Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis

Thèse de doctorat

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de

VALENCIENNES ET DU HAINAUT-CAMBRESIS

Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement spécialité Molécules et Matière Condensée

Présentée et soutenue par Rémy, CATTEAUX.

Le 27/04/2015, à Maubeuge

Ecole doctorale :
Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement (SMRE)

Laboratoire :
Laboratoire des Matériaux Céramiques et Procédés Associés (LMCPA)

Etude de bioverres sol-gel à base de SiO_2, CaO, Na_2O, P_2O_5 et dopés à l'argent

JURY

Président du jury
- Obbade, Saïd. Professeur des Université, Grenoble INP/PHELMA.

Rapporteurs
- Obbade, Saïd. Professeur des Université, Grenoble INP/PHELMA.
- Oudadesse, Hassane. Professeur des Universités, Université de Rennes 1.

Examinateurs
- Bigerelle, Maxence. Professeur des Universités, Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis.
- Désanglois, Françoise. Maître de Conférences, Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis.
- Tavares Lopes Almeida, Maria Margarida. Assistant Professor, Universidade de Aveiro (Portugal).

Directeur de thèse

- Follet, Claudine. Professeur des Universités, Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis.

Co-encadrant : Désanglois, Françoise. Maître de Conférences, Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis.
Co-encadrant : Lebecq, Isabelle. Maître de Conférences, Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis.

Membres invités
- Lebecq, Isabelle. Maître de Conférences, Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis.

Remerciements

Je remercie tout d'abord Madame Anne LERICHE, Professeur à l'Université de Valenciennes et du Hainaut - Cambrésis et directrice du Laboratoire des Matériaux Céramiques et Procédés Associés (LMCPA), pour m'avoir accueilli dans son unité de recherche.

Je remercie vivement Madame Claudine FOLLET, Professeur à l'Université de Valenciennes et du Hainaut - Cambrésis et directrice de cette thèse, pour la compréhension et la patience dont elle a fait preuve tout au long de ce travail. Sa disponibilité et ses grandes qualités humaines m'ont permis de mener à bien la rédaction de ce mémoire.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur Saïd OBBADE, Professeur à l'INP Grenoble, et à Monsieur Hassane OUDADESSE, Professeur à l'Université de Rennes 1, de me faire l'honneur d'être rapporteurs de ce travail.

J'adresse également mes plus vifs remerciements à Madame Maria Margarida TAVARES LOPES ALMEIDA, Professeur à l'Université d'Aveiro (Portugal), et à Monsieur Maxence BIGERELLE, Professeur à l'Université de Valenciennes et du Hainaut Cambrésis, pour leur participation au jury.

Je remercie tout particulièrement Madame Françoise DÉSANGLOIS, Maître de Conférences à l'Université de Valenciennes et du Hainaut Cambrésis et Madame Isabelle LEBECQ, Maître de Conférences à l'Université de Valenciennes et du Hainaut Cambrésis, pour le soutien, le suivi et les conseils qu'elles m'ont apportés, tout au long de ce travail ainsi que pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Un grand merci à Madame Feng CHAI de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de l'Université de Lille, pour avoir réalisé les tests de prolifération et de vitalité sur des cellules humaines L132 et MG63, et pour avoir pris le temps de m'expliquer les notions de biologie qu'il me manquait.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Franck BOUCHART et à Madame Edwige MEURICE, Maîtres de Conférences à l'Université de Valenciennes et du Hainaut Cambrésis, pour avoir réalisé les tests sur les bactéries, ainsi qu'à Monsieur Jean-Christophe

HORNEZ, Maître de Conférences à l'Université de Valenciennes et du Hainaut Cambrésis, pour m'avoir formé aux techniques de synthèse et de mise en forme des biocéramiques. Merci de m'avoir fourni tous les substrats HA et TCP dont j'avais besoin.

Merci à Monsieur Gérard MOREAU du LMCPA, à qui je dois les micrographies MEB de ce mémoire. Merci également à Monsieur Yannick LORGOUILLOUX, Maître de Conférences à l'Université de Valenciennes et du Hainaut Cambrésis, et à Madame Sylvie DAVIERO – MINAUD, Professeur à l'Université de Lille, Unité de Catalyse et de Chimie du Solide, pour leur aide au niveau des ATD/ATG.

Merci à Cyrille, Philippe, Christian, Jérôme, Jaoide, Rudy, votre aide m'a été indispensable.

Merci à toi Elisa, pour ton soutien sans faille dans tous ces moments de stress, je te remercie de tes encouragements, de ta patience et de tout l'amour que tu me portes.

Sommaire

Introduction ..... p. 1

Chapitre I. Elaboration de nouveaux procédés de synthèse des bioverres sol-gel ..... p. 7
1ère partie : Rappels bibliographiques sur les verres bioactifs obtenus par fusion classique et leurs synthèses par voie sol-gel ..... p. 9
2ème partie : Synthèses de verres sol-gel bioactifs dans les domaines SiO_2 – CaO – P_2O_5 et SiO_2 – CaO – Na_2O – P_2O_5 ..... p. 51

Chapitre II. Dopages à l'argent de bioverres du système SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5, recouvrements de substrats biocéramiques et tests biologiques ..... p. 123
1ère partie : Approche théorique des conditions de prolifération in vitro des micro-organismes cellulaires ..... p. 129
2ème partie : Caractérisations de bioverres dopés à l'argent, réalisations de dépôts sur des biocéramiques et évaluations de la réponse biologique. ..... p. 149

Conclusion ..... p. 197
ANNEXES ..... p. 205

Chapitre I. Elaboration de nouveaux procédés de synthèse des bioverres sol-gel ..... p. 7

Chapitre I. 1ère partie : Rappels bibliographiques sur les verres bioactifs obtenus par fusion classique et leurs synthèses par voie sol-gel ..... p. 9

1. Domaines de compositions des verres bioactifs obtenus par fusion ..... p. 10
1.1. Le verre de référence 45S5® ..... p. 10
1.2. Domaines de bioactivité selon I. Lebecq *et al.* ..... p. 12
1.3. Etude du système SiO_2-CaO-Na_2O dopé par P_2O_5 par plans de mélanges ..... p. 14
1.4. Elaboration de bioverres macroporeux ..... p. 18
2. Bioverres obtenus par le procédé sol-gel ..... p. 19
2.1. Histoire et principes ..... p. 19
2.2. Etapes réactionnelles ..... p. 20
2.2.1. Le sol ..... p. 20

2.2.2. Le gel ..... p. 22
2.2.3. Le séchage..... p. 22
2.2.4. La thermolyse ..... p. 23
2.3. Formateurs de réseau vitreux sol-gel ..... p. 23
2.3.1. Le silicium ..... p. 23
2.3.2. Le phosphore..... p. 26
2.4. Modificateurs de réseau ..... p. 27
2.4.1. Le sodium ..... p. 27
2.4.2. Le calcium..... p. 28
2.5. Dopants ..... p. 29
3. Additifs ..... p. 29
3.1. Complexants..... p. 30
3.2. Plastifiants ..... p. 30
3.3. Tensioactifs ..... p. 31
4. Cinétique de formations des gels ..... p. 31
4.1. Catalyses ..... p. 31
4.1.1. Acides Forts ..... p. 32
4.1.2. Catalyse par l'acide acétique ..... p. 34
4.1.3. Catalyse basique ..... p. 35
4.1.4. Catalyse par les fluorures..... p. 36
4.2. Autres paramètres cinétiques ..... p. 37
4.2.1. Le pH ..... p. 37
4.2.2. L'apport d'eau..... p. 38
4.2.3. La nature du solvant..... p. 38
4.2.4. La température ..... p. 39
4.2.5. La concentration dans le solvant..... p. 39
4.2.6. Influence des substituants de l'alcoolate ..... p. 40
Bibliographie..... p. 43

Chapitre I. 2ème partie : Synthèses de verres sol-gel bioactifs dans les domaines $SiO_2 – CaO – P_2O_5$ et $SiO_2 – CaO – Na_2O – P_2O_5$ ..... p. 51

1. Essais de synthèses de verres sol-gel dans le système SiO_2-CaO-P_2O_5 et SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5 à l'aide de modificateurs minéraux ..... p. 52
1.1. Considérations théoriques ..... p. 52
1.2. Compositions réalisées ..... p. 53
1.3. Produits de départ ..... p. 54
1.4. Mode opératoire ..... p. 55
1.5. Analyses ..... p. 57
1.5.1. Observations ..... p. 57
1.5.2. Diffractions des rayons X ..... p. 57
1.6. Discussion ..... p. 61
2. Synthèses de bioverres sol-gel à l'aide de précurseurs alcoolates ..... p. 62
2.1. Etude de faisabilité ..... p. 62
2.2. Produits de départ ..... p. 69
2.3. Compositions réalisées ..... p. 69
2.4. Mode opératoire ..... p. 70
2.5. Analyses sur les compositions 47T-A et 47Q-A ..... p. 71
2.5.1. Mesures de t_{gel} ..... p. 71
2.5.2. Diffractogrammes X ..... p. 72
2.5.3. Discussion intermédiaire sur les compositions 47Q-A et 47T-A. ..... p. 73
2.6. Complément d'analyses sur la composition 47T-A ..... p. 74
2.6.1. Analyses thermiques ..... p. 74
2.6.2. Diffractions des rayons X ..... p. 75
2.6.3. Etudes FTIR ..... p. 76
2.6.4. Analyses MEB/EDS ..... p. 78
2.6.5. Etude de la bioactivité ..... p. 79
2.7. Discussion sur le verre 47T-A ..... p. 83
3. Synthèses de bioverres sol-gel dans le système SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5 ..... p. 84
3.1. Contexte bibliographique ..... p. 84
3.2. Compositions réalisées ..... p. 85
3.3. Produits de départ ..... p. 86
3.4. Mode opératoire ..... p. 86
3.5. Analyses ..... p. 88
3.5.1. Mesure de t_{gel} ..... p. 88
3.5.2. Observations sur le vieillissement des gels ..... p. 89

3.5.3. ATG/ATD ..... p. 90
3.5.4. Diffraction des rayons X (DRX) ..... p. 94
3.5.5. Analyses FTIR ..... p. 96
3.5.6. Etude de la bioactivité ..... p. 99
3.5.7. MEB/EDS ..... p. 104
3.6. Discussion ..... p. 105
4. Utilisation d'un complexant pour la synthèse d'un bioverre sol-gel dans le système SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5 ..... p. 107
4.1. Théorie ..... p. 107
4.2. Composition réalisée ..... p. 108
4.3. Produits de départ ..... p. 108
4.4. Mode opératoire ..... p. 109
4.5. Analyses ..... p. 110
4.5.1. Mesure de t_{gel} et observations ..... p. 110
4.5.2. Analyses thermiques ..... p. 111
4.5.3. DRX ..... p. 111
4.5.4. EDS/MEB ..... p. 112
4.5.5. Etude de la bioactivité ..... p. 113
4.6. Discussion ..... p. 115
Bibliographie ..... p. 119

Chapitre II. Dopages à l'argent de bioverres du système SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5, recouvrements de substrats biocéramiques et tests biologiques .. p. 123
Introduction ..... p. 124

Chapitre II. 1ère partie : Approche théorique des conditions de prolifération in vitro des micro-organismes cellulaires ..... p. 129

1. Définitions générales ..... p. 130
1.1. Cellules eucaryotes et cellules procaryotes ..... p. 130
1.2. Vie et mort des cellules ..... p. 131
1.3. Cultures *in vitro* ..... p. 132
1.4. Types de cellules ..... p. 132

1.5. Limite de Hayflick et de l'inhibition de contact ..... p. 133
2. Prolifération *in vitro* des cellules eucaryotes ..... p. 133
2.1. Milieux de cultures cellulaires ..... p. 133
2.2. Cellules HeLa ..... p. 134
2.3. Lignées immortalisées ..... p. 135
3. Prolifération *in vitro* de cellules procaryotes ..... p. 136
3.1. Milieux de cultures bactériens *in vitro* ..... p. 136
3.2. Modes de vie bactériens ..... p. 137
4. Essais biologiques ..... p. 139
4.1. Méthodes de mesure de la vitalité ..... p. 140
4.1.1. Libération d'ATP ..... p. 140
4.1.2. Activité métabolique ..... p. 140
4.2. Evaluation de la prolifération ..... p. 141
4.2.1. Comptage des cellules ..... p. 141
4.2.2. Evaluation par spectrophotométrie ..... p. 142
Bibliographie ..... p. 145

Chapitre II. 2ème partie : Caractérisations de bioverres dopés à l'argent, réalisations de dépôts sur des biocéramiques et évaluations de la réponse biologique ..... p. 149

1. Synthèse de bioverres sol-gel dopés à l'argent ..... p. 150
1.1. Effet oligodynamique ..... p. 150
1.2. Influence des bioverres non dopés sur les cultures eucaryotes in-vitro ..... p. 151
1.3. Introduction de l'argent dans les verres sol-gel ..... p. 154
1.4. Compositions réalisées ..... p. 155
1.5. Mode opératoire ..... p. 156
1.6. Analyses des bioverres dopés ..... p. 157
1.6.1. Temps de gélification ..... p. 157
1.6.2. Observations sur le vieillissement et le séchage des gels ..... p. 157
1.6.3. ATD/ATG ..... p. 158
1.6.4. Diffraction des rayons X ..... p. 159
1.6.5. Bioactivité dans le SBF ..... p. 161

1.7. Discussion ..... p. 165
2. Recouvrement de substrats biocéramiques ..... p. 167
2.1. Mise en forme des substrats ..... p. 167
2.1.1. Pastilles denses ..... p. 167
2.1.2. Substrats macroporeux ..... p. 168
2.1.3. Méthode de dépôt ..... p. 170
2.2. Caractérisations des dépôts de bioverre sur pastilles de TCP ..... p. 172
2.2.1. Masse de verre déposée ..... p. 172
2.2.2. Caractérisations des dépôts de bioverre 47Q-2A ..... p. 172
2.2.3. Caractérisations des dépôts de bioverre 47Q-G ..... p. 174
2.3. Immersion dans le SBF ..... p. 176
2.3.1. Immersion de pastilles en TCP recouvertes ..... p. 176
2.3.2. Immersion d'édifices macroporeux ..... p. 178
2.4. Discussion ..... p. 180
3. Evaluation de l'influence de l'argent sur la prolifération *in-vitro* ..... p. 181
3.1. Préparation des échantillons ..... p. 181
3.2. Tests des bioverres sur la prolifération et la formation de biofilms avec *Pseudomonas aeruginosa* ..... p. 181
3.2.1. Culture et conditions de croissance ..... p. 181
3.2.2. Résultats ..... p. 182
3.2.3. Discussion ..... p. 184
3.3. Tests des bioverres sur la prolifération et la vitalité de cellules eucaryotes MG63 p. 186
3.3.1. Culture et conditions de croissance ..... p. 186
3.3.2. Résultats ..... p. 187
3.3.3. Discussion ..... p. 189
Bibliographie ..... p. 191

Conclusion ..... p. 197

Résumé des bioverres étudiés ..... p. 203
Glossaire ..... p. 204

ANNEXES ..... p. 205
Annexe I : Synthèses des phosphates de calcium ..... p. 206

Bibliographie..... p. 217
Annexe II : Techniques de mises en forme des poudres de biocéramiques ..... p. 220
Bibliographie..... p. 226
Annexe III : Procédés de dépôts sol-gel..... p. 227
Bibliographie..... p. 229
Annexe IV : Composition du MEM..... p. 230
Annexe V : Notice constructeur des tests de quantifications des biofilms bactériens p. 231

Introduction

Depuis plusieurs décennies, des recherches visent à améliorer les matériaux utilisés comme implants en chirurgie réparatrice. Depuis 1920, un des deux matériaux les plus courants est le phosphate tricalcique $Ca_3(PO_4)_2$ ou β-TCP. Biocompatible, il se résorbe dans l'organisme en quelques semaines en étant remplacé par de l'os nouveau.

L'autre matériau est l'hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, abréviée HA. En 1978, les propriétés de l'hydroxyapatite frittée furent reconnues comme étant similaires à celles de la phase minérale de l'os naturel. Contrairement au β-TCP, cette phase est insoluble et stable. Ces deux biocéramiques de la famille des phosphates de calcium ne sont pas toxiques pour les organismes et ne déclenchent pas de mécanismes de rejets. Le choix de l'une ou de l'autre dépendra des applications visées : le β-TCP sera plutôt utilisé pour des prothèses résorbables et l'HA pour des implants fixes.

Cependant, la surface des biocéramiques HA et β-TCP est peu réactive vis-à-vis des cellules hôtes. C'est également le cas d'autres matériaux implantables comme par exemple l'alumine ou la zircone. Pour pallier à ce manque, l'US Army Medical Research and Development proposa en 1969 de développer un biomatériau capable de se lier chimiquement avec l'organisme. La même année, L.L. Hench, chercheur à l'université de Floride, découvrit le bioverre. Il remarqua qu'une fois immergé dans un milieu biologique, la surface du verre se recouvre rapidement d'une couche d'hydroxyapatite carbonaté (HAC) semblable à la phase minérale de l'os naturel. Le mécanisme de cette réaction est établi : le verre se dissout partiellement en formant un gel de silice et libère des ions calcium et phosphore dans le milieu. L'équilibre local de dissolution/précipitation est alors modifié ce qui permet à de l'hydroxyapatite amorphe d'apparaitre sur le gel. Avec le temps, l'apatite amorphe cristallise en formant une couche d'hydroxyapatite carbonatée. Cette couche et le gel de silice forment des liaisons faibles avec les cellules, permettant un accrochage stable. Cette composition de verre est appelée 45S5®, la formulation du verre correspond à 46,1% de SiO_2, 26,9% de CaO, 24,4% de Na_2O et 2,6% de P_2O_5 , exprimée en pourcentages molaires. Toutefois, cette composition n'a pas été optimisée par L.L. Hench.

Au laboratoire, un plan d'expérience réalisé par C. Duée a permis d'établir la composition la plus réactive de ce domaine quaternaire. Il s'agit de la composition 47Q qui contient 47% de SiO_2, 26,5% de CaO, 21,5% de Na_2O et 5% de P_2O_5 en pourcentages molaires.

Les bioverres réalisés par fusion des oxydes précurseurs à 1400°C sont mécaniquement moins résistants que les biocéramiques. Il est donc impossible de remplacer des os naturellement soumis à des contraintes élevées, comme ceux des membres. Les bioverres sont donc habituellement réservés à la chirurgie reconstructive faciale ou auditive et à la chirurgie dentaire. Il est également impossible de recouvrir de bioverres à 1400°C des substrats constitués de matériaux divers, comme par exemples des biocéramiques HA et TCP denses ou macroporeuses. En effet, le verre cristallise lors de la trempe et la température élevée lors de la coulée peut dégrader le substrat.

Il est possible d'utiliser le procédé sol-gel pour réaliser des matériaux vitreux. Avec ce procédé, une préformation du verre est effectuée à froid dans un milieu liquide appelé sol. Dans ce cas, les précurseurs ne sont plus des oxydes mais, en général, des molécules organiques qui peuvent s'hydrolyser et se condenser en gel avec l'emploi ou non d'un catalyseur. Pour les verres de silice, ces molécules peuvent être des alcoolates de silicium et aussi des molécules azotées comme les silazanes par exemples.

En général, les verres obtenus par voie sol-gel n'appartiennent pas au domaine quaternaire SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5. En effet, il y a des difficultés à maintenir le verre final amorphe lorsque le calcium et le sodium sont présents ensembles dans un sol. Lors du séchage du gel, ces deux éléments peuvent facilement cristalliser, ce qui donne naissance à une vitrocéramique et non à un verre stabilisé. Pour les compositions 45S5® et 47Q la difficulté de synthèse est encore plus marquée car ces verres ont une composition inversée : ils contiennent plus de calcium et de sodium, appelés éléments modificateurs, que de silicium et de phosphore qui sont les formateurs du réseau vitreux.

Les questions, qui se sont posées au début du travail de la thèse, ont été les suivantes :

- est-il possible d'adapter la synthèse sol-gel pour réussir à reproduire facilement les compositions de bioverres déjà synthétisé par fusion ?
- comment est-il possible de les caractériser ?
- les propriétés de bioactivité sont-elles conservées ?

De plus, dans le but d'utiliser ces verres dans des applications pratiques, d'autres questions peuvent être énoncées :

- ces verres sol-gel sont-ils toxiques vis-à-vis des cellules humaines ?

- ces compositions peuvent-elles être dopées pour réduire la prolifération d'agents pathogènes comme les bactéries ?

- si oui, les paramètres de bioactivité sont-ils conservés ?

- peut-on recouvrir des biocéramique HA et TCP de bioverres sol-gel et quelles sont les propriétés biologiques de ces nouveaux composites ?

Après une étude bibliographique sur les bioverres obtenus par fusion, les différents types de précurseurs, utilisés en synthèse des verres sol-gel, sont également abordés dans la 1ère partie du chapitre 1. En effet, il existe différentes voies catalytiques pouvant accélérer l'hydrolyse et la condensation des formateurs de réseau sol-gel. Il est nécessaire de les étudier afin d'en comprendre les mécanismes. En plus de l'influence du catalyseur, cette partie résume les différents paramètres qui peuvent modifier la cinétique de formation des gels, et évoque des additifs pouvant améliorer certaines de leurs propriétés.

La 2ème partie est consacrée à la synthèse par sol-gel des verres bioactifs appartenant aux systèmes SiO_2-CaO-P_2O_5 et SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5.
Un procédé sol-gel classique a tout d'abord été utilisé pour l'élaboration d'un verre quaternaire, en prenant des précurseurs minéraux pour le calcium et le sodium. Les résultats n'étant pas ceux souhaités, deux procédés supplémentaires ont été développés. Des molécules organiques ont été utilisées à la place des poudres minérales. Les précurseurs de ces synthèses n'étant pas courants au laboratoire, une autre voie originale proposant l'utilisation de glycérol comme complexant a été réalisée.

Dans tous les cas, les échantillons résultants de ces synthèses ont été caractérisés par des analyses thermogravimétriques et thermo différentielles. Celles-ci permettent de déterminer les températures caractéristiques des verres, comme la température de transition vitreuse et celle de cristallisation du réseau. Les échantillons ont été aussi analysés par diffraction des rayons X à plusieurs températures. Cela a permis de valider les conditions de vieillissement des gels et d'identifier la phase cristalline des verres.
Pour tous les procédés de synthèses sol-gel, la bioactivité des verres a été établie par spectroscopie Infra Rouge. Ces analyses ont été réalisées avant et après immersion *in vitro* dans du fluide physiologique simulé (SBF).

Le second chapitre est consacré au dopage à l'argent des bioverres SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5, synthétisés par voie sol-gel. En effet, l'argent possède une action qui limite la prolifération des bactéries.

Dans la première partie, des notions simples de biologie ont été rappelées. En effet, elles ont été utiles à la compréhension des manipulations qui conduisent à déterminer la prolifération et la vitalité des cellules, qu'elles soient bactériennes ou humaines.

Dans la deuxième partie, la toxicité des bioverres, élaborés par les différents procédés de synthèse, a été évaluée, par contact avec des cellules humaines de type L132, sur les échantillons réduits en poudre. Cette étape a permis de sélectionner le procédé de synthèse le moins toxique pour réaliser des tests nécessitants des manipulations plus complexes. Ce procédé a été également choisi pour les essais de dopage à l'argent.

Après les caractérisations physico-chimiques et les analyses *in vitro* de la bioactivité de ces verres dopés, des essais de recouvrement de biocéramiques, denses en β-TCP et macroporeuses en HA, par des bioverres ont été réalisés. Après observation des dépôts au microscope électronique à balayage (MEB), les échantillons denses ont été testés en cultures *in vitro* bactériennes et humaines. L'action et la toxicité des dépôts de bioverres ont été évaluées, par rapport à des échantillons non recouverts.

La conclusion permet d'établir le bilan du travail effectué et propose des ouvertures à une éventuelle suite de cette étude.

Chapitre I : Elaboration de nouveaux procédés de synthèse des bioverres sol-gel

1ère partie : Rappels bibliographiques sur les verres bioactifs obtenus par fusion classique et leurs synthèses par voie sol-gel

Pour réussir des synthèses de verres bioactifs sol-gel, il est nécessaire d'étudier dans un premier temps les verres obtenus par fusion. C'est pourquoi la notion de bioverres, de bioactivité et les domaines de composition menant à ces matériaux sont définis dans la suite de ce mémoire.

Après avoir décrit l'élaboration de bioverres obtenus par fusion, cette partie s'intéresse à la théorie sol-gel. Les principales étapes de la synthèse ainsi que les précurseurs pouvant être utilisés sont étudiés. Les paramètres qui affectent la cinétique de formation des gels ainsi que les additifs pouvant améliorer certaine propriétés sont également énoncés.

1. Domaines de compositions des verres bioactifs obtenus par fusion

1.1. Le verre de référence 45S5®

Les bioverres, ou verres bioactifs, furent initialement étudiés par L.L. Hench [1], à la demande de l'armée américaine de créer un substitut osseux dans un nouveau matériau capable de réduire le temps de convalescence des soldats. Les verres bioactifs, une fois immergés dans l'organisme ou bien dans un fluide physiologique simulé (SBF, *simulated body fluid)* sont capables de développer à leur surface, une couche d'hydroxyapatite carbonatée (notée HAC) similaire à la phase minérale de l'os. Cette couche possède la particularité d'augmenter l'adhérence des cellules hôtes sur le bioverre par un grand nombre de liaisons intimes, assurant par cela un accrochage stable de l'implant.

Dans le cadre d'un projet avec l'US Army Medical Research and Development, L.L. Hench [1] fut le premier à s'intéresser aux verres bioactifs préparés par fusion. Ce projet l'a amené à étudier le diagramme ternaire SiO_2-CaO-Na_2O dans lequel il a ajouté 6 % en masse de P_2O_5. Les verres préparés furent testés *in vitro* dans du liquide physiologique simulé et *in vivo* dans des fémurs de rat.

L. L. Hench a défini la bioactivité de la manière suivante. Un matériau est dit bioactif lorsque :

- *in vitro*, la moitié de sa surface sera recouverte d'apatite cristallisée,
- *in vivo*, la moitié de la surface de l'implant sera liée au milieu hôte.

Un indice de bioactivité, noté I_B, est alors défini. Il peut être calculé de la façon suivante :

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

avec $t_{0,5bb}$ correspondant au temps en jours au bout duquel plus de 50 % de l'interface est liée (bb : « bone bonding » signifiant liaison à l'os).

Le résultat de son étude de la bioactivité est représenté sur la figure I-I-1.

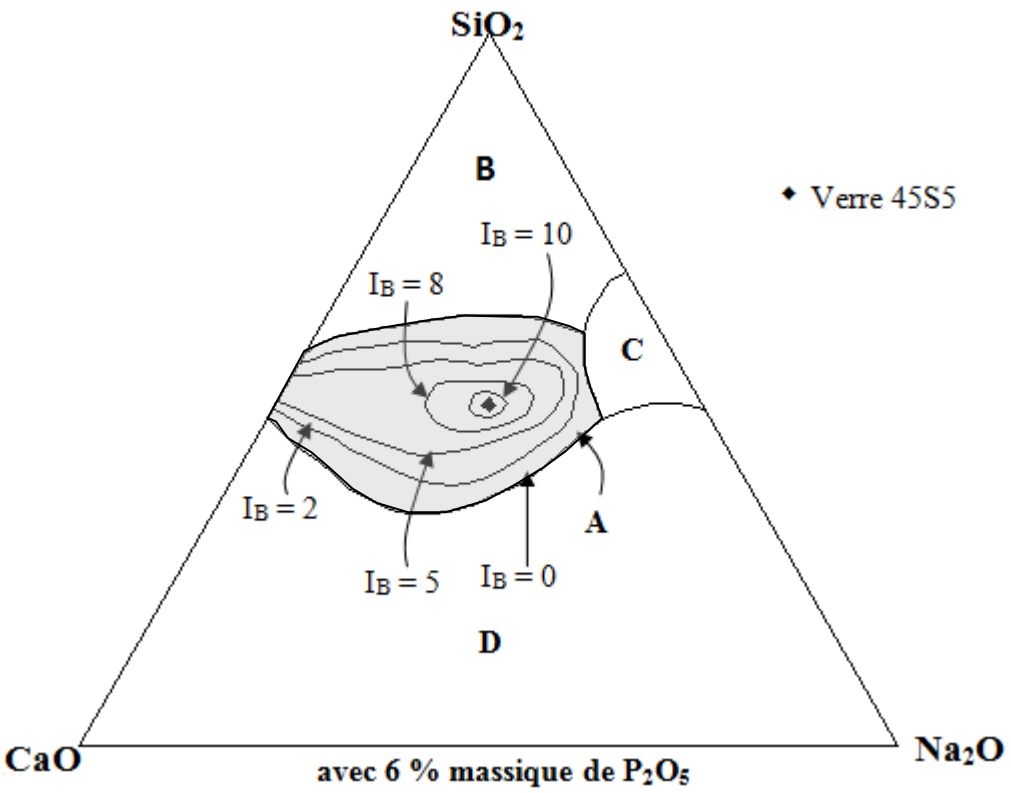


Figure I-I-1 : Indice de bioactivité I_B, de L. L. Hench, dans le diagramme SiO_2-CaO-Na_2O avec 6% massique de P_2O_5.

Les courbes d'iso-indice de bioactivité, allant de 0 à 10, sont indiquées sur la figure I-I-1. Le diagramme est décomposé en quatre domaines :

- le domaine A, domaine de bioactivité
- le domaine B où il n'y a pas de liaison à l'os car la réactivité de la surface est trop faible.
- le domaine C où il n'y a pas de liaison à l'os car la réactivité de la surface est trop élevée (dissolution du verre).
- le domaine D où il n'y a pas possibilité de préparer des verres.

Le verre représenté par un losange sur la figure I-I-1 est le verre le plus bioactif obtenu par L. L. Hench. Nommé le Bioglass 45S5®, sa composition est :

- En pourcentages massiques, 45% SiO_2, 24,5% CaO, 24,5% Na_2O, 6% P_2O_5.
- En pourcentages molaires, 46,1% SiO_2, 26,9% CaO, 24,4% Na_2O, 2,6% P_2O_5.

L'appellation 45S5® est basée sur le code de M. Ogino *et al.* [2] pour les biomatériaux :

45 = pourcentage en masse de formateur (SiO_2, B_2O_3) ;

S ou B = type de formateur de réseau c'est-à-dire SiO_2 ou B_2O_3 ;

5 = rapport molaire Ca / P.

L. L. Hench a mis en évidence trois points essentiels pour qu'un verre soit bioactif :

- il doit contenir moins de 60 % massique de silice, formateur du réseau,
- il doit donc avoir une quantité importante de modificateurs Na_2O et CaO,
- il doit enfin respecter un rapport molaire Ca / P élevé (supérieur à 5).

1.2. Domaines de bioactivité selon I. Lebecq *et al* [5-6].

Les études précédemment réalisées sur des bioverres dans le ternaire SiO_2-Na_2O-P_2O_5 et le quaternaire SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5 [3-4] indiquent que le verre le plus bioactif doit contenir un taux moyen de silice d'environ 50% molaire. Cependant, les résultats proposés dans les différentes publications se contredisent quant aux quantités de calcium et sodium.
C'est pourquoi, I. Lebecq *et al.* [5-6] ont décidé d'étudier le comportement de quinze verres du système SiO_2-CaO-Na_2O dont les compositions sont regroupées dans le tableau I-I-1.

Verre	SiO_2	CaO	Na_2O
A1	42	34,5	23,5
A2	45	31,5	23,5
A3	47	29,5	23,5
A4	50	26,5	23,5
A5	55	21,5	23,5
B1	42	29	29
B2	45	27,5	27,5
B3	47	26,5	25,5
B4	50	25	25
B5	55	22,5	22,5
C1	42	23,5	34,5
C2	45	23,5	31,5
C3	47	23,5	29,5
C4	50	23,5	26,5
C5	55	23,5	21,5

Tableau I-I-1 : Compositions molaires étudiées par I. Lebecq *et al.* [5-6].

Les verres sont préparés par fusion classique en utilisant de la silice pure, des carbonates de calcium et de sodium, et du sel de Graham comme précurseurs. La fusion est obtenue à 1400°C après un palier de décarbonatation de 2h à 800°C. Les verres sont alors coulés en forme de pastilles. Celles-ci sont stabilisées grâce à un recuit à 400°C pendant 2h puis placées au fond de moules en silicone pour y être recouvertes de résine. Les échantillons sont ensuite démoulés pour être conduits vers l'étape du polissage qui permet de lisser la surface vitreuse libre. Celui-ci est effectué à l'aide d'un papier SiC de grade 1200 (15,3 µm). Les échantillons sont finalement immergés dans du SBF. Cette préparation permet d'avoir toujours la même surface de contact du matériau vitreux avec le milieu d'immersion.

Les résultats de ces travaux mettent en évidence trois domaines de bioactivité. La figure I-I-2 représente les verres étudiés ainsi que leurs domaines de bioactivité.

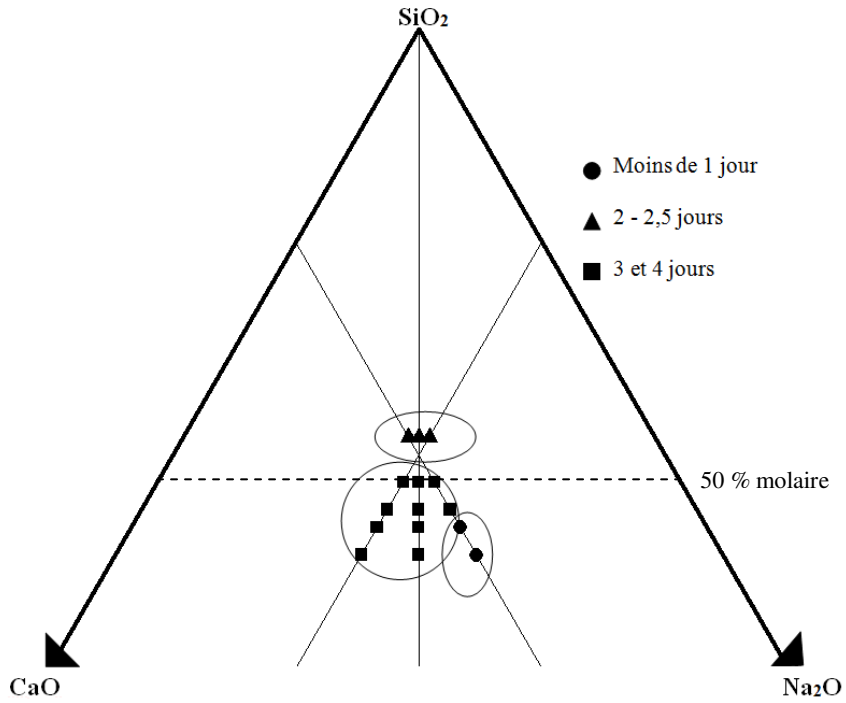


Figure I-I-2 : Domaines de bioactivité dans le système SiO_2 – CaO – Na_2O.

Dans le premier domaine, qui contient la majorité des verres étudiés et se situe du côté du calcium, la bioactivité est faible et l'HydroxyApatite Carbonatée (HAC) apparaît en plus de trois jours à la surface des verres. Le deuxième, qui correspond aux verres les plus riches en silice, est un domaine de bioactivité moyenne. La couche d'apatite se forme en 2 à 3 jours d'immersion dans le liquide physiologique. Enfin, le troisième domaine contient les verres les plus bioactifs dont la couche d'HAC apparaît entre 12 et 22 heures. Ce sont les verres les plus riches en sodium. Cette étude met en relation la composition des bioverres avec la réactivité de surface.

1.3. Etude du système SiO_2-CaO-Na_2O dopé avec P_2O_5 par plans de mélanges

C. Duée *et al.* [7-8] ont utilisé les plans de mélanges pour étudier un certain nombre de propriétés, appelées réponses et en particulier, le temps d'apparition de la couche d'hydroxyapatite et l'épaisseur de celle-ci. Les plans de mélanges permettent de déterminer la valeur d'une réponse quelle que soit la composition d'un domaine défini. Pour cela, des expériences sont réalisées et une formule donnant la réponse en fonction de la composition peut être établie. Le domaine étudié est donné sur la figure I-I-3.

Ce domaine est défini d'après les considérations suivantes :

- Les verres de l'étude doivent être synthétisables à 1400°C ou moins
- Les échantillons doivent être parfaitement vitreux
- Les verres ne doivent pas être totalement solubles
- Ils doivent être bioactifs et former leur couche d'HAC en 15 jours maximum

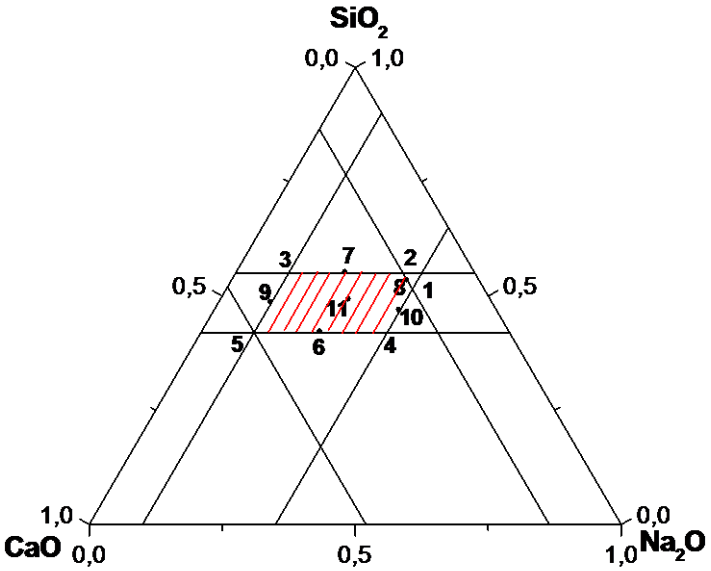


Figure I-I-3 : Domaine d'étude pour les plans de mélanges appliqués au système SiO_2 – CaO – Na_2O.

Onze verres sont retenus pour l'étude. L'évaluation de la bioactivité de ces verres suit le même protocole que celui retenu par I. Lebecq *et al.* [5-6] sauf pour l'étape de polissage final qui est réalisée avec du papier SiC de grade 80 (200 µm). Un état de surface plus rugueux permet alors d'obtenir une meilleure réactivité des verres. Leur immersion dans du fluide physiologique donne des réponses en terme de temps d'apparition de la couche d'HAC et d'épaisseur de celle-ci. Elle est mesurée par microscopie électronique à balayage (MEB). Le paramètre X_1 est posé comme étant la proportion molaire de SiO_2, X_2 celle de CaO et X_3 celle de Na_2O.

Les formules obtenues sont les suivantes :

$$\text{Temps d'apparition de l'HAC} = -24{,}23.X_1 - 125{,}09.X_2 - 231{,}39.X_3 + 301{,}98.X_1X_2 + 510{,}65.X_1X_3 + 1306{,}70.X_2X_3 - 2416{,}03.X_1X_2X_3$$

$$\text{Epaisseur de l'HAC} = -248{,}59.X_1 - 579{,}86.X_2 - 175{,}30.X_3 + 1869{,}99.X_1X_2 + 1127{,}13.X_1X_3 + 1985{,}51.X_2X_3 - 5450{,}45.X_1X_2X_3$$

D'autres réponses, comme la température de transition vitreuse (Tg) ou celle de cristallisation (Tc), ont été également étudiées [9]. Les formules sont les suivantes :

$$Tg = -408{,}43.X_1 - 413{,}62.X_2 - 257{,}62.X_3 + 4874{,}88.X_1X_2 + 3221{,}18.X_1X_3 + 973{,}43.X_2X_3 - 4908{,}18.X_1X_2X_3$$

$$Tc = 1190{,}40.X_1 - 166{,}62.X_2 + 1339{,}15.X_3 + 1580{,}75.X_1X_2 - 2829{,}17.X_1X_3 + 1816{,}13.X_2X_3 - 6990{,}79.X_1X_2X_3$$

Ces formules permettent de tracer des isoréponses dans le domaine considéré du système SiO_2-CaO-Na_2O. Les figures I-I-4, I-I-5, I-I-6 et I-I-7 représentent respectivement les isoréponses : bioactivité, épaisseur d'HAC, température de transition vitreuse et température de cristallisation.

Les verres les plus bioactifs sont situés dans le domaine le plus proche de CaO. Les temps de réactivité varient de 3 à 6h30, ce qui est très intéressant. Les épaisseurs de couche sont assez faibles : de 10 à 25 microns. Les plages de travail sont petites car les températures de transition vitreuse et les températures de cristallisation sont voisines.

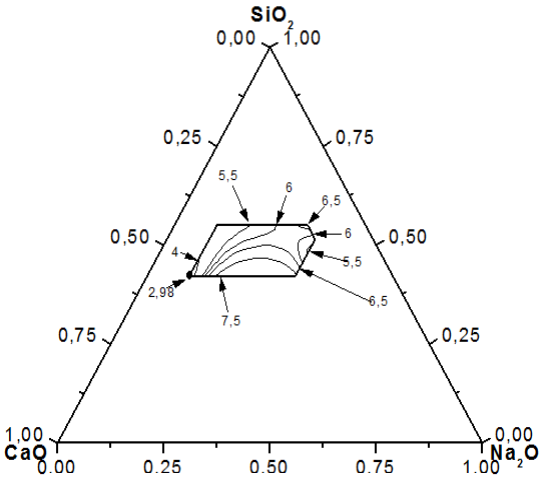


Figure I-I-4 : Bioactivité dans le ternaire SiO_2 – CaO – Na_2O.

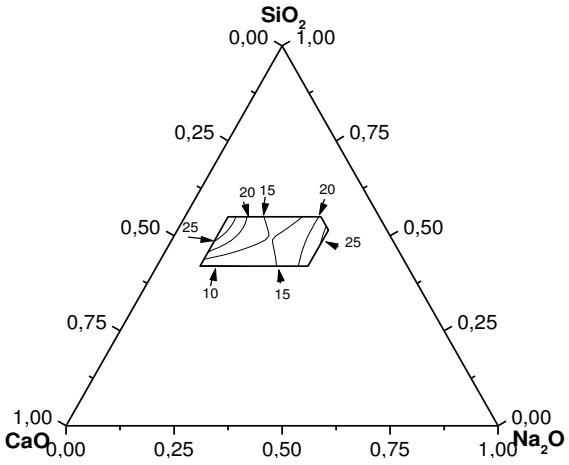


Figure I-I-5 : Epaisseurs dans le système SiO_2 – CaO – Na_2O.

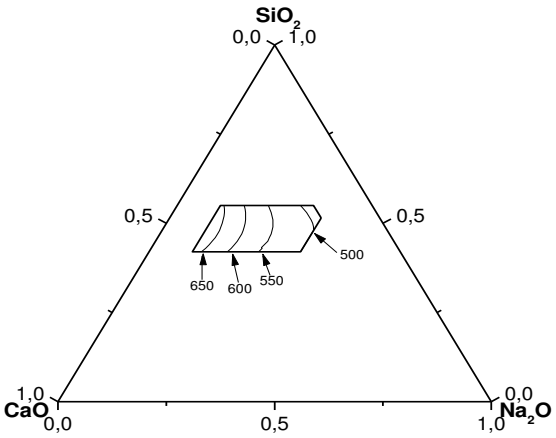


Figure I-I-6 : Températures de transition vitreuse.

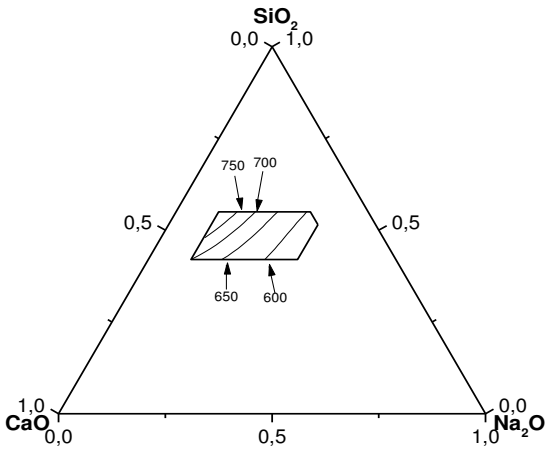


Figure I-I-7 : Températures de cristallisation.

Le système ternaire est dopé avec du phosphore. La quantité maximale pouvant être introduite est de 5% molaire de P_2O_5. Au-delà de cette valeur, les échantillons deviennent cristallisés.

De nouveaux plans de mélange ont permis de trouver de nouvelles formules et de tracer les isoréponses, avec différents taux de phosphore. La figure I-I-8 présente les isoréponses de temps d'apparition d'apatite avec 5% de P_2O_5 et la figure I-I-9 les isoréponses de l'épaisseur de couche.

Le domaine de plus forte bioactivité s'est déplacé plutôt au centre du diagramme, la couche d'apatite apparaît en moins de 3 heures. Le composé le plus bioactif a la composition suivante : 47% SiO_2 - 26,5% CaO - 21,5% Na_2O - 5% P_2O_5.

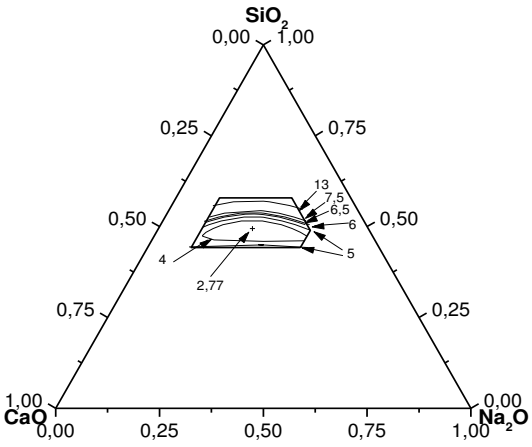


Figure I-I-8 : Bioactivité dans le système avec 5% de P_2O_5.

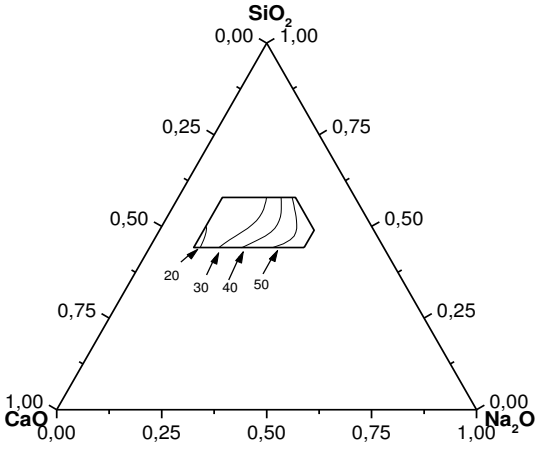


Figure I-I-9 : Epaisseurs dans le système avec 5% de P_2O_5.

Les épaisseurs de couche ont considérablement augmenté avec l'ajout de phosphore dans la composition. Les figures I-I-10 et I-I-11 représentent l'évolution des temps d'apparition de la couche d'HAC et de l'épaisseur de cette couche en fonction de l'ajout de P_2O_5 pour le composé quaternaire le plus bioactif.

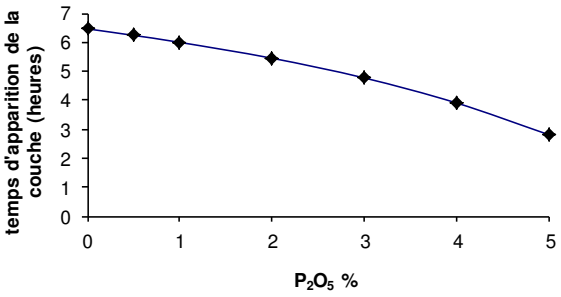


Figure I-I-10 : Temps d'apparition d'HAC en fonction de P_2O_5.

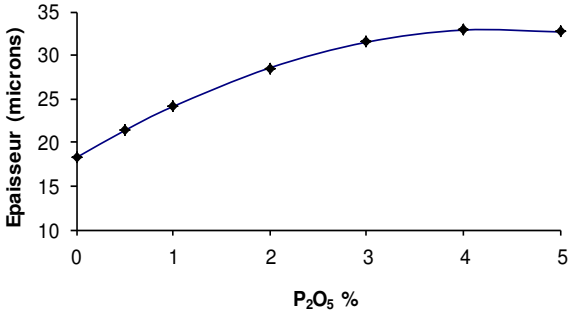


Figure I-I-11 : Epaisseur d'HAC en fonction de P_2O_5.

Le temps d'apparition de la couche d'HAC diminue alors que son épaisseur augmente quand du P_2O_5 est ajouté. Il est malheureusement impossible d'en ajouter davantage puisque lors de la trempe, il y a cristallisation pour des compositions ayant des taux de P_2O_5 supérieurs.

1.4. Elaboration de bioverres macroporeux

A. Pardini [10] a utilisé des compositions de bioverres étudiées par I. Lebecq [5] pour tenter de préparer des macroporeux. La bioactivité étant un phénomène de surface, il est possible qu'un implant macroporeux permette une colonisation plus rapide et plus complète du matériau par le milieu hôte. De l'apatite se formerait pour lier intimement l'implant dans l'organisme, avec un développement de cellules osseuses à l'intérieur des porosités.

Pour préparer ces bioverres macroporeux, le brevet « Procédé d'élaboration de substituts osseux synthétiques d'architecture poreuse parfaitement maîtrisée » [11] a été utilisé. Celui-ci concernait à l'origine des poudres d'hydroxyapatite ou d'alumine, de granulométrie proche du micron. Ce procédé permet la mise en forme de substituts osseux ayant un volume poreux de 70-80% avec un diamètre de pores contrôlé compris entre 10 et 1000 µm.

L'étude comporte plusieurs étapes, à savoir :

- l'élaboration d'une structure porogène,
- l'obtention d'une poudre de verre micrométrique,

- l'élaboration d'une barbotine,
- un traitement thermique à basse température : le déliantage,
- un traitement thermique à haute température.

Ces étapes permettent tout d'abord de préparer une structure à base de billes de diamètre connu, collées entre elles. Le diamètre de celles-ci constitue la future macroporosité, la façon dont elles sont collées entre elles constitue l'interconnexion. Ce sont des billes de PolyMétAcrylate de Méthyle (PMMA) de diamètre 600-700 µm qui ont été utilisées.

Puis, le bioverre est synthétisé, broyé, mis en suspension. L'édifice organique de PMMA est alors imprégné, puis porté à 250°C pour éliminer les porogènes. Enfin, le macroporeux est densifié à 900°C. A cause des hautes températures mises en œuvre, ce procédé a conduit à l'élaboration d'une vitrocéramique macroporeuse et non d'un verre.

E. Wers [12] a réalisé au cours de son travail de thèse des verres bioactifs dans le domaine SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5. Quatre métaux, Zn, Ti, Cu et Ag sont ajoutés à des compositions de verre de base afin d'étudier l'influence de ces dopants sur la réactivité chimique et la cytotoxicité. Les métaux introduits influent sur les températures d'élaboration des verres, sur le temps d'apparition et l'épaisseur de la couche d'HAC mais ils ne diminuent pas la prolifération cellulaire. En parallèle, il a développé une vitrocéramique à base de TiN et ZnO qui présente des microporosités. Des essais *in vitro* ont montré un caractère bioactif du matériau après 60 jours d'immersion et une absence de toxicité pour les cellules. Cette vitrocéramique a alors été implantée dans des fémurs de lapins. Les résultats des analyses ont montré une résorption progressive au cours des six mois qui ont suivi l'implantation.

2. Bioverres obtenus par le procédé sol-gel

2.1. Histoire et principes

La première polymérisation sol-gel est réalisée par M. Ebelmen [13-14] qui décrit dès 1845 « la conversion en verre solide de l'acide silicique exposé à l'air humide ». La technique de la polymérisation sol-gel ne sera reprise industriellement qu'en 1939, par la firme allemande Schott Glaswerke, afin de recouvrir par trempage des récipients en verre. L'industrie

s'intéresse alors à la réalisation de couches minces par voie sol-gel ce qui permet d'éviter le problème des fissurations observées lors du séchage de gels plus denses.

Le principe de cette « chimie douce » repose sur l'utilisation d'une succession de réactions d'hydrolyse-condensation, à température modérée, pour organiser des réseaux d'oxydes amorphes qui peuvent être à leur tour traités thermiquement afin d'obtenir un verre stabilisé [15].
La formation du réseau d'oxydes a lieu, en solution, à une température proche de l'ambiante. Il s'agit d'un processus de conversion en solution d'alcoolates métalliques, tels que les alcoolates de silicium, zirconium, aluminium, titane...
La réaction de synthèse de verres par voie sol-gel repose sur la propriété qu'ont les alcoolates de silicium de pouvoir plus ou moins s'hydrolyser en présence d'eau. Suivant l'intensité de cette hydrolyse, il se formera par polycondensation un réseau tridimensionnel polymérisé.

J. Livage [16] peut être considéré comme l'initiateur de la chimie douce en France. Il a notamment mis au point des procédés sol-gel qui permettent d'obtenir des matériaux originaux inaccessibles par les voies classiques. Ses travaux ont pour but d'obtenir des matériaux de type vitreux dans des conditions douces en essayant de reproduire les procédés de biominéralisation naturels. Il est ainsi possible de lier par exemple des molécules organiques, voire même biologiques, à un réseau de silice, pour former des nouveau matériaux hybrides [17]. Les applications industrielles d'une telle chimie sont considérables.

2.2. Etapes réactionnelles

2.2.1. Le sol

Le système est dans l'état liquide [15] : il est constitué d'un mélange d'oligomères colloïdaux et de petites macromolécules ainsi que de différents monomères partiellement hydrolysés, selon le degré d'avancement de la réaction de polymérisation.

Dans le cas d'un verre bioactif, le sol est constitué d'un volume de solvant dans lequel on va dissoudre les formateurs et les modificateurs de réseau sol-gel qui sont souvent respectivement des alcoolates et des sels cristallins.

Dans le cas d'un verre de silice, la formation du réseau amorphe est assurée par un alcoolate de silicium auquel il faudra ajouter un agent catalyseur. La réaction d'hydrolyse résultante assure la création de groupements $Si(OR)_X(OH)_{4-X}$. Ces groupements se condensent ensuite en liaisons Si-O-Si plus ou moins longues avec l'avancement de la réaction dans le temps. Le gel est alors en cours de formation.

A partir du sol, il est possible :

- de former un gel, qui après séchage et stabilisation, se transformera en monolithe directement implantable [18],
- de déposer le gel sur un substrat quelconque qui en séchant s'affinera en un film dense [19],
- de faire gélifier le sol à l'intérieur d'un substrat poreux qui une fois sec donnera un macroporeux si le substrat est éliminé ou bien un composite à porosité contrôlée si le substrat est conservé.

La figure I-I-12 résume les applications possibles de la voie sol-gel.

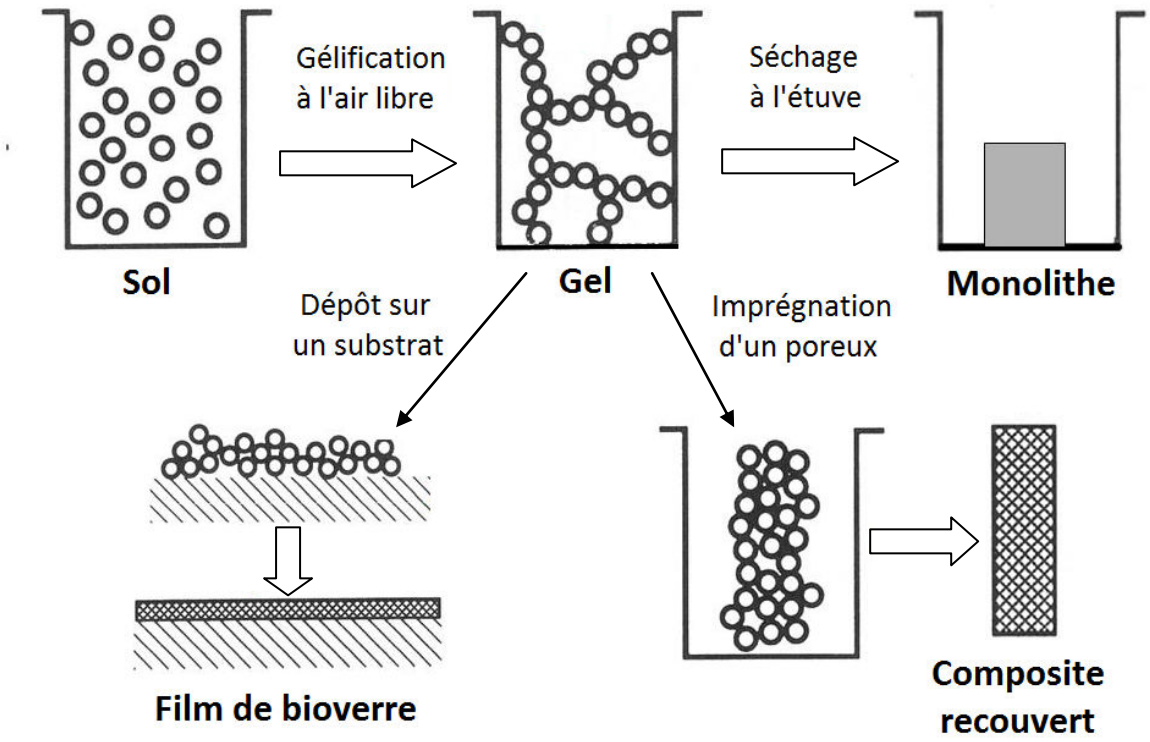


Figure I-I-12 : Possibilités d'applications de la voie sol-gel.

2.2.2. Le gel

Un gel est constitué d'un réseau tridimensionnel d'oxydes gonflé par le solvant, avec des liaisons chimiques assurant la cohésion mécanique du matériau en lui donnant un caractère rigide, non déformable [15].

Une fois les réactions d'hydrolyse et de condensation amorcées dans le sol, celui-ci vieillit progressivement. Ce vieillissement est dû à l'augmentation progressive de la taille des condensats siliceux qui se traduit par une augmentation de la viscosité du sol. Le point de gel est atteint lorsque des macromolécules se forment et se touchent entre elles, ce qui donne un aspect solide au gel.
Le temps nécessaire au « sol » pour se transformer en « gel » est appelé temps de gélification.
Lorsque le gel vieillit, des réactions de condensation se produisent encore à l'intérieur de celui-ci. Elles conduisent à une contraction macroscopique du gel et à un rétrécissement de ses porosités. Celui-ci, nommé synérèse du gel, conduit alors à une expulsion du solvant.

2.2.3. Le séchage

Une fois sa synérèse achevée, le gel peut être séché. L'eau ainsi que les solvants organiques sont évaporés. Pour effectuer rapidement cette opération, le gel peut être placé dans une étuve, à 130°C [20].

Il est intéressant de noter que la vitesse de séchage ainsi que les différentes conditions environnementales, comme le taux de vapeurs saturantes des solvants utilisés, influencent grandement la stabilité mécanique des gels secs obtenus. Un séchage rapide impliquera un grand flux de matière passant au travers des pores déjà rétrécis par la synérèse, d'où une dégradation de ceux-ci impliquant de nombreuses fractures.

La présence d'eau est à minimiser car elle dégrade beaucoup plus la structure des pores du gel que des solvants comme le méthanol.
Le risque d'un séchage rapide à l'étuve est d'obtenir une poudre une fois le gel sec. A contrario, un séchage à l'air ambiant, lent, limitera la dégradation des porosités et donnera un monolithe dense connu sous le nom de xérogel.

Des conditions environnementales hypercritiques, où le solvant liquide est progressivement remplacé par un solvant plus facilement éliminable, donneront un aérogel, beaucoup plus poreux que le xérogel.

2.2.4. La thermolyse

En chauffant le gel [15] à des températures moyennes, entre 500 et 1000°C suivant les auteurs, il subit d'autres modifications qui conduisent à une stabilisation du gel en un verre. Avec l'augmentation de la température, la diffusion des ions est accrue et les derniers départs gazeux se produisent. La dilatation du matériau augmente, elle aussi, avec la température. Si des fissurations microscopiques existent, elles vont alors devenir macroscopiques lors du traitement thermique ce qui a souvent pour conséquence de fracturer l'échantillon en fragments millimétriques.

Lorsque qu'un échantillon est soumis à une Analyse Thermodynamique Différentielle (ATD), une stabilisation du réseau amorphe est observable par une baisse de l'enthalpie à une température dite de transition vitreuse (Tg). Le verre stabilisé est ainsi obtenu.

Si cette température est dépassée, l'agitation thermique devenue trop importante finit par entraîner la destruction du réseau amorphe en libérant l'énergie de liaison. Ce phénomène est visible par un pic exothermique sur une analyse ATD, correspondant à la température de cristallisation (Tc) du composé. Lors du refroidissement, le caractère amorphe du matériau n'est plus conservé et un nouvel arrangement cristallisé des atomes peut être observé par diffraction des rayons X.

Le rétrécissement des porosités lors des étapes de séchage et de thermolyse peut être limité par des additifs (cf. page 29).

2.3. Formateurs de réseau vitreux sol-gel

2.3.1. Le silicium

De nombreux auteurs introduisent le silicium sous forme de TétraEthylOrthoSilicate (TEOS) [21-22]. Moins fréquemment, le TétraMéthylOrthoSilicate ou TMOS [23] est utilisé comme précurseur.

L'utilisation de l'un ou l'autre de ces alcoolates comme source de silicium se base sur la nature du solvant utilisé (méthanol ou éthanol). Cependant, les conditions d'obtention des gels avec ces deux précurseurs ne sont pas similaires : les études menées par C.J. Brinker *et al.* [24] montrent que ces deux alcoolates influent de façon différente sur la cinétique de formation du gel.

En effet, une grande partie des réactions d'hydrolyse-condensation qui se déroulent lors d'une gélification sont de type substitution nucléophile du second ordre (SN2). La longueur des chaînes carbonées des substituants organiques des alcoolates va alors avoir une influence sur la réactivité, tout comme la configuration électronique de l'atome de silicium central. Ce dernier paramètre est régi par le pH du milieu réactionnel. L'influence des substituants du silicium sera étudiée au paragraphe 4.2.6. (cf. page 40)

Dans le domaine des verres bioactifs obtenus par voie sol-gel, M. Catauro *et al.* ont préparé un bioverre ternaire SiO_2 – CaO – Na_2O dopé à l'argent en utilisant du TMOS comme précurseur du silicium [25]. De même, les travaux de A. Martinez *et al.* montrent que l'utilisation du TEOS permet d'obtenir des verres [26] bioactifs par immersion dans du fluide physiologique simulé.

L'analyse des résultats conclut que l'utilisation de ces organométalliques permet d'obtenir avec succès des verres de compositions très variées. Cette relative liberté est appliquée avec intérêt dans le domaine des bioverres : il est possible d'obtenir des verres dans des domaines de compositions plus larges que ceux envisageables avec la méthode par fusion classique. En effet, lors de la trempe du verre, la cristallisation de composés non désirés peut apparaître [5].

La faculté intéressante des alcoolates métalliques est de pouvoir s'hydrolyser facilement en présence d'eau, par des réactions thermodynamiquement favorables. Le TEOS possède quatre groupements éthanolate substituant le silicium. Entre un et quatre de ces groupements peuvent donc être hydrolysés, en fonction de l'avancement de la réaction. Ces réactions conduisent donc à la formation de molécules de $Si(OH)_4$ plus ou moins substituées qui deviennent les

briques d'un gel de silice. La condensation de ces briques en un gel amorphe est également possible. Cependant, la cinétique de toutes ces réactions en l'absence de catalyseur est longue, atteignant plus de 1000 heures pour le TEOS [27].

La réaction d'hydrolyse spontanée du TEOS avec l'eau est représentée sur la figure I-I-13 :

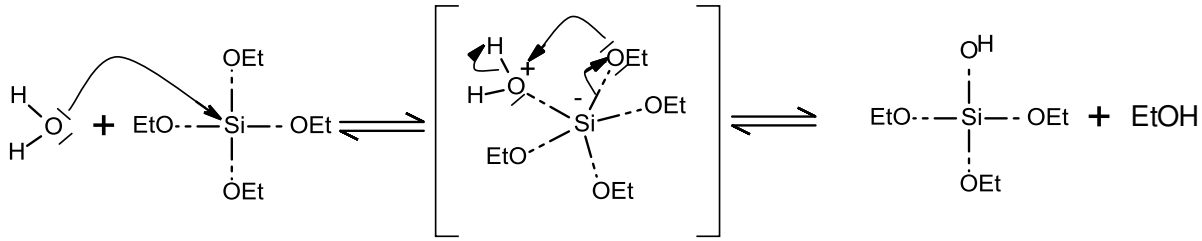


Figure I-I-13 : Auto-hydrolyse du TEOS.

La réaction peut être accélérée par l'usage d'un catalyseur. Il peut être de nature acide ou basique, ou bien être un ion ou une molécule influençant les réactions élémentaires de l'hydrolyse.

Les réactions de condensation, responsables de la densification progressive du gel, peuvent être de deux types :

- l'oxolation, dont le mécanisme est résumé sur la figure I-I-14, combine deux groupements hydrolysés de l'alcoolate pour former une molécule d'eau et une liaison Si-O-Si,
- l'alcoxolation combine quant à elle des groupements hydrolysés et non hydrolysés de l'alcoolate afin d'obtenir une molécule d'alcool et une liaison silane. Le mécanisme de cette réaction est résumé à la figure I-I-15.

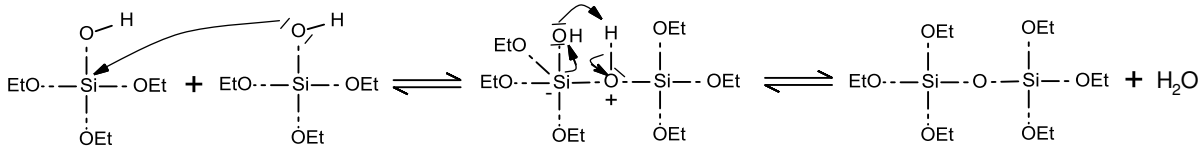


Figure I-I-14 : Réaction d'oxolation.

