THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Science et Génie des Matériaux

Présentée et soutenue par :

M. MAXIMILIEN DESBORD

le jeudi 5 novembre 2020

Titre :

Elaboration et étude des propriétés physico-chimiques et biologiques de nouveaux matériaux amorphes bioactifs pyro/orthophosphate de calcium

---

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux (CIRIMAT)

Directeur(s) de Thèse :

MME CHRISTELE COMBES

M. JEREMY SOULIE

Rapporteurs :

M. JONATHAN LAO, UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

M. THIBAUD CORADIN, CNRS PARIS

Membre(s) du jury :

Mme CHRISTINE FRANCES, CNRS TOULOUSE, Président

M. JEREMY SOULIE, TOULOUSE INP, Membre

M. LAURENT GREMILLARD, CNRS, Membre

Mme CHRISTELE COMBES, TOULOUSE INP, Membre

M. THIERRY CARDINAL, CNRS, Membre

REMERCIEMENTS :

Pour conclure ce manuscrit de thèse avant que je ne sombre dans une déchéance partielle, je souhaiterais remercier tous les gens qui ont participé, m'ont aidé, m'ont fait avancé dans mes travaux de thèse et ont même rendu ces 3 années rocambolesques.

Dans un premier temps je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir apporté leur correction et toutes leurs critiques qui ont été des plus constructives afin d'améliorer la première version de mon manuscrit.

Jonathan Lao, Maitre de conférence à l'Université de Clermont Auvergne,
Thibaud Coradin, directeur de recherche CNRS
Merci d'avoir rapporté ce long travail et de l'avoir amélioré grâce à votre rapport mais aussi par vos remarques lors de la soutenance. En espérant vous rencontrer physiquement un jour pour échanger encore plus avec vous.

Christine Frances, directrice de recherche CNRS,
Merci de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse et d'avoir été présente physiquement lors de la soutenance. Je tiens également à vous remercier pour l'échange intéressant que nous avons eu sur les procédés de synthèse.

Thierry Cardinal, directeur de recherche CNRS,
Merci pour vos remarques sur les caractérisations par spectroscopie, qui m'ont permis d'attribuer attribuer les vibrations sur les spectres.

Laurent Gremillard, directeur de recherche CNRS,
Merci pour toute la discussion lors de la soutenance mais également de m'avoir fait confiance en m'acceptant au sein du laboratoire MATEIS lors de mon stage de Master 2 et de m'avoir fait découvrir les biomatériaux. C'était avec grand plaisir que j'ai pu te revoir même si ce n'était qu'en visioconférence.

Ensuite je voudrais remercier l'Agence National de la Recherche (ANR-16-CE19-0013, 2017-2021) d'avoir financé ce projet mais surtout mon salaire, c'est-à-dire mon loyer, ma nourriture, mes pintes, mes soirées….

Malgré cette dernière année entachée par l'épidémie de COVID-19, qui m'aura tout de même permis de ne pas avoir besoin de passer le TOEIC, je voudrai dire un grand merci à tout le laboratoire CIRIMAT-ENSIACET pour tout ce que vous m'avez apporté pendant ces 3 années.

En particulier l'équipe PPB, en commençant par mes fabuleux directeurs de thèse qui m'ont fait confiance pour mener à bien ce projet.
Christèle Combes qui m'aura plus appris en 3 ans que tous les enseignants que j'ai pu avoir tout le long de ma scolarité. Tu m'auras transmis un peu de ton exigence qui me manquait avant cette thèse. Malgré cette dernière entachée par le COVID j'ai remarqué que ce virus avait réussi l'exploit de limiter ton addiction au sucre en nous empêchant d'apporter des confiseries.
Jérémy Soulié qui aura réussi à me partager toute son envie et sa passion pour les phosphates. Même si nous ne sommes pas en accord en terme de sport (foot/rugby), c'était un vrai plaisir de travailler avec toi. Toute ta motivation m'aura aidé à ne jamais rien lâcher pendant ces 3 années, et bon courage pour ton HDR.

Merci pour tout ce que vous m'avez apporté et également merci de m'avoir fait découvrir l'Allemagne de l'Est, ses magnifiques forêts, ses fleurs, sa fabuleuse nourriture (couscous au stick de mozzarella, kartoffelsalat, …) mais surtout ses bières.

Je tiens donc à remercier la professeur *Delia Brauer* de m'avoir accueilli au sein de son équipe à l'Université Friedrich-Schiller à Jéna pendant presque 2 mois ; pendant lesquels j'ai pu tester les fours allemands (sans mauvais jeu de mots) et me familiariser avec les techniques de synthèse à hautes températures. Merci à tous les gens que j'ai pu rencontrer là-bas, en particulier *Omar* et *Franziska*.

Cette thèse n'aurait pas pu autant avancer sans les laboratoires partenaires du projet Pyverres. Je tiens à remercier tous les collaborateurs pour avoir partagé leur expertise lors des réunions Pyverres qui se tenaient tous les 6 mois.
Danielle Laurencin et *Joël Chopineau* de l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier,
Christian Bonhomme, Christel Gervais et *Capucine Sassoye* du laboratoire de la matière Condensée de Paris,
Merci à vous d'avoir partagé toutes vos connaissances, même si je n'ai jamais compris l'intégralité d'une de vos discussions sur la RMN ou la modélisation.

Robin Siadoux, Reine Bareille, Alice Leroux et *Joëlle Amédée* du laboratoire BioTis à Bordeaux,
Rebecca Landon et *Fani Anagnostou* du laboratoire B3OA à Paris,
Merci pour toutes les pastilles que vous m'avez faites faire, c'était un grand plaisir de produire autant de comprimés pour les analyses biologiques des matériaux PYG. Merci surtout pour votre disponibilité, pour toutes les fois où je vous ai demandé des conseils sur les aspects biologiques.

Anthony Maçon anciennement de NORAKER à Lyon,
Merci pour ton implication dans le projet, malgré ton emploi du temps chargé, et pour les échanges lors des fameuses réunions Pyverres.

Merci également à tous les étudiants que j'ai encadrés au cours de cette thèse, Marielle, Julie, Valentina, Cécile, Candice, Mathis et Alexandros.

Je tiens maintenant à remercier tous les gens du laboratoire CIRIMAT que j'ai pu côtoyer durant ces 3 années.
Domi et *Caroline* pour toutes les commandes que je leur ai faites passer,
Carole Thouron pour toutes les pastilles que nous avons réalisées,
Cédric Charvillat et *Olivier Marsan* mes voisins de bureau pour toutes leur aide sur les analyses DRX et Raman, c'était « bijou ».

Christophe Drouet, notre chef d'équipe, pour toutes les fois où tu as fait irruption dans notre bureau pour venir grappiller du sucre.

David Grossin, futur chef d'équipe, avec qui j'ai eu la chance de partager quelques TP, merci pour toute ta bonne humeur.

Ghislaine Bertrand, merci pour tout l'enthousiasme que tu as amené à chaque fois que tu rentrais dans le bureau partager un café et pour les repas entre thésards que tu organisais chez toi.

Christian Rey, je tiens à vous remercier pour tout l'apport scientifique que vous avez pu partager avec moi autour d'un délicieux repas du RU et pour le travail de rapporteur que vous avez fait en corrigeant ma thèse. Félicitations pour votre grande médaille CNRS que vous méritez tant par votre gentillesse et votre amour pour la science.

Ensuite je voudrais remercier les thésards et post-docs des équipes MEMO et SURF en particulier *Clémen*t, *Tom, Loïc, André, Pierre, Romain* et *Adrien* pour toutes les soirées que nous avons partagées mais également les week-ends ski et surf.

Un grand merci aux thésard(e)s de l'équipe PPB avec qui j'ai partagé le fameux bureau 1-R1-1. Je sais que ça n'a pas dû être facile tous les jours mais merci d'avoir supporté mes blabla, les chansons de Balavoine, les discussions politico-scientifiques, les débats sportifs, culturels ou les blagues de mauvais goût. Merci de m'avoir écouté même si la plupart du temps vous faisiez semblant.

Laëtitia, première voisine de diagonale, qui a débuté ce projet un an avant moi, permettant à ma thèse d'avancer plus rapidement. Je te souhaite le meilleur pour la suite de tes aventures de jeune maman.

Marine, première voisine de gauche lorsque tu n'étais pas au Québec, un petit peu trop impulsive sur certains sujets (Fanfan), tu t'es beaucoup assagie pendant les 2 ans où l'on a partagé le bureau. Bon courage pour ta carrière et pense à bien garder ton franc-parler.

Camille, premier voisin d'en face, et seul garçon avec qui j'ai partagé le bureau. C'est surtout toi qui m'a accueilli dans l'équipe et surtout qui m'a acclimaté aux autres thésards et post-docs du labo. Tu as été une grande source d'inspiration et j'ai énormément appris pendant ma première année de thèse. Nos commérages sur le chemin du labo, ta bonne humeur au bureau et même les « ta gu*ule » m'ont manqué après cette première année. Alors merci beaucoup maître Jedi.

P*rescillia*, seconde voisine d'en face, j'ai eu peur de me retrouver le seul garçon lorsque tu as remplacé Camille au bureau mais je me suis vite rendu compte que l'on avait beaucoup de points en commun en plus de nos directeurs de thèse (foot, chats, koh lanta, bières…). On en aura bavé avec cette dernière année, mais rédiger en même temps que toi pendant le COVID aura vraiment été une source de motivation.

Ambra, voisine de bureau quand tu passais par le CIRIMAT. Jamais je n'aurais pensé fêter la victoire en coupe du monde avec une italienne après ce qui était arrivé en 2006… Bon courage pour la fin de ta thèse, tête de m*rde.

Merci également aux doctorants PPB de la faculté de pharmacie et en particulier *Clémentine*, avec qui j'ai partagé le plus grand nombre de blagues douteuses ; *Maylis*, collègue du cru PPB 2017, tu en auras un peu bavé durant ta thèse mais c'était toujours un plaisir de te croiser pour ta bonne humeur ; *Thibault* également collègue du cru PPB 2017, qui est devenu mon nouveau dentiste.

Un grand merci à mon colocataire de Saint-Cyprien, *Camille*, avec qui je suis arrivé à Toulouse, et qui m'a permis de m'intégrer à ce nouveau climat sudiste. Tu vas surement faire des jaloux mais tu as été mon meilleur coloc', jamais à faire la bouille, toujours motivé même quand t'étais un peu patraque. Grand défenseur de l'égalitarisme, j'espère que tu trouveras ta voie mon bon vieux Gusgus.

Je remercie bien entendu mes parents, mon frère, toute ma famille pour votre soutien et de m'avoir remotivé lors des confinements. Un merci tout particulier à mamie *Annette* et *Charlie,* car même si la thèse m'a éloigné physiquement de tout le reste de ma famille elle m'a rapproché de vous. Pour tous les week-ends et les vacances passés à la mer pendant ma thèse mais aussi avant, ces soirées à parler, rigoler et un peu trop picoler m'ont prédisposé à réussir mon doctorat.

Et enfin mon plus grand merci pour *Emilie,* je ne te le dis pas assez mais MERCI pour tout. En partageant tous les bons et mauvais côtés de ma thèse avec toi pendant ces 3 années, j'ai réussi à ne pas sombrer dans la folie, même s'il y a eu quelques fantaisies. Merci de m'avoir fait rencontrer des nouveaux amis, de m'avoir fait découvrir Toulouse, Rome, Lisbonne, Barcelone, et même l'Aveyron. Merci de m'avoir presque forcé à prendre un chat qui est devenu mon assistant de confinement et mon petit pote. Merci pour tous ces moments en espérant qu'il y en ait encore abondamment.

à mon fils, ma bataille

INTRODUCTION **1**

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE **5**

I.1. LE TISSU OSSEUX 6
I.1.1. Fonctions et architecture *6*
I.1.2. Les cellules osseuses *8*
I.1.3. Les enzymes *9*
I.1.4. Le remodelage osseux *12*
I.1.5. Maladies ou traumatismes osseux *14*
I.2. LES MATERIAUX DE COMBLEMENT OSSEUX 16
I.2.1. LES MATERIAUX BIOACTIFS 17
I.2.2. Les verres bioactifs *18*
I.2.2.1 Le bioverre de type 45S5 20
I.2.2.2 Les verres phosphates 23
I.2.3. Les phosphates de calcium *24*
I.2.3.1 Les phosphates de calcium cristallisés 25
I.2.3.1.1 Les orthophosphates de calcium cristallisés 26
I.2.3.1.1.1. Les phosphates tricalciques 26
I.2.3.1.1.2. Les apatites phosphocalciques 27
I.2.3.1.2 Les pyrophosphates de calcium cristallisés 29
I.2.3.1.2.1. Les pyrophosphates de calcium anhydres *30*
I.2.3.1.2.2. Les pyrophosphates de calcium dihydratés 30
I.2.3.1.2.3. Le pyrophosphate de calcium tetrahydraté 31
I.2.3.2 Les phosphates de calcium amorphes 32
I.2.3.2.1 Les orthophosphates de calcium amorphes 32
I.2.3.2.2 Les pyrophosphates de calcium amorphes 33
I.2.3.3 Les matériaux amorphes mixtes ortho- et pyrophosphates de calcium 34
I.2.3.3.1 Les matériaux mixtes ortho/pyrophosphate de calcium contenant du potassium 34
I.2.3.3.2 Les matériaux mixtes ortho/pyrophosphate de calcium contenant du sodium 37
I.3. ETUDE DE L'EVOLUTION DE MATERIAUX BIOACTIFS EN MILIEU AQUEUX 44
I.3.1. Evolution en milieu aqueux simple *45*
I.3.2. Evolution en milieux tampons acellulaires : une norme ISO controversée *46*
I.3.3. Evolution en milieu en présence d'enzymes *49*
I.3.4. Tests in vitro cellulaires *50*
I.3.5. Evaluation d'un biomatériau in vivo dans un modèle animal *51*
I.4. OBJECTIFS ET METHODOLOGIE DU TRAVAIL DE THESE 53

CHAPITRE II : ÉLABORATION ET CARACTÉRISATION DES MATÉRIAUX MIXTES ORTHO/PYROPHOSPHATE DE CALCIUM HYDRATÉS **55**

II.1. SYNTHESE ET CARACTERISATION DES MATERIAUX AMORPHES MIXTES ORTHO/PYROPHOSPHATES DE CALCIUM HYDRATES : NaPYG-0X0 56
II.1.1. Choix des matériaux à étudier *56*
II.1.2. Synthèse des matériaux amorphes NaPYG-0X0 ..... *57*
II.1.3. Caractérisation des matériaux amorphes mixtes ortho/pyrophosphates de calcium hydratés NaPYG-0X0 ..... *59*
II.1.3.1 Diffraction des rayons X 60
II.1.3.2 Spectroscopies vibrationnelles FTIR et Raman 60
II.1.3.3 Analyses thermogravimétriques 66
II.1.3.4 Analyses chimiques 67
II.1.3.5 Observations microscopiques 69
II.1.3.6 Mesure de la surface spécifique 70
II.1.4. Discussion sur la synthèse des matériaux NaPYG-0X0 ..... *71*
II.2. ETUDE DE L'EFFET DE CERTAINS PARAMETRES DE SYNTHESE DES NaPYG-0X0 73
II.2.1. Concentration des précurseurs *73*

II.2.2. Volume d'eau de lavage ... *80*
II.2.3. Technique de séchage ... *83*
II.2.4. Influence de la stérilisation des matériaux NaPYG-0X0 ... *86*
II.2.5. ETUDE PRELIMINAIRE DE CHANGEMENT D'ECHELLE POUR LA SYNTHESE DES MATERIAUX NaPYG-0X0 ... 88
II.3. CONCLUSION ... 91

CHAPITRE III : ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DES MATÉRIAUX AMORPHES NaPYG-0X0 DANS DIFFÉRENTS MILIEUX AQUEUX ACELLULAIRES ... 94

III.1. PROTOCOLE D'EVOLUTION ... 96
III.1.1. Préparation des matériaux ... *96*
III.1.2. Immersion des matériaux NaPYG-0X0 en milieu aqueux ... *97*
III.1.3. Séparation des matériaux du milieu aqueux ... *98*
III.2. EVOLUTION DES MATERIAUX NaPYG-0X0 DANS L'EAU ... 100
III.2.1. Evolution des matériaux NaPYG-0X0 dans l'eau ultra-pure ... *100*
III.2.1.1 Caractérisation des matériaux ... 100
III.2.1.1.1 Diffraction des rayons X ... 101
III.2.1.1.2 Spectroscopie Raman ... 103
III.2.1.1.3 Observation microscopique ... 105
III.2.1.2 Caractérisation des milieux ... 107
III.2.1.3 Discussion ... 107
III.2.2. Evolution des matériaux NaPYG-0X0 dans l'eau acidifiée à pH 4 ... *109*
III.2.2.1 Caractérisation des matériaux ... 109
III.2.2.1.1 Diffraction des rayons X ... 110
III.2.2.1.2 Spectroscopie Raman ... 112
III.2.2.1.3 Observation microscopique ... 114
III.2.2.2 Caractérisation des milieux ... 116
III.2.2.2.1 Evolution du pH ... 116
III.2.2.2.2 Dosages chimiques ... 116
III.2.2.3 Discussion ... 117
III.2.3. Evolution des matériaux NaPYG-0X0 dans l'eau acidifiée à pH 2 ... *120*
III.2.3.1 Caractérisation des matériaux ... 120
III.2.3.1.1 Diffraction des rayons X ... 121
III.2.3.1.2 Spectroscopie Raman ... 122
III.2.3.1.3 Observation microscopique ... 124
III.2.3.2 Caractérisation des milieux ... 126
III.2.3.2.1 Evolution du pH ... 126
III.2.3.2.2 Dosages chimiques ... 126
III.2.3.3 Discussion ... 128
III.2.4. Discussion et conclusion sur les évolutions des matériaux NaPYG-0X0 dans l'eau et sur l'effet du pH de la solution ... *130*
III.3. EVOLUTION DES MATERIAUX NaPYG-0X0 DANS DIFFERENTS MILIEUX TAMPON ... 131
III.3.1. Evolution des matériaux NaPYG-0X0 dans le milieu de type solution SBF ... *131*
III.3.1.1 Caractérisation des matériaux ... 133
III.3.1.1.1 Diffraction des rayons X ... 134
III.3.1.1.2 Spectroscopie Raman ... 136
III.3.1.1.3 Observation microscopique ... 138
III.3.1.2 Caractérisation des milieux ... 139
III.3.1.2.1 Evolution du pH ... 139
III.3.1.2.2 Dosages chimiques ... 140
III.3.1.3 Discussion ... 141
III.3.2. Evolution des matériaux NaPYG-0X0 en milieu de culture α-MEM sans cellules ... *143*
III.3.2.1 Caractérisation des matériaux ... 144
III.3.2.1.1 Diffraction des rayons X ... 145
III.3.2.1.2 Spectroscopie Raman ... 147
III.3.2.1.3 Observation microscopique ... 149
III.3.2.2 Caractérisation des milieux ... 151

III.3.2.2.1 Evolution du pH 151
III.3.2.2.2 Dosages chimiques 151
III.3.2.3 Discussion 152
III.4. CONCLUSION SUR LES ETUDES D'EVOLUTION DES MATERIAUX NaPYG-0X0 DANS DIFFERENTS MILIEUX AQUEUX 154

CHAPITRE IV : ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES MATÉRIAUX NaPYG-0X0 157

