic elements influences their thermal characteristics, the glass matrix dissolution, the kinetic and the crystallization of the hydroxyapatite layer. A good cells proliferation have been showed. In parallel, a method of synthesis of a glass-ceramic, having a microporosity, have been developed by reaction between TiN and ZnO. *In vitro* assays have showed a bioactive character after 60 days of immersion and a non-cytotoxicity. This biomaterial was implanted in the femoral dyaphisis of rabbits. Different structural studies have showed the gradual resorption of the biomaterial up to 6 months of implantation. Finally, scaffolds chitosan/bioactive glass, obtained by freeze-drying, have also been studied during *in vitro* assays. They were used as support for the vectorization of gentamicin. The obtained results show that the content of chitosan and bioactive glass have an impact on the crystallization of hydroxyapatite et the release of drug. Mathematic models show that the relaxation time depend on the starting concentration of gentamicin

Key words : Bioactive glasses, glass-ceramic, scaffolds, hydroxyapatite, gentamicin, chitosan, porosity, chemical reactivity, excess entropy, relaxation time, fusion, freeze-drying.