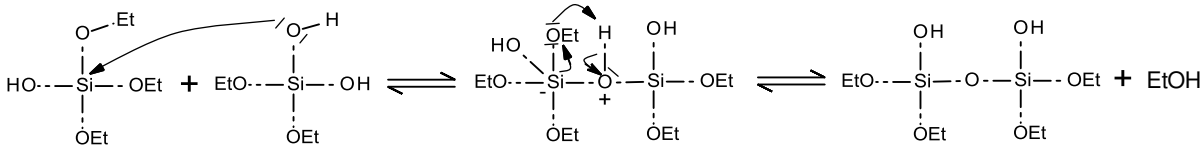


Figure I-I-15 : Réaction alcoxolation.

2.3.2. Le phosphore

En plus d'être un formateur de réseau vitreux, le phosphore est un élément fondamental pour l'activité biologique de l'implant et un composant majoritaire de l'os avec le calcium. L'oxyde de phosphore P_2O_5 est un élément formateur de réseau vitreux avec le silicium dans le cas de mélange de ces deux oxydes ou de dopage d'une composition.

La grande majorité des auteurs emploient couramment le TriEthylPhosphate (TEP) et plus rarement l'acide phosphorique [28]. M. Elisa *et al.* [29] ont notamment réalisé un verre de silice-phosphore par voie sol gel.

L'hydrolyse du TEP peut se produire en milieu acide ou basique, à l'aide des catalyseurs de mêmes noms. La littérature n'a pas renseigné d'autres catalyseurs originaux mais la chimie des organométalliques est complexe. Il est fort probable que tout bon nucléophile comme le fluor puisse catalyser la réaction à l'instar de l'ion OH^- avec le TEOS, dans le mécanisme présenté à la figure I-I-19 (cf. page 35).

La réaction d'auto-hydrolyse du TEP, est visible sur la figure I-I-16. Le phosphore étant entouré par trois groupements éthanolate, il est possible de l'hydrolyser entre une et trois fois suivant l'avancement des réactions.

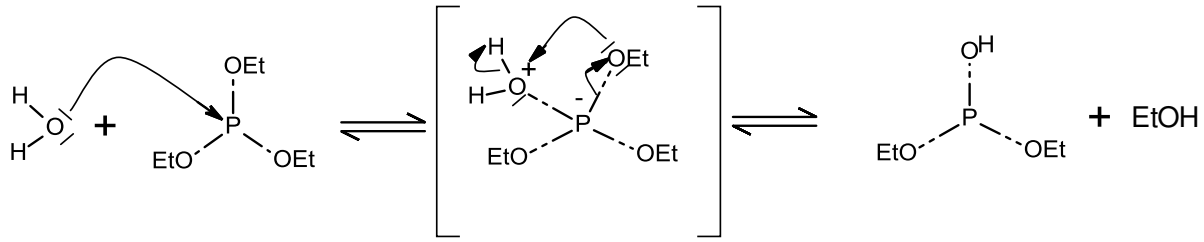


Figure I-I-16 : Auto-hydrolyse du TEP.

Pour conclure, l'utilisation du TEOS et du TEP comme précurseurs de la silice et du phosphore permet d'après les différents auteurs d'obtenir des bioverres par voie sol-gel. Il faudra cependant tester les différentes voies catalytiques afin de déterminer les paramètres de synthèse permettant d'introduire avec succès les modificateurs de réseaux dans une structure finale amorphe.

2.4. Modificateurs de réseau

2.4.1. Le sodium

Elément habituellement spectateur dans la classification, le sodium est aussi, comme l'ont montré I. Lebecq *et al.* [6], un élément indispensable à une bonne bioactivité des verres.

Avec la méthode traditionnelle de fusion et trempe des oxydes, le sodium intervient comme modificateur de réseau : son oxyde est Na_2O. Sa présence permet d'abaisser la température d'élaboration des verres, il joue le rôle de fondant. La silice permet d'obtenir un verre mais son point de fusion est très élevé (1730°C). En ajoutant des fondants comme le sodium, la température de synthèse est abaissée à 1400°C.
L'ajout d'un oxyde de sodium provoque également la rupture d'une liaison Si-O et l'apparition d'un oxygène non-pontant. Cela a pour conséquence de fragiliser le réseau et d'augmenter sa solubilité dans les milieux aqueux.

Dans le cadre d'une immersion dans le SBF de bioverres contenant du sodium [5], il est possible de remarquer plusieurs points montrant l'avantage de cet élément :

- le sodium permet une mise en solution plus rapide des verres. Ceux-ci forment alors un gel de silice plus rapidement,
- le gel devient favorable au dépôt de CaP amorphe qui subit ensuite une nucléation rapide pour devenir de l'HAC néoformée.

Dans un procédé sol-gel, le sodium peut être introduit par plusieurs catégories de précurseurs. Les précurseurs minéraux, tel que le nitrate de sodium ($NaNO_3$), ne permettent pas d'inclure le sodium de façon stable dans le cas de binaire $SiO_2 – Na_2O$ [30].

L'utilisation de ces mêmes réactifs dans le cadre de compositions plus complexes, comme des systèmes quaternaires, n'est pas favorable pour l'obtention d'un verre amorphe stable [31].
Une explication probable provient de l'environnement présent dans le sol. La nature labile du sodium dans les liaisons silanes l'emporte en présence de tout anion ayant une affinité chimique plus forte. C'est le cas pour les nitrates et les chlorures, par exemple.
Lors de la maturation et du séchage du gel, la diffusion du sodium ionique au travers des porosités du matériau favorise une rencontre avec les anions présents. L'évaporation du solvant entraîne une précipitation de sels de sodium, qui implique l'obtention d'une vitrocéramique.

Des précurseurs organiques, tel que l'acétate de sodium, peuvent être utilisés. Les résultats obtenus avec ces précurseurs organiques sont meilleurs que ceux obtenus avec leurs homologues minéraux, des molécules plus grandes et moins polarisées favoriseraient moins de mouvements ioniques dans le gel [32].

Les alcoolates de sodium, sous forme méthyl ou éthyl, sont aussi employés comme précurseurs. Leur utilisation est citée par R. Puyané *et al.* [33] dans le cadre de la formation d'un verre de composition molaire 87 SiO_2-13 Na_2O. Comme tous les alcoolates, ils peuvent être hydrolysés puis condensés avec d'autres alcoolates présents dans l'environnement chimique.

2.4.2. Le calcium

Le calcium est un élément essentiel des verres : il est employé depuis le moyen-âge comme stabilisateur de réseau. Son oxyde est CaO. Il introduit des oxygènes non pontants mais il est réticulant grâce à sa double charge positive, ce qui a pour conséquence une stabilisation du verre. Celui-ci sera alors plus résistant aux attaques chimiques comme, par exemple, une dissolution par l'eau.

Afin d'introduire cet élément dans une composition de bioverres sol-gel, divers précurseurs sont utilisés dans la littérature.

- Les sels minéraux :

Les carbonates et les nitrates de calcium sont couramment employés dans le cadre de synthèse sol-gel [34]. Les sels minéraux ont l'avantage d'être plus solubles que les autres précurseurs du calcium. Les nitrates sont couramment utilisés du fait de leur instabilité thermique : ils sont de ce fait facilement éliminés lors de la thermolyse [35].
Cependant, leur utilisation dans le cadre de compositions quaternaires provoque des problèmes de cristallisation avec le sodium notamment [36].

- Les sels organiques :

L'utilisation d'acétate de calcium par certains auteurs semble donner lieu à des verres [37]. Les alcoolates de calcium sont également utilisables lors de synthèses sol-gel [38]. Après une hydrolyse préalable, ils possèdent la capacité de s'intégrer dans le réseau du gel en condensant avec les formateurs.

Ainsi, l'utilisation de précurseurs minéraux ne permet pas d'insérer de façon stable les éléments modificateurs dans le cadre d'une synthèse sol-gel dans un système quaternaire SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5. L'obtention des bioverres parfaitement amorphes semble, au contraire, possible avec l'utilisation de précurseurs organiques, cependant plus onéreux que leurs homologues minéraux.

2.5. Dopants

Il est possible d'intégrer d'autres éléments dans la composition du bioverre, dans le but de lui apporter une ou plusieurs fonctions supplémentaires. Avec de faibles proportions, par rapport au formateur et modificateur de réseau dans la composition globale, ces éléments seront qualifiés de dopants.
Il est possible d'apporter des fonctions antibactériennes avec des éléments comme l'argent, le magnésium ou le zinc [39-41]. Lors de la synthèse sol-gel, les éléments dopants peuvent être apportés par des précurseurs minéraux (nitrates, carbonates, …) ou également par des précurseurs organiques (acétates).

3. Additifs

La réactivité chimique et les propriétés mécaniques des verres sol-gel peuvent être influencées par l'ajout dans le sol de divers additifs :

- les complexants des modificateurs qui vont déplacer la limite de solubilité dans le solvant d'un ou de plusieurs éléments comme le calcium par exemple,
- les plastifiants du réseau amorphe qui augmentent la flexibilité du réseau une fois le gel formé,
- les tensio-actifs qui réduisent la tension capillaire lors de la synérèse et minimisent alors le risque de fracturation de l'échantillon par effondrement.

3.1. Complexants

Les complexants permettent de créer des complexes qui vont modifier la solubilité d'un élément chimique dans le solvant.

Dans les sols, la dispersion ou la dissolution des précurseurs doit être la plus parfaite possible afin de conserver le caractère amorphe lors du séchage du gel.
De plus, il n'est pas possible d'augmenter indéfiniment le volume de solvant mis en œuvre pour la synthèse sol-gel. Il faut pouvoir conserver une densité élevée une fois le gel séché.

Les complexants permettent d'obtenir un verre plus dense et bien amorphe, en diminuant la quantité de solvant à mettre en œuvre pour que la dissolution des précurseurs soit effective. Un autre effet positif de l'ajout de complexants est l'augmentation des domaines de compositions réalisables. Par contre, les complexants peuvent être difficiles à éliminer lors du traitement thermique final. Il faut donc veiller à ce que les composés chimiques utilisés soient non toxiques.

Plusieurs familles chimiques de complexants sont utilisables en synthèse sol-gel. Il semble que les fonctions hydroxyles des polyols et en particulier le glycérol [42] présentent souvent une bonne affinité avec le solvant et forment des complexes avec les ions bivalents.

3.2. Plastifiants

Il s'agit en général de molécules organiques avec plusieurs doublets d'électrons non liants, double liaison ou toutes autres fonctions organiques pouvant condenser avec le réseau amorphe lors de la transition sol-gel.

Les polyols, comme par exemple le glycérol, donnent des résultats satisfaisants comme plastifiants [42-43]. La molécule de glycérol possède une chaîne à 3 carbones, chacun étant substitué par un groupement alcool. Les alcools ont la capacité de s'hydrolyser tout comme les formateurs de réseau sol-gel (TEOS, …) et de se condenser avec le réseau amorphe.

Le résultat de cette intégration est l'apparition, dans le gel, de liaisons entre le silicium et le carbone. Les liaisons carbonées sont plus souples que les liaisons du silicium, c'est ce qui provoque l'effet plastifiant. Cet effet est limité en température avec des molécules organiques : lors de la thermolyse finale, celles-ci sont détruites par l'oxygène à basse température (à partir de 100°C). Le départ du carbone détruit l'effet plastifiant et fragilise fortement le verre. L'échantillon perd alors de sa solidité et son aspect initial, par destruction des liaisons silicium-carbone.

En modulant la quantité de plastifiant employée lors de la synthèse, il est possible d'utiliser ce désagrément comme générateur de porosité dans le verre [44].

3.3. Tensioactifs

Les gels soumis au séchage et au vieillissement présentent de nombreuses fissurations, dues au mécanisme de synérèse. Celles-ci vont inéluctablement grandir et se propager dans le matériau vieillissant, ne permettant pas d'obtenir des échantillons massifs stabilisés de grande dimension.
Les tensioactifs possèdent la propriété de diminuer efficacement les forces capillaires responsables des effondrements pore à pore du gel lors du séchage [45]. Tout comme les autres additifs, ils peuvent être difficiles à éliminer lors de la thermolyse.

4. Cinétique de formations des gels

4.1. Catalyses

Les catalyseurs communément rencontrés en synthèse sol-gel sont des acides forts, des bases fortes ou encore le cas particulier de l'acide acétique.
Le tableau I-I-2 donne les temps de gélification du TEOS en fonction du catalyseur [46].

Catalyseur	Mole d'acide ou de base par mole de TEOS	pH initial	Temps de gélification (heures)
HF	0,05	1,90	12
HCl	0,05	<0,05	92
HNO_3	0,05	<0,05	100
H_2SO_4	0,05	<0,05	106
CH_3COOH	0,05	3,70	72
NH_4OH	0,05	9,95	107
Sans catalyseur	-	5,00	1000

Tableau I-I-2 : Temps de gélification du TEOS en fonction du catalyseur.

On peut distinguer différents domaines de temps de gélification. L'acide fluorhydrique (HF) permet d'obtenir le gel le plus rapidement (12 heures). Ensuite, vient l'acide acétique avec 72 heures. Enfin, il y a les autres acides forts (92 - 106 heures) et une base (l'ammoniaque, NH_4OH) avec 107 heures pour obtenir le gel.
Pour expliquer ces observations, chaque type de catalyseur est détaillé dans les paragraphes suivants.

4.1.1. Acides Forts

L'usage d'acides forts comme agents d'hydrolyse de l'alcoolate de silicium est régulièrement cité [47]. Ce sont les protons qui activent la réaction.

L'hydrolyse du TEOS en milieu acide se déroule suivant le mécanisme visible à la figure I-I-17. La mauvaise stabilité de l'intermédiaire réactionnel positif formé implique que la matière première n'est jamais totalement hydrolysée.

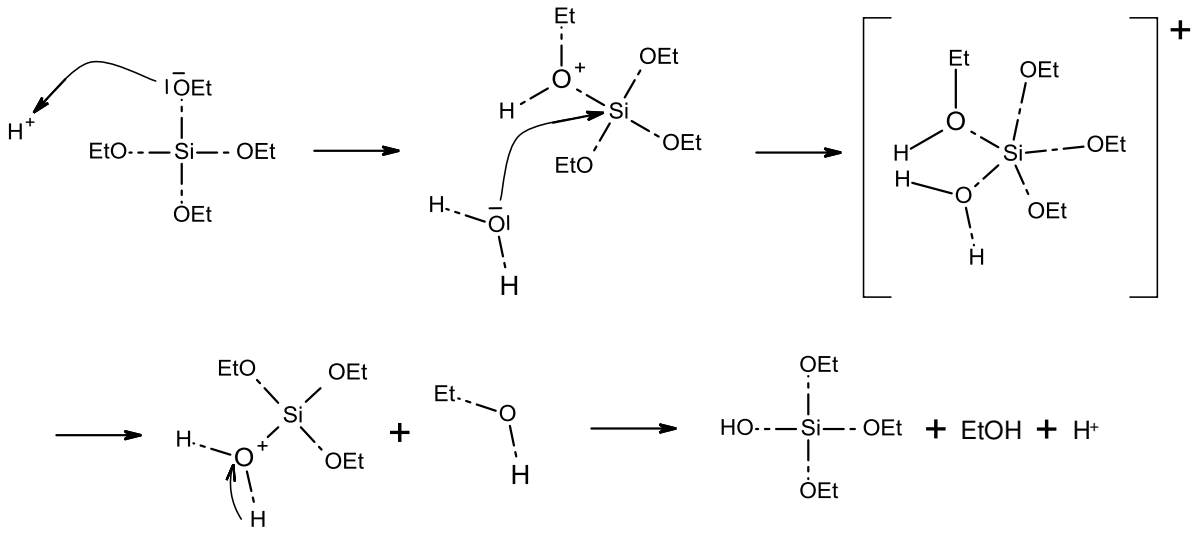


Figure I-I-17 : Mécanisme de catalyse acide du TEOS.

Le taux d'hydrolyse partiel du précurseur a une conséquence sur la structure des agrégats se condensant dans le sol : les molécules du TEOS s'alignent sur une structure linéaire, proche de ce que l'on peut observer pour une polymérisation classique en chimie organique [48].
Les chaînes grandissent dans le sol avec le temps et deviennent de plus en plus longues. Le point de gel est atteint lorsque les chaînes finissent par s'enchevêtrer les unes dans les autres : le réseau vitreux se forme et se densifie.

M. Laczka *et al.* [49] ont utilisé l'acide chlorhydrique (HCl) afin de catalyser la formation d'un gel quaternaire. La composition est, dans un premier temps, un ternaire 35 % SiO_2 – 54 % CaO – 6 % P_2O_5 (% molaire). Cinq compositions quaternaires sont créées par l'addition de 5% de bore, de magnésium, de sodium, d'aluminium ou de fluor respectivement.
Leurs travaux permettent de mettre en lumière l'influence de cet acide sur la cinétique de formation d'un gel avec le TEOS. La pluralité des compositions mises en œuvre vérifie l'influence de l'acide avec plusieurs précurseurs modificateurs. L'effet catalyseur est vérifié pour les cinq compositions.
Cependant, les résultats de la diffraction X montrent l'obtention de céramiques pour les cinq échantillons préparés. Ainsi, la catalyse par HCl ne permet peut-être pas d'obtenir des verres avec des compositions quaternaires pauvres en silice.

L'acide nitrique (HNO_3) est aussi communément employé comme agent d'hydrolyse.

M. Mami *et al.* [50] l'ont utilisé avec le TEOS en vue de former un ternaire de composition molaire 60 % SiO_2 – 35 % CaO – 5 % P_2O_5.
L'interprétation des résultats indique que l'utilisation de cet acide comme catalyseur ne permet d'obtenir, dans ce cas précis, qu'un composé de morphologie finale de type vitrocéramique, au lieu du verre attendu. L'acide nitrique (HNO_3) ne semble pas être le catalyseur idéal pour la synthèse des verres ternaires même avec 60 % molaires de silice.

HF est un cas particulier, c'est un acide assez fort (pk_a=3,17) mais il est capable de réaliser la catalyse également par le fluorure (cf. page 36).

4.1.2. Catalyse par l'acide acétique

L'addition d'acide acétique dans le sol raccourcit le temps de gélification du TEOS. La cinétique de gélification devient rapide, de même ordre que celle observée avec les acides forts (voir tableau I-I-2). Une autre réaction intervient entre l'acide acétique et le TEOS. En effet, la quantité de protons libérés dans le milieu est moindre qu'avec un acide fort. C'est la fonction hydroxyle qui intervient dans le mécanisme et augmente la vitesse de réaction.
Le mécanisme de la réaction est visible sur la figure I-I-18. La réaction de l'acide acétique avec le TEOS conduit à la formation d'un ester de silyle. Cet intermédiaire a la capacité de réagir facilement avec une fonction alcool pour finalement obtenir un silanol (Si-OH). Les protons, H^+, ne jouent pas de rôle dans ces mécanismes, rendant la catalyse par l'acide acétique indépendante du pH [46].

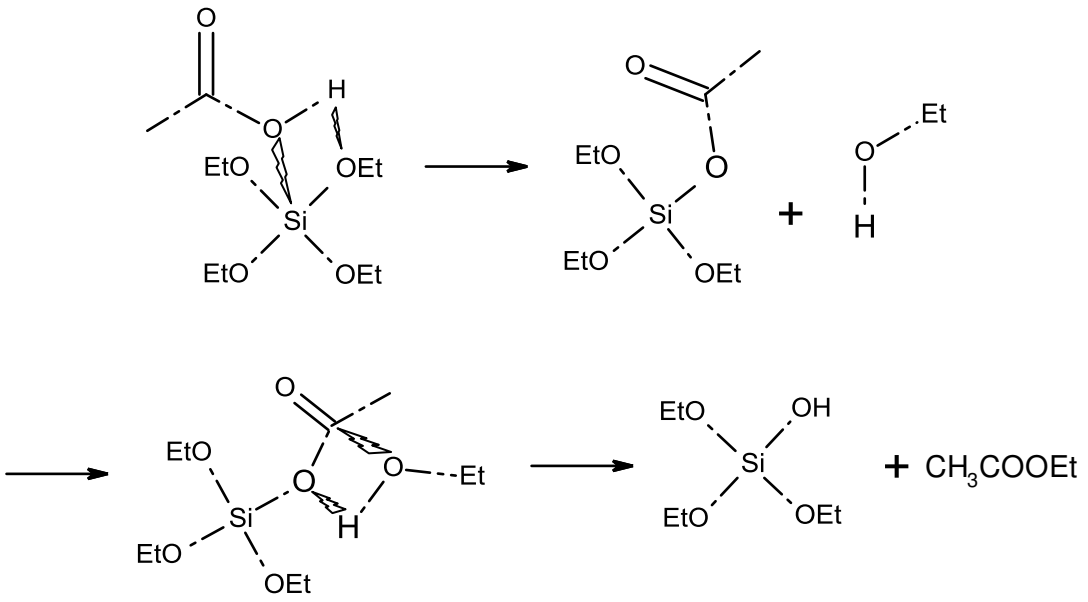


Figure I-I-18 : Mécanisme d'hydrolyse par l'acide acétique.

4.1.3. Catalyse basique

La catalyse par les acides forts ne permet pas toujours d'obtenir un verre dans le cas de composition supérieure au ternaire. La catalyse basique constitue une alternative.
Les réactions attendues avec le TEOS sont présentées sur la figure I-I-19 :

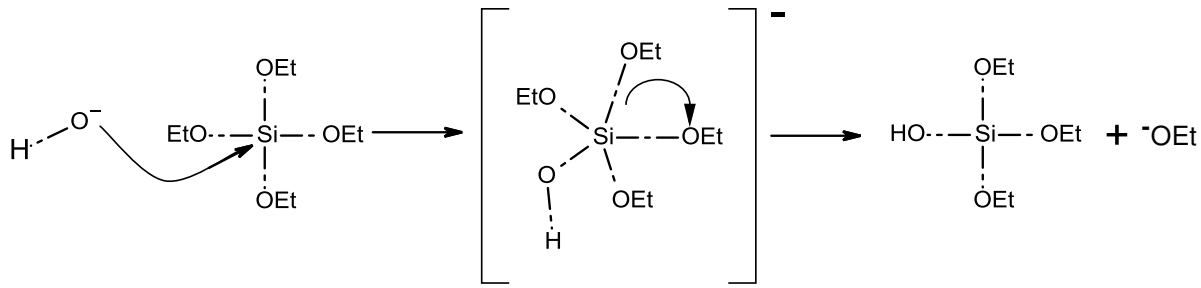


Figure I-I-19 : Mécanisme de catalyse basique du TEOS.

L'analyse du mécanisme permet de remarquer que :

- l'ion hydroxyle agit comme nucléophile. Etant plus réactif que l'eau, la formation de l'intermédiaire est assurée et l'hydrolyse est accélérée,
- l'intermédiaire réactionnel est négatif, ce qui accroît sa stabilité.

Cependant, cette voie de synthèse est depuis longtemps considérée comme difficile à contrôler [51].

En effet, la réaction d'hydrolyse étant massive et rapide, les réactions de condensation seront elles aussi dotées d'une cinétique importante. Le taux de substitution de l'atome de silicium central dans la molécule de TEOS atteint sa valeur maximale de quatre. Les réactions de condensation se produisent alors dans les trois directions de l'espace, ce qui conduit à la formation de sphère de silice macroscopique. La viscosité du gel augmente de façon importante et le point de gel est vite atteint, par contact des sphères les unes avec les autres [52].

Les bases ou nucléophiles utilisés peuvent être variées [46] :

- NH_4OH qui permet un temps de gélification de 107h avec le TEOS (cf. tableau I-I-2 page 32). Les autres bases ammoniaquées sont également adaptées,
- les sels d'halogénures (KBr, ...)
- les bases fortes traditionnelles sont également utilisables : NaOH, $Ca(OH)_2$, …

Le pH est régulé à l'aide d'un acide faible et ainsi ralentit significativement les réactions de condensation. Divers acides tels que l'acide acétique, l'acide phosphorique peuvent être utilisés expérimentalement, rendant intéressante l'exploration de la voie basique [53].

4.1.4. Catalyse par les fluorures

L'acte catalytique du fluor repose sur le même mécanisme que celui des bases, à la seule différence que l'ion F^- remplace OH^- en tant que nucléophile. Cela permet, en outre, à la réaction d'hydrolyse d'être indépendante du pH.

L'acide fluorhydrique est souvent utilisé comme précurseur du fluor. Il permet une gélification rapide (12 heures, cf. tableau I-I-2 page 32). On note également l'emploi d'halogénure de potassium KF mais aussi NaF et NH_4F.

L'ion fluorure est d'une taille similaire à l'ion hydroxyde et possède lui aussi la capacité d'augmenter la coordination du silicium. Celle-ci est normalement de quatre, mais la réaction avec l'ion forme un intermédiaire réactionnel penta-coordonné [54].

Par contre, le fluor présente une certaine toxicité qui peut rendre délicat son usage vis-à-vis d'une industrialisation. Cependant, un léger dopage des bioverres par du fluor permet à la

structure préparée d'acquérir des propriétés antibactériennes [55] idéalement acquises sans nuire à l'activité biologique voulue du bioverre.

De par leur caractère nucléophile et leur électronégativité, les fluorures sont les catalyseurs les plus efficaces vis-à-vis de la gélification.

4.2. Autres paramètres cinétiques

Hormis le choix du catalyseur, d'autres paramètres peuvent influencer les vitesses des réactions d'hydrolyse et de condensation. Ces paramètres sont :

- le pH (nature du catalyseur),
- l'apport d'eau,
- la température,
- la concentration en ions et alcoolates dans le milieu,
- le solvant.

4.2.1. Le pH

La Figure I-I-20 montre l'évolution de la vitesse des réactions d'hydrolyse et de condensation pour le TEOS en fonction du pH du sol.

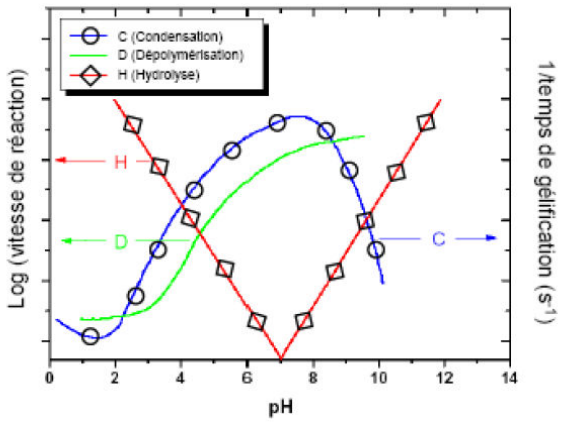


Figure I-I-20 : Evolution des vitesses de réaction en fonction du pH.

L'analyse de cette figure montre que la vitesse d'hydrolyse est maximale pour des pH très acides ou très basiques, mais faible à pH neutre. Inversement, les réactions de condensation ne

sont à vitesse maximale que lorsque le pH est neutre. Il est donc possible de faire varier la cinétique de formation d'un gel en modifiant le ph du sol.

4.2.2. L'apport d'eau

L'apport d'eau dans le solvant organique influence également la cinétique et la structure finale des gels obtenus. Suivant le caractère acide ou basique du milieu, l'eau joue différents rôles [56] :

- sous condition acide, la concentration en eau influence les mécanismes des réactions d'hydrolyse au premier ordre.
- en milieu basique, l'eau n'intervient pas dans les mécanismes, la vitesse de réaction est d'ordre zéro, donc indépendante par rapport à la concentration en H_2O dans le milieu.

4.2.3. La nature du solvant

I. Artaki *et al.* [57] ont étudié la cinétique des réactions de condensation des formateurs de réseaux sol-gel. Omettant volontairement l'addition de catalyseur dans le milieu, ils ont utilisé trois types de solvants afin d'étudier l'influence du milieu sur les réactions en présence.
Ils ont comparé :

- les solvants protiques et polaires (méthanol, formamide),
- les solvants aprotiques et polaires (diméthylformamide, acétonitrile),
- les solvants aprotiques et apolaires (dioxane).

En catalyse acide, les solvants les plus favorables à la formation des intermédiaires sont les solvants polaires et protiques. En effet, ils forment avec les intermédiaires réactionnels des liaisons hydrogènes, ce qui les stabilise.
Malheureusement, en catalyse basique, ils protonent les nucléophiles ce qui inhibe leur réactivité. Les solvants adaptés qui stabiliseraient l'état de transition chargé du silicium et qui seraient favorables à la dissolution des réactifs, seraient alors les solvants aprotiques polaires.
Les plus mauvais solvants sont les aprotiques apolaires : les catalyseurs et précurseurs y sont mal dissous.

I. Artaki *et al.* [57] ont également montré que la structure des réseaux créés était différente selon le solvant. Les solvants polaires impliquent un enchaînement des liaisons Si-O-Si sous

forme linéaire alors que les solvants apolaires favorisent la formation d'amas sphériques. Les porosités varient après le séchage.

4.2.4. La température

La température exerce également une influence sur les réactions d'hydrolyse et de condensation. Une augmentation de température augmente les vitesses de ces réactions à toutes les étapes de la gélification, de la préparation du sol jusqu'au séchage. Il est donc possible de ralentir ou d'accélérer la formation du gel en agissant sur un paramètre physique (la température), et de ne pas utiliser d'artifices chimiques ralentissant ou accélérant la prise du gel.

4.2.5. La concentration dans le solvant

La concentration en formateur de réseau dans le solvant est un paramètre important pour la cinétique mais aussi pour la morphologie finale du verre obtenu [58]. En effet :

- si la concentration dans le solvant est faible, le temps de gélification devient long. Un effondrement mécanique du gel en forme de poudre peut être observé lors du séchage du fait de la faible densité atteinte,
- si la concentration est importante, le risque est de ne pas dissoudre ou de ne pas disperser correctement les constituants du sol par une prise du gel rapide. Ceci peut entraîner la formation de composés cristallisés lors du séchage.

La concentration en alcoolate influence l'étape de condensation du sol. Ce phénomène est facilement expliqué : plus la concentration en alcoolate diminue, plus les molécules sont éloignées et auront une plus faible probabilité de se rencontrer pour réagir ensemble. De ce fait, plus la concentration est faible et plus la formation du gel est retardée.
La diminution de la concentration en alcoolate de silicium dans le sol aura pour conséquence d'augmenter la porosité du gel et de diminuer sa densité lors du séchage.
Afin de réaliser un dépôt suffisamment dense, il convient donc de se placer à la limite de solubilité des différents précurseurs utilisés.

Le cas des agents modificateurs est plus complexe. Généralement introduits sous forme de poudre dans le solvant, ils introduisent des ions qui vont pouvoir rendre le réseau plus dense.

Le cas des ions mono et bivalents est différent :

- les ions bivalents ont la possibilité de réticuler la structure pour former le verre, en diminuant le temps de gélification. En effet, ils organisent les réactions de condensation autour d'eux grâce à leur électronégativité. Ils multiplient ainsi les points de départs des réactions de condensation.
- les ions monovalents comme le sodium multiplient également les points de germination des condensats, mais contrairement aux ions bivalents, ils ne peuvent pas relier physiquement deux amas entre eux du fait de leur unique charge. Une concentration trop élevée en sodium, par exemple, pourra former rapidement des amas qui resteront de taille réduite et ne formant pas un gel.

4.2.6. Influence des substituants de l'alcoolate

L'étape de formation du gel repose sur des réactions d'hydrolyse et de condensation. Cependant, pour amorcer favorablement la formation des intermédiaires réactionnels, il faut que l'atome central de l'alcoolate soit accessible. Cette accessibilité dépendra donc de la densité du nuage électronique du silicium mais aussi de l'encombrement stérique autour de ce même atome central.

Les substituants du silicium vont influencer ces deux paramètres [59]. Les groupements substituants vont plus ou moins encombrer l'atome central suivant leur taille, ce qui modifie l'encombrement stérique.

Leur caractère donneur (nucléophile) ou attracteur (électrophile) d'électrons va enrichir ou appauvrir le nuage électronique de l'atome central, ce qui modifie la densité du nuage électronique.

Les intermédiaires réactionnels n'ayant pas la même charge suivant les conditions de pH, les effets cinétiques seront donc différents :

- en milieu acide, l'activation se produit sur l'atome d'oxygène d'un des quatre groupements alcoolates qui sont de bons électrophiles. La basicité de l'oxygène et donc sa réactivité vis-à-vis des protons acides, est fortement liée à la disponibilité d'électrons sur le silicium. Tout autre substituant voisin de l'alcoolate qui va posséder un effet donneur d'électrons, va augmenter la densité électronique du silicium et ainsi augmenter la réactivité de l'oxygène du groupement alcoolate,

- la réaction d'hydrolyse, en milieu basique, est activée par l'attaque d'un nucléophile (OH^-, F^-) sur le silicium. Il est facile d'imaginer que plus les substituants exerceront un effet attracteur d'électrons important, plus le déficit en électrons sur silicium central sera fort. Ce phénomène facilitera la réactivité vis-à-vis des nucléophiles.

En résumé, les substituants du silicium qui possèdent un caractère inductif donneur d'électrons accéléreront la réaction d'hydrolyse en milieu acide. Les substituants qui se dotent d'un caractère inductif attracteur d'électrons augmenteront la cinétique de la réaction en milieu basique.

Spécifiquement, le TEOS est totalement substitué par des groupements alcoolates possédant un pouvoir inductif attracteur d'électrons. Le déficit en électrons sur le silicium central est alors important, le TEOS atteint ainsi très rapidement le point de gel en milieu basique.
La vitesse de réaction du TEOS en milieu acide est plus faible du fait de l'absence de groupements donneurs d'électrons. Dans ces conditions, la vitesse des réactions d'hydrolyse est plus faible que la vitesse des réactions de condensation.

La réactivité du TMOS suit le même raisonnement. Substitué par des groupements méthanolates, le silicium est un peu plus électronégatif qu'avec les groupements éthanolates du TEOS, du fait d'un effet attracteur de l'oxygène un peu plus faible. La cinétique de gélification en milieu acide est donc plus rapide pour le TMOS que pour le TEOS. En milieu basique, le raisonnement inverse est à tenir : l'oxygène étant moins attracteur, la réactivité de l'atome de silicium central sera affaiblie.

Il est possible de modifier la réactivé du TEOS ou du TMOS par substitution d'un ou plusieurs groupements alcoolates [60] (fonctions insaturées, fonctions acryliques, fonctions époxydes, fonctions amines…).

Cette étude bibliographique permet d'éclaircir plusieurs points essentiels à la mise en place de synthèses de verres bioactifs sol-gel. Ces manipulations sont décrites dans la deuxième partie de ce chapitre.

La bioactivité est définie comme étant l'apparition à la surface d'un verre d'une couche d'HAC lorsque celui-ci est immergé *in vitro* ou *in vivo*. Il est alors possible de caractériser cette couche en mesurant son temps d'apparition et son épaisseur. Deux compositions de bioverres intéressantes dans le système SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5 sont établies :

- la composition 45S5® de L.L. Hench, qui est la référence des verres bioactifs,
- le 47Q de C.Duée *et al.* qui permet d'obtenir la couche d'HAC plus rapidement que le 45S5 (environ trois heures contre huit heures). La couche est aussi plus épaisse (30 µm).

Les éléments formateurs des verres, le silicium et le phosphore, doivent être insérés avec des molécules qui ont la capacité de se condenser en voie liquide pour former un matériau amorphe. Cela est possible avec les alcoolates de silicium et de phosphore. Le choix a été fait d'utiliser le TEOS (TétraEthylOrthoSilicate) comme précurseur du silicium et le TEP (TriEthylPhosphate) pour introduire le phosphore.

Les modificateurs, le sodium et le calcium, peuvent être amenés dans les compositions sol-gel par l'intermédiaire de plusieurs catégories de précurseurs :

- les précurseurs minéraux, tels que les nitrates ou les chlorures.
- les précurseurs alcoolates, comme le diméthanolate de calcium ou l'éthanolate de sodium
- les autres précuseurs organiques, qui peuvent être par exemple des acétates de calcium et de sodium.

Les compositions 45S5 et 47Q sont inversées, c'est-à-dire qu'elles contiennent plus d'éléments modificateurs que de formateurs. Il faut donc être attentif au choix des précurseurs, car ces verres présentent un risque de cristallisation important. Pour diminuer ce risque, il est possible d'introduire des molécules qui forment des complexes avec le calcium par exemple. C'est le cas du glycérol, qui a été également utilisé.

Bibliographie

[1] : L.L. Hench, B. Raton, A. Arbor, **Bioactive glasses and glass-ceramics : a perspective**, Handbook of bioactive ceramics, ed. CRC Press, Boston, vol. 1, p. 7-23, 1990.

[2] : M. Ogino, F. Ohuchi and L.L. Hench, **Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass**, J. Biomed. Mater. Res., vol. 14, p. 55-64, 1980.

[3] : Y. Ebisawa, T. Kokubo, C. Oakka and T. Yamamuro, **Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramics with a simulated body fluid**, J. Mater. Sci. : Materials in Medicine, vol. 3, p. 79-83, 1992.

[4] : O.H. Andersson, K.H. Karlsson, K. Kangasniemi and A. Yli-Urpo, **Models for physical properties and bioactivity of phosphate opal glasses**, Glastechnische berichte, vol. 61, issue 10, p.300-305, 1998.

[5] : I. Lebecq, **Etude de bioverres à base de SiO_2, CaO, Na_2O non dopés et dopés par le phosphore**, Thèse de l'Université de Valenciennes, 2002.

[6] : I. Lebecq, F. Désanglois, A. Leriche and C. Follet-Houttemane, **Compositional dependance on the *in vitro* bioactivity of invert or conventional bioglasses in the Si-Ca-Na-P system**, J. Biomed. Mater. Res. part A, vol. 83A, issue 1, p. 156-168, 2007

[7] : C. Duée, **Elaboration de nouvelles compositions de bioverres destinés à la chirurgie réparatrice**, Thèse de l'Université de Valenciennes, 2007.

[8] : C. Duée, F. Désanglois, I. Lebecq, G. Moreau, A. Leriche, C. Follet-Houttemane, **Mixture designs applied to glass bioactivity evaluation in the Si–Ca–Na system**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 355, issues 16-17, p. 943-950, 2009.

[9] : C. Duée, F. Désanglois, I. Lebecq, C. Follet-Houttemane, **Predicting glass transition and crystallization temperatures of silicate bioglasses using mixture designs**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 358, issue 8, p. 1083-1090, 2012.

[10] : A. Pardini, **Elaboration et analyses structurales de verres bioactifs macroporeux**, Thèse de l'Université de Valenciennes, 2007.

[11] : O. Richart, S. Szarzynski, P. Hardouin, M. Descamps, A. Gallur-Greme, **Method for preparing synthetic bone substitutes with controlled porosity,** United States Patent, US 6,316,091 B1, 2001.

[12] : E. Wers, **Élaboration d'un biomatériau poreux à base d'une matrice vitreuse induisant le phénomène d'ostéoinduction**, Thèse de l'Université de Rennes 1, 2014.

[13] : M. Ebelmen, **Sur les éthers siliciques**, Compt. Rendus Acad. Sci., vol. 19, p. 398-400, 1844.

[14] : M. Ebelmen, **Chimie sur une production artificielle de silice diaphane**, Compt. Rendus Acad. Sci., vol. 21, p. 502-505, 1845.

[15] : P. Audebert, F. Miomandre, **Procédé sol-gel de polymérisation**, ed. Technique de l'ingénieur, référence J S 820, 2005.

[16] : J. Livage, **Bioactivity in sol-gel glasses**, Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série II, Mécanique, physique, chimie, astronomie A., vol. 322, issue 5, p. 417-427, 1996.

[17] : D. Avnir, T. Coradin, O. Lev, J. Livage, **Recent bio-applications of sol–gel materials**, J. Mater. Chem, vol. 16, p. 1013-1030, 2006.

[18] : J. Zhong, D.C. Greenspan, **Processing and properties of Sol-gel Bioactive Glasses**, J. Biomed. Mater. Res., vol. 53, p. 694-701, 2000.

[19] : J. Liu, X. Miao, **Sol–gel derived bioglass as a coating material for porous alumina scaffolds**, Ceram. Int., vol. 30, p. 1781-1785, 2004.

[20] : A. Balamurugan, G. Balossier, D. Laurent-Maquin, S.Pina, A.H.S. Rebelo, J. Faure, J.M.F. Ferreira, **An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system**, Dent. Mater., vol. 24, p. 1343-1351, 2008.

[21] : H. Ghomi, M.H. Fathi, H. Edris, **Effect of the composition of hydroxyapatite/bioactive glass nanocomposite foams on their bioactivity and mechanical properties**, Mater. Res. Bull., vol. 47, p. 3523-3532, 2012.

[22] : G.S. Lázaro, S.C. Santos, C.X. 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**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 386, p. 19-28, 2014.

[23] : A. Yasumori, S. Inoue, M. Yamane, **Preparation of Na_2O-SiO_2 glasses in the metastable immiscibility region**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 82, p. 177-182, 1986.

[24] : C. J. Brinker, **Hydrolysis & Condensation of Silicates : Effects on structure**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 100, p. 31-50, 1988.

[25] : M. Catauro, M.G. Raucci, F. De Gaetano, A. Marotta, **Antibacterial and bioactive silver-containing Na_2O-CaO-$2SiO_2$ glass prepared by sol-gel method**, J. mater. Sci., vol. 15, p. 831-837, 2004.

[26] : A. Martinez, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regi, **Bioactivity of a CaO-SiO_2 binary glasses system**, Chem. Mater., vol. 12, p. 3080-3088, 2000.

[27] : C.J. Brinker, G.W. Sherrer, **Sol-Gel Science, the Physic and Chemistry Sol-Gel Processing**, Academic Press, San Diego, 1989.

[28] : C. Fernandez-Lorenzo, L. Esquivias, P. Bardoux, J. Maquet, F. Taulelle, **Sol-Gel synthesis of SiO_2-P_2O_5 glasses**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 176, p. 189-199, 1994.

[29] : M. Elisa, B.A. Sava, A. Volceanov, R.C.C. Monteiro, E. Alves, N. Franco, F.A. Costa Oliveira, H. Fernandes, M.C. Ferro, **Structural and thermal characterization of SiO_2-P_2O_5 sol-gel powders upon annealing at high temperature**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 356, p. 495-501, 2010.

[30] : Q.Z. Chen, G.A. Thouas, **Fabrication and characterization of sol-gel derived 45S5 Bioglass®-ceramic scaffolds**. Acta Biomaterialia, vol. 7, p. 3616-3626, 2011.

[31] : J. Phalippou, M. Prassas, J. Zarzycki, **Crystallization of gels and glasses made from hot-pressed gels**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 48, p. 17-30, 1982.

[32] : A. Yasumori, S. Inoue, M. Yamane, **Preparation of Na_2O-SiO_2 glasses in the metastable immiscibility region**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 82, p. 177-182, 1986.

[33] : R. Puyané, P.F. James, H. Rawson, **Preparation of Silica and Soda-silica glasses by the sol-gel process**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 41, p. 105-115, 1980.

[34] : J.R. Jones, L.M. Ehrenfried, L.L. Hench, **Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering**, Biomaterials, vol. 27, p. 964-973, 2006.

[35] : P. Saravanapavan, J.R. Jones, S. Verrier, R.Beilby, V.J. Shirtliff, L.L. Hench, J.Polak, **Binary CaO-SiO_2 gel-glasses for biomedical applications**, Bio-Med. Mater. Eng., vol. 14, p. 467-486, 2004.

[36] : C. Zhu, J. Phalippou, J. Zarzycki, **Influence of trace alkali ions on the crystallization behaviour silica gels**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 82, p. 321-328, 1986.

[37] : G. Carturan, M. Guglielmi, **Precursors for sol-gel preparations**. J. Non-Cryst. Solids, vol. 100, p. 16-30, 1988.

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

[39] : A. Balamurugan, G. Balossier, S. Kannan, J.M. Avito, H.S. Rebelo, J.M.F. Ferreira, **Development and in vitro characterization of sol–gel derived CaO–P_2O_5–SiO_2–ZnO bioglass,** Acta Biomaterialia, vol. 3, issue 2, p. 255-262, 2007.

[40] : A. Saboori, M. Rabiee, F. Moztarzadeh, M. Sheikhi, M. Tahriri, M. Karimi, **Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of sol-gel-derived SiO_2–CaO–P_2O_5–MgO bioglass**, Mater. Sci. Eng. : C, vol. 29, issue 1, p. 335-340, 2009.

[41] : A.M. El-Kady, A.F. Ali, R.A. Rizk, M.M. Ahmed, **Synthesis, characterization and microbiological response of silver doped bioactive glass nanoparticles**, Ceram. Int., vol. 38, issue 1, p. 177-188, 2012.

[42] : M. Lavorgna, F. Piscitelli, P. Mangiacapra, G.G. Buonocore, **Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films**, Carbohyd. Polym., vol. 82, issue 2, p. 291-298, 2010.

[43] : A. Inaba, O. Andersson, **Multiple glass transitions and two step crystallization for the binary system of water and glycerol,** Thermochim. Acta, vol. 461, issues 1-2, p. 44-49, 2007.

[44] : M.D. González, P. Salagre, M. Linares, R. García, D. Serrano, Y. Cesteros**, Effect of hierarchical porosity and fluorination on the catalytic properties of zeolite beta for glycerol etherification,** Appl. Catal. A : General, vol. 473, p. 75-82, 2014.

[45] : M.S. Mastuli, N.S. Ansari, M.A. Nawawi, A.M. Mahat**, Effects of Cationic Surfactant in Sol-gel Synthesis of Nano Sized Magnesium Oxide**, APCBEE Procedia, vol. 3, p. 93-98, 2012.

[46] : E.J.A. Pope and J.D. Mackenzie; **Sol-Gel processing of silica II. The role of the catalyst**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 87, p. 185-198, 1986.

[47] : A. Balamurugan, G. Sockalingum, J. Michel, J. Fauré, V. Banchet, L. Wortham, S. Bouthors, D. Laurent-Maquin, G. Balossier, **Synthesis and characterization of sol gel derived bioactive glass for biomedical applications**, Mater. Lett., vol. 60, p. 3752-3757, 2006.

[48] : E.R. Pohl, F.D. Osterholtz, G. Kruna, H. Ishida, **Molecular Characterisation of Composites Interfaces**, ed. Plenum, New York, 1985.

[49] : M. Laczka, K. Cholewa-Kowalska, A. Laczka-Osyczka, M. Tworzydlo, B. Turyna, **Gel-derived materials of a CaO-P_2O_5-SiO_2 system modified by boron, sodium,**

magnesium, aluminium and fluorine compounds, J. Biomed. Mater. Res., vol. 52, p. 601-612, 2000.

[50] : M. Mami, A. Lucas-Girot, H. Oudadesse, R. Dorbez-Sridi, M. Mezahi, E. Dietrich, **Investigation of the surface reactivity of a sol-gel derived glass in the ternary system SiO_2-CaO-P_2O_5**, Appl. Surf. Sc., vol. 254, p. 7386-7393, 2008.

[51] : M. Prassas, J. Phalippou, L.L. Hench, **Preparation of 33 mol% Na_2O - 67mol% SiO_2 glass by gel-glass transformation**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 53, p. 183-193, 1982.

[52] : C.J. Brinker, G.W. Scherer, **Sol-Gel Science - The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing**, Academic Press, 1990.

[53] : C. Zhu, J. Phalippou, J. Zarzycki, **Influence of trace alkali ions on the crystallization behaviour silica gels**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 82, p. 321-328, 1986.

[54] : R. Winter, J.B. Chan, R. Frattini, J. Jonas, **The effect of fluoride on the sol-gel process** J. Non-Cryst. Solids, vol. 105, issue 3, p. 214-222, 1988.

[55] : D.S. Brauer, M.N. Anjum, M. Mneimne, R.M. Wilson, H. Doweidar, R.G. Hill, **Fluoride-containing bioactive glass-ceramics**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 358, p. 1438-1442, 2012.

[56] : R. Aelion, A. Loebel and F. Eirich; **Hydrolysis of ethyl silicate**, J. Am. Chem. Soc., vol. 72, p. 5705-5712, 1950.

[57] : I. Artaki, T. W. Zerda and J. Jonas; **Solvent effects on the condensation stage of the sol-gel process**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 81, p. 381-395, 1986.

[58] : K.C. Chen, T. Tsuchiya, J.D. Mackenzie, **Sol-gel processing of silica: I. The role of the starting compounds**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 81, issues 1-2, p. 227-237, 1986.

[59] : F.D. Osterholz, E.R. Pohl, K.L. Mittal**, Kinetics of the hydrolysis and condensation of organofunctional alkoxysilanes: a review, in Silanes and Other Coupling Agents**, Utrecht, p. 119-141, 1992.

[60] : S. Sakka and K. Kamiya; **The sol-gel transition in the hydrolysis of metal alkoxides in relation to the formation of glass fibers and films**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 48, p. 31-46, 1982.

2ème partie : Synthèses de verres sol-gel bioactifs dans les domaines $SiO_2 – CaO – P_2O_5$ et $SiO_2 – CaO – Na_2O – P_2O_5$

Cette partie présente les différents procédés de synthèses sol-gel mis au point durant cette étude. Dans un premier temps, des analyses de diffractions des rayons X sont réalisées sur chacun des matériaux obtenus pour déterminer s'il s'agit d'un verre ou d'une vitrocéramique.

Si un verre est obtenu, le procédé est validé et l'étude est poursuivie par des analyses thermiques et de spectroscopie Infra-Rouge. Des essais d'immersion dans le SBF sont également réalisés pour déterminer si les verres sol-gel peuvent être qualifiés de verres bioactifs.

Comme l'étude bibliographique l'a montré, il est possible d'insérer les précurseurs des modificateurs (calcium et sodium) sous trois formes :

- les précurseurs minéraux
- les alcoolates
- les précurseurs organiques

Il est également possible d'utiliser des complexant du calcium, comme le glycérol.

1. Essais de synthèses de verres sol-gel dans le système SiO_2-CaO-P_2O_5 et SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5 à l'aide de modificateurs minéraux

1.1. Considérations théoriques

Un verre réalisé dans le cadre de la thèse de C. Duée est particulièrement intéressant en matière de verre bioactif. Il est obtenu par fusion classique et forme une fois immergé dans le SBF (*in vitro)* une couche d'HAC d'environ 30 µm d'épaisseur à sa surface. Cette couche se forme en 2h30 [1].

La réactivité de ce bioverre est expliquée par la présence de deux paramètres importants. En effet, il est composé en pourcentage molaire, de 47% de SiO_2, 26,5% de CaO, 21,5% de Na_2O et 5% de P_2O_5. Il s'agit d'un verre inversé, c'est-à-dire un verre contenant qu'une part moins de 50% molaire en SiO_2 dans sa composition et d'autre part il contient du sodium. Il est donc facilement soluble dans les milieux aqueux. La présence du sodium favorise la formation du dépôt d'HAC à la surface du bioverre.

Des synthèses sol-gel de bioverres peuvent être réalisées à l'aide de précurseurs minéraux tels que des sels chlorés ou nitrés de calcium ou de sodium. Cependant, les compositions dans la littérature ne sont pas des verres inversés [2], ou bien elles ne comportent pas de sodium [3]. Les auteurs de ces études ne précisent pas s'il est possible d'étendre les compositions obtenues vers des verres inversés quaternaires du système SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5. Il s'agit donc de déterminer s'il est possible de préparer un verre inversé en utilisant des modificateurs de réseaux de nature minérale.

Il est nécessaire d'obtenir un verre et non une vitrocéramique afin de bénéficier de la bioactivité maximale [4]. En effet, la cristallisation d'un verre à haute température est observée par l'apparition d'un silicate cristallisé substitué par du calcium et du sodium, comme la Combéite High [5], par exemple. Ces composés stables ne sont pas réactifs et ne participent donc pas à la formation d'apatites à la surface du bioverre.

Pour obtenir un composé parfaitement amorphe par voie sol-gel, les poudres des précurseurs des sols doivent être parfaitement dissoutes dans le solvant, ou elles doivent se présenter sous forme de nanoparticules en suspension dans le sol [6]. Pour assurer une bonne dissolution, les auteurs discernent deux possibilités de synthèse : une voie utilisant un solvant constitué d'un alcool pur [7] ou bien une autre utilisant un mélange eau-alcool [8].

1.2. Compositions réalisées

La composition du bioverre de C. Duée [1] est reproduite par voie sol-gel. Cette composition de verre est notée 47Q, Q signifiant un système quaternaire. La composition de ce verre 47Q est 47% de SiO_2, 26,5% de CaO, 21,5% de Na_2O et 5% de P_2O_5 (pourcentages molaire).

Une composition ternaire molaire comprenant 47 % SiO_2 - 48 % CaO - 5 % P_2O_5 est également réalisée afin d'évaluer l'influence du sodium dans les gels. Il y a 48 % de CaO pour reprendre les (26,5 % + 21,5 %) de modificateurs de la composition quaternaire. En effet, le sodium est un élément facilement mobile et sa présence peut entraîner la formation de précipités pendant le séchage. La présence de ces éventuelles phases cristallisées dans les gels n'est pas souhaitable car l'étape de stabilisation à plus haute température conduira à la formation d'une vitrocéramique et non à celle d'un verre. Ce verre est noté 47T, 47 pour le pourcentage molaire en silice et T en référence au système ternaire.

Cette composition est difficile à réaliser avec la méthode par fusion classique car sa température de fusion est proche de celle de la silice pure, soit environ 1600°C. Cette valeur est supérieure à la température maximale atteignable pour les fours électriques du laboratoire. Le sodium est en effet un élément jouant le rôle de fondant, ce qui le rend indispensable à la réalisation de verre à des températures plus accessibles (1400°C).

La plupart des auteurs de travaux sur les bioverres sol-gel utilisent des sels minéraux de nitrates pour introduire le calcium [9] et le sodium [10] dans les sols. Il semble donc intéressant de réaliser les compositions 47T et 47Q avec ces précurseurs.

La catalyse des sols à base de nitrates de calcium est assurée par de l'acide nitrique [11]. Un autre catalyseur est régulièrement utilisé : l'acide chlorhydrique [12]. Pour introduire le même anion dans les sols, le chlorure de calcium remplace le nitrate pour la réalisation de ces sols.

Pour les deux compositions, deux types de précurseurs du calcium sont donc testés : du nitrate de calcium et du chlorure de calcium. Pour les compositions quaternaires 47Q, le sodium est apporté par du nitrate de sodium [2].
Les compositions sont renommées avec un suffixe qui indique le procédé par lequel elles ont été obtenues : -NO_3 pour les compositions à base de nitrate de calcium et d'acide nitrique et –Cl pour celles à base de $CaCl_2$ et d'acide chlorhydrique. Les précurseurs sont dissous soit dans un alcool pur, ce qui constitue la voie A, ou bien dans un mélange 50% eau 50% alcool noté voie B. Le tableau I-II-1 résume les compositions réalisées pour chaque voie.

<table>
<tr><th>Notation</th><th>Précurseur du calcium</th><th>Précurseur du sodium</th><th>Catalyseur</th></tr>
<tr><td>47Q-NO_3</td><td rowspan="2">Nitrate de Calcium</td><td>Nitrate de Sodium</td><td rowspan="2">HNO_3</td></tr>
<tr><td>47T-NO_3</td><td></td></tr>
<tr><td>47Q-Cl</td><td rowspan="2">Chlorure de Calcium</td><td>Nitrate de Sodium</td><td rowspan="2">HCl</td></tr>
<tr><td>47T-Cl</td><td></td></tr>
</table>

Tableau I-II-1 : Compositions réalisées par voies A (alcool) et B (50% eau – 50% alcool).

1.3. Produits de départ

L'origine et la pureté des précurseurs sont précisées dans le tableau I-II-2.

Les formateurs de réseau sol-gel employés sont le tétraéthylorthosilicate (TEOS) et le triéthylphosphate (TEP). Ces deux alcoolates ont la capacité de former un gel puis un verre si les réactions d'hydrolyses-condensations sont correctement accélérées par un catalyseur.

Dans la littérature, les deux catalyseurs régulièrement employés sont l'acide nitrique (HNO_3) [11] et l'acide chlorhydrique (HCl) [12].

Fonction du précurseur	Nom du produit	Formule	Pureté / Concentration	Masse molaire	Fournisseur
Formateurs de réseau	Tétraéthyl orthosilicate (TEOS)	$(C_2H_5O)_4Si$	99,999 %	208,33 $g.mol^{-1}$	Aldrich
	Triéthyl phosphate (TEP)	$(C_2H_5O)_3P$	> 99,8 %	182,16 $g.mol^{-1}$	Aldrich
Modificateurs de réseau	Nitrate de calcium	$Ca(NO_3)_2$, $4H_2O$	99 %	236,15 $g.mol^{-1}$	Aldrich
	Chlorure de calcium	$CaCl_2$	99 %	147,02 $g.mol^{-1}$	Riedel-de Haën
	Nitrate de sodium	$NaNO_3$	99,9 %	84,99 $g.mol^{-1}$	Aldrich
Solvant	Méthanol	CH_3OH	99,9 %	32 $g.mol^{-1}$	Prolabo
Catalyseurs	Acide chlorhydrique	HCl	1 M	36,46 $g.mol^{-1}$	Prolabo
	Acide nitrique	HNO_3	1 M	63,01 $g.mol^{-1}$	Prolabo

Tableau I-II-2 : Produits de départ.

Le calcium est introduit dans le système ternaire et quaternaire sous forme de nitrate et de chlorure. Dans les compositions quaternaires, le sodium est introduit à l'aide d'un nitrate. Ces précurseurs sont des poudres : un broyage dans un creuset en agate est préalablement nécessaire afin de faciliter leur pesée précise ainsi que leur future dissolution. La concentration des deux catalyseurs HCl et HNO_3 est fixée à 1 $mol.L^{-1}$.

1.4. Mode opératoire

Dans un premier temps, il convient d'établir la quantité de matière finale de verre souhaitée (notée n_{verre}). Cela permet de fixer la masse de formateurs et de modificateurs nécessaires à la formation du sol, en correspondance avec la composition molaire du verre. Le volume de solvant (noté $V_{solvant}$) à utiliser va également dépendre de n_{verre}. Pour le déterminer, il est intéressant de définir la concentration en verre dans le sol : $C_{sol} = \frac{n_{verre}}{V_{solvant}}$.

Dans la littérature, les concentrations en verres dans les sols sont de l'ordre de 1 mol/L [6].

Les deux voies de synthèses A et B sont discernables par le mode opératoire employé :

- Voie A : solvant alcool pur.

Avec cette méthode, l'eau et le catalyseur nécessaires à la transformation sol-gel sont ajoutés en dernier, dans un sol alcoolique.

La méthode est la suivante :
Les formateurs (Si et P) et les modificateurs (Ca et éventuellement Na) sont pesés avec précision puis mélangés pendant trente minutes dans un bécher contenant du méthanol. Le volume de méthanol employé correspond exactement à $V_{solvant}$. A cette étape, le sol est formé.

Afin d'entraîner la gélification, l'amorçage de l'hydrolyse des formateurs de réseau (TEOS et TEP) est réalisé en ajoutant une quantité d'eau acidifiée à 1M par HCl ou HNO_3.

Le silicium possède une coordinance de 4 et le phosphore une coordinance de 3, l'eau est donc ajoutée en quantité stœchiométrique afin que les alcoolates formateurs de réseau puissent être totalement hydrolysés. Ceci correspond à une quantité d'eau telle que : $n_{H_2O} = 4n_{TEOS} + 3n_{TEP}$,

avec n_{TEOS} et n_{TEP} la quantité de matière (mol) de TEOS et de TEP dans le sol.
Le volume d'eau à ajouter en millilitre sera donc :

$$V_{H_2O} = \frac{m_{H_2O}}{\rho_{H_2O}} = \frac{n_{H_2O}.M_{H_2O}}{\rho_{H_2O}} = (4n_{TEOS} + 3n_{TEP})x18 \text{, } \rho_{H_2O} = 1 \text{ g/mL (masse volumique de l'eau).}$$

Le gel commence à se former à température ambiante, il devient solide après 24 heures. Le bécher est alors placé dans une étuve à 130°C pendant 24 heures au minimum.

- Voie B : solvant eau et alcool.

Les sels modificateurs (Ca et éventuellement Na) sont pesés conformément à la formulation souhaitée dans un verre de montre puis placés dans un bécher. Ils sont ensuite dissous dans de l'eau acidifiée à 1 mol/L d'HCl ou HNO_3. Le volume est ajusté pour correspondre à la moitié de $V_{solvant}$. La solution résultante est maintenue sous agitation magnétique durant trente minutes, elle forme la partie aqueuse du sol.

Pendant ce temps, les formateurs de réseau vitreux (Si et P) sont préparés. Ils sont pesés précisément puis mélangés dans du méthanol pendant trente minutes à l'intérieur d'un bécher. Le volume de méthanol utilisé correspond à l'autre moitié de $V_{solvant}$, ce qui permet d'obtenir la partie alcoolique du sol.

Le sol est formé par l'addition de la partie aqueuse dans le bécher contenant la partie alcoolique. Les réactions d'hydrolyse-condensation sont amorcées par l'acide et l'eau contenus dans la partie aqueuse. Le sol est alors doucement chauffé à 70°C pour accélérer la formation du gel. Le chauffage est arrêté lorsque le gel commence à se former, ce qui demande environ une heure. La gélification se poursuit à température ambiante durant 24h. Après ce délai, un échantillon de gel encore humide est prélevé pour analyse. Le gel restant est placé 24h dans une étuve à 130°C pour être analysé une fois sec.

1.5. Analyses

1.5.1. Observations

Après 24 heures à l'étuve, les deux types de gels se présentent comme une poudre de couleur blanche, aussi bien pour la voie A ou que pour la voie B.

Les gels se démarquent toutefois par leur aspect physique : les gels secs de la voie B forment des poudres très fines alors que les gels issus de la voie A développent des amalgames de poudre durant le séchage.

1.5.2. Diffractions des rayons X

Les analyses X sont réalisées sur un domaine $20° < 2\theta < 80°$ à l'aide du diffractomètre X PanAnalytical X'Pert Pro. La figure I-II-1 présente les diffractogrammes effectués sur les gels humides obtenus par voie A.

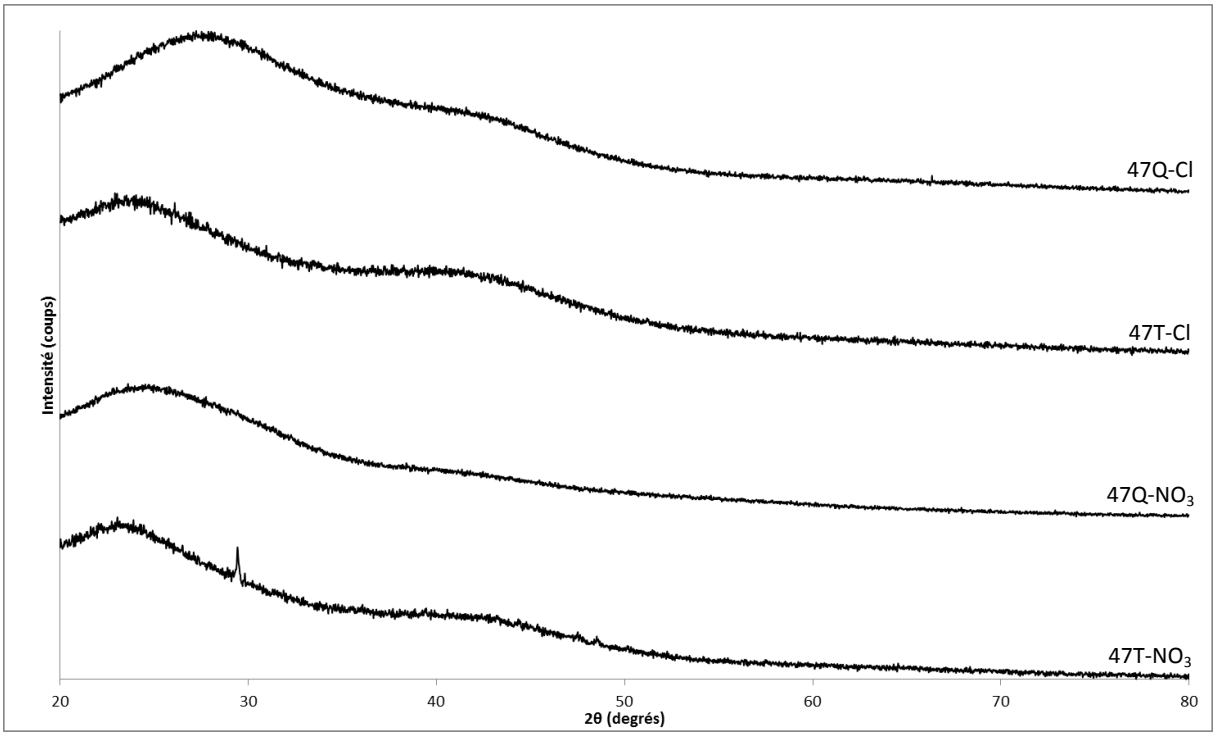


Figure I-II-1 : Diffractogrammes des gels humides obtenus par voie A.

L'analyse de la figure I-II-1 permet de remarquer que tous les gels humides préparés par voie A présentent un massif amorphe bien défini. Le gel 47T-NO_3 ne présente qu'une légère trace de cristallisation, trop peu marquée pour être identifiée.

La figure I-II-2 représente les diffractogrammes des gels secs obtenus par la voie A.