IV.1. ETUDE DE L'EVOLUTION PHYSICO-CHIMIQUE *IN VITRO* DES MATERIAUX NaPYG-0X0 APRES CONTACT AVEC DES CELLULES OU DES ENZYMES 159
IV.1.1. Evolution de biomatériaux en présence d'enzymes 159
IV.1.1.1 Protocole de l'étude de l'évolution 159
IV.1.1.2 Comparaison des évolutions des matériaux NaPYG-0X0 en présence ou non d'enzymes 160
IV.1.1.2.1 Caractérisation des matériaux 160
IV.1.1.2.1.1. Diffraction des rayons X 161
IV.1.1.2.1.2. Spectroscopie Raman 163
IV.1.1.2.1.3. Observations microscopiques 165
IV.1.1.2.2 Caractérisation des milieux 167
IV.1.1.2.2.1. Evolution du pH 167
IV.1.1.2.2.2. Dosages chimiques 167
IV.1.1.3 Evolution du matériau NaPYG-010 en milieu tampon TRIS en présence d'enzymes en fonction du temps 169
IV.1.1.3.1 Caractérisation des matériaux 169
IV.1.1.3.2 Caractérisation des milieux 171
IV.1.1.4 Discussion sur l'effet de l'enzyme sur les matériaux amorphes 172
IV.1.2. Caractérisations des matériaux NaPYG-010 après contact avec des cellules mésenchymateuses 174
IV.1.2.1 Protocole 175
IV.1.2.2 Résultats 176
IV.2. ETUDES CELLULAIRES *IN VITRO* 179
IV.2.1. Etude de la cytotoxicité et de l'activité métabolique 179
IV.2.1.1 Matériels et méthodes 179
IV.2.1.1.1 Mise en forme des pastilles de NaPYG-0X0 179
IV.2.1.1.2 Protocole des tests de la cytotoxicité et de l'activité métabolique 180
IV.2.1.2 Résultats 180
IV.2.2. Etude de la cytocompatibilité 182
IV.2.2.1 Protocole 182
IV.2.2.2 Résultats 183
IV.3. IMPLANTATIONS *IN VIVO* 185
IV.3.1. Première série d'implantations 185
IV.3.1.1 Matériels et méthodes 185
IV.3.1.2 Résultats 186
IV.3.1.2.2 Caractérisation du tissu et du matériau au 28ème jour 187
IV.3.1.2.2.1. Echantillon sous forme de pastille 188
IV.3.1.2.2.2. Echantillons sous forme de granulés 188
IV.3.2. Seconde série d'implantations 191
IV.4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 193

CHAPITRE V : SYNTHÈSE, CARACTÉRISATION DE LA CANAPHITE-α ET ÉTUDE DE SON ÉVOLUTION DANS DIFFÉRENTS MILIEUX AQUEUX CELLULAIRES/ACELLULAIRES 195

V.1. SYNTHESE ET CARACTERISATION DE LA CANAPHITE-α 197
V.1.1. Synthèse de la canaphite-α 198
V.1.2. Caractérisation de la canaphite-α 198
V.1.2.1 Diffraction des rayons X 198
V.1.2.2 Spectroscopies vibrationnelles FTIR et Raman 199
V.1.2.3 Analyses thermogravimétriques 202

V.1.2.4 Analyses chimiques 202
V.1.2.5 Observations microscopiques 203
V.2. EVOLUTION DE LA CANAPHITE DANS L'EAU ULTRA-PURE ET EFFET DU PH 205
V.2.1. Caractérisation du matériau 205
V.2.1.1 Diffraction des rayons X 206
V.2.1.2 Spectroscopie Raman 208
V.2.1.3 Observation microscopique 209
V.2.2. Caractérisation des milieux 212
V.2.2.1 Evolution du pH 212
V.2.2.2 Dosages chimiques 213
V.2.3. Discussion sur l'effet du pH 214
V.3. EVOLUTION EN MILIEUX TAMPONS 217
V.3.1. Caractérisation des matériaux 217
V.3.1.1 Diffraction des rayons X et spectroscopie Raman 218
V.3.1.2 Observation microscopique 219
V.3.2. Caractérisation des milieux 221
V.3.2.1 Evolution du pH 221
V.3.2.2 Dosages chimiques 221
V.3.3. Discussion 222
V.4. ETUDE DE L'EVOLUTION DE LA CANAPHITE-α EN PRESENCE D'ENZYMES 224
V.4.1. Comparaison de l'évolution de la canaphite-α en milieu tampon TRIS avec et sans enzymes . 224
V.4.1.1 Caractérisation des matériaux 224
V.4.1.1.1 Diffraction des rayons X 225
V.4.1.1.2 Spectroscopie Raman 226
V.4.1.1.3 Observation microscopique 227
V.4.1.2 Caractérisation des milieux 228
V.4.2. Evolution en fonction du temps 229
V.4.2.1 Caractérisation des matériaux 229
V.4.2.2 Caractérisation des milieux 232
V.4.3. Discussion sur l'étude de l'évolution de la canaphite-α en présence de PAL 233
V.5. ETUDES DE LA CYTOTOXICITE ET DE L'ACTIVITE METABOLIQUE DE LA CANAPHITE-α 236
V.6. CONCLUSION 237

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 240

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 244

ANNEXES 253

ANNEXE II.1 : MASSES DES PRECURSEURS POUR LA SYNTHESE DES TROIS COMPOSITIONS DE MATERIAUX NaPYG-0X0 253
ANNEXE II.2 : DESCRIPTION DES TECHNIQUES UTILISEES AFIN DE CARACTERISER LES MATERIAUX NaPYG-0X0 ET DE LA CANAPHITE-α AVANT ET APRES EVOLUTION EN MILIEU AQUEUX 254
ANNEXE II.3 : DESCRIPTION DES TECHNIQUES DE DOSAGES DES MATERIAUX NaPYG-0X0 ET DE LA CANAPHITE-α SYNTHETISES 256
ANNEXE III.1 : DESCRIPTION DES TECHNIQUES DE DOSAGES DES SOLUTIONS DANS LESQUELLES LES MATERIAUX NaPYG-0X0 ET LA CANAPHITE-α ONT EVOLUE. 258
ANNEXE III.2 : LISTE DES EQUILIBRES DE DISSOCIATION DES CPP ET D'ASSOCIATION DES IONS PYROPHOSPHATE ET CALCIUM..... 259
ANNEXE IV.1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DISPOSITIF DE PRESSE POUR LA REALISATION DE PASTILLE..... 260
ANNEXE VI : ETUDE DU COMPORTEMENT PHYSICO-CHIMIQUE DES MATERIAUX NaPYG-0X0 A HAUTES TEMPERATURES..... 261
Synthèse par fusion de matériaux comparables aux NaPYG-0X0..... 261
Protocole 261
Résultats 264
Etude des matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 à hautes températures..... 265

Table des abréviations :

ACP : Phosphate de calcium amorphe

AMP : Adénosine monophosphate

ATG : Analyse thermogravimétrique

ATP : Adénosine triphosphate

BET : Théorie Brunauer, Emmett et Teller

BMP : Protéine osseuse morphogénétique

CPP : pyrophosphate de calcium

DRX : diffraction des rayons X

ENPP : Ectonucleotide pyrophosphatase

FTIR : Infrarouge à transformée de Fourier

HAC : Hydroxyapatite carbonatée

hBMSC : Human bone marrow stromal cells

mCPPD : Pyrophosphate de calcium dihydraté monoclinique

mCPPT-β : Pyrophosphate de calcium tétrahydraté monoclinique

MEB : Microscope électronique à balayage

MEM : Milieu essentiel minimum

MET : Microscope électronique à transmission

NaPYG : Matériau amorphe mixte ortho/pyrophosphate de sodium

NTP-PPase : Nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase

OCN : Ostéocalcine

OPG : Ostéoprotégérine

OPN : Ostéopontine

PAL : Phosphatase alcaline

PMMA : Poly(méthacrylate de méthyle)

PTH : Hormone parathyroïdienne

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RT-qPCR : Reverse transcriptase polymerase chain reaction

RunX2 : Runt-related transcription factor 2

SAXS : Diffusion des rayons X aux petits angles

Table des abréviations :

SBF : Simulated Body fluid

TCP : Phosphate tricalcique

tCPPD : Pyrophosphate de calcium dihydraté triclinique

TEOS : Orthosilicate de tétraéthyle

TEP : Triéthyl phosphate

TGF-β : Facteur de croissance transformant bêta

TRIS : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

U : Unité enzymatique

INTRODUCTION

Suite à un traumatisme telle une fracture ou dans le cadre de certaines pathologies osseuses, un défaut osseux de taille critique peut se former. Dans ce cas, bien qu'ayant la capacité d'auto-cicatrisation, le tissu osseux ne pourra se régénérer tout seul et une greffe osseuse sera nécessaire. Les greffes autologues requièrent un prélèvement osseux et donc une intervention chirurgicale supplémentaire pouvant entraîner des douleurs, des risques d'hémorragie ou d'infections pour le patient. De plus, la quantité d'os disponible pour le prélèvement peut être insuffisante. Des substituts osseux synthétiques sont donc développés afin de pallier à ces limites.

Les phosphates de calcium amorphes et les matériaux de type bioverre ont déjà été largement étudiés pour la substitution osseuse en raison de leur métastabilité qui leur confère une bioactivité *in vitro* et *in vivo*. En effet, cette dernière alliée à une composition chimique adéquate, leur confère la capacité de libérer des ions biologiquement actifs et/ou de générer des réactions de dissolution/précipitation conduisant à la formation d'apatite (notamment à leur surface), ce qui améliore l'intégration de ces biomatériaux au tissu osseux et plus largement leurs propriétés biologiques. Parmi eux, les phosphates de calcium amorphes sont attractifs en raison de leur similitude de composition avec le minéral osseux et de leur implication en tant que précurseur de l'apatite du minéral osseux. Deux familles de biomatériaux amorphes à base de phosphates sont principalement décrites dans la littérature pour les applications de substitution osseuse : les verres à base de phosphates qui sont généralement synthétisés par fusion et les phosphates de calcium amorphes synthétisés à basse température. La plupart du temps, ces derniers matériaux sont basés sur l'association d'ions calcium avec des ions orthophosphate ou plus marginalement avec des ions pyrophosphate. Récemment, la possibilité d'associer ces deux types de phosphates dans un même matériau amorphe synthétisé à basse température a été démontrée au CIRIMAT. Pour cette nouvelle famille de matériaux, le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates peut être contrôlé dans le solide via une synthèse réalisée à basse température dans l'eau et avec des précurseurs ioniques (chlorure de calcium et sels de phosphates de sodium). Actuellement, la description de ces matériaux est basée sur l'existence de clusters d'ortho / pyrophosphates de calcium dont la

cohésion serait assurée par des molécules d'eau et des cations de sodium inter-clusters. Ces solides peuvent être élaborés avec une large gamme de rapports ortho / (ortho + pyro) phosphates et sont représentés par la formule chimique suivante :

$$[(Ca^{2+}_{y}Na^{+}_{z}H^{+}_{3+x-2y-z})\ (PO_4^{3-})_{1-x}\ (P_2O_7^{4-})_{x}]\ (H_2O)u$$

Cette famille de matériaux est particulièrement intéressante pour la substitution osseuse pour plusieurs raisons. En effet, elle contient du calcium et des phosphates sous forme d'orthophosphate, brique élémentaire de l'apatite osseuse, et également de pyrophosphate dont l'intérêt en tant que biomatériaux a été largement démontré par des tests acellulaires et cellulaires *in vitro* et des études d'implantation *in vivo.* Sur la base de ces résultats décrits dans la littérature, le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates ajustable dans ces matériaux pourrait permettre de contrôler leur comportement biologique. En effet, le pyrophosphate est connu pour être hydrolysé en ions orthophosphate *in vivo* et *in vitro* par des enzymes (phosphatase alcaline par exemple) et/ou dans des milieux acides typiques d'une réaction inflammatoire post-opératoire.

Outre la nouveauté de ces matériaux amorphes mixtes d'ortho- et pyrophosphates de calcium hydratés, leur évolution en milieu aqueux n'a jamais été étudiée, alors que cette première étape est cruciale afin de prévoir leur comportement potentiel une fois implantés. En effet, l'étude des ions libérés en solution, combinée à la caractérisation du solide résultant est essentielle pour comprendre le mécanisme de dégradation physico-chimique et, le cas échéant, le comportement « bioactif » ultérieur du matériau dans un environnement physiologique. De plus, ces données permettraient d'élaborer les compositions de matériaux « à façon » permettant d'induire une réponse biologique spécifique et de cibler ainsi une application biomédicale.

Les objectifs de cette thèse sont, dans un premier temps, d'étudier l'évolution physico-chimique de cette nouvelle famille de matériaux amorphes mixtes d'ortho et pyrophosphate de calcium contenant du sodium appelés NaPYG afin de comprendre leurs mécanismes de dégradation et de déterminer si la composition, et notamment le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates du matériau, est un paramètre-clé contrôlant l'évolution *in vitro* et *in vivo* de ces matériaux. Pour cela, l'évolution de trois compositions de matériaux NaPYG amorphes contenant des proportions graduelles d'orthophosphate ont été étudiées dans des milieux aqueux de plus en plus complexes. Puis, leur biocompatibilité avec des cellules mésenchymateuses ainsi que leur capacité à induire la formation d'un tissu osseux ont été étudiés *via* des tests cellulaires *in vitro* et des implantations *in vivo* chez le petit animal. Au-delà de ces matériaux amorphes, au cœur de ces travaux de thèse, la composition extrême de cette nouvelle famille de matériaux composée uniquement de pyrophosphate s'est révélée conduire à une phase cristalline, la canaphite ($CaNa_2P_2O_7.4H_2O$). Un autre objectif a été donc d'étudier pour la première fois le comportement physico-chimique et biologique *in vitro* de cette phase pour examiner son potentiel en tant que

matériau de substitution osseux bioactif. Enfin, la thèse étant menée en vue d'envisager un potentiel développement industriel de cette famille de matériaux, ainsi leur capacité de reconstruction osseuse *in vivo* sera comparée à celle du substitut osseux de type bioverre le plus vendu sur le marché : le bioverre 45S5.

Ces travaux de thèse font partie du projet ANR PyVerres (ANR-16-CE19-0013) coordonné par le CIRIMAT et réunissant cinq laboratoires français ainsi qu'une PME aux expertises complémentaires. Dans le cadre de ce projet, le laboratoire CIRIMAT a été chargé de la synthèse et de l'évaluation physico-chimique des matériaux, le laboratoire BioTis a réalisé les études *in vitro* cellulaires et le laboratoire B3OA a quant à lui effectué l'étude sur un modèle animal. Dans ce contexte et afin de répondre aux problématiques soulevées dans les paragraphes précédents, ce document est divisé en six chapitres.

Le premier chapitre est une revue bibliographique qui reviendra sur la composition et les fonctions du tissu osseux, puis se focalisera sur une description des matériaux cristallisés et amorphes composés de phosphates de calcium utilisés pour la substitution osseuse. Une revue des voies d'évaluation des propriétés (principalement leur évolution au cours du temps) de ces matériaux dans des milieux aqueux acellulaires et cellulaires sera ensuite précisée. Enfin, les objectifs ainsi que la méthodologie du travail de thèse seront présentés.

Dans un second chapitre, la synthèse de cette nouvelle famille de biomatériaux sera décrite puis la caractérisation complète de ces matériaux initiaux sera présentée. Dans l'optique d'un transfert industriel, différents paramètres du protocole de synthèse seront étudiés afin d'optimiser le rendement massique de matériau obtenu.

Les évolutions physico-chimiques des matériaux amorphes en interaction avec plusieurs milieux aqueux acellulaires seront examinées et discutées dans le chapitre III alors que leur évolution en présence d'enzymes ou de cellules ainsi que leurs propriétés biologiques seront analysées dans le chapitre IV. Ce chapitre présentera également les premières séries d'implantations *in vivo* dans des rats.

Le chapitre V présentera une méthode originale de synthèse de la phase canaphite-α, ainsi que ces caractérisations complètes. L'étude de son évolution physico-chimique et de ses propriétés biologiques sera également décrite.

Et enfin le chapitre VI, traitera d'études préliminaires menées en vue de potentielles perspectives autour des matériaux amorphes NaPYG-0X0. Ainsi une synthèse à plus grande échelle et une étude préliminaire de leur comportement à hautes températures seront introduites.

Les techniques de caractérisations des matériaux et des milieux aqueux dans lesquelles ils ont évolué seront détaillées en annexes.

Chapitre I : **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

Ce premier chapitre introduit dans un premier temps le rôle et la composition du tissu osseux correspondant à l'environnement avec lequel le substitut osseux va échanger une fois implanté. Puis, certains matériaux de comblement osseux sont décrits en commençant par définir la bioactivité. L'importance d'étudier l'évolution *in vitro* de ces substituts en milieu aqueux est ensuite explicitée, et enfin les objectifs ainsi que la méthodologie adoptée pour cette thèse sont exposés.

I.1. Le tissu osseux

I.1.1. Fonctions et architecture

L'os est un tissu conjonctif qui a notamment un rôle de soutien mécanique de l'organisme et de protection des organes, comme la boîte crânienne qui protège le cerveau par exemple. De plus, il présente d'autres fonctions indispensables au bon fonctionnement du corps. Il permet le mouvement par le biais des articulations et joue également un rôle métabolique, puisqu'il contribue au maintien de l'équilibre phosphocalcique dans les flux sanguins. Le tissu osseux est un réservoir d'ions minéraux. Il contient 99% du calcium, 90% du phosphore, 80% des carbonates et 50% du magnésium de l'organisme[1]. Enfin, le tissu osseux joue un rôle hématopoïétique, c'est-à-dire que les cellules sanguines (globules rouges, globules blancs et plaquettes) sont produites dans l'os, plus précisément dans la moelle osseuse rouge.

Le squelette humain comporte 206 os qui peuvent être classés selon leur morphologie. On peut ainsi distinguer les os longs (par exemple, le fémur), courts (par exemple, os du pied ou de la main), plats (par exemple, l'omoplate) et irréguliers (par exemple, les vertèbres). Le tissu osseux est composé d'une partie compacte que l'on retrouve en périphérie de la moelle osseuse et des os en général (Figure I.1)[2], appelée os cortical. Sa structure lamellaire lui confère une densité et une dureté qui lui permettent de résister aux principales contraintes mécaniques que subit notre corps (valeur maximale de contrainte subie par l'os cortical : 150 MPa)[3]. Les lamelles osseuses entourent le canal de Havers, cavité accueillant les vaisseaux sanguins et les fibres nerveuses, et cet ensemble forme une structure appelée ostéon. L'os cortical représente 80% de la masse osseuse du corps humain[4]. Les 20% restant du tissu osseux sont composés de l'os spongieux ou trabéculaire, situé principalement dans les os courts et dans les extrémités ou épiphyses, des os longs. Il tient son nom des lamelles osseuses qui le constituent, appelées trabécules. Ses lamelles sont arrangées en travées de 150 µm de diamètre, lui conférant une architecture d'éponge. Il résistera donc moins aux contraintes mécaniques (valeur maximale de contrainte subie par l'os trabéculaire : 7 MPa)[3]. L'os trabéculaire est entouré de tissu adipeux et de plasma sanguin, ce qui va lui permettre d'être une surface d'échange en nutriments avec les liquides interstitiels.