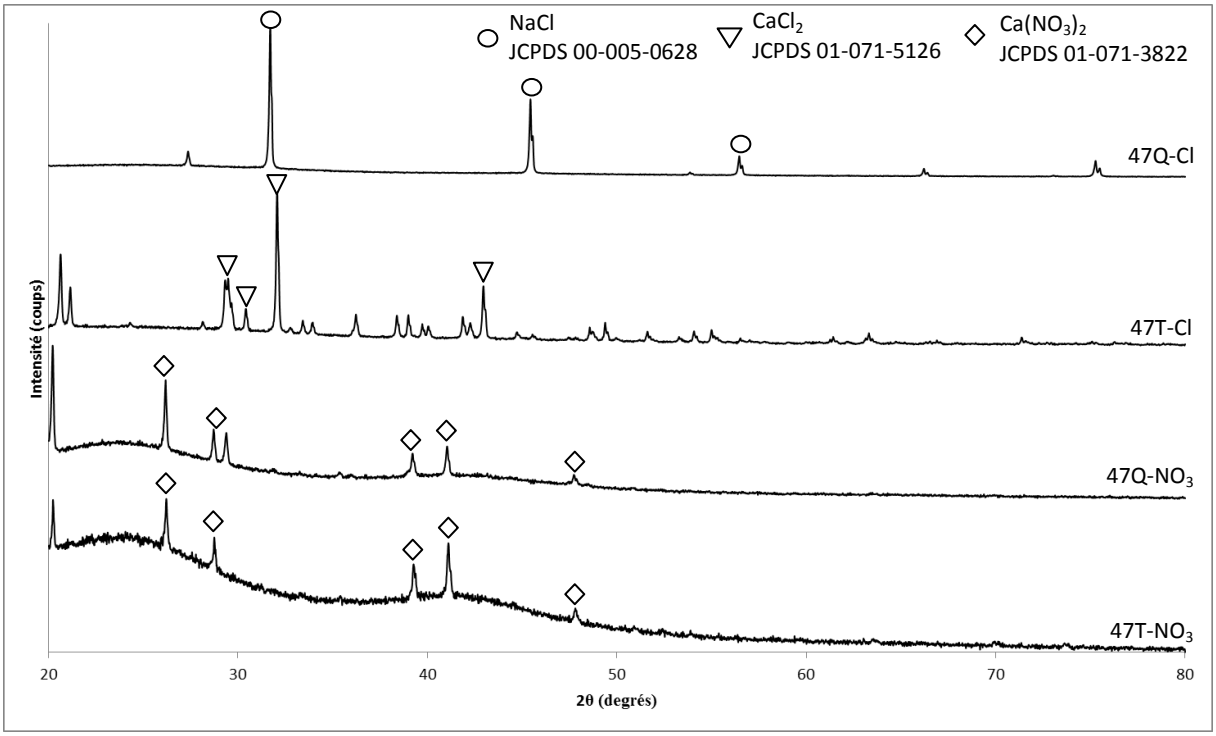


Figure I-II-2 : Diffractogrammes des gels séchés à 130°C obtenus par voie A.

Les observations faites sur la figure I-II-2 permettent de déduire que tous les gels ont cristallisé durant le séchage. Cependant, les gels nitrés présentent des résultats différents des gels chlorés. En effet, les gels chlorés sont plus fortement cristallisés que les gels nitrés, et cette phase varie également en fonction de la composition. La composition ternaire 47T-Cl voit apparaître du $CaCl_2$ alors que du NaCl est visible sur le diffractogramme de la composition quaternaire 47Q-Cl.

Pour les gels à base de nitrate de calcium, la phase cristalline détectée reste inchangée entre la composition ternaire 47T-NO_3 et la composition quaternaire 47Q-NO_3 : il s'agit de nitrate de calcium.

Les figures I-II-3 et I-II-4 présentent les spectres de diffraction des rayons X des échantillons de la voie B, humides et secs.

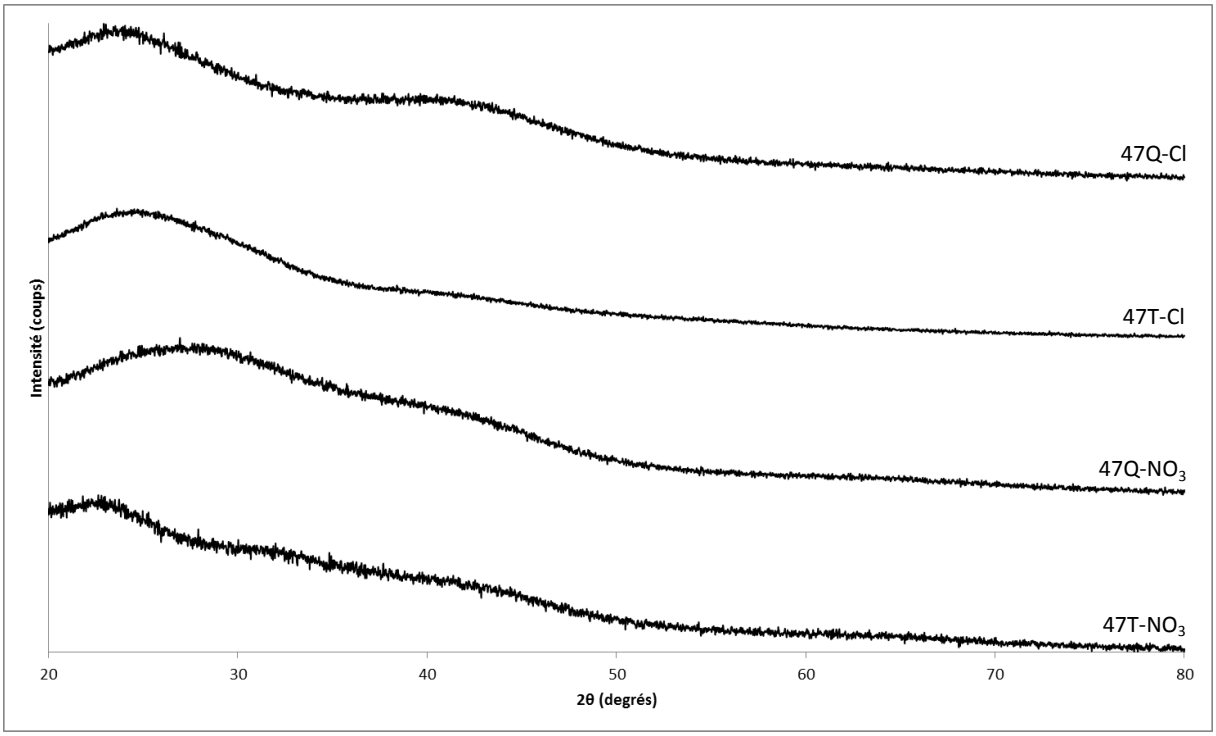


Figure I-II-3 : Diffractogrammes des gels humides obtenus par voie B.

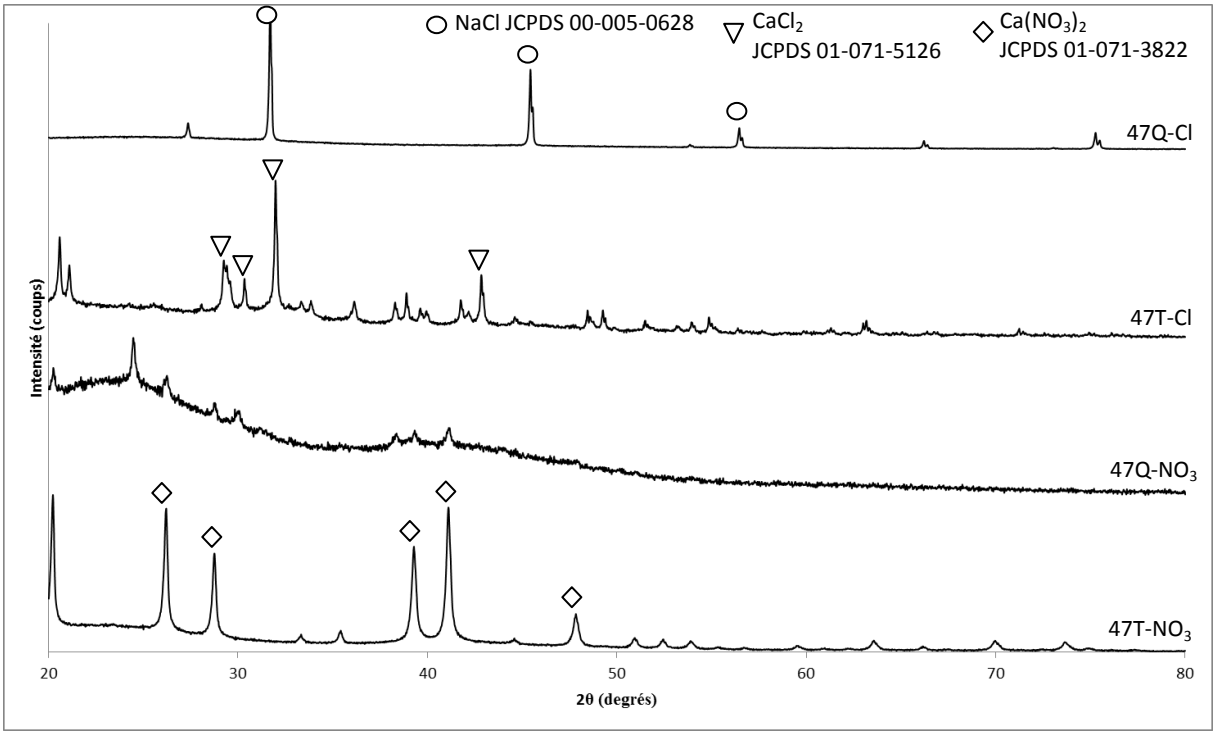


Figure I-II-4 : Diffractogrammes des gels séchés à 130°C obtenus par voie B.

Tous les gels humides présentés sur la figure I-II-3 sont amorphes, indépendamment de la nature des précurseurs utilisés ou bien de la composition.

Tout comme sur la figure I-II-2, les observations faites sur la figure I-II-4 montrent qu'une fois séchés à 130°C, tous les gels présentent sur leur diffractogramme un massif vitrocéramique ou sont cristallisés. Le gel quaternaire chloré est toujours mieux cristallisé que les gels nitrés.
La composition ternaire 47T-Cl cristallise sous forme de $CaCl_2$ alors que pour la composition quaternaire 47Q-Cl du NaCl apparaît.
Le 47T-NO_3 montre une phase de $Ca(NO_3)_2$ alors que le 47Q-NO_3 est mal cristallisé en une phase difficile à identifier, mais qui correspond probablement à un début de cristallisation de $Ca(NO_3)_2$.

Les résultats pour les deux voies A et B sont presque identiques. Cependant le massif amorphe reste plus intense sur les échantillons issus de la voie A que sur les échantillons de la voie B, où la cristallisation est plus marquée. Les pics de diffraction correspondent pour tous les gels nitrés à la formation de cristallites de nitrate de calcium [13].

Les diffractogrammes des gels ternaires et quaternaires synthétisés avec du chlorure de calcium montrent une intense cristallisation, aussi bien pour la voie A que la voie B.
Dans le cas des gels ternaires, la nature du cristallisé obtenu est semblable pour les deux voies, du $CaCl_2$ [14] est identifié. Les diffractogrammes des gels quaternaires chlorés présentent des pics qui montrent la cristallisation de NaCl [15], indépendamment de la méthode de synthèse.

1.6. Discussion

L'analyse des figures I-II-1 à I-II-4 permet de conclure que les précurseurs minéraux utilisés ne permettent pas d'obtenir un gel amorphe qui permettra d'obtenir un verre dans un domaine de composition pauvre en silice.

Des cristallisés de nitrate de calcium sont obtenus pour les gels nitrés 47T-NO_3 et 47Q-NO_3 des voies A et B, ce qui correspond au produit de départ employé.
Cette situation est également observée pour les gels chlorés 47T-Cl préparés par les deux voies, où du chlorure de calcium est détecté après séchage.

Cependant, la comparaison des diffractogrammes réalisés sur les gels humides avec ceux mesurés sur les gels séchés à 130°C permet de déduire que la dissolution initiale des précurseurs dans les sols est complète.
Les précurseurs sont initialement bien dissous mais par la suite lors du séchage des précipitations se produisent : absentes sur les gels humides, des phases cristallines sont présentes sur tous les gels séchés. Cette apparition traduit bien la croissance d'un composé cristallisé lors du séchage des gels.

La nature mobile du sodium est bien mise en évidence dans les gels quaternaire chlorés. La formation de NaCl montre bien que cet élément cristallise très facilement avec l'environnement chimique des gels.

L'utilisation d'un mélange eau-alcool comme solvant permet une meilleure dissolution des sels mais il y a ensuite dégradation du caractère amorphe des gels secs. L'avantage de ce mode opératoire est d'assurer une dissolution rapide des sels de calcium et de sodium dans l'eau, en profitant de sa polarité plus forte que l'alcool. Les quantités d'eau mises en jeu rendent indispensable un chauffage pour former rapidement le gel, ce qui dégrade fortement sa structure lors du séchage.

La dissolution des sels est plus difficile par la voie alcoolique mais les gels secs à 130°C présentent un massif amorphe plus marqué car la formation du gel s'effectue de façon plus douce. Le départ d'un alcool lors du séchage dégrade moins le gel qu'un mélange eau-alcool.
Pour réaliser des compositions de bioverres inversés parfaitement amorphes, il faut donc augmenter la cohésion entre les éléments modificateurs Ca et Na avec le réseau de silice lors de la formation gel. Pour conserver cette cohésion lors du séchage, il faut effectuer les synthèses sol-gel dans un milieu uniquement alcoolique.

Tous ces éléments permettent d'ajuster le procédé de synthèse afin de rendre possible l'élaboration d'un verre sol-gel inversé bien amorphe.

2. Synthèses de bioverres sol-gel à l'aide de précurseurs alcoolates

2.1. Etude de faisabilité

De par l'obtention de vitrocéramiques et de différentes phases cristallines, l'utilisation de sels minéraux comme précurseurs ne permet pas a priori d'envisager la formation d'un gel amorphe exempt de phases cristallines observées à l'état sec. Parallèlement à la réaction de polycondensation tridimensionnelle recherchée, les précurseurs minéraux sont le siège de mécanismes de dissolution-précipitation liés entre autres aux solvants choisis, à la nature et à la concentration des anions dans le milieu voire à la distribution hétérogène des espèces dans le gel. L'étude s'est donc orientée vers l'utilisation d'autres précurseurs du calcium et du sodium afin de limiter la part des anions qui contribuent au phénomène de précipitation non souhaité lors du séchage des gels.
Les sels de calcium et de sodium répondant à cette contrainte sont les hydroxydes : $Ca(OH)_2$ et NaOH.

Le cas est idéal pour le calcium, car son hydroxyde présente une très faible solubilité dans le méthanol. L'ionisation de $Ca(OH)_2$ en Ca^{2+} et $2OH^-$ est donc limitée. Il devient alors possible d'imaginer des réactions de condensation liant directement les formateurs pré-hydrolysés et les hydroxydes de calcium. La figure I-II-5 présente le mécanisme théorique de condensation entre le TEOS partiellement hydrolysé et l'hydroxyde de calcium.

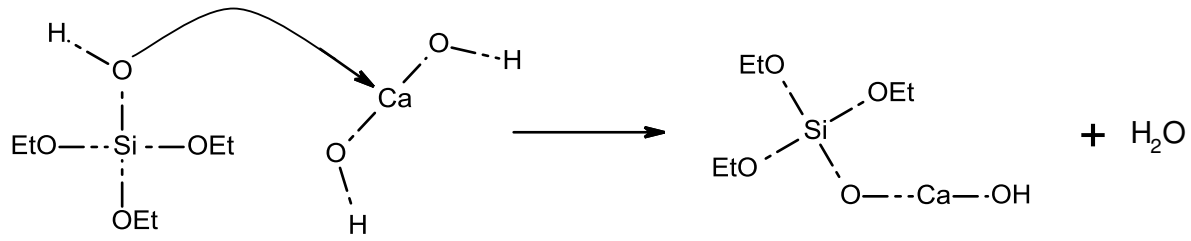
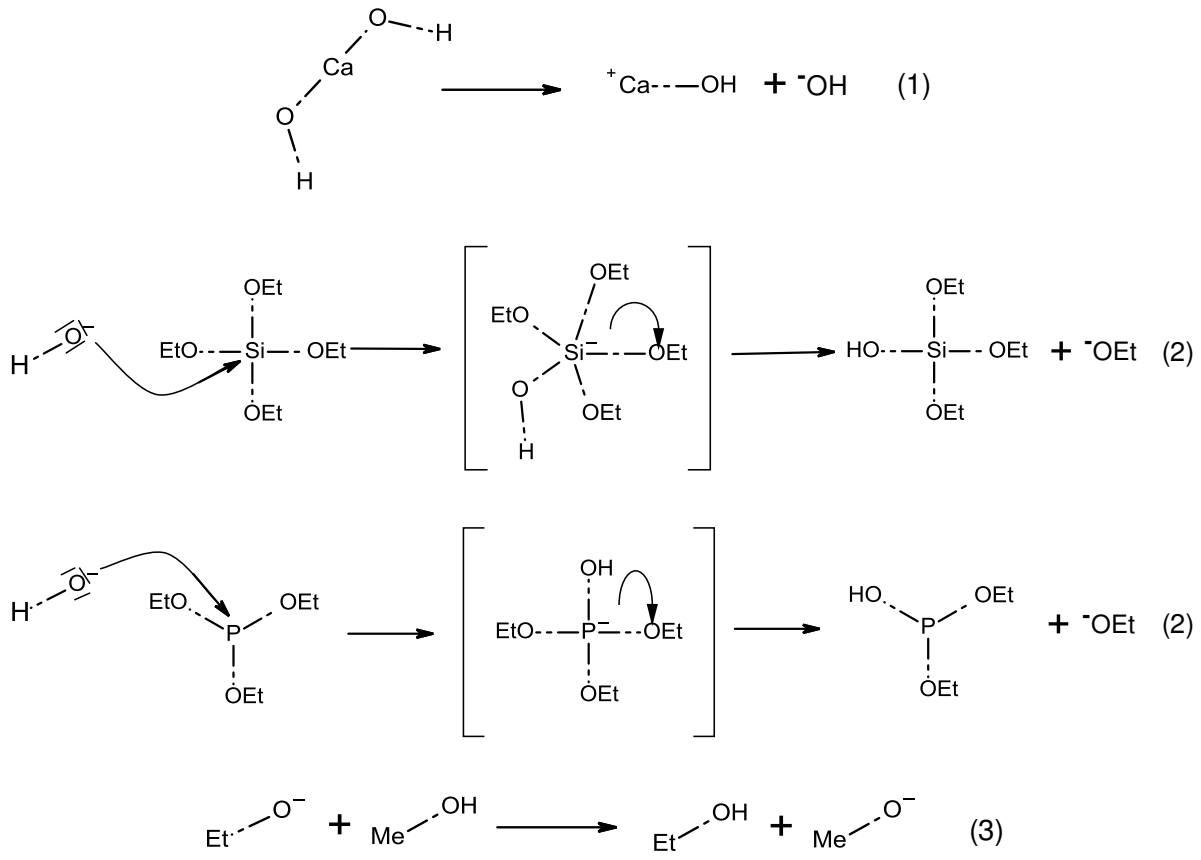


Figure I-II-5 : Condensation du TEOS et du $Ca(OH)_2$.

Par contre, la réaction de condensation n'est pas probable avec l'hydroxyde du sodium car la solubilité de NaOH est beaucoup trop importante dans le méthanol (s = 238 $g.L^{-1}$ alors que $Ca(OH)_2$ est pratiquement insoluble), ce qui l'ionise totalement en Na^+ et OH^-. Les anions hydroxydes, en tant que base de Brönsted, sont en équilibre avec la forme H_2O dans un milieu aussi protique. De plus, seules des réactions nucléophiles avec le TEOS sont envisageables (hydrolyse des fonctions –OEt du TEOS en fonction hydroxyles), ce qui contribue au bon fonctionnement de la réaction de polycondensation.

Une vérification a été entreprise afin de valider l'emploi direct de $Ca(OH)_2$ comme précurseur du calcium dans une synthèse sol-gel. Il s'agit de l'élaboration d'une composition binaire simple contenant 75% de SiO_2 et 25% de CaO (% molaire). Ce verre est facile à obtenir car ce n'est pas un verre inversé. Le sol est réalisé avec du TEOS (Sigma-Aldrich, pureté 99,9%) comme formateur de réseau vitreux et du $Ca(OH)_2$ anhydre (Sigma-Aldrich, pureté 99,9%) comme précurseur du calcium. L'hydroxyde de calcium anhydre est finement broyé dans un mortier en agate, puis dispersé durant plusieurs heures dans du méthanol sous agitation magnétique en terminant par une agitation ultrasonique de trente minutes. Le volume de méthanol est calculé afin que C_{sol} soit égale à 1M.

Il est remarquable dans cette expérience qu'un simple ajout d'eau pure tel que $n_{eau} = 4\ n_{TEOS}$ a suffi pour entraîner la gélification du TEOS en 60 minutes. Il n'y a aucune référence bibliographique mentionnant l'usage de ce précurseur dans les synthèses sol-gel. Mais il est possible d'énoncer un mécanisme probable présenté à la figure I-II-6.



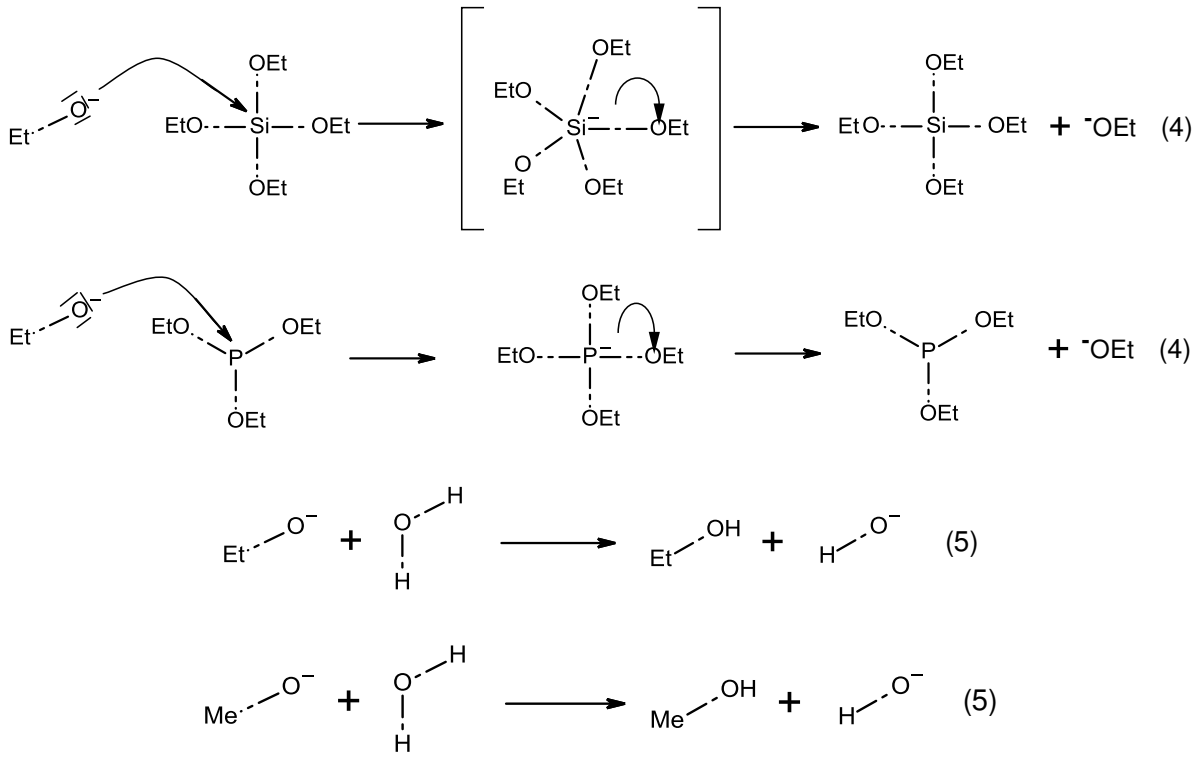


Figure I-II-6 : Mécanisme de catalyse basique avec $Ca(OH)_2$ et le TEOS

Il est possible d'imaginer que l'ionisation partielle de l'hydroxyde calcium dans l'alcool permet la gélification auto-catalysée du TEOS :

- la mise en solution de $Ca(OH)_2$ dans le méthanol forme une quantité d'ions OH^- faible mais non négligeable (1),
- ces ions OH^- peuvent alors réagir avec le TEOS pour l'hydrolyser, ce qui a pour conséquence la formation d'ions éthanolates (2),
- les ions éthanoates sont fortement réactifs, mais tant que de l'eau n'est pas ajoutée dans le solvant, les réactions mènent à l'apparition de méthanolates par réaction sur le solvant (3),
- la réaction d'attaque nucléophile des atomes de silicium électrophile du TEOS ou du TEP par les ions éthanoates de la solution ne modifie pas la réactivité des précurseurs, car cela ne change en rien leur structure après libération d'un groupement éthanoate dans le milieu (4). Toutefois, les ions méthanolates évoqués en (3) peuvent aussi remplacer des groupements OEt par des groupements OCH_3 cette fois, par trans-esterification. Cela aura peu d'impact sur la vitesse de réaction d'hydrolyse, mais contribuera à améliorer la compatibilité des précurseurs avec le solvant méthanolique.

- l'addition d'eau à ce mélange, présentant une quantité supposée non négligeable de bases conjuguées de l'éthanol, s'accompagne systématiquement de la formation de l'ion OH^- . Ce dernier, catalysant l'hydrolyse des précurseurs, permet leur gélification par condensation progressive des hydroxydes de silicium et de phosphore (5).

Ce mécanisme proposé n'a pas fait l'objet d'analyses fines établissant les structures moléculaires en évolution ou de suivis réactionnels, difficiles à mettre en place dans un milieu de composition complexe. La catalyse basique apparaît toutefois la plus crédible pour expliquer une telle vitesse de réaction: la viscosité évolue fortement au cours du temps et le gel formé devient rapidement difficile à agiter magnétiquement.

Cependant, lors du séchage du gel binaire 75%SiO_2-25%CaO, un composé vitrocéramique a été obtenu. La phase cristallisée a pu être identifié comme du $Ca(OH)_2$ [16]. L'explication la plus probable de l'existence de cette phase repose sur la taille grossière des particules de $Ca(OH)_2$ utilisées pour obtenir le gel.

L'utilisation de poudres agglomérées et microniques n'autorisent que des réactions de condensation à la surface des grains de chaux. Lors de la gélification, des zones cristallines (ou nodules) se manifestent suite à l'encapsulation de ces agglomérats par le gel qui a complétement réagi à leur surface. Ces zones de réactifs, non exploitables pour poursuivre la construction de la matrice polymèrique, germeront durant la stabilisation thermique, initiant des cristallisations locales.
Les techniques de broyage ne permettent pas d'obtenir facilement des poudres de morphologies nanométriques. Il est donc indispensable d'envisager la synthèse *in situ* des hydroxydes pour obtenir des molécules unitaires de très petite taille.

Les alcoolates de calcium et de sodium sont de bons candidats. Quelques publications indiquent qu'ils peuvent être utilisés pour synthétiser des verres par voie sol-gel.
Il s'agit des travaux de M.M. Pereira [17], qui commentent l'utilisation du diméthanolate de calcium, et des travaux de M. Prassas [18], qui introduisent l'éthanolate de sodium.

En effet, comme le TEOS et le TEP, ces alcoolates s'hydrolysent au contact de l'eau [6], ce qui conduit à la formation de $Ca(OH)_2$ et NaOH dans le sol. Ces équations sont présentées sur la figure I-II-8.

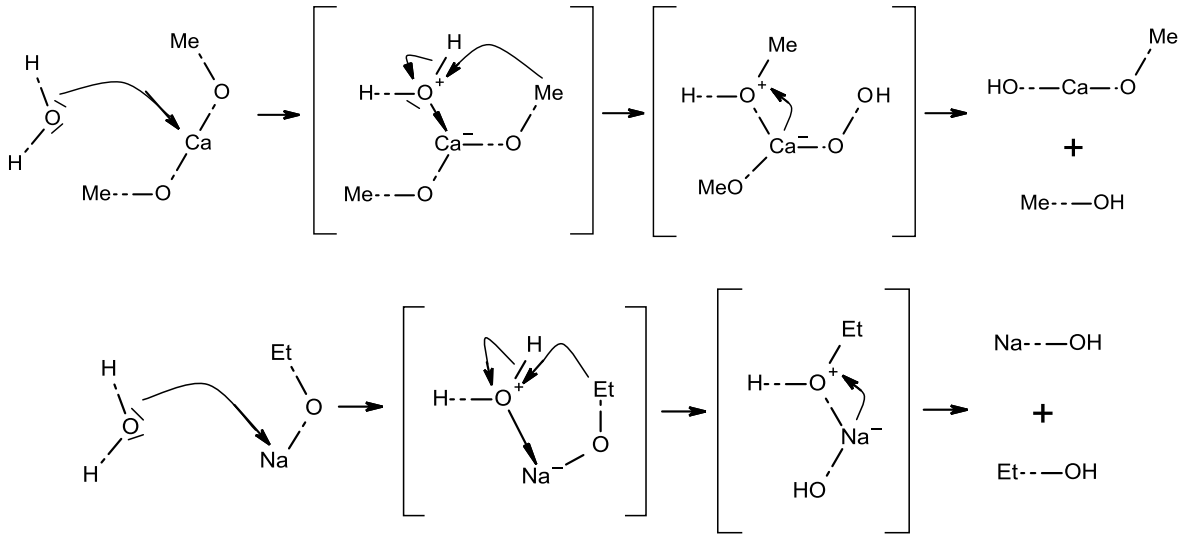


Figure I-II-8 : Réactions d'hydrolyse des alcoolates de calcium et de sodium.

De plus, la cinétique de l'hydrolyse sans catalyse est rapide pour les alcoolates de calcium et de sodium alors qu'elle est plutôt lente pour le TEOS et le TEP [19].

Il est donc possible de mélanger tous les alcoolates pour former un sol alcoolique et d'amorcer la gélification par un ajout d'eau.

Pour une composition ternaire comme la composition 47T utilisant du TEOS et du TEP comme formateur de réseau et du diméthanolate de calcium comme modificateur, la gélification peut alors se produire en plusieurs étapes qui sont présentées sur la figure I-II-9.

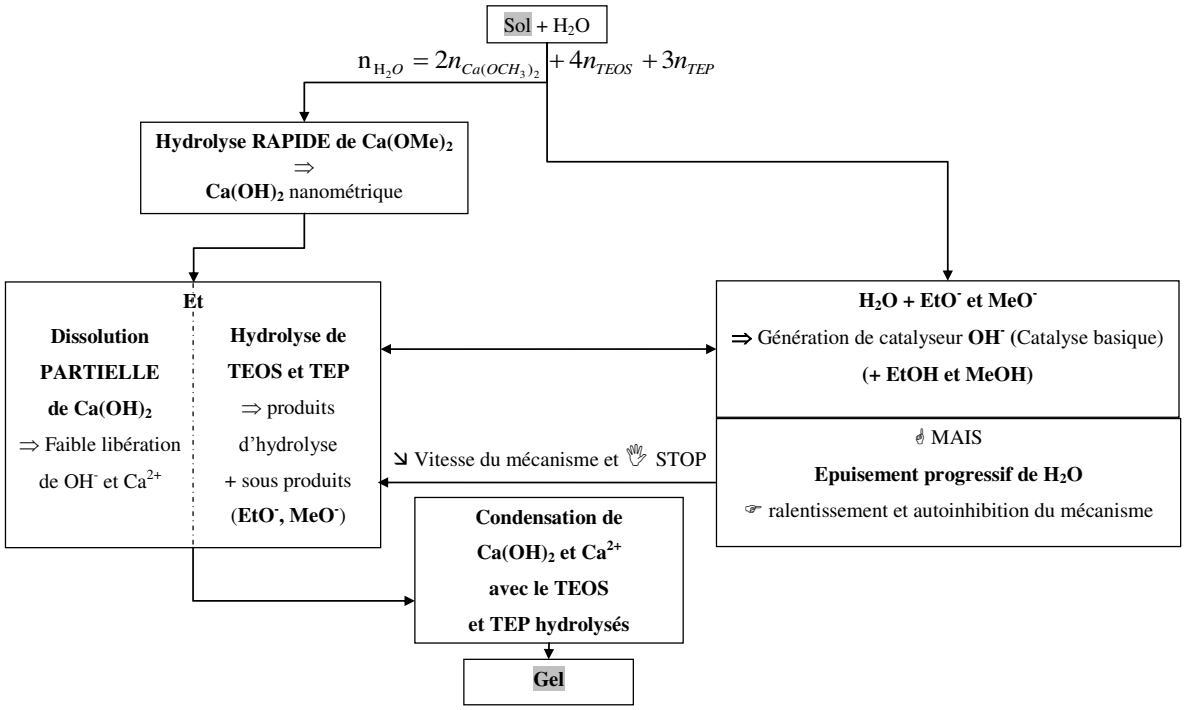


Figure I-II-9 : Mécanisme de gélification attendu avec l'alcoolate de calcium.

La figure I-II-9 s'explique de la façon suivante. Une fois les précurseurs correctement dispersés dans le sol, de l'eau pure est ajoutée pour amorcer la gélification. Tous les groupements des alcoolates devant réagir, la quantité d'eau est calculée pour que $n_{H_2O} = 4n_{TEOS} + 3n_{TEP} + 2n_{Ca(OCH_3)_2}$, avec $n_{Ca(OCH_3)_2}$ la quantité de matière en diméthanolate de calcium.

Une quantité d'eau égale à $2n_{Ca(OCH_3)_2}$ réagit rapidement avec l'alcoolate de calcium : cela conduit à l'hydrolyse *in situ* pour former de l'hydroxyde calcium de taille moléculaire. Le reste de l'eau ne réagit pas initialement avec le TEOS et le TEP car l'auto-hydrolyse sans catalyseur de ces composés est très longue, 1000h pour le TEOS (cf. tableau I.I.2 page 32).

L'apparition d'hydroxyde de calcium entraîne la formation d'une faible concentration d'ions OH^- par dissolution dans le méthanol. L'hydrolyse du TEOS et du TEP est alors possible.

Lors de l'hydrolyse des alcoolates formateurs, l'ion OH^- est consommé mais la réaction fait naître un ion éthanolate.

Le catalyseur OH^- ne peut-être régénéré qu'avec un contact assuré entre un ion éthanolate et une molécule d'eau. Lorsque l'eau est en grande partie consommée, la probabilité de former le catalyseur par cette réaction acido-basique entre l'eau et l'ion éthanoate diminuent avec le temps, ce qui modère la catalyse basique du TEOS et du TEP.

Lorsqu'il y a assez de groupements de TEOS et de TEP hydrolysés, des réactions de condensation se produisent entre les formateurs hydrolysés et les hydroxydes nanométriques suivant les réactions vues sur la figure I-II-5, ce qui conduit à la formation du gel. Les ions calcium présents se retrouvent intégrés et dispersés dans le gel sans contre ions minéraux qui conduiraient à leur précipitation.

Dans le cadre d'une formation de gel avec les TEOS et le TEP, l'alcoolate de calcium pourrait être un bon candidat pour réaliser des synthèses de bioverres de composition inversée. La réalisation d'une composition quaternaire avec l'éthanoate de sodium permettra de valider l'hypothèse du mécanisme de la catalyse modérée.

2.2. Produits de départ

Les précurseurs utilisés sont regroupés dans le tableau I-II-3.

Fonction du précurseur	**Nom du produit**	**Formule**	**Pureté / Concentration**	**Masse molaire**	**Fournisseur**
Formateurs de réseau	Tétraéthyl orthosilicate (TEOS)	$(C_2H_5O)_4Si$	99,999 %	208,33 $g.mol^{-1}$	Aldrich
	Triéthyl phosphate (TEP)	$(C_2H_5O)_3P$	> 99,8 %	182,16 $g.mol^{-1}$	Aldrich
Modificateurs de réseau	Diméthanolate de calcium	$(CH_3O)_2Ca$	97 %	102,15 $g.mol^{-1}$	Aldrich
	Ethanolate de sodium	CH_3CH_2ONa	21% dans l'éthanol	68,05 $g.mol^{-1}$	Aldrich
Solvants	Méthanol	CH_3OH	99 %	32 $g.mol^{-1}$	Prolabo

Tableau I-II-3 : Produits de départ avec des modificateurs sous forme d'alcoolates.

2.3. Compositions réalisées

Deux compositions ont été étudiées :

- la composition ternaire comprenant 47 % SiO_2 – 48 % CaO – 5 % P_2O_5 en moles, notée 47T-A, plus simple car ne contenant pas de sodium,
- la composition quaternaire molaire de C. Duée comportant 47 % de SiO_2, 26,5 % de CaO, 21,5 % de Na_2O et 5 % de P_2O_5 et notée 47Q-A.

Le suffixe-A signifie alcoolate. L'influence des deux alcoolates de calcium et de sodium dans les gels est donc étudiée. Pour la composition 47T-A, le calcium est apporté par du diméthanolate de calcium, qui est complété par l'éthanolate de sodium dans la composition quaternaire 47Q-A.

Les deux compositions sont regroupées dans le tableau I-II-4.

3. Nom	Précurseur du calcium	Précurseur du sodium
47T-A	Diméthanolate de calcium	
47Q-A	Diméthanolate de calcium	Ethanolate de sodium

Tableau I-II-4 : Compositions réalisées dans le cadre des précurseurs alcoolates.

2.4. Mode opératoire

La quantité molaire finale de verre souhaitée, n_{verre} est déterminée avant chaque manipulation. La masse de formateurs et de modificateurs en est déduite en correspondance avec la composition molaire du verre.

Afin d'évaluer l'impact de la concentration en verre dans le sol sur le temps de gélification, une gamme de concentrations croissantes est réalisée, avec C_{sol} variant de 0,5M à 1,5M.
Seule la voie alcoolique est utilisée et tous les alcoolates (Si, P, Ca et éventuellement Na) sont pesés avec précision puis mélangés ensemble pendant trente minutes dans un bécher contenant du méthanol. Le volume de méthanol employé correspond exactement à $V_{solvant}$.

Afin d'entraîner la gélification et d'assurer la régénération du catalyseur nécessaire à l'hydrolyse totale du TEOS et du TEP, un ajout d'eau est réalisé suivant une quantité stœchiométrique :

- $n_{H_2O} = 4n_{TEOS} + 3n_{TEP} + 2n_{Ca(OCH_3)_2}$ pour la composition 47T-A.
- $n_{H_2O} = 4n_{TEOS} + 3n_{TEP} + 2n_{Ca(OCH_3)_2} + n_{NaOCH_2CH_3}$ pour la composition 47Q-A, afin de prendre en compte l'eau nécessaire à l'hydrolyse de l'éthanolate de sodium ($n_{NaOCH_2CH_3}$ représente la quantité de matière en éthanolate de sodium).

Le gel se forme à température ambiante, au bout d'un temps noté t_{gel}. Une fois le gel séché à l'air libre (24 à 48h), le bécher est placé dans une étuve à 130°C pendant 24h.

2.5. Analyses sur les compositions 47T-A et 47Q-A

2.5.1. Mesures de t_{gel}

Cinq sols de concentrations croissantes en verre sont réalisés à 0,5M, 0,83M, 1M, 1,33M et 1,5M. Les temps de gélifications de ces sols sont mesurés à l'aide d'un chronomètre pour les compositions 47T-A et 47Q-A. Les figures I-II-10 et I-II-11 représentent le temps de gélification en fonction de la concentration en verre dans le sol pour les deux compositions.

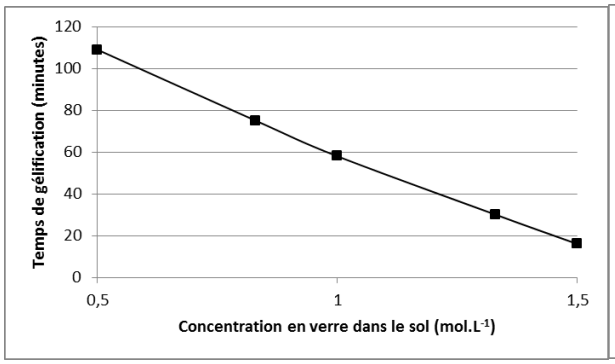


Figure I-II-10 : t_{gel} en fonction de C_{sol} pour la composition 47T-A.

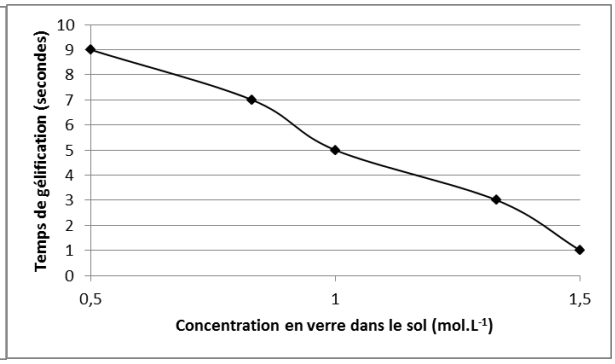


Figure I-II-11: t_{gel} en fonction de C_{sol} pour la composition 47Q-A.

La composition ternaire est obtenue à des temps variant entre 109 minutes pour les faibles concentrations à 16 minutes pour la plus forte (figure I-II-10). Tous les gels 47T-A séchés à l'étuve se présentent en forme de poudre fine de couleur blanche. Cependant, à partir de la concentration de 1 mol/L, la poudre se présente en amas dont la taille augmente aux concentrations de 1,33 et 1,5M. Ces amas restent toutefois fragiles et se fracturent aisément.

Le gel quaternaire est réactif, l'alcoolate de sodium réagit lors de sa mise au contact de l'eau et conduit à la formation de NaOH. La solubilité de l'hydroxyde de sodium étant importante dans le méthanol, l'apparition d'ions OH^- entraîne une gélification à des vitesses allant de 9 à 1 seconde (figure I-II-11). Les gels 47Q-A se présentent à l'œil nu sous la forme d'une poudre de couleur blanche une fois l'étuvage terminé, mais ne forment pas d'amas sur aucune des concentrations. Le gel quaternaire se forme trop rapidement pour assurer une bonne homogénéité et donc un gel amorphe.

2.5.2. Diffractogrammes X

Une étude par diffraction des rayons X est réalisée sur les gels secs 47T-A et 47Q-A pour chaque concentration en verre dans le sol. Les figures I-II-12 et I-II-13 présentent les résultats.

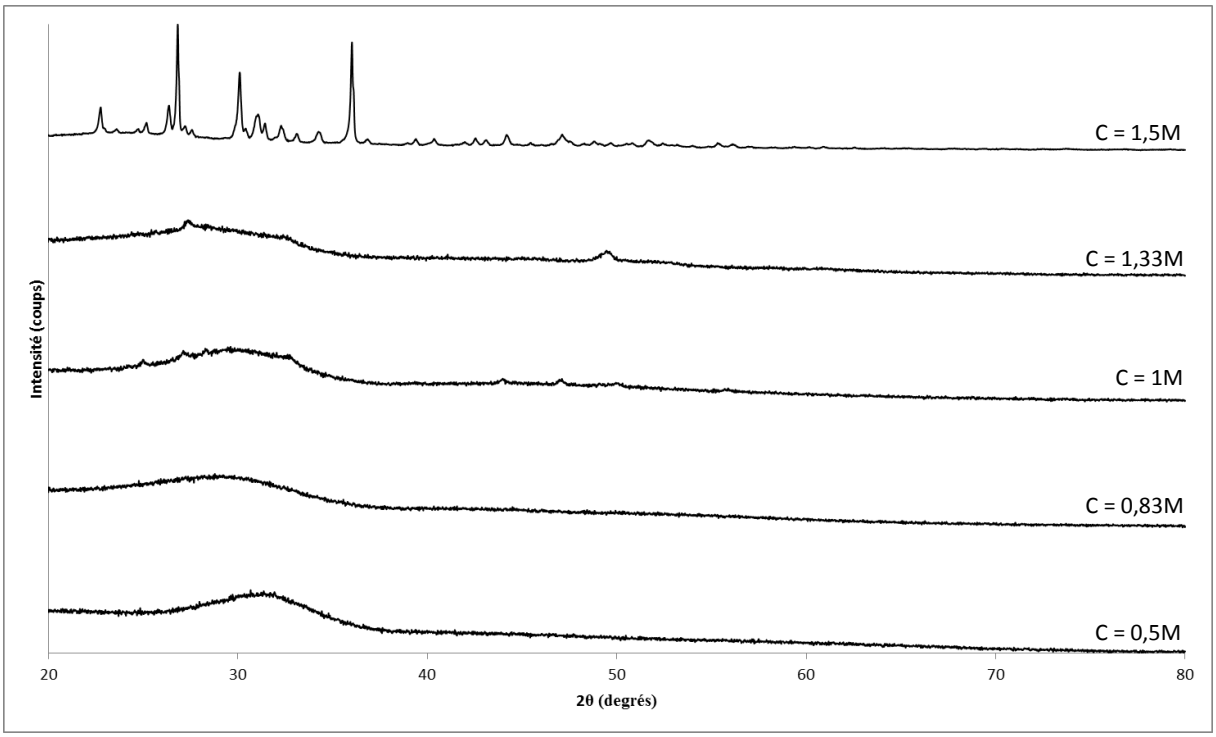


Figure I-II-12 : Diffractogrammes X des gels séchés 47T-A en fonction de C_{sol}.

Sur la figure I-II-12, il est possible d'observer que les gels secs de composition 47T-A sont amorphes jusqu'à une concentration de 1M. Ils présentent de légères traces de cristallisation à 1,33M. La limite de dispersion du précurseur est atteinte au-delà de 1,33M. A 1,5M, une

phase cristalline difficile à identifier est détectée. Il s'agit probablement de $Ca(OH)_2$ en faible quantité ou bien de précurseurs qui n'ont pas réagi car mal dissous.

La figure I-II-13 montre que tous les gels quaternaires secs 47Q-A sont cristallisés par une phase également difficile à identifier à l'aide de la diffraction X. Il s'agit certainement d'un mélange de phases cristallines.

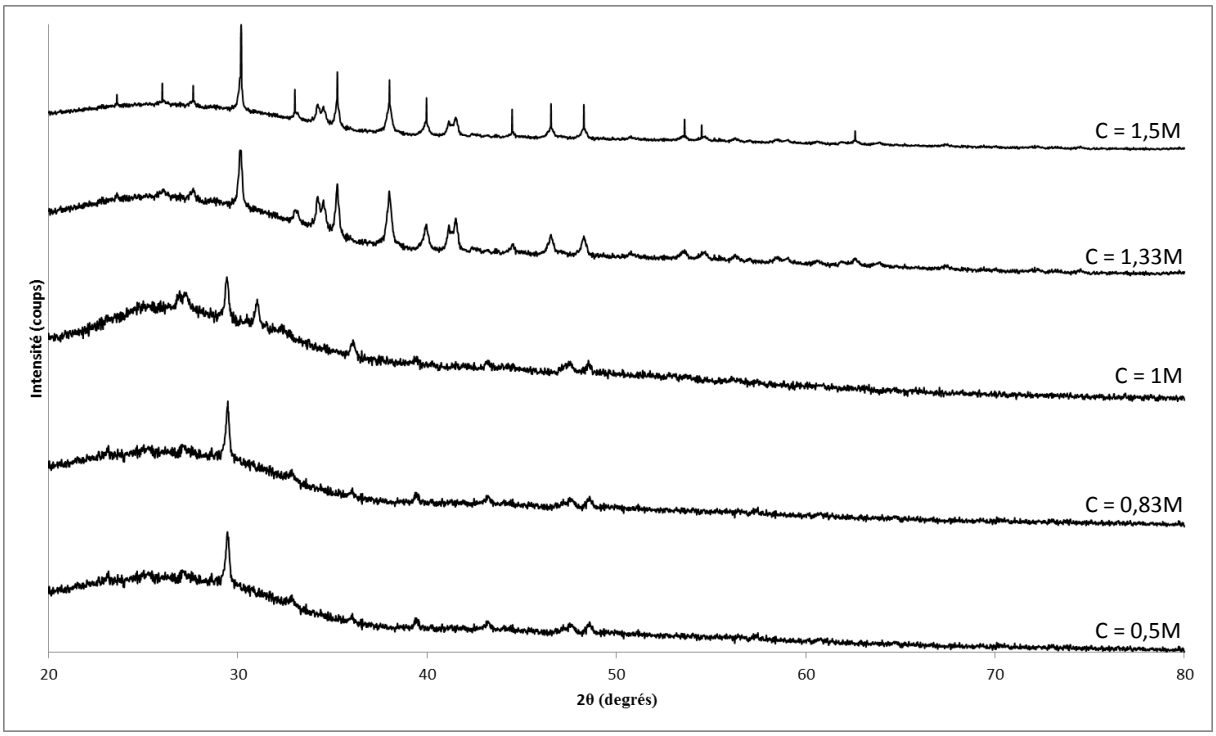


Figure I-II-13 : Diffractogrammes X des gels séchés 47Q-A en fonction de C_{sol}.

2.5.3. Discussion intermédiaire sur les compositions 47Q-A et 47T-A.

Les résultats de l'étude cinétique, couplés à ceux de la diffraction X, indiquent qu'il est judicieux d'utiliser un alcoolate de calcium pour effectuer une synthèse de verre bioactif par voie sol-gel.

Dans le cas de la composition ternaire, la formation de particules de $Ca(OH)_2$ de taille suffisamment petite pour bien intégrer le calcium dans le réseau amorphe semble confirmée. La formation de ces particules entraîne la formation du gel par leur dissolution partielle dans le méthanol. Cette dissolution est suffisamment faible pour ne pas former le gel trop rapidement. La concentration optimale en verre dans le sol est située entre 1 et 1,33M avec

l'alcoolate de calcium. Une valeur supérieure entraîne un gel sec non amorphe et une valeur inférieure n'optimise pas la densité du verre final.

En ce qui concerne la composition quaternaire 47Q-A, un alcoolate de sodium ne permet pas de la réaliser, peu importe la concentration de verre dans le sol. L'éthanoate de sodium réagit avec l'eau, ce qui forme de l'hydroxyde de sodium NaOH. L'hydroxyde de sodium se dissout et entraîne une libération importante d'ions OH^- qui accélèrent brutalement la gélification. Cette catalyse basique anarchique forme un gel hétérogène qui entraîne une cristallisation lors du séchage du gel. L'alcoolate de sodium doit donc être exclu des manipulations sol-gel mais confirme le principe de la catalyse basique par libérations d'ions OH^-.

Il est donc intéressant de ne poursuivre l'étude que sur le gel ternaire 47T-A.

2.6. Compléments d'analyses sur la composition 47T-A

2.6.1. Analyses thermiques

Afin de déterminer les températures de vieillissement des gels, une Analyse ThermoGravimétrique (ATG) couplée à l'Analyse Thermique Différentielle (ATD) est utilisée.

La température de transition vitreuse, Tg, ainsi que la température de cristallisation, Tc, peuvent être déterminées grâce à l'ATD. Le Tg correspond à la température de formation du réseau vitreux, qui informe donc sur la température de vieillissement minimale du gel. Le Tc est quant à lui, la température à ne pas dépasser sous peine de former une vitrocéramique voir un composé complètement cristallisé. Le domaine [Tg - Tc] correspond à la plage de température utilisable afin de vieillir le gel, il correspond au domaine de travail.

L'ATG renseigne sur les départs de produits présents dans le gel. Les pertes de masse doivent être faibles dans le domaine de température de vieillissement choisi, afin d'assurer la stabilité dans le temps du verre formé.

Les deux techniques sont couplées (Matériel Setaram Setsys TG 16) et les traitements thermiques sont réalisés dans le domaine de température 40-1200°C avec une vitesse de

chauffage de 1°C/minute. Le four est alimenté en air, les creusets sont en alumine frittée, la référence utilisée pour l'ATD est de l'alumine anhydre. L'ATD/ATG est effectuée sur le gel 47T-A. Le résultat de cette analyse est présenté sur la figure I-II-14.

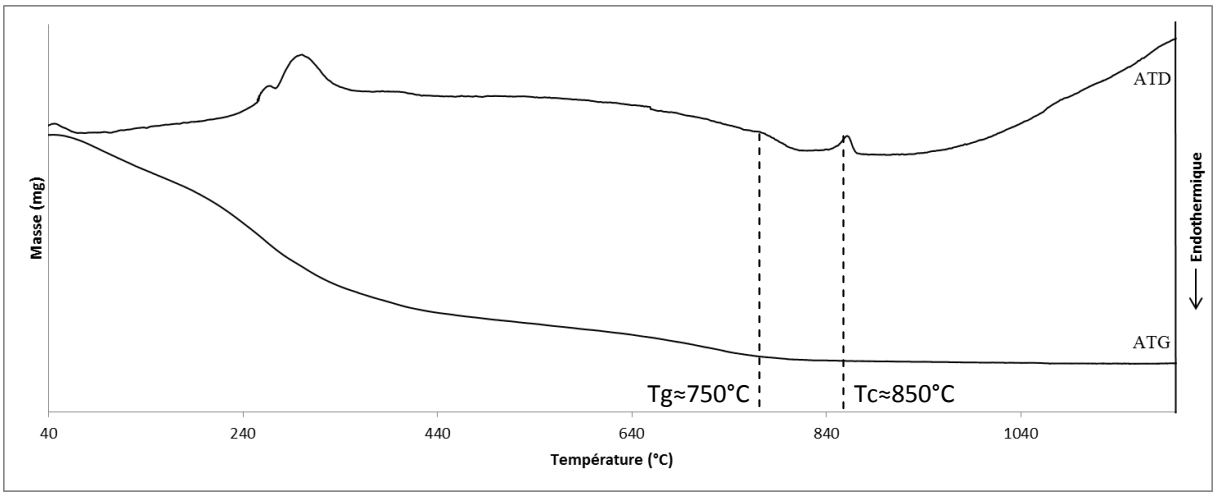


Figure I-II-14 : Analyse ATD/ATG sur le gel 47T-A.

La figure I-II-14 définit les conditions de vieillissement du gel ternaire :

- l'ATG n'indique plus aucun départ au-delà de 800°C : le composé sera stable dès cette température,
- l'ATD permet de donner la valeur de la température de transition vitreuse Tg, ainsi que de la température de cristallisation Tc. Pour le 47T-A, Tg est d'environ 750°C et Tc d'environ 850°C. Le pic qui est observé à 240°C correspond au départ de l'eau et des molécules organiques.

Les résultats de l'ATD/ATG indiquent que le passage du gel au verre peut se faire entre 750°C et 850°C.

2.6.2. Diffractions des rayons X

La figure I-II-15 montre les diffractogrammes du gel 47T-A porté aux températures de 600, 700, 800, 900, 1000°C. La montée en température est de 1°C/min et elle est maintenue durant 24 heures avant analyse.

Comme il est possible de le voir à la figure I-II-15, le vieillissement du gel à une température supérieure à 800°C entraîne la formation d'une vitrocéramique dont la phase cristallisée

correspond à la formation de silicate de calcium $CaSiO_3$ (wollastonite) [20]. Pour conserver le caractère amorphe du verre par traitement thermique, il faut donc chauffer le gel à 800°C maximum.

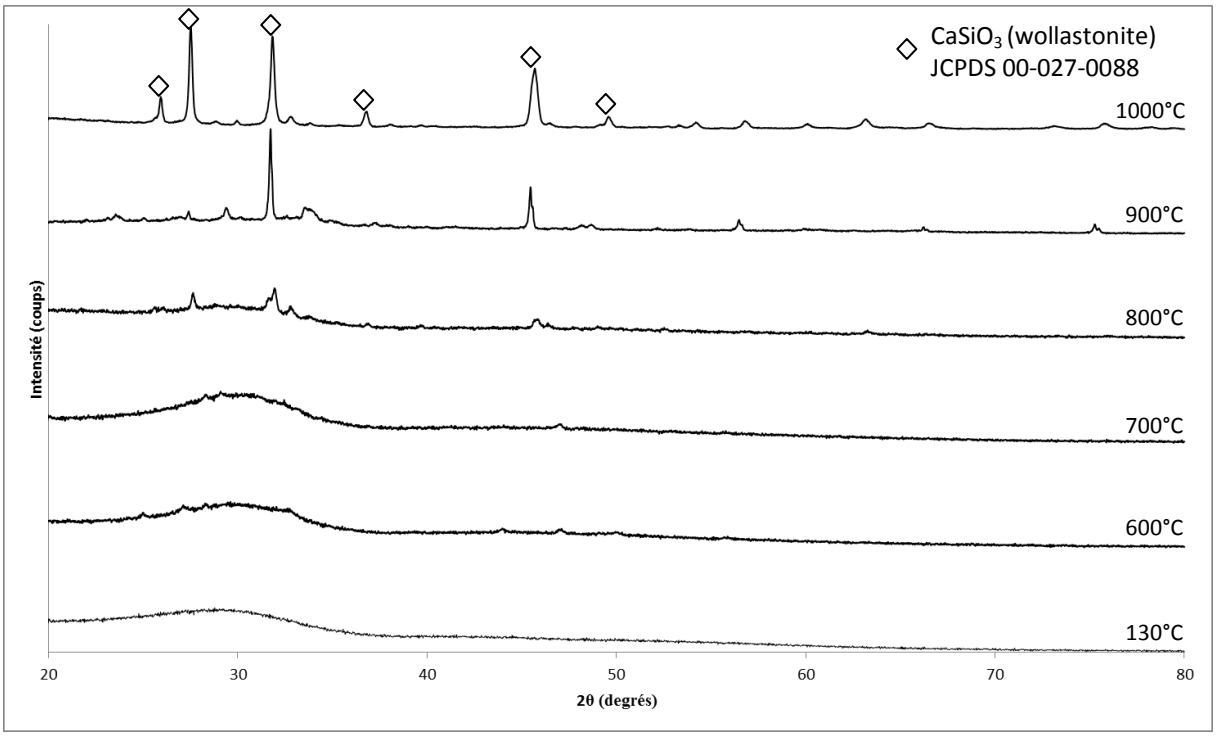


Figure I-II-15 : Diffraction des rayons X sur le 47T-A à différentes températures.

2.6.3. Etudes FTIR

Les spectres Infra-Rouge sont réalisés sur un domaine de nombres d'ondes de 400-1400 cm^{-1} grâce à un appareil à transformée de Fourier (FTIR) JASCO FT/IR 460 Plus.
Les spectres IR permettent d'évaluer la nature des liaisons présentes dans le gel ou le verre. En effet, deux bandes traduisent le passage d'un gel de silice à un verre stabilisé : l'apparition de la double bande de vibration d'élongation de la liaison Si-O dans les tétraèdres SiO_4 à 2 oxygènes pontants, ν Si-O 2NBO, à 937 et 864 cm^{-1} (2 NBO pour 2 Non Bridging Oxygen) ainsi que l'élargissement de la bande de déformation angulaire de Si-O-Si (δ Si-O-Si à 467 cm^{-1}).

La largeur du pic de la bande de déformation angulaire de Si-O-Si est moins importante dans le cas d'un gel de silice, que dans le cas d'un verre. La largeur d'un pic en Infra-Rouge étant

entre autre liée à l'orientation des liaisons dans l'espace, un gel de silice présentera un ordre relatif plus important que le verre de même composition.

La double bande ν Si-O 2NBO à 937 et 864 cm^{-1} est caractéristique d'un verre car les liaisons qui l'animent n'existent pas dans un gel de silice. Cela s'explique par la très faible proportion de liaison ionique silicium-ion, appelée aussi liaison non pontante (NBO). Ces liaisons se forment à haute température dans le verre et disparaissent quand celui-ci forme une couche de gel à sa surface.

La figure I-II-16 présente les résultats de spectroscopie Infra-Rouge effectuée sur le gel ternaire 47T-A séché pendant 24h à 130°C ainsi que ceux du verre correspondant obtenu après un vieillissement de 24h à 800°C. Les échantillons sont broyés puis pastillés avec du KBr à l'aide d'une presse.

La figure I-II-16 montre l'évolution de la structure chimique entre le gel sec à 130°C et le verre obtenu à 800°C.

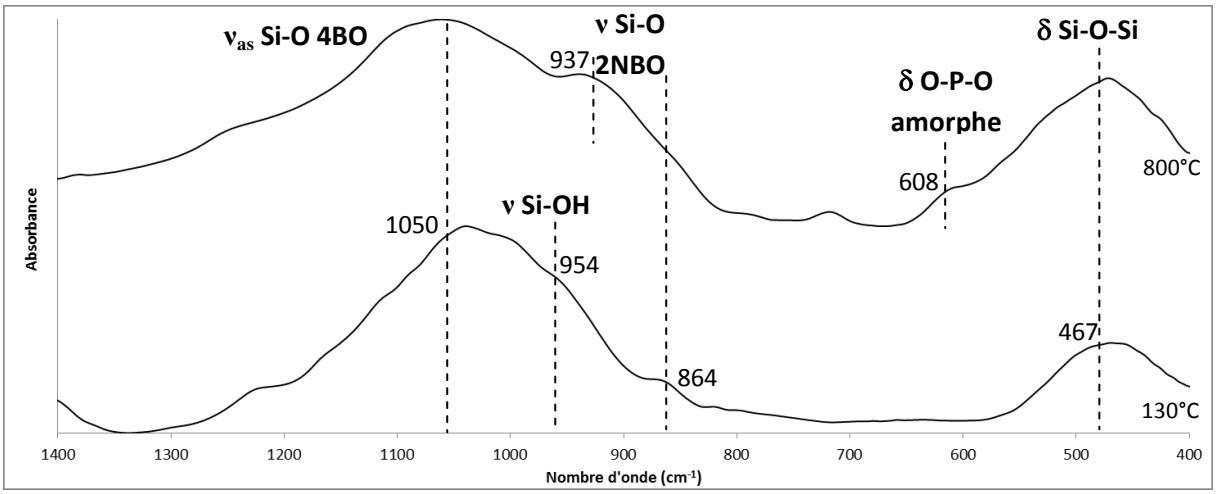


Figure I-II-16 : Spectres Infra-Rouges du gel et du verre 47T-A.

Les bandes ν_{as} Si-O 4BO à 1050 cm^{-1} et δ Si-O-Si à 467 cm^{-1} ainsi qu'une partie de la double bande ν Si-O 2NBO à 864 cm^{-1} indiquent qu'une structure vitreuse est présente dès 130°C.
Comme le montre la présence de la bande ν Si-OH à 954 cm^{-1}, le réseau n'est pas complet car à cette température il reste beaucoup de liaisons OH qui sont caractéristiques d'un gel de silice.

Après traitement à 800°C, la bande de vibration d'élongation de Si-O dans les tétraèdres SiO_4 à 2 oxygènes non pontants, ν Si-O 2NBO à 937 cm^{-1}, remplace la bande ν Si-OH. Cela veut dire que la silice présente dans le gel s'est intégrée dans le verre sous forme de liaison NBO. Il apparait également un peu d'apatite amorphe, qui est visible grâce à la bande δ O-P-O amorphe à 608 cm^{-1}. Cette bande indique que le phosphore est présent dans le réseau.
Avec l'élargissement de la bande de déformation angulaire de l'angle Si-O-Si à 467 cm^{-1} (δ Si-O-Si), il est possible d'affirmer que le traitement du gel à 800°C permet d'obtenir un verre stabilisé.

2.6.4. Analyses MEB-EDS

La microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à l'EDS (spectroscopie de dispersion d'énergie) est essentiellement une méthode d'analyse qualitative. L'appareil utilisé est un microscope Hitachi S-3500N à pression variable, équipé d'un spectromètre à dispersion d'énergie Kevex. Le verre 47T-A obtenu à 800°C est broyé dans un mortier en agate puis la poudre est pastillée à l'aide d'une presse hydraulique. Le tableau I-II-5 comporte les résultats d'étude semi-quantitative MEB-EDS de ce verre. Trois points de mesures sont effectués.

	1er point		**2ème point**		**3ème point**	
	% masse	**% atomes**	**% masse**	**% atomes**	**% masse**	**% atomes**
O	49	68	49	67	49	68
Si	19	16	20	15	19	15
P	3	2	3	2	3	2
Ca	29	16	28	15	29	16

Tableau I-II-5 : Résultats de l'étude EDS effectuée sur le 47T-A.

Les résultats du tu tableau I-II-5 montrent que la composition étudiée est homogène. En effet, les écarts observés entre les pourcentages massiques des trois points étudiés sont inférieurs ou égaux à 1 %.

Le tableau I-II-6 comporte la composition théorique du verre 47T-A ainsi que la moyenne effectuée sur les trois points expérimentaux.

	% masse		% atomes	
	théorique	**Moyenne**	**théorique**	**moyenne**
O	42,92	49±1	61,40	68±1
Si	21,20	19±1	17,28	15±1
P	4,98	3±1	3,67	2±1
Ca	30,90	29±1	17,65	16±1

Tableau I-II-6 : Composition théorique et expérimentale du 47T-A.

Sur le tableau I-II-6, l'écart le plus important entre la composition théorique et la moyenne expérimentale est visible pour l'oxygène avec environ 6% de différence. Le reste des proportions en atomes et en masse est relativement bien respecté. Les résultats étant donnés en pourcentages, les pourcentages en atomes du verre ne sont pas indépendants les uns des autres et cet écart décale les valeurs des autres atomes. Cela peut réduire ou augmenter les pourcentages observés pour les éléments présents en faible quantité comme le phosphore.

2.6.5. Etude de la bioactivité

Après avoir été synthétisés, les monolithes sont broyés puis les poudres sont pastillées à l'aide d'une presse hydraulique. Les cylindres de verres sont entourés de résine époxy, ce qui permet d'avoir une surface de réaction toujours identique pour tous les verres.
Les échantillons sont ensuite rincés à l'acétone et immergés pendant différentes durées dans le fluide physiologique simulé (SBF), maintenu à 37°C à l'aide d'un bain thermostaté.
Lors des manipulations, une seule face de la pastille est en contact avec le SBF. Le volume de SBF employé est de 50 cm^3 et la surface des pastilles est de 1,54 cm^2, soit un rapport S/V = 0,03 cm^{-1} environ. Ce rapport se situe dans la moyenne des rapports S/V généralement rencontrés dans la littérature, qui varient entre 0,005 à 0,5 cm^{-1} [21]. Le récapitulatif de la composition du SBF est dans le tableau I-II-7.

Ions	Concentrations en mmol/L	
	SBF	**Plasma humain**
Na^+	142,0	142,0
K^+	5,0	5,0
Mg^{2+}	1,5	1,5
Ca^{2+}	2,5	2,5
Cl^-	147,8	103,0
HCO_3^-	4,2	4,2
HPO_4^{2-}	1,0	1,0
SO_4^{2-}	0,5	0,5
pH	7,25-7,42	7,24-7,40

Tableau I-II-7 : Composition ionique en mmol/L du Simulated Body Fluid (SBF) et du plasma humain.

Les blocs sont ensuite sortis du SBF, rincés à l'eau déminéralisée puis séchés à l'étuve. La surface des échantillons est ensuite analysée à l'aide de la spectroscopie Infra Rouge à transformée de Fourier en mode ATR (Attenuated Total Reflection ou réflection totale atténuée). Grâce à cette méthode, les différentes étapes de réactivité des verres peuvent être détectées et le mode ATR permet de réaliser des manipulations rapides sans devoir réaliser le pastillage avec le KBr.

La figure I-II-17 présente l'installation utilisée afin de réaliser l'immersion.

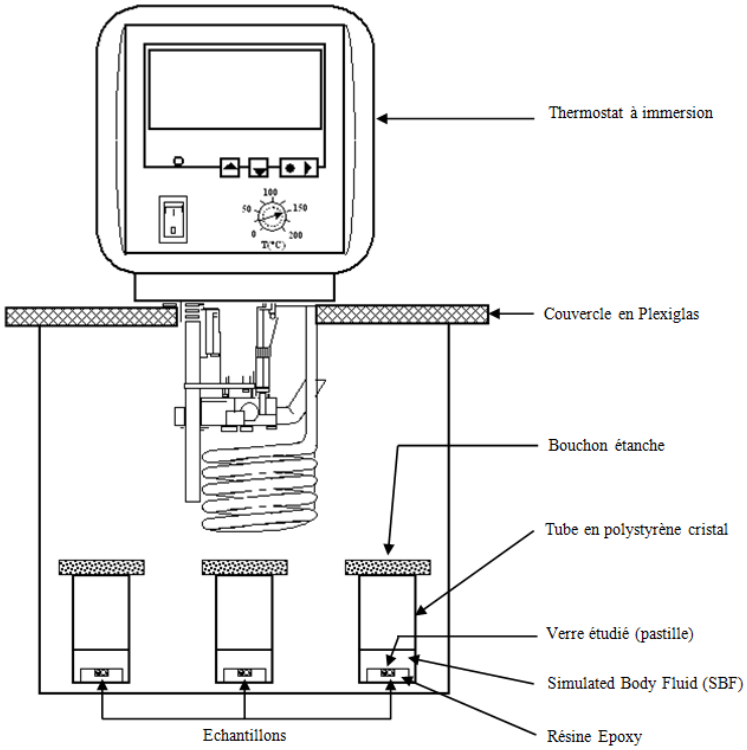


Figure I-II-17 : Montage utilisé pour les tests *in vitro*.

La figure I-II-18a représente le spectre Infra Rouge de l'hydroxyapatite carbonatée synthétique semblable à l'apatite biologique [22]. Ce spectre comporte les bandes d'absorption des phosphates à 1038, 958, 602, 564 et 464 cm^{-1} et une bande de vibration des carbonates à 874 cm^{-1}. Les spectres Infra-Rouges de la surface du verre 47T après immersion sont présentés sur la figure I-II-18b après 3 et 24 heures, 4 et 5 jours d'immersion. Le mode ATR ne permet pas d'obtenir des résultats reproductibles en dessous de 500 cm^{-1}. La bande de vibration δ Si-O-Si à environ 500 cm^{-1} ne pourra donc pas être interprétée.

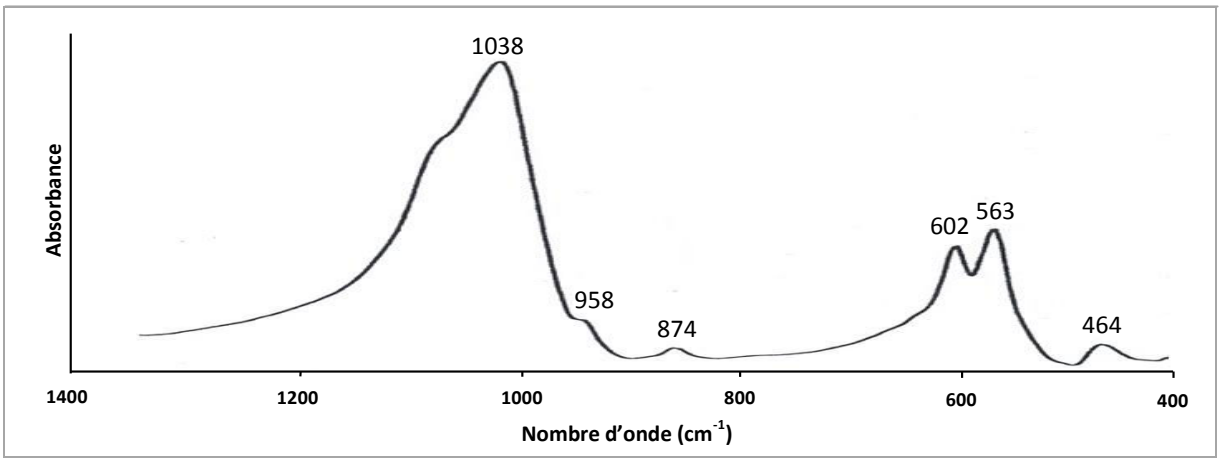


Figure I-II-18a : Spectre infra rouge de l'HydroxyApatite Carbonatée (HAC) biologique d'après M. Vallet-Regi *et al.*[18].

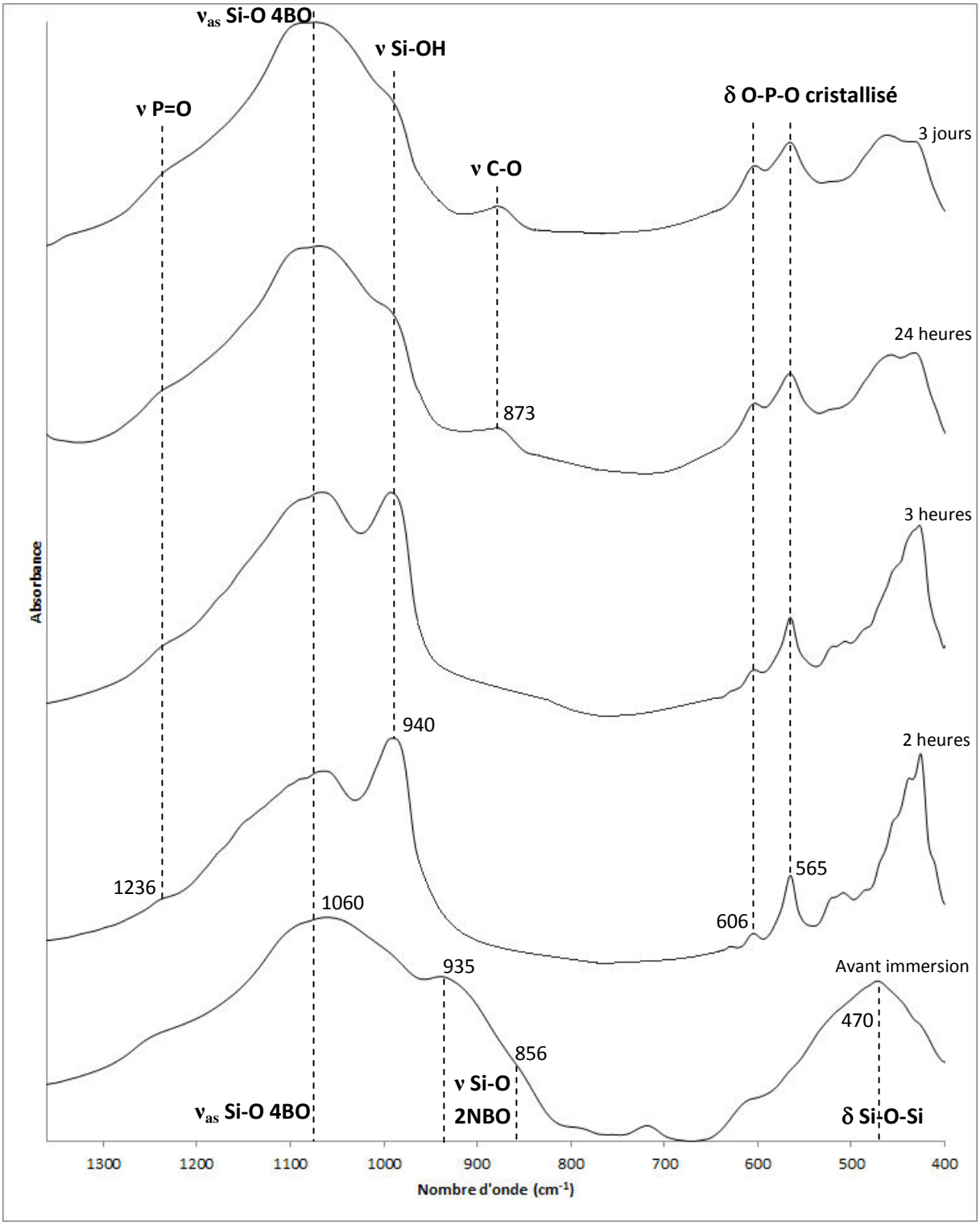


Figure I-II-18b : Résultats FTIR après immersion du verre 47T-A dans le SBF.

L.L. Hench [23] a mis en évidence trois états de surface caractéristiques lors de l'immersion du bioverre de référence 45S5® synthétisé par fusion :

- dans un premier temps, il y a relargage des modificateurs Ca^{2+} et Na^{+} puis formation d'un gel de silice amorphe qui caractérise le début de la réaction du bioverre,

- une couche de phosphate de calcium amorphe précipite ensuite sur le gel,
- le développement de cette couche conduit à l'apparition d'hydroxyapatite cristallisée.

Ces étapes correspondent à celles rencontrées sur la figure I-II-18b.

Avant immersion, les bandes ν Si-O 2NBO à 856 et 935 cm^{-1} et ν_{as} Si-O 4BO à 1060 cm^{-1} sont présentes et indiquent la présence d'oxygènes liés et non liés dans l'échantillon 47T-A. La bande δ Si-O-Si est également présente à 470 cm^{-1} mais ne sera pas interprétée du fait de la mauvaise fidélité du mode ATR en dessous de 500 cm^{-1}.

A 2h d'immersion, ces bandes ne sont plus visibles mais elles sont remplacées par une bande intense à 940cm^{-1} attribuée à ν Si-OH. Les liaisons oxygènes non pontés disparaissent, ce qui traduit une repolymérisation de la surface du verre. Pour un même temps d'immersion, cette bande est beaucoup plus intense pour le 47T-A que pour les verres obtenus par fusion [24].

Cependant, il y a également formation d'apatite cristallisée à 2h d'immersion, comme l'indiquent les deux bandes δ O-P-O cristallisé à 606 et 565 cm^{-1} et la bande ν P=O à 1236 cm^{-1}.

A 3h d'immersion la bande ν_{as} Si-O 4BO à 1060 cm^{-1} s'intensifie. Cela traduit qu'une structure plutôt tridimensionnelle se met en place à la surface du 47T-A : le nombre d'oxygène ponté augmente.

A 24h d'immersion, il y a un élargissement des pics à 606 et 565 cm^{-1} ce qui correspond à une augmentation de la croissance de l'apatite. La bande ν C-O à 873 cm^{-1} indique que des groupements CO_3^{2-} sont présents à la surface : l'apatite formée devient carbonatée.

A partir de 24h et jusque 3 jours, il n'y a plus de changement dans les bandes observées : l'état de surface du 47T-A se stabilise.

2.7. Discussion sur le verre 47T-A

L'alcoolate de calcium convient pour synthétiser un verre ternaire de composition molaire 47% SiO_2, 48% CaO, 5% P_2O_5. Ce verre, qui ne contient pas de fondant Na_2O, se révèle

difficile, voire impossible à réaliser avec des fours conventionnels limités à 1600°C. La méthode sol-gel a rendu possible cette synthèse à 800°C.

Les résultats de l'étude *in vitro* du 47T-A confirment une bioactivité du verre à partir de 2h d'immersion dans le SBF. Il est possible de qualifier le 47T-A de verre bioactif, par la présence des pics de l'HAC à 606 et 565 cm^{-1} mais aussi par la présence de la bande ν P=O à 1236 cm^{-1}. L'apatite obtenue peut être qualifiée d'HAC par la présence à 24h de la bande ν C-O à 873 cm^{-1}.

Cependant, il existe des différences entre la réactivité du bioverre 47T-A sol-gel et un verre bioactif obtenu par fusion : la formation du gel de silice et celle de l'apatite sont accélérées. La taille nanométrique [6] des particules de bioverres obtenues lors de la synthèse sol-gel est responsable de cette forte réactivité. En effet, les échantillons 47T-A sont constitués d'une fine poudre résultante de la synthèse sol-gel qui est compressée sous forme de pastilles. Ces échantillons peuvent présenter une surface spécifique supérieure à celle des blocs massifs de verres obtenus par fusion. Si la surface réactive est plus grande pour le verre sol-gel, il est normal que les étapes de formation du gel et de précipitation de l'apatite deviennent plus rapides.

Le calcium a été incorporé (cf. paragraphe 2.6.4. MEB-EDS page 78), avec pour preuve la création d'une phase cristallisée au-delà du Tc, présente sous forme de silicate de calcium, observable sur le diffractogramme X.
L'EDS nous informe aussi d'un manque de phosphore dans la composition, mais cependant les résultats obtenus doivent être confirmés par une méthode de dosage. En effet, l'EDS est une méthode semi-quantitative, elle « dose » chaque élément par rapport à l'élément le plus présent et l'incertitude est de 1% molaire. Cette dernière peut se cumuler et être d'autant plus importante pour les éléments légers et faiblement présents.

Le diméthanolate de calcium permet donc de former un gel et un verre bioactif ternaire avec un temps de gélification d'environ 30 minutes à C_{sol} = 1,33M.

3. Synthèses de bioverres sol-gel dans le système SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5

3.1. Contexte bibliographique

Le diméthanolate de calcium permet d'obtenir un bioverre inversé dans le système ternaire SiO_2-CaO-P_2O_5 mais son association avec l'éthanolate de sodium ne permet pas de synthétiser une composition quaternaire bien amorphe.

Il est possible d'insérer le sodium dans les compositions quaternaires sol-gel en utilisant d'autres précurseurs comme, par exemple, l'acétate de sodium. A. Yasumori *et al.* ont obtenu des verres dans le système binaire SiO_2-Na_2O avec ce précurseur [25].

Il convient de déterminer si l'utilisation conjointe d'un acétate de sodium avec le diméthanolate de calcium permet d'obtenir un gel et un bioverre quaternaire dans le système SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5.

3.2. Compositions réalisées

Deux compositions de bioverres sol-gel sont étudiées, le suffixe –2A signifie Alcoolate et Acétate :

- la composition de référence des verres bioactifs, le 45S5® de L.L. Hench [26], de composition molaire 46,1% SiO_2-26,9% CaO-24,4% Na_2O-2,6% P_2O_5, noté 45S5Q-2A,
- la composition quaternaire de C. Duée [1] comportant 47% de SiO_2, 26,5% de CaO, 21,5% de Na_2O et 5% de P_2O_5 (% molaire) et notée 47Q-2A.

Ces compositions de verres sont également réalisées par fusion : les échantillons de ceux-ci ont, en effet, des paramètres physico-chimiques et de bioactivité bien connus [1,26]. Ils établissent une référence nécessaire pour comparer la structure et la bioactivité des compositions réalisées par voie sol-gel. Ils sont notés 47Q et 45S5Q. Le verre 45S5Q forme la couche d'HAC à partir de 8 heures d'inmmersion dans le SBF [27]. Le verre 47Q forme la couche en 2 heures 45 pour une épaisseur de 30 µm environ [28].
Le tableau I-II-8 résume l'ensemble des compositions.

Nom	**45S5Q-2A, 45S5Q**	**47Q-2A, 47Q**
Composition molaire	46,1% SiO_2 - 26,9% CaO - 24,4% Na_2O - 2,6% P_2O_5	47% SiO_2 - 26,5% CaO - 21,5% de Na_2O - 5% P_2O_5

Tableau I-II-8 : Compositions réalisées.

3.3. Produits de départ

Le tableau I-II-9 regroupe les produits de départ utilisés dans la synthèse sol-gel des compositions quaternaires 47Q-2A et 45S5Q-2A.

Fonction du précurseur	Nom du produit	Formule	Pureté / Concentration	Masse molaire	Fournisseur
Formateurs de réseau	Tétraéthyl orthosilicate (TEOS)	$(C_2H_5O)_4Si$	99,999 %	208,33 g.mol^{-1}	Aldrich
	Triéthyl phosphate (TEP)	$(C_2H_5O)_3P$	> 99,8 %	182,16 g.mol^{-1}	Aldrich
Modificateurs de réseau	Diméthanolate de calcium	$(CH_3O)_2Ca$	97 %	102,15 g.mol^{-1}	Aldrich
	Acétate de sodium	$C_2H_3NaO_2$	99 %	82,03 g.mol^{-1}	Aldrich
Solvants	Méthanol	CH_3OH	99 %	32 g.mol^{-1}	Prolabo

Tableau I-II-9. Produits de départ avec des modificateurs sous forme d'alcoolates/acétates.

Le tableau I-II-10 regroupe les précurseurs employés dans la synthèse par fusion classique des compositions 47Q et 45S5Q.

Fonction du précurseur	Nom du produit	Formule	Pureté	Masse molaire	Fournisseur
Formateurs de réseau	Silice anhydre	SiO_2	99,9%	60,08 g.mol^{-1}	Merks
	Sel de Graham	NaH_2PO_4	99,9%	119,98 g.mol^{-1}	Aldrich
Modificateurs de réseau	Carbonate de calcium	$CaCO_3$	99,9%	100,09 g.mol^{-1}	Aldrich
	Carbonate de sodium	Na_2CO_3	99,9%	105,99 g.mol^{-1}	Aldrich

Tableau I-II-10. Produits de départ pour la synthèse classique par fusion des verres.

3.4. Mode opératoire

- Synthèse sol-gel alcoolique

La quantité molaire finale de verre souhaitée, n_{verre}, est déterminée. Elle permet de déduire la masse de formateurs et de modificateurs pour chaque composition en correspondance avec la composition molaire du verre.

La concentration en verre dans le sol, C_{sol}, est étudiée de 0,5M à 1,5M, afin de déterminer le volume de solvant le plus efficace dans le cadre de cette méthode de synthèse.
Tous les alcoolates (Si, P, Ca) et l'acétate de sodium sont pesés avec précision puis mélangés pendant trente minutes dans un bécher contenant du méthanol. Le volume de solvant est calculé à l'aide de C_{sol} et de n_{verre}.

Afin d'entraîner la gélification, l'amorçage de l'hydrolyse de tous les alcoolates est réalisé en ajoutant une quantité stœchiométrique d'eau, $n_{H_2O} = 4n_{TEOS} + 3n_{TEP} + 2n_{Ca(OCH_3)_2}$.
Le gel se forme à température ambiante, au bout d'un temps noté t_{gel}. Une fois le gel séché à l'air libre (24 à 48h), le bécher est placé dans une étuve à 130°C pendant 24h.

- Synthèse par fusion classique

Les masses des composés formateurs (Si et P) ainsi que celles des modificateurs (Ca et Na) sont déterminées à l'aide des compositions molaires. Toutes les poudres sont broyées indépendamment dans un mortier en agate puis elles sont mélangées dans un mortier. Cela permet d'assurer une bonne homogénéité.
Le mélange résultant est réparti dans un ou plusieurs creusets de platine afin que le niveau de poudre ne dépasse pas le premier tiers de chaque creuset. En effet, les précurseurs sont majoritairement des carbonates dont la décomposition thermique entraîne un dégagement de CO_2 vers 800°C. Si aucune précaution n'est prise, le mélange de poudre va mousser à haute température, entrainant un débordement hors du creuset.

Les creusets sont alors placés au four électrique. Après un palier de trois heures à 800°C qui permet de décarbonater les précurseurs, la fusion est obtenue à 1400°C et elle est maintenue pendant au minimum deux heures pour homogénéiser le mélange. Passé ce délai nécessaire à une bonne homogénéité, les verres en fusion sont coulés rapidement sur une plaque en acier à température ambiante. Après refroidissement, les verres sont finement broyés, à l'aide d'un mortier en agate, pour analyses.

3.5. Analyses

3.5.1. Mesure de t_{gel}

La mesure du temps de gel des compositions 45S5Q-2A et 47Q-2A est effectuée à l'aide d'un chronomètre, pour des concentrations en verre dans le sol de 0,5M, 0,83M, 1M, 1,33M. La figure I-II-19 présente les résultats pour le 47Q-2A et la figure I-II-20 ceux du 45S5Q-2A.

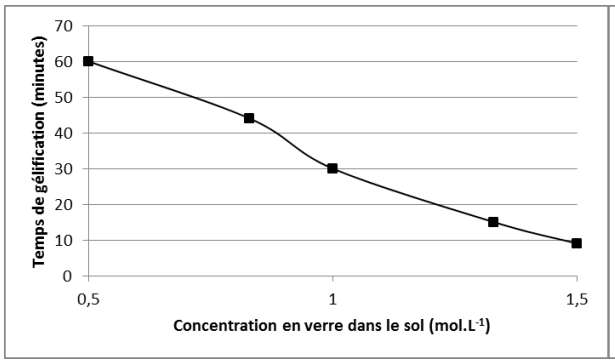


Figure I-II-19 : t_{gel} en fonction de C_{sol} pour la composition 47Q-2A

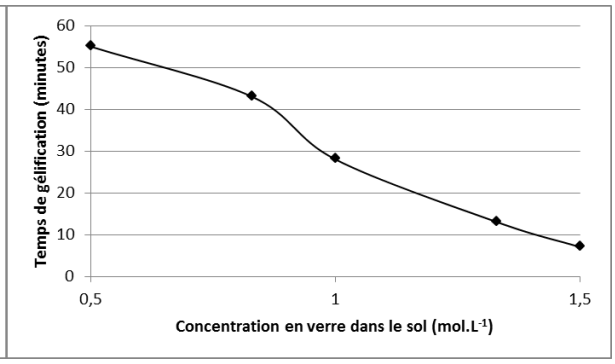


Figure I-II-20 : t_{gel} en fonction de C_{sol} pour la composition 45S5Q-2A.

La formation du gel 45S5Q-2A est semblable à celle du composé 47Q-2A. Il y a une différence de quelques minutes qui est facilement expliquée par l'analyse du rapport formateur/modificateur (cf. page 39) qui influence la cinétique de formation des gels de silice.

Pour le 45S5Q-2A, ce rapport est de 0,95 contre 1,08 pour le 47Q-2A. Le 45S5Q-2A est donc plus riche en éléments modificateurs que le 47Q-2A. Cette différence va impliquer un réseau plus substitué qui se forme donc plus rapidement.
Il est possible de déterminer la meilleure concentration de verres dans les sols. En effet, il a été observé que :

- à 0,5 et 0,83 M, une fine poudre blanche est obtenue à la fin du séchage,
- à 1 et 1,33 M, des petits monolithes transparents se forment après le séchage. Leur taille moyenne est de 0,5 mm à 1 M et de 1mm à 1,33 M,
- à 1,5 M les monolithes obtenus sont blancs opaques. Ils n'ont aucune résistance mécanique, et se transforment en poudre facilement.

Il faut donc travailler avec une concentration en verre située à 1,33 M pour favoriser le plus possible la formation d'une phase translucide qui présente une certaine robustesse mécanique

par rapport à un amas de poudre. Cette phase semble intéressante pour obtenir des verres sol-gel à l'aspect et aux comportements physico-chimiques proches de ceux obtenus par fusion classique.

Cependant, la cinétique de formation est rapide à 1,33 M : environ 15 minutes pour les deux compositions, ce qui peut être trop court pour réaliser des dépôts par trempage retrait. Il est possible de tremper le bécher contenant le gel dans un bain de glace ce qui a pour conséquence de ralentir sa formation. Dans le cadre de la synthèse sol-gel du 45S5Q-2A et 47Q-2A, un bain de glace à 0°C a permis de ralentir la formation des gels jusqu'à 1h30.

3.5.2. Observations sur le vieillissement des gels

Une fois le point de gélification atteint, un réseau amorphe est formé. Cependant, les gels de silice et de phosphore continuent d'évoluer chimiquement assez longtemps après leur formation.

Dans les verres, les atomes de formateurs de réseau (silicium, phosphore) sont entourés par des atomes d'oxygènes qui les connectent deux à deux : il s'agit des oxygènes pontant (Si-O-Si). Lorsque les formateurs sont connectés à un ou plusieurs éléments modificateurs (calcium ou sodium) l'oxygène qui les relie est dit non pontant (Si-O-Ca ou Si-O-Na). Le nombre d'oxygènes pontant entourant l'atome central est alors défini par le terme Qn. Pour le silicium qui est tétravalent, n peut varier entre 0 et 4.

Au point de gélification, des études RMN [29] ont montré qu'il existe une forte concentration d'unités de silice sous forme Q2 dans le solvant situé entre les particules de gels. Avec le temps, ces unités évoluent en forme Q3 et Q4. Il y a donc augmentation du nombre d'oxygènes liés. Ce phénomène est appelé le vieillissement du gel. Le passage d'entité Q2 à Q3 et Q4 indique que le réseau vitreux se réticule par la formation d'autres liaisons Si-O-Si. En conséquence, le gel se contracte et expulse le solvant au cours du processus de synérèse.

Cette étape est réalisée en 24 à 48 heures pour les compositions sol-gel alcoolate. Elle est interrompue lorsque le solvant, expulsé par la synérèse, s'est totalement évaporé du bécher. Dans les conditions de cette étude, l'hygrométrie et la température peuvent varier pendant le vieillissement des gels à l'air libre. Ce comportement peut conduire à une vitesse

d'évaporation différente d'une synthèse à une autre et nuit à la reproductibilité des manipulations.

L'étape qui suit le vieillissement est le séchage. Il conduit à l'élimination du solvant restant dans la structure du gel. Ce dernier est alors dégradé, si la montée en température est trop rapide et si la pression de vapeur saturante du solvant n'est pas maintenue [6]. L'élévation de température provoquée une étuve est trop brusque. Pour éviter cela, il faudrait monter progressivement le gel à sa température de séchage, dans une enceinte où les taux de vapeurs sont contrôlés.

Les gels vieillis du procédé alcoolate à 1,33M laissés 24h dans une étuve se fracturent beaucoup, mais restent des monolithes. A ce moment, à l'intérieur même de ceux-ci, il reste beaucoup de molécules qui n'ont pas été évacuées : des molécules carbonées issues des précurseurs et des solvants. L'objectif de la stabilisation thermique est donc double : amener le gel entre la température de transition vitreuse et celle de cristallisation pour obtenir un verre et éliminer les dernières transformations gazeuses.
Le départ de ces molécules à plus haute température peut encore modifier la structure vitreuse en formation. Des analyses thermiques permettent de mettre en évidence ces différentes évolutions.

3.5.3. ATG/ATD

Des analyses ATD/ATG sont effectuées sur les gels 45S5Q-2A et 47Q-2A. Le résultat de l'analyse du 45S5Q-2A est présenté sur la figure I-II-21 et celui du 47Q-2A sur la figure I-II-22. Les analyses sont effectuées de 40 jusqu'à 900°C, à une vitesse de chauffe de 5°C/min. Un flux d'azote évite les combustions et chasse les gaz formés.

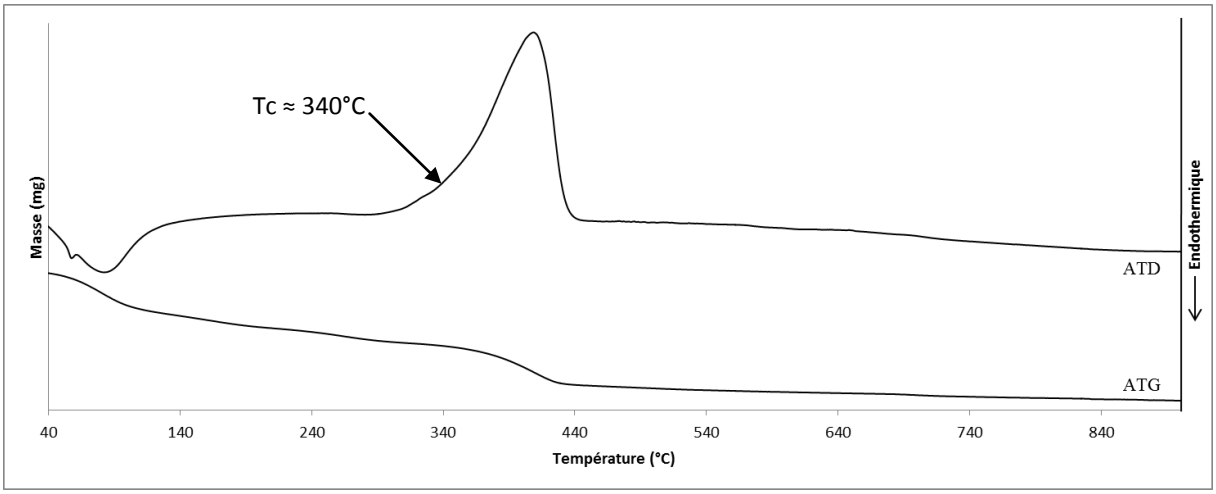


Figure I-II-21 : Analyse ATD/ATG sur le gel 45S5Q-2A (5°C/min).

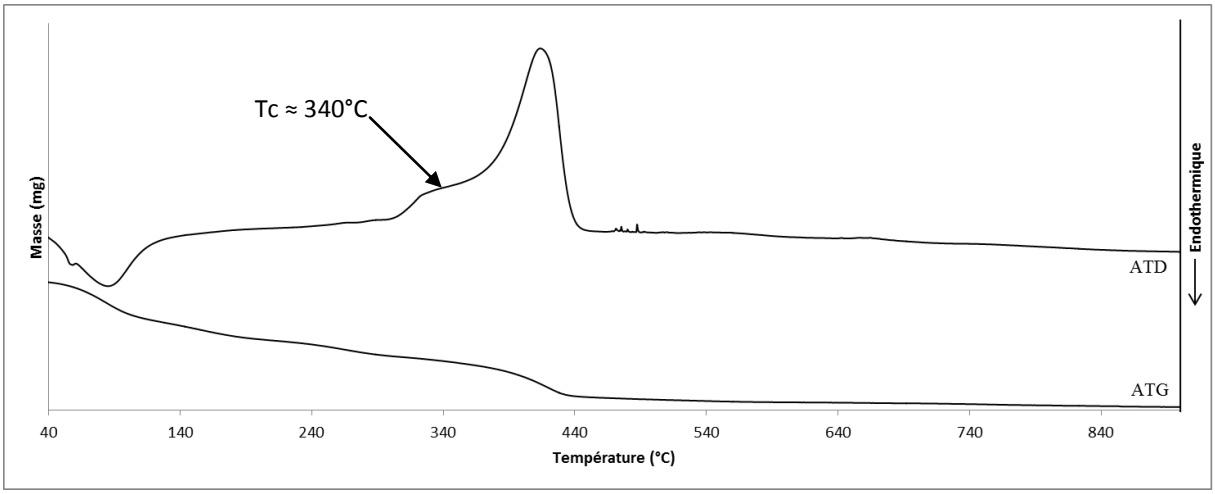


Figure I-II-22 : Analyse ATD/ATG sur le gel 47Q-2A (5°C/min).

L'analyse des figures I-II-21 et I-II-22 ne montre pas de différence importante entre les mesures effectuées sur les gels 45S5Q-2A et 47Q-2A. En effet, pour ces deux compositions, l'analyse thermogravimétrique indique que la majorité des pertes de masses ont lieu entre 40 et 450°C.

Les profils des analyses thermo-différentielles sont également identiques : à partir de 340°C pour les deux gels un large pic exothermique est visible. Parallèlement, l'ATG montre que les compositions continuent à perdre de la masse.

Il n'est pas possible d'observer le comportement d'une structure vitreuse classique. En effet, pour un verre un changement de la ligne de base correspondant au Tg du verre est observé, suivi d'un pic exothermique à la température Tc indiquant la cristallisation du réseau. Pour les

deux compositions étudiées un seul large pic exothermique est visible : il est attribuable à une cristallisation.
Il est possible d'émettre l'hypothèse suivante : le Tg n'est pas visible car il y a eu formation rapide d'une phase cristallisée à partir de la phase amorphe. Le signal de celle-ci se trouve alors masqué par le pic exothermique à 370°C. Cette température correspond aussi, sur l'ATG, aux moments où les pertes de masses sont les plus importantes.

Dans les gels de silice, les éléments modificateurs sont présents sous forme d'ions ou de nanoparticules [6]. Les liaisons avec les formateurs hydrolysés sont également de nature ionique. Une montée en température trop rapide entraîne des départs brutaux dans le gel, ce qui provoque une ouverture de ces liaisons chimiques faibles à relativement faibles [6].

Le gel, même séché à 130°C, comprend encore des solvants et d'autres molécules carbonées emprisonnées dans sa structure. Une élévation douce de la température permet aux gaz de s'échapper en ne dégradant que le minimum de liaisons. *A contrario*, avec une montée en température rapide, la quantité de matière vaporisée augmente pour un temps donné. Cela peut conduire à une pression interne trop élevée pour la structure amorphe. L'augmentation de la distance inter-atomes provoquée affaiblit les liaisons ioniques du calcium et du sodium avec le réseau de silice-phosphore. Avec l'agitation thermique, les modificateurs peuvent alors trouver une nouvelle organisation stable. Ils cristallisent sans doute avec les autres ions encore présents.

De nouvelles analyses thermiques à une vitesse de chauffe plus faible ont été faites afin de vérifier cette hypothèse. Elles sont réalisée sur le 45S5Q-2A et le 47Q-2A à une vitesse de chauffe égale à 1°C/min. Les résultats sont présentées sur les figures I-II-23 et I-II-24.

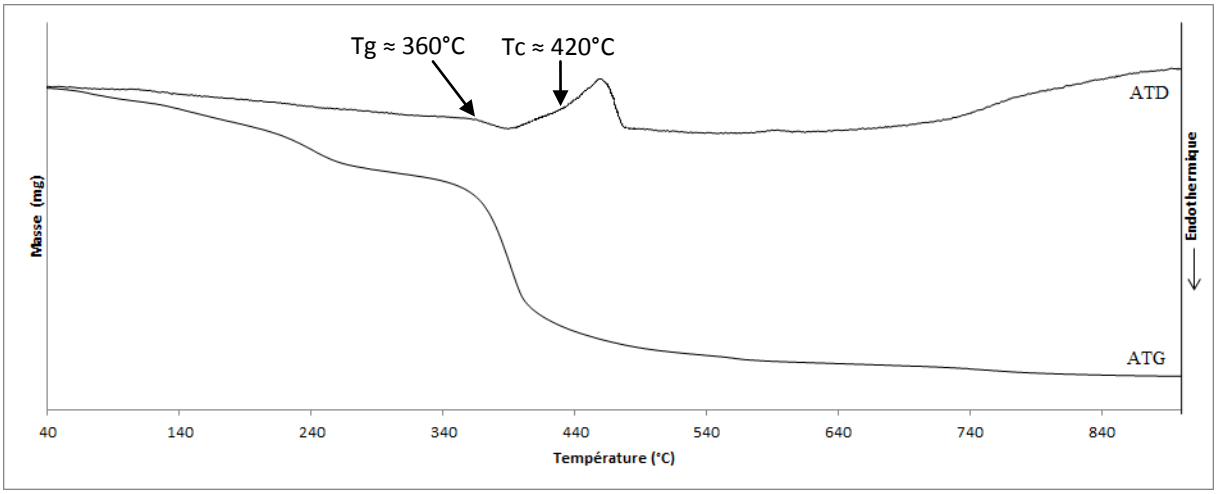


Figure I-II-23 : Analyse ATD/ATG sur le gel 45S5Q-2A (1°C/min).

La figure I-II-23 définit les conditions de stabilisation du gel 45S5Q-2A. L'ATG indique que la majorité des pertes ont lieu entre 40 et 450°C. L'ATD indique un pic endothermique qui permet de placer le Tg du verre 45S5Q-2A à environ 360°C. Sur l'ATG, la majorité des pertes ont lieu à cette température. Après la transition vitreuse, un pic exothermique faible en intensité est visible. Il permet de déterminer le Tc, qui est d'environ 420°C pour le 45S5Q-2A. La température de 400°C située entre Tg et Tc permettrait donc d'obtenir un verre quaternaire stabilisé en maximisant les pertes de molécules carbonées.

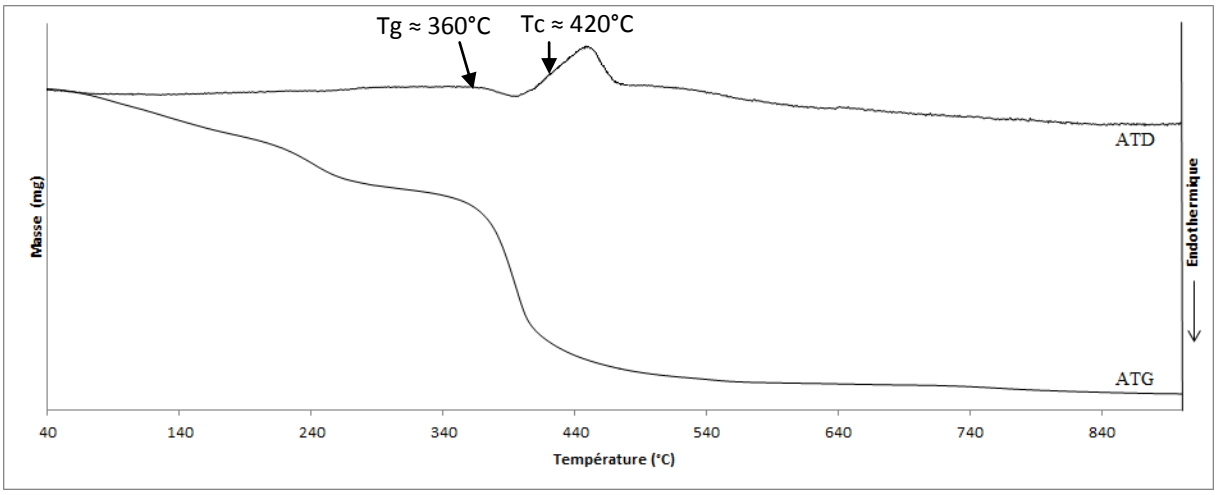


Figure I-II-24 : Analyse ATD/ATG sur le gel 47Q-2A (1°C/min).

Le raisonnement suit le même cheminement pour le gel 47Q-2A. L'analyse de l'ATD/ATG de la figure I-II-24 permet de donner la valeur de la température de transition vitreuse environ égale 360°C ainsi que la température de cristallisation Tc ≈ 420°C. La température de 400°C, située entre Tg et Tc, permettrait donc d'obtenir un verre de composition 47Q-2A.

Les deux composés 47Q-2A et 45S5Q-2A ne présentent pas de différences majeures dans leurs températures caractéristiques. En effet, la composition des deux verres n'est pas assez éloignée.

Lors de cette analyse thermique, les Tg et les Tc des verres ont pu être déterminés. Le pic exothermique identifié sur les figures I-II-21 et I-II-22 n'est pas visible à la vitesse de chauffe de 1°C/min. Cela confirme que la stabilisation du gel en verre nécessite un traitement thermique lent pour ne pas dégrader la structure par une cristallisation du réseau.

A ce stade, il est nécessaire de caractériser la nature des phases présentes lors d'un traitement thermique à 1°C/min. Pour cela, des analyses par diffraction des rayons X sont réalisées après un traitement thermique et une trempe des échantillons.

3.5.4. Diffraction des rayons X (DRX)

La figure I-II-25 montre les résultats de diffraction X concernant le chauffage du gel 45S5Q-2A aux températures de 130, 400, 450, 500, 600 et 700°C. La montée en température est proche de 1°C/min et la température désirée est maintenue durant 24 heures, suivie d'une trempe. L'échantillon est ensuite analysé.
La figure I-II-26 illustre les résultats de la diffraction X pour le chauffage du gel 47Q-2A aux mêmes températures que le 45S5Q-2A.

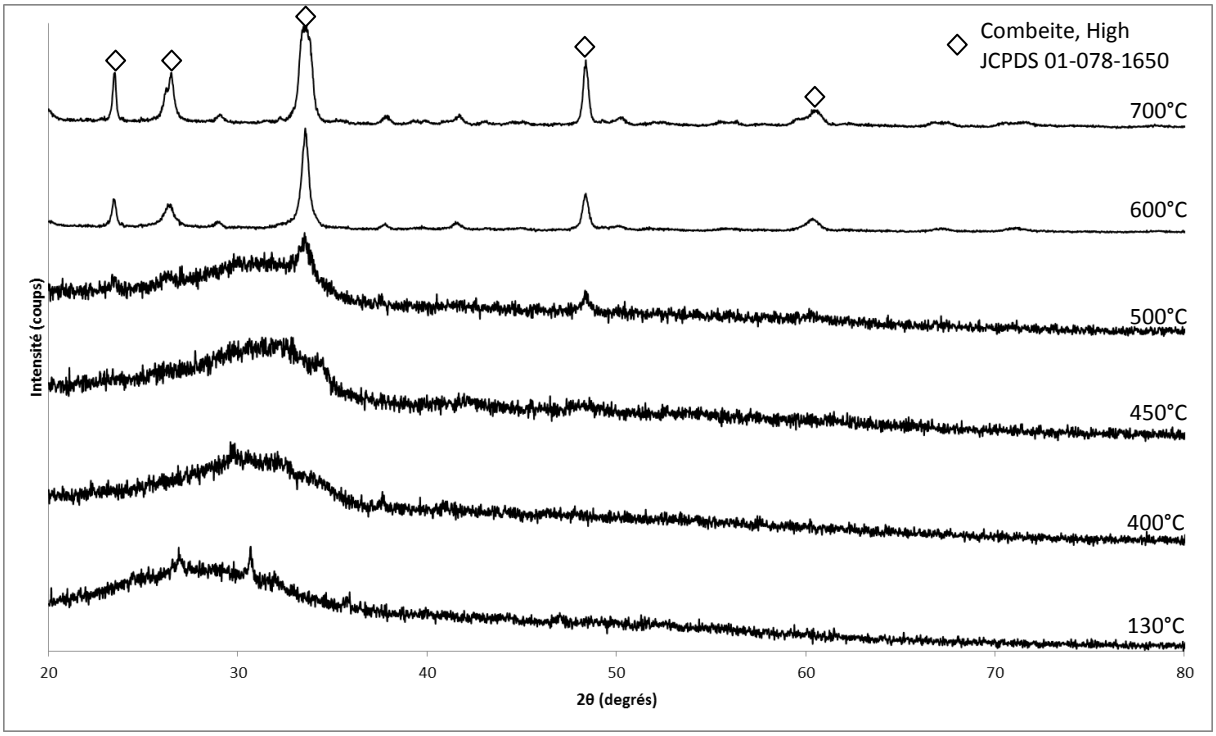


Figure I-II-25 : Diffractogrammes de l'échantillon 45S5Q-2A.

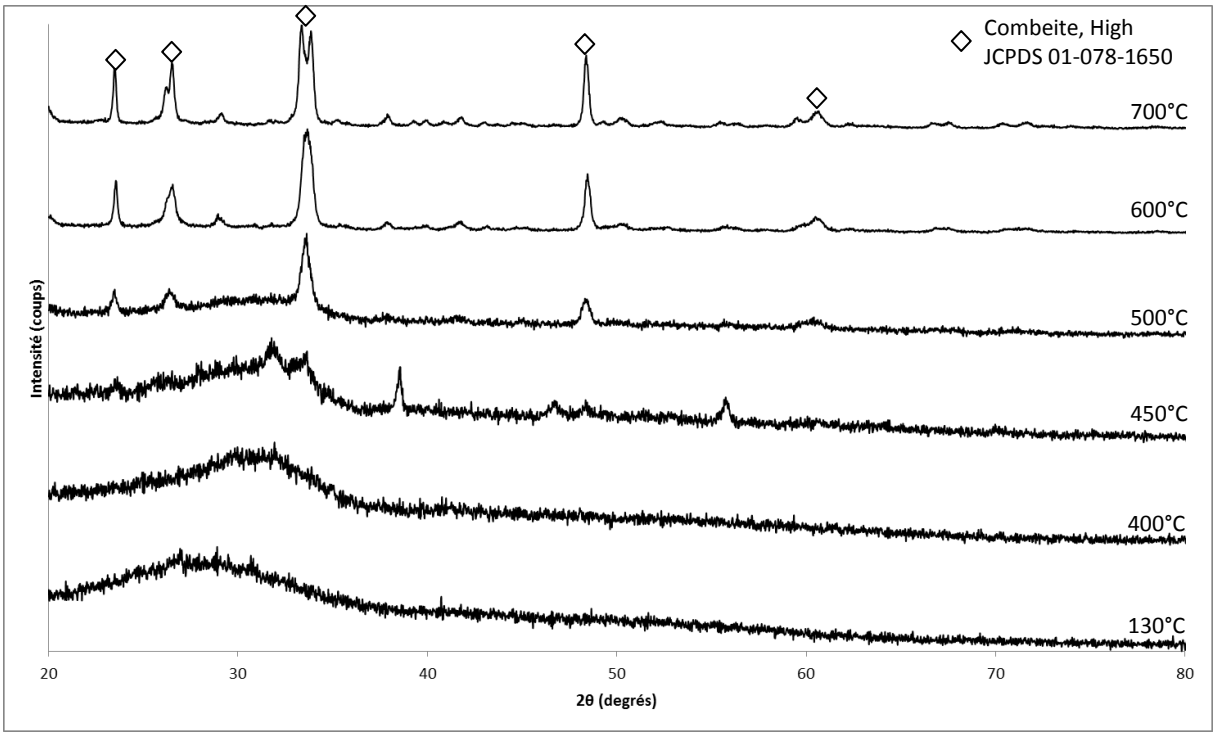


Figure I-II-26 : Diffractogrammes de l'échantillon 47Q-2A.

L'analyse des figures I-II-25 et I-II-26 indique que l'utilisation d'acétate de sodium comme précurseur de sodium est un bon choix pour obtenir des verres amorphes.

Le 47Q-2A séché à 130°C présente un massif amorphe sans pic de cristallisation. Le 45S5Q-2A présente une légère trace de cristallisation à cette température, qui n'est pas identifiable. Il s'agit probablement d'un des précurseurs du sol.

Cependant, cette cristallisation disparait à 400°C, donnant un massif amorphe bien défini pour les deux compositions. Cette disparition montre que la phase amorphe présente dans les gels continue d'évoluer chimiquement lors du traitement thermique. Avec la température, le réseau sol-gel forme de nouvelles liaisons oxygènes non liés [6], la formation de ces liaisons peut inclure des éléments cristallisés.

Les deux verres cristallisent à 450°C soit une température voisine de celle obtenue avec l'ATD/ATG réalisés à la même vitesse de chauffe. Cette phase cristalline croît aux températures supérieures pour être facilement identifiée à 700°C comme de la Combéite High ($Na_{5,27}Ca_3(Si_6O_{18})$) [30].

Après le passage à 400°C, les deux verres gardent une couleur grisâtre : le carbone issu des précurseurs est encore piégé dans la structure du verre. Ce carbone semble toutefois se présenter sous forme amorphe ou il n'est pas en quantité suffisante pour être détecté par la diffraction X. Afin d'en savoir plus sur la chimie intime des différentes compositions, des analyses infrarouges par transformée de Fourier (IRTF) en été réalisées en fonction de la température de traitement thermique.

3.5.5. Analyses IRTF

Afin de vérifier que le chauffage des gels 45S5Q-2A et 47Q-2A à 400°C conduit bien à un verre, la spectroscopie Infra-Rouge en mode ATR est utilisée sur ces deux échantillons. Les figures I-II-27 et I-II-28 présentent les spectres des composés 45S5Q-2A et 47Q-2A aux températures de 130, 400, 450, 500 et 600°C. Les verres 45S5Q et 47Q obtenus par fusion y sont ajoutés pour servir de références spectrales.
Les spectres des figures I-II-27 et I-II-28 montrent que les gels secs à 130°C du 45S5-A et du 47Q-2A évoluent de façon similaire avec la montée en température.

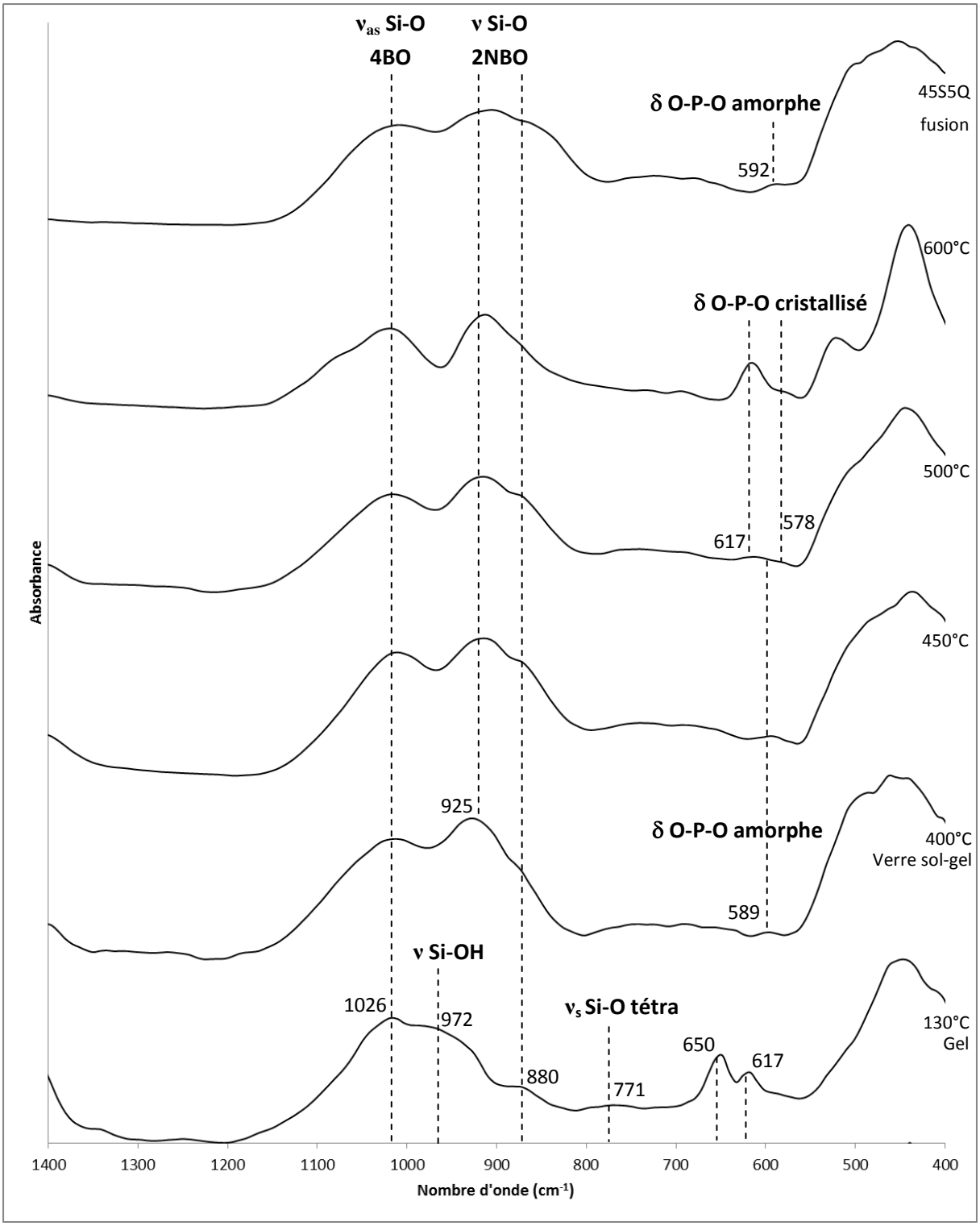


Figure I-II-27 : Spectres Infra-Rouges de la composition 45S5Q-2A.

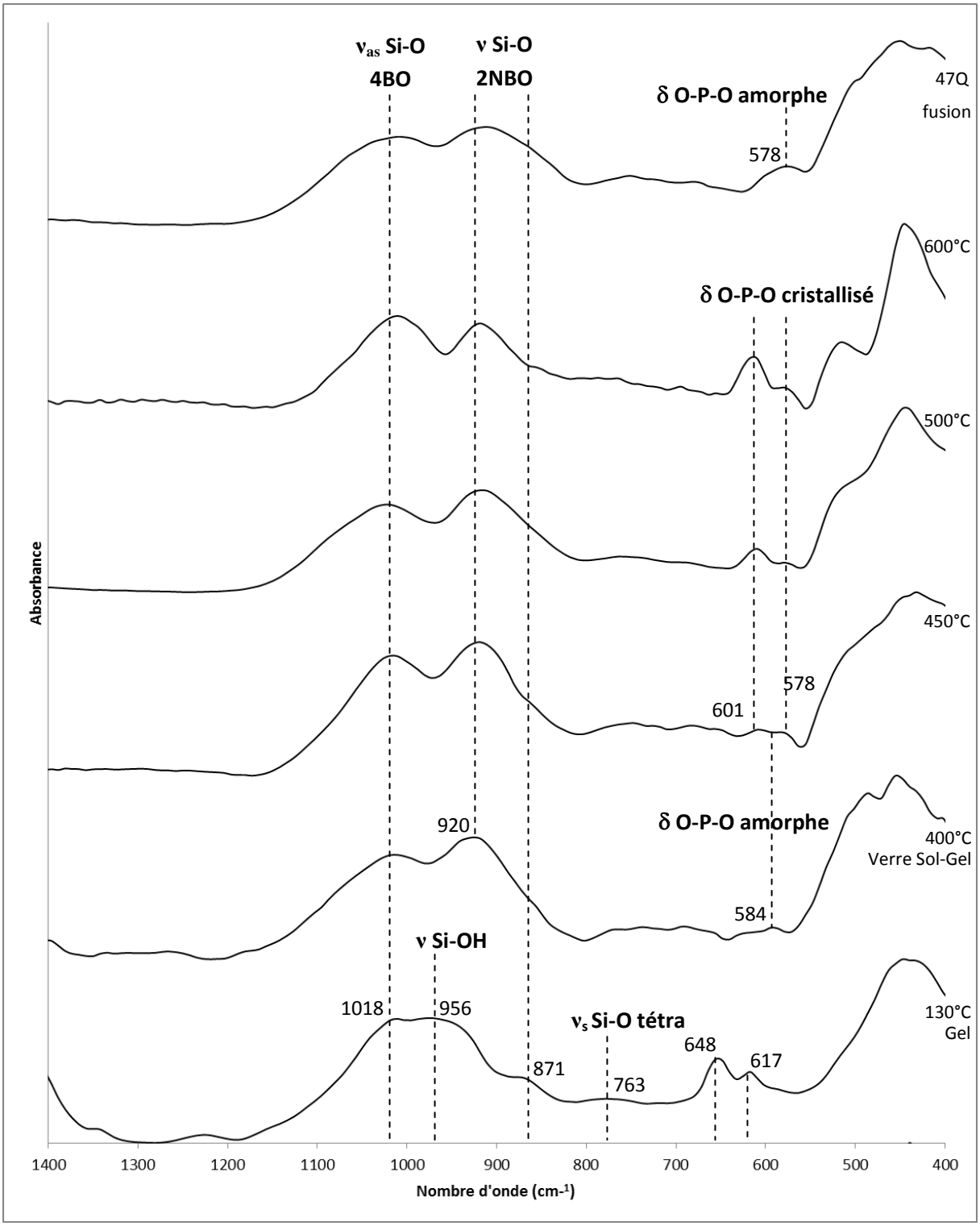


Figure I-II-28 : Spectres Infra-Rouges de la composition 47Q-2A.

Les gels à 130°C peuvent être facilement identifiés par la présence des bandes ν Si-OH et ν_s Si-O tétraédrique à 972 et 771 cm^{-1} pour le 45S5Q-2A et à 956 et 763 cm^{-1} pour le 47Q-2A. La silice se trouve en effet sous forme de tétraèdres SiO_4 dans les gels, où elle s'agence avec de nombreuses liaisons Si-OH. L'une des deux bandes ν Si-O 2NBO à 880 cm^{-1} pour le 45S5-

A et à 871 cm^{-1} pour le 47Q-2A est déjà visible. Elle indique la présence d'oxygènes non liés. La bande ν_{as} Si-O 4BO à 1026 cm^{-1} pour le 45S5-A et à 1018 cm^{-1} pour le 47Q-2A est également présente. Deux bandes inconnues visibles vers 650 et 617 cm^{-1} doivent être provoquée par un séchage incomplet : des liaisons OH doivent encore être en grand nombre dans le composé à 130°C.

A 400°C, ces bandes inconnues ont disparues, ce qui confirme un défaut de séchage. La deuxième bande ν Si-O 2NBO est visible à 925 cm^{-1} pour le 45S5Q-2A et à 920 cm^{-1} pour le 47Q-2A, alors que les bandes ν Si-OH et ν_s Si-O tétraédrique sont masquées. Cela indique que le réseau de silice présent s'est repolymérisé lors du traitement à 400°C en intégrant les éléments présents dans le gel. Une légère apparition de la bande de δ O-P-O amorphe à environ 590 cm^{-1} montre que le phosphore est également bien intégré au réseau de la silice.

Pour les températures supérieures, le dépassement du Tc entraîne l'intensification des deux bandes δ O-P-O cristallisé à 617 cm^{-1} et 578 cm^{-1} pour le 45S5Q-2A et à 601 cm^{-1} et 578 cm^{-1} pour le 47Q-2A. Cette phase n'a pas été détectée lors de la diffraction X, certainement masquée par la Combéite High, un silicate de calcium et de sodium qui ne contient pas de phosphore.

Il est intéressant d'observer qu'à 400°C, toutes les bandes du 45S5Q-2A et du 47Q-2A trouvent leurs équivalences dans les spectres des verres 45S5Q-2A et 47Q obtenus par fusion. Cette température permet donc d'obtenir des verres sol-gel à la structure chimique très proche des verres à 1400°C.

Les bioverres fusion de mêmes compositions étant bioactifs, il est nécessaire de vérifier si la même bioactivité est conservée pour les verres sol-gel obtenu à 400°C. C'est l'objet de l'étude suivante, qui consiste à analyser la surface du verre après immersion dans du fluide physiologique simulé ou SBF.

3.5.6. Etude de la bioactivité

Une étude de bioactivité par immersion dans le SBF a été effectuée. Pour la réaliser, les deux verres sol-gel, 45S5Q-2A et 47Q-2A traités à 400°C, sont broyés à l'aide d'un mortier en agate puis pastillés à un diamètre de 1,4cm à l'aide d'une presse. Les pastilles sont résinées

pour n'exposer qu'une surface S=1,54 cm² une fois immergées dans un volume de 50mL de SBF, le rapport S/V est donc de 0,03 cm^{-1}. La température est maintenue à 37°C tout le temps de l'étude.

Ces études FTIR sont comme précédemment réalisées en mode ATR, qui permet une mesure directe de l'état de surface des pastilles. Le mode ATR nécessite un échantillon parfaitement plat pour donner des signaux de bonnes intensités. Les pastilles une fois immergées ne sont plus planes car la réaction dans le SBF engendre des défauts de surface. Il faut donc effectuer plusieurs mesures à différents endroits de la pastille pour trouver une zone plane, ce qui peut également endommager le dépôt. Cette méthode de mesure donne toutefois de meilleurs résultats que la technique du grattage de la surface suivie d'une analyse avec du KBr. En effet, la pastille n'est pas dense mais constituée de poudre : trop de verre est arraché lors du grattage, ce qui nuit à la détection du dépôt.

Les résultats de la spectroscopie Infra-Rouge sont présentés sur les figures I-II-29 et I-II-30. Sur ces figures, il est possible de constater que la réponse des verres 45S5Q-2A et 47Q-2A après immersion dans le SBF est similaire. C'est pourquoi il a été choisi de détailler l'analyse du 45S5Q-2A.

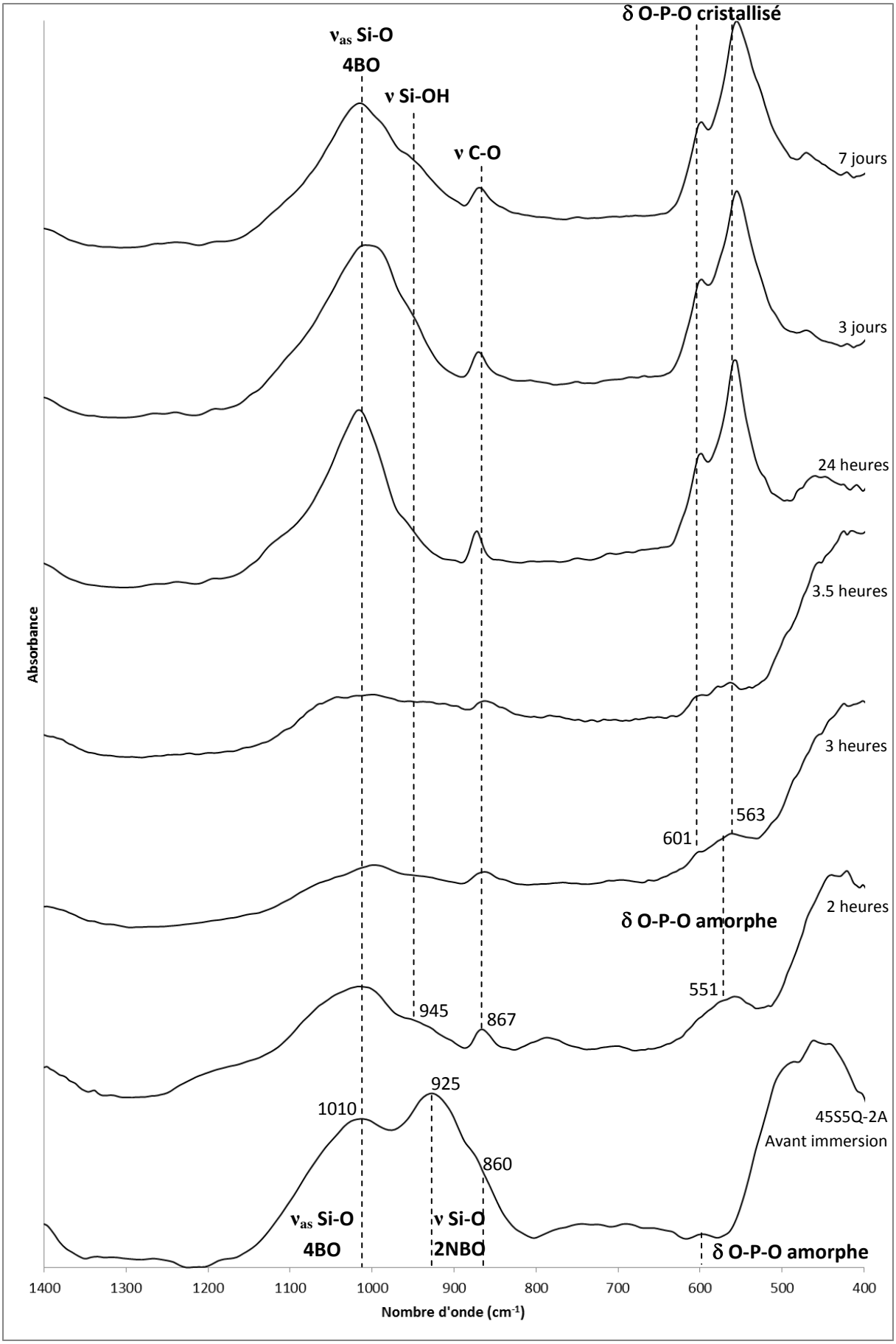


Figure I-II-29 : Spectres Infra-Rouges après immersion dans le SBF du 45S5Q-2A.

Avant immersion, la bande ν_{as} Si-O 4BO à 1010 cm^{-1} ainsi que la double bande ν Si-O 2NBO à 925 et 860 cm^{-1} sont présentes sur le spectre du composé. Il y a également des traces de liaisons O-P-O amorphe, qui prouve que le phosphore est présent dans le verre.
Immédiatement après 2h d'immersion dans le SBF, ces bandes sont substituées par la bande ν Si-OH à 945 cm^{-1}. Cela signifie que la surface de l'échantillon s'est repolymérisée en transformant les liaisons NBO du verre en liaisons Si-OH. Ces liaisons caractérisent la formation d'un gel de silice. La bande ν C-O apparait à 867 cm^{-1}, beaucoup plus tôt dans le temps que pour la composition ternaire 47T-A et les verres par fusion [24]. La présence de cette bande est due au carbone introduit par les acétates et qui n'a pas quitté le verre lors du chauffage. A 2h d'immersion, l'intensification de la bande de déformation asymétrique δ_{as} O-P-O amorphe à 551cm^{-1} démontre que le dépôt d'apatite est en cours.

Cette bande se dédouble à 3h et 3h30 en deux bandes de déformation δO-P-O à 563 et 601 cm-1, montrant la formation d'apatite cristallisée. Les carbonates déjà présents permettent d'affirmer que le bioverre forme de l'hydroxyapatite carbonatée. Sur les spectres à 24h, 3 jours et 7 jours, la présence de l'apatite cristallisée devient progressivement majoritaire face aux bandes du verre initial.