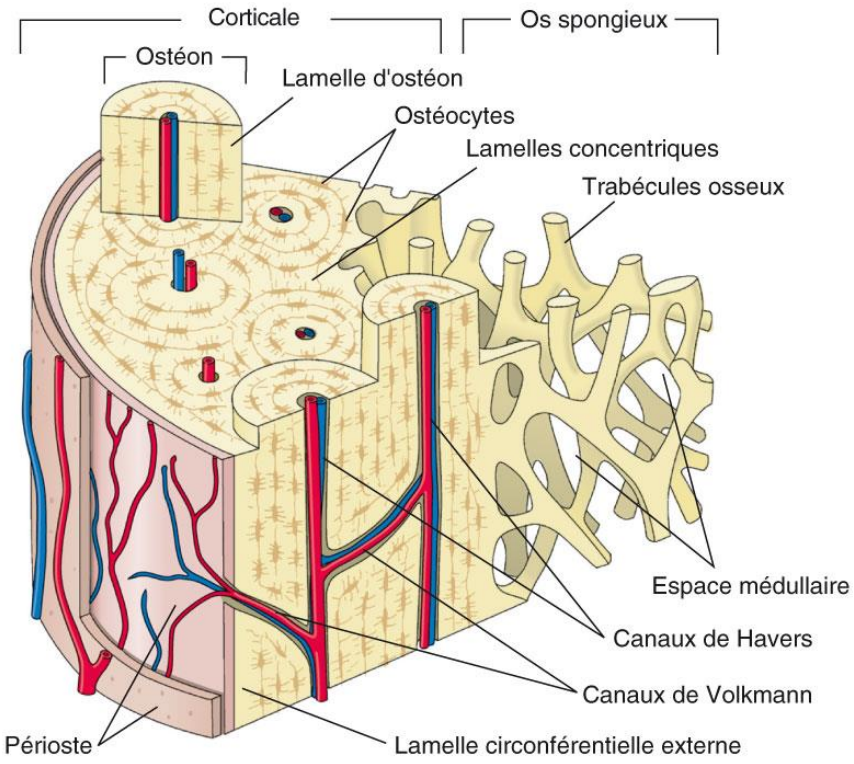


Figure I.1 : Schéma en coupe montrant la structure et la composition d'un os long

Le tissu osseux est un tissu complexe composé d'une substance organique minéralisée. La matrice organique fibreuse est formée en grande partie (95%) de collagène de type I associé à des protéines non collagéniques (ostéocalcine, protéoglycane…), dont le rôle est de réguler la minéralisation et la croissance osseuse. Le collagène est une glycoprotéine structurée en triple hélice. Il est organisé en fibres parallèles sur plusieurs couches, chacune possédant sa propre orientation. Cette organisation confère à l'os sa grande résistance à la rupture. Longitudinalement, les fibres sont séparées par un espace de 40 nm et décalés de 67 nm, ce qui va créer des espaces qui sont le lieu de la germination des cristaux de minéral osseux lors de la minéralisation[5].

Des cristaux nanométriques de phosphate de calcium de structure apatitique constituent la phase minérale de l'os. Ils ont une structure hexagonale allongée selon l'axe c, formant des plaquettes, ce qui participe à assurer la rigidité de la matrice osseuse. Les apatites biologiques sont non-stœchiométriques[6] et présentent une couche hydratée à la surface des nanocristaux. Cette non-stœchiométrie est due à la substitution partielle des ions PO_4^{3-} par des ions bivalents tels que CO_3^{2-} ou HPO_4^{2-}. Cette perte de charge négative est compensée par la présence de lacunes en ions calcium et hydroxyde. La formule générale de l'apatite biologique peut s'écrire[7] :

$$Ca_{10-x}(PO_4)_{6-x}(HPO_4,CO_3)_x(OH)_{2-x}$$

La grande réactivité des cristaux d'apatite provient de sa couche hydratée identifiée à leur surface (Figure I.2)[8], contenant des ions bivalents labiles (Ca^{2+}, HPO_4^{2-}, CO_3^{2-}) qui vont favoriser les échanges ioniques avec les fluides biologiques adjacents[9].

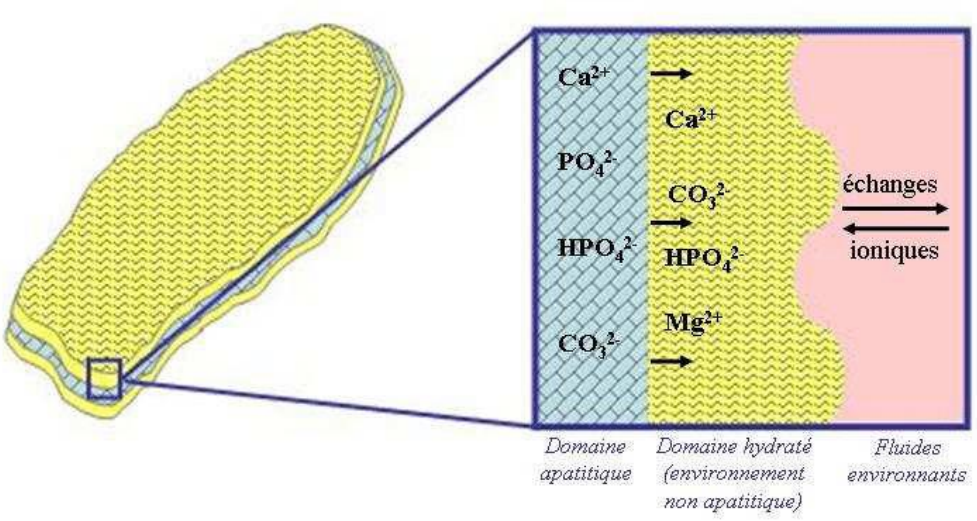


Figure I.2 : Représentation schématique des nanocristaux d'apatites biologiques incluant la couche hydratée à la surface du nanocristal (à gauche) qui est le lieu d'échanges avec les fluides environnants (agrandissement à droite).

La minéralisation de la matrice osseuse n'est possible que par l'intervention de cellules osseuses et de protéines présentes dans celle-ci.

I.1.2. Les cellules osseuses

Les cellules osseuses ont pour origine la moelle osseuse et sont impliquées dans le phénomène de remodelage osseux qui sera décrit plus tard dans ce chapitre (chap.I.1.4). On distingue 3 types de cellules :

- Les ostéoclastes, qui sont des cellules volumineuses (d'environ 100 µm de diamètre) poly-nucléées responsables de la résorption osseuse. Elles ont pour précurseurs des cellules de la lignée monocytaire[10], qui, au contact des cellules pré-ostéoblastiques vont se différencier en pré-ostéoclastes mono-nucléés. Par la suite, les pré-ostéoclastes vont fusionner entre eux pour former un ostéoclaste mature multinucléé. Les ostéoclastes possèdent une pompe à protons qui leur permettra de dissoudre la phase minérale de l'os.

- Les ostéocytes sont des cellules ostéoblastiques emmurées dans la matrice osseuse suite à sa formation. Ils sont reliés entre eux et aux cellules bordantes aplaties (ostéoblastes peu actifs) par un réseau de canalicules cheminant à travers la matrice osseuse. Ce réseau assure la circulation d'ions ou d'hormones.

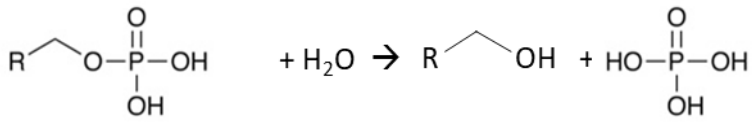
- Les ostéoblastes sont des cellules mono-nucléées d'environ 20 µm de diamètre qui contribuent à la synthèse de la matrice organique de l'os, l'ostéoïde, et participent ensuite à sa minéralisation. Ils ont pour origine les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse. Les ostéoblastes régulent le remodelage osseux directement par le biais d'enzymes protéolytiques (phosphatase alcaline) et indirectement par des facteurs agissant sur les ostéoclastes.

I.1.3. Les enzymes

Les enzymes sont des protéines compactes stabilisées par de nombreuses liaisons chimiques (hydrogène, ioniques, pont disulfure). Elles sont constituées d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques formant des chaînes polypeptidiques pouvant prendre la forme de feuillets, d'hélices, de coudes ou de tonneaux. Le rôle des protéines est multiple : elles peuvent assurer un rôle structurel dans les tissus, comme le collagène par exemple, ou réguler l'expression des gènes mais aussi catalyser des réactions biologiques, c'est-à-dire augmenter la vitesse d'une réaction, tout en étant régénérées à la fin de celle-ci. C'est à ce dernier groupe qu'appartiennent les enzymes. Elles agissent à faible concentration et chaque enzyme est spécifique à une réaction biochimique grâce à son site actif. Le site actif permet à l'enzyme de se fixer sur son substrat, puis d'interagir avec lui. L'enzyme est aussi composée de cofacteurs, qui ont pour rôle de stabiliser la structure de l'enzyme ou de la fixer sur le substrat. Les cofacteurs sont des composés non-protéiques classés en 2 familles : des coenzymes ou des ions métalliques. Les enzymes ont des rôles biologiques très variés, elles interviennent lors de la digestion en dégradant des macromolécules issues de l'alimentation en petites molécules (acides aminés) pour qu'elles soient absorbées par le métabolisme. On y retrouve des enzymes appelées peptidases ou amylases. Nous nous intéresserons par la suite aux enzymes intervenant au niveau du tissu osseux.

Lors de la minéralisation de la matrice osseuse, les ostéoblastes vont exprimer l'enzyme phosphatase alcaline (PAL). C'est une glycoprotéine produite par le foie, les reins, les intestins, le placenta et les os sous forme d'iso-enzyme. C'est-à-dire qu'on retrouve dans tous ces tissus une enzyme qui va catalyser la même réaction (I.1) :

monoester de phosphate + H_2O ↔ alcool + phosphate (Equation I.1)



Malgré ce point commun, ces iso-enzymes possèdent une forme structurale différente en fonction de leur origine spécifique au tissu ; par exemple certains gènes (appelé L, B et K) ont une longueur plus petite pour la phosphatase alcaline intestinale que celle des gènes de la phosphatase alcaline non spécifique[11]. Elles peuvent aussi avoir des propriétés physico-chimiques différentes, ainsi les PAL intestinales deviennent inactives lorsque la température dépasse 65°C alors que les PAL placentaire sont thermodynamiquement très stables[12].

La phosphatase alcaline osseuse est localisée dans la membrane plasmique des ostéoblastes, liée par un pont phospho-glucidique. Sa fonction n'est pas encore parfaitement définie mais elle a un rôle clé dans la minéralisation de l'os. En plus de sa capacité à cliver les liaisons P-O-P, elle pourrait transporter le calcium ou le phosphate inorganique. On retrouve ainsi une activité plus élevée de cette enzyme dans les zones de fracture nouvellement calcifiées que dans l'os au repos[13]. Par la suite la phosphatase alcaline est libérée dans la matrice extra-cellulaire et on utilise sa concentration sérique comme marqueur de l'activité ostéoblastique[14].

Des études plus précises ont pu être menées sur des cellules bactériennes de type *Escherichia Coli*, qui possèdent aussi une phosphatase alcaline formée de deux macromolécules contenant chacune 429 acides aminés[15]. L'enzyme de *E. Coli* a des propriétés catalytiques similaires, un profil de pH similaire, c'est-à-dire que son activité est optimale lorsque le pH est basique (pH > 8) et elle forme le même intermédiaire phosphosérine que l'enzyme intestinale[16]. On retrouve en son centre actif, les cofacteurs, sous la forme de 3 ions métalliques (2 ions Zn^{2+} et un ion Mg^{2+}) (Figure I.3)[17].

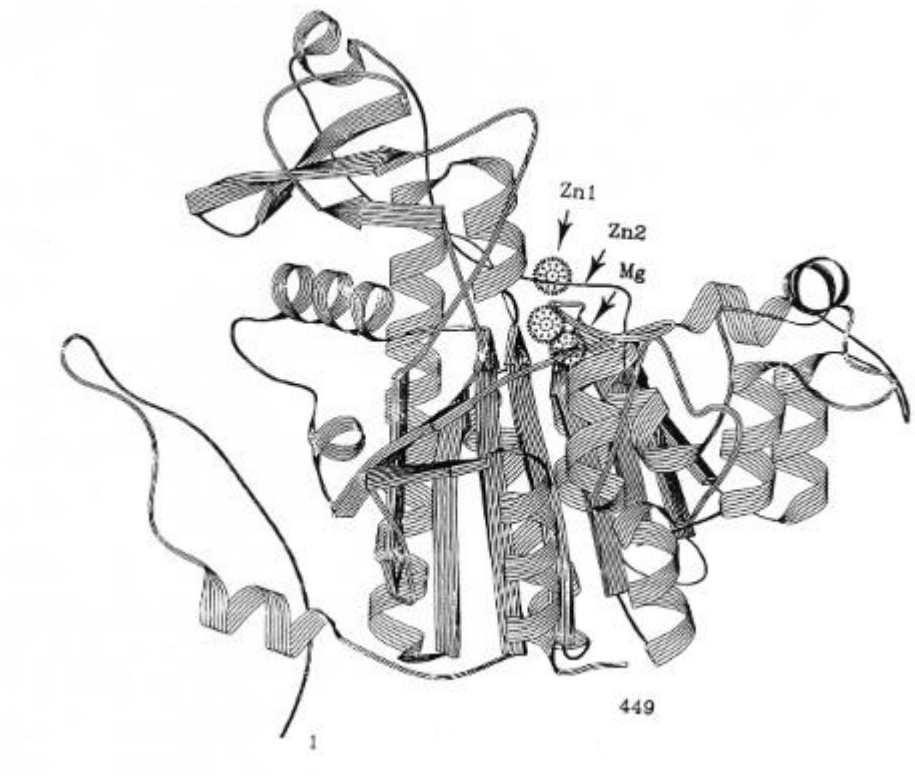


Figure I.3 : Diagramme en ruban du monomère de la phosphatase alcaline *de E. Coli.* Le centre du monomère est constitué de 15 hélices de longueurs variables et d'un film de 8 feuilles à 10 brins.

Dans une review Coleman et al.[18] ont proposé un mécanisme pour expliquer la déphosphorylation d'un monoester de phosphate (Equation I.1), dans lequel les ions métalliques Zn^{2+} serviraient à fixer l'enzyme au phosphate avec l'acide aminé S102 (sérine) et la base nucléique R166 (guanine) du site actif de l'enzyme. Suite à un enchaînement de substitutions nucléophiles se déroulant à pH alcalin, l'enzyme hydrolyse l'ester de phosphate en libérant du phosphate inorganique.

Toutefois, le mécanisme de cette réaction et le rôle spécifique de la phosphatase alcaline dans la minéralisation osseuse est toujours à l'étude[19].

Lors de la résorption osseuse les ostéoclastes vont aussi secréter diverses enzymes comme la cathepsine K ou la phosphatase acide tartrate résistante qui vont dégrader la matrice organique à pH acide, en digérant les constituants organiques de la matrice extra-cellulaire[20].

I.1.4. Le remodelage osseux

Afin de conserver ses propriétés mécaniques, de réparer les micro-dommages osseux et de réguler l'équilibre minéral, la matrice osseuse se renouvelle continuellement. Ce remodelage fait intervenir les ostéoclastes qui vont résorber la matrice et les ostéoblastes qui vont reformer l'os. Une séquence de remodelage dure environ 3 mois chez l'homme adulte, et il est plus fréquent pour l'os trabéculaire que pour l'os cortical[4].

Le processus de remodelage osseux peut être décrit en 5 étapes[20] et sont présentées sur la figure I.4 :

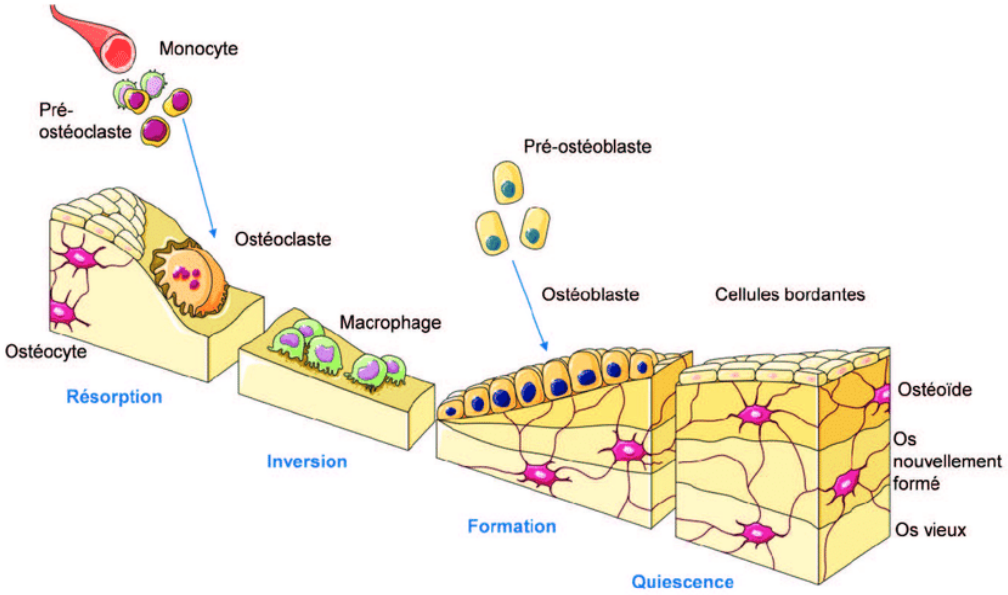


Figure I.4 : Représentation schématique d'un cycle de remodelage osseux [Servier® Medical Art https://creativecommons.org/licenses]

- Phase d'activation : les cellules bordantes recouvrant la surface osseuse se rétractent, alors que les pré-ostéoclastes migrent vers la zone ciblée et fusionnent pour donner un ostéoclaste mature. L'ostéoclaste s'attache ensuite à la surface osseuse par son pôle apical où se situe la bordure en brosse, grâce à des intégrines.
- Phase de résorption : L'ostéoclaste forme un micro-compartiment entre la matrice osseuse et lui-même, qu'il acidifie à pH 5 grâce à sa pompe à protons[21]. La matrice minérale va alors se dissoudre. L'ostéoclaste libère ensuite des enzymes (cathepsines, hydrolases) à travers sa bordure en brosse, qui vont dégrader la structure organique de la matrice. Suite à la création de

cette lacune osseuse, l'ostéoclaste se déplace le long de la surface osseuse, afin de créer une succession de lacunes. La phase de résorption est présentée sur la figure I.5.