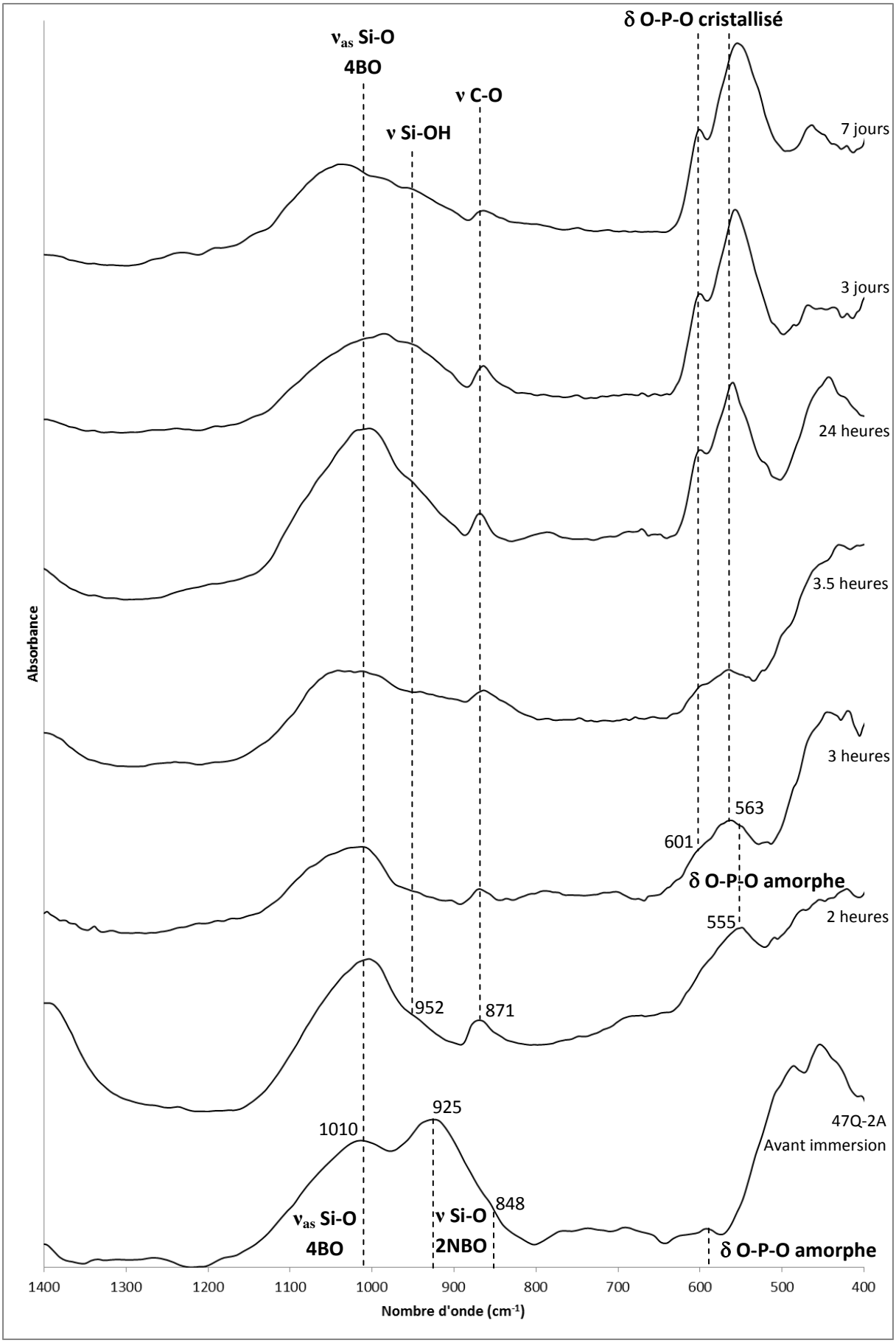


Figure I-II-30 : Spectres Infra-Rouges après immersion dans le SBF du 47Q-2A.

3.5.7. EDS/MEB

Le verre 47Q-2A est broyé dans un mortier en agate puis pastillé pour qu'une analyse MEB-EDS soit réalisée sur trois points de mesures. Le tableau I-II-11 présente les résultats. Les mêmes étapes sont réalisées pour le verre 45S5Q-2A et les résultats sont présentés dans le tableau I-II-12.

	1er point		**2ème point**		**3ème point**	
	% masse	**% atomes**	**% masse**	**% atomes**	**% masse**	**% atomes**
O	50	65	50	65	50	64
Si	19	14	20	15	20	15
P	1	1	2	1	2	1
Ca	15	8	16	8	15	8
Na	14	12	12	11	13	12

Tableau I-II-11 : Résultats EDS du verre 47Q-2A.

	1er point		**2ème point**		**3ème point**	
	% masse	**% atomes**	**% masse**	**% atomes**	**% masse**	**% atomes**
O	45	59	45	59	45	58
Si	20	15	20	15	19	14
P	1	1	1	1	1	1
Ca	15	8	16	9	15	8
Na	19	18	20	18	19	17

Tableau I-II-12 : Résultats EDS du verre 45S5Q-2A.

L'analyse MEB-EDS étant essentiellement une méthode d'analyse semi-quantitative, l'analyse des tableaux I-II-11 et I-II-12 met en évidence que les verres 47Q-2A et 45S5Q-2A contiennent du Si, du Na, du Ca et du P. La composition théorique ainsi que la moyenne des mesures réalisée sur les trois points expérimentaux du 47Q-2A et du 45S5Q-2A sont résumées dans les tableaux I-II-13 et I-II-14 respectivement.

	% masse		% atome	
	théorique	**moyenne**	**théorique**	**moyenne**
O	42,06	50±1	56,90	65±1
Si	20,75	20±1	16,01	15±1
P	4,88	1±1	3,41	1±1
Ca	16,72	15±1	9,03	8±1
Na	15,57	13±1	14,65	12±1

Tableau I-II-13 : Composition théorique et expérimentale du verre 47Q-2A.

	% masse		% atome	
	théorique	**moyenne**	**théorique**	**moyenne**
O	40,65	45±1	55,20	59±1
Si	21,02	20±1	16,26	15±1
P	2,61	1±1	1,83	1±1
Ca	17,51	15±1	9,49	8±1
Na	16,83	20±1	17,21	18±1

Tableau I-II-14 : Composition théorique et expérimentale du verre 45S5Q-2A.

L'observation des tableaux I-II-13 et I-II-14 permettent d'établir qu'il manque du phosphore dans les composés 47Q-2A et 45S5Q-2A. Comme lors de l'analyse EDS du composé 47T-A, le dosage d'élément dopant comme le phosphore ne donne pas des résultats représentatifs avec cette méthode. Pour les autres éléments des deux verres, la composition est proche de la composition théorique.

3.6. Discussion

La synthèse de bioverres de composition 45S5Q-2A et 47Q-2A est possible avec une méthode de synthèse impliquant l'utilisation de l'acétate de sodium couplé avec le diméthanolate de calcium. Les gels secs obtenus sont amorphes, de même que leurs verres stabilisés à 400°C. La phase cristalline, qui apparaît au-delà de 450°C, est identique pour le 45S5Q-2A et le 47Q-2A et est identifiée comme de la Combéite High. Cette phase est régulièrement observée dans la bibliographie traitant de la cristallisation des verres du domaine SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5 obtenus par fusion [5]. Ce comportement renforce la similitude avec les verres issus de la synthèse sol-gel.

Le séchage des gels obtenus avec l'acétate de sodium et le diméthanolate de calcium donne un aspect différent de celui obtenu avec les autres précurseurs. En effet, les méthodes de synthèses plus conventionnelles décrites en 1. et 2. entraînent l'apparition de poudres plus ou moins amorphes durant le séchage des gels.

Avec l'utilisation du diméthanolate de calcium et de l'acétate de sodium, des monolithes translucides se forment et l'augmentation de la concentration de verres dans le sol jusqu'à 1,33 M assure la formation de monolithes de taille plus importante. Un séchage lent sous atmosphère contrôlée pourrait limiter le phénomène de fissurations qui apparaît au cours de l'étuvage.

Le carbone, majoritairement apporté par les acétates ne s'élimine pas facilement, les verres ne sont donc pas purs. L'échantillon est laissé au moins une journée à son Tg lors du traitement thermique pour tenter d'en éliminer un maximum. La vitesse de montée en température du four ne doit pas être trop rapide sous peine de cristalliser le réseau vitreux en formation. Une vitesse de 1°C/min permet la formation d'une phase amorphe de composition quaternaire à 400°C. Une légère cristallisation du gel peut disparaître une fois le verre stabilisé. D'après l'étude FTIR, la silice présente sous forme de Si-OH se transforme en liaison Si-O 2NBO. La formation de ces oxygènes non liés permet d'intégrer des modificateurs mal dissous dans le sol initial.

La spectroscopie IR en mode ATR permet de vérifier la bioactivité des verres 45S5Q-2A et 47Q-2A, à partir de 3h d'immersion. Ces deux compositions quaternaires préparées par voie sol-gel peuvent donc être qualifiées de bioactives selon la définition donnée par L.L. Hench [23]. Les mesures FTIR des échantillons immergés restent cependant délicates, même en utilisant une technique spécialisée en analyse de surface comme l'ATR.

Les verres quaternaires réalisés avec le procédé alcoolate ont une réactivité plus proche des verres par fusion que le verre ternaire 47T-A. Il est possible de discerner les trois étapes citées par L.L. Hench [23] : la formation du gel de silice, le dépôt d'apatite amorphe et enfin la cristallisation de l'apatite. Les temps d'apparition de l'apatite carbonatée restent également proches de ceux des verres obtenus par fusion. Cependant, la formation du gel de silice reste toujours plus rapide par voie sol-gel. Cela semble être une conséquence d'une homogénéité

apportée à une échelle plus petite que la méthode par fusion, grâce à des précurseurs de plus petite taille.

4. Utilisation d'un complexant pour la synthèse d'un bioverre sol-gel dans le système SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5

4.1. Théorie

Il a été montré dans les manipulations décrites précédemment, que le diméthanolate de calcium associé au TEOS et au TEP permet de maintenir, sous forme amorphe, des compositions de bioverres sol-gel où le réseau de silice est fortement substitué par des cations modificateurs.
Cependant, le diméthanolate de calcium est coûteux et sa pureté n'est pas garantie à 99% mais à 97%. Cela entraîne une imprécision sur les pesées et implique une problématique sur d'éventuelles contaminations par des impuretés.

Une voie de synthèse alternative est possible en utilisant un complexant des ions calcium en milieu alcoolique dans le but de faciliter l'insertion de cet élément dans les gels.

Il est possible d'utiliser du glycérol (CH_2OH-$CHOH$-CH_2OH), un triol présent naturellement dans les organismes vivants.

Le glycérol se dissout facilement dans le méthanol. Il est possible d'alcaliniser le mélange à l'aide d'une base forte suffisamment soluble dans l'alcool, ce qui a pour conséquence de déprotonner une des fonctions alcools de la molécule.

Il devient intéressant d'ajouter des ions Ca^{2+} dans le milieu pour former un complexe glycéro calcique [31] de formule chimique à définir. Ce complexe possède encore deux groupements OH qui ont la possibilité d'effectuer des réactions de condensations.

Le milieu étant toujours très basique, si des formateurs de réseau sol-gel tels que le TEOS et le TEP sont ajoutés, ils seront rapidement et totalement hydrolysés. Des réactions de condensation seront alors possibles entre les hydrolysants, mais aussi avec les complexes glycérocalciques, ce qui conduit à la formation d'un gel avec du calcium, du sodium et du

carbone insérés dans sa structure. Un effet plastifiant est attendu, améliorant la tenue du gel lors du séchage [32].

Lors du traitement thermique de l'échantillon, la dégradation du carbone, couplée avec la proximité moléculaire du calcium et du réseau vitreux, peux favoriser la formation d'un verre bien amorphe.

4.2. Composition réalisée

Une composition de bioverres quaternaire est étudiée : la composition de C. Duée [1] comportant 47% de SiO_2, 26,5% de CaO, 21,5% de Na_2O et 5% de P_2O_5 (% molaire). Cette composition obtenue avec du glycérol est notée 47Q-G.

4.3. Produits de départ

Le tableau I-II-15 regroupe les produits de départ utilisés dans la synthèse sol-gel voie complexe de la composition quaternaire 47Q-G.

Fonction du précurseur	Nom du produit	Formule	Pureté / Concentration	Masse molaire	Fournisseur
Formateurs de réseau	Tétraéthyl orthosilicate (TEOS)	$(C_2H_5O)_4Si$	99,999 %	208,33 $g.mol^{-1}$	Sigma Aldrich
	Triéthyl phosphate (TEP)	$(C_2H_5O)_3P$	> 99,8 %	182,16 $g.mol^{-1}$	Sigma Aldrich
Modificateurs de réseau	Acétate de calcium anhydre	C4H6CaO4	99%	158,17 $g.mol^{-1}$	Sigma Aldrich
	Hydroxyde de sodium	NaOH	99%	40 $g.mol^{-1}$	Sigma Aldrich
Complexant	Glycérol	$C_3H_8O_3$	99%	92,09 $g.mol^{-1}$	Sigma Aldrich
Solvants	Méthanol	CH_3OH	99 %	32 $g.mol^{-1}$	Prolabo

Tableau I-II-15. Produits de départ avec le glycérol comme complexant.

Le procédé décrit en 4.1. permet d'obtenir des bioverres sol-gel de composition quaternaire à condition que les précurseurs soient judicieusement choisis :

- une base fortement soluble dans le méthanol doit être utilisée : le choix est porté sur l'hydroxyde de sodium qui joue alors le rôle de précurseur du sodium et de base forte,
- le précurseur du calcium doit être suffisamment soluble et les contres ions ne doivent pas entraîner l'apparition de précipités. Les ions minéraux étant à proscrire, l'acétate de calcium est sélectionné.

4.4. Mode opératoire

- Calculs préparatoires

Les masses des précurseurs correspondants à la composition 47Q-G sont calculées par rapport à n_{verre}, la quantité finale de verre souhaitée. Le calcul de la quantité de solvant est fait avec une concentration C_{sol} qui est égale à 1,5 mol/L.

- Mise en solution des formateurs et ajout du glycérol

5% du volume initialement calculé est prélevé dans un bécher. Le TEOS et le TEP sont ajoutés puis mélangés au minimum 20 minutes (Solution 1).
20% du volume initialement calculé est remplacé par du glycérol qui est placé dans un autre bécher. Ce bécher est complété avec du méthanol pour les 75% restants, ce qui forme la solution 2. Ce volume de glycérol ajouté a été déterminé expérimentalement et permet de former efficacement le complexe glycérocalcique.

- Ajout des modificateurs

Un certain ordre est à respecter lors de l'ajout des précurseurs du calcium et du sodium dans la solution 1. La quantité stœchiométrique d'hydroxyde de sodium est pesée puis mise en premier. Avant d'ajouter l'acétate de calcium, il faut assurer la dissolution totale de la soude : ce qui n'est pas aisé en milieu alcoolique. Le méthanol étant moins polaire que l'eau, le passage du bécher pendant 30 minutes dans un bain à ultrasons permet d'accélérer la dissolution, en plaçant un couvercle sur le bécher pour éviter l'évaporation du solvant.

Suivant l'origine de l'hydroxyde de sodium, il est possible d'observer le dépôt d'un sel insoluble dans le solvant après cette opération. Ce sel correspond à la formation d'une couche

de carbonate de sodium à la surface des grains de soude lors de leur contact avec le dioxyde de carbone de l'air ambiant. Il ne se dissout pas dans le méthanol et entraîne la cristallisation des gels.
Si la solution est limpide, il est possible d'ajouter progressivement l'acétate de calcium. A chaque ajout, le calcium est consommé par la formation du complexe glycérocalcique qui est de couleur jaune.

- Formation du sol et du gel

Pour former le sol puis le gel, les solutions 1 et 2 sont mélangées. Le gel commence rapidement à se former. En effet, l'usage de NaOH permet d'obtenir un sol basique ce qui permet une catalyse efficace (cf. page 35). Le bécher est maintenu sous agitation magnétique alors que la viscosité du sol augmente progressivement pour atteindre le point de gel. Le gel est alors séché à l'étuve 72h à 130°C pour analyses.

4.5. Analyses

4.5.1. Mesure de t_{gel} et observations

Le sol 47Q-G atteint le point de gel en deux heures environ à l'ambiante. Si ce temps est comparé à ceux déjà rencontrés avec le TEOS et le TEP en utilisant d'autres protocoles de synthèses, l'utilisation du glycérol semble augmenter le délai nécessaire à la formation du gel.
Le bécher contenant le sol passe progressivement d'une couleur jaune translucide à une couleur rose transparente au cours de la gélification.

Les réactions d'hydrolyse des formateurs se déroulant en milieu basique sont rapides et totales mais les réactions de condensations associées à la formation du gel sont probablement ralenties par la présence du complexe.

Lors du séchage, le gel 47Q-G ne se fracture pas, une pastille dense et transparente se forme dans le fond du bécher. Le séchage du gel à l'étuve à 130°C pendant 72h n'est pas complet car il reste beaucoup de glycérol qui n'a pas réagi et qui devra être éliminé lors du traitement thermique.

4.5.2. Analyses thermiques

La figure I-II-31 montre les analyses thermiques conduites à une vitesse de chauffe de 1°C/min sur le gel quaternaire 47Q-G.

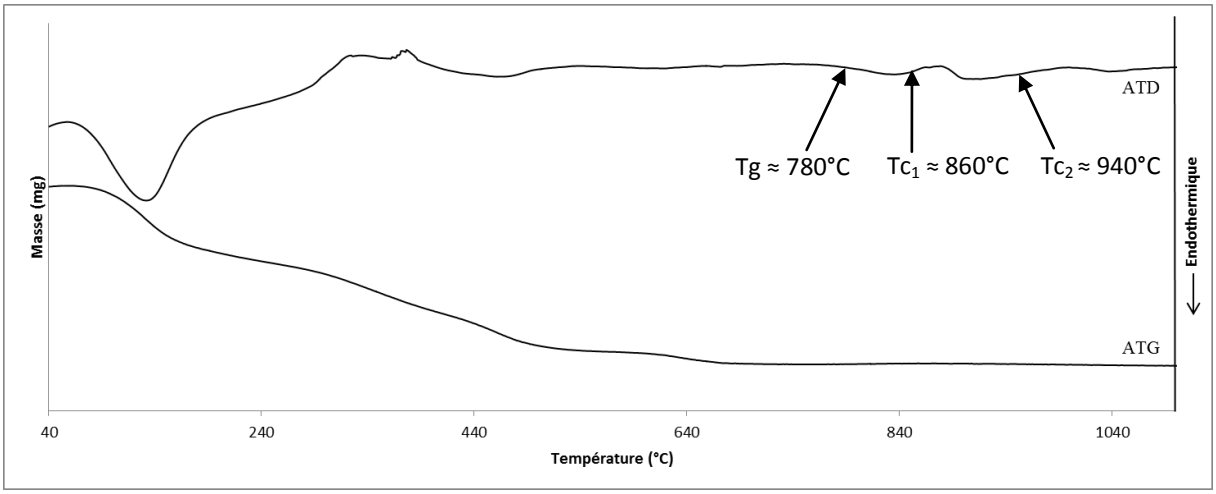


Figure I-II-31 : ATD / ATG du gel sec 47Q-G (1°C/min).

Les résultats de l'ATG visible sur la figure I-II-31 montrent que la plupart des pertes se produisent entre la température ambiante et 700°C.
Les résultats de l'ATG couplée à l'ATD donnent les températures caractéristiques du gel quaternaire :

- la température de transition vitreuse Tg est située vers 780°C,
- une première température de cristallisation Tc_1 est détectée à 860°C suivie d'une seconde cristallisation Tc_2 vers 940°C.

Il est possible de conclure que pour obtenir un verre et non une vitrocéramique avec la composition 47Q-G, il faut chauffer le gel sec entre 780 et 860°C.

4.5.3. DRX

La figure I-II-32 représente les résultats de l'analyse par diffraction des rayons X sur le gel de composition quaternaire 47Q-G. L'étude est effectuée en fonction de la température avec une amplitude thermique allant de 130 à 1000°C. Un diffractogramme est réalisé à chaque température de 130°C, 600°C, 700°C, 750°C, 800°C, 900°C et 1000°C. La température

choisie est maintenue 24 heures puis une trempe est réalisée pour pouvir effectuer l'analyse. Les échantillons sont chauffés avec un four électrique, à une vitesse de 1°C/min.

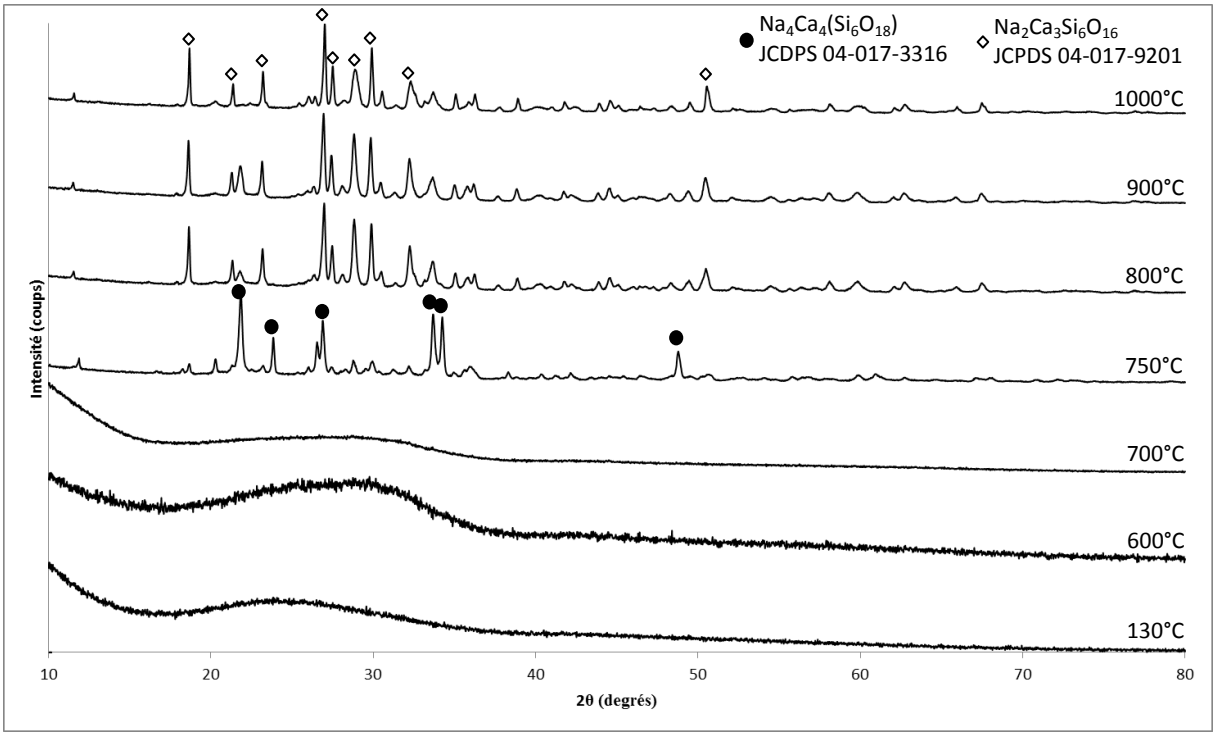


Figure I-II-32 : Résultats de la diffraction X sur le composé 47Q-G.

La figure I-II-32 montre l'évolution du massif du gel 47Q-G : le gel à 130°C est bien amorphe et son traitement thermique jusqu'à 700°C forme également un composé amorphe. A 750°C, une phase cristallisée apparaît : elle correspond à un composé de formulation $Na_4Ca_4(Si_6O_{18})$ [33]. A partir de 800°C, cette phase devient du $Na_2Ca_3Si_6O_{16}$ [34].

Bien que la montée en température soit réalisée à la même vitesse que l'ATD/ATG, les températures observées sont différentes. Les différences viennent peut être de la ventilation qui peut être variable en fonction des enceintes de traitement thermique.
Dans le cadre d'une synthèse réalisée dans un four traditionnel, le traitement thermique appliqué au gel ne doit pas dépasser 700°C pour maintenir la nature amorphe du verre 47Q-G.

4.5.4. EDS/MEB

Une analyse MEB-EDS a été réalisée sur une pastille de verre 47Q-G à 700°C. Le verre est broyé dans un mortier en agate puis pastillé. Le tableau I-II-16 présente les résultats de trois points de mesures à la surface de la pastille.

	1er point		2ème point		3ème point	
	% masse	% atomes	% masse	% atomes	% masse	% atomes
Si	40	44	41	45	41	45
P	8	8	8	8	8	8
Ca	37	29	37	29	37	29
Na	14	19	14	19	14	19

Tableau I-II-16. Résultats EDS/MEB pour le 47Q-G.

Le tableau I-II-17 indique la composition théorique et la moyenne des trois points de mesures du 47Q-G.

	% masse		% atome	
	théorique	moyenne	théorique	moyenne
Si	35,86	41±1	37,15	45±1
P	8,41	8±1	7,91	8±1
Ca	28,86	37±1	20,95	29±1
Na	26,87	14±1	33,99	19±1

Tableau I-II-17. Composition théorique et expérimentale du 47Q-G.

Comme pour les études précédentes, l'analyse MEB-EDS étant essentiellement une méthode d'analyse semi-quantitative, l'analyse du tableau I-II-17 met en évidence que le gel 47Q-G contient du Si, du Na, du Ca et du P. L'écart entre la composition théorique est la moyenne expérimentale est plus marqué avec ce procédé qu'avec les procédés A et 2A.

4.5.5. Etude de la bioactivité

Pour réaliser cette étude, le verre sol-gel 47Q-G à 700°C est broyé à l'aide d'un mortier en agate puis pastillé à l'aide d'une presse. Les pastilles sont résinées pour n'exposer qu'une surface S=1,54 cm² une fois immergées dans un volume de 50 mL de SBF à une température fixe de 37°C. Le rapport S/V est donc de 0,03 cm^{-1}. Un échantillon de la surface est ensuite

analysé par FTIR en mode ATR pour chaque temps d'immersion. La figure I-II-33 montre l'évolution de la surface du bioverre 47Q-G pour des temps d'immersions de 3 et 24 heures. Comme précédemment avec les compositions 45S5Q-2A et 47Q-2A, le mode ATR rend l'acquisition des spectres délicats à cause des pastilles imparfaitement planes.

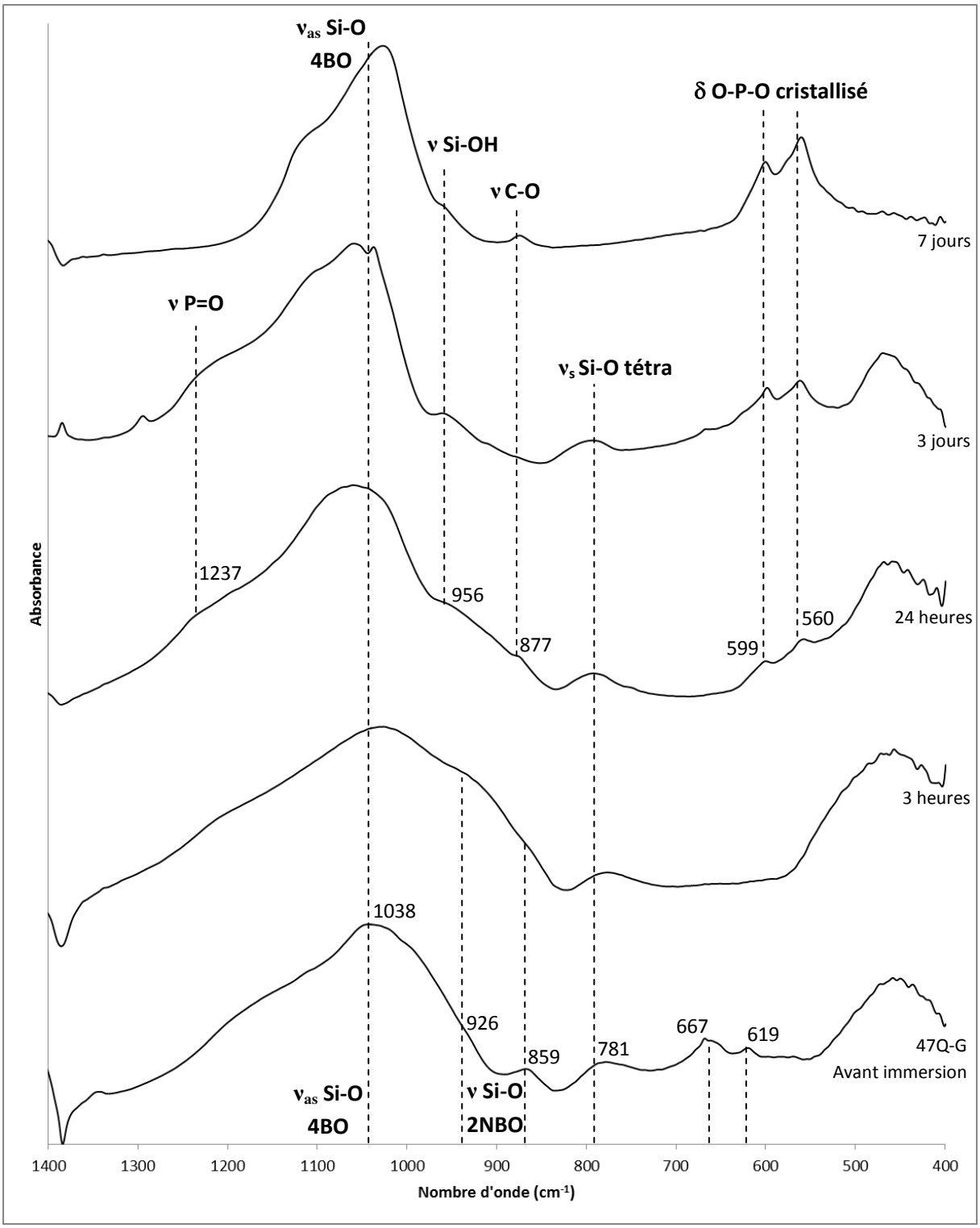


Figure I-II-33. Spectre FTIR de la surface du bioverre 47Q-G en fonction de la durée d'immersion.

Comme le montre la figure I-II-33, les pastilles de verres 47Q-G traitées à 700°C présentent des spectres FTIR différents en fonction du temps d'immersion.

Avant immersion, le verre est constitué de 6 bandes apparentes : la bande ν_{as} Si-O 4BO à 1038 cm^{-1} et celle de ν_s Si-O tétraèdre à 781 cm^{-1}, la double bande ν Si-O 2NBO à 926 cm^{-1} et 859 cm^{-1} sont caractéristiques du réseau de silice. Les deux dernières bandes à 667 et 619 cm^{-1} sont inconnues mais peuvent être attribuées à des liaisons OH encore présentes dans le verre à cause du glycérol. Ces bandes sont présentes à cause des précurseurs organiques, elles sont également rencontrées sur les gels des bioverres du procédé alcoolate.

Après 3h immersion, il est possible de remarquer que les bandes ν Si-O 2NBO à 926 cm^{-1} et 859 cm^{-1} s'intensifient avant l'apparition d'une bande propre aux liaisons Si-OH. Cela rapproche la réactivité du verre 47Q-G de celle des verres de compositions similaires obtenus par fusion. Sur ceux-ci, I. Lebecq [24] a observé l'intensification des bandes ν Si-O 2NBO avant l'apparition d'un gel à la surface.

A 24h d'immersion, deux bandes relatives à la déformation δ O-P-O cristallisé apparaissent à 560 et 599 cm^{-1} mais aussi celle de ν P=O à 1237 cm^{-1}. La présence de ces bandes indique la formation d'apatite cristallisée. Cette apatite peut être définie comme carbonatée grâce à la bande ν C-O à 877 cm^{-1}.

Toutes ces bandes s'intensifient à 3 et 7 jours d'immersion, montrant la croissance de l'hydroxyapatite carbonatée.

Il est possible que le début de la cristallisation de l'HAC ait lieu entre 3h et 24h mais des tests rapides d'immersion au-delà de 3h n'ont pas permis de trouver le moment exact de l'apparition de cette phase. Le verre sol-gel 47Q-G obtenu à l'aide de glycérol peut donc être qualifié de bioactif, mais sans pouvoir en préciser le temps minimal qui est forcément inférieur à 24h.

4.6. Discussion

L'utilisation du glycérol comme complexant des ions calcium permet d'obtenir un verre dès 700°C. Le glycérol n'empêche pas le verre d'être bioactif par immersion dans le SBF. Ce

composé ralentit la formation du gel de silice et rend son apparition plus proche des mécanismes observés avec les verres par fusion.
Par contre, le glycérol permet de réaliser un sol moins coûteux avec des précurseurs qui sont courants au laboratoire.

Les différents constituants des verres sont correctement insérés sous forme amorphe et réagissent ensemble lors du traitement thermique, ce qui provoque la première cristallisation de $Na_4Ca_4(Si_6O_{18})$. Cependant, cette phase est déficiente en calcium : une partie est encore piégée dans le réseau. Celui-ci n'est totalement dégradé qu'à 800°C et la phase cristalline définitive apparaît, du $Na_2Ca_3Si_6O_{16}$. D'autres phases peuvent apparaître entre 750° et 800°C en fonction du taux de calcium libéré mais elles ne sont pas toutes observables par la diffraction X car elles sont métastables.

Durant la synthèse du 47Q-G, il peut y avoir formation d'un carbonate de sodium insoluble par réaction de la surface des grains lors de leur contact avec l'air. La soude doit donc être manipulée et stockée sous atmosphère azotée pour éviter ce phénomène.

La quantité de glycérol inséré dans la structure du verre est importante et ce composé ne commence son départ qu'à partir de 290°C une fois mélangé au réseau silicate, donnant un aspect très noir au verre final. Il n'est pas possible de mettre moins de glycérol dans le solvant, car sinon la formation du complexe n'est pas totale et le calcium ne s'insère pas dans le réseau.

Pour utiliser efficacement une méthode de synthèse employant un complexant du calcium, il faut trouver une molécule présentant une élimination plus facile et formant des complexes avec une bonne efficacité. Cependant, cette méthode de synthèse peut être ajoutée à celles qui ont déjà été mises au point et qui permettent de préparer des bioverres sol-gel.

Trois procédés de synthèse sol gel ont été mis au point dans cette partie de l'étude :

- le procédé A (alcoolate), avec qui le bioverre ternaire 47T-A de composition 47 % SiO_2-48 % CaO-5 % P_2O_5 (% molaire) a été obtenu.

- le procédé 2A (alcoolate et acétate) qui permet de réaliser des compositions quaternaires comme le 45S5Q-2A (46,1% SiO_2-26,9% CaO-24,4% Na_2O-2,6% P_2O_5 %molaire) ou le 47Q-2A (47% SiO_2-26,5% CaO-21,5% Na_2O-5% P_2O_5 %molaire),
- le procédé G qui utilise du glycérol pour former des complexes avec le calcium et réaliser des verres quaternaires, comme le 47Q-G (47% SiO_2-26,5% CaO-21,5% Na_2O-5% P_2O_5 %molaire).

Tous ces verres ont été testé comme bioactifs après immersion dans du SBF. Les procédés 2A et G sont sélectionnés pour la suite de l'étude car ils permettent d'obtenir des compositions quaternaires. Il est alors possible de réaliser des comparaisons avec les verres obtenus par fusion de mêmes compositions. Cela n'est pas possible avec le verre ternaire 47T-A qui est difficile à synthétiser à 1400°C, car il ne contient pas de sodium, le fondant.

Bibliographie

[1] : C. Duée, I. Grattepanche-Lebecq, F. Désanglois, C. Follet-Houttemane, F. Chai, H.F. Hildebrand, **Predicting bioactive properties of phosphosilicate glasses using mixture designs,** J. Non-Cryst. Solids, vol. 362, p. 47-55, 2013.

[2] : G.S. Lázaro, S.C. Santos, C.X. Resende, E.A. 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**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 386, p. 19-28, 2014.

[3] : J. Ma, C.Z. Chen, D.G. Wang, X.G. Meng, J.Z. Shi, **Influence of the sintering temperature on the structural feature and bioactivity of sol–gel derived SiO_2–CaO–P_2O_5 bioglass**, Ceram. Int., vol. 36, issue 6, p. 1911-1916, 2010.

[4] : I. Lebecq, F. Désanglois, A. Leriche and C. Follet-Houttemane, **Compositional dependance on the *in vitro* bioactivity of invert or conventianal bioglasses in the Si-Ca-Na-P system**, J. Biomed. Mater. Res. Part A, vol. 83A, issue 1, p.156-168, 2007.

[5] : C. Volzone, F.M. Stábile, **Structural Changes by Thermal Treatment up to Glass Obtention of P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2 Compounds with Bioglass Composition Types**, New Journal of Glass and Ceramics, vol. 3, p. 53-57, 2013

[6] : A.C. Pierre, **Introduction aux procédés sol-gel**, ed. Septima, Paris, 1992.

[7] : M. Catauro, M.G. Raucci, F. de Gaetano, A. Marotta, **Antibacterial and bioactive silver-containing Na_2O-CaO-2SiO_2 glass prepared by sol-gel method**, J. Mater. Sci-Mater El, issue 15, p. 831-837, 2004.

[8] : Q.Z. Chen, G.A. Thouas, **Fabrication and characterization of sol–gel derived 45S5 Bioglass®–ceramic scaffolds**, Acta Biomaterialia, vol. 7, issue 10, p. 3616-3626, 2011.

[9] : A. Saboori, M. Rabiee, F. Moztarzadeh, M. Sheikhi, M. Tahriri, M. Karimi, **Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of sol-gel-derived SiO_2–CaO–P_2O_5–MgO bioglass**, Mater. Sci. Eng. C, vol. 29, issue 1, p. 335-3401, 2009.

[10] : Q.Z. Chen, Y. Li, L.Y. Jin, J.M.W. Quinn, P.A. Komesaroff, **A new sol–gel process for producing Na_2O-containing bioactive glass ceramics**, Acta Biomaterialia, vol. 6, issue 10, p. 4143-4153, 2010.

[11] : S. Pourhashem, A. Afshar, **Double layer bioglass-silica coatings on 316L stainless steel by sol–gel method**, Ceram. Int., vol. 40, issue 1, part A, p. 993-1000, 2014.

[12] : C.J. Shih, P.S. Lu, C.H. Hsieh, W.C. Chen, J.C. Chen, **Effects of bioglass powders with and without mesoporous structures on fibroblast and osteoblast responses**, Appl. Surf. Sci., vol. 314, p. 967-972, 2014.

[13] : $Ca(NO_3)_2$, JCPDS 01-071-3822.

[14] : $CaCl_2$, JCPDS 01-071-5126.

[15] : NaCl, JCPDS 00-005-0628.

[16] : $Ca(OH)_2$, JCPDS 00-004-0733.

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

[18] : M. Prassas, J. Phalippou, L.L. Hench, J.Zarzycki, **Preparation of xNa_2O-$(1-x)SiO_2$ gels for the gel-glass process: I. Atmospheric effect on the structural evolution of the gels**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 48, p. 79-95, 1982.

[19] : E.J.A. Pope, J.D. Mackenzie, **Sol-Gel processing of silica II. The role of the catalyst**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 87, p. 185-198, 1986.

[20] : $CaSiO_3$, Wollastonite, JCPDS 00-027-0088.

[21] : T. Kokubo, **Bioactive glass ceramics: properties and applications,** Biomaterials, vol. 12, p. 155–163, 1991.

[22] : M. Vallet-Regi, A. M. Romero, V. V. Ragel, R. Z. LeGeros, **XRD, SEM-EDS and FTIR studies of in vitro growth of an apatite like layer on sol-gel glasses**, Journal of Biomedical Material Research, vol. 44, p. 416–421, 1999.

[23] : L.L. Hench, **The story of bioglass**, J. Mater. Sci. Mater. Med., issue 17, p. 967–978, 2006.

[24] : I. Lebecq, **Etude de bioverres à base de SiO_2, CaO, Na_2O non dopés et dopés par le phosphore**, Thèse de l'Université de Valenciennes, 2002.

[25] : A. Yasumori, S. Inoue, M. Yamane, **Preparation of Na_2O-SiO_2 glasses in the metastable immiscibility region**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 82, p. 177-182, 1986.

[26] : J. R. Jones, **Review of bioactive glass: From Hench to hybrids**, Acta Biomaterialia, vol. 9, issue 1, p. 4457-4486, 2013.

[27] : C. Duée**, Elaboration de nouvelles compositions de bioverres destinés à la chirurgie réparatrice**, Thèse de l'Université de Valenciennes, p. 117, 2007.

[28] : C. Duée, **Elaboration de nouvelles compositions de bioverres destinés à la chirurgie réparatrice**, Thèse de l'Université de Valenciennes, p. 174, 2007.

[29] : P. Audebert, F. Miomandre, **Procédé sol-gel de polymérisation**, ed. Technique de l'Ingénieur, référence J S 820, 2005.

[30] : Combeite, High, JCPDS 01-078-1650.

[31] : A.A. Refaat, **Biodiesel production using solid metal oxide catalysts**, Int. J. Environ. Sci. Tech., vol. 8, issue 1, p. 203-221, 2011.

[32] : D. Muscat, B. Adhikari, R. Adhikari, D.S. Chaudhary, **Comparative study of film forming behaviour of low and high amylose starches using glycerol and xylitol as plasticizers**, J. Food Eng., vol. 109, issue 2, p. 189-201, 2012.

[33] : $Na_4Ca_4(Si_6O_{18})$, JCPDS 04-017-3316.

[34] : $Na_2Ca_3Si_6O_{16}$, JCPDS 04-017-9201.

Chapitre II. Dopages à l'argent de bioverres du système SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5, recouvrements de substrats biocéramiques et tests biologiques.

Les bioverres sol-gel, des procédés 2A et G étudiés au chapitre I, développent, une fois immergés dans du fluide physiologique simulé (SBF), un gel de silice puis de l'apatite amorphe qui cristallise progressivement. Cet état de surface est bénéfique pour l'adhérence des cellules hôtes car il permet la formation de nombreuses liaisons faibles de type Van der Waals entre les cellules et les terminaisons OH du gel [1]. Le procédé sol-gel permet de conserver la bioactivité observée sur les verres obtenus par fusion. La formation d'apatites amorphes puis cristallisées permet aux bioverres d'apporter aux cellules hôtes quelques-unes des briques essentielles à la formation de l'os. Les cellules puisent les éléments, dont elles ont besoin, dans le milieu où elles sont accrochées.

Tout d'abord une étude préliminaire de prolifération sur des cellules L132 a été réalisée. En exposant les cellules à des concentrations croissantes de poudre de bioverres des procédés 2A, G et fusion, il est possible de déterminer le procédé sol-gel le moins toxique pour les cellules humaines. Par choix, la suite de l'étude s'est portée sur le procédé le moins toxique.

Les procédés sol-gel, décrits dans le chapitre I, ne permettent pas d'obtenir directement des blocs de verres aux dimensions contrôlées. En effet, les monolithes obtenus se fracturent facilement lors du séchage et de la stabilisation thermique. Un broyage de ces monolithes permet cependant d'obtenir une poudre qui est mise en forme de pastilles avec une presse. Ces pastilles sont ensuite résinées pour étudier la réactivité d'une seule face lors d'immersions dans le SBF.

Cependant, les pastilles de poudres compressées sont constituées de grains de verres qui peuvent se détacher facilement les uns des autres en milieu aqueux. Pour réaliser des études de proliférations et de vitalités cellulaires, les échantillons doivent présenter une surface sur laquelle les cellules peuvent adhérer facilement pour proliférer. Avec les échantillons tels qu'ils ont été préparés, il y a un risque de décrochage, ce qui n'est pas souhaitable. Pour éviter ce phénomène, il est possible de recouvrir la surface des substrats d'une couche mince de bioverre sol-gel à l'aide d'une technique de trempage-retrait (cf. Annexe III).

Les biocéramiques traditionnelles en HA et TCP présentent une bonne compatibilité naturelle avec les cellules eucaryotes [2], ce qui en fait de bons candidats pour réaliser ces substrats. Il

est possible de les mettre en forme de pastilles denses [3] ou bien en forme d'échantillons macroporeux [4].

De plus, pour un matériau implantable *in vivo*, posséder une action de surface, qui limiterait la formation de biofilms bactériens, est une caractéristique intéressante. L'argent, comme d'autres éléments métalliques, réduit la prolifération des cellules par un effet appelé effet oligodynamique. Les travaux de A. Balamurugan *et al.* [5] étudient le dopage d'un verre sol-gel avec de l'argent et permettent d'observer un effet antibactérien. Il est donc envisageable de doper les compositions 47Q et 45S5®, de déposer les verres dopés et non dopés à la surface de substrats biocéramiques puis de caractériser les dépôts.

L'effet biologique de ces dépôts a été évalué dans un premier temps sur une souche bactérienne appelée *Pseudomonas aeruginosa.* Il est cependant souhaitable que l'argent n'exerce pas de toxicité pour les cellules eucaryotes de l'hôte. Pour le vérifier, des tests de prolifération et de vitalité ont été réalisés sur une lignée cellulaire humaine appelée MG63.

Ce chapitre se décompose en deux parties :

- la première partie donne une approche théorique des conditions de prolifération *in vitro* des microorganismes cellulaires et défini des notions essentielles à la compréhension des tests biologiques réalisés *in vitro*,
- la deuxième partie concerne les résultats du dopage à l'argent et le recouvrement de biocéramiques par les verres dopés et non dopés. Les tests biologiques permettent alors d'évaluer l'effet des dépôts sur la prolifération et la vitalité d'une souche bactérienne et d'une souche cellulaire eucaryote.

[1] : J.R. Jones, A.G. Clare, **Bio-glasses an introduction**, ed. Wiley, 2012.

[2] : F. Monchau, P. Hivart, B. Genestie, F. Chai, M. Descamps, H.F. Hildebrand, **Calcite as a bone substitute. Comparison with hydroxyapatite and tricalcium phosphate with regard to the osteoblastic activity**, Mater. Sci. Eng. C, vol. 33, p. 490-498, 2013.

[3] : F. Monchau, A. Lefevre, M. Descamps, A. Belquin-myrdycz, P. Laffargue, H.F. Hildebrand, **In itro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, -tricalcium phosphate, calcium carbonate**, Biomol. Eng., vol. 19, p. 143-152, 2002.

[4] : M. Descamps, O. Richart, P. Hardouin, J.C. Hornez, A. Leriche, **Synthesis of macroporous b-tricalcium phosphate with controlled porous architectural**, Ceram. Int., vol. 34, p. 1131-1137, 2008.

[5] : A. Balamurugan, G. Balossier, D. Laurent-Maquin, S. Pina, A.H.S. Rebelo, J. Faure, J.M.F. Ferreira, **An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol–gel derived silver-incorporated bioglass system,** Dent. Mater., vol. 24, issue 10, p. 1343-1351, 2008.

1ère partie : Approche théorique des conditions de prolifération *in vitro* des micro-organismes cellulaires

Cette partie s'articule autour de quatre points principaux. Dans un premier temps, des définitions courantes dans le domaine de la biologie, mais souvent mal connues dans le domaine de la chimie des matériaux, sont énoncées. Ensuite, les différents paramètres, permettant la réussite de culture *in vitro* de bactéries et de cellules eucaryotes, ont été étudiés en deux points distincts. Ce travail bibliographique se termine par la compréhension de quelques-unes des techniques qui permettent de quantifier la prolifération et la vitalité cellulaire.

1. Définitions générales

1.1. Cellules eucaryotes et cellules procaryotes

En 1665, R. Hooke [1] observa une cellule au moyen d'un microscope rudimentaire. La découverte de R. Hooke marqua le début de la théorie cellulaire, selon laquelle tous les êtres vivants sont formés de cellules.

La communauté scientifique commença à s'intéresser à l'origine des cellules et les différentes observations s'enchaînèrent. Les bactéries, les levures et d'autres organismes furent découverts, ce qui permit de différencier :

- les êtres unicellulaires, ne comportant qu'une seule cellule dite procaryote : par exemple les bactéries.
- des êtres pluricellulaires composés de multiples cellules appelées eucaryotes : comme les végétaux ou les animaux.

La figure II-I-1 représente les deux différents types de cellules.

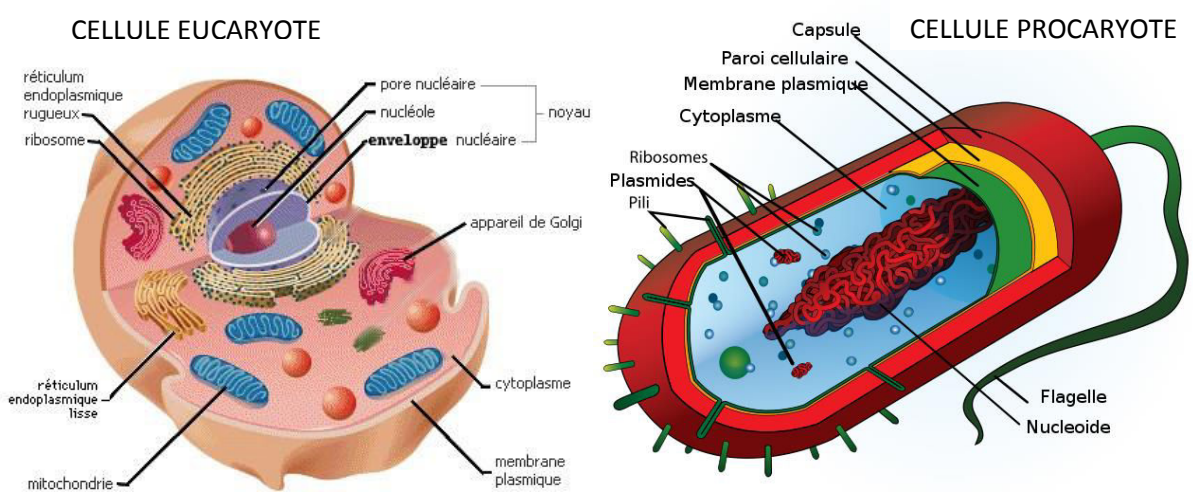


Figure II-I-1 : Cellules eucaryote et procaryote

Les procaryotes sont principalement les bactéries. La plupart vivent comme des organismes unicellulaires mais certaines bactéries peuvent s'associer en chaîne. Les procaryotes n'ont pas de vrai noyau : leur ADN flotte dans le cytoplasme de la cellule.
Les eucaryotes (ou « noyau-vrai ») possèdent un noyau séparé du reste du contenu cellulaire, il contient l'ADN. Les cellules animales et végétales sont principalement eucaryotes.
Les virus, ou acaryotes, sont des éléments, et non des cellules, qui ne possèdent ni noyau ni cytoplasme et qui détournent la chimie d'une cellule hôte pour se reproduire.

1.2. Vie et mort des cellules

En 1879, W. Flemming [2] décrit le mécanisme qui permet aux cellules eucaryotes de se diviser et de proliférer dans leur environnement : la mitose cellulaire. Un mécanisme proche de la mitose est observé chez les bactéries : la scissiparité.

La nécrose correspond à une mort brutale, qui est une mort non programmée et qui survient lorsque la cellule est agressée par une molécule chimique ou par une autre cellule. La cellule éclate et répand son cytoplasme dans le milieu de culture.

L'apoptose, ou mort programmée, s'oppose à la nécrose. Dans le cas de l'apoptose, la cellule n'éclate pas mais elle se fragmente en plusieurs petits morceaux qui seront facilement éliminables par l'organisme. Cette mort programmée ne provoque pas d'état infectieux, contrairement aux tissus nécrosés.

1.3. Cultures *in vitro*

En 1855, R. Virchow [3] énonce le second axiome de la théorie cellulaire : toute cellule provient d'une autre cellule. L. Pasteur [4] montra en 1861, que tout être vivant a besoin d'un milieu de culture adapté à ses besoins : rien ne peut croître spontanément. Le milieu de culture doit contenir au minimum des sels minéraux, des acides aminés, des vitamines et une source d'énergie comme, par exemple, du glucose.

Les chercheurs réussirent rapidement la culture *in vitro* d'organismes procaryotes, comme les bactéries. De par leur nature solitaire, les bactéries présentent naturellement un taux de division important, non dicté par un facteur extérieur.
Les premières tentatives de culture de cellules eucaryotes, comme par exemple les cellules humaines, ne donnèrent pas de bons résultats. En effet, ces cellules ne se divisent pas d'elles-mêmes si elles sont sorties de leurs organismes hôtes. Elles ont en effet besoin d'un facteur de croissance sécrété par d'autres cellules de l'organisme et qui permet d'amorcer leur méiose.
Chez les végétaux, certains facteurs de croissance communs furent identifiés comme les cytokinines et les auxines sécrétées par leurs apex, qui sont les sommets de chaque tige. Pour les cellules eucaryotes animales, les facteurs de croissance sont très spécifiques à chaque type de cellules. Les cultures de cellules humaines n'ont donc pas été possibles avant le début du $XX^{ème}$ siècle car les facteurs de croissance restaient inconnus.

1.4. Types de cellules

L'organisme humain est composé d'environ 10^{14} cellules qui se différencient en plus de deux cents types cellulaires différents comme, par exemple, les lymphocytes, les ostéoblastes, les neurones… Ces ensembles cellulaires constituent les tissus ou organes (système sanguin, os, cerveau...).
Chaque tissu possède un stock de cellules souches, de cellules adultes et de cellules sénescentes [5].
Les cellules souches présentes dans les tissus sont dites *unipotentes* car elles sont déjà programmées pour se différencier en un seul type de cellules.
Il existe des cellules souches embryonnaires qui sont *totipotentes* : elles peuvent se différencier en tous les types de cellules présentes dans l'organisme. Le caractère *totipotent* des cellules souches embryonnaires ne se manifeste que lors des premières divisions.

1.5. Limite de Hayflick et de l'inhibition de contact

Plusieurs paramètres biologiques limitent la culture et la conservation *in vitro* de cellules eucaryotes : parmi ces paramètres, les plus influents sont la limite de Hayflick et de l'inhibition de contact cellulaire [5] :

- la limite de Hayflick est le nombre maximal de divisions que pourra effectuer une cellule adulte avant d'entrer en sénescence puis de mourir par apoptose. Les cellules embryonnaires ne sont pas concernées par la limite de Hayflick,
- l'inhibition de contact repose sur le fait que les cellules refusent de se diviser si elles ont colonisé toute la surface disponible : les cellules ne peuvent pas se superposer l'une sur l'autre.

2. Prolifération *in vitro* des cellules eucaryotes

2.1. Milieux de cultures cellulaires

In vivo, la prolifération cellulaire est rigoureusement contrôlée : certaines cellules, comme les neurones ne nécessitent pas un renouvellement constant alors que d'autres sont perpétuellement en cours de multiplication comme les cellules sanguines ou la peau [5].
Le contrôle de cette multiplication cellulaire normale se fait par l'intermédiaire d'un équilibre entre facteurs activateurs de croissance et facteurs inhibiteurs. Toute altération de cet équilibre peut faire pencher la balance du côté inhibiteur et dans ce cas la cellule meurt et disparaît.
Lorsqu'une cellule sénescente normale meurt, une cellule souche *unipotente* présente dans le tissu devient mature et la remplace. Cette cellule devient alors adulte et elle peut commencer à se diviser sous l'influence des facteurs de croissance.

La culture *in vitro* de cellules eucaryotes n'est pas facile : il faut utiliser un milieu de culture très varié qui reproduit le plus fidèlement possible les conditions de propagation rencontrées *in vivo*. Pour cela, un milieu de culture possible est le sérum de veau fœtal (noté SVF). Il est préparé à partir de sang de fœtus de veau, prélevé chez des vaches qui au moment de l'abattage, sont gestantes. Le fœtus de veau est enlevé lors de l'éviscération et le sang est récolté par ponction cardiaque sans anesthésie.

Le SVF présente dans sa composition des facteurs de croissance permettant la prolifération mais aussi des facteurs d'attachement contribuant à une bonne adhérence indispensable à la division cellulaire [6]. Il apporte des hormones et exerce un pouvoir tampon ainsi qu'un rôle protecteur et des propriétés nutritives par la présence de nombreux métabolites, d'ions, d'oligoéléments et de lipides en solution.
Cependant, le SVF présente aussi des défauts : sa composition précise n'est pas définie et il existe une forte variabilité d'un lot à l'autre. Même si il est prélevé stérilement et stérilisé par filtration, il présente également des problèmes d'innocuité car il peut renfermer des agents pathogènes de petites tailles [7]. Sa richesse peut même limiter la prolifération, il est alors nécessaire de le diluer dans un autre milieu [8].

Devant la faible reproductibilité de certains résultats, certains chercheurs ont évolué vers la mise au point de milieux artificiels, enrichis en facteurs rigoureusement contrôlés. Ces milieux sont appelés milieux définis. Différents constituants définis sont additionnés en fonction des exigences du type cellulaire cultivé à des concentrations définies dans un milieu synthétique de base riche. Le milieu essentiel minimum, ou MEM (Minimum Essential Medium) est couramment utilisé (cf. Annexe IV).

Cependant, la culture de cellule normale ne sera pas pérenne. Lorsque la taille de la colonie approchera de la limite d'inhibition de contact, elle dépérira. Il faudra effectuer des repiquages successifs de la culture jusqu'à la limite de Hayflick et il faudra tout recommencer avec des cellules plus jeunes.
Tous ces phénomènes nuisent à la reproductibilité et ne sont pas compatibles avec des études effectuées sur de longues périodes.

2.2. Cellules HeLa

In vivo, les cancers sont des amas de cellules anormales qui ne se soumettent plus aux facteurs de croissance de l'organisme et à l'apoptose. Ces cellules sont souvent porteuses d'un gène appelé oncogène qui leur permet d'organiser elles-mêmes leur prolifération en émettant leurs propres facteurs de croissance. En échappant aux mécanismes de prolifération naturels, les cellules cancéreuses se soustraient également aux limites de Hayflick et de l'inhibition de contact. Alors que les cellules normales ont besoin d'un support pour vivre et ne peuvent pas

s'empiler, les cellules cancéreuses peuvent s'amasser et être mobiles dans l'organisme tout en restant prolifiques.

Au début du XX^{ème} siècle, les cultures *in vitro* de cellules cancéreuses étaient également difficiles mais en 1951, un papillomavirus infecta une patiente américaine nommée Henrietta Lack, ce qui lui inocula un gène qui conduisit au déclenchement d'un cancer du col l'utérus [9-10]. Le papillomavirus est un virus porteur d'un oncogène qui infecte une cellule normale en la transformant en cellule cancéreuse, ce qui la rend potentiellement capable de produire une plus grande quantité de nouveaux virus. Comme cette patiente était déjà porteuse de son propre oncogène, l'introduction du gène du papillomavirus déclencha le cancer tout en amplifiant le potentiel de croissance de ces cellules.

En conséquence, une culture *in vitro* de ces cellules, baptisées cellules HeLa, est possible du fait de leur extraordinaire faculté de croissance. Leur potentiel de croissance est si important que si elles contaminent par accident une autre culture cellulaire, elles prennent le dessus et étouffent les autres cellules.
La colonie ne dépérissant plus avec le temps, ces cellules ont été baptisées cellules immortelles. Individuellement, les cellules meurent mais la souche peut être conservée indéfiniment.

Les cellules HeLa constituent la première souche de cellules humaines immortelles et elles ont permis la conduite d'essais biologiques longs pouvant être pratiqués facilement avec une bonne reproductibilité, ce qui était difficile avant leur apparition.

2.3. Lignées immortalisées

En infectant des cultures de cellules humaines avec d'autres virus oncogènes, les chercheurs ont élaboré d'autres méthodes pour obtenir *in vitro* des lignées immortelles d'origine artificielle [11].

La méthode la plus courante concerne l'utilisation du virus simien 40 (ou SV40). Le virus SV40 fait partie la famille des polyomavirus qui comme les papillomavirus, sont des virus à ADN de petite taille (environ 45nm) sans enveloppe. Il est présent naturellement dans les reins des singes rhésus chez qui il semble être non-pathogène. L'étude du SV40 a permis

d'isoler un antigène nommé AgT qui est capable d'immortaliser une lignée cellulaire humaine une fois introduit dans le milieu de culture.

D'autres virus porteurs d'oncogènes ont depuis été détectés comme, par exemple, le virus JC et le virus BK, également de la famille des polyomavirus. Ils exercent de façon similaire au SV40 mais agissent sur d'autres types de cellules.

3. Prolifération *in vitro* de cellules procaryotes

3.1. Milieux de cultures bactériens in vitro

R. Koch [12] peut être considéré comme le véritable fondateur de la microbiologie. C'est lui qui développa les principales méthodes encore utilisées aujourd'hui : milieux nutritifs adaptés à toutes sortes de bactéries, culture des bactéries sur milieu solide, colorations spécifiques… On lui doit, entre autre, la découverte du bacille de la tuberculose et du vibrion du choléra. Mais, en France, c'est le nom de L. Pasteur qui reste attaché à la naissance de la microbiologie.

Même si certains micro-organismes se développent facilement, un milieu de culture doit-être préparé afin d'augmenter leur vitesse de multiplication [13]. Il doit aussi satisfaire leur exigences nutritives ce qui implique :

- de couvrir les besoins en ions minéraux et d'apporter une source de carbone et d'énergie,
- de présenter un pH ainsi qu'une force ionique optimale.

Il existe une grande variété de milieux de culture en rapport avec la diversité des exigences nutritives des micro-organismes. Il est possible de distinguer les milieux empiriques des milieux synthétiques.

Les milieux empiriques sont de composition approximative car cela dépend des matières premières utilisées : extrait de viande ou de levure, peptones, sucres et éventuellement liquides biologiques (sérum, sang…). Les composants du milieu doivent convenir aux micro-organismes étudiés. Ce sont les milieux les plus employés aujourd'hui comme, par exemple, les milieux LB, Columbia, Gassner, …

Les milieux synthétiques sont de composition exactement connue, qualitativement et quantitativement. Ces milieux sont surtout utilisés pour l'étude des bactéries autotrophes ou pour étudier les besoins nutritifs d'un germe.

Il est possible de favoriser la culture de certains micro-organismes par rapport à d'autres en jouant sur la composition du milieu : les milieux pourront être sélectifs ou non-sélectifs.
La majorité des procaryotes ont besoin d'une surface solide à laquelle adhérer pour former un biofilm. Un milieu de culture solide et facile à reproduire est nécessaire, il est obtenu en ajoutant un agent gélifiant à un milieu liquide. Le gélifiant le plus utilisé est l'agar-agar ou gélose, l'addition de diverses autres molécules ne posant aucun problème particulier. L'agar-agar est un polygalactoside sulfaté que très peu de micro-organismes sont capables de dégrader. Il présente la propriété de former avec l'eau un gel solide à une température inférieure à 60 °C tout en étant liquéfiable par ébullition, auquel cas, il reste en surfusion jusqu'aux environs de 45°C.
Les milieux solides destinés à être coulés en boîte de Pétri ou en tube ont une teneur en gélose assez élevée (15 $g.L^{-1}$) tandis que les géloses molles ou semi-solides sont peu gélosées (3 à 5 $g.L^{-1}$).

3.2. Modes de vie bactériens

Il existe de nombreux types bactériens différents qui vivent dans des milieux naturels variés [13]. Afin d'en réussir la culture *in vitro,* il est nécessaire de connaître les caractéristiques de vie des bactéries. Un premier classement du genre *bacteria* peut s'organiser suivant la nature des nutriments consommés. Les bactéries peuvent être autotrophes ou hétérotrophes :

- l'autotrophie consiste à assimiler des nutriments d'origine inorganique ce qui permet de ne pas avoir besoin de molécules organiques pour assurer la survie, par exemple les cyanobactéries,
- l'hétérotrophie inclut les bactéries qui ont la nécessité de consommer des éléments organiques pour proliférer. De part cette dépendance, elles représentent un danger pathogène pour les espèces eucaryotes. La majorité des bactéries connues sont hétérotrophes : les staphylocoques, les bacilles, …

Une deuxième classification peut être effectuée par la nature et la forme de la paroi bactérienne. Il est possible d'observer deux formes de parois : les coccis et les bacilles. Les coccis sont de forme ronde et les bacilles sont cylindriques.

Indépendamment, il existe deux types de parois :

- les parois épaisses mais uniques,
- celles plus fines mais doublées.

C'est le bactériologiste danois H. C. Gram [14] qui mit au point en 1884 un protocole de coloration qui permet d'identifier les deux types de parois. Les différentes étapes de cette coloration sont succinctement les suivantes :

- coloration par le violet de gentiane (cristal violet) pendant 30 secondes à 1 minute, suivie d'un rinçage à l'eau pure. Le violet de gentiane se fixe sur les composants des parois de toutes les bactéries,
- fixation du colorant avec du lugol (solution composée de diiode et d'iodure de potassium en solution dans de l'eau) pendant 30 secondes à 1 minute, suivie d'un rinçage à l'eau déminéralisée également,
- décoloration rapide à l'alcool : l'alcool ou un mélange alcool-acétone est versé au goutte à goutte sur une lame inclinée obliquement jusqu'à ce que le filet de solvant résultant soit clair. Cette étape est suivie d'un rinçage abondant avec l'eau déminéralisée pour stopper la décoloration. Cette étape doit être effectuée avec délicatesse, l'utilisation abusive de l'alcool aurait pour conséquence de rendre le test faux,
- recoloration à la safranine ou à la fuchsine, pendant 30 secondes à 1 minute. Un dernier lavage à l'eau déminéralisée doit être réalisé suivi d'un séchage de la lame à 50°C.

L'alcool sert à décolorer la paroi des bactéries qui seront dites Gram négatif (ou Gram-). Celle-ci, plus fine, va en effet laisser passer l'alcool (molécule hydrophile) ou le mélange alcool-acétone ce qui provoquera la décoloration en éliminant le violet de gentiane.
Au contraire, pour les bactéries dites Gram positif (ou Gram+), la paroi est plus épaisse et constitue une barrière imperméable à l'alcool. Elles resteront alors de couleur violette.
L'étape de recoloration est une contre-coloration ayant pour but de donner aux bactéries Gram négatif précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope.

Les bactéries à Gram positif restées violettes seront évidemment insensibles à cette contre-coloration plus pâle que le violet imprégnant leur cytoplasme.

La coloration de Gram permet de différencier la paroi bactérienne et de scinder les bactéries en deux grands groupes : les Gram+ qui ont une paroi épaisse comme les *Lactobacillus* et les Gram- qui ont une paroi fine mais ont en plus une membrane externe comme, par exemple, *Escherichia coli*. Alors que les bactéries Gram+ sont pour la plupart des germes non exigeants, c'est-à-dire qu'ils se cultivent facilement dans les milieux de base, les organismes Gram- sont plus difficiles à cultiver *in vitro*.

Une dernière classification concerne leurs conditions physiques de propagations : la plupart des bactéries ont besoin du support de culture sur lequel elles fabriquent un film adhésif et protecteur qui est appelé biofilm [15]. Le biofilm présente souvent plusieurs genres de bactéries qui vivent en symbioses au travers d'un comportement coopératif [16]. Lorsque que la bactérie survit seule dans un milieu liquide sans former de biofilm, le mode de vie est dit planctonique.

4. Essais biologiques

A l'aide de la culture de cellules *in vitro,* il est possible d'évaluer l'impact d'un matériau ou d'une molécule sur la prolifération cellulaire. Ces évaluations reposent sur la comparaison de cultures exposées aux substances à tester par rapport à des cultures témoins non exposées.
Pour que les résultats soient significatifs, il faut donc répliquer l'expérience un grand nombre de fois afin de calculer les moyennes et les écarts types entre les différentes manipulations. Il faut également s'assurer d'une bonne reproductibilité des conditions de culture.
Toutes les méthodes consistent à ensemencer les cultures exposées et les cultures témoins avec la même concentration initiale en micro-organisme.
Les cultures sont placées ensemble à l'étuve à 37°C. Après un temps défini suivant la nature de l'étude, elles en sont retirées pour analyse.