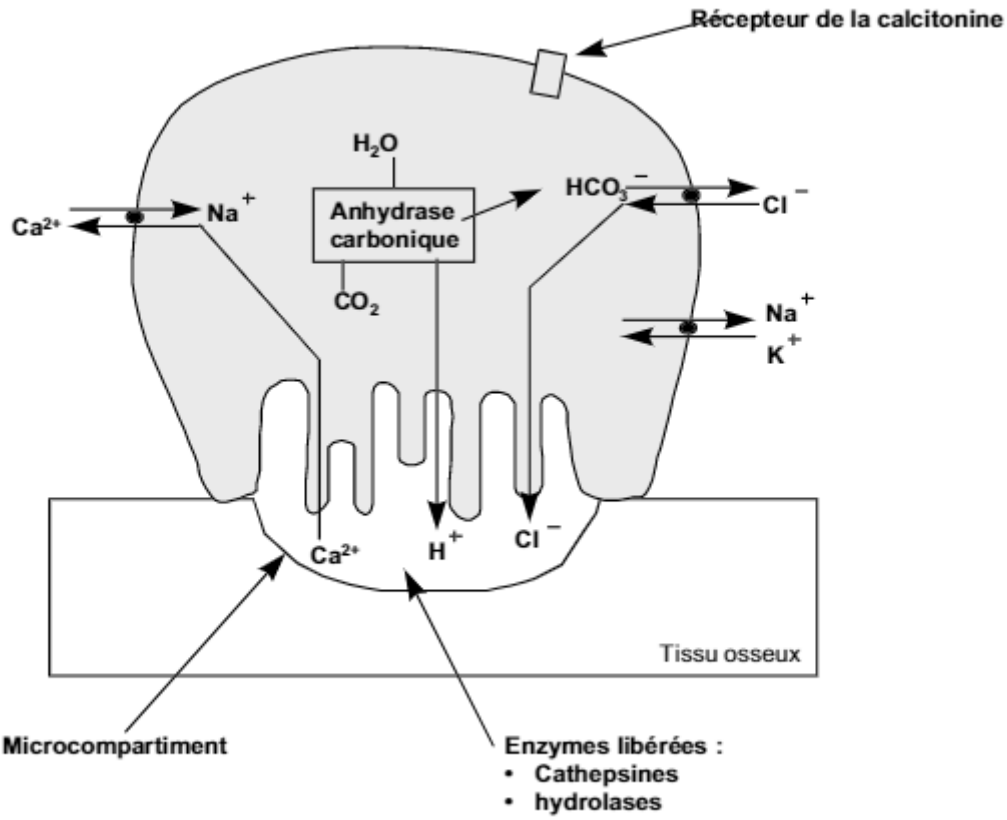


Figure I.5 : Schéma d'un ostéoclaste au moment de la phase de résorption lors d'une séquence du remodelage osseux [Guidicelli-1998]

- Phase d'inversion : La dégradation de la partie minérale de l'os entraîne une augmentation de la concentration de calcium dans la lacune de résorption. Ce calcium est absorbé par l'ostéoclaste, ce qui va désorganiser et donc mettre fin aux phénomènes d'adhésion de la cellule. De plus, les pré-ostéoblastes vont être attirés au niveau de la lacune par des facteurs de croissance libérés par les ostéoclastes. Ils se différencient ensuite en ostéoblastes matures.
- Phase de formation : les ostéoblastes vont proliférer et combler la lacune en apposant de l'os non calcifié (ostéoïde). En formant la nouvelle matrice, des ostéoblastes vont rester piégés dans cette matrice ; on les appelle les ostéocytes.
- Phase de quiescence : les ostéoblastes finalisent la minéralisation, puis deviennent inactifs, sous forme de cellules bordantes. Ces cellules font barrière aux ostéoclastes.

Ce remodelage osseux est modulé par différents facteurs hormonaux, des facteurs locaux et par l'effet des contraintes mécaniques qui conduisent le tissu osseux à s'adapter à ces sollicitations.

- Facteurs hormonaux : Les hormones exerçant le plus de contrôle sur l'ostéoformation sont l'hormone parathyroïdienne (PTH), les œstrogènes et la vitamine D^{20}.
- Facteurs locaux : Ils sont produits principalement par les ostéoblastes et s'incorporent dans la matrice osseuse.
  - Le TGFβ est un facteur de croissance stimulant la formation osseuse. Il inhibe la formation ou induit l'apoptose des ostéoclastes en augmentant la production en ostéoprotégérine (OPG). Il stimule aussi la production de collagène de type I.
  - Les protéines BMPs (bone morphogenetic proteins) appartiennent à la famille des TGFβ. Elles ont des propriétés ostéoinductrices, en stimulant l'expression de la phosphatase alcaline ou du collagène de type I dans les ostéoblastes.
  - Le système RANK-ligand (receptor activator of nuclear factor-κB ligand*)* / RANK / OPG est le médiateur de la communication intercellulaire entre ostéoblastes et ostéoclastes. RANKL est une protéine transmembranaire, qui, en activant le récepteur RANK exprimé par les ostéoclastes, stimule leur différenciation, leur maturation et inhibe leur apoptose. L'OPG est une glycoprotéine soluble produite par les ostéoblastes et présente dans le milieu extracellulaire. Elle agit comme récepteur piège de RANKL et inhibe son effet. OPG et RANKL ont donc des effets opposés sur la formation des ostéoclastes.

Au cours de la croissance des vertébrés et des humains en particulier, la quantité de matrice osseuse créée est plus élevée que celle résorbée. Puis dans des conditions ordinaires, la quantité d'os formé équivaut à la quantité d'os résorbé. Cet équilibre est ensuite déstabilisé à la faveur d'une perte de masse osseuse lors du vieillissement ou suite à certaines pathologies ou traumatismes accidentels.

I.1.5. Maladies ou traumatismes osseux

Le processus de remodelage osseux permet à l'os de s'auto-réparer en cas de traumatisme. Ainsi, suite à une fracture par exemple, un réalignement et un maintien du membre cassé peuvent suffire pour que l'os se répare en produisant un nouveau tissu. Malheureusement, dans certains cas ce traitement ne permet pas de combler le défaut osseux. Le défaut est alors défini comme critique, c'est-à-dire que le tissu osseux est incapable de se réparer spontanément. On observe ce problème suite à des traumatismes accidentels ou à des opérations chirurgicales, telles que

l'ablation d'une tumeur osseuse générant des défauts de grande taille ou encore dans le cadre de certaines pathologies.

En effet, le remodelage peut aussi connaître un déséquilibre. Par exemple, les ostéoclastes vont dégrader plus que ce que les ostéoblastes ne peuvent reconstruire, ce qui va entraîner une perte de masse osseuse. Ce déséquilibre est associé à plusieurs pathologies osseuses, notamment l'ostéoporose illustrée sur la figure I.6[22], qui est la maladie osseuse la plus courante survenant le plus souvent après la ménopause[23]. Elle a pour cause une carence en œstrogène qui est un modulateur du remodelage osseux. La perte osseuse fragilise l'os et conduit à une augmentation du risque de fractures.

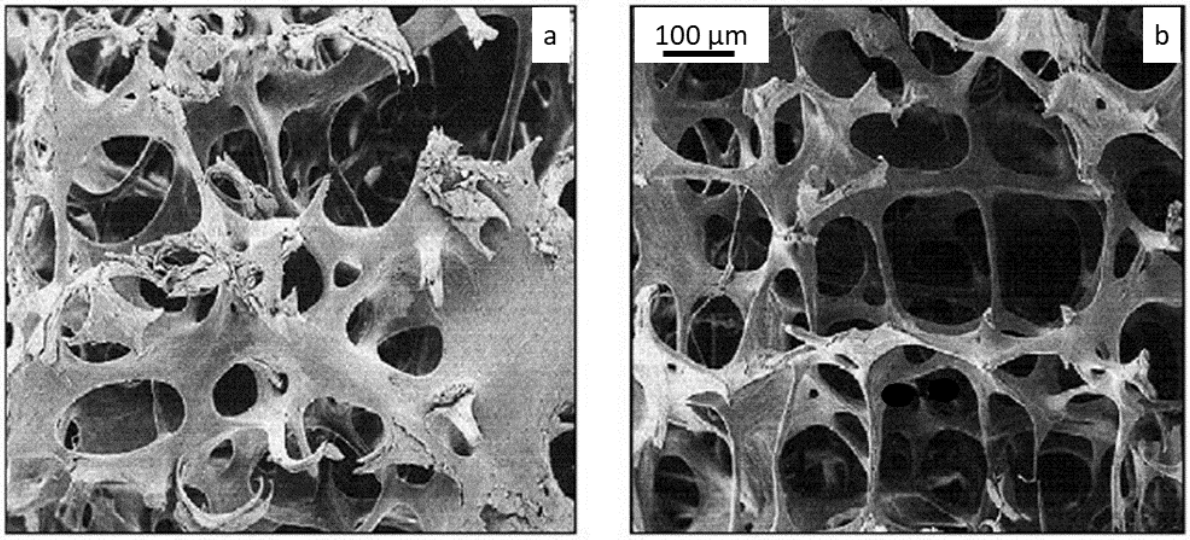


Figure I.6 : Image MEB de l'architecture d'un os normal (a) et celle d'un os ostéoporotique (b)[21]

Un remodelage anarchique peut causer d'autres maladies osseuses comme la maladie de Paget[22] correspondant à une dystrophie osseuse, se traduisant par un remodelage excessif et accéléré. Cette pathologie engendre la déformation des os et des douleurs osseuses. Par ailleurs, lors de la pose d'un implant dentaire, il peut arriver que la quantité de substance osseuse de la mandibule soit insuffisante pour assurer un ancrage mécanique satisfaisant de l'implant dans l'os mandibulaire. Ce déficit en tissu osseux ne pourra pas être compensé seulement par le remodelage naturel.

Comme évoqué, le remodelage osseux octroie à l'os de nombreuses fonctionnalités, dont celle de s'auto-réparer. Cependant, suite aux différents exemples mentionnés plus haut, lorsque le défaut est de taille critique, il est nécessaire d'utiliser un matériau de comblement pour aider l'os à se reformer en apportant un support mécanique et une cicatrisation osseuse.

I.2. Les matériaux de comblement osseux

Lorsqu'il y a une déficience osseuse de taille supérieure au défaut critique et que la capacité auto-réparatrice du tissu osseux ne suffit pas, la greffe constitue le traitement de référence. De nos jours, plus de 2 millions de greffes osseuses sont réalisées dans le monde chaque année[24]. Il existe différents types de greffes :

- La xénogreffe : entre individus d'espèces différentes (porc ou bœuf principalement)[25]
- L'allogreffe : entre individus différents mais d'une même espèce[26]
- L'autogreffe : issu d'un même individu[27]

Les xénogreffes et les allogreffes sont peu courantes à cause du risque de transmission d'agents pathogènes. Les greffes osseuses se résument principalement aux autogreffes. Toutefois elles ne sont possibles que lorsqu'il y a assez de tissu osseux disponible sur le site donneur, dont le plus courant est la crête iliaque[28], et peuvent provoquer d'importantes douleurs chez le patient qui doit subir deux interventions (prélèvement sur le site donneur et implantation sur le site receveur). De plus, le nombre de chirurgies osseuses (orthopédique, traumatologique et dentaire) ne cesse d'augmenter en raison du vieillissement de la population. C'est donc dans le but de trouver une alternative aux greffes que les substituts osseux d'origine synthétique se sont développés. Ils ont pour avantages de ne présenter aucun risque de transmission de maladies, de limiter la morbidité liée au prélèvement autologue et d'adapter leurs propriétés pour l'application clinique ciblée.

Les biomatériaux peuvent être classés en fonction de leur interaction avec le tissu osseux :

- Les matériaux biotolérés (par exemple l'acier inoxydable) ne forme pas de liaison avec le tissu osseux et entraîne une encapsulation fibreuse, c'est-à-dire que les fibroblastes vont former une couche plus ou moins épaisse de collagène sur la surface du matériau qui va l'isoler du tissu osseux. Ce phénomène peut provoquer le rejet de l'implant entraînant une nouvelle intervention chirurgicale.
- Les matériaux bioinertes composés principalement par des matériaux métalliques (titane et ses alliages, …), et des céramiques (zircone, alumine, …) interagissent peu avec l'environnement cellulaire et le tissu dans lequel ils sont implantés. Ils n'induisent aucune réaction (positive ou négative) avec le tissu hôte lors de l'implantation. Cependant, ils présentent des propriétés mécaniques et une durabilité dans le temps qui font de ces matériaux des implants de choix pour un substitut de tissus durs (os et dents)[29,30].

- Les matériaux bioactifs sont capables de provoquer une interaction avec le tissu hôte en se résorbant (matériaux biorésorbables) ou en se liant avec celui-ci.

Nous nous focaliserons par la suite sur les matériaux bioactifs.

I.2.1. Les matériaux bioactifs

La bioactivité est la propriété de permettre des réactions chimiques spécifique. Un matériau est bioactif lorsqu'il induit une activité biologique spécifique[31]. Par exemple, un aliment apportant des vitamines ou alors un matériau implanté libérant des molécules ou des ions capables de jouer un rôle bénéfique pour l'organisme sera dit bioactif. De plus, un substitut osseux bioactif est souvent ostéoconducteur quand il favorise la croissance osseuse grâce à l'invasion de cellules et de vaisseaux, conduisant à la formation d'un os nouveau lorsqu'il est au contact (ou très proche) de l'os. Il est ostéoinducteur lorsqu'il est capable de générer la formation osseuse en recrutant des cellules de la moelle osseuse afin qu'elles se différencient en ostéoblastes même sans être au contact avec le tissu osseux.

Généralement, un substitut osseux doit être capable de favoriser le développement cellulaire, c'est-à-dire la formation osseuse. Le substitut osseux le plus ancien est le sulfate de calcium (plâtre de Paris)[32], qui répond (pratiquement) à tous les critères du cahier des charges d'un substitut osseux bioactif[33] :

- Biocompatible : il doit être toléré et capable d'induire une réponse appropriée de l'hôte à une application spécifique [ISO 10993-1]
- Résorbable : il doit se résorber selon un délai adapté à l'indication médicale (sauf pour un implant permanent)
- Radio-opaque : il doit être possible de l'observer par radiographie aux rayons X
- Ostéoconducteur : il doit favoriser la croissance osseuse
- Résistance mécanique : il doit résister aux contraintes mécaniques notamment en compression (de 5 à 550 MPa)

Cette dernière propriété fait défaut aux matériaux à base de sulfate de calcium, qui ont maintenant été remplacés par des matériaux phosphocalciques. La structure et la composition chimique de ces derniers, similaires à celles du minéral osseux, en font le matériau le plus utilisé pour la substitution osseuse. D'autres matériaux, d'origine naturelle peuvent être utilisés comme le corail[34] ou l'os bovin céramisé à 1000°C[35].

En outre, l'induction de la formation osseuse est d'une importance fondamentale dans l'intégration au substitut osseux. Certains phosphates de calcium (en particulier amorphes) ou

verres bioactifs présentent cette propriété. Leur caractère métastable, peut se traduire par une capacité à libérer des ions (potentiellement actifs, i.e. stimulant les cellules osseuses) en se dégradant, et à former de nouvelles phases plus stables par précipitation une fois implantés.

I.2.2. Les verres bioactifs

A l'instar des autres matériaux vitreux, les verres bioactifs sont des matériaux amorphes, qui ne présentent pas d'ordre atomique à longue distance et possèdent une température de transition vitreuse (Tg) qui se définit comme l'intervalle de température au cours duquel le matériau passe d'un état liquide fondu à un état vitreux. La forme vitreuse est obtenue si l'abaissement de la température est assez rapide, ce qui empêche la cristallisation. Les verres bioactifs ont été découverts par Hench en 1969[36] et sont les premiers matériaux synthétiques dont la capacité à se « lier chimiquement » à l'os a été démontrée. Lors de leur implantation, une couche biologiquement active d'hydroxyapatite carbonatée se forme à la surface du verre suite à un mécanisme de dissolution/reprécipitation d'éléments issus de la composition du verre (P et Ca). Cette couche permet l'adhésion des ostéoblastes et la formation d'une interface solide avec l'os. La nomenclature traditionnelle des verriers décrit leur composition en termes d'oxydes, qui peuvent être classés vis-à-vis de leur capacité à former un réseau vitreux lorsque les verres sont élaborés par fusion. On retrouve :

- Les oxydes formateurs de réseau : ils confèrent la stabilité au matériau, ils peuvent former un verre de réseau tridimensionnel à eux seuls (silicium, bore, phosphore).
- Les oxydes modificateurs de réseau : ils ne peuvent pas former un réseau vitreux seuls, du fait de leur électronégativité plus faible, qui ne les lient aux atomes d'oxygène que par des liaisons ioniques (sodium, calcium…). Ils vont faciliter la fusion en diminuant la température de transition vitreuse et permettent une dégradation accrue du verre le cas échéant.
- Les oxydes intermédiaires : ces éléments peuvent jouer le rôle de formateur ou de modificateur de réseau suivant la composition du verre.

Les bioverres peuvent être préparés par fusion (entre 1000°C et 1450°C), en alliant un formateur et un modificateur de réseau. Cette voie de préparation limite les perspectives au niveau de la fonctionnalisation ou de la morphologie des bioverres. Par exemple, elle ne permet pas d'obtenir un matériau à porosité contrôlée ou sous forme de nanoparticules[37]. Cette voie d'élaboration est cependant majoritairement utilisée dans l'industrie du fait de la robustesse du procédé. Alternativement ces matériaux peuvent être synthétisés par chimie douce à température ambiante, grâce à la voie sol-gel. Du point de vue de leurs propriétés, les bioverres sont classés en deux groupes correspondant à leur bioactivité ; il existe ainsi les bioverres de classe A (Bioglass® ou 45S5) qui sont ostéoconducteurs et ostéoinducteurs, pouvant se lier au tissu osseux et à des tissus mous comme le cartilage, et les bioverres de classe B (Cerabone®) seulement

ostéoconducteurs, en raison d'une dissolution de surface plus lente, ne permettant pas la prolifération rapide des ostéoblastes. Afin de discriminer la bioactivité des bioverres de silice, Hench a proposé un diagramme ternaire SiO_2-CaO-Na_2O en fixant un ajout de 6% de P_2O_5 (figure I.7)[38] permettant de distinguer 4 zones de comportement :

- Zone A : matériaux bioactifs ostéo-inducteurs, capables de former une liaison chimique avec l'os et les tissus mous grâce à une vitesse de libération d'espèces chimiques élevée
- Zone B : matériaux bioactifs seulement capables de former une liaison chimique avec l'os mais ne se dissolvant pas assez rapidement en raison d'une réactivité chimique lente
- Zone C : matériaux inertes en raison d'une réactivité trop lente
- Zone D : matériaux se solubilisant trop rapidement entraînant sa résorption
- Zone E : impossible d'obtenir un verre

Il existe maintenant de nombreux types de bioverres : les verres à base de silice, en particulier le 45S5 sont les plus courants, mais ceux à base de phosphate se développent de plus en plus et seront détaillés ci-après.

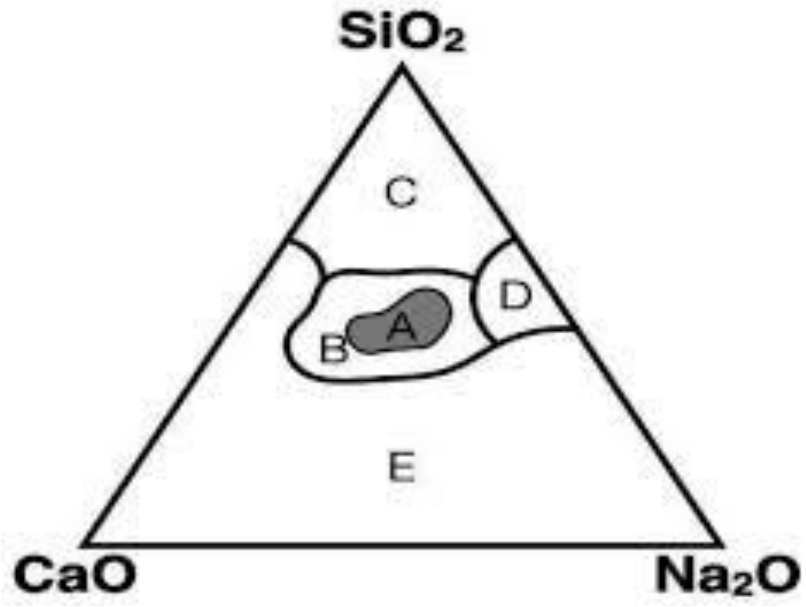


Figure I.7 : Diagramme ternaire de corrélation entre la vitesse de formation d'une couche d'apatite formée sur la surface des bioverres et leur composition en SiO_2, CaO et Na_2O et 6% de P_2O_5.