Il est possible d'établir l'efficacité d'une culture *in vitro* en mesurant :

- la vitalité, il s'agit de déterminer l'activité de la cellule,
- la prolifération, le nombre de cellules vivantes est mesuré,

- la viabilité, c'est l'évaluation de la capacité d'une cellule à survivre ou à mourir. La viabilité ne sera pas évaluée dans cette étude.

4.1. Méthodes de mesure de la vitalité

4.1.1. Libération d'ATP

L'activité des micro-organismes peut être évaluée par une méthode qui consiste à mesurer la quantité d'Adénosine TriPhosphate ou ATP [17-18] Les cellules eucaryotes et les bactéries utilisent l'ATP comme vecteur d'énergie. L'ATP est fabriqué et utilisé rapidement par les cellules, et n'est pas stocké ce qui en fait un bon indicateur de l'activité à un instant donné. Pour libérer l'ATP, il faut mettre en contact les cellules avec un réactif qui provoque leur lyse.

Pour mesurer la quantité d'ATP libérée dans le milieu, la réaction avec la luciférine est utilisée. La luciférine est présente dans la luciole où elle est responsable de la lueur émise dans l'obscurité. La réaction consomme l'ATP, la luciférine et de l'oxygène pour former du CO_2, de l'oxyluciférine et un photon de lumière. Des kits de réactifs avec des appareils de mesures associés sont commercialisés et permettent une lecture rapide et standardisée.

4.1.2. Activité métabolique

Toutes les cellules eucaryotes ont une ou plusieurs mitochondries à l'intérieur de leur cytoplasme. Ces mitochondries sont les centrales énergétiques des cellules qui consomment les nutriments présents dans le milieu en produisant en retour l'ATP.
Les mitochondries émettent également dans le milieu des déchets métaboliques comme la succinate déshydrogénase mitochondriale (MTT). Il est alors intéressant de mesurer la concentration en MTT dans le milieu pour calculer la vitalité cellulaire : plus la cellule est active et plus sa mitochondrie relargue du MTT [19].

Les sels de tétrazolium sont utilisés car ils sont oxydés par la MTT, pour former du formazan. L'ajout provoque également une lyse des cellules. Le formazan formé étant violet et les sels de tétrazolium initiaux jaunes, il suffit alors de mesurer l'absorbance de la solution à une longueur d'onde située autour de 550 nm. La lecture est facilement effectuée à l'aide d'un

spectrophotomètre. En comparant avec celle du témoin l'absorbance lue permet de calculer la vitalité. La figure II-I-2 montre la réaction qui conduit au formazan.

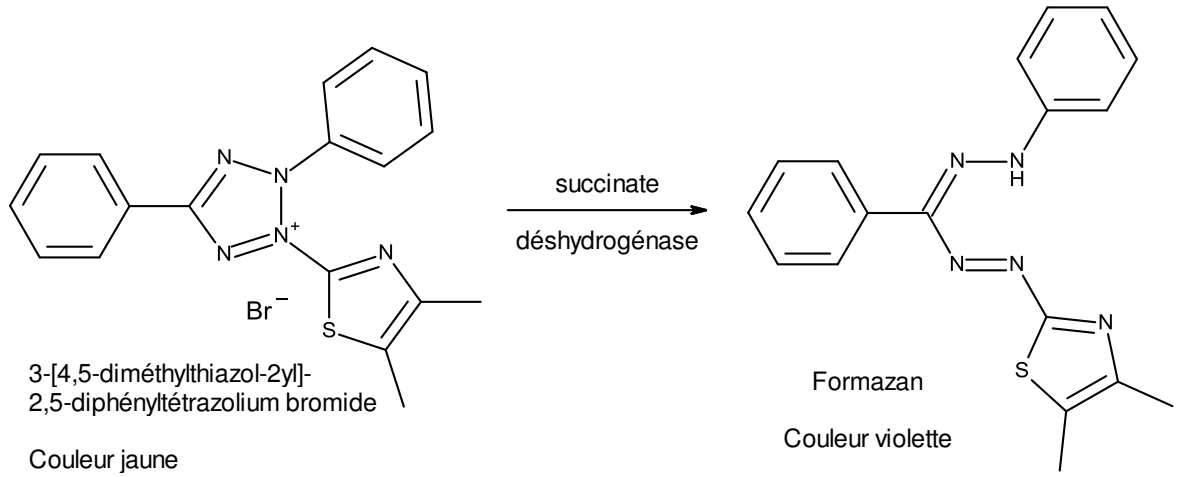


Figure II-I-2. Réaction du test MTT

4.2. Evaluation de la prolifération

4.2.1. Comptage des cellules

Des échantillons des cultures tests et des cultures témoins sont prélevés pour être observés avec une cellule de Malassez, en utilisant un colorant ou non [20].

Pour les cellules eucaryotes deux colorants sont utilisés :

- le bleu trypan qui est un colorant qui ne colore que les cellules mortes,
- le rouge neutre qui colore uniquement les cellules vivantes mais cela entraîne leur lyse.

La figure II-I-3 montre une observation de cellules eucaryote avec un microscope optique équipé d'une cellule de Malassez.

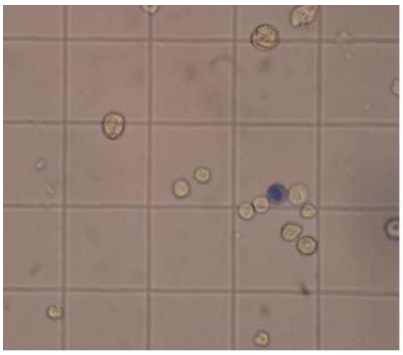


Figure II-I-3 : Observation de cellules eucaryotes sous cellules de Malassez.

Pour les bactéries, le comptage peut être réalisé à l'œil nu ou au microscope à faible grossissement [21].

En effet, une bactérie solitaire cultivée dans un milieu adéquat va former, à l'issue de l'étuvage, une colonie par division successive. Il est impossible de discerner à l'œil nu une bactérie isolée mais cela devient possible lorsque la bactérie a proliféré jusqu'à former une colonie de taille acceptable. La comparaison du nombre de colonies, présentes dans les témoins avec celui observé dans les boîtes exposées, permet de quantifier l'influence de la substance sur la prolifération des bactéries. Il est possible d'utiliser un colorant comme le violet de gentiane après l'étuvage et de fixer cette coloration avec du lugol pour faciliter le comptage.

4.2.2. Evaluation par spectrophotométrie

Les microorganismes cultivés en milieu liquide le rendent opaque à certaines longueurs d'ondes. L'utilisation d'un spectrophotomètre permet de mesurer la turbidité, la teneur du liquide en particules qui opacifient la solution. La turbidité est proportionnelle au nombre de cellules présentes dans le liquide, et donc à l'absorbance lue sur l'appareil [22].

Le calcul du résultat permet de déterminer la prolifération, en divisant les mesures des échantillons exposés par celles des échantillons témoins.

Les définitions et les techniques énoncées vont être utiles à la compréhension des tests biologiques qui sont réalisés dans la deuxième partie de ce chapitre.

En effet, la prolifération a été étudiée par comptage direct pour les cellules eucaryotes et par spectrophotométrie pour les bactéries. La vitalité des eucaryotes a été analysée par une technique de mesure de l'activité métabolique et la formation de biofilms par les bactéries a été mise en évidence par des mesures de l'ATP.

Bibliographie

[1] : R. Hooke, **Micrographia : or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses**. ed. J. Martyn and J. Allestry, Londres, 1665.

[2] : W. Flemming, **Ueber das Verhalten des Kerns bei der Zellteilung und über die Bedeutung mehrkerniger Zellen**. Arch. Pathol. Anat, vol. 77, p. 1-28, 1879.

[3] : R. Virchow, **Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre**, Berlin, 1858.

[4]: L. Pasteur, **Sur la fermentation visqueuse et la fermentation butyrique**, Bulletin de la Société chimique de Paris, p. 30-31, séance du 8 février 1861.

[5] : J.H. Weil, J. Auwerx, Y. Boulanger, N. Dali-Youcef, **Biochimie générale : cours et exercices corrigés,** ed. Dunod, Paris, 2005.

[6] : F.G. Leivas, D.S. Brum, S.S. Fialho, W.P. Saliba, M.T.T. Alvim, M.L. Bernardi, M.I.B. Rubin, C.A.M. Silva, **Fetal calf serum enhances in vitro production of Bos taurus indicus embryos**, Theriogenology, vol. 75, issue 3, p. 429-433, 2011.

[7] : J.P. Pilili, N.V. González, G. Molinari, M.A. Reigosa, S. Soloneski, M.L. Larramendy, **Testing genotoxicity and cytotoxicity strategies for the evaluation of commercial radiosterilized fetal calf sera**, Biologicals, vol. 38, issue 1, p. 135-143, 2010.

[8] : H.H. Bohets, E.J. Nouwen, M.E. De Broe, P.J. Dierickx, **Effects of foetal calf serum on cell viability, cytotoxicity and detoxification in the two kidney-derived cell lines LLC-PK1 and MDCK**, Toxicol. in Vitro, vol. 8, issue 4, p. 559-561, 1994.

[9] : T. Burki, **The Immortal Life of Henrietta Lacks**, The Lancet Oncology, vol. 11, issue 7, p. 618, 2010.

[10] : P. Ranscombe, **HeLa**, The Lancet Oncology, vol. 14, issue 6, p.459, 2013.

[11]: E.K. Colvin, C. Weir, R.J. Ikin, A.L. Hudson, **SV40 TAg mouse models of cancer**, Semin. Cell Dev. Biol., vol. 27, p. 61-73, 2014.

[12] : R. Koch, **Uber bakteriologische Forschung, in : GesamWerke von Robert Koch**, ed. Julius Schwalbe, Leipzig, vol. 659, p.650-660, 1890.

[13] : G. Lanéelle, J. Asselineau, **Biochimie bactérienne : structures, biosynthèses et fonctions des constituants des enveloppes**, ed. Hermann, Paris, 1991.

[14] : H.C. Gram,. **Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten**, Fortschritte der Medizin, vol. 2, p. 185-189, 1884.

[15] : J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D. De Beer, D. Caldwell, D. Korber, G. James **Minireview: biofilms, the customized microniche,** J. Bacteriol., vol. 176, p. 2137–2142, 1994.

[16] : A. Bridier, D. Le Coq, F. Dubois-Brissonnet, V. Thomas, S. Aymerich, R. Briandet, **The spatial architecture of Bacillus subtilis biofilms deciphered using a surface-associated model and in situ imaging**, PLoS One, 2011.

[17] : S. Tu, D. Patterson, J. Uknalis, P. Irwin, **Detection of Escherichia coli O157:H7 using immunomagnetic capture and luciferin-luciferase ATP measurement**, Food Res. Int., vol. 33, issue 5, p. 375-380, 2000.

[18] : Y. Sugawara, M. Takeuchi, **A simple and rapid method for determining cell survival in the cryopreserved shoot apex using luciferin–luciferase ATP assay**, Plant Sci., vol. 130, issue 1, p. 107-112, 1997.

[19] : J.C. Stockert, A. Blázquez-Castro, M. Cañete, R.W. Horobin, Á. Villanueva, **MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets**, Acta Histochem., vol. 114, issue 8, p. 785-796, 2012.

[20] : A. Balamurugan, G. Balossier, S. Kannan, J. Michel, A.H.S. Rebelo, J.M.F. Ferreira, **Development and in vitro characterization of sol–gel derived $CaO–P_2O_5–SiO_2–ZnO$ bioglass**, Acta Biomaterialia, vol 3, issue 2, p. 255-262, 2007.

[21] : A. Balamurugan, G. Balossier, D. Laurent-Maquin, S. Pina, A.H.S. Rebelo, J. Faure, J.M.F. Ferreira, **An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol–gel derived silver-incorporated bioglass system**, Dent. Mater., vol 24, issue 10, p. 1343-1351, 2008.

[22] : A. Métris, S.M. George, M.W. Peck, J. Baranyi**, Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations,** J. Microbiol. Meth., vol. 55, issue 3, p. 821-827, 2003.

2ème partie : Caractérisations de bioverres dopés à l'argent, réalisations de dépôts sur des biocéramiques et évaluations de la réponse biologique.

Le but est de taille dans cette partie, le dopage à l'argent sur un des procédés sol-gel étudié au chapitre I. En effet, l'argent ainsi introduit devrait posséder une action limitant la formation de biofilm par des bactéries [1]. La toxicité de poudres de verres issus des procédés 2A, G et fusion sera évaluée avec des cellules L132, afin de réaliser les dopages à l'argent sur le verre élaboré par le procédé le moins toxique pour les cellules humaines.

Les températures caractéristiques (Tg et Tc) ont été déterminées pour les nouveaux verres dopés, à l'aide d'analyses thermiques et de diffractions des rayons X. Une étude de la bioactivité des verres par immersion dans du fluide physiologique simulé a été également réalisée.

La mise en place d'essais biologiques plus poussés nécessite de déposer les verres sol-gel sur des substrats biocéramiques. Pour réaliser les substrats des essais biologiques, des poudres de TCP sont mises en forme de pastilles. A titre d'essai, un édifice macroporeux en HA est également préparé. Les échantillons sont ensuite recouverts à l'aide d'une technique de trempage-retrait par les bioverres dopés et non dopés avec de l'argent. Des observations MEB caractérisent ces dépôts, avant et pendant leur immersion dans du SBF.

La surface des pastilles de TCP a été ensuite testée avec une souche de bactérie, *Pseudomonas aeruginosa,* afin d'évaluer l'effet antibactérien de l'argent. La toxicité des dépôts pour les cellules eucaryotes MG63 a été également quantifiée. En effet, elle ne doit pas être trop élevée pour ne pas nuire aux cellules de l'hôte.

1. Synthèse de bioverres sol-gel dopés à l'argent

1.1. Effet oligodynamique

En 1893, le botaniste suisse K.W. von Nägeli observe que les ions métalliques de mercure, d'argent, de cuivre, de fer, de zinc, de bismuth, d'or, d'aluminium et d'autres métaux exercent un effet toxique sur les cellules procaryotes et eucaryotes, même à faible concentration [2]. Il baptise ce phénomène effet oligodynamique.

Le mécanisme complet de cet effet est actuellement incompris. Cependant, l'action des cations métalliques doit intervenir sur le métabolisme cellulaire : les virus, dépourvus de métabolisme, ne sont pas affectés par l'effet oligodynamique.

Une étude récente [3] a évalué la toxicité de l'argent et du cuivre sur des colonies de *Salmonella paratyphi*, *Shigella spp.*, *E. coli*, *E. coli* (souche multi-résistante), *Vibrio cholerae* et *Klebsiella*. Elles sont incubées avec de l'eau stockée dans des jarres faites des métaux testés. Après comptage à 48h d'incubation, toutes les souches bactériennes placées dans les jarres en argent montrent une réduction de leur prolifération. Cela est observable même pour les souches d'*E. coli* multi résistantes aux traitements chimiques. Les résultats indiquent que des ions métalliques se lient sur les sites actifs d'enzymes produites par les cellules, ce qui conduit à l'inactivation de ces catalyseurs des réactions du milieu vivant.

Actuellement, l'effet oligodynamique est majoritairement appliqué, grâce au procédé sol-gel, au traitement de surface des matériaux destinés à des usages médicaux [4-5]. Le dépôt réalisé empêche alors la formation de biofilm bactérien à la surface des matériaux traités. En particulier, ce type de dépôt peut être appliqué à des substrats céramiques en hydroxyapatite (HA) ou en phosphate tricalcique (TCP), en utilisant des bioverres obtenus par voie sol-gel judicieusement dopés, à l'instar des travaux de M. Catauro *et al.* [6] et de M.G. Raucci *et al.* [7] qui mettent en œuvre un bioverre ternaire $SiO_2 – CaO – Na_2O$ dopé à l'argent.

1.2. Influence des bioverres non dopés sur les cultures eucaryotes *in-vitro*

Il est nécessaire d'évaluer l'impact biologique des bioverres seuls avant d'entreprendre un dopage des compositions par l'argent, afin de s'assurer que les matériaux, obtenus par les différents procédés de synthèse utilisés, ne présentent pas de toxicité pour les cellules eucaryotes.

Pour cela six bioverres réalisés par différents procédés sont comparés :

- le bioverre 47Q-2A, issu du procédé alcoolate (cf. page 84). Une comparaison complète est possible avec la composition 45S5Q-2A, qui est obtenue avec le même procédé et possède la même composition initiale que le verre 45S5® de Hench.
- les verres 47Q-G et 45S5Q-G qui sont réalisés avec le procédé glycérol (présenté à la page 107).

- les bioverres 47Q et 45S5Q synthétisés par fusion classique qui sont déjà connus pour être biocompatibles [8-10]

Les études de prolifération permettent d'évaluer la concentration létale à 50% ou CL50. La CL50 est la concentration de bioverre à apporter aux cellules pour que la moitié des individus meurent par rapport à témoin non exposé. Elle est déterminée en utilisant un test de développement de colonies de cellules épithéliales de lignée L132 (cellules de poumon embryonnaire humain) [11]. Tous les organes sont recouverts d'une sorte de membrane qui délimite le tissu : les épithéliums. Les cellules épithéliales se situent dans cette membrane. Ces cellules servent à protéger les organes et à faire des échanges avec le milieu extérieur. Ce test respecte les normes internationales et européennes (ISO10993-5/EN30993-5) [12]. La lignée cellulaire épithéliale L132 est choisie pour sa bonne reproductibilité et son efficacité au clonage d'environ 37%. La culture est réalisée en milieu MEM (cf. page 133 et Annexe IV) supplémenté avec 10% de SVF (sérum de veau fœtal).

Les cellules L132 sont exposées continuellement à une concentration croissante (0, 25, 50, 100, 200, 400 mg / L) de poudre de verre bioactif sans renouvellement de l'environnement au cours des expériences. Après une période de culture de 9 jours, le milieu est éliminé et les colonies sont colorées au cristal violet pour compter les cellules encore vivantes. Le nombre de colonies est alors compté sous microscope binoculaire. Au moins six expériences sont effectuées pour chaque groupe de concentration. Les résultats sont exprimés sous forme de valeurs moyennes ± SD par rapport au témoin (environnement sans poudre de verre). L'abréviation SD ou Standard Deviation signifie écart-type. La poudre de nickel a également été testée comme témoin positif. Tous les composés étudiés ont été introduits en poudre avec une granulométrie moyenne de 20 µm.

Les figures II-II-1 à II-II-6 présentent les résultats des tests réalisés sur les bioverres des procédés alcoolates, glycérol et fusion. Les figures II-II-1 et II-II-2 présentent les résultats de prolifération des cellules L132 sur les poudres des bioverres de références : les 45S5Q et 47Q obtenus par fusion classique.

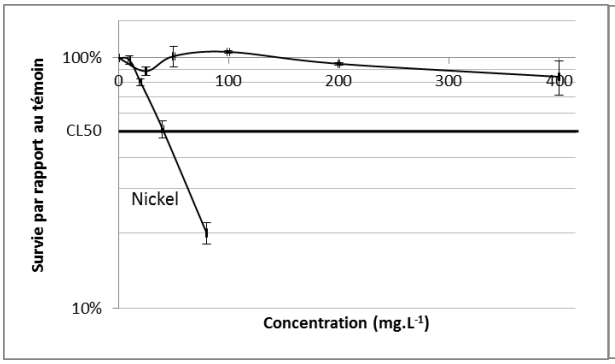


Figure II-II-1 : Etude de la toxicité du bioverre 45S5Q.

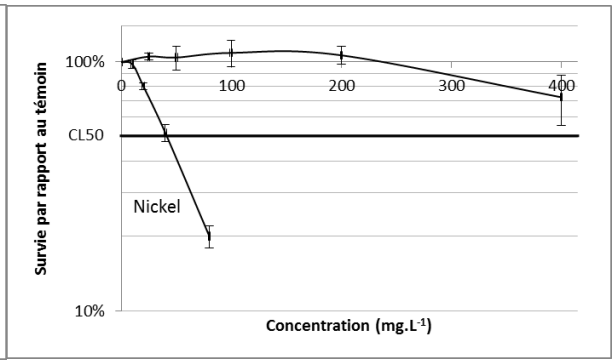


Figure II-II-2 : Etude de la toxicité du bioverre 47Q.

Lorsqu'ils sont en faible concentration dans le milieu, comme par exemple à 25, 50 et 100 $mg.L^{-1}$, la survie des cellules L132 est assurée. En effet, le taux de survie par rapport au témoin dépasse 100% pour ces deux compositions, ce qui signifie que les cellules ne sont pas mortes au contact des verres.

A plus forte concentration, les bioverres réalisé par fusion montrent une toxicité un peu plus exacerbée, mais qui n'atteint jamais la CL50. Les cellules L132 sont des cellules résistantes [13], mais il est possible de conclure que les bioverres fusion 45S5Q et 47Q ne sont pas toxiques pour celles-ci.

Les figures II-II-3 et II-II-4 montrent que la biocompatibilité des poudres de bioverres issues du procédé alcoolate est similaire à celle des bioverres réalisés par fusion.

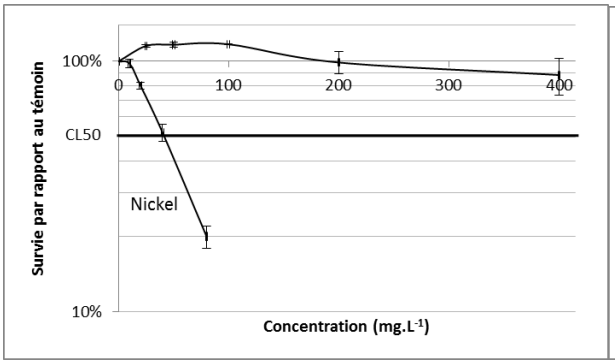


Figure II-II-3 : Etude de la toxicité du bioverre 45S5Q-2A.

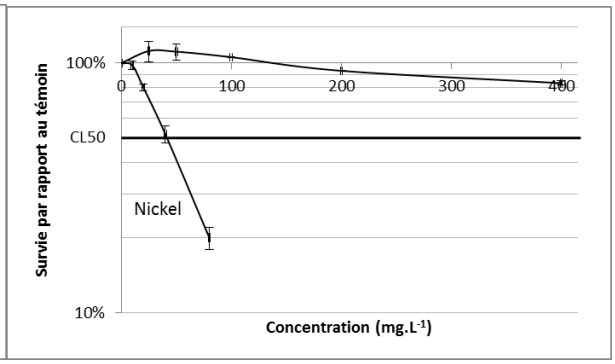


Figure II-II-4 : Etude de la toxicité du bioverre 47Q-2A.

De la même façon, la prolifération est assurée pour les basses concentrations de bioverres 45S5Q-2A et 47Q-2A. Lorsque les concentrations augmentent au-dessus de 100 $mg.L^{-1}$, la

survie est maintenue au-dessus de la CL50. A la concentration maximale de 400 $mg.L^{-1}$ elle est d'environ 85% pour le 45S5Q-2A et de 90% pour le 47Q-2A. Cette perte de prolifération peu marquée permet d'affirmer que les bioverres issus du procédé alcoolate sont non toxiques pour les cellules L132.

Le procédé au glycérol présente une toxicité un peu plus marquée, comme l'indiquent les figures II-II-5 et II-II-6.

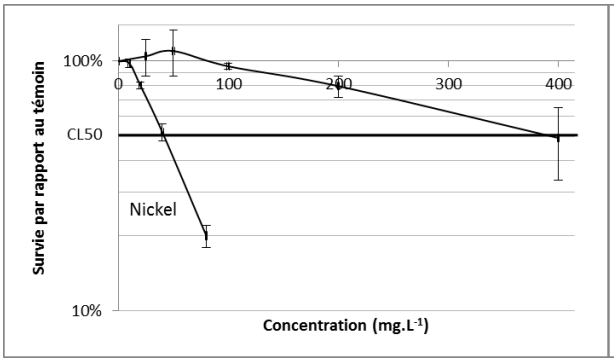


Figure II-II-5 : Etude de la toxicité du bioverre 45S5Q-G.

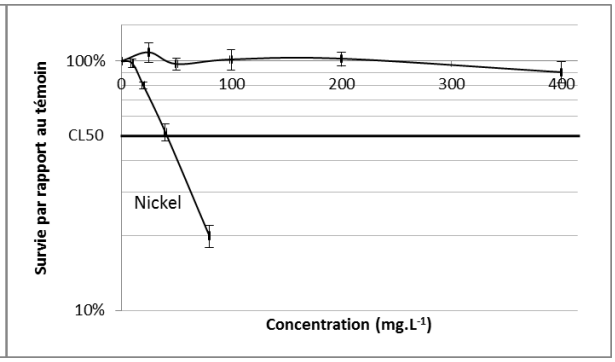


Figure II-II-6 : Etude de la toxicité du bioverre 47Q-G.

Pour les deux compositions testées, la zone de concentration où la toxicité est nulle est plus restreinte. Pour le 45S5Q-G par exemple, c'est à partir de 100$mg.L^{-1}$ que la toxicité commence à augmenter, pour atteindre la CL50 à 400$mg.L^{-1}$. Ce bioverre peut être considéré comme toxique. Ce n'est cependant pas le cas du 47Q-G qui présente des résultats comparables aux verres issus des autres procédés. Il est cependant possible d'observer des valeurs de survie plus faibles aux basses concentrations. Si ce bioverre n'est pas toxique, il peut entraîner un plus grand stress pour les cellules.

Le stress engendré par les verres issus du procédé alcoolate est similaire à celui causé par les verres issus de la fusion à 1400°C sur toute la gamme de concentration.

La CL50 n'étant jamais atteinte pour le procédé alcoolate ce qui n'est pas le cas du 45S5Q-G du procédé glycérol. En conséquence, la suite de l'étude ne portera que sur le dopage des verres 45S5Q-2A et 47Q-2A du procédé alcoolate.

1.3. Introduction de l'argent dans les verres sol-gel

L'argent est introduit dans les sols du procédé alcoolate à l'aide d'acétate d'argent. L'utilisation du groupement acétate présente plusieurs avantages par rapport au nitrate d'argent :

- les groupements acétates sont compatibles avec l'environnement chimique des gels issus du procédé alcoolate. Ils sont déjà introduits dans le sol par le sodium et n'entraînent pas la cristallisation des verres sol-gel. Des essais de synthèses avec du nitrate d'argent ont conduit à l'obtention d'une céramique et non d'un verre.
- des études biologiques récentes [14-15], déconseillent l'usage des nitrates qui sont toxiques pour les organismes.

La première partie de l'étude consiste en l'élaboration et la caractérisation de bioverres sol-gel dopés à l'acétate d'argent sur une gamme de concentration variant de 0,01% à 1% d'Ag_2O.
La deuxième partie portera sur la caractérisation biologique de ces verres déposés à la surface de pastilles en TCP.

1.4. Compositions réalisées

Les compositions 47Q-2A et 45S5Q-2A précédemment étudiées (cf. page 84) sont dopées avec les proportions oxydes d'argent suivantes, en pourcentage molaire : 0,01%, 0,1%, 0,5% et 1%. Même si la synthèse sol-gel utilise un acétate d'argent, l'oxyde d'argent est utilisé pour le calcul des compositions car c'est l'élément présent dans les verres obtenus par fusion et étudiés par A.A. Ahmed *et al*. [16].

Les deux compositions de base ainsi que leurs huit compositions dopées sont résumées dans le tableau II-II-1. Le dopage est réalisé par rapport à l'ensemble des quatre constituants de la composition de base. Par exemple, pour calculer la composition du 47Q-1Ag, il faut multiplier par 0,99 les pourcentages molaires en SiO_2, CaO, Na_2O et P_2O_5 pour amener leur somme à 99% et doper le 47Q-2A avec 1% d'Ag_2O.

Nom	Composition molaire	Nom	Composition molaire
47Q-**2A**	47% SiO_2 - 26,5% CaO - 21,5% Na_2O - 5% P_2O_5	45S5Q-**2A**	46,1% SiO_2 - 26,9% CaO - 24,4% Na_2O - 2,6% P_2O_5
47Q-**0,01Ag**	46,995% SiO_2 - 26,497% CaO - 21,497% Na_2O - 4,999% P_2O_5 - 0,01% Ag_2O	45S5Q-**0,01Ag**	46,095% SiO_2 - 26,897% CaO - 24,397% Na_2O - 2,599% P_2O_5 - 0,01% Ag_2O
47Q-**0,1Ag**	46,95% SiO_2 - 26,47% CaO - 21,47% Na_2O - 4,99% P_2O_5 - 0,10% Ag_2O	45S5Q-**0,1Ag**	46,05% SiO_2 - 26,87% CaO - 24,37% Na_2O - 2,60% P_2O_5 - 0,10% Ag_2O
47Q-**0,5Ag**	46,76% SiO_2 - 26,36% CaO - 21,39% Na_2O - 4,97% P_2O_5 - 0,50% Ag_2O	45S5Q-**0,5Ag**	45,86% SiO_2 - 26,76% CaO - 24,27% Na_2O - 2,58% P_2O_5 - 0,50% Ag_2O
47Q-**1Ag**	46,53% SiO_2 - 26,23% CaO - 21,28% Na_2O - 4,95% P_2O_5 – 1,00% Ag_2O	45S5Q-**1Ag**	45,64% SiO_2 - 26,63% CaO - 24,16% Na_2O - 2,57% P_2O_5 – 1,00% Ag_2O

Tableau II-II-1 : Dopages à l'argent des bioverres 47Q-2A et 45S5Q-2A.

1.5. Mode opératoire

Le tableau II-II-2 indique les précurseurs utilisés pour effectuer les synthèses.

Fonction du précurseur	Nom du produit	Formule	Pureté / Concentration	Masse molaire	Fournisseur
Formateurs de réseau	Tétraéthyl orthosilicate (TEOS)	$(C_2H_5O)_4Si$	99,999 %	208,33 $g.mol^{-1}$	Aldrich
	Triéthyl phosphate (TEP)	$(C_2H_5O)_3P$	> 99,8 %	182,16 $g.mol^{-1}$	
Modificateurs de réseau	Diméthanolate de calcium	$(CH_3O)_2Ca$	97 %	102,15 $g.mol^{-1}$	
	Acétate de sodium	$C_2H_3NaO_2$	99 %	82,03 $g.mol^{-1}$	
Dopant	Acétate d'argent	$C_2H_3AgO_2$	99,9%	166,91 $g.mol^{-1}$	
Solvants	Méthanol	CH_3OH	99 %	32 $g.mol^{-1}$	Prolabo

Tableau II-II-2 : Précurseurs des verres dopés.

Le mode opératoire de réalisation des verres sol-gel dopés avec l'acétate d'argent est identique à celui mis en œuvre pour réaliser les verres non dopés (cf. page 86).
La masse d'acétate d'argent correspondant au dopage est simplement ajoutée dans le sol, puis après homogénéisation, la gélification est entraînée par l'ajout d'eau en quantité stœchiométrique.

1.6. Analyses des bioverres dopés

1.6.1. Temps de gélification

La mesure du temps de gélification des composés 47Q-2A, 47Q-0,01Ag, 47Q-0,1Ag, 47Q-0,5Ag et 47Q-1Ag est représentée sur la figure II-II-7 en fonction du dopage en argent.
Les mêmes mesures sont visibles sur la figure II-II-8 pour les composés 45S5Q-2A, 45S5Q 0,01Ag, 45S5Q-0,1Ag, 45S5Q-0,5Ag et 45S5Q-1Ag. Tous les sols ont une concentration constante égale à 1,33 M comme pour toutes les compositions à base d'alcoolates.

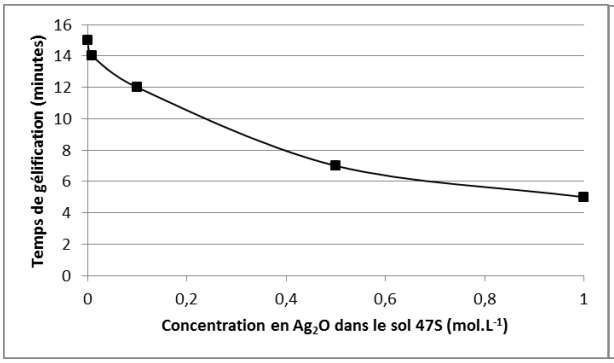


Figure II-II-7 : Temps de gélification du 47Q-2A en fonction du dopage en Ag_2O.

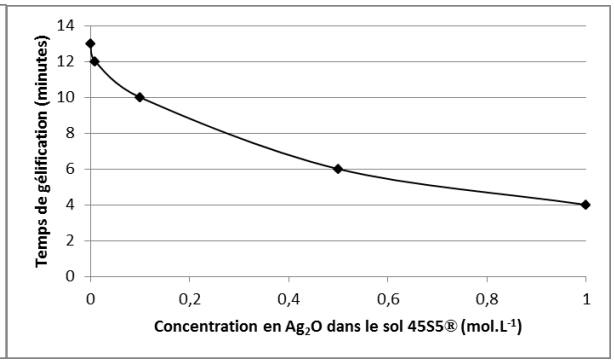


Figure II-II-8 : Temps de gélification du 45S5Q-2A en fonction du dopage en Ag_2O.

Sur les figures II-II-7 et II-II-8, il est possible de remarquer que plus la concentration en argent dans les gels augmente, plus le temps de gélification diminue. D'un extrême à l'autre, le temps de gélification est de 15 minutes pour le 47Q-2A non dopé et de 5 minutes pour le dopage à 1% (figure III-II-7). Similairement sur la figure III-II-8, le temps de gel diminue de 9 minutes entre le 45S5Q-2A et son homologue dopé à 1%.

1.6.2. Observations sur le vieillissement et le séchage des gels

Tout comme les bioverres du procédé 2A (cf. page 89), l'hygrométrie et la température peuvent varier pendant le vieillissement des gels à l'air libre. Le séchage à l'étuve n'est pas non plus réalisé dans des conditions parfaitement reproductibles, seule la température est régulée à 130°C. Ces paramètres incontrôlés nuisent à la reproductibilité des manipulations et peuvent entrainer l'apparition de phases cristallisées, comme des carbonates de calcium ou de sodium.

1.6.3. ATD/ATG

Des analyses ATD/ATG sont effectuées sur tous les gels dopés. Seule une vitesse de chauffe lente permet d'observer la température de transition vitreuse et la température de cristallisation avec le procédé 2A (cf. page 90). Les analyses sont donc effectuées de 40°C jusqu'à 900°C, à une vitesse de chauffe de 1°C/min. Les résultats des analyses des compositions dopées à 0,01%, 0,1%, 0,5% et 1% en Ag_2O issues du 45S5Q-2A sont présentés dans le tableau II-II-3. Le tableau II-II-4 donne quant à lui les résultats obtenus avec le composés 47Q-2A et ceux réalisés sur les gels de mêmes dopages en Ag_2O que précédemment.

	45S5Q-2A	45S5Q-0,01Ag	45S5Q-0,1Ag	45S5Q-0,5Ag	45S5Q-1Ag
Domaine de perte de masse sur l'ATG	40-450°C				
Température de transition vitreuse (Tg)	360°C				
Température de cristallisation (Tc)	420°C				

Tableau II-II-3 : Résultats des ATG/ATD pour les séries de compositions 45S5.

	47Q-2A	47Q-0,01Ag	47Q-0,1Ag	47Q-0,5Ag	47Q-1Ag
Domaine de perte de masse sur l'ATG	40-450°C				
Température de transition vitreuse (Tg)	360°C				
Température de cristallisation (Tc)	420°C				

Tableau II-II-4 : Résultats des ATG/ATD pour les séries de compositions 47Q.

Les tableaux II-II-3 et II-II-4 permettent de définir les températures caractéristiques des gels dopées à l'argent, ainsi que les domaines de pertes de masse. Pour toutes les compositions, les analyses ATG montrent les pertes de masse correspondant au départ du méthanol, de l'eau et du carbone résiduel. Les pertes s'échelonnent de 40°C à 450°C.

Pour la série des 45S5, visible au tableau II-II-3, les dopages réalisés ne modifient pas les températures. Du 45S5Q-2A sans dopage au 45S5Q-1Ag dopé à 1% d'Ag_2O, la température de transition vitreuse est aux alentours de 360°C et la température de cristallisation est d'environ 420°C.

Ces deux températures sont celles également observées pour la série 47Q (Tableau II.II.4).

Pour les deux séries de dopages 45S5 et 47Q, l'argent ne semble pas modifier la température de transition vitreuse et la température de cristallisation. Pour toutes les compositions, un traitement thermique entre Tg=360°C et Tc=420°C doit permettre d'obtenir des verres stabilisés. Afin de laisser le moins de molécules carbonées possible, il est plus favorable de se placer au plus proche du Tc afin de maximiser les différents départs. Afin de préciser ces valeurs, une étude de diffraction des rayons X est réalisée.

1.6.4. Diffraction des rayons X

Les différents verres ont tous été traités de la même façon. Les analyses de diffraction X ont été réalisées sur des échantillons chauffés aux températures de 130, 400, 500, 600 et 700°C. La montée en température est de 1°C/min et la température désirée est maintenue durant 24 heures avant analyse. Les résultats obtenus avec les verres 47Q-0,01Ag, 47Q-0,1Ag et 47Q-0,5Ag sont similaires. Il a été choisi de détailler les résultats du matériau 47Q-1Ag.

La figure II-II-9 montre l'évolution du gel 47Q-1Ag en fonction de la température de stabilisation.

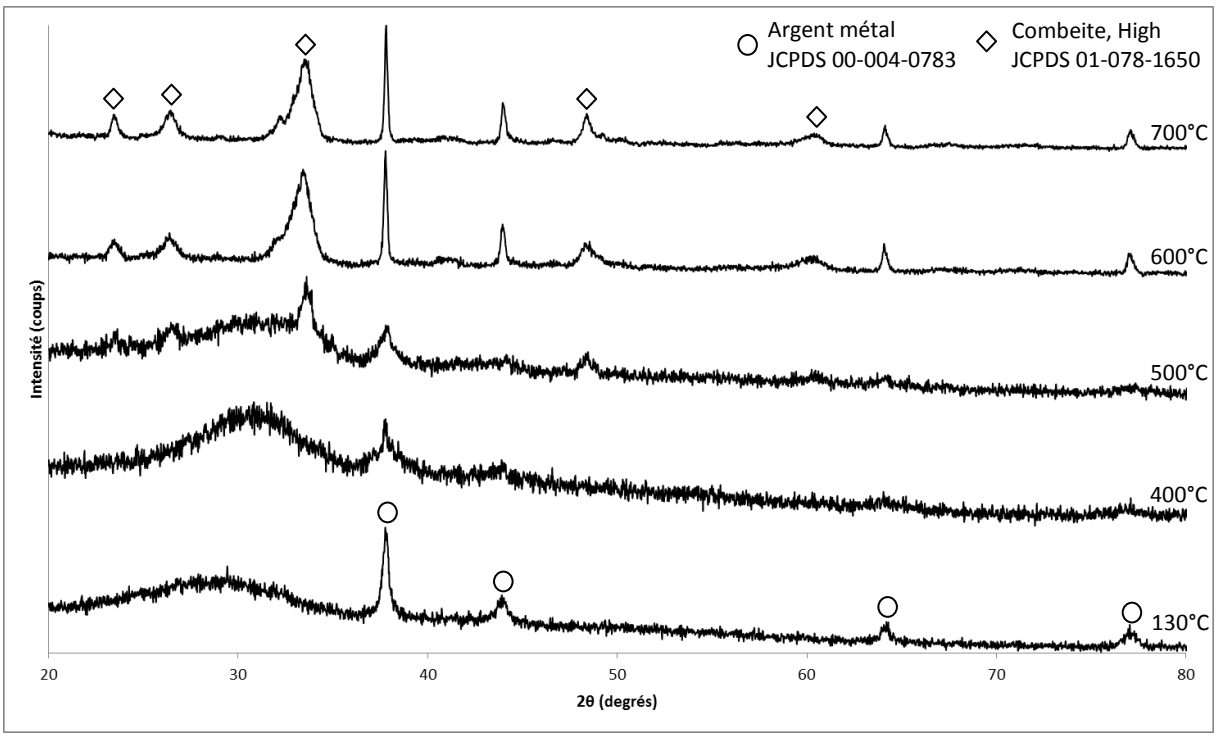


Figure II-II-9 : Diffractogrammes de l'échantillon 47Q-1Ag.

Pour le gel chauffé à 130°C et aux températures supérieures, l'argent n'est pas inséré sous forme amorphe mais sous forme de particule d'argent métallique [17]. Ces particules sont encore détectées aux températures supérieures. Les pics à 38°, 44°, 64° et 77° sont caractéristiques de cet élément. Dans tous les cas, une phase cristallisée apparait à partir de 500°C : elle est identifiée comme de la Combéite High [18].

La température de 400°C parait donc appropriée pour vieillir le gel 47Q-1Ag, en permettant la réalisation d'un composé amorphe dans lequel des particules d'argent métallique sont réparties. Ce résultat est en accord avec ceux de l'ATD/ATG.
Les autres compositions dopées 47Q-0,01Ag, 47Q-0,1Ag et 47Q-0,5Ag présentant la même évolution, il est donc possible de les stabiliser aussi à 400°C.

La même étude a été réalisée sur les gels 45S5Q-0,01Ag, 45S5Q-0,1Ag, 45S5Q-0,5Ag et 45S5Q-1Ag, aux températures de 130, 400, 500, 600 et 700°C. La montée en température est également de 1°C/min, les températures désirées sont maintenues durant 24h avant analyse. Les résultats des 45S5Q-0,01Ag, 45S5Q-0,1Ag, 45S5Q-0,5Ag sont similaires.

Le choix a été fait de détailler les résultats obtenu pour le gel 45S5Q-1Ag (figure II-II-10).

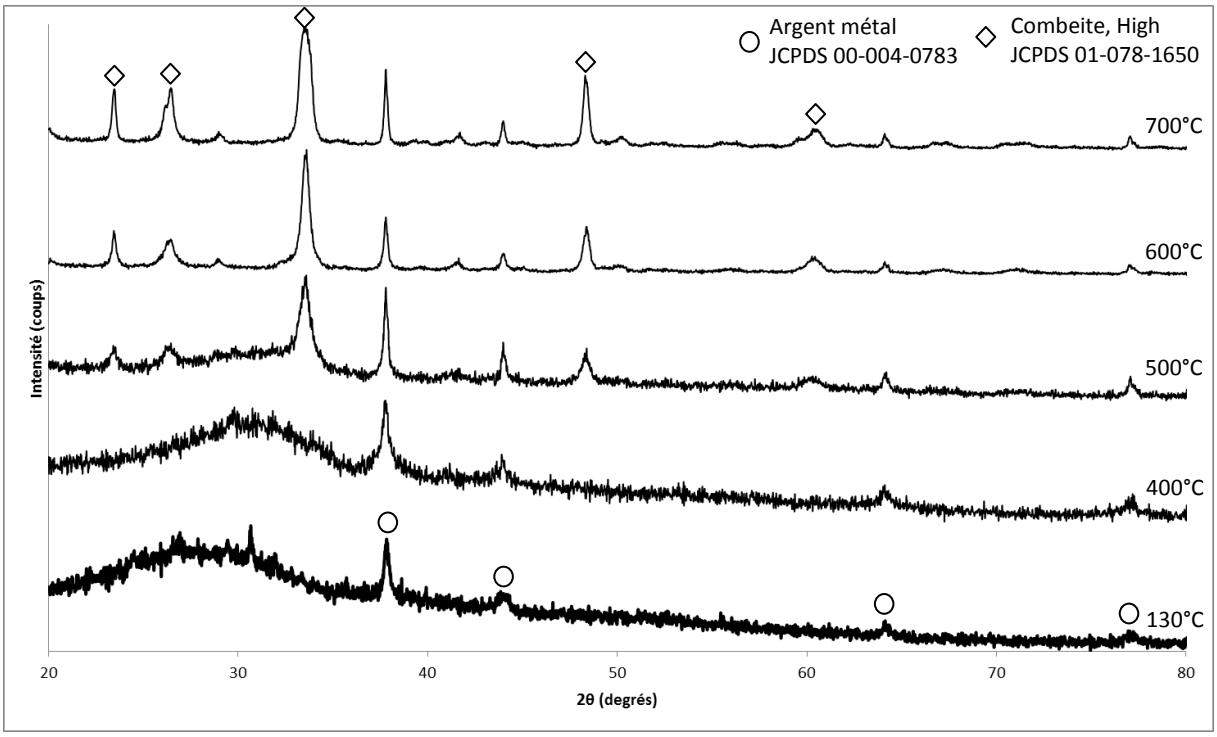


Figure II-II-10 : Diffractogrammes de l'échantillon 45S5Q-1Ag.

Comme pour la composition 47Q-1Ag, l'analyse de la figure II-II-10 montre que l'argent est inséré sous forme de particules d'argent métallique. La phase cristallisée, inchangée, apparait à partir de 500°C. A 600°C puis 700°C, cette phase cristalline est identifiée comme de la Combéite High. C'est la phase couramment rencontrée avec les verres fusions quaternaires obtenus par fusion classique [19-20].

En accord avec les résultats de l'ATD/ATG, la température de 400°C permet d'obtenir un verre stabilisé de composition 45S5Q-1Ag. Le traitement thermique des gels 45S5Q-0,01Ag, 45S5Q-0,1Ag et 45S5Q-0,5Ag peut être effectué à la même température.

1.6.5. Bioactivité dans le SBF

Afin de vérifier que la présence de l'argent n'inhibe pas la bioactivité des verres, deux études d'immersion dans du SBF sont présentées pour les bioverres les plus fortement dopés : le 47Q-1Ag et 45S5Q-1Ag. Les résultats obtenus avec les autres verres dopés sont similaires.

Pour cela, les bioverres dopés sont finement broyés puis pastillés à l'aide d'une presse. Après avoir été résinés pour n'exposer qu'une surface S=1,54cm², les échantillons sont immergés dans un volume V=50cm^3 de SBF. Celui-ci est maintenu à 37°C.
Après des temps d'immersion de 2 heures, 3 heures, 3 heures 30, 24 heures, 3 jours et 7 jours, les échantillons sont sortis du SBF puis rincés à l'eau pure pour finalement être séchés dans une étuve à 130°C. La surface des échantillons est directement analysée par FTIR en mode ATR, après un séchage d'au moins 4h à l'étuve pour que les échantillons soient complètement secs.

La figure II-II-11 montre les résultats de l'immersion dans le SBF du verre 47Q-1Ag et la figure II-II-12 ceux du 45S5Q-1Ag.

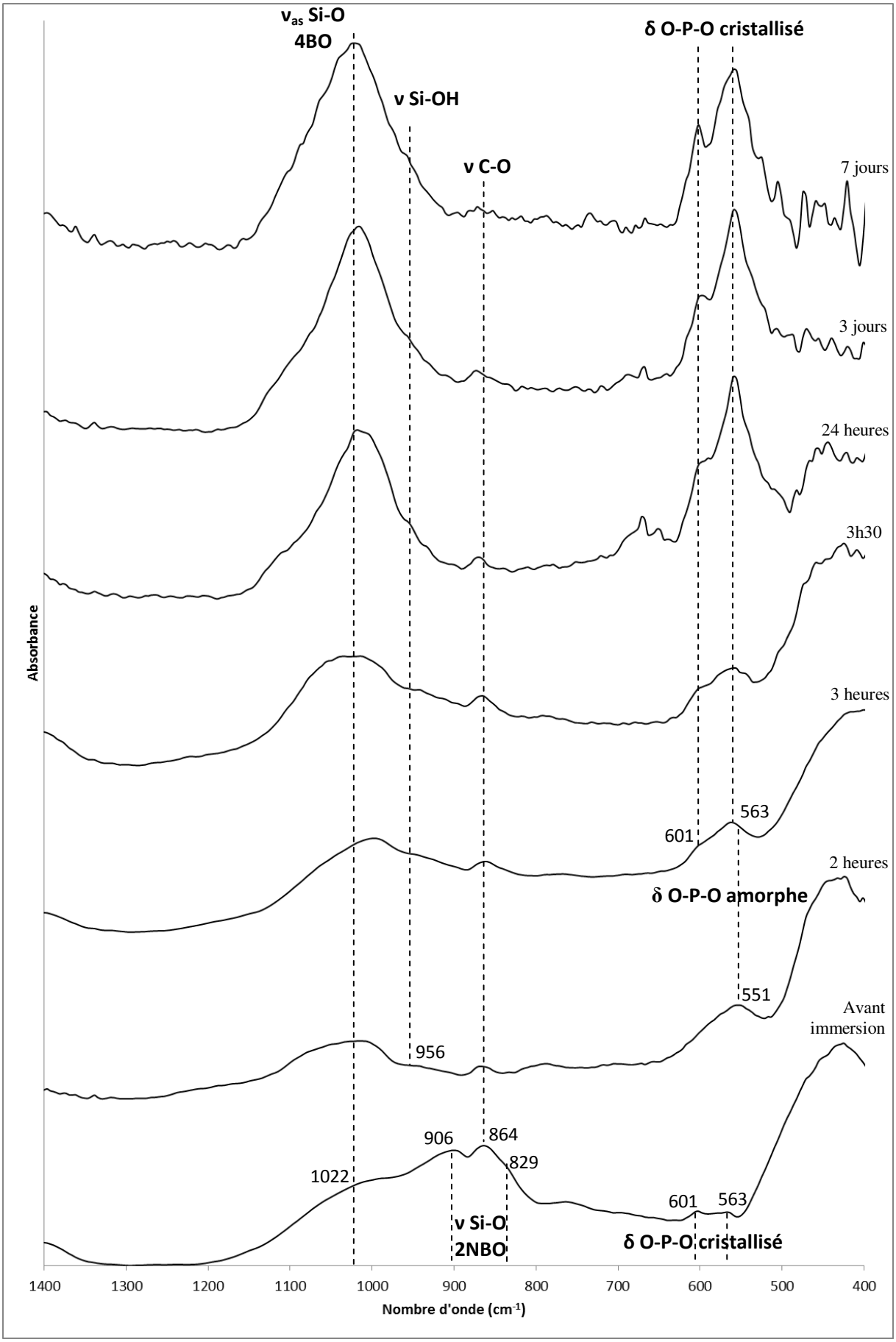


Figure II-II-11 : Spectres Infra-Rouges après immersion dans le SBF du 47Q-1Ag.

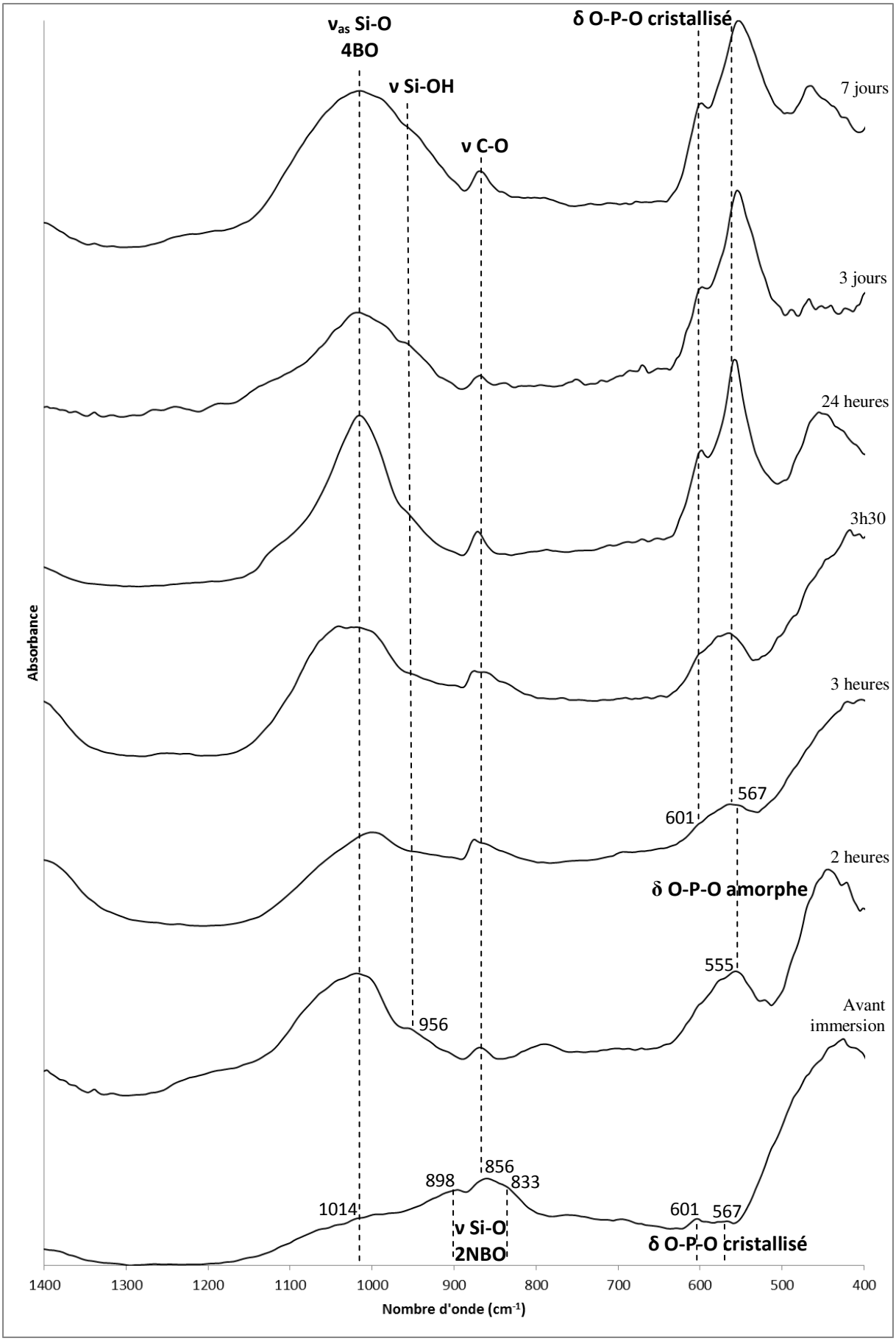


Figure II-II-12 : Spectres Infra-Rouges après immersion dans le SBF du 45S5Q-1Ag.

Les spectres FTIR étant réalisés en mode ATR, les bandes inférieures à 500 cm^{-1} ne sont pas interprétées du fait d'un rapport signal sur bruit non favorable. Il est également admis que les surfaces ne sont pas suffisamment planes après immersion ce qui provoque du bruit dans les données (cf. page 99).

Sur les figures II-II-11 et II-II-12, il est possible de constater que la réactivité après immersion dans le SBF des verres 47Q-1Ag et 45S5Q-1Ag est similaire. C'est pourquoi, il a été choisi d'analyser les résultats du 47Q-1Ag.

Avant immersion les bandes caractéristiques d'un verre stabilisé sont visibles.

- La bande de vibration asymétrique ν_{as} Si-O 4BO est située à 1022 cm^{-1}. Elle indique qu'un réseau de silice tridimentionnel est déjà formé dans le verre.
- La bande ν Si-O 2NBO à deux représentantes : 906 et 829 cm^{-1}. Ces bandes sont indicatrices de la présence d'oxygènes non liés dans le verre avant immersion. Elles sont importantes car nécessaires à la formation d'un gel de silice, ce qui est la première étape de réactivité d'un bioverre.
- Les bandes δO-P-O cristallisé sont présentes à 601 et 563 cm^{-1} et indiquent une cristallisation du phosphore, passé inaperçue lors de la diffraction des rayons X du fait de la faible concentration de cet élément dans le verre.
- La bande ν C-O apparait à 864 cm^{-1}. La présence de cette bande avant immersion est causée par la présence de carbone résiduel dans le verre stabilisé.

Immédiatement après 2 heures d'immersion dans le SBF, le spectre Infra-Rouge montre une repolymérisation de la surface immergée.

- Les bandes ν Si-O 2NBO sont substituées par la bande ν Si-OH à 956 cm^{-1}. Les liaisons NBO du verre, facilement mobiles, se sont transformées en liaisons Si-OH. Cela démontre qu'un gel de silice s'est formé à la surface de l'échantillon, la première étape est donc accomplie.
- La bande de déformation asymétrique δ_{as} O-P-O amorphe apparait à 551cm^{-1}, de façon plus intense comparée à la double bande δO-P-O présente avant immersion. Cela démontre qu'un nouveau dépôt d'apatite amorphe est en cours, la deuxième étape de la réactivité des verres.

A partir de 3 heures d'immersion,

- la bande δ_{as} O-P-O amorphe se dédouble en deux bandes de déformation δ O-P-O cristallisé à 563 et 601 cm^{-1}, montrant la formation d'apatite cristallisée. C'est la troisième et dernière étape.

La bande ν C-O des carbonates est déjà présente avant immersion car il reste du carbone à la suite du traitement thermique du verre. Ce carbone réagit facilement avec l'eau et l'air pour former les groupements carbonates qui sont observés. Après immersion, cette bande ne et encore présente, car il y a aussi carbonatation de l'hydroxyapatite. La bande ν C-O est donc représentative des deux phénomènes.

Sur les spectres à 24h, 3 jours et 7 jours la présence de l'apatite devient progressivement majoritaire face aux bandes du verre initial.

La présence de l'argent ne nuit pas à la bioactivité des verres : l'apparition de l'HAC n'est pas retardée par un dopage à 1% d'argent des compositions 45S5Q-2A et 47Q-2A. Le tableau II-II-5 rappelle les temps d'apparition précédemment observés.

Composition	**45S5Q-2A**	**47Q-2A**
Temps d'apparition de la couche d'HAC	3 heures	

Tableau II-II-5. Temps d'apparition de l'HAC pour les 45S5Q-2A et 47Q-2A

Les verres 45S5Q-1Ag et 47Q-1Ag peuvent donc être qualifiés de bioactifs à partir de trois heures d'immersion dans le SBF. C'est également le cas des compositions dopés à 0,01%, 0,1% et 0,5% d'argent pour la série des verres 45S5 et 47Q : ils sont tous bioactifs à partir de trois heures d'immersion.

1.7. Discussion

Le dopage à l'argent de bioverres de composition de base 45S5 et 47Q est possible avec une méthode de synthèse sol gel par voie alcoolate et l'utilisation d'acétate d'argent. Pour tous les gels séchés à 130°C et à toutes les températures supérieures, de l'argent métallique ressort du massif amorphe sur les diffractogrammes X.

La phase cristalline qui apparaît au-delà de la température de cristallisation des verres dopés est identique à celle des verres non dopés. Il s'agit aussi de la combéite high.

Le séchage de gels n'est pas parfait et l'élimination du carbone n'est pas totale. Il peut y avoir formation de carbonate dans les gels, suivant les conditions atmosphériques au moment de la manipulation. Ces groupements peuvent être en effet présents sur les spectres FTIR des verres obtenus, mais ils sont difficiles à observer par diffraction X.
Pour une vitesse de montée en température de 1°C/min, la transition vitreuse du réseau de tous les verres dopés se situe à 360°C et celle de cristallisation du réseau à 420°C. En analysant les données de l'ATD/ATG et de la diffraction des rayons X, il est possible d'établir la température d'élaboration de tous les composés vitreux à 400°C.

La spectroscopie Infra-Rouge en mode ATR permet de vérifier la bioactivité. En effet, tous les verres dopés sont bioactifs à partir de 3h d'immersion dans le SBF. Comme pour les bioverres non dopés du procédé 2A, la première étape de la réaction de surface des verres, la formation du gel de silice est accélérée par rapport aux verres obtenus par fusion, cela est favorisé par la méthode de synthèse. Le dépôt d'apatite amorphe, la deuxième étape, s'effectue dès deux heures. La troisième étape, l'apparition de l'apatite carbonatée, est visible à trois heures. Ces valeurs sont proches de celles observées lors de l'immersion de bioverres obtenus par fusion. Les temps d'apparition de l'apatite pour les verres sol-gel et fusion [8] sont rappelés dans le tableau II-II-6.

Composition	**45S5**	**45S5Q-2A**	**45S5Q-1Ag**	**47Q**	**47Q-2A**	**47Q-1Ag**
Temps d'apparition de la couche d'HAC	8 heures	3 heures	3 heures	2 heures 45 minutes	3 heures	3 heures

Tableau II-II-6. Comparaison des temps d'apparition de l'HAC des compositions fusion de C.Duée [8] et les compositions sol-gel.

Le temps d'apparition est égal à 3 heures pour toutes les compositions 47Q, 47Q-2A et 47Q-1Ag. Si les verres sol-gel 45S5Q-2A et 45S5Q-1Ag forme l'HAC dans le même délai (3 heures), la composition 45S5 réalisée à 1400°C montre une apparition retardée de cinq heures. Dans le cas des verres obtenus par fusion, les différences de compositions exercent

beaucoup d'influence sur le temps d'apparition de l'HAC. Cela ne semble pas être le cas avec le procédé sol-gel 2A.

2. Recouvrement de substrats biocéramiques

Les biocéramiques traditionnelles en HA et TCP présentent une bonne compatibilité naturelle avec les cellules eucaryotes [21]. Pour réaliser les substrats, des poudres d'HA et de TCP sont synthétisées au laboratoire. La synthèse par double décomposition est utilisée (cf. Annexe I). Cette méthode présente l'avantage de pouvoir synthétiser une grande quantité de produit avec une bonne reproductibilité. Elle permet aussi d'exercer un contrôle sur la stœchiométrie finale du matériau. Il est ainsi possible d'obtenir de l'HA, du TCP mais aussi des compositions mixtes.

Les poudres issues de ce procédé doivent dans un premier temps être mise en forme de pastilles [22] et d'édifices macroporeux [23]. Ces substrats seront ensuite recouverts par les bioverres dopés avec de l'argent et non dopés.

2.1. Mise en forme des substrats

2.1.1. Pastilles denses

Le dépôt sol-gel est réalisé sur des substrats denses en TCP en forme de pastilles dont le diamètre est imposé par les contraintes des tests biologiques. Les manipulations se déroulant dans des puits d'essais d'un diamètre de 1,5 cm, les pastilles doivent mesurer 1,4 cm après frittage pour être adaptées.

Lors de tests biologiques, il est nécessaire de répliquer les manipulations sur un grand nombre d'échantillons afin de calculer un écart type réaliste. Il est donc indispensable de mettre en forme les poudres de biocéramiques avec des méthodes permettant d'obtenir facilement un nombre important de pastilles correctement dimensionnées.

Dans ce but, une méthode efficace est le coulage en bande (cf. Annexe II) : le couteau d'un banc de coulage est réglé pour obtenir une bande crue d'une épaisseur de 1,5 mm. Des pastilles sont ensuite découpées dans celle-ci avec un emporte-pièce de 2 cm. Après un traitement thermique à 1150°C pendant 3h, les dimensions des pastilles sont réduites à des

valeurs moyennes de 1,4 cm pour le diamètre et de 1mm pour l'épaisseur. Le frittage des crus d'HA et de TCP implique un retrait environ égal à 30% de leurs dimensions initiales.

Ce procédé présente toutefois une limitation concernant l'épaisseur possible de la bande : il est difficile de tirer une bande crue de deux millimètres d'épaisseur sans qu'elle ne s'affaisse, limitant alors l'épaisseur après frittage d'échantillons en HA et TCP autour du millimètre. Les essais biologiques nécessitent d'utiliser des pastilles de plus de 1 mm d'épaisseur afin que les manipulations de celles-ci au fond des puits soient plus aisées. De telles épaisseurs sont difficiles à obtenir avec un procédé de coulage en bande, les substrats denses utilisés pour les manipulations biologiques sont donc réalisés avec un procédé de moulage traditionnel.

2.1.2. Substrats macroporeux

Une structure macroporeuse en HA ou en TCP présente une bonne biocompatibilité avec les organismes vivants [23]. Il est donc intéressant de recouvrir ces édifices, à titre d'essai pour des études ultérieures. Une série d'immersions dans du SBF est donc réalisée à des temps différents sur des édifices macroporeux en HA recouvert de bioverre 47S-2A.
La structure du macroporeux est élaborée par imprégnation d'un squelette de bille de PMMA par une barbotine. Une technique de chimie formage est utilisée pour élaborer ce squelette [24].

Les échantillons macroporeux sont réalisés avec des macropores d'environ 500 µm communiquant entre eux par des interconnexions de 150 µm. En prenant compte du retrait lors du frittage, des billes de PMMA sont tout d'abord criblées entre 600 et 700 µm. Les billes de PMMA sont réparties jusqu'à la hauteur voulue dans un moule. Le solvant constitué d'un mélange volumique de 50% d'acétone et de 50% d'éthanol, est apporté dans le moule jusqu'à recouvrir totalement les billes. Un pilon est ajouté par-dessus et exerce par gravité une légère pression. Sous l'action conjointe du pilon et du solvant, les billes vont se souder les unes aux autres. Le diamètre de l'interconnexion des billes sera proportionnel au retrait du pilon dans le moule.

Un modèle issu d'études au laboratoire [25] est utilisé pour déterminer de façon empirique, le retrait nécessaire au pilon pour atteindre une interconnexion d'environ 150µm après le

déliantage et le frittage de l'échantillon. Le tableau II-II-7 donne un aperçu du modèle empirique pour des billes de PMMA de 600 à 700 µm.

Diamètre d'interconnexion (µm)	Hauteur initiale dans le moule (mm)	Retrait du pilon (µm)	Diamètre après imprégnation et frittage HA (µm)
150	4	29,1	122
160	4	47,9	130
170	4	66,7	138
180	4	85,4	146
187,75	**4**	**100,0**	**152**
190	4	104,2	154
200	4	123,0	162
210	4	141,8	170

Tableau II-II-7 : Modèle empirique d'évaluation du diamètre d'interconnexion.

Pour avoir un diamètre d'interconnexion environ égal à 150 µm après le frittage, le tableau II-II-7 indique un retrait du pilon de 100 µm. Le diamètre d'interconnexion des billes avant frittage sera d'environ 190 µm. Si un échantillon plus haut que 4 mm est souhaité, il suffit d'augmenter proportionnellement le retrait du pilon. Par exemple, pour une hauteur initiale de 5,1mm de billes dans le moule, le retrait du pilon sera calculé à 127 µm.

Ce retrait est mesuré à l'aide d'un palpeur. Une fois le retrait souhaité obtenu, il est nécessaire de rincer le squelette macroporeux à l'eau pure afin de stopper la dissolution des billes par le solvant.

Une observation au microscope à balayage électronique permet de caractériser les diamètres des billes ainsi que celui de leurs interconnexions après l'étape de chimie formage. Deux micrographies de ces échantillons sont présentées à la figure II-II-13.

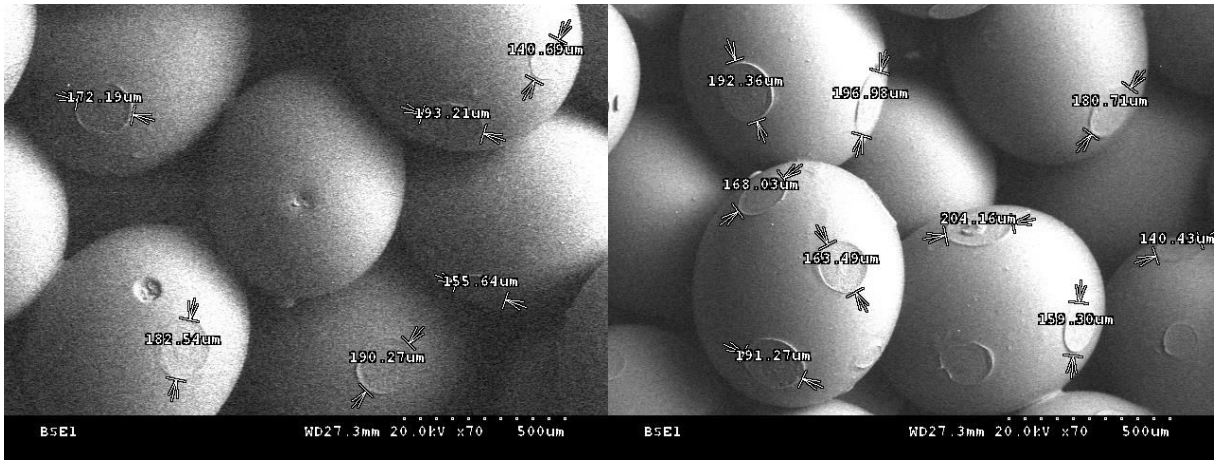


Figure II-II-13 : Micrographies du squelette de PMMA des substrats macroporeux.

Sur cette figure, le diamètre d'interconnexions moyen mesuré par le MEB est de 175 µm. Il existe donc un écart de 15 µm entre le diamètre prédit par la loi empirique et le diamètre réel, qui peut être corrigé en augmentant le retrait du pilon dans le moule.

La mise en forme des structures macroporeuses est réalisée par l'imprégnation d'un squelette de billes de PMMA par une barbotine aqueuse à 75% de matière sèche. Après imprégnation sous vide du squelette avec la barbotine et séchage, l'échantillon est placé dans un four électrique programmé pour un traitement thermique en deux étapes :

- le déliantage, réalisé à 220°C pendant 30 heures, où le squelette est dégradé pour laisser place à la macroporosité, suivi d'un palier à 400°C pendant 3 heures pour éliminer le carbone résiduel,
- le frittage qui s'effectue à 1150°C pendant 3 heures.

Une fois ces étapes réalisées, l'échantillon peut être recouvert de bioverre sol-gel par un procédé de trempage retrait.

2.1.3. Méthode de dépôt

Différents essais ont été réalisés afin de caractériser le dépôt de bioverre sol-gel à la surface de substrats en biocéramiques denses et macroporeux. Le bioverre 47Q-2A préalablement étudié est déposé sur des pastilles en TCP et dans des structures macroporeuses en HA. Pour compléter l'étude et comparer les dépots réalisés avec les procédé 2A et G, la composition 47Q-G est déposée sur des pastilles en TCP. La technique de recouvrement utilisée est le trempage-retrait (cf. Annexe III).

Les premières étapes sont la préparation d'un sol puis l'amorçage de la gélification tout en maintenant l'agitation. A partir de ce moment, la température du sol est notée à intervalles réguliers afin de suivre l'évolution des réactions d'hydrolyse se produisant dans le sol. En effet, les réactions d'hydrolyse des précurseurs sont exothermiques, contrairement aux réactions de condensation. Lorsque l'avancement des réactions d'hydrolyse est maximal, la température du sol est également maximale.

Lorsque la température commence à décroitre, les alcoolates sont donc à leur taux d'hydrolyse maximal. A ce moment, il y a peu de groupements condensés. Il est possible de ralentir fortement ces réactions de condensation en refroidissant le sol aux alentours de 0°C. Cette étape fait office de trempe qui permet d'augmenter le temps de gélification. Pour tous les bioverres du procédé 2A à 1,33M, le temps de gélification est allongé d'au moins 4 heures.

Un dépôt réalisé au tout début de la trempe dans la glace fait apparaître plusieurs caractéristiques avantageuses :

- le dépôt présente une meilleure homogénéité de par l'absence d'agglomérat solide,
- il possède une meilleure adhérence par la présence d'une grande quantité de liaisons Si-OH non condensées qui peuvent alors se lier avec le substrat.

Les éventuels défauts de surface sont préalablement éliminés des substrats sous forme de pastilles à l'aide d'un papier abrasif SiC 120. Celles-ci sont également recouvertes d'un adhésif disposé sur l'une des deux faces, afin de ne recouvrir qu'un seul côté de la pastille lors du trempage. Une pince laisse un endroit non recouvert à l'endroit de son attache alors que l'adhésif permet également d'attacher la pastille à recouvrir au dip-coater par une extrémité. Les échantillons macroporeux n'ont pas besoin de préparation avant le recouvrement.

L'agitation est interrompue temporairement lors du trempage jusqu'au retrait total du substrat afin de ne pas créer de mouvements dans le sol, qui se traduiraient par des irrégularités sur le dépôt. Dans tous les cas, la vitesse de trempage-retrait est de 10 cm par minute.
Après un séchage à l'étuve à 70°C pendant 24h, les échantillons sont déposés pendant une journée dans un four électrique réglé sur la température de stabilisation des bioverres. Cette température est de 400°C pour le verre 47Q-2A (cf. page 94) et de 700°C pour le verre 47Q-G (cf. page 111).

Il est possible de réaliser plusieurs couches de bioverre. Dans ce cas, chaque couche est déposée, séchée puis vieillie à haute température, avant de recommencer le protocole pour déposer la suivante. Un nouveau sol est préparé à chaque fois.

2.2. Caractérisations des dépôts de bioverre sur pastilles de TCP

2.2.1. Masse de verre déposée

Cinq pastilles en TCP sont pesées avant et après recouvrement dans un même sol 47Q-2A et après stabilisation à 400°C. Les valeurs de ces pesées sont présentées dans le tableau II-II-8. Les pastilles sont préalablement séchées à l'étuve. La méthode du bain de glace est utilisée, ainsi qu'une vitesse de trempage retrait de 10 $cm.min^{-1}$. Le diamètre moyen des pastilles est de 1,4 cm, soit 1,54 cm² de surface recouverte.

Avant recouvrement (1)	Après recouvrement (2)	Après stabilisation (3)	(2) - (1)	(3) - (1)
1,0836 g	1,0845 g	1,0839 g	0,9 mg	0,3 mg
1,2219 g	1,2227 g	1,2225 g	0,8 mg	0,6 mg
1,0605 g	1,0614 g	1,0609 g	0,9 mg	0,4 mg
1,0246 g	1,0254 g	1,0251 g	0,8 mg	0,5 mg
1,2398 g	1,2407 g	1,2403 g	0,9 mg	0,5 mg
		Moyenne	0,86 mg	0,46 mg
		Moyenne.cm^{-2}	0,56 $mg.cm^{-2}$	0,30 $mg.cm^{-2}$

Tableau II-II-8 : Mesures de masses de dépôts de 47S-2A sur TCP.

Le tableau II-II-8 permet de déduire que la masse de dépôt moyenne avant stabilisation est de 0,86 mg. Après passage à 400°C, il reste 0,46 mg de bioverre sur une pastille de 1,54 cm². Ramené à 1cm², le procédé permet de déposer une masse de 0,3 $mg.cm^{-2}$ de bioverre 47Q-2A.

2.2.2. Caractérisations des dépôts de bioverre 47Q-2A

Les clichés MEB (Hitachi S3500) présentés à la figure II-II-14 permettent d'observer l'aspect d'un dépôt de bioverre 47Q-2A à la surface de pastilles en TCP.

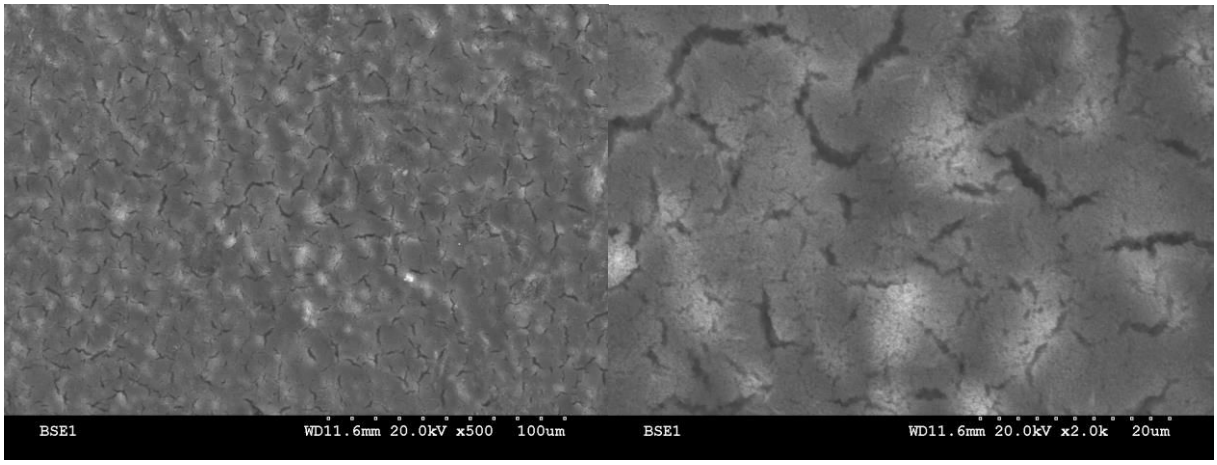


Figure II-II-14 : Observations MEB d'un dépôt de bioverre 47Q-2A à la surface de pastille en TCP.

L'analyse de la figure II-II-14 montre que le dépôt de 47Q-2A à la surface du TCP est homogène. Il existe des fissures qui sont probablement apparues lors de l'évaporation du solvant. Aux abords de ces fissures, la couche de bioverre se décolle. Les fissures étant de petite taille et régulièrement réparties, ce phénomène donne un aspect ondulé au dépôt.

Le recouvrement par un verre dopé à 1% d'argent (47Q-1Ag) est observé sur la figure II-III-15.

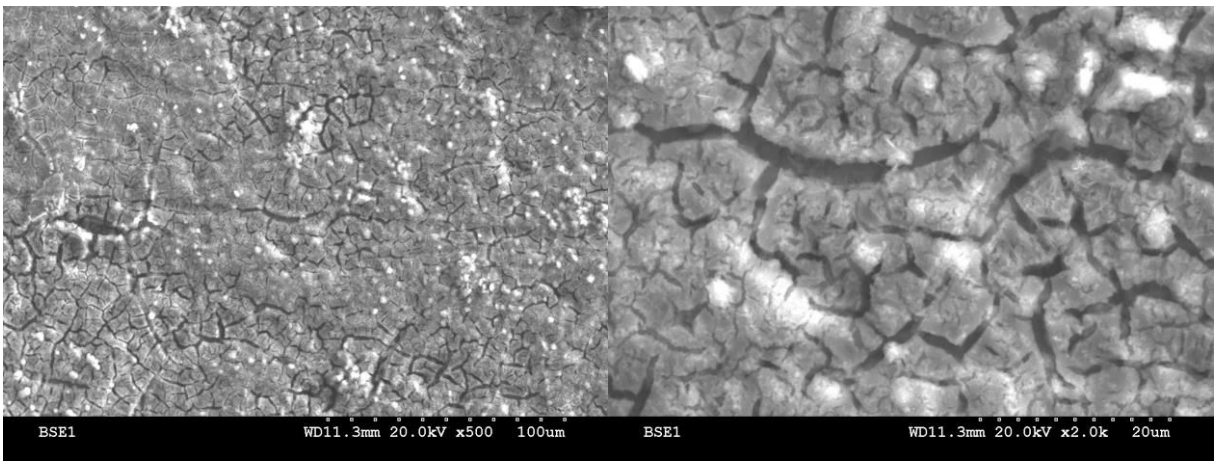


Figure II-II-15 : Observations MEB d'un dépôt de bioverre 47Q-1Ag à la surface de pastille en TCP.

L'échantillon de la figure II-II-15 présente des fissures plus marquées et la présence sur sa surface de particules plus brillantes car elles envoient plus d'électron au détecteur que le dépôt de verre. Il s'agit de l'argent métallique observé lors de la diffraction X.

Des fissures plus larges permettent d'évacuer plus de solvant lors du séchage : la couche de verre se décolle alors moins du TCP.

La figure II-II-16 est une photographie MEB d'une vue en coupe d'une pastille de TCP recouverte de deux couches de bioverre 47Q-2A. Cette coupe permet de déterminer l'épaisseur moyenne de bioverre déposé.

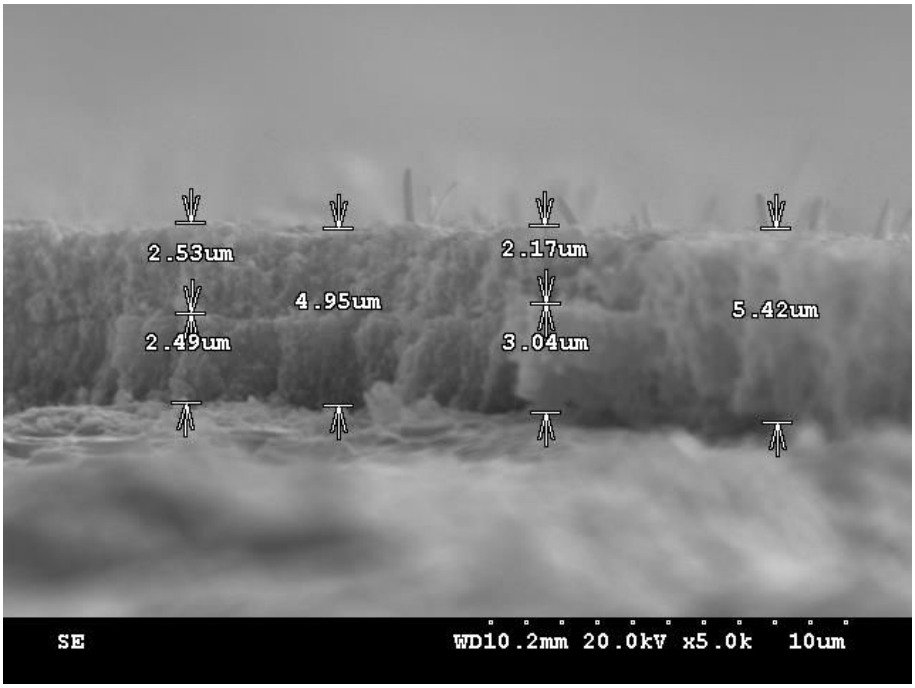


Figure II-II-16 : Observations par la tranche du dépôt de bioverre 47Q-2A.

L'analyse de la figure II-II-16 permet de déterminer l'épaisseur de bioverre déposé pour chaque couche, soit 2,5 µm. Une épaisseur moyenne de 5 µm est obtenue pour les deux dépôts successifs. L'épaisseur mesurée pour les autres bioverres du procédé 2A reste dans le domaine 2-2,5µm. Les aiguilles parfois présentes sur le dessus du dépôt sont provoquées par un séchage mal contrôlé, qui peut provoquer la croissance de composés cristallisés comme les carbonates.

2.2.3. Caractérisations des dépôts de bioverre 47Q-G

Les micrographies que comporte la figure II-II-17 permettent d'observer un dépôt de bioverre 47Q-G à la surface de pastilles en TCP.

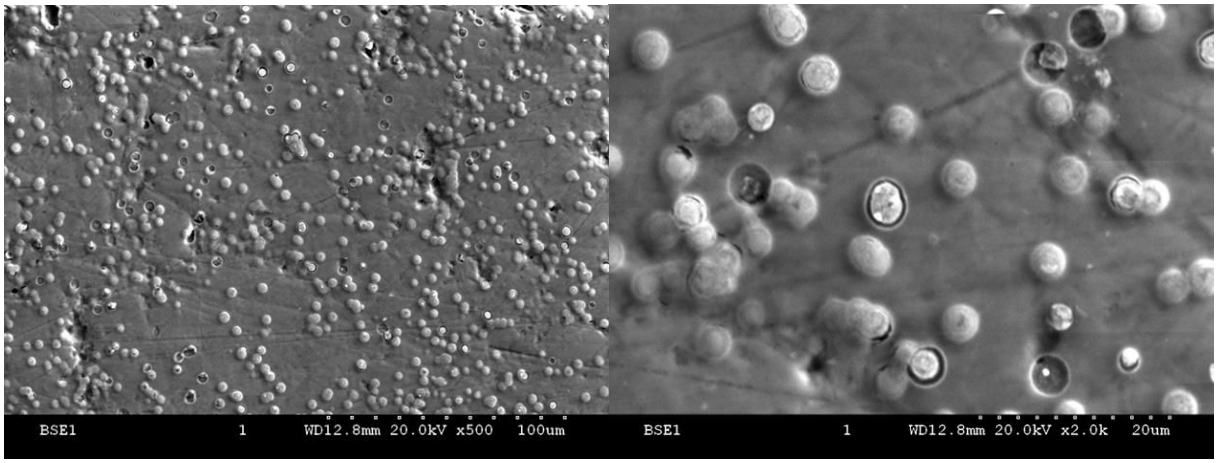


Figure II-II-17 : Observations MEB du dépôt de bioverre 47Q-G.

Les observations MEB de la figure II-II-17 révèlent que la surface des pastilles est recouverte d'un mélange de billes de verre liées entre elles par un dépôt plat de verre. Sur cette figure, le dépôt est un peu fissuré. L'arrachage de certaines billes fait apparaître des cratères.

La figure II-II-18 présente des observations MEB réalisées après avoir cassé une pastille, ce qui permet d'évaluer l'épaisseur du dépôt de bioverre.

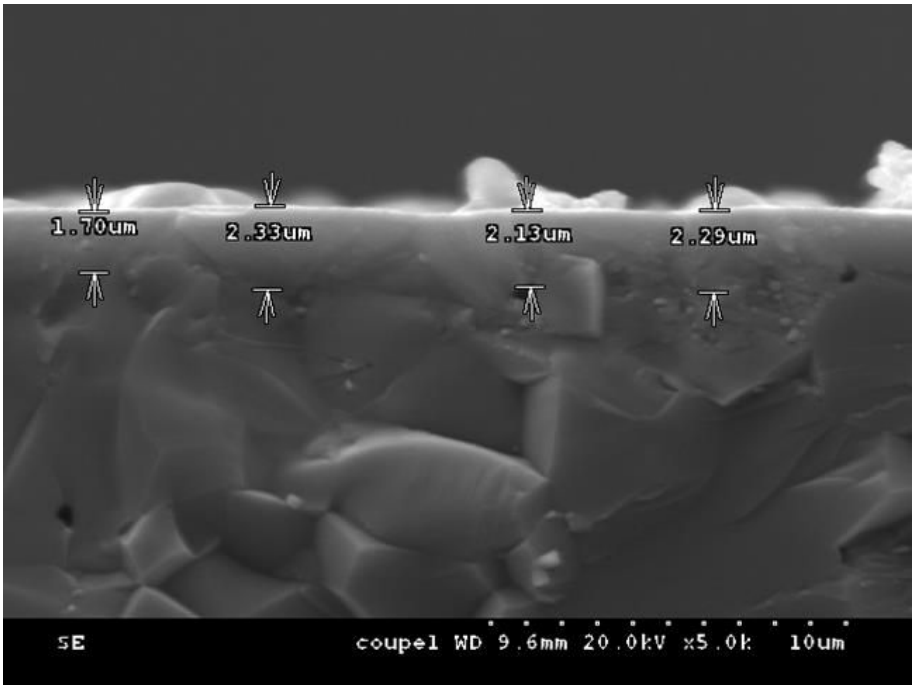


Figure II-II-18 : Observation en tranche du dépôt de bioverre 47Q-G.

Sur les micrographies présentées figure II-II-18, le dépôt de bioverre apparaît plus clair et le substrat plus foncé. Le 47Q-G recouvre par une épaisseur moyenne de 2 µm la surface

accidentée du substrat. Les billes sont visibles et elles émergent d'environ 1 à 2 µm par rapport à la surface, ce qui permet d'estimer leur diamètre moyen entre 2 et 3 µm.

2.3. Immersion dans le SBF

2.3.1. Immersion de pastilles en TCP recouvertes

Pour observer l'évolution des dépôts réalisés, des pastilles en TCP sont recouvertes de bioverre 47Q-2A et 47Q-1Ag, puis immergées dans du SBF dont la température est régulée à 37°C. Les pastilles sont plongées dans un volume V = 50 cm^3, la face recouverte étant sur le dessus, en contact avec le SBF. Le diamètre de la pastille est de D = 1,4 cm, soit une surface S = 1,54 cm^2 d'où S/V = 0,03 cm^{-1}. Après immersion, la pastille est rincée avec de l'eau pure, ce qui stoppe les réactions en cours. Elle est ensuite placée dans une étuve à 70°C pendant au moins 4 heures, le temps du séchage. Une fois ce délai écoulé, la surface de la pastille est observée au MEB.

La figure II-II-19 présente les photographies obtenues avant et après 3 et 7 jours d'immersion dans le SBF.

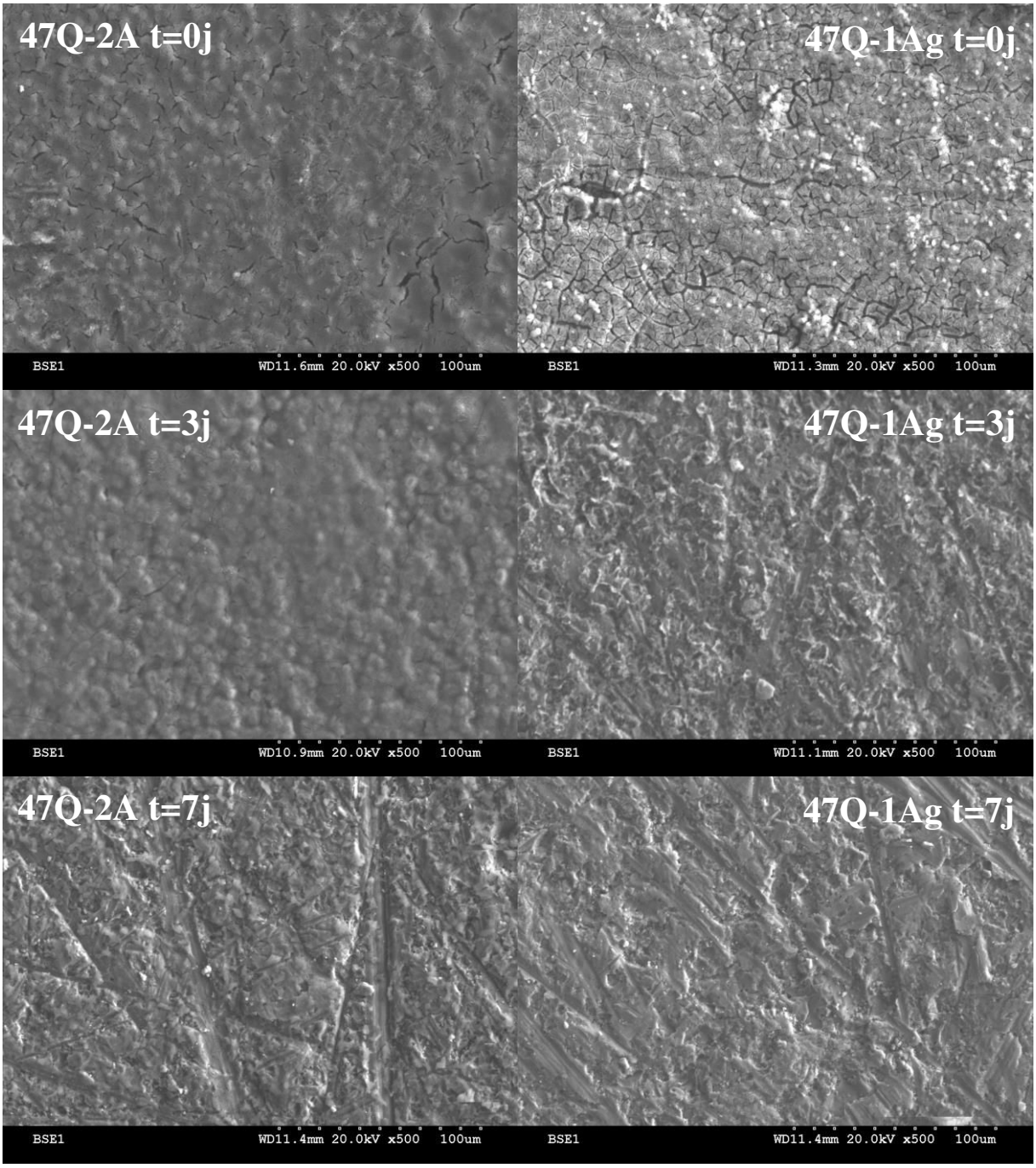


Figure II-II-19 : Observation MEB de la formation de la couche d'hydroxyapatite en fonction du temps d'immersion dans le SBF.

L'analyse de la figure II-II-19 fait apparaitre que les deux dépôts bioverres 47Q-2A et 47Q-1Ag ont commencé leur dégradation à 3 jours d'immersion. La dissolution de la couche de verre débute à l'endroit des fissures observées avant immersion. La couche de verre 47Q-1Ag présentant des fissures plus larges, elle se dégrade un peu plus vite que celle du 47Q-2A.

A 7 jours d'immersion, les deux dépots de bioverres n'ont pas encore totalement disparu. Ils sont cependant fortement dégradés et il est possible d'apercevoir le substrat.

2.3.2. Immersion d'édifices macroporeux

L'étude est poursuivie par une immersion d'échantillons macroporeux en HA recouverts par le bioverre 47Q-2A dans du SBF maintenu à 37°C. Lorsque le temps d'immersion choisi est atteint, les échantillons sont sortis du SBF puis rincés à l'eau déminéralisée afin d'arrêter les réactions en cours. Ils sont ensuite placés dans une étuve à 70°C pendant 24h, puis cassés en deux avant d'effectuer l'observation. Cela permet de suivre l'évolution du dépôt de bioverre à l'intérieur des macropores. La figure II-II-20 présente un ensemble de clichés MEB réalisés avant immersion, puis à des durées de 3, 7, 14 et 16 jours d'immersion.

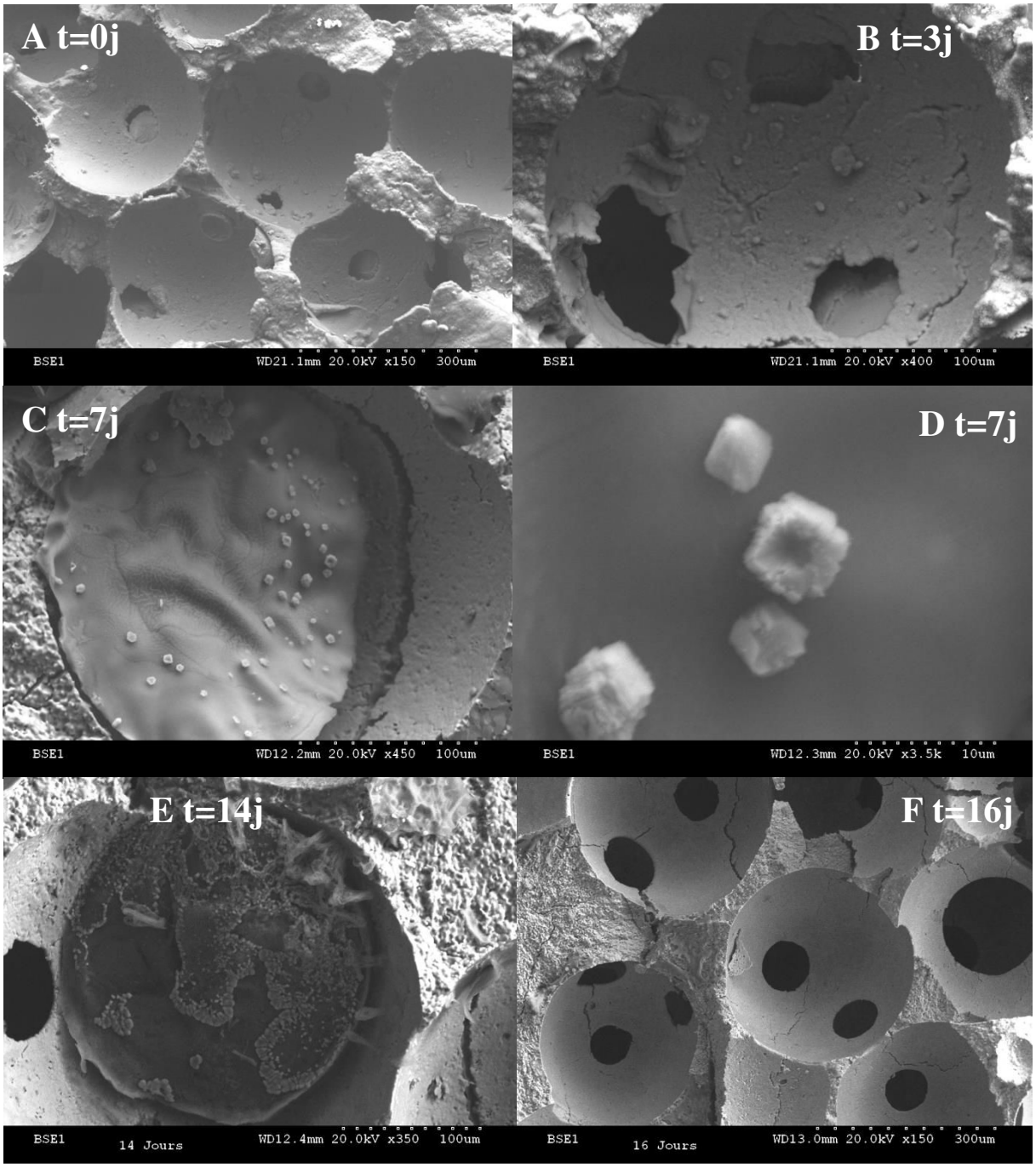


Figure II-II-20 : Observation MEB de la formation de la couche d'hydroxyapatite en fonction du temps d'immersion dans le SBF.

Comme le montre la photographie A de la figure II-II-20, avant immersion dans le SBF, le dépôt de bioverre recouvre la surface de chaque macropore. Il obstrue également les interconnexions. A trois jours d'immersion (photographie B), la situation n'est plus la même : les interconnexions sont ouvertes et le dépôt commence à être dégradé.

Quatre jours plus tard, le cliché C montre un début de formation de cristaux d'apatite, qui sont détaillés sur la photographie D. Cette formation s'intensifie pour aboutir à l'issue de 14 jours (photographie E) à une organisation en ilots. A partir de ce moment, la couche de bioverre devient très fragile et se décolle aisément du substrat.

Une immersion prolongée de deux jours ne permet plus d'observer le dépôt (photographie F). L'intérieur des macropores est vide et le substrat est totalement mis à nu.

2.4. Discussion

Le procédé de trempage retrait permet de recouvrir de bioverre 47Q-2A des pastilles en TCP avec une épaisseur moyenne de 2,5 µm. La masse moyenne de dépôt est égale à 0,46mg.
L'observation MEB d'échantillons immergés dans du SBF montre la dégradation progressive du dépôt après une immersion de 3 à 7 jours. Des cristaux d'apatite n'ont pas été clairement observés : il est probable qu'ils ne soient pas différentiable de la couche de bioverre en décomposition, ou bien que le rinçage des pastilles réalisé lors de la sortie du SBF décroche les grains.

Sur les échantillons macroporeux, il est possible d'observer des cristaux d'apatite à 7 jours d'immersion dans le SBF. Cette croissance s'intensifie progressivement à 14 jours. L'apatite et le reste de la couche de bioverre disparaissent totalement à 16 jours d'immersion.
Les échantillons macroporeux présentent une apparition plus tardive de l'apatite et une croissance plus lente. Ce retard est probablement dû aux interconnexions et aux macropores : les ions ont de plus grandes difficultés à se déplacer dans un espace macroporeux que dans un milieu libre. Les échanges ioniques sont indispensables pour assurer rapidement la précipitation des apatites à la surface des bioverres [26]. De plus, les interconnexions restent obstruées pendant 3 jours, ce qui limite initialement les échanges entre le SBF et la couche de bioverre en dissolution.
Pour équilibrer plus rapidement le milieu intérieur des macropores avec le SBF, il faut envisager de réaliser des essais en faisant circuler un flux de SBF au travers des échantillons, ce qui serait plus proche des conditions rencontrées *in-vivo*.
L'analyse du dépôt réalisé avec le verre 47Q-G à la surface de pastille en TCP montre que le dépôt comporte un nombre important de billes noyées dans un dépôt plat. Il s'agit d'amas de verre 47Q-G en forme de billes. C'est un fait établi par la littérature. En effet, dans un sol

rendu très basique par le précurseur NaOH, l'hydrolyse totale des formateurs est assurée très rapidement [27]. La prise du gel est alors assurée par contact entre des amas qui grandissent en forme de sphère. La trempe par un bain de glace n'est pas suffisante pour empêcher la formation de ces amas dans le cadre du bioverre 47Q-G.

3. Evaluation de l'influence de l'argent sur la prolifération *in-vitro*

3.1. Préparation des échantillons

Les bioverres 45S5Q-2A et 47Q-2A, ainsi que tous les bioverres dopés à l'argent, sont déposés par trempage-retrait sur la surface de pastilles en TCP d'un diamètre égal à 1,4cm. Pour optimiser le dépôt et son adhérence, deux couches de bioverres sont déposées en utilisant le procédé décrit précédemment. Il est ainsi possible de stabiliser les sols par un bain de glace en ralentissant la formation des gels.

Les pastilles ainsi recouvertes vont permettre d'évaluer la biocompatibilité des verres, par des études de prolifération bactérienne et de cellules humaines sur leurs surfaces.
Par souci de reproductibilité, cinq pastilles de chaque composition sont préparées pour chacune des manipulations. Cela permet de les répliquer, ce qui est indispensable pour le calcul des écarts-types. Cinq pastilles ne sont pas recouvertes et servent de témoins.

Après le dépôt de chaque couche, les pastilles sont séchées 24 heures à l'air libre puis 24 heures à l'étuve à 130°C. Les pastilles sont ensuite disposées dans un four électrique à la température de stabilisation de la composition avant d'appliquer la couche suivante.

3.2. Tests des bioverres sur la prolifération et la formation de biofilms avec *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.1. Culture et conditions de croissance

Pseudomonas aeruginosa, autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique causant la production de pus bleuté sur les plaies infectées, est une bactérie à Gram - et aérobie strict. C'est un agent tellurique et commensal, c'est-à-dire qu'elle est présente dans les sols et dans les déchets présents à l'extérieur des tissus. Elle peut, dans certaines conditions, devenir

pathogène. Elle est très résistante à de nombreux antibiotiques, et avec d'autres bactéries à Gram -, elle peut être responsable d'infections nosocomiales. *Pseudomonas aeruginosa* peut se développer sous forme d'agrégats structurés appelés biofilms. Les cellules sont alors enrobées d'une matrice composée de polymères complexes. Ces biofilms forment une barrière physique contre notamment l'entrée d'agents antimicrobiens et permet aux bactéries de résister aux forces de cisaillement, aux défenses immunitaires...
Pour cette étude, la souche de *Pseudomonas aeruginosa* non pathogène a été cultivée « over night » en milieu liquide avec agitation à 140 rpm à 30°C. La croissance bactérienne est suivie par mesure de la turbidité à 620 nm. Le milieu utilisé lors de la culture est le Milieu Luria Bertani ou LB [28].

Les pastilles recouvertes de bioverres et les témoins en TCP sont stérilisés. Pour cela, ils sont incubés pendant 20 min avec une solution d'éthanol à 70%. Puis, ils sont lavés 3 fois avec de l'eau stérile puis séchés. Ils sont ensuite placés dans des plaques de cultures cellulaires à 24 puits (Cellstar®, Greiner Bio-one) et sont incubés avec 1mL de suspension bactérienne diluée à 1/100 (DO_{620} = 0,03) avec du milieu neuf pendant 72h. L'agitation est arrêtée pour permettre la production de biofilms.

Après 72h d'incubation, la biomasse des cellules planctoniques est estimée par mesure de la turbidimétrie à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type Thermo electron corporation heyios γ.
La mesure de l'activité bactérienne à la surface des échantillons est également réalisée par analyse des biofilms. Pour cela, les pastilles sont rincées 3 fois avec de l'eau physiologique stérile (H_2O, NaCl 9‰) afin de retirer les cellules planctoniques et de ne garder que les biofilms fixés sur les échantillons.

La quantification de la biomasse totale présente sur leur surface (1 face/pastille) représentant le biofilm est réalisée par ATPmétrie (GLBiocontrol®, Kikkoman lumitester C-110). Le protocole employé est conforme aux recommandations du fournisseur (cf. Annexe V). Les résultats sont exprimés en picogramme d'ATP/surface traitée. Un picogramme d'ATP représente approximativement mille bactéries, selon le fabricant.

3.2.2. Résultats

Les données spectrophotométriques, qui permettent de mesurer la biomasse planctonique de *Pseudomonas aeruginosa* (cellules en suspension), sont représentées sur la figure II-II-21. Toutes les compositions sont présentées ainsi que les témoins en TCP non recouvert de bioverre.

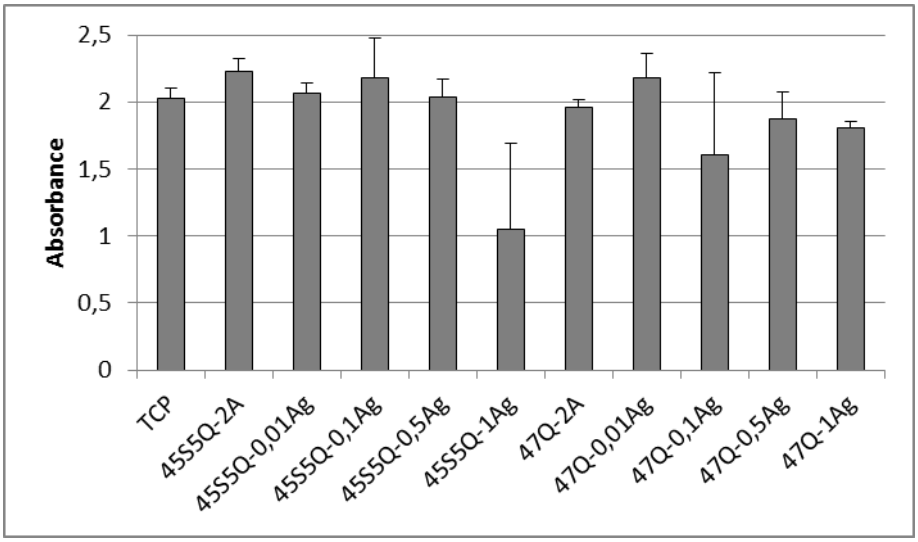


Figure II-II-21 : Cellules planctoniques *pseudomonas aeruginosa*.

D'après la figure II-II-21, aucune concentration en argent, mis à part le 45S5Q-1Ag, ne réduit la prolifération des cellules planctoniques *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats sont identiques au témoin non recouvert et aux bioverres non dopés pour toutes les concentrations de dopage.

Il est possible d'expliquer l'absence d'effet au niveau planctonique par la structure de l'argent présent dans les verres. L'argent est en effet sous forme de particules métalliques (cf. page 159). Lors de la mise en solution des échantillons, il est probable que l'argent ne forme pas beaucoup d'ions du fait d'une solubilité limitée, ce qui permet aux bactéries planctoniques d'éviter son contact.

La figure II-II-22 présente les résultats des tests d'ATP-métrie entrepris sur la surface des échantillons pour étudier les biofilms. Les données fournies avec le lumitester (cf. Annexe V) permettent d'extrapoler la quantité de bactéries à partir de la concentration en ATP mesurée.

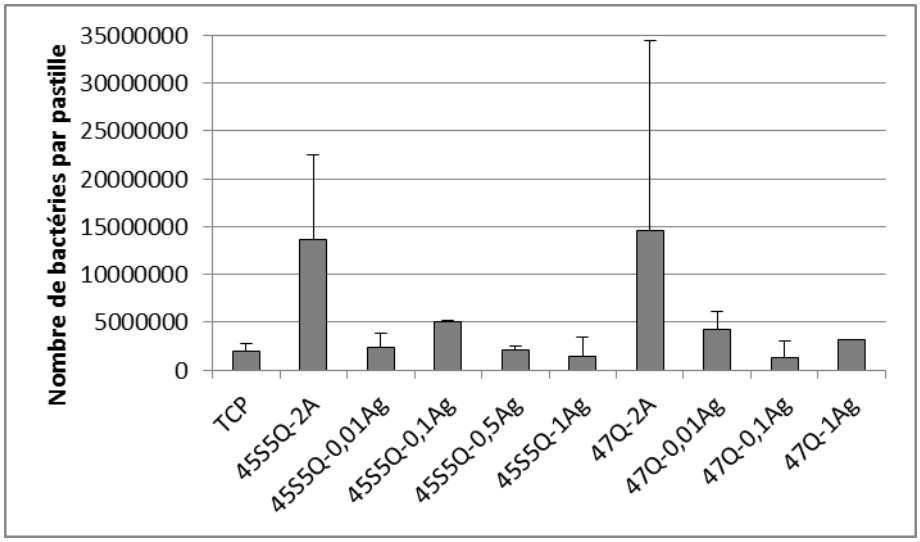


Figure II-II-22 : Nombre de bactéries par surface de pastille (ATP-métrie).

La figure II-II-22 permet de mettre en évidence une action de l'argent sur la prolifération des bactéries. Ainsi, sur les pastilles recouvertes par des verres dopés à partir de 0,01% d'Ag_2O le nombre de bactéries qui réussissent à proliférer diminue fortement :

- l'échantillon recouvert par le bioverre 45S5Q-2A non dopé possède un peu moins de 15.10^6 bactéries sur sa surface alors que celui recouvert par le 45S5Q-0,01Ag présente environ $2,5.10^6$. Cette valeur est aussi observée pour les compositions 45S5Q-0,5Ag et 45S5Q-1Ag. La composition 45S5Q-0,1Ag permet la prolifération de 5.10^6 bactéries.
- de même, les échantillons recouverts par le bioverre 47Q-2A présentent également environ 15.10^6 bactéries sur leur surface, alors que tous ceux recouverts par les verres dopés ont une population inférieure à 5.10^6.

Les *Pseudomonas aeruginosa* prolifèrent donc à la surface des bioverres sol-gel du procédé alcoolate, mais un dopage en argent permet de réduire leur croissance et de limiter la formation de biofilm.

Le même effet est cependant observé sur les substrats en TCP non recouvert de bioverre : les bactéries ont plus faiblement proliféré sur leurs surfaces, à la hauteur d'environ $2,5.10^6$ individus par pastille.

3.2.3. Discussion

Les résultats de la culture bactérienne permettent de vérifier l'effet antibactérien des différents échantillons.

Le TCP non recouvert montre une faible formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* par rapport au TCP traité en surface par les bioverres. La surface des pastilles en TCP ne semble pas privilégier naturellement l'adhérence ou l'adhésion des *Pseudomonas aeruginosa*. Il est probable que les propriétés physico-chimiques de surface (charge ionique,…) perturbent l'étape d'adhésion des bactéries. En effet, le TCP est riche en phosphate chargé négativement pouvant empêcher les interactions avec les lipopolysaccharides membranaires des cellules bactériennes qui sont également chargées négativement. Cette répulsion de charge pourrait expliquer le faible dépôt de biofilm sur ces biocéramiques. En effet, pour privilégier la formation de biofilm, il faut qu'il y ait dans les premières étapes de leur formation (adhésion) des interactions faibles entre la membrane des bactéries et les surfaces inorganiques [29].

En modifiant la surface du TCP, le bioverre semble favoriser la formation de biofilms en augmentant le contact entre les bactéries et le matériau. Il est d'ailleurs possible que les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* possèdent une affinité particulière avec les bioverres [30]. D'après cette étude, ces bactéries ont la capacité de consommer des ions Ca^{2+} et PO_4^{2-}, ce qui inhibe la formation de l'hydroxyapatite à la surface. La couche de verre est donc naturellement propice à la formation de biofilms par *Pseudomonas aeruginosa*, en lui fournissant une source de nutriments. Ce n'est pas le cas des témoins en TCP. En effet le produit de solubilité du TCP est de l'ordre de $2{,}83.10^{-30}$ (cf. Annexe I), les ions Ca^{2+} et PO_4^{2-} ne sont donc pas émis en grande quantité dans le milieu.

Les bactéries n'ont donc pas de mal à s'accrocher sur les bioverres et à former un biofilm, ce qui permet à leur population de proliférer 5 fois plus sur les échantillons en TCP recouvert de 45S5Q-2A et de 47Q-2A que sur le TCP seul.

L'ajout d'argent dans les compositions 2A permet de diminuer la formation de biofilm sur la surface des échantillons. Dès la concentration minimale de 0,01% d'Ag_2O, la prolifération diminue et permet d'observer les mêmes résultats que pour le TCP seul.
L'ajout d'argent dans les verres permet donc de diminuer l'adhérence des cellules et la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*. Cela est en accord avec les effets observés par d'autres auteurs avec d'autres bactéries [6, 7, 31].

Les résultats cumulés de la prolifération planctonique et de celle de surface permettent d'observer que l'ajout d'argent dans les bioverres limite la formation de biofilm à la surface des biomatériaux. Cette propriété est intéressante pour des matériaux destinés à une utilisation médicale.

3.3. Tests des bioverres sur la prolifération et la vitalité de cellules eucaryotes MG63

3.3.1. Culture et conditions de croissance

Pour évaluer l'influence de l'argent sur la prolifération de cellules eucaryotes, une souche appelée MG63 est utilisée. Cette souche est cancéreuse tout comme les cellules HeLa (cf. page 134). Elles sont de type fibroblaste et ont, comme source, un ostéosarcome détecté chez un homme il y a plus de 10 ans. Ces cellules ont donc une bonne reproductibilité lors de la culture et leur activité peut être représentative de celle des cellules ostéoblastiques humaines.

Dans un premier temps, les pastilles recouvertes de bioverres et les témoins en TCP sont stérilisés à 180°C pendant une heure. Après cette étape, ils sont placés dans des plaques de cultures cellulaires à 24 puits. Les puits sont ensuite remplis avec 900 µL de milieu de culture MEM (cf. Annexe IV).
Les puits peuvent alors être ensemencés avec la solution mère de cellules P3 MG63, en ajoutant 100 µL par puits. Cela permet d'introduire environ 6000 cellules. Les plaques sont ensuite mises en culture à la température de 37°C.

Pour permettre d'évaluer la vitalité et la prolifération des cellules MG63, les cultures sont arrêtées après 3 et 6 jours d'incubation. Pour n'évaluer que les cellules accrochées à la surface des échantillons, le milieu de culture est remplacé.

- Pour 3 jours de culture, le milieu nutritif est remplacé par 500 µL de Alamar Blue® (Trek Diagnostic Systems, Inc).
- Lors d'une culture 6 jours, le milieu est remplacé par 1000 µL de Alamar Blue®.

Le Alamar Blue® est un des noms commerciaux de la résazurine. La résazurine est une molécule complexe qui est réduite en résorufine par les mitochondries lors de la respiration

cellulaire. La résazurine est d'une couleur bleue et n'est pas une molécule fluorescente alors que la résorufine est rose et elle émet un rayonnement de fluorescence. Les mesures de vitalité cellulaire (cf. page 134) peuvent donc être déduites de la mesure de ce rayonnement. Les essais basés sur la résazurine montrent une excellente corrélation avec les essais basés sur la méthode au formazan (méthode MTT : cf. page 140) tout en étant moins dangereux pour l'utilisateur et plus faciles à mettre en œuvre [32].

Après remplacement du milieu, les échantillons sont incubés pendant deux heures puis deux prises d'essais de 150 µL sont effectuées pour analyses. Le fluorimètre utilisé est un Twinkle LB970 (Berthold Technology, GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany) réglé à 560 nm.

La prolifération est déterminée par un comptage au microscope optique, sans colorant.

3.3.2. Résultats

La figure II-II-23 présente les résultats de mesure de la vitalité et de la prolifération des cellules MG63 après 3 jours d'incubation à la surface d'échantillons de TCP nus et d'échantillons de TCP recouverts par des bioverres sol-gel de composition 45S5Q-2A, 45S5Q-0,01Ag, 45S5Q-0,1Ag, 45S5Q-0,5Ag et 47Q-2A, 47Q-0,01Ag, 47Q-0,1Ag, 47Q-0,5Ag. Le nickel est ajouté comme témoin positif.

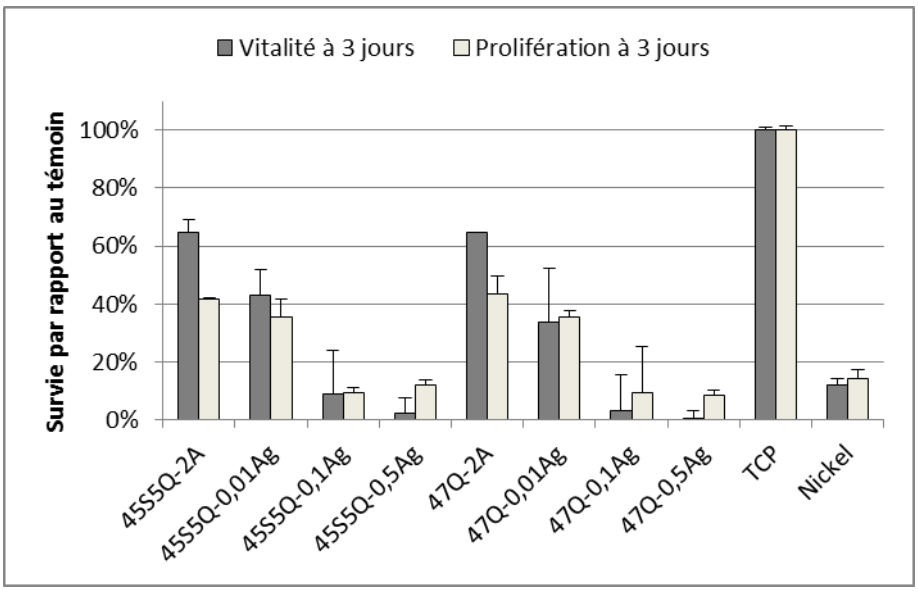


Figure II-II-23 : Vitalité et prolifération à 3 jours.

En analysant les résultats de la figure II-II-23, il est possible d'établir ou non la toxicité des surfaces testées vis-à-vis des cellules MG63.
Les échantillons en TCP non recouvert représentent les témoins pour cette étude : leurs résultats sont donc établis à 100% de vitalité et de prolifération.
Les résultats pour les bioverres sont similaires pour les deux compositions non dopées : l'apport des deux bioverres 45S5Q-2A et 47Q-2A à la surface des pastilles n'améliore pas la prolifération des cellules MG63. Au contraire, la vitalité et la prolifération sont dégradées, la prolifération sur le 45S5Q-2A atteint environ 40% de celle de du TCP non recouvert. Cette valeur est également atteinte par le 47Q-2A.

Lors du dopage des verres avec de l'argent, plus la concentration augmente, plus la prolifération et la vitalité diminuent. A partir de 0,1% d'argent dans leur composition, les bioverres deviennent plus toxiques que le nickel. Les valeurs atteignent 10% de celle du TCP nu avec un dopage de 0,1% d'argent. La barre d'erreur un peu plus importante signifie qu'un ou plusieurs échantillons ont présenté des réponses assez éloignées l'une de l'autre. Cela est peut-être dû à un défaut d'homogénéité du dépôt. Comparés au TCP, les verres non dopés et les verres dopés ne présentent pas une bonne compatibilité avec les cellules MG63.

Le dopage à 0,5% peut être considéré comme toxique, l'étude à 6 jours n'est poursuivie que sur les échantillons dopés à 0,01% et 0,1%. La figure II-II-24 montre les résultats des mesures de la vitalité et de la prolifération des cellules MG63 après 6 jours. L'étude concerne des échantillons de TCP nus et des échantillons de TCP recouverts par des bioverres sol-gel de composition 45S5Q-2A, 45S5Q-0,1Ag, 45S5Q-0,01Ag et 47Q-2A, 47Q-0,1Ag, 47Q-0,01Ag.

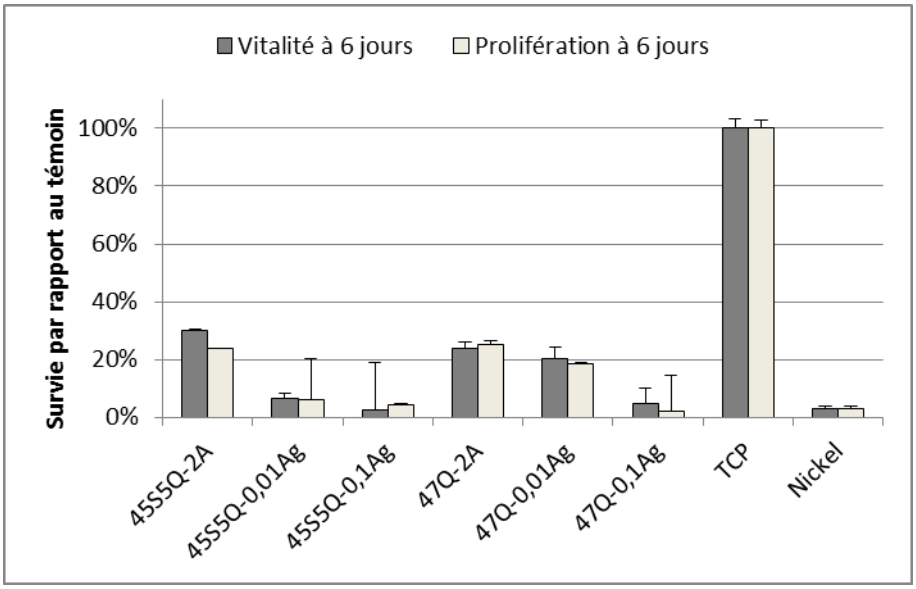


Figure II-II-24 : Vitalité et prolifération à 6 jours.

Les conclusions précédemment apportées sont confortées par les résultats observés à 6 jours d'incubation, visibles sur la figure II-II-24. Les pastilles en TCP nues servent toujours de témoins, avec une vitalité et une prolifération égale à 100%.

Après 6 jours d'incubation, les cellules n'ont pas mieux survécu au contact des bioverres non dopés 45S5Q-2A et 47Q-2A. La vitalité et la prolifération atteint environ 20% pour les deux compositions. Les dopages en argent à 0,01% et 0,1% présentent également des valeurs inférieures à celle rencontrées à 3 jours. Par exemple, la viabilité sur 45S5Q-0,1Ag atteint 5% à 3 jours et elle atteint 3% à 6 jours.

Tous les dépôts de bioverres réalisées peuvent donc être considérés comme toxiques pour les cellules MG63 par rapport au TCP seul. L'ajout d'argent dans les compositions amplifie le phénomène, en étant aussi toxique que le nickel.

3.3.3. Discussion

Les résultats des essais de vitalités et de proliférations des cellules MG63 à la surface de pastilles en TCP recouvertes de bioverres n'a pas donné de bons résultats. Les bioverres du procédé alcoolate, dopés ou non avec un acétate d'argent, sont toxiques pour ces cellules.
Les éléments, relâchés par les verres une fois immergés doivent être analysés pour comprendre ce qui provoque la toxicité observée. Par exemple, ces éléments pourraient être

déterminés à l'aide d'une analyse ICP du milieu d'immersion [33]. Des variations rapides de pH à la surface des matériaux peuvent également influencer négativement la prolifération des cellules eucaryotes [34-35].

Cela n'est pas en accord avec les études de toxicité déjà réalisées (cf. page 151). Cependant, les conditions d'étude sont différentes : la lignée cellulaire n'est pas la L132 et les bioverres ne sont pas mis en contact avec les cellules sous forme de poudres.
Pour valider ces résultats, il faudrait reconsidérer l'étude en utilisant une autre lignée cellulaire. De plus, certains auteurs ne sont pas convaincus que l'activité des MG63 soit représentative de celle des cellules ostéoblastiques humaines [36], ce qui encourage à refaire de nouveaux essais.

La synthèse de bioverres sol-gel dopés à plusieurs concentrations d'argent est réalisée avec succès à l'aide du procédé 2A. La température d'élaboration des verres reste identique et la présence d'argent n'inhibe pas la bioactivité.

Une technique de trempage-retrait par bain de glace a permis de recouvrir des échantillons macroporeux d'HA et des pastilles de TCP. La bioactivité est conservée lors d'immersion dans le SBF. Les dépôts mesurent en moyenne 2 µm pour une vitesse de trempage retrait de 10 cm par minute.

La réponse biologique des bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et des cellules MG63 est similaire, l'argent exerce une toxicité pour tous les dopages. Il a également été remarqué que les bioverres sans dopage sont toxiques pour les MG63. Si la toxicité observée correspond à celle recherchée pour les bactéries, elle n'est pas souhaitable dans le cadre des cellules MG63. Il faudrait donc refaire d'autres tests avec d'autres lignées cellulaires pour confirmer les résultats, et rechercher les causes de cette toxicité, qui est peut être due aux modifications de pH qu'induisent les bioverres au moment de leur réaction avec le milieu.

Bibliographie

[1] : H. Zhu, C. Hu, F. Zhang, X. Feng, J. Li, T. Liu, J. Chen, J. Zhang, **Preparation and antibacterial property of silver-containing mesoporous 58S bioactive glass**, Mater. Sci. Eng. C, vol. 42, p. 22-30, 2014.

[2] : K.W. von Nägeli, **Über oligodynamische Erscheinungen in lebenden Zellen**, Neue Denkschriften der allgemeinen Schweizerischen Gesellschaft füt die gesammten Naturwissenschaften**,** Nouveaux Mémoires de la Société Helvétique des Sciences Naturelles, vol. 32, 1893.

[3] : R. Shrestha, D.R. Joshi, J. Gopali, S. Piya, **Oligodynamic Action of Silver, Copper and Brass on Enteric Bacteria Isolated from Water of Kathmandu Valley**, Nepal Journal of Science and Technology, vol. 10, p. 189-193, 2009.

[4] : N. Stobie, B. Duffy, D.E. McCormack, J. Colreavya, M. Hidalgo, P. McHale, S.J. Hinder, **Prevention of Staphylococcus epidermidis biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol–gel coating**, Biomaterials, vol. 29, issue 8, p. 963-969, 2008.

[5] : M. Diba, A.R. Boccaccini, **Silver-containing bioactive glasses for tissue engineering applications**, Precious Metals for Biomedical Applications, p. 177-211, 2014.

[6] : M. Catauro, M.G. Raucci, F. De Gaetano, A. Marotta, **Antibacterial and bioactive silver-containing Na_2O-CaO-$2SiO_2$ glass prepared by sol-gel method**, J. Mater. Sci. Mater. Med., vol 15, issue 7, p. 831-837, 2004.

[7]: M.G. Raucci, K. Adesanya, L. Di Silvio, M. Catauro, L. Ambrosio, **The biocompatibility of silver-containing $Na_2O.CaO.2SiO_2$ glass prepared by sol-gel method: in vitro studies**, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater., vol. 92B, issue 1, p. 102-110, 2010.

[8]: C. Duée, **Elaboration de nouvelles compositions de bioverres destinés à la chirurgie réparatrice**, Thèse de l'Université de Valenciennes, 2007.

[9]: A.S. Bakry, Y. Tamura, M. Otsuki, S. Kasugai, K. Ohya, J. Tagami, **Cytotoxicity of 45S5 bioglass paste used for dentine hypersensitivity treatment**, J. Dent., vol. 39, issue 9, p. 599-603, 2011.

[10] : G.E. Vargas, R.V. Mesones, O. Bretcanu, J.M.P. López, A.R. Boccaccini, A. Gorustovich, **Biocompatibility and bone mineralization potential of 45S5 Bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds in chick embryos**, Acta Biomaterialia vol. 5, issue 1, p. 374-380, 2009.

[11]: N.P. Ziats, K.M. Miller, J.M. Anderson, ***In vivo* and *in vitro* interactions of cells with biomaterials**, Biomaterials, vol. 9, p. 5-13, 1988.

[12]: I. Lebecq, **Etude de bioverres à base de SiO_2, CaO, Na_2O non dopés et dopés par le phosphore**, Thèse de l'Université de Valenciennes, p. 159, 2002.

[13] : H.F. Hildebrand, I. Floquet, A. Lefevre, C. Veron, **Biological and hepatotoxic effects of palladium. An overview on experimental investigations and personal studies**, The International Journal of Risk and Safety in Medecine, vol. 8, p. 149-167, 1996.

[14] : D.D. Kuhn, S.A. Smith, G.D. Boardman, M.W. Angier, L. Marsh, G.J. Flick, **Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei: Impacts on survival, growth, antennae length, and pathology**, Aquaculture, vol. 309, issues 1–4, p. 109-114, 2010.

[15] : C. Sar, B. Mwenya, B. Pen, K. Takaura, R. Morikawa, A. Tsujimoto, N. Isogai, Y. Asakura, I. Shinzato, Y. Toride, J. Takahashi, **Effect of wild type Escherichia coli W3110 or Escherichia coli nir-Ptac on methane emission and nitrate toxicity in nitrate-treated sheep**, International Congress Series, vol. 1293, p. 193-196, 2006.

[16] : A.A. Ahmed, A.A. Ali, Doaa A.R. Mahmoud, A.M. El-Fiqi, **Study on the preparation and properties of silver-doped phosphate antibacterial glasses (Part I)**, Solid State Sci., vol. 13, issue 5, p. 981-992, 2011.

[17] : Combeite, High, JCPDS 01-078-1650.

[18] : Argent (cubique), JCPDS 00-004-0783.

[19] : R. Golovchak, P. Thapar, A. Ingram, D. Savytskii, H. Jain, **Influence of phase separation on the devitrification of 45S5 bioglass**, Acta Biomaterialia, vol. 10, issue 11, p. 4878-4886, 2014.

[20] : N.A. Zarifah,W.F. Lim, K.A. Matori, H.A.A. Sidek, Z.A. Wahab, N. Zainuddin, M.A. Salleh, B.N. Fadilah, A.N. Fauzana, **An elucidating study on physical and structural properties of 45S5 glass at different sintering temperatures**, J. Non-Cryst. Solids, vol. 412, p. 24-29, 2015.

[21] : F. Monchau, P. Hivart, B. Genestie, F. Chai, M. Descamps, H.F. Hildebrand, **Calcite as a bone substitute. Comparison with hydroxyapatite and tricalcium phosphate with regard to the osteoblastic activity**, Mater. Sci. Eng. C, vol. 33, p. 490-498, 2013.

[22] : F. Monchau, A. Lefevre, M. Descamps, A. Belquin-myrdycz, P. Laffargue, H.F. Hildebrand, **In itro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, -tricalcium phosphate, calcium carbonate**, Biomol. Eng., vol. 19, p. 143-152, 2002.

[23] : M. Descamps, O. Richart, P. Hardouin, J.C. Hornez, A. Leriche, **Synthesis of macroporous b-tricalcium phosphate with controlled porous architectural**, Ceram. Int., vol. 34, p. 1131-1137, 2008.

[24] : E. Meurice, A. Leriche, J.C. Hornez, F. Bouchart, E. Rguiti, L. Boilet, M. Descamps, F. Cambier, **Functionalisation of porous hydroxyapatite for bone substitutes,** J. Eur. Ceram. Soc., vol. 32, issue 11, p. 2673-2678, 2012.

[25] : M. Descamps, T. Duhoo, F. Monchau, J. Lu, P. Hardouin, J.C. Hornez, A. Leriche, **Manufacture of macroporous β-tricalcium phosphate bioceramics**, J. Eur. Ceram. Soc., vol. 28, issue 1, p. 149-157, 2008.

[26] : J.R. Jones, A.G. Clare, **Bio-glasses an introduction**, ed. Wiley, 2012.

[27] : P. Audebert, F. Miomandre, **Procédé sol-gel de polymérisation,** ed. Technique de l'Ingénieur, référence J S 820, 2005.

[28] : K.H. Miller, **A short course in bacterial genetics. A laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria**, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1992.

[29] : G. Lanéelle, J. Asselineau, **Biochimie bactérienne : structures, biosynthèses et fonctions des constituants des enveloppes**, ed. Hermann, Paris, 1991.

[30] : E. Papadopoulou, L. Papadopoulou, K.M. Paraskevopoulos, P. Koidis, A. Sivropoulou, **Pseudomonas A1 influences the formation of hydroxyapatite and degrades bioglass,** Mater. Sci. Eng. B, vol. 165, issue 3, p. 239-242, 2009.

[31] : A. Balamurugan, G. Balossier, D. Laurent-Maquin, S. Pina, A.H.S. Rebelo, J. Faure, J.M.F. Ferreira, **An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol–gel derived silver-incorporated bioglass system,** Dent. Mater., vol. 24, issue 10, p. 1343–1351, 2008.

[32] : **UptiBlue Viable Cell Counting Kit**, Notice technique complementaire, Uptima.

[33] : S. Shahrabi, S. Hesaraki, S. Moemeni, M. Khorami, **Structural discrepancies and in vitro nanoapatite formation ability of sol–gel derived glasses doped with different bone stimulator ions**, Ceram. Int., vol. 37, issue 7, p. 2737-2746, 2011.

[34] : M.A. Chaudhry, B.D. Bowen, J.M. Piret, **Culture pH and osmolality influence proliferation and embryoid body yields of murine embryonic stem cells**, Biochem. Eng. J., vol. 45, issue 2, p. 126-135, 2009.

[35] : F.A. Shah, D.S. Brauer, N. Desai, R.G. Hill, K.A. Hing, **Fluoride-containing bioactive glasses and Bioglass® 45S5 form apatite in low pH cell culture medium**, Mater. Lett., vol. 119, p. 96-99, 2014.

[36] : J. Clover, M. Gowen, **Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype?**, Bone, vol. 15, issue 6, p. 585-591, 1994.