I.2.2.1 Le bioverre de type 45S5

Les premiers travaux publiés sur le 45S5 ou Bioglass® datent de 1971 et présentent ce matériau comme le premier matériau dégradable à former un lien chimique fort avec l'os[39]. C'est un bioverre à base de silice, dont la composition massique est 24.5% Na_2O - 24.5% CaO - 45% SiO_2 – 6% P_2O_5. En plus d'être le premier bioverre développé et commercialisé, il reste de nos jours le verre bioactif le plus utilisé en tant que substitut osseux. Les proportions d'alcalins et d'alcalino-terreux sont telles que le 45S5 est résorbable dans les fluides biologiques. Il est utilisé dans de nombreuses applications biomédicales comme par exemple le comblement dentaire ou la substitution osseuse en orthopédie, mais aussi comme prothèse d'oreille interne ou moyenne (figure I.8)[40].

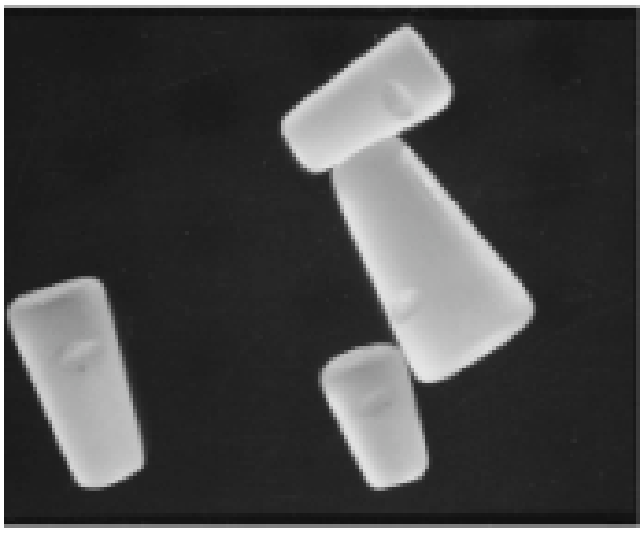


Figure I.8 : Implant d'oreille interne ou moyenne en bioverre 45S5®.

Dans l'industrie, le 45S5® est couramment synthétisé par fusion, en mélangeant les différents précurseurs (le plus souvent des carbonates pour les alcalins et alcalino-terreux) sous forme de poudres qui serviront de formateur de réseau (SiO_2), de modificateurs de réseau (Na_2O, CaO) et d'intermédiaire (P_2O_5). Les oxydes de phosphate et de calcium sont utilisés pour favoriser la germination d'une couche de phosphate de calcium lors de la dégradation ultérieure du réseau vitreux. Une fois introduit dans le four, une première étape de décarbonatation est généralement opérée à 800°C pendant 2 h, avant que les oxydes soient fondus autour de 1400°C. Suite à la fusion, une étape de trempe est nécessaire puis le matériau est broyé pour obtenir des granulés. Ces verres peuvent aussi être coulés et moulés concomitamment afin d'obtenir un verre sous forme de pastille.

Des équivalents du 45S5 peuvent aussi être synthétisés par la méthode sol-gel, à des températures plus basses que la méthode par fusion, notamment pour obtenir des compositions ou morphologies alternatives. Ainsi les bioverres obtenus par sol-gel ont une plus grande porosité intrinsèque, ce qui leur permet de mieux s'intégrer dans le corps. Leur synthèse utilise des alcoolates de silicium (ou alcoxydes), par exemple le tétraéthylorthosilicate (TEOS) et le triethyl phosphate (TEP)[41] et des sels comme précurseurs des ions alcalins et alcalino-terreux. Une suspension colloïdale ou sol est ensuite induite par les réactions d'hydrolyse de l'alcoxyde :

$$\equiv Si\text{-}OR + H_2O \rightarrow \equiv Si\text{-}OH + ROH$$

Puis, un réseau tridimensionnel polymérisé se forme grâce à deux réactions de condensation :

$$\text{Oxolation : } \equiv Si\text{-}OH + HO\text{-}Si\equiv \rightarrow \equiv Si\text{-}O\text{-}Si\equiv + H_2O$$

$$\text{Alcoxolation : } \equiv Si\text{-}OH + RO\text{-}Si\equiv) \rightarrow \equiv Si\text{-}O\text{-}Si\equiv + ROH$$

Un gel se forme par croissance des condensats de silice, puis est séché jusqu'à évaporation du solvant organique et de l'eau. Cette méthode permet aussi de d'intégrer via des liaisons covalentes ou des interactions faibles des molécules organiques ou biologiques au réseau de silice pour obtenir un verre hybride[42].

Le 45S5 est un matériau de classe A, non cytotoxique. Lors de son implantation, le 45S5 est capable de se lier à l'os en plusieurs étapes[43] :

- Relargage d'ions alcalins dans les fluides physiologiques

$$\equiv Si\text{-}O\text{-}Na^+ + H^+ + OH^- \rightarrow \equiv Si\text{-}OH + Na^+ + OH^-$$

- Dissolution de la silice, puis formation de liaisons Si-(OH) par l'hydrolyse des liaisons Si-O-Si

- Polycondensation d'une couche à la surface du matériau riche en SiO_2

- Adsorption d'ions Ca^{2+}, PO_4^{3-}, CO_3^{2-} et OH^- par cette couche riche en silice

- Cristallisation d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée (HAC) à la surface du matériau

- Adsorption de fractions biologiques dans la couche HAC formée

- Action des macrophages

- Colonisation des cellules souches

- Différenciation et prolifération des cellules souches en ostéoblastes

- Production d'une matrice osseuse

- Minéralisation de la matrice osseuse

Pour analyser si le matériau est capable de former une couche d'HAC et ainsi reproduire les premières étapes jusqu'à la cristallisation en surface d'une phase apatitique, le matériau peut être immergé dans des solutions aqueuses ioniques simulant les fluides biologiques.

La figure I.9 présente les caractérisations par diffraction des RX (fig.I.9a)[44] et spectroscopie Raman (fig.I.9b)[45] d'un bioverre 45S5 synthétisé par fusion. Le diagramme RX forme un halo large diffus entre 25 et 35° caractéristique des matériaux amorphes alors que le spectre Raman est composé de bandes de vibration larges à 625 et 855 cm^{-1} correspondant respectivement aux vibrations de la liaison Si-O-Si, puis aux étirements symétriques des tétraèdres SiO_4 et enfin la bande entre 900 et 1100 cm^{-1} regroupe les déformations liées aux tétraèdres SiO_4 et des entités PO_4^{3-} et HPO_4^{2-}.

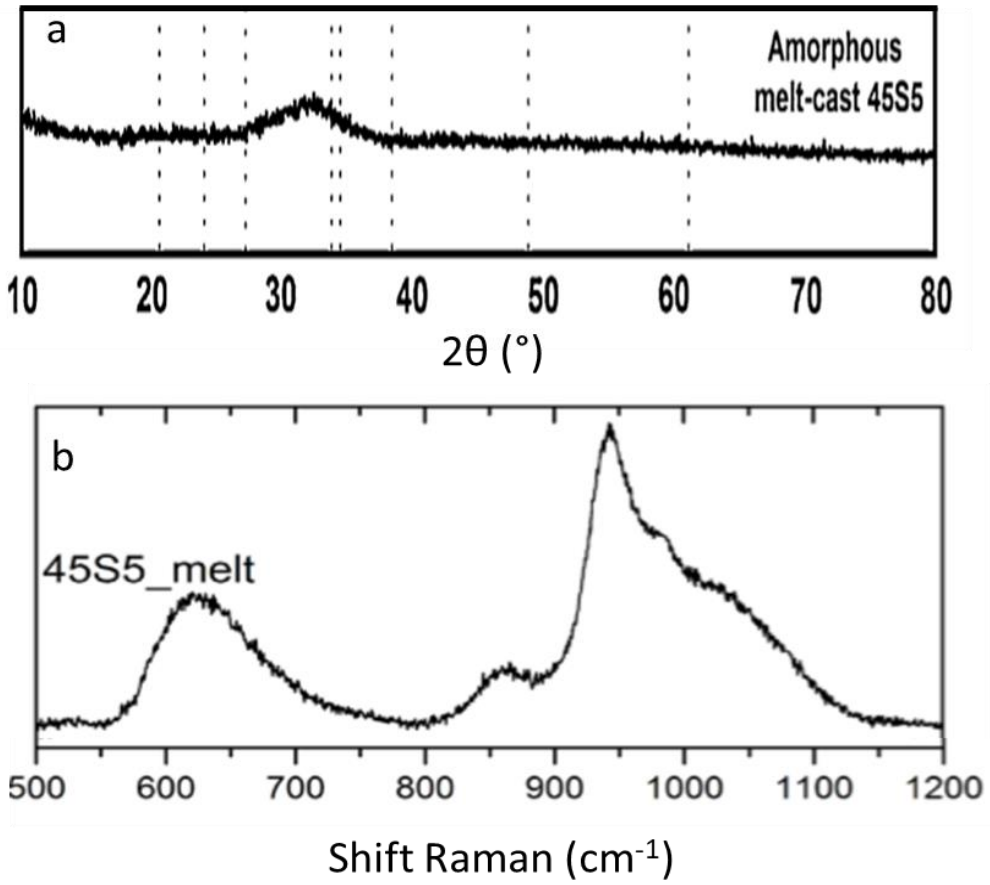


Figure I.9 : Diagramme de diffraction RX (a) et spectre Raman (b) d'un bioverre 45S5 synthétisé par fusion.

I.2.2.2 Les verres phosphates

Au départ, les verres phosphates ont été développés pour des applications optiques en raison de leur indice de réfraction élevé comparé aux verres à base de silice. Ils sont par ailleurs utilisés pour vitrifier les déchets nucléaires[46] mais aussi pour des applications biomédicales. Leur température de fusion assez basse et leur composition chimique (proche de celle de l'os) en font une bonne alternative aux verres silicates.

Les verres phosphates ont pour brique de base le tétraèdre PO_4. Ces tétraèdres se lient au maximum à trois tétraèdres voisins *via* des ponts oxygène, pour former un réseau 3D. Celui-ci se dépolymérise lors de l'addition d'oxydes modificateurs, les ions alcalins ou alcalino-terreux provoquant la formation d'oxygène non-pontant et, entraînant la formation d'espèces à chaines plus courtes composées d'anions phosphates. Ces anions sont décrits suivant la nomenclature Q^n où n est le nombre d'atomes d'oxygène pontant par tétraèdre. Ils peuvent former quatre configurations différentes suivant leur degré d'oxydation[47] :

- Le groupement isolé : PO_4^{3-} appelé Q^0
- Le groupement terminal : PO_4^{2-} appelé Q^1
- Le groupement intermédiaire : PO_4^- appelé Q^2
- Le groupement point de branchement : PO_4 appelé Q^3

Le réseau de verres phosphatés est déterminé par le nombre de liaisons entre les tétraèdres voisins directement lié à Q^n et peut être classé selon le rapport oxygène / phosphate ([O]/[P])[48].

Les ultraphosphates ($2.5 < [O]/[P] < 3$) : leur réseau est basé sur des combinaisons de tétraèdres Q^2 et Q^3 et sont très riches en P_2O_5. Ils ont pour formule $[P_{2m}+nO_{5m+3n}]_n^-$. Les sites Q^3 étant hygroscopiques (ils ont tendance à absorber l'humidité), ils ont une faible durabilité chimique ce qui limite leur usage.

Les polyphosphates ($[O]/[P] > 3$) : leur réseau est un enchaînement de Q^2, se terminant par des tétraèdres Q^1, de formule $[PnO_{3n+1}]_{(n+2)}$. La longueur de la chaîne diminue lorsque le rapport [O]/[P] augmente. Le pyrophosphate ou diphosphate ($P_2O_7^{4-}$) étant la chaîne la plus courte possible des polyphosphates.

Les métaphosphates ($[O]/[P] = 3$) : leur réseau en chaîne ou en anneau est entièrement basé sur des tétraèdres Q^2. Ils sont souvent décrits comme des polyphosphates à très longues chaînes. La formule des anions cycliques est $(PO_3)_n$.

Lorsque la quantité d'oxygène augmente encore, la structure du verre est constituée de petites unités de pyrophosphate Q^1 (diphosphate) et d'orthophosphate Q^0 (monophosphate) : ce sont les verres inversés ou « invert glasses » en anglais. Dans ce cas, l'enchainement entre les

unités phosphates ne peut avoir lieu et le réseau vitreux sera formé par l'interaction entre les groupements phosphates et les cations calcium modificateurs de réseau. Ces verres ont une forte tendance à cristalliser. En effet, la petite taille des entités phosphates accroit leur mobilité et diminue la viscosité. La germination et la croissance de phases cristallines est donc favorisée par cette diffusion exacerbée par rapport à des chaines phosphate plus longues.

Les verres phosphates, dont les verres inversés (*invert glasses*) sont obtenus généralement par la méthode de fusion classique suivie d'une étape de trempe. Les précurseurs utilisés peuvent être sous forme d'oxydes purs (CaO, MgO) ou de métaphosphate ($Mg(PO_3)_2$, CaO_6P_2). De plus, l'ajout d'oxyde de sodium permet de diminuer la température de fusion.

La méthode sol-gel apporte les mêmes avantages que pour leur homologue silicate, cependant elle est plus complexe à mettre en place. En effet il est difficile d'obtenir un gel à partir de précurseurs simples de phosphate, en raison de leur difficulté à s'hydrolyser.

Des précurseurs ont tout de même pu être préparés par la réaction suivante :

$$P_2O_5 + 3EtOH \rightarrow OP(OEt)(OH)_2 + OP(OEt)_2(OH)$$

Puis en ajoutant de l'éthoxyde de sodium et du méthoxyde de calcium dissous, un gel est obtenu en 1 semaine. Celui-ci est séché et calciné pour former un verre de phosphate[49].

Une autre réaction sol-gel a été mise au point en utilisant du n-butyle phosphate et de l'isopropoxyde de titane pour synthétiser des verres dans le système TiO_2-P_2O_5, et ainsi obtenir des compositions originales, impossibles à réaliser en passant par la fusion[50].

L'intérêt des verres phosphates dans le système Na_2O-CaO-P_2O_5 du point de vue biomédical, se trouve dans leur composition, car ils sont constitués d'éléments présents naturellement dans le corps humain et sont donc non cytotoxiques[51]. De plus, la composition initiale du verre phosphate permet de modifier leur vitesse de dissolution en contrôlant la libération d'ions. En effet, la présence d'additifs, le rapport O/P ou l'augmentation de la quantité de calcium dans la composition permettra de réguler la dissolution du matériau. Enfin, leur grande diversité de formes (granulés, tissus, monolithes…) en fait des biomatériaux adaptés pour le comblement osseux.

I.2.3. Les phosphates de calcium

Les phosphates de calcium sont les matériaux bioactifs les plus implantés en raison de leur structure et leur composition chimique analogues à celles du minéral osseux. Ils sont ostéoconducteurs, ce qui leur permet, une fois implantés, de créer une interface stable avec l'os[24].

De plus, les phosphates de calcium sont pour la plupart biorésorbables et peuvent donc être remplacés par de l'os néoformé[52,53].

Dans la plupart des phosphates de calcium constituants les substituts osseux commercialisés, le phosphate est sous forme de monophosphate également appelé orthophosphate ; certains contiennent du diphosphate, également appelé pyrophosphate ou d'autres formes de polyphosphates. On retrouve ces deux entités (orthophosphate et pyrophosphate) *in vivo* dans le corps humain. L'orthophosphate de formule PO_4^{3-}, est une brique élémentaire de la minéralisation osseuse et le pyrophosphate est un des principaux régulateurs de cette minéralisation. En effet, il a un double rôle à jouer dans le processus de minéralisation : lorsque sa concentration dans les fluides biologiques est supérieure à 10^{-7} mol.L^{-1}, il inhibe la formation d'hydroxyapatite[54]. D'autre part, il est le principal substrat de l'hydrolyse des enzymes phosphatases présentes *in vivo*, telles que la phosphatase alcaline. L'action de ces enzymes permet de libérer de l'orthophosphate qui contribue ensuite à minéraliser la matrice osseuse. En tant que biomatériau, il a été montré que le pyrophosphate ne présente aucune cytotoxicité, sa résorption entraine une néoformation osseuse[55] et sa présence peut même stimuler la réparation osseuse[56].

De nombreux substituts osseux à base de phosphates de calcium sont étudiés et même commercialisés que ce soit sous forme de ciment, de poudre, de céramique ou encore de revêtement[57]. Les phosphates de calcium peuvent être obtenus par calcination d'un autre phosphate de calcium qui servira d'intermédiaire ou par chimie douce, notamment en précipitant une solution de calcium et de phosphate par double décomposition. Cette dernière méthode permet de contrôler la composition chimique en faisant varier différents paramètres comme le pH, la température et la vitesse de précipitation ou en incorporant d'autres éléments (cuivre, zinc, fluor, carbonates…). Les phosphates de calcium synthétiques présentent une grande diversité dans leur composition chimique et peuvent être différenciés par leur rapport atomique Ca/P ; ainsi que par leur structure, qui peut être cristalline ou amorphe.

I.2.3.1 Les phosphates de calcium cristallisés

Le tableau I.1 décrit les phosphates de calcium les plus étudiés dans la littérature. Leur formule chimique ainsi que leur rapport Ca/P y sont reportés. Le rapport Ca/P des matériaux à base d'orthophosphate de calcium varie entre 0,5 pour la phosphate monocalcique monohydraté jusqu'à 2 pour le phosphate tétracalcique alors que les matériaux à base de pyrophosphate de calcium ont un rapport Ca/P entre 0,5 et 1. Par la suite, les phases à base d'orthophosphate et de pyrophosphate de calcium seront décrites séparément.

Tableau I.1 : Noms, abréviations, formules chimiques, structures cristallographiques et rapports Ca/P des principales phases d'orthophosphates et pyrophosphates de calcium cristallisés

Composé	Abréviation	Formule chimique	Groupe d'espace	Rapport Ca/P
Phosphate monocalcique monohydraté	MCPM	$Ca(H_2PO_4)_2.(H_2O)$	Triclinique $P\ \bar{1}$	0,5
Phosphate dicalcique dihydraté	DCPD ou brushite	$CaHPO_4.2H_2O$	Monoclinique 2/m	1
Phosphate octocalcique	OCP	$Ca_8(PO_4)_4(HPO_4)_2.5(H_2O)$	Triclinique	1,33
Apatite non stœchiométrique	Ns-HAP	$Ca_{10-x}(PO_4)_{6-x}(HPO_4,CO_3)x(OH)_{2-x}$	Hexagonal $P6_3/m$	1,34 – 1,66
Phosphate tricalcique β	β-TCP	β-$Ca_3(PO_4)_2$	Rhomboédrique R3cH	1,5
Hydroxyapatite phosphocalcique stœchiométrique	HAP	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	Monoclinique $P2_1/b$ ou Hexagonal $P6_3/m$	1,67
Phosphate tétracalcique	TTCP	$Ca_4O(PO_4)_2$	Monoclinique $P2_1/m$	2
Pyrophosphate de calcium anhydre alpha et beta	α-CPP β-CPP	α- or β-$Ca_2P_2O_7$	Monoclinique $P2_1/m$ Tétragonal $P4_1$	1
Pyrophosphate de calcium tetrahydraté	m-CPPTβ	$Ca_2P_2O_7.4H_2O$	Monoclinique $P2_1/c$	1
Pyrophosphate de calcium dihydraté	m-CPPD ou t-CPPD	$Ca_2P_2O_7.2H_2O$	Monoclinique $P2_1/n$ ou Triclinique P_{-1}	1

Par ailleurs, des orthophosphates de calcium et pyrophosphates de calcium amorphes ont été étudiés et seront présentés après avoir exposés les différents orthophosphates de calcium et pyrophosphates de calcium cristallisés.

I.2.3.1.1 Les orthophosphates de calcium cristallisés

I.2.3.1.1.1. Les phosphates tricalciques

Les substituts osseux cristallisés à base d'orthophosphates de calcium sont les plus étudiés. La famille des phosphates tricalciques fait partie des phosphates de calcium utilisés comme substituts osseux. Elle regroupe les composés de rapport Ca/P égal à 1,5. Le phosphate tricalcique de type β (β-TCP) de composition $Ca_3(PO_4)_2$ synthétisé à haute température (entre 850 et 1125°C)[58], est le matériau le plus implanté de cette famille. C'est un matériau anhydre qui bien que non soluble à pH physiologique (7,4) n'est pas présent naturellement dans le corps humain. Cependant, on retrouve dans le tartre sous-gingival ou dans le cartilage de patients atteints d'arthrose de la Whitlockite, un phosphate tricalcique associé à du magnésium de formule

$Ca_9(MgFe)(PO_4)_6PO_3(OH)$. De plus, le β-TCP possède de bonnes propriétés biologiques. Par exemple, à 9 mois de cicatrisation, le β-TCP permet d'obtenir autant de formation osseuse en quantité qu'avec de l'os autogène[59].

Des céramiques biphasées associent le phosphate tricalcique et l'hydroxyapatite ainsi que leurs propriétés physico-chimiques respectives. Leur biorésorbabilité varie en fonction du ratio HA/TCP et peut donc être modulé selon la vitesse de résorption souhaitée. Cependant, les céramiques biphasiques ne sont pas ostéo-inductrices et n'ont pas une grande résistance mécanique[52].

I.2.3.1.1.2. Les apatites phosphocalciques

Les apatites phosphocalciques sont des composés de formule chimique générale $Me_{10}(PO_4)_6Y_2$, avec Me un cation bivalent (Ca^{2+}, Ba^{2+}, Sr^{2+}, Pb^{2+}, …) et Y un anion monovalent (OH^-, Br^-, Cl^- et F^-). La référence des apatites de synthèse est l'hydroxyapatite stœchiométrique de formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ et de rapport Ca/P égal à 1,67. L'hydroxyapatite est une céramique bioactive élaborée à haute température (1300°C) dans l'industrie[60]. Cependant elle reste assez éloignée de l'apatite biologique de par sa composition chimique, non stœchiométrie et la réactivité physico-chimique qui en découle. En effet, l'apatite biologique est mal cristallisée et contient des carbonates ce qui entraîne des propriétés physico-chimiques différentes de maturation et de réactivité en milieux aqueux ainsi que de résorption *in vivo*.

La synthèse par double décomposition a permis d'élaborer des apatites nanocristallines analogues aux apatites biologiques. Ces apatites également appelées apatites biomimétiques se présentent sous forme de nanocristaux constitués d'une couche hydratée en surface incluant des ions principalement divalents très labiles (facilement échangeables avec le milieu environnant) qui entoure un noyau d'apatite non-stœchiométrique[61]. L'apatite nanocristalline est plus soluble/résorbable que l'hydroxyapatite en raison de la présence d'ions carbonate CO_3^{2-} et de phosphate protoné HPO_4^{2-}, rendant l'apatite non stœchiométrique. En effet, elle est déficiente en calcium comme les apatites biologiques, ce qui leur permet de posséder des propriétés de réactivité physico-chimique en milieu aqueux similaires[62].

La figure I.10 présente les diagrammes de diffraction des rayons X d'une apatite nanométrique, d'une apatite stœchiométrique synthétiques et d'un os humain. Nous pouvons observer que les diagrammes DRX de l'os et de l'apatite nanocristalline sont similaires et que les pics de diffraction de l'apatite nanométrique (ou de l'os) sont plus larges que ceux de l'hydroxyapatite stœchiométrique dû à la faible cristallinité de l'apatite nanocristalline. Les pics à 25,9 et 31,8° correspondant à la diffraction des plans (002) et (211) des cristaux d'apatite[63].

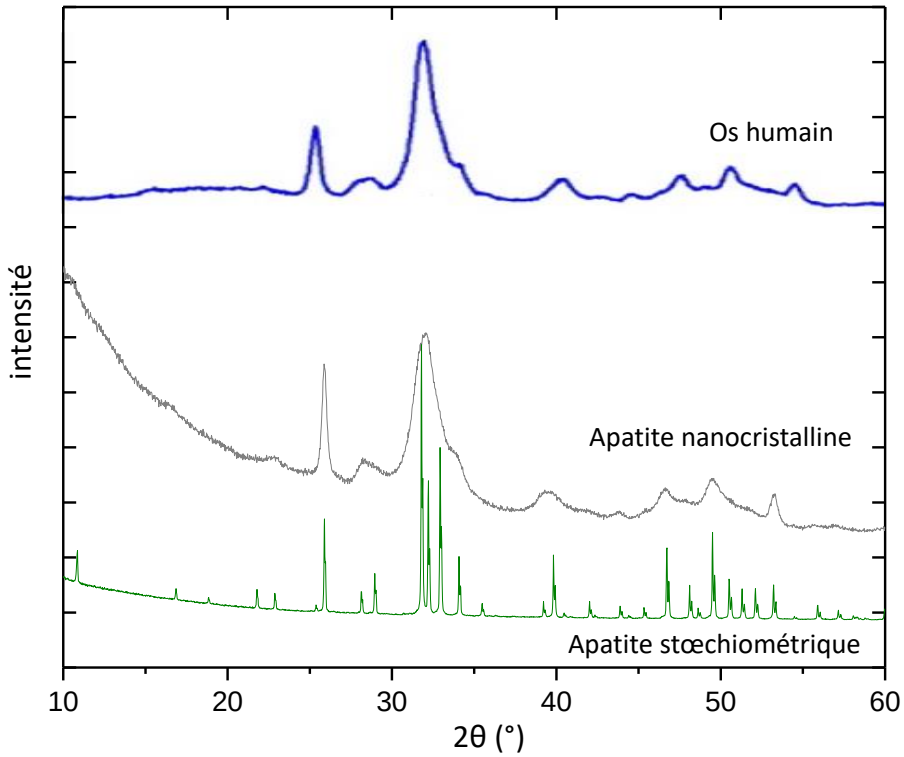


Figure I.10 : Diagrammes de diffraction des rayons X d'un os humain, d'une apatite nanocristalline maturée 24 heures et d'une apatite stœchiométrique synthétiques

Les spectres Raman d'apatites nanocristallines carbonatée ou non et d'une apatite stœchiométrique synthétiques sont renseignés sur la figure I.11. Leurs bandes de vibration $\nu^{1s}PO_4$ sont toutes positionnées à 958 cm^{-1} mais elles sont plus larges sur les spectres des apatites nanocristallines. De plus, une bande de vibration située à 1085 cm^{-1} est observée sur le spectre de l'apatite nanocristalline carbonatée correspondant aux vibrations $\nu^1(CO_3^{2-})$.

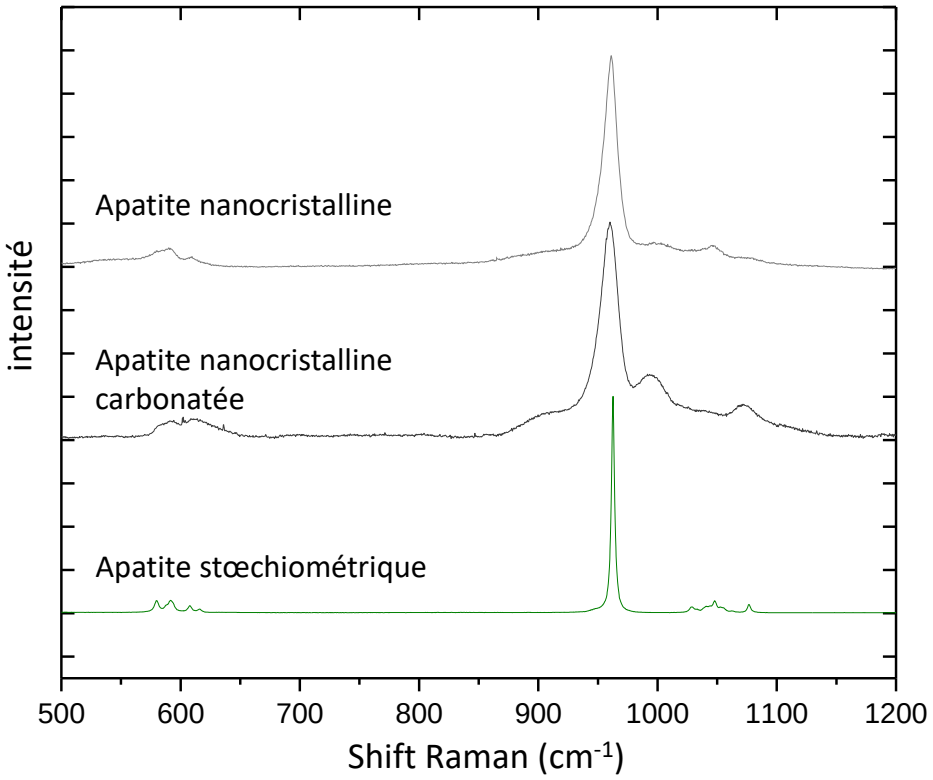


Figure I.11 : Spectres Raman d'une apatite nanocristalline carbonatée et non carbonatée maturée 24 heures et d'une apatite stœchiométrique synthétiques

I.2.3.1.2 Les pyrophosphates de calcium cristallisés

Les ions pyrophosphates $P_2O_7^{4-}$ font partie de la famille des polyphosphates, ils sont formés par condensation de deux ions orthophosphate liés par un atome d'oxygène. Le pyrophosphate extracellulaire est produit *in vivo* par l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate (AMP) catalysée par des enzymes comme la nucléoside triphosphate pyrophosphohydrolase (NTPPPase) ou l'ectonucléotide pyrophophatase-phosphodiesterase 1 (ENPP1)[64]. Le pyrophosphate extracellulaire peut ensuite être hydrolysé en orthophosphate par l'action de l'enzyme phosphatase alcaline (PAL). Le rapport ortho/pyrophosphate extracellulaire est alors maintenu par ces enzymes, qui régulent la concentration des ions ortho et pyrophosphates. Les matériaux à base de pyrophosphate utilisés comme substituts osseux prennent alors tout leur sens, puisque leur résorption pourrait être contrôlée par des enzymes en fonction de la proportion d'ions pyrophosphate constituant ces biomatériaux.

I.2.3.1.2.1. Les pyrophosphates de calcium anhydres

Le pyrophosphate de calcium anhydre est généralement synthétisé par condensation d'hydrogénophosphate de calcium, notamment à partir de monétite ($CaHPO_4$) chauffée entre 750 et 800°C[65], et implique la libération d'une molécule d'eau :

$$2HPO_4^{2-} \leftrightarrow H_2O + P_2O_7^{4-} \text{ (Equation I.1)}$$

La réaction inverse, dite d'hydrolyse est favorisée en milieu acide à des températures plus basses (entre 20 et 70°C) ou directement en phase solide lorsque la température augmente[66].

On retrouve les pyrophosphates anhydres, le plus souvent de type β (CPP-β) impliqués dans les biocéramiques car c'est la forme la plus stable. Il est synthétisé en chauffant du phosphate de calcium amorphe (ACP) à plus de 800°C[67]. L'amorphe va dans un premier temps former par transformation solide du pyrophosphate de calcium anhydre γ (CPP-γ) vers 350°C. En augmentant la température, cette phase métastable va cristalliser en phase pure CPP-β à 980°C[68]. Le β-$Ca_2P_2O_7$ est donc une phase stable à hautes températures. A noter que cette phase est résorbée plus rapidement que l'hydroxyapatite. Ces propriétés en font un choix intéressant en tant que biomatériau pour la greffe osseuse dans la fusion lombaire[69]. En effet, le β-CPP associée à une autogreffe est aussi efficace que l'os autologue pour la greffe lors de la fusion vertébrale.

I.2.3.1.2.2. Les pyrophosphates de calcium dihydratés

Des phases cristallisées de pyrophosphate de calcium hydraté ont été identifiées *in vivo*, dans le liquide articulaire et le cartilage de patients atteints d'arthrose et en particulier de pseudogoutte[70]. Ces cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté, monoclinique (m-CPPD) et triclinique (t-CPPD) de formule $Ca_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$, induisent une réponse inflammatoire. Les travaux de thèse de P. Gras[71] ont permis la synthèse en 45 minutes de ces deux phases pures par la méthode de double décomposition de solutions de pyrophosphate de potassium et de nitrate de calcium dans une solution tampon. La phase t-CPPD a été synthétisée dans une gamme de pH compris entre 3,6 et 5 et à des températures entre 60 et 90°C alors que le phase m-CPPD a été synthétisée à pH 5,8 et à 90°C. La phase t-CPPD est la phase thermodynamiquement la plus stable, elle a également pu être synthétisée en laissant maturer un pyrophosphate de calcium amorphe pendant 7 jours[72] et deux semaines[71] à pH acide. La phase m-CPPD était quant à elle plus difficile à obtenir sous forme d'une phase pure avant la méthode publiée par P. Gras car sa synthèse n'était pas reproductible[73].

Leur caractérisation par DRX, spectroscopie Raman et MEB sont présentées sur la figure I.12. Leur diagramme de diffraction RX respectif montre plusieurs pics de diffraction dont les

plus intenses sont situés à 11 et 13° pour la phase t-CPPD et à 12° pour la phase m-CPPD (Fig.I.12a). Les spectres Raman des phases t-CPPD et m-CPPD présentent une bande de vibration intense à 1049 cm^{-1} et 1045 cm^{-1} correspondant à la vibration $\nu^{s}PO_3$ et une bande un peu moins intense entre 750 et 775 cm^{-1} associée à la vibration $\nu^{s}POP$ (Fig.I.12b)[71]. Enfin, sur les micrographies tirées de la thèse de P. Gras[71] nous pouvons observer des cristaux sous forme d'aiguilles de longueur variant entre 5 et 25 µm et de largeur entre 1 à 3 µm (Fig.I.12c et 12d). La seule différence de morphologie entre ces deux phases semble que les cristaux de t-CPPD semble plus larges et épais que ceux de m-CPPD. De plus, il est à noter que ces deux phases présentent une solubilité élevée en milieu acide, les phases t-CPPD et m-CPPD ont un pKs respectivement de 18,35 et 17,7[74].

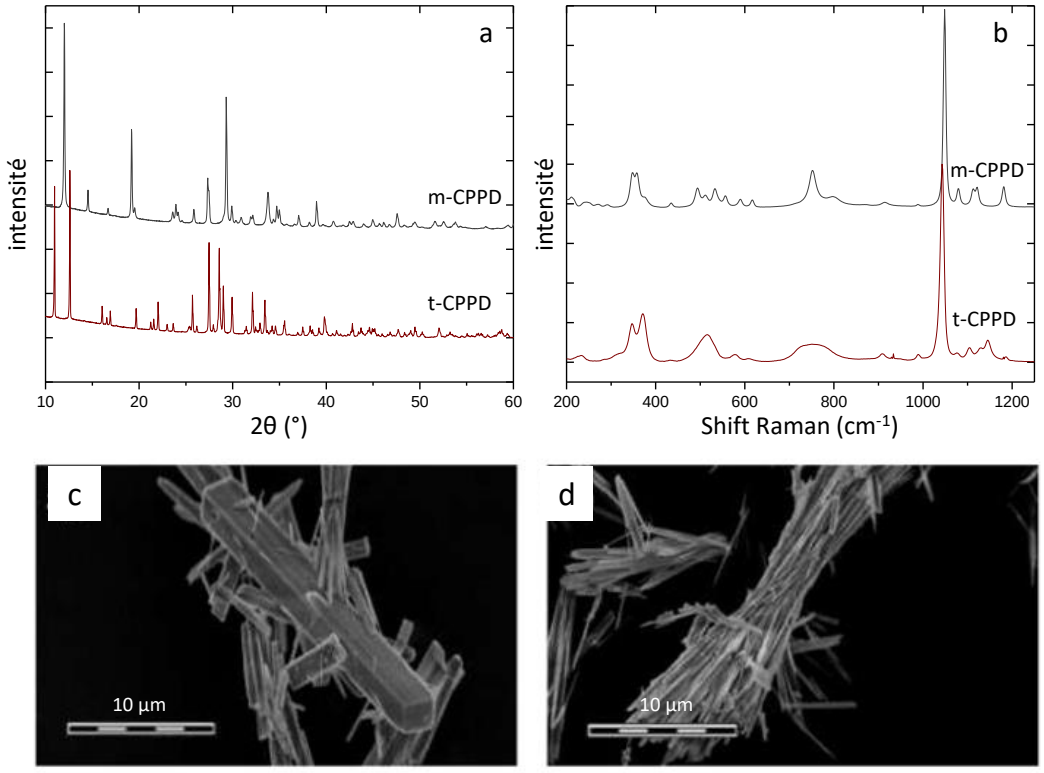


Figure I.12 : Diagrammes de diffraction des RX (a), spectres Raman (b) et micrographies MEB des phases pures m-CPPD (c) et t-CPPD (d) synthétiques[70].

I.2.3.1.2.3. Le pyrophosphate de calcium tetrahydraté

La même technique de synthèse des phases t-CPPD et m-CPPD a permis d'obtenir la phase pure de pyrophosphate de calcium tétrahydratée beta, m-CPPT-β de formule $Ca_2P_2O_7,4H_2O$ à pH légèrement acide entre 3,6 et 5 et à température inférieure à 50°C[75]. La phase m-CPPT-β a aussi pu être obtenue en laissant maturer une phase amorphe de pyrophosphate de calcium hydraté a-

CPP pendant deux semaines à pH légèrement acide (entre 3,5 et 5,5) et à des températures inférieures à 40°C[71,73]. Cette phase n'a cependant pas été identifiée *in vivo* contrairement aux deux phases dihydratées déjà présentées. La figure I.13 présente les caractérisations par diffraction des RX, spectroscopie Raman et MEB de la phase pure m-CPPT-β synthétique. Le diagramme DRX montre plusieurs pics de diffraction, dont les plus intenses à 7,8° et 30,6° (Fig.I.13a) et le spectre Raman nous permet d'identifier les bandes de vibration $\nu^{s}PO_3$ de cette phase à 1036 cm^{-1} et $\nu^{s}POP$ à 743 cm^{-1} (Fig.I.13b). Nous pouvons également observer sur la micrographie MEB que les cristaux ont une morphologie de lamelles hexagonales à faciès plat de longueur environ 20 µm (Fig.I.13c). Cette morphologie est due à leur structure cristallographique basée sur l'alternance de couches d'ions pyrophosphate et calcium et d'une de molécules d'eau reliées entre elles par des liaisons hydrogène[71,74].