Conclusion

L'objectif principal de l'étude a été accompli. En effet, des bioverres habituellement obtenus par fusion classique à 1400°C ont été synthétisés par voie sol-gel. Pour y parvenir, le TEOS et le TEP ont toujours été utilisés comme formateurs de réseau sol-gel. Placés en présence d'eau et correctement catalysés, ils permettent d'obtenir des gels rapidement. Il s'agit dans tous les cas de compositions de verres inversés, c'est-à-dire qu'ils contiennent plus d'éléments modificateurs que d'éléments formateurs.

En utilisant les méthodes sol-gel décrites dans la littérature, ces composés inversés ont cristallisé intensément durant le séchage des gels en donnant naissance à des poudres de vitrocéramiques. L'utilisation de précurseurs minéraux comme les chlorures (procédé Cl) et les nitrates (procédé NO_3) ont entraîné des cristallisations de nitrate de calcium et de chlorure de calcium, mais aussi de NaCl, ce qui montre qu'aucun de ces précurseurs ne semble convenir.

Le solvant retenu lors de ces manipulations a été le méthanol. Les gels secs formés avec celui-ci présentent un massif amorphe plus marqué. Il a été montré que le départ d'un alcool dégrade moins la structure que celui d'un mélange eau-alcool. La dissolution des sels dans un alcool pur est possible mais plus difficile que dans l'eau. En effet, l'alcool est moins polaire.

Pour réaliser des compositions de bioverres inversés parfaitement amorphes, il faut donc augmenter la cohésion entre les éléments modificateurs Ca et Na et les formateurs de réseau.
L'étude de la réactivité des alcoolates de calcium (méthanolate) et de sodium (éthanolate) a permis d'établir que ces précurseurs sont capables de se transformer rapidement en hydroxyde de taille moléculaire ce qui permet leur condensation avec les alcoolates formateurs de réseau. La réalisation de liaisons chimiques entre les modificateurs et les formateurs pendant la formation du gel diminue alors les risques de cristallisation. Les hydroxydes peuvent aussi libérer des groupements OH^- par dissolution dans le solvant ce qui catalyse automatiquement la réaction. Il s'agit du procédé A, comme alcoolate.

Une des compositions réalisée avec ce procédé est un ternaire, le 47T-A. Sa composition en pourcentage molaire est de 47 % de SiO_2, 48 % de CaO et de 5 % de P_2O_5. Pour ne pas transformer les gels en vitrocéramiques par saturation du précurseur dans le solvant, la concentration en verre dans le sol ne doit pas dépasser 1,33M. Après obtention du verre à 800°C, les résultats de l'étude *in vitro* confirment que celui-ci est bioactif à partir de 2h

d'immersion dans le SBF. L'analyse EDS semble montrer un manque de phosphore, mais ces résultats doivent être confirmés par une autre méthode de dosage. En effet, l'EDS est une méthode semi-quantitative.

L'alcoolate de calcium permet donc de synthétiser le verre ternaire 47T-A. Ce verre qui ne contient pas de fondant Na_2O, se révèle difficile, voire impossible à réaliser par voie fusion avec des fours conventionnels limités à 1600°C. La méthode sol-gel a rendu possible cette synthèse à 800°C.

La composition quaternaire 47Q-A de composition 47% SiO_2, 26,5% CaO, 21,5% Na_2O et 5% P_2O_5 (% molaire) est également réalisée avec le procédé A, en utilisant des alcoolates de calcium et de sodium. Un verre n'a pas pu être obtenu. L'éthanoate de sodium réagit rapidement avec l'eau, ce qui forme de l'hydroxyde de sodium. Celui-ci se dissout et entraîne une libération importante d'ions OH^- qui accélèrent brutalement la gélification. Cette catalyse basique trop rapide ne laisse pas le temps au sol de s'homogénéiser ce qui donne naissance à un gel hétérogène. Cela entraîne une cristallisation du gel lors du séchage. L'alcoolate de sodium doit donc être exclu des manipulations sol-gel mais confirme le principe de la catalyse basique des sols par la formation d'hydroxyde de sodium.

Il a été possible d'élaborer des verres sol-gel quaternaires amorphes, en utilisant un acétate de sodium et le méthanolate de calcium. Cela correspond au procédé sol-gel 2A, alcoolate et acétate. Les bioverres dénommés 45S5Q-2A et 47Q-2A, de compositions 46,1% SiO_2 - 26,9% CaO - 24,4% Na_2O - 2,6% P_2O_5 et 47% SiO_2 - 26,5% CaO - 21,5% Na_2O - 5% P_2O_5 respectivement, sont obtenus avec ce procédé.

Les gels secs sont amorphes de même que leurs verres après vieillissement à 400°C. La phase cristalline, qui apparaît au-delà de 450°C, est identique pour le 45S5Q-2A et le 47Q-2A, elle a été identifiée comme de la Combéite High. Cette phase est régulièrement observée dans la bibliographie traitant de la cristallisation des verres du domaine SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5 obtenus par fusion. Par le procédé 2A, des monolithes translucides se forment à la concentration de 1,33 M lors du séchage. Ils se fracturent par la suite, mais un séchage lent sous atmosphère contrôlée pourrait limiter ce phénomène de fissurations. Le carbone apporté par les précurseurs organiques ne s'élimine pas facilement et impose un traitement thermique d'au moins une journée.

La vitesse de montée en température du four ne doit pas être trop rapide sous peine de cristalliser le réseau vitreux en formation. Une vitesse de 1°C/min permet la formation d'une phase amorphe de composition quaternaire à 400°C, la température de stabilisation. La spectroscopie Infra-Rouge en mode ATR permet d'observer la bioactivité des verres 45S5Q-2A et 47Q-2A, à partir de 3h d'immersion. Ces deux compositions quaternaires préparées par voie sol-gel peuvent donc être qualifiées de bioactives. Il est possible de discerner les trois étapes citées par L.L. Hench : la formation du gel de silice, la précipitation d'apatite amorphe et enfin la cristallisation de l'apatite. Les temps d'apparition de l'apatite carbonatée restent proches de ceux des verres obtenus par fusion mais la formation du gel de silice est plus rapide par voie sol-gel.

Une autre voie de synthèse des compositions quaternaires a été également proposée, il s'agit d'utiliser du glycérol comme complexant des ions calcium. Ce procédé, noté G, permet d'obtenir les verres 47Q-G et 45S5Q-G dès 700°C avec des précurseurs qui sont courants au laboratoire et peu coûteux. Le glycérol n'empêche pas le verre 47Q-G d'être bioactif par immersion dans le SBF. Ce complexant semble ralentir la formation du gel de silice et rend son apparition plus proche de celle observée avec les verres par fusion. Les différents constituants des verres sont correctement insérés sous forme amorphe et réagissent ensemble lors du traitement thermique, ce qui provoque la première cristallisation de $Na_4Ca_4(Si_6O_{18})$ à 750°C. Cependant, cette phase est déficiente en calcium : une partie est encore piégée dans le réseau. Celui-ci n'est totalement dégradé qu'à 800°C et la phase cristalline définitive apparaît, du $Na_2Ca_3Si_6O_6$.
La quantité de glycérol restant dans le verre final est importante ce qui lui donne un aspect noir. Il n'est pas possible de mettre moins de glycérol, car sinon la formation du complexe n'est pas suffisante et le calcium ne s'insère pas totalement dans le réseau. Pour utiliser efficacement une méthode de synthèse employant un complexant du calcium, il faut trouver une molécule présentant une élimination plus facile et formant des complexes avec une bonne efficacité.

L'autre but de ce travail était de recouvrir des échantillons denses et macroporeux en TCP et en HA avec les bioverres issus de ces procédés. Pour cela, la technique du trempage retrait a été utilisée. Un bain de glace a été placé autour du réacteur de synthèse au début de la formation du gel ralentissant les réactions de condensations et allongeant donc fortement le temps de gélification.

Il était nécessaire de vérifier la bioactivité de ces échantillons. C'est pourquoi, les pastilles denses en TCP ont été recouvertes avec deux couches de bioverre 2A pour ensuite être immergées dans du SBF. La réactivité de la surface des échantillons a été observée au MEB à partir de 3 jours d'immersion sur des pastilles denses. Il faut attendre un peu plus longtemps avant de voir apparaître ces cristaux sur les échantillons macroporeux. Sur ceux-ci, la formation d'hydroxyapatite est visible à 7 jours d'immersion dans le SBF puis cette couche croît progressivement à 14 jours, pour totalement disparaître à 16 jours d'immersion. Les interconnexions restent obstruées pendant 3 jours, limitant les échanges entre le SBF et la couche de bioverre en dissolution, expliquant le retard observé. Pour équilibrer plus rapidement le milieu intérieur des macropores avec le SBF, il faut envisager de réaliser des essais en faisant circuler un flux de SBF au travers des échantillons, ce qui serait plus proche des conditions rencontrées *in-vivo*.

Le caractère antibactérien de l'argent a également été testé en dopant les matériaux à l'argent. Il a été montré que le dopage à partir de 0,01% à 1% (% molaire) des compositions 45S5® et 47Q est possible avec le procédé 2A et l'utilisation d'acétate d'argent. Cependant, pour tous les gels séchés à 130°C puis pour toutes les températures supérieures, de l'argent métallique ressort du massif amorphe sur les diffractogrammes. L'argent des dopages n'est donc pas parfaitement inséré dans la structure amorphe des verres. La phase cristalline, qui apparaît au-delà de la température de cristallisation des verres dopés, est identique à celle des verres non dopés. Il s'agit aussi de la Combéite High.
Pour une vitesse de montée en température de 1°C/min, la transition vitreuse du réseau de tous les verres dopés a été établie à 360°C et celle de cristallisation du réseau à 420°C. La température d'élaboration de tous les composés dopés est de 400°C. La spectroscopie Infra-Rouge en mode ATR a permis de vérifier la bioactivité : tous les verres dopés sont bioactifs à partir de 3h d'immersion dans le SBF. Comme pour les bioverres non dopés du procédé 2A, la première étape de la réaction de surface des verres, i.e. la formation du gel de silice, est accélérée par rapport aux verres obtenus par fusion.

Afin de tester le caractère antibactérien des matériaux des essais de proliférations planctoniques et de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* ont été réalisés sur des pastilles en TCP recouvertes et non recouvertes par les bioverres 45S5Q-2A, 45S5Q-0,01Ag à 45S5Q-1Ag et 47Q-2A, 47Q-0,01Ag à 47Q-1Ag.

La surface des pastilles en TCP ne semble pas privilégier naturellement l'adhérence ou l'adhésion des *Pseudomonas*. En modifiant la surface du TCP, les bioverres non dopés 45S5Q-2A et 47Q-2A semblent favoriser la formation de biofilms en augmentant le contact entre les bactéries et le matériau. L'ajout d'argent dans ces compositions a permis de diminuer la formation de biofilms sur la surface des échantillons. Dès la concentration minimale de 0,01% d'acétate d'argent, la quantité de biofilms diminue. Les mêmes résultats ont été observés pour le TCP seul. L'ajout d'argent dans les verres permet donc de diminuer l'adhérence des cellules et la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*.

Des tests de prolifération réalisés sur les bioverres du procédé 2A, réduits en poudre et mis au contact la lignée cellulaire L132, n'ont pas révélé de toxicité. Cependant, des tests de vitalités et de proliférations des cellules MG63, à la surface de pastilles en TCP recouvertes des bioverres dopés et non dopés, n'ont pas donné de bons résultats : tous les bioverres sont toxiques pour ces cellules. Pour valider ces résultats, il serait nécessaire de répéter l'étude avec d'autres lignées cellulaires que la lignée MG63.

Les éléments relâchés par les verres immergés doivent être déterminés afin de comprendre ce qui provoque la toxicité. Pour la suite de l'étude, une analyse ICP permettrait de déterminer les éléments présents dans le milieu d'immersion des verres.
Des variations rapides de pH du milieu peuvent réduire la prolifération des cellules eucaryotes. Des mesures devraient donc être effectuées pour valider ou non cette hypothèse.

Résumé des bioverres étudiés

Compositions de référence (% molaire) :

- 45S5Q : 46,1% SiO_2 - 26,9% CaO - 24,4% Na_2O - 2,6% P_2O_5 (45S5® de L.L. Hench)
- 47T : 47% SiO_2 - 48% CaO - 5% P_2O_5
- 47Q : 47% SiO_2 - 26,5% CaO - 21,5% Na_2O - 5% P_2O_5

Fusion classique à 1400°C
45S5Q
47Q

Procédé sol-gel **Cl** et **NO_3** (chlorure ou nitrate page 52)
47T-Cl
47Q-Cl
47T-NO_3
47Q-NO_3

Procédé sol-gel **A** (acétate page 62)
47T-A
47Q-A

Procédé sol-gel **2A** (alcoolate et acétate page 84)
45S5Q-2A
45S5Q-0,01Ag
45S5Q-0,1Ag
45S5Q-0,5Ag
45S5Q-1Ag
47Q-2A
47Q-0,01Ag
47Q-0,1Ag
47Q-0,5Ag
47Q-1Ag

Procédé sol-gel **G** (complexant glycérol page 107)
45S5Q-G
47Q-G

Glossaire

ATD : Analyse Thermo Différentielle.

ATG : Analyse Thermo Gravimétrique.

ATR : Attenuated Total Reflection ou réflection totale atténuée.

EDS : Energy Dispersive Spectrometry ou analyse dispersive en énergie.

FTIR : Fourier Transform InfraRed spectroscopy, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (spectroscopie IRTF).

HA : HydroxyApatite.

HAC : HydroxyApatite Carbonatée.

MEM : Minimum Essential Medium ou milieu essentiel minimum.

PMMA : Poly(Methyl MethAcrylate) ou poly(méthacrylate de méthyle).

SD : Standard Deviation ou écart-type.

TEOS : Tétra Ethyl Ortho Silicate.

TMOS : Tétra Méthyl Ortho Silicate.

TEP : Tri Ethyl Phosphate.

Tg : Température de transition vitreuse.

Tc : Température de cristallisation.

SBF : Simulated Body Fluid ou fluide physiologique simulé.

SN2 : Substitution Nucléophile d'ordre 2.

Annexes

Annexe I : Synthèses des phosphates de calcium

1. Les phosphates de calcium

Les poudres de phosphate de calcium sont connues et utilisées par l'homme depuis plusieurs décennies. Cependant, les progrès croissants de la chirurgie réparatrice entraînent une augmentation de la demande en matériaux pouvant être implantés dans l'organisme.
Les céramiques de phosphate de calcium [1], en particulier l'hydroxyapatite (HA) et le triphosphate de calcium (TCP) peuvent imiter l'os naturel, d'une part grâce à une résistance à la compression au moins similaire voire supérieure à celle rencontrée pour l'os cortical (Tableaux A-I-1 et A-I-2) et d'autre part grâce à leurs compositions chimiques riches en calcium et en phosphore.

Type d'os	Résistance à la compression (MPa)	Résistance à la flexion (MPa)	Résistance à la tension (MPa)	Module (GPa)	Porosité (%)
Cortical	130 à 180	135 à 193	50 à 151	12 à 18	5 à 13
Spongieux	4 à 12	–	1 à 5	0,1 à 0,5	30 à 90

Tableau A-I-1 : Propriétés mécaniques du tissu osseux.

Matériaux	Résistance à la compression (MPa)
Céramiques denses (HA ou TCP)	5 à 550
Céramiques poreuses (HA)	0,8 à 350
Céramiques poreuses (TCP)	1,5 à 300
Composites polymères-CaP	0,45 à 300
Ciments minéraux	5 à 80

Tableau A-I-2 : Résistance à la compression de quelques biomatériaux à base de CaP.

Les phosphates de calcium sont un groupe de molécules très variées dont la synthèse s'effectue en général par la réaction d'un sel de phosphate avec un sel de calcium en voie sèche ou humide. La formation des phosphates de calcium est un procédé simple mais la réaction entre la bivalence du calcium et les quatre électrons de valence du phosphore donnent

souvent naissance à des molécules résultant d'un assemblage aléatoire de ces éléments rendant les phases intermédiaires instables et mal connues [2].

C'est principalement le rapport Ca/P initial qui va permettre d'obtenir un arrangement des atomes de calcium et de phosphore dans un système cristallin stable lors de la formation des poudres, que ce soit par voie sèche ou humide.

De façon générale (figure A-I-1),

- Si Ca/P < 1,5 : un mélange de β-TCP et de pyrophosphate de calcium β est formé ;
- Si Ca/P = 1,5 : le β-TCP pur est obtenu ;
- Si 1,5 < Ca/P < 1,67 : un mélange de β-TCP et d'hydroxyapatite stœchiométrique est formé ;
- Si Ca/P = 1,67 : de l'hydroxyapatite pure est obtenue ;
- Si 1,67 > Ca/P : un mélange d'hydroxyapatite stœchiométrique et de CaO est formé.

Il faut veiller à utiliser des précurseurs les plus purs afin de conserver un rapport Ca/P le plus proche de la réalité.

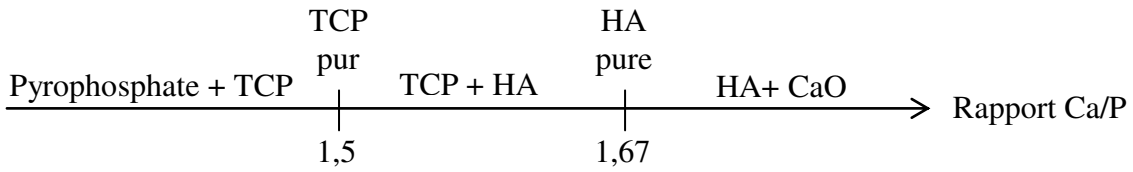


Figure A-I-1 : Formation des phosphates de calcium en fonction du rapport Ca/P initial.

1.1. L'hydroxyapatite et les apatites stœchiométriques

L'hydroxyapatite est une forme naturelle d'apatite de calcium, de formule $Ca_5(PO_4)_3(OH)$. Le groupement hydroxyl OH peut être aisément substitué par d'autres nucléophiles comme le fluor, le chlore ou les carbonates, ce qui forme la famille des apatites stœchiométriques.

Les apatites ne présentent pas de propriétés mécaniques exceptionnelles pour le monde minéral. Le dispositif cristallin est hexagonal et sa dureté est de 5 sur l'échelle de Mohs. Cette valeur fait des apatites un matériau plutôt fragile. Leur fracturation donne des fractures irrégulières conchoïdales. Elles ont une densité plutôt faible de 3,16 à 3,22 [3].

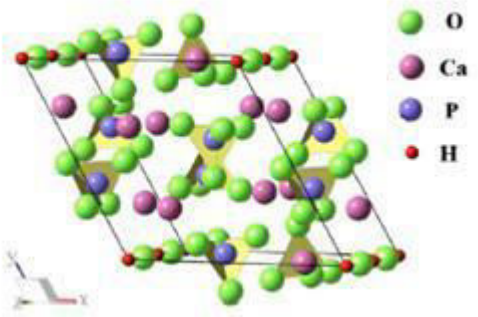


Figure A-I-2 : Dispositif cristallin de l'hydroxyapatite.

Il est possible d'obtenir de l'hydroxyapatite stœchiométrique en faisant réagir des quantités stœchiométriques de calcium et de phosphore, soit 5 atomes de calcium avec 3 atomes de phosphore (Ca/P = 1,67). Les apatites stœchiométriques sont très stables thermiquement. Par exemple, la fluoroapatite ne fond qu'à partir de 1644°C. Cependant, des décompositions peuvent apparaître à des températures inférieures sous des atmosphères oxydantes. Ainsi, la fluoroapatite peut être transformée en hydroxyapatite par chauffage dans un courant de vapeur d'eau à 1 360°C pendant 48 h [4]. La pureté des précurseurs est essentielle pour préserver la stœchiométrie mais également afin de ne pas introduire des impuretés pouvant dégrader la maille cristalline.

Si la stœchiométrie est parfaitement préservée, la structure du matériau n'est soumise qu'à des décompositions réversibles lors du traitement thermique. En effet, l'hydroxyapatite commence à perdre de l'eau à partir de 850°C pour donner de l'oxyapatite ; cette transformation est fortement dépendante des conditions de pression partielle en vapeur d'eau qui doit être très faible. Ensuite, l'oxyapatite se décompose en TCP à environ 1 050 °C (sous vide). Toutes ces réactions sont théoriquement réversibles si le refroidissement n'est pas trop brutal (trempe) [5].

Tout écart par rapport à la stœchiométrie idéale se traduira par l'apparition d'autres phases cristallines grâce à des mécanismes de décompositions irréversibles.

Par exemple, un léger défaut de calcium dans la composition entraîne l'apparition d'une phase de β-TCP dans l'hydroxyapatite (Ca/P < 1,67). Cette réaction de décomposition irréversible des apatites déficientes en calcium est très souvent utilisée pour synthétiser des céramiques biphasiques HA-βTCP [6].

Il est également possible qu'un excès de calcium soit présent (Ca/P > 1,67) ce qui mène indubitablement vers la formation de cluster de chaux (CaO) dans l'HA [7]. La présence de phases de densités et de duretés différentes entraîne souvent une fragilisation du matériau biphasique.

Les apatites stœchiométriques contenant des groupements carbonatés sont les plus instables des apatites. Durant leur traitement thermique, elles perdent rapidement du CO_2 et forment alors des composés de formulation variable et instable qui conduisent à des pyrophosphates. Les mécanismes de décomposition des apatites sont complexes du fait de la variabilité et de l'instabilité des molécules.

Les valeurs des produits de solubilité des apatites stœchiométriques varient sur de très grands domaines mais restent extrêmement faibles [8-9] (tableau A-I-3). Les valeurs trouvées dans la littérature scientifique se réfèrent à des produits difficilement synthétisables de façon pure, d'où les grandes variations dans les mesures. Ils sont potentiellement contaminés par des ions de divers éléments qui, même en faible concentration, se substituent dans la matrice cristalline en créant des contraintes non négligeables ce qui entraîne la variation de la solubilité du composé.

Solide	**Composition chimique**	**Produit de solubilité**
Brushite	$Ca(HPO_4), 2H_2O$	$2{,}59.10^{-7}$
Phosphate tricalcique	$Ca_3(PO_4)_2$	$2{,}83.10^{-30}$
Phosphate d'octacalcium	$Ca_8H_2(PO_4)_6$	2.10^{-49} à $1{,}01.10^{-94}$
Hydroxyapatite	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	$2{,}34.10^{-59}$ à $6{,}62.10^{-126}$
Fluoroapatite	$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$	$3{,}16.10^{-60}$ à $6{,}30.10^{-137}$

Tableau A-I-3 : Diverses valeurs de produits de solubilité de quelques phosphates de calcium à 25°C.

La solubilité des apatites est rétrograde, c'est-à-dire qu'après avoir atteint un maximum vers 16°C, elle diminue lorsque cette température est dépassée.
De plus, la solubilité peut varier fortement en fonction de la composition de la solution environnante et des phénomènes de surface, qui sont également mal connus.
Toutes les céramiques à base de phosphates de calcium sont solubles à un pH < 4. Dans un organisme, l'activité immunitaire peut générer un pH très acide [10] accélérant la

biodégradation de l'implant. Toutefois, la vitesse de dissolution de l'hydroxyapatite stœchiométrique bien cristallisée est très lente à cause de sa solubilité faible et ce matériau est souvent considéré comme non résorbable ou faiblement résorbable *in vivo* alors qu'un phosphate de calcium non stœchiométrique comme le tricalcium phosphate peut se dégrader à une vitesse plus élevée.

1.2. Le phosphate tricalcique

Le phosphate tricalcique ($Ca_3(PO_4)_2$) ou TCP, se présente principalement sous deux formes cristallines : α et β-TCP. La phase α-TCP possède une densité de 2,86 et une maille cristalline monoclinique. La phase β- est plus résistante avec une densité de 3,07 et cristallise dans un système rhomboédrique. La synthèse de la phase β-TCP est donc à privilégier pour ses propriétés mécaniques plus favorables à la réalisation d'implants céramiques.

Ces phases TCP s'obtiennent facilement par voie solide mais également par voie liquide en mélangeant les sels de calcium et de phosphore avec un rapport Ca/P = 1,5. La voie liquide permet d'obtenir du TCP amorphe qu'il faut chauffer afin d'obtenir la phase β [11]. Si la synthèse s'effectue par voie solide, un traitement thermique est également nécessaire, afin de convertir la phase α formée en phase β-TCP [12].

La figure A-I-3 résume les transitions de phases du TCP lors de son passage à hautes températures.

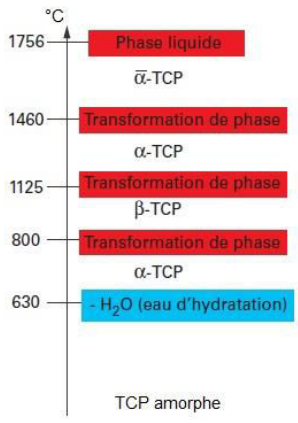


Figure A-I-3 : Transition de phase du TCP [9].

Le TCP amorphe perd ses molécules d'eau jusqu'à sa cristallisation en α-TCP à 630°C.

La phase β-TCP s'obtient en chauffant le α-TCP au-dessus de la température de transition α-β, entre 800°C et 1125°C. Cette dernière température correspond à la température de transition β-α où le changement de phase s'effectue à nouveau vers la phase α-TCP.
La phase α-TCP est métastable à température ambiante et facile à obtenir en trempant le TCP chauffé au-dessus de 1125°C.

Des écarts stœchiométriques sur le rapport Ca/P initial entraînent, comme pour l'HA, l'apparition de phases différentes du TCP initial, par l'intermédiaire de réactions de décompositions irréversibles se produisant entre 900 et 1100°C.

La solubilité du TCP est de l'ordre de $2{,}83.10^{-30}$ mol/L pour les deux phases. Le TCP est donc faiblement soluble, mais bien plus que l'HA qui ne présente quant à elle qu'un pK_s de 60 à 120 suivant les auteurs [8-9]. Sous l'environnement acide d'un organisme vivant, les céramiques de TCP sont donc résorbables à une vitesse plus élevée que les céramiques d'apatites stœchiométriques.

2. Synthèses par voie sèche

2.1. Calcination

Différentes méthodes de préparation des apatites par voie sèche ont été publiées.
Ces méthodes utilisent la calcination à des températures comprises entre 900 et 1 100°C de réactifs solides de sels de calcium et de phosphore dans des proportions adaptées à la stoechiométrie finale désirée. Le rapport Ca/P sera ajusté à 1,5 pour obtenir du phosphate tricalcique et à 1,67 pour favoriser la formation de l'hydroxyapatite parfaitement stœchiométrique [13].
Tous les sels de phosphate et de calcium qui se décomposent à une température inférieure à celle de la température de calcination sont utilisables [14].

2.2. Hydrolyse

Il est possible d'effectuer la synthèse d'apatites grâce à des réactifs d'origine naturelle.
Les sels de calcium tel que le $CaCO_3$ réagissent avec l'eau à des températures supérieures à 900°C pour former de l'apatite, la phase la plus stable thermodynamiquement.

C'est ainsi qu'il est possible de transformer des coraux naturels en apatites phosphocalciques tout en conservant la structure poreuse initiale. Ce procédé se nomme le replamineform [15].

Une autre méthode de synthèse de l'hydroxyapatite stoechiométrique (HA) peut être effectuée par calcination d'un mélange de carbonate de calcium et de phosphate tricalcique à 1 000°C sous vapeur d'eau.
Il est également possible d'utiliser d'autres sels de calcium qui se décomposent à la température de réaction ou en dessous de cette température, comme par exemple les nitrates.

La phase apatitique stœchiométrique est dans tous les cas thermodynamiquement la plus stable et l'hydrolyse à haute température de sels ayant un rapport Ca/P supérieur ou inférieur à la stœchiométrie idéale conduira à une apatite stœchiométrique par des réactions de dissolution-reprécipitation [16].

C'est ainsi que l'hydrolyse de phosphates possédant un rapport Ca/P inférieur à celui de l'apatite s'accompagne d'une augmentation du rapport Ca/P du solide associée à une acidification du milieu liée à la mise en solution de phosphate de calcium comportant des espèces protonées. Ces phosphates de calcium acides présents dans la solution dotent le milieu d'un rapport Ca/P inférieur à la phase solide de départ.
Le phénomène est complexe et bien souvent les apatites obtenues sont sous-stœchiométriques car elles contiennent des ions. Pour faciliter la formation d'une apatite plus proche de la stœchiométrie, la plupart des auteurs travaillent en milieu alcalin.

Pour les phosphates de calcium possédant un rapport Ca/P supérieur à celui de l'hydroxyapatite, notamment le phosphate tétracalcique, l'hydrolyse conduit à une diminution du rapport Ca/P du solide et par conséquent à une solution basique avec un rapport Ca/P supérieur à celui du solide initial.

3. Synthèses par voie humide

3.1. Synthèse par neutralisation

Il existe une méthode de synthèse qui repose sur la neutralisation d'une solution ou d'une suspension de $Ca(OH)_2$ par de l'acide phosphorique, ce qui entraîne la formation de précipités apatitiques [17].
Cette synthèse permet d'obtenir un produit final de grande pureté car il y a absence de contre-ions dans les précurseurs employés, ce qui ne forme pas de sous-produits. La principale difficulté est le contrôle de la réaction.

3.2. Synthèse par double décomposition

La synthèse par double décomposition est amplement citée dans la littérature pour obtenir des poudres de phosphate de calcium. La précipitation des poudres a lieu à partir d'une solution d'un sel de phosphate et d'une solution d'un sel de calcium. Cette méthode offre la possibilité de jouer sur de nombreux paramètres expérimentaux : concentrations des solutions de départ, addition lente ou rapide de ces solutions, température, pH, durée de la réaction, mais également le rapport atomique Ca/P dans les réactifs.

C'est majoritairement le rapport Ca/P qui va permettre d'orienter la synthèse vers la formation d'hydroxyapatite ou de phosphate tricalcique. Les conditions opératoires différenciant, les synthèses des deux poudres sont résumées dans le tableau A-I-4.

	Hydroxyapatite (HA)	Phosphate tricalcique (TCP)
Formule	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	$Ca_3(PO_4)_2$
Ca/P (réactifs)	1,67	1,50
Température	98°C	30°C
PH	pH : Ammoniacal	pH : 6 – 6,5
Maturation	1 heure	24 heures

Tableau A-I-4 : Conditions de synthèse.

Selon M. Descamps *et al.* [18-19], la synthèse des poudres d'HA et de TCP est réalisée par précipitation d'une solution désaérée d'hydrogénophosphate d'ammonium (NH4)2HPO4 dans une solution de nitrate de calcium préparée à partir de Ca(NO3)2,4H2O et de l'eau distillée désaérée. La solution contenant les phosphates est ajoutée goutte à goutte à la solution de calcium dont le pH est contrôlé par un régulateur. Le tableau A-I-5 résume les produits de départ employés.

Fonction du précurseur	Nom du produit	Formule	Pureté / Concentration
Calcium	Nitrate de Calcium	$Ca(NO_3)_2$	99%
Phosphore	L'hydrogénophosphate de diammonium	$((NH_4)_2HPO_4)$	99%
Catalyseur	Ammoniaque	NH_3	30%
Solvant	Eau	H_2O	-

Tableau A-I-5 : Produits de départ.

Il est assez facile d'obtenir des phases apatitiques par précipitation mais la conservation de la stœchiométrie de la phase liquide vers la phase solide n'est pas assurée.
Outre le rapport Ca/P initial, d'autres paramètres peuvent modifier la stœchiométrie des précipités formés. Les paramètres les plus importants sont le pH, la température, le temps de maturation, la manière d'ajouter les réactifs et les ions étrangers éventuellement présents dans la solution [20].

C'est pour cela que le mode opératoire de la synthèse s'appuie sur plusieurs étapes, qui permettent de garantir la pureté des poudres finales.

Dans un premier temps, le nitrate de calcium est introduit en totalité dans le réacteur avec la quantité d'eau nécessaire à sa mise en solution. En effet, la formation d'apatites stœchiométriques est favorisée lorsque la précipitation est effectuée en présence d'un excès d'ions calcium en solution. En effet, la saturation du calcium dans la solution réduit les risques que la phase apatitique puisse admettre d'autres substituants lors de sa cristallisation [20].

De l'hydrogénophosphate de diammonium, préalablement mis en solution aqueuse, est introduit à une vitesse de 50 mL/min.
Il est alors nécessaire de chauffer le réacteur [21]. La température minimale est de 30°C dans le cas d'une synthèse de phosphate tricalcique, afin d'augmenter la cinétique de la précipitation.
La température agit également sur la cinétique de formation du précipité dans le cas de l'hydroxyapatite, mais agit aussi la stœchiométrie et la cristallinité. Les températures élevées

(supérieures à 80°C) favorisent la formation d'hydroxyapatites stœchiométriques et bien cristallisées.

Le pH du réacteur est important car les phosphates de calcium obtenus à des pH acides contiennent généralement des proportions importantes d'ions et présentent des cristaux avec des lacunes en ions calcium et hydroxyde.
Maintenir un pH légèrement acide (6 – 6,5) est nécessaire dans le cas de la synthèse de phosphate tricalcique afin de stabiliser cette phase en évitant sa transformation en apatite. Le phosphate tricalcique présente un déficit en calcium par rapport à l'hydroxyapatite qui est ainsi maintenu grâce à un pH acide [22].
L'hydroxyapatite stœchiométrique est par contre toujours obtenue en milieu basique afin d'éviter les lacunes en ions conduisant à une sous-stœchiométrie.

L'étape suivante est la maturation où le réacteur est laissé à la température de synthèse et sous agitation constante.
La durée de vieillissement en solution est importante car les sursaturations élevées dans le milieu ainsi que les vitesses de précipitation importante accroissent la formation d'intermédiaires instables qui sont de natures cristallisés ou amorphes [23].
Il faut alors attendre que ces intermédiaires se stabilisent sous forme de phosphate tricalcique ou d'hydroxyapatite. Ce délai de stabilisation, appelé maturation, dépend aussi de la température de réaction et du pH.

Les précipités d'hydroxyapatite ou de phosphate tricalcique sont alors filtrés de la solution par aspiration sous Büchner. Les amas de poudres sont rincés à l'éthanol et mis dans une étuve à 80°C pour séchage pendant 24h.

Les étapes finales de la synthèse sont la stabilisation thermique suivie d'un broyage en jarre.

Lors de l'étape de stabilisation, la poudre séchée est grossièrement broyée et placée dans des creusets en alumine. On traite alors thermiquement ceux-ci dans un four à 900°C pendant 15h ce qui permet d'éliminer efficacement les nitrates présents lors de la synthèse. Dans le cas du phosphate tri-calcique, on effectue également la transition de phase de la phase α-TCP vers la phase β-TCP à cette température.

A la suite de ce traitement thermique, la poudre est placée dans des jarres de broyage dotées de billes d'agate, avec un peu d'eau. Le temps de broyage dépendra de la granulométrie finale voulue. Après une dernière filtration de la barbotine sous Büchner, la poudre résultante est séchée à l'étuve pour 24h à 80°C.

Ce procédé de synthèse permet d'obtenir après calcination à 900°C du phosphate tricalcique et de l'hydroxyapatite pur.

Bibliographie

[1] : A.J. Wagoner, B.A. Herschler, **A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair**, Acta Biomaterialia, vol. 7, p. 16-30, 2011.

[2] : J.C. Elliott, **Structure and chemistry of the apatites and others calcium orthophosphates**, ed. Elsevier, Amsterdam, 1994.

[3] : G. Montel, **« progrès dans le domaine de la chimie des composes phosphores solides à structure d'apatite. Application à la biologie et au traitement des minerais »**, Pure and applied chemistry, vol. 52, p. 973-987, 1980.

[4] : C.A. Beevers, D.B. McIntyre, **Atomic structure of fluor-apatite and its relation to tooth and bone materials**. Miner. Mag., vol. 27, p. 254-257, 1946.

[5] : S. Raynaud, **Synthèse frittage et propriétés mécaniques de phosphates de calcium dans le système hydroxyapatite – phosphate tricalcique**, Thèse de l'Université de Limoges, 1999.

[6] : R.Z. Legeros, **Biphasic calcium phosphate bioceramics : preparation, properties and applications**, J. Mater. Sci.-Mater. M., vol. 14, p. 201-209, 2003.

[7]: J.H. Welch, W. Gutt, **High temperature studies of the system calcium oxide-phosphorus pentoxyde**, J. Chem. Soc., p. 4442-4444, 1961.

[8]: A.Ravaglioli, A. Krajewski, **Bioceramics materials properties applications**, ed. Chapman and Hall, London, 1992.

[9]: C. Rey, C. Combes, C. Drouet, D. Grossin, P. Ucheyne, K. Healy, D. Hutmacher, D.E.Grainger, J. Kirkpatrick, **Bioactive Ceramics : Physical Chemistry. « Comprehensive Biomaterials »**, ed. Elsevier, p. 187-221, 2011.

[10] : A. Schädlich, S. Kempe, K. Mäder, **Non-invasive *in vivo* characterization of microclimate pH inside *in situ* forming PLGA implants using multispectral fluorescence imaging**, J. Control. Release, vol. 179, p. 52-62, 2014.

[11]: A. Destainville, E. Champion, D. Bernache-Assolant, E. Laborde, **Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate**, Mater. Chem. Phys., vol. 80, p. 269-277, 2003.

[12]: R. Famery, N. Richard, P. Boch, **Preparation of α and β-TCP ceramics with and without magnesium addition**, Ceram. Int., vol. 20, p. 327-336, 1994.

[13] : L.H. He, O.C. Standard, T.T.Y. Huang, B.A. Latella, M.V. Swain, **Mechanical behaviour of porous hydroxyapatite**, Acta Biomaterialia, vol. 4, issue 3, p. 577-586, 2008.

[14] : E. Meurice, A. Leriche, J.C. Hornez, F. Bouchart, E. Rguiti, L. Boilet, M. Descamps, F. Cambier, **Functionalisation of porous hydroxyapatite for bone substitutes**, J. Eur. Ceram. Soc., vol. 32, issue 11, p. 2673-2678, 2012.

[15]: J.F. Piecuch, N.J. Fedorka, **Results of soft-tissue surgery over implanted replamineform hydroxyapatite,** J. Oral Maxil. Surg., vol. 41, issue 12, p. 801-806, 1983.

[16] : J.O. Amankonah, P. Somasundaran, K.P. Ananthapadmabhan, **Effects of dissolved mineral species on the dissolution/ precipitation characteristics of calcite and apatite**, Colloid. Surface., vol. 15, p. 295-307, 1985.

[17] : S. Lazić, S. Zec, N. Miljević, S. Milonjić, **The effect of temperature on the properties of hydroxyapatite precipitated from calcium hydroxide and phosphoric acid**, Thermochim. Acta, vol. 374, issue 1, p. 13-22, 2001.

[18] : M. Descamps, J.C. Hornez, A. Leriche, **Effects of powder stoichiometry on the sintering of β-tricalcium phosphate**, J. Eur. Ceram. Soc., vol. 27, issue 6, p. 2401-2406, 2007.

[19] : E. Meurice, A. Leriche, J.C. Hornez, F. Bouchart, E. Rguiti, L. Boilet, M. Descamps, F. Cambier, **Functionalisation of porous hydroxyapatite for bone substitutes**, J. Eur. Ceram. Soc., vol. 32, issue 11, p. 2673-2678, 2012.

[20] : J. Pena, M. Vallet-Regi, **Hydroxyapatite tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by a liquid mix technique**, J. Eur. Ceram. Soc., vol. 23, p. 1687-1696, 2003.

[21] : S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, P. Thomas, **Calcium phosphate apatities with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powder**, Biomaterials, vol. 23, p. 1065-1072, 2002.

[22] : H. Zhang, Y. Wang, Y. Yan, S. Li, **Precipitation of biocompatible hydroxyapatite whiskers form moderately acid solution**, Ceram. Int., vol. 29, 2003.

[23] : Y.X. Pang, X. Bao, **Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and cristallinity of hydroxyapatite nanoparticles**, J. Eur. Ceram. Soc., vol. 23, p. 1697-1704, 2003.

Annexe II : Techniques de mises en forme des poudres de biocéramiques

1. Réalisation de massifs par coulage d'une barbotine en moule de plâtre

La réalisation d'une barbotine avec des poudres de phosphates de calcium permet l'élaboration de massifs de formes très variées pour une simplicité de mise en œuvre.

1.1. Constituants de la barbotine

Il est courant de réaliser une barbotine à 65% de matière sèche qui n'implique pas un retrait trop important lors du séchage. Le solvant utilisé est traditionnellement l'eau, bien que des solvants organiques puissent être utilisés afin de réduire le temps de séchage [1].

Afin d'optimiser la dispersion de la poudre dans le solvant, il est nécessaire d'utiliser un dispersant. Le dispersant permet d'éviter les amas de poudre dans la suspension. Il permet d'éviter que les particules de céramiques se rencontrent et se lient entre elles.
Les phénomènes mis en jeu pour l'action du dispersant dépendent à la fois de la poudre et du solvant [2]. Deux modèles sont proposés pour expliquer le mécanisme de dispersion d'une poudre dans son solvant [3-6]:
Si la barbotine est faiblement chargée en poudre, le modèle de répulsion est électrostatique. Le dispersant est inutile : les forces électrostatiques présentes entre les grains sont des forces répulsives qui résultent de l'interaction des couches périphériques s et p des atomes. Lorsque deux particules se rapprochent, les couches se repoussent ce qui stabilise la suspension de façon naturelle.
Dans le cas présent, la barbotine est fortement chargée en poudre. Le modèle de répulsion utilisé devient le modèle de l'encombrement stérique. La stabilisation stérique résulte de l'addition dans la barbotine du dispersant. Le dispersant est une macromolécule organique qui va être adsorbée à la surface des grains de la céramique et qui va alors former un écran de protection contre les contacts et donc éviter la formation d'amas.

Les produits de départ utilisés pour préparer les barbotines sont résumés dans le tableau A-II-1.

Fonction du précurseur	Nom du produit	Remarques
Matière sèche	HA / TCP	65% de la masse finale
Dispersant	Darvan-C	Nom commercial
Solvant	Eau	

Tableau A-II-1 : Produits de départ

1.2. Préparation de la barbotine et coulage

La préparation de la barbotine s'effectue en plusieurs étapes qui comprennent en autre, la pesée d'une masse de poudre d'hydroxyapatite égale à 65% de la masse de barbotine voulue dans une jarre de broyage dotée de billes d'agate. L'ajout du dispersant est suivi par l'addition dans la jarre d'une masse d'eau complémentaire au 65% de matière sèche.
La quantité de dispersant qu'il est nécessaire d'introduire dépend de la masse de poudre utilisée mais également de la finesse de celle-ci. En effet, une granulométrie peu élevée entraîne une surface spécifique plus importante à mouiller par le solvant, d'où la nécessité d'utiliser plus de dispersant.
La jarre est ensuite placée 1h dans un broyeur planétaire tournant à 200 tours/min. Une fois ce temps écoulé, la barbotine est prête à être coulée dans des moules.

Le coulage s'effectue dans des moules de plâtre de forme et hauteur voulues qui ont la capacité d'absorber le surplus d'eau de la surface du massif lors du séchage. Ce phénomène permet la formation d'une interface de contact assurant un séchage sans fracturation.
Le séchage des massifs s'effectue à l'air libre pendant 48h.

La densification des massifs s'effectue dans un four électrique à la température 1100°C pendant 3h pour le phosphate tricalcique et à 1250°C pour l'hydroxyapatite qui est plus stable thermiquement.

2. Réalisation de pastilles denses par coulage en bande

Le coulage de barbotine d'hydroxyapatite ou bien de phosphate tricalcique est également possible par une autre technique de mise en forme par voie liquide : le coulage en bande de la barbotine, la bande étant une surface longue et plane (figure A-II-1).

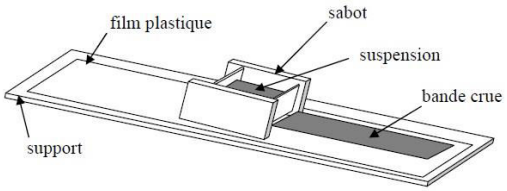


Figure A-II-1 : Schéma de principe du montage utilisé pour le coulage en bande.

L'étalement de la barbotine sur la bande est obtenu par un mouvement de la bande ou du réservoir contenant la suspension (appelé également sabot). Les deux types de configuration existent :

- les montages à coulage continu, la bande est mobile et le sabot fixe. C'est le type de montage le plus fréquent. Le coulage peut s'effectuer en continu si on dispose d'une bande assez longue et d'un sabot de bonne capacité, ce qui en fait une technique appréciée dans l'industrie.
- les montages à coulage discontinu : le sabot se déplace sur le support fixe.

Le réservoir est muni d'un couteau qui lamine la barbotine lors de son écoulement ce qui permet à la bande déposée de présenter une épaisseur uniforme sur toute sa longueur. Le réglage de la hauteur du couteau détermine l'épaisseur de la bande [7].

2.1. Constituants de la barbotine

La barbotine utilisée pour le coulage en bande contient, en plus de la poudre de céramique et de son solvant, plusieurs additifs permettant d'adapter la barbotine au procédé de coulage, comme des dispersants, liants et plastifiants. La quantité d'additifs à ajouter dépendra des caractéristiques granulaires de la poudre, afin que la rhéologie de la barbotine soit adaptée au coulage en bande qui doit être idéalement rhéofluidifiant [7-8].

La gamme de granularité de la poudre dépend évidemment de l'application. La taille des grains doit cependant être faible et il ne doit pas y avoir d'agglomérats.

La surface spécifique ne doit cependant pas être trop élevée : plus la surface devient grande et plus la quantité d'additifs à utiliser pour stabiliser la barbotine est importante. Les additifs comme les dispersants et liants, par exemple, sont souvent des molécules organiques polymères qui devront ensuite être éliminées, en laissant des résidus néfastes pour les propriétés finales des massifs. Il faut donc veiller à en employer le moins possible. Dans le même ordre d'idée, une répartition multimodale de la taille des grains est préférable à une répartition monomodale car elle nécessite une teneur plus faible en constituants organiques.

Le solvant est un constituant essentiel, qui ne doit avoir aucune réactivité vis-à-vis de la poudre de céramique utilisée et qui assure la solubilité des différents constituants organiques. Il participe également à la dispersion de la poudre par effet électrostatique.
Il doit être inerte vis à vis de la poudre. Le milieu aqueux présente de faibles vitesses d'évaporation et n'est donc pas beaucoup employé dans l'industrie, contrairement aux solvants organiques.

Le second constituant est le dispersant. La dispersion, ou défloculation des poudres, est fondamental dans le procédé de coulage en bande. Tout comme pour le procédé de coulage en moule de plâtre, la formation d'amas de poudre dans la barbotine est évitée par addition de macromolécules s'adsorbant sur les grains céramiques.

Le troisième additif constituant la barbotine est le liant. Le liant est une longue molécule organique qui s'adsorbe à chacune de ses extrémités à la surface des grains de la céramique. Ce phénomène crée des ponts qui permettent l'édification d'un squelette renforçant les propriétés mécaniques de la bande une fois coulée. Le liant parfait doit être inerte vis-à-vis des autres constituants de la barbotine et être efficace à de faibles concentrations afin que sa pyrolyse ne laisse pas trop d'éléments carbonés dans la céramique finale.

Le liant permet également de modifier la rhéologie de la barbotine afin qu'elle soit la plus proche possible du comportement rhéologique idéal lors du coulage en bande : le comportement rhéologique rhéofluidifiant. Les fluides rhéofluidifiants sont les plus adaptés car leur viscosité diminue avec le gradient de vitesse. Au repos, la viscosité élevée de la barbotine évite la sédimentation des particules durant les différentes étapes d'élaboration. Lors du coulage, la fluidité augmente, ce qui permet d'obtenir une bande homogène. Après la

coulée, la viscosité reprend sa valeur initiale ce qui évite cette fois ci la sédimentation dans l'épaisseur de la bande.

Le plastifiant est le dernier additif organique indispensable pour l'élaboration d'une barbotine de coulage en bande. Il donne à la bande crue la flexibilité nécessaire à sa manipulation en rompant certaines liaisons fortes entre les particules. Il modère ainsi l'action du liant en évitant les fissurations. Les plastifiants utilisés sont les glycols comme le polyéthylène glycol (PEG) de faible masse molaire (typiquement 300 $g.mol^{-1}$) et les phthalates, comme le dibutylphthalate (DBP) [3].

2.2. Préparation de la barbotine et coulage

La préparation d'une suspension de coulage est réalisée en trois étapes bien distinctes [8].
La première étape est un broyage qui concerne uniquement la poudre, cette opération consiste à désagglomérer la poudre et à lui donner la granulométrie adaptée au coulage.
La deuxième étape permet d'effectuer le mélange entre la poudre, le solvant et le dispersant. La dispersion est effectuée de façon plus efficace dans un milieu peu visqueux où il n'y pas encore une grande concentration de produits organiques. Dissoudre préalablement le dispersant sans le liant permet également d'éviter les compétitions ultérieures d'adsorption entre le dispersant et le liant à la surface des particules. Il y aurait alors évolution des propriétés rhéologiques de la suspension dans le temps (vieillissement), ce qui n'est pas souhaitable [2, 3, 8].
La troisième étape permet de dissoudre correctement les additifs manquants et d'homogénéiser l'ensemble. Cette dernière étape de mélange est effectuée de façon plus délicate que la précédente afin de ne pas détériorer les longues chaînes fragiles du liant comme lors d'un broyage trop intense.

La suspension est ensuite désaérée sous vide d'air avant coulage, ceci afin d'éviter par la suite la formation de bulles sur la bande.

Afin d'obtenir des pastilles, il suffit de percer la bande coulée à l'emporte-pièce. Après séchage, les pastilles sont récupérées et subissent un traitement thermique avec un palier à basse température qui permet l'élimination des additifs organiques. Cette opération serait également réalisable grâce à un déliantage de la bande par un fluide supercritique.

Le traitement se poursuit à haute température afin de densifier le massif céramique. La figure A-II-2 résume le procédé de coulage en bande.

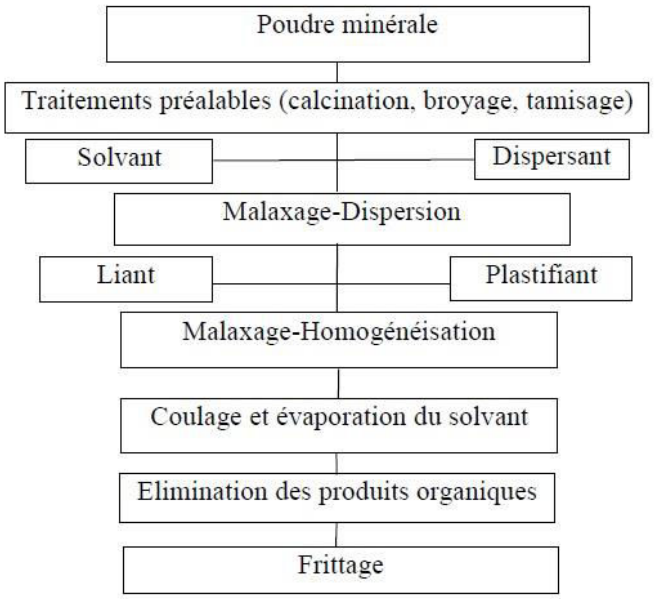


Figure A-II-2 : Procédé de coulage en bande.

Bibliographie

[1] : Y. Hu, X. Miao, **Comparison of hydroxyapatite ceramics and hydroxyapatite/borosilicate glass composites prepared by slip casting**, Ceram. Int., vol. 30, issue 7, p. 1787-1791, 2004.

[2] : A. Kristofferson, E. Carlstrom, **Tape casting of alumina in water with and acrylic latex binder**, J. Eur. Ceram. Soc., vol. 7, p. 289-297, 1997.

[3] : T. Chartier, **Procédé de mise en forme des céramiques**, Matériaux et Processus Céramiques, ed. HERMES Science Europe, p. 141-217, 2001.

[4] : L. Braun, J. R. Morris, W. R. Cannon, **Viscosity of tape casting slips**, Am. Ceram. Soc. Bull., vol. 64, p. 727-729, 1985.

[5] : H. A. Van Der Schee, J. Lyklema, **A lattice of polyelectrolyte adsorption**, Journal of Physical Chemistry, vol. 88, p. 6661-6667, 1984.

[6] : J. Papenhuizen, H.A. Van Der Schee, G.F. Fleer, **Polyelectrolyte adsorption I. Anew lattice theory**, Journal of Colloidal Interface Sciences, vol. 104, p 540-561,1985.

[7] : L. Lostec, **Elaboration par coulage en bande et caractérisation microstructurale et mécanique de composite SiC/MAS-L**, Thèse de l'université de Limoges, 1997.

[8] : T. Chartier, **Tape casting**, Encyclopedia of Advanced Materials, ed. Pergamon press, p. 2763-2768, 1994.

Annexe III : Procédés de dépôts sol-gel

1. Le trempage-retrait (dip-coating)

Le trempage retrait [1-2] est l'une des techniques de recouvrement sol-gel la plus utilisée. Un schéma de ce procédé est visible sur la figure A-III-1, et une photographie de dispositif de trempage-retrait sur la figure A-III-2.

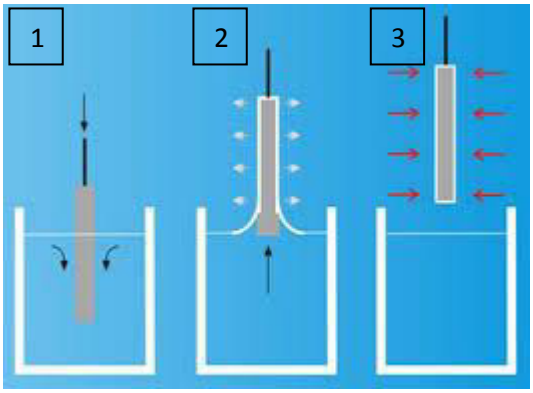


Figure A-III-1 : Principe du trempage-retrait.



Figure A-III-2 : Dispositif de trempage retrait.

Comme le montre ces figures, les substrats sont immergés dans le sol verticalement (1). Une fois l'échantillon complètement recouvert, les échantillons sont lentement extraits du sol à une vitesse contrôlée (2). La gélification se produit alors à la surface du substrat ce qui forme un dépôt. L'épaisseur déposée est inversement proportionnelle à la vitesse, un dépôt épais est donc réalisé avec une vitesse faible (3).

En jouant sur la viscosité et la vitesse de retrait, cette technique permet d'obtenir avec précision des dépôts de qualité ayant des épaisseurs allant de 50nm à 2µm. Les avantages de cette technique sont :

- la possibilité de recouvrir simultanément les 2 faces, mais un masquage d'une des faces rend possible un recouvrement monoface.
- la perte de gel est minime.

2. La centrifugation (spin-coating)

Le principe de la centrifugation est indiqué sur la figure A-III-3 [3-4] :

- une goutte de gel est déposée au centre d'une pièce fixée sur un support horizontal rotatif (1),
- la vitesse de rotation, de l'ordre de 3000 tr/min, étale le gel par centrifugation jusqu'à l'obtention d'un film uniforme (2),
- l'épaisseur du film est inversement proportionnelle à la vitesse de rotation mais dépend aussi des propriétés de viscosité du gel (3),
- le séchage du gel s'effectue rapidement et l'échantillon peut être remplacé par un autre (4).

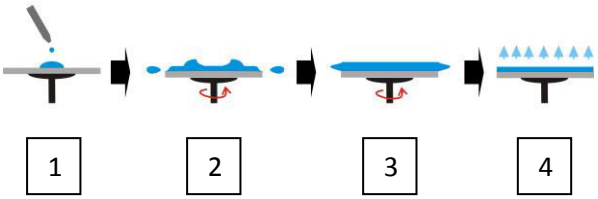


Figure A-III-3 : Principe de la centrifugation sol-gel.

L'application du gel est mono-face, mais cette technique permet un recouvrement maîtrisé des couches minces en utilisant des quantités de gel faibles. La figure A-III-4 montre un exemple de centrifugeur ou spin-coater.



Figure A-III-4 : Spin-coater.

Bibliographie

[1] : J.R. Jones, A.G. Clare, **Bio-glasses an introduction**, ed. Wiley, 2012.

[2] : J. Liu, X. Miao, **Sol–gel derived bioglass as a coating material for porous alumina scaffolds**, Ceram. Int., vol. 30, issue 7, p. 1781-1785, 2004.

[3] : C.J. Brinker, A.J. Hurd, K.J.W. Machenzie, **Fundamentals of Sol-gel thin films formation**, ed. Wiley, New York, 1988.

[4] : S.H. Teng, P. Wang, J.Q. Dong, **Bioactive hybrid coatings of poly(ε-caprolactone)–silica xerogel on titanium for biomedical applications**, Mater. Lett., vol. 129, p. 209-212, 2014.

Annexe IV : Composition du MEM

Minimum Essential Medium (MEM)			
Composants	**Masse molaire**	**Concentration (mg/L)**	**Concentration (mM)**
Sels inorganiques			
chlorure de calcium Anhydre ($CaCl_2$)	111	200,00	1,80
chlorure de potassium (KCl)	75	400,00	5,30
sulfate de magnesium ($MgSO_4$)	120	97,67	0,814
chlorure de sodium (NaCl)	58	6800,00	117,24
bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$)	84	2200,00	26,20
phosphate de sodium hydraté (NaH_2PO_4-H_2O)	138	140,00	1,01
Autres composants			
D-Glucose	180	1000,00	5,55
rouge de phénol	398	10,00	0,0251
Acides aminés			
L-Arginine - HCl	211	126,00	0,600
L-Cystine-2 HCl	313	31,00	0,100
L-Glutamine	146	292,00	2,000
L-Histidine – HCl - H_2O	210	42,00	0,200
L-Isoleucine	131	52,00	0,400
L-Leucine	131	52,00	0,400
L-Lysine-HCl	183	73,00	0,397
L-Methionine	149	15,00	0,101
L-Phenylalanine	165	32,00	0,194
L-Threonine	119	48,00	0,403
L-Tryptophane	204	10,00	0,049
L-Tyrosine - 2Na - 2H_2O	261	52,00	0,199
L-Valine	117	46,00	0,393
Vitamines			
D-Ca Pantothenate	477	1,00	0,002
chlorure de choline	140	1,00	0,0071
acide folique	441	1,00	0,0022
i-Inositol	180	2,00	0,0111
niacinamide	122	1,00	0,0081
pyridoxal HCl	2041,00	0,0049	
riboflavine	376	0,10	0,0002
thiamine HCl	337	1,00	0,0029

Annexe V : Notice constructeur des tests de quantifications des biofilms bactériens

GLBiocontrol procédures



Quantification de la biomasse totale présente sur une surface par ATP-métrie



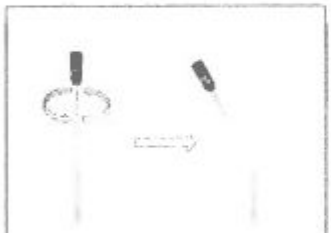
1. Distribuer 8 gouttes de réactif EXTRACTANT dans un tube de mesure pour luminomètre



2. Sortir l'écouvillon de son emballage et plonger son extrémité (coton) dans le tube contenant le réactif



3. Présenter le gabarit sur la surface à prélever et frotter à l'aide de l'écouvillon le champ délimité (20cm²)



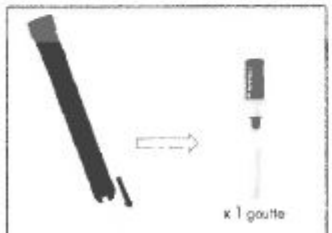
4. Introduire l'écouvillon dans le tube et homogénéiser. Casser le bâtonnet au niveau supérieur du tube



5. Distribuer 2 gouttes de réactif DENDRIDIAG® BF dans le tube de mesure contenant l'EXTRACTANT



6. Fixer le tube de mesure au stylo porte-tube et l'introduire dans le luminomètre. Lancer la mesure



7. Noter le résultat R1 (en RLU). Sortir le stylo et ôter le tube. Introduire une goutte de STANDARD (ajout dosé)



8. Fixer le tube de mesure au stylo porte-tube et réaliser une nouvelle mesure. Noter le résultat R2 (en RLU)

9. Calculs :

$$\text{Etalon} = \frac{(R2 - R1)}{\text{Standard}} \quad (\text{RLU / pg})$$

$$[\text{ATP}] = \frac{R1}{\text{Etalon} \times S} \quad (\text{pgATP/cm}^2)$$

Avec :
R1 (en RLU) : résultat sur l'échantillon
R2 (en RLU) : résultat après ajout dosé
Standard (en pg) : 1000
S (en cm²): surface prélevée (20cm²)

La concentration en ATP intracellulaire est donnée en picogramme d'ATP par centimètre carré et peut être exprimée en équivalent bactérien par centimètre carré selon la convention suivante : 1 picogramme d'ATP ≈ 1 000 bactéries.

GL BIOCONTROL - S.A.R.L. au capital de 22 500 € - SIRET 505 340 448 00032
9, avenue de l'Europe - CAP ALPHA - 34 830 CLAPIERS - FRANCE / Tél : +33(0)9.67.39.35.20 - Fax : +33(0)9.55.25.40.31

Les bioverres du système quaternaire SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5 obtenus par fusion doivent être coulés à 1400°C, ce qui ne permet pas la mise en forme de matériaux complexes comme par exemple des composites macroporeux en biocéramiques (HA et TCP) recouverts d'une couche uniforme de bioverre. Pour contourner cette limitation, la voie sol-gel a été utilisée dans cette étude. Le but principal a été de synthétiser par le procédé sol-gel, deux compositions quaternaires du système SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5 habituellement obtenues par fusion. Il s'agit des compositions 45S5® de L.L. Hench et 47Q de C. Duée. Ces verres sont inversés, c'est à dire qu'ils contiennent plus d'éléments modificateurs (calcium et sodium) que d'éléments formateurs (silicium et phosphore). Pour la synthèse sol-gel, du TEOS (TétraEthylOrthoSilicate) et du TEP (TriEthylPhosphate) ont été utilisés pour introduire les formateurs. En utilisant des précurseurs minéraux pour le calcium et le sodium, il existe des difficultés à maintenir le gel amorphe lors de son séchage. En effet, les précurseurs minéraux sont le siège de mécanismes de dissolution-précipitation liés entre autres aux solvants choisis, à la nature et à la concentration des anions dans le milieu. L'étude s'est donc orientée vers l'utilisation d'autres précurseurs des modificateurs afin de limiter la part des anions qui contribuent au phénomène de précipitation non souhaité. Deux procédés de synthèse originaux ont été alors mis au point avec des précurseurs alcoolates, acétates et du glycérol. Avec ces procédés, la nature amorphe des composés a été confirmée et leurs caractéristiques thermiques ont été ensuite étudiées. Tous les verres sol-gel réalisés sont bioactifs.

Les compositions de base, 45S5® et 47Q, ont été ensuite dopées avec de l'argent afin de doter les bioverres d'une action antibactérienne. Des cellules L132 ont été utilisées pour évaluer la toxicité des poudres des deux procédés sol-gel. Le procédé le moins toxique a été conservé pour la suite de l'étude. Les bioverres dopés et non dopés ont été alors déposés à la surface d'échantillons plats et macroporeux en HA et TCP par une technique de trempage-retrait. Des tests de prolifération et de formation de biofilms par *Pseudomonas aeruginosa* ont été réalisés sur des pastilles de TCP recouvertes et ont mis en évidence un effet toxique des dépôts contenant de l'argent. Des mesures de prolifération et de vitalité sur des cellules humaines MG63 ont été également réalisées et ont permis d'observer également un effet toxique. Cet effet n'est pas souhaitable dans ce cas car il affecte la biocompatibilité de l'implant. Il devrait cependant être confirmé par d'autres tests réalisés avec d'autres lignées cellulaires.

Mots-clés :
Verres bioactifs, bioverres, bioactivité, sol-gel, alcoolates, acétates, spectroscopie Infra-Rouge, diffractions des rayons X, analyses thermiques, trempage-retrait, hydroxyapatite, phosphate tricalcique, biofilms, prolifération, vitalité.

Bioglasses of quaternary system SiO_2-Na_2O-CaO-P_2O_5 obtained by melting are cast at 1400 ° C, which does not allow the shape of complex materials, for example macroporous bioceramics composites (HA and TCP) coated with an uniform layer of bioglass. To overcome this limitation, the sol-gel process has been used in this study. The aim has been to synthesize by sol-gel process, two quaternary compositions usually obtained by melting in the SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5 system. These are two compositions : 45S5® of L.L. Hench and 47Q made by C. Duée. These glasses are reversed, ie they contain more modifiers elements (calcium and sodium) as formers elements (silicon and phosphorus). For the sol-gel synthesis, TEOS (TetraEthylOrthoSilicate) and TEP (TriEthylPhosphate) have been used to introduce the formers. When minerals precursors are used for calcium and sodium, there are difficulties to maintain amorphous the gel during its drying. Indeed, minerals precursors have some dissolution-precipitation mechanisms linked to the selected solvents and the nature and concentration of anions in the medium. The use of other modifiers precursors has been made in the study to limit the proportion of anions contributing to the undesired precipitation phenomenon. Two original synthesis methods have been developed with alkoxide precursors, acetates and glycerol. With these processes, the amorphous nature of the compounds has been confirmed and their thermal characteristics have been studied. All sol-gel glasses are bioactives.

The compositions, 45S5® and 47Q, have been doped with silver to add an antibacterial action to the bioglasses. L132 cells have been used to test the toxicity on the powders of the two sol-gel processes. The least toxic process is has been retained for the other tests. Doped and undoped bioglasses have been coated on the surface of flat and macroporous samples of HA and TCP by a dip-coating technique. Proliferation tests and biofilms formation by *Pseudomonas aeruginosa* have been made on coated TCP and show toxic effects of silver. Proliferation and vitality tests have been also made on MG63 human cells and have allowed to observe a toxic effect. This effect is not suitable in this case because it affects the biocompatibility of the implant. It would, however, be confirmed by other tests with other cell lines.

Keywords :
Bioactive glasses, bioglasses, bioactivity, sol-gel, alkoxides, acetates, Infrared spectroscopy, X-ray diffraction, thermal analysis, dip coating, hydroxyapatite, tricalcium phosphate, biofilms, proliferation vitality.

Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis
Laboratoire des Matériaux Céramiques et Procédés Associés EA2443
Pôle Universitaire de Maubeuge Boulevard Charles de Gaulle 59600 Maubeuge, France