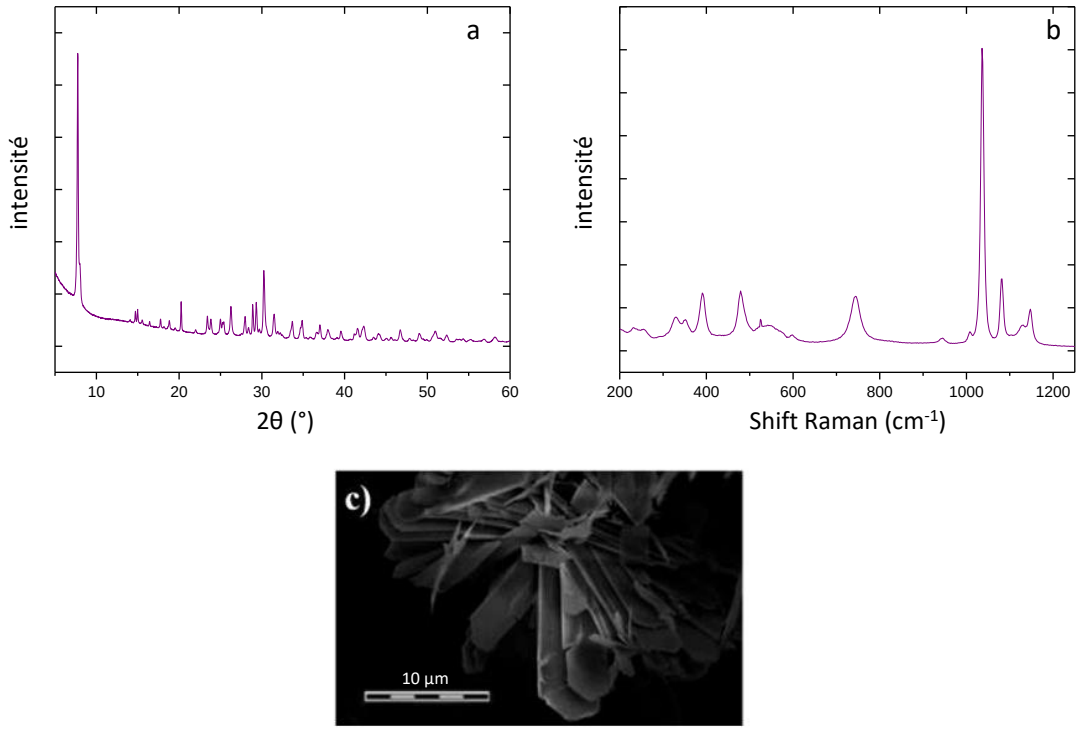


Figure I.13 : Diagrammes de diffraction RX (a), spectre Raman (b) et micrographie MEB de la phase pure m-CPPT-β synthétique[70]

I.2.3.2 Les phosphates de calcium amorphes

I.2.3.2.1 Les orthophosphates de calcium amorphes

L'orthophosphate de calcium amorphe ou ACP possède un ratio Ca/P proche de 1,5 et une des formules chimiques est décrite comme $Ca_xH_y(PO_4)_z.nH_2O$. L'étude de la fonction de distribution radiale a permis à Posner et Betts de mettre à jour la structure à courte distance de

l'orthophosphate de calcium amorphe[76]. Elle est composée par de groupes de formule $Ca_9(PO_4)_6$ de 9,5 Å de diamètre, avec un ion Ca^{2+} central entouré de six anions orthophosphate PO_4^{3-}, qui à leur tour sont entourés de huit autres ions calcium[77]. Ces groupements, appelés « clusters de Posner » seraient reliés entre eux par de l'eau interstitielle.

L'ACP a été proposé comme un précurseur de l'apatite du minéral osseux[78]. En effet, la présence d'ACP a été trouvée dans des os nouvellement formés[79] avant qu'ils cristallisent. Le mécanisme de formation d'apatite à partir d'ACP reste à élucider mais les premières hypothèses proposeraient que la transformation serait initiée par la présence d'humidité. Cette dernière permettrait l'agrégation d'amas de germination qui vont se densifier afin de former des particules sphériques d'apatite nanocristalline[80].

L'ACP a pu être synthétisé par précipitation par double décomposition en solution de sels de calcium et de phosphate solubles à température ambiante et à pH proche de 10[81].

I.2.3.2.2 Les pyrophosphates de calcium amorphes

Il y a peu d'études structurales sur les pyrophosphates de calcium amorphes aussi poussées que pour les orthophosphate de calcium amorphes. Néanmoins, des pyrophosphates de calcium amorphes ont pu être synthétisés en conditions douces dans l'eau[66,71]. La coprécipitation des ions calcium et pyrophosphate à température ambiante ainsi que la méthode de double décomposition d'une solution de pyrophosphate de potassium et d'une solution de nitrate de calcium permet de former du pyrophosphate de calcium amorphe hydraté pur (a-CPP) de formule $Ca_2P_2O_7.nH_2O$ avec n légèrement inférieur à 4[71,82]. Cette phase amorphe a été identifiée comme un précurseur *in vitro* des phases dihydratées cristallisées observées *in vivo* (m-CPPD et t-CPPD). De plus, cette phase amorphe est stable à température ambiante. En effet, lors de sa thèse P. Gras a montré que l'aCPP montrait une grande stabilité en solution à 37°C et pH 7,4, puisque des analyses par spectroscopie Raman et diffraction des rayons X après deux ans d'évolution n'ont montré aucun signe de cristallisation[71]. Cependant, une petite quantité d'ions orthophosphate ont été identifiés par spectroscopie Raman dans l'échantillon ayant évolué sur cette longue période en raison de l'hydrolyse partielle des ions pyrophosphate en orthophosphate ; ces derniers pourraient très certainement avoir joué un rôle dans l'inhibition de la cristallisation du pyrophosphate de calcium amorphe. D'un autre côté Slater et al.[66] ont étudié la stabilité de l'entité pyrophosphate en caractérisant la structure de pyrophosphate de calcium et de strontium amorphes par des méthodes fines. Ils ont suggéré que cette stabilité était due à un désordre de l'angle de liaison P-O-P et des molécules d'eau liées par liaisons hydrogène aux phosphate empêchant la formation d'un réseau ordonné et donc la cristallisation du matériau. Même à des températures avoisinant les 450°C, le

matériau était toujours composé d'une phase amorphe. Ainsi, grâce à sa grande stabilité le pyrophosphate de calcium amorphe pourrait présenter un intérêt biologique encore peu exploité.

Des matériaux phosphocalciques amorphes, à l'instar des verres phosphates par fusion ont pu être synthétisés par une autre méthode dite de « coacervat ». Le procédé de coacervation implique l'ajout d'une solution de cations polyvalents à une solution concentrée de polyphosphate de sodium. Une phase de « coacervat », c'est-à-dire la phase qui contient les macromolécules de degrés de polymérisation les plus élevés, est obtenue suite aux interactions électrostatiques entre les chaînes de polyphosphate et les cations. Cette phase est ensuite extraite et séchée pour former un matériau amorphe hydraté de formule chimique $(Na_2O)_x(CaO)_{0.5-x}(P_2O_5)_{0.5y}(H_2O)$. Une analyse thermique a permis de distinguer deux environnements aqueux : l'eau structurale et l'eau liée par liaison faible[83]. Ces amorphes ont par exemple été utilisés en tant qu'agents de délivrance d'ions antibactériens. Cette méthode est une alternative à la méthode sol-gel d'éviter l'étape de chauffage pour éliminer les molécules organiques.

Récemment, des ciments composés principalement de monétite ($CaHPO_4$) ou de brushite ($CaHPO_4.2H_2O$) dans lesquels ont été incorporés des espèces de pyrophosphate amorphes (aCPP) et cristallisés (β-$Ca_2P_2O_7$) ont été étudiés dans le but d'améliorer les propriétés d'ostéoinduction d'implants[56,84]. En faisant varier les proportions des précurseurs pyrophosphates, ils ont pu ajuster les quantités des phases amorphes et cristallines dans les ciments dans le but de contrôler leur libération ionique en milieux aqueux *in vitro* ou *in vivo.* La coexistence de phases orthophosphate et pyrophosphate de calcium au sein de la composition d'un matériau pourrait permettre de prodiguer des propriétés de dégradation *in vitro* différentes des phases pures d'ortho ou pyrophosphate seules.

I.2.3.3 Les matériaux amorphes mixtes ortho- et pyrophosphates de calcium

I.2.3.3.1 Les matériaux mixtes ortho/pyrophosphate de calcium contenant du potassium

Le développement de matériaux à base de pyrophosphate de calcium en tant que substitut osseux semble intéressant puisqu'il a été montré que le pyrophosphate de calcium hydraté amorphe ne présente pas de potentiel inflammatoire[71], qu'il est relativement stable en solution comparé à d'autres sels minéraux amorphes (carbonate de calcium amorphe, orthophosphate de calcium amorphe), et qu'il peut même stimuler la régénération osseuse lorsqu'il est ajouté en tant qu'additif dans des ciments phosphocalciques[56]. Des matériaux amorphes tels que les verres

phosphate peuvent être composés d'identités ortho- et pyrophosphates, malheureusement leur vitesse de dissolution est rapide et permet d'aboutir que très rarement à une couche d'apatite en milieux aqueux[85,86].

Récemment, une nouvelle famille de matériaux amorphes mixtes d'ortho et pyrophosphates de calcium contenant du potassium a pu être synthétisée au CIRIMAT par chimie douce en utilisant la double décomposition en solution du pyrophosphate de potassium anhydre ($K_4P_2O_7$) et du chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2.2H_2O$)[87,88]. Des solutions à différentes concentrations en calcium ont été utilisées afin d'étudier si le rapport molaire en solution calcium/pyrophosphate (Ca/pyro) pouvait influer sur la nature du matériau final. Le mélange a ensuite été centrifugé à 7500 tour/minutes et lavé plusieurs fois à l'eau déionisée afin d'obtenir un gel qui est ensuite séché à 70°C plusieurs jours. Les différents gels produits étaient transparents lorsque le rapport Ca/pyro était faible et translucides lorsqu'il était élevé, ce qui semblait montrer que le rapport initial Ca/pyro en solution pouvait modifier la physico-chimie du gel (Figure I.14)[88]. Les résultats de cette étude ont montré que selon le rapport Ca/pyro en solution un matériau amorphe mixte d'ortho et de pyrophosphates de calcium contenant également du potassium de formule : $\{[(Ca^{2+})_{1-x}(H^+/K^+)_{2x}]_2[(P_2O_7^{4-})_{1-y}(PO_4^{3-})_{4y/3}]\}n(H_2O)$ ou un matériau vitrocéramique contenant des cristaux $Ca_{10}K_4(P_2O_7)_6,9H_2O$ ont pu être synthétisés. Ces matériaux à base de pyrophosphate ont généré *in situ* un peu d'orthophosphate jouant un rôle dans l'inhibition de la cristallisation du matériau.

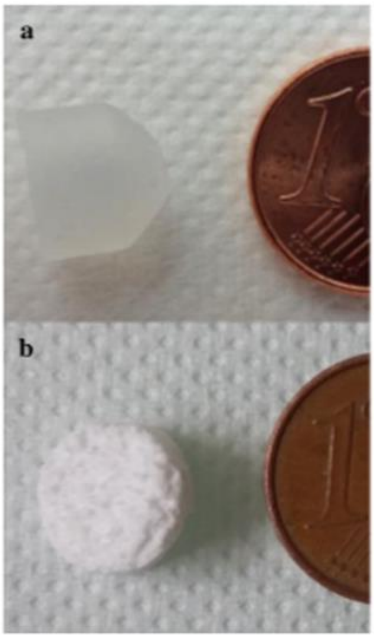


Figure I.14 : Photographies des matériaux synthétisés avec un rapport molaire en solution Ca/P de 0,108 (a) et 0,433 (b)[87].

En outre, les auteurs ont montré que plus le rapport Ca/pyro était élevé et plus la quantité de la phase cristalline était élevée dans la vitrocéramique (Figure I.15). Il a également été montré que l'étape de lavage a permis d'éviter la formation de la phase cristalline.

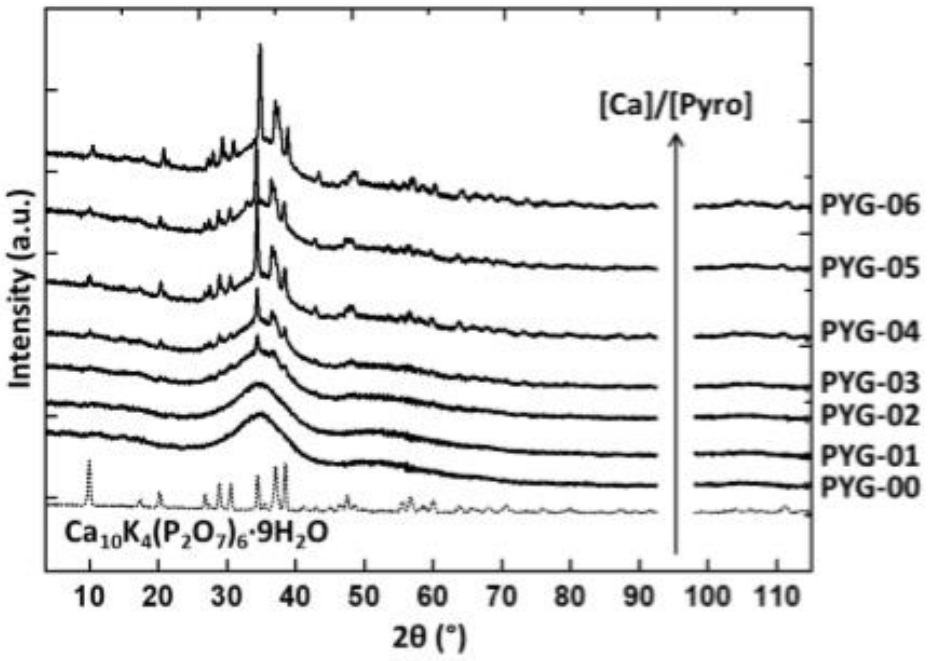


Figure I.15 : Diagrammes de diffraction des RX des matériaux mixtes d'ortho et pyrophosphates de calcium et de potassium, en fonction du rapport Ca/pyrophosphate initial en solution, comparés au diagramme DRX d'une phase $Ca_{10}K_4(P_2O_7)_6.9H_2O$ de référence[87].

Ce procédé à basse température ouvre des perspectives pour le développement de nouveaux matériaux à base de pyrophosphate et d'orthophosphate de calcium. En effet, lorsque le rapport Ca/pyro est faible un matériau amorphe mixte ortho-/pyrophosphate de calcium hydraté contenant du potassium était obtenu. L'hypothèse avancée au cours de cette étude était que l'hydrolyse du pyrophosphate due à la présence d'eau dans la structure formerait de petites quantités d'ions orthophosphate. La coexistence d'ortho et de pyrophosphate dans la composition du matériau inhiberait sa cristallisation[89,90]. Le contrôle de la structure et de la composition du matériau en fonction du rapport Ca/pyro en solution permettrait donc de synthétiser un matériau à différents ratios ortho-/pyrophosphate. Comme vu précédemment le pyrophosphate est un régulateur de la minéralisation osseuse en inhibant la cristallisation de l'apatite d'une part, et en formant par hydrolyse par des enzymes présentes *in vivo* de l'orthophosphate, brique élémentaire de la phase minérale de l'os, d'autre part. Ainsi, une famille de matériaux possédant différents rapports ortho-/pyrophosphate semble intéressante afin de contrôler la dégradation du matériau *in vitro* et *in vivo*.

I.2.3.3.2 Les matériaux mixtes ortho/pyrophosphate de calcium contenant du sodium

Sur la base de la synthèse des matériaux à base de pyrophosphate de calcium et de potassium décrite précédemment, le CIRIMAT a également pu synthétiser des matériaux mixtes d'ortho et pyrophosphate de calcium et de sodium, appelés NaPYG, en utilisant dans ce cas un mélange de deux précurseurs phosphates (pyrophosphate tétrasodique et orthophosphate de sodium). En effet, le sodium a remplacé le potassium dans la composition du matériau pour éviter tout problème de santé pouvant être lié à un excès de potassium dans l'organisme (hyperkaliémie)[91] et la mise en œuvre de mélanges d'ortho et pyrophosphates devaient permettre d'obtenir des matériaux amorphes. L'étude de ces matériaux et en particulier la compréhension des mécanismes de formation et l'influence de certains paramètres de synthèse de cette famille de matériaux a fait l'objet de la thèse de L. Mayen[92].

Afin de synthétiser les matériaux NaPYG, une solution de phosphate à différents rapports ortho / (ortho + pyro) phosphates est préparée en dissolvant du phosphate trisodique dodecahydraté ($Na_3PO_4.12H_2O$) et du pyrophosphate tétrasodique anhydre ($Na_4P_2O_7$) dans 400 mL d'eau déionisée pour étudier l'influence de ce rapport sur la structure et la composition du matériau final. Le précurseur $Na_4P_2O_7$ est préalablement obtenu en chauffant de l'hydrogénophosphate (Na_2HPO_4) à 400°C pendant 1 nuit. La pureté du précurseur de pyrophosphate est contrôlée par DRX, spectroscopies Raman et RMN en phase solide du ^{31}P. Une solution de calcium de concentration 0,09 M est élaborée séparément en dissolvant du $CaCl_2.2H_2O$ dans 40 mL d'eau déionisée et est ajoutée à la solution de phosphate sous agitation magnétique. Après 5 minutes d'agitation la solution colloïdale est centrifugée à 7500 tours/minutes pendant 5 minutes et lavée plusieurs fois à l'eau déionisée. Après trois centrifugation/lavages le gel obtenu est séché à 70°C pendant 7 jours. Le nombre de moles de précurseurs de sels de calcium et de phosphates impliqués dans les solutions initiales de calcium et de phosphates, ainsi que le rapport molaire, le pourcentage et le pH après mélange des deux solutions sont indiqués dans le tableau I.2. Les matériaux à base d'ortho/pyrophosphate de calcium et de sodium sont appelés NaPYG-0X0. Plus X est grand, plus la solution initiale est composé d'une proportion élevée d'orthophosphate (X = 0 : solution sans précurseur orthophosphate et X = 6 : solution sans précurseur pyrophosphate).

Tableau I.2: Nombre de moles de précurseurs de sels de calcium et de phosphates impliqués dans les volumes des solutions initiales. Le rapport molaire, le pourcentage et le pH après mélange des deux solutions sont également indiqués [Mayen-2020].

NaPYG	-000	-010	-020	-030	-040	-050	-060
$CaCl_2.2H_2O$ (mM)				7,21			
$Na_4P_2O_7$ (mM)	33,3	28,3	23,3	16,7	10	5	0
$Na_3PO_4.12H_2O$ (mM)	0	5	10	16,7	23,3	28,3	33,3
PO_4^{3-} / ($P_2O_7^{4-}$+PO_4^{3-}) (en %)	0	15	30	50	70	85	100

Il a été montré que ces matériaux amorphes sont composés seulement d'éléments chimiques (Ca, ortho et pyrophosphates, Na) présents *in vivo*, ce qui devrait rendre leur toxicité envers le tissu osseux faible voire nulle, les rendant adaptés à des applications de comblement osseux. Une caractérisation multi-échelles des matériaux NaPYG-0X0 a été entreprise par DRX, spectroscopie Raman, MEB, RMN et ATG[93].

La figure I.16[92] montre que les matériaux élaborés avec de l'ortho et du pyrophosphate sont donc totalement amorphes, et que ceux composés uniquement d'orthophosphate ou uniquement de pyrophosphate sont cristallisés. La phase cristalline pour le matériau NaPYG-000 a été identifiée comme correspondant à un composé de pyrophosphate de calcium et sodium hydraté, la canaphite-α et celle pour le matériau NaPYG-060 correspond à une apatite nanocristalline biomimétique.

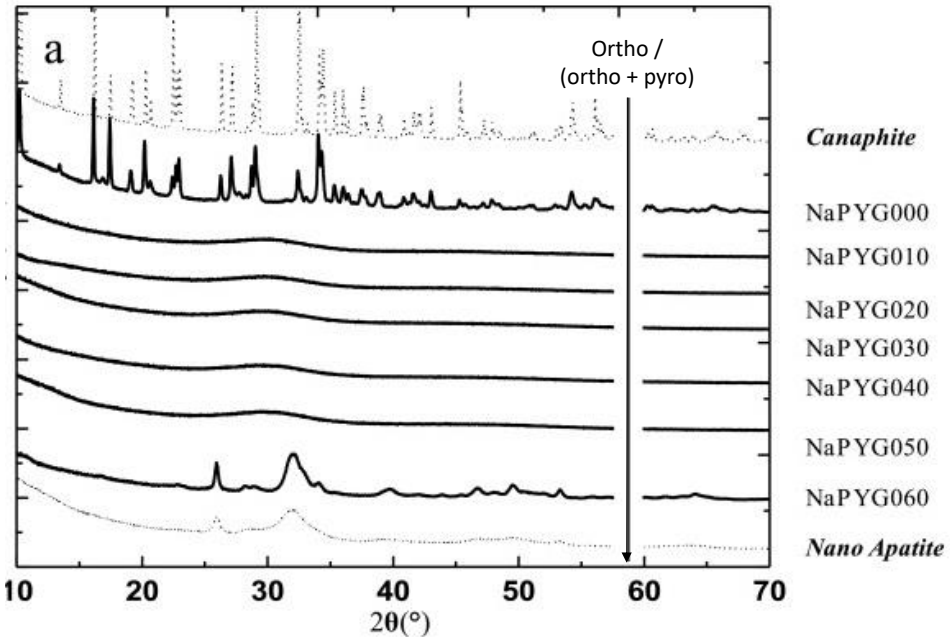


Figure I.16 : Diagrammes de diffraction des RX des matériaux mixtes ortho et pyrophosphates de calcium et de sodium NaPYG-0X0 en fonction du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates initial en solution comparés aux diagrammes RX de référence des phases canaphite-α et apatite nanocristalline[91].

Pour les matériaux NaPYG-0X0, six domaines principaux ont pu être distingués par spectroscopie Raman pour les entités phosphates (Figure I.17)[92]:

(i) Un domaine entre 410–650 cm^{-1} correspondant aux bandes vibrationnelles des ions orthophosphate et pyrophosphate (δPO_3 et ρPO_3 de P_2O_7 et $\nu_4 PO_4$).

(ii) Quatre domaines attribués aux entités pyrophosphate uniquement, dont le mode de déformation de la liaison POP (δPOP) autour de 350 cm^{-1}; l'élongation symétrique de POP (ν^sPOP, entre 695 et 795 cm^{-1}), et les raies intenses de $\nu^s PO_3$, entre 1015 et 1070 cm^{-1} et de $\nu^{as} PO_3$ entre 1080 et 1195 cm^{-1}.

(iii) Un domaine correspondant principalement à l'élongation symétrique des entités orthophosphates ($\nu^s PO_4$) entre 915 et 990 cm^{-1}.

Pour NaPYG-000 et NaPYG-060, seules les bandes associées respectivement aux ions pyrophosphate ou orthophosphate ont été observées. De plus, ces bandes, en particulier $\nu^s PO_4$ (orthophosphate) et $\nu^s PO_3$ (pyrophosphate) se sont révélées plus étroites que pour les autres compositions. Ce qui indique la présence prédominante d'environnements bien définis appartenant à des phases cristallines, correspondant à la canaphite-α pour NaPYG-000 et à l'apatite nanocristalline pour NaPYG-060 comme analysé par DRX (Fig.I.17). Pour les autres compositions, de larges bandes typiques des phases amorphes ont été observées. Compte tenu de

la bande $\nu^{s}PO_4$ de l'ion orthophosphate à 955 cm^{-1}, son intensité a augmenté, avec l'augmentation de la proportion relative d'ions orthophosphate dans la solution initiale (de NaPYG-010 à NaPYG-050). Cette tendance est opposée pour la bande d'élongation du pyrophosphate ($\nu^{s}PO_3$ à 1038 cm^{-1}), montrant une diminution du pyrophosphate lorsque le rapport orthophosphate / (ortho + pyro) phosphates dans la solution de synthèse a augmenté.

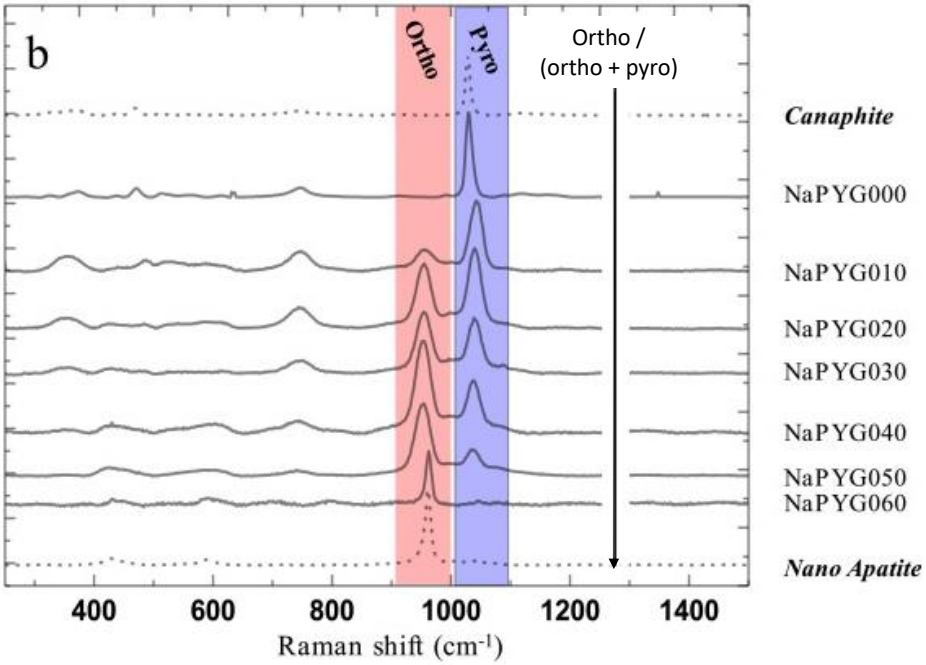


Figure I.17 : Spectres Raman des matériaux mixtes ortho et pyrophosphates de calcium et de sodium NaPYG-0X0 en fonction du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates initial en solution, comparés avec les spectres de référence des phases canaphite-α et apatite nanocristalline[91].

L'aspect macroscopique des particules de matériaux synthétisés apparait différent pour les compositions étudiées (Figure I.18)[92] : une poudre fine est obtenue pour le NaPYG-000, alors que les autres compositions présentent des grains de plusieurs millimètres. Les observations en microscopie électronique à balayage montrent que : NaPYG-000 est composé de grains de diamètre compris entre 20 et 100 µm. Ces grains sont soit des sphérulites, soit des faisceaux de cristaux en forme de plaquettes d'environ 2 µm de largeur et 0,5 µm d'épaisseur. Pour les autres échantillons, après broyage, les particules semblent avoir des formes angulaires, avec des surfaces de fracture lisses et compactes et des morphologies irrégulières.

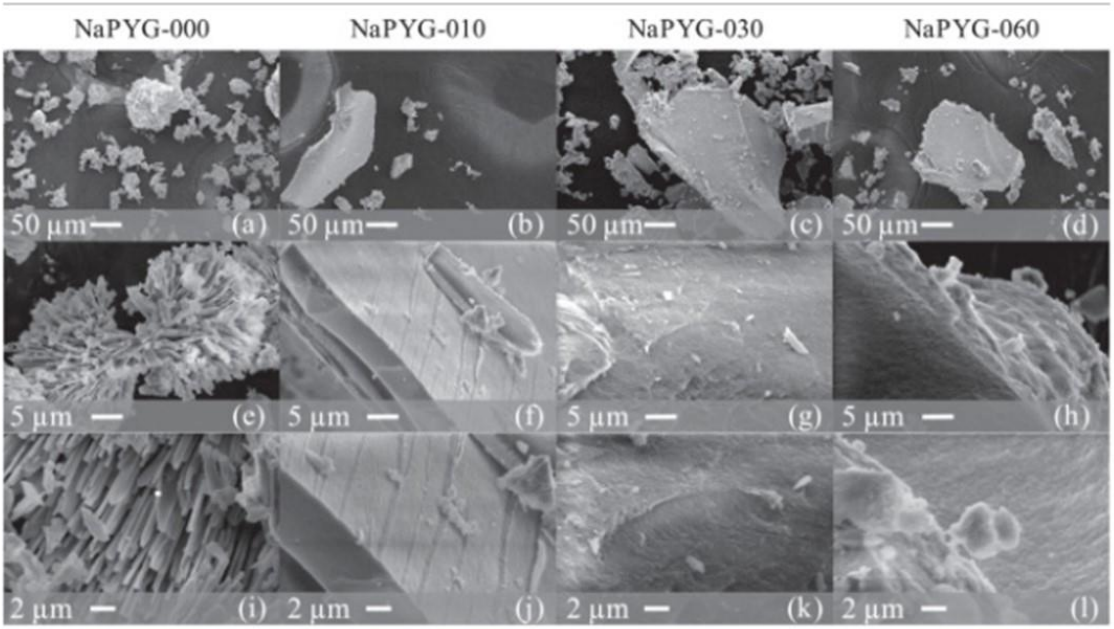


Figure I.18 : Micrographies MEB des matériaux mixtes ortho et pyrophosphates de calcium et de sodium NaPYG-000, -010, -030 et -060 observés à différents grossissements[91].

L'analyse ATG des matériaux NaPYG-0X0 permet de déterminer la quantité d'eau structurale associée aux matériaux NaPYG-0X0 : 20,1%, 13,7%, 15,3% et 4,9% pour NaPYG-000, NaPYG-010, NaPYG-030 et NaPYG-060, respectivement. Elle varie significativement en fonction de la composition du matériau.

Les analyses RMN en phase solide du noyau ^{31}P des matériaux NaPYG-0X0 représentées sur la figure I.19 confirment les tendances générales observées en spectroscopie Raman (Fig.I.17). En effet, deux régions sont examinées sur les spectres ; elles correspondent majoritairement aux différents types d'unités phosphates : (i) entre 8 et -1 ppm principalement pour les espèces orthophosphate, (ii) entre -2 et -10 ppm pour les espèces pyrophosphate. Pour NaPYG-000 et NaPYG-060, des résonances plus étroites sont observées, respectivement attribuées à l'environnement pyrophosphate de la canaphite-α (-2,5 et -5,8 ppm) et à l'environnement orthophosphate de l'apatite nanocristalline (2,8 ppm). Dans le cas du NaPYG-000, un large composant sous-jacent dû à l'environnement pyrophosphate est également observé, représentant ~ 23% de l'intensité globale du phosphore, indiquant que NaPYG-000 contient également une composante amorphe (en plus de la canaphite-α). Pour les échantillons NaPYG-010 à NaPYG-050, de larges résonances sont observées pour ces matériaux amorphes. Leur intensité relative s'est avérée varier de la même manière que le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates dans la solution initiale, ce qui est conforme aux analyses spectroscopiques Raman (Fig.I.17).

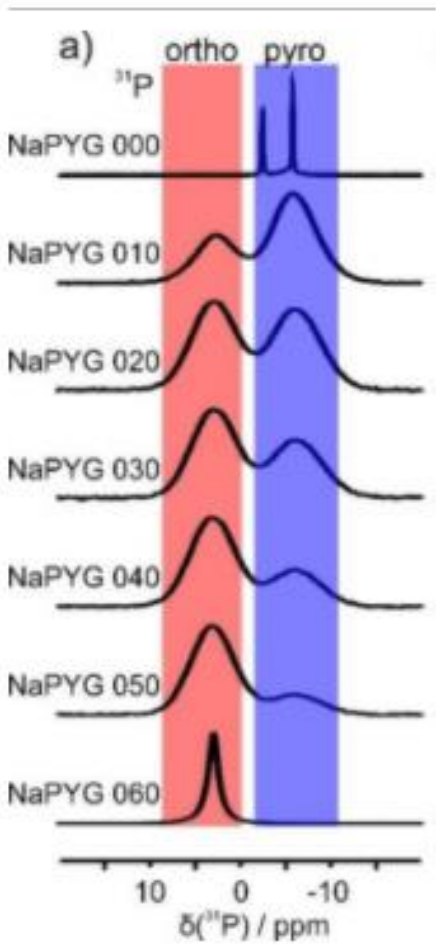


Figure I.19 : Spectres RMN en phase solide du ^{31}P des matériaux NaPYG-0X0[91].

Ces différentes caractérisations ont permis de conclure que la quantité d'orthophosphate et de pyrophosphate dans le matériau final étaient directement corrélés au rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates dans la solution initiale. De plus, une hypothèse sur la formation des matériaux amorphes NaPYG-0X0 (X = 1 à 5) a pu être émise. Ainsi, le solide amorphe serait composé par l'agrégation de colloïdes d'ortho et de pyrophosphates de calcium liés entre eux par l'eau interstitielle dont la structuration est influencée par le sodium.

Le contrôle du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates permettrait éventuellement de contrôler la biorésorbabilité de ces matériaux amorphes. En effet, le pyrophosphate est capable de s'hydrolyser en orthophosphate *in vivo* notamment *via* l'effet d'enzymes (PAL). Ainsi, le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates pourrait être modulé selon l'application de comblement osseux et la vitesse de résorption du matériau visée.

L'étude de l'évolution *in vitro* de ces matériaux, couplée à l'étude de leur implantation *in vivo* permettrait d'améliorer la compréhension et de valider ou d'infirmer l'hypothèse précédente, et *in fine* d'évaluer le potentiel de ces matériaux pour le comblement osseux.

I.3. Etude de l'évolution de matériaux bioactifs en milieu aqueux

L'étude des produits de dissolution ionique ou dégradation des matériaux bioactifs est essentielle afin de comprendre le comportement physico-chimique et la bioactivité du matériau en environnement physiologique[94]. De plus, ces connaissances permettraient de produire des biomatériaux avec une cinétique de libération d'ions contrôlée pour induire une réponse biologique adaptée pour une application spécifique. Il a été démontré qu'une libération à des concentrations précises de certains éléments comme le calcium (entre 2 et 8 mmol)[95] et le phosphate (environ 10 mmol)[96] par exemple, permettent une régulation de la formation osseuse optimale.

L'implantation *in vivo* sur un modèle animal voire humain reproduit idéalement les conditions réelles mais pour des raisons éthiques, il est nécessaire de s'affranchir le plus possible de ces tests. Pour cette raison, des études dans des milieux modèles ou biologiques pouvant évaluer la bioactivité d'un matériau ont été proposées par Kokubo[97]. Cette méthode consiste à immerger un matériau dans un milieu tampon avec des concentrations ioniques pratiquement équivalentes à celles du plasma humain (simulated body fluid : solution SBF) et d'observer si une couche d'apatite se forme sur la surface du matériau. La méthode de Kokubo sera examinée et discutée plus loin dans ce chapitre. Des tests d'évolution dans des milieux moins complexes comme de l'eau à différents pH ou des milieux plus spécifiques au matériau étudié, c'est-à-dire composés de protéines ou d'enzymes présentes *in vivo* pouvant réagir avec celui-ci, ont permis de donner des indications sur l'évolution physico-chimique de certains matériaux en milieu *in vivo*. Toutes ces études corrélées aux expériences en présence de cellules, ainsi que celles d'implantations *in vivo* peuvent apporter une description complète de l'évolution physico-chimique et biologique d'un matériau étudié.

Les études d'évolution en milieu aqueux peuvent être effectuées par une méthode statique, dynamique ou semi-dynamique.

- La méthode statique : le matériau est immergé en solution et l'étude se réalise sans agitation.
- La méthode semi-dynamique : le matériau est immergé en solution et l'étude se réalise avec agitation.
- La méthode dynamique : le matériau est immergé en solution, l'étude se réalise avec agitation en changeant le milieu après chaque prélèvement pour se rapprocher d'un modèle de circulation d'un fluide biologique.

La méthode dynamique est celle qui reproduit le mieux les conditions *in vivo* pour lesquelles les fluides biologiques sont circulants et les cellules actives. Le tableau I.3 présente une liste non exhaustive des éléments présents dans la composition du sang et du plasma sanguin.

Tableau I.3: Composition du sang (en rouge) et dans le plasma (en vert) en pourcentage volumique.

Elément	Quantité présente dans 1 µL de sang
Globules rouges (érythrocytes)	4-6 millions
Globule blancs (leucocytes)	5000-11000
Plaquettes (thrombocytes)	150000-300000
Eau	90-92 % du plasma
Protéines (albumines, fibrogènes, globulines)	7-8% du plasma
Sels (chlorure, sulfate)	< 1%
Gaz (oxygène, dioxyde de carbone)	< 1%
Nutriments (lipides, glucose, acides aminés)	< 1%

I.3.1. Evolution en milieu aqueux simple

Le fluide biologique est une solution aqueuse liquide à pH = 7,4 composée d'énormément de cellules, de protéines, de glucose et d'un grand nombre d'ions minéraux comme le montre le tableau I.3. Mais la principale composante du sang est son solvant : l'eau. Dans une première approche, il est intéressant d'étudier l'évolution d'un matériau dans de l'eau déionisée.

L'usage de ce type de milieu permet de comprendre le comportement physico-chimique voire la solubilité du matériau dans un milieu aqueux simple, dénué de cellules et d'ions inorganiques. Le comportement du matériau est la plupart du temps analysé en mesurant le relargage des ions et la modification du pH en solution. Il est possible de modifier les paramètres physico-chimiques afin d'accélérer la dégradation du matériau. Par exemple, une étude d'évolution de verres de métaphosphate de calcium contenant du sodium ($(50\text{-}x)Na_2O\text{-}xCaO\text{-}50P_2O_5$) dans l'eau à différents pH et à différentes températures a montré qu'en diminuant le pH

jusqu'à 3[98] ou en augmentant la température à environ 100°C[99], l'hydrolyse des poly/pyrophosphates était accélérée.

De plus, lors d'une implantation chirurgicale, une phase d'inflammation intervient et contribue à une baisse locale du pH jusqu'à des valeurs acides (pH 4-5)[100]. Il peut donc aussi être pertinent d'étudier l'évolution d'un biomatériau en milieu aqueux acide de manière à simuler les conditions de l'inflammation post-opératoire. Ces études donneront un premier aperçu des phénomènes de dégradation, dissolution ou corrosion que le matériau peut subir en milieu aqueux acide.

I.3.2. Evolution en milieux tampons acellulaires : une norme ISO controversée

La capacité d'un matériau à se lier à l'os est très souvent évaluée par le fait qu'une couche d'apatite se forme sur sa surface lorsque celui-ci est immergé dans un fluide biologique. Depuis maintenant quatre décennies, le simulated body fluid (SBF) est une solution ionique utilisée pour simuler *in vitro* le plasma sanguin. La solution SBF est un milieu tamponné à pH = 7,4 avec du TRIS et du HCl et dont les concentrations ioniques sont presque égales à celles présentes dans le plasma humain (Tableau I.4). La solution SBF a ensuite subi des révisions afin de réévaluer les concentrations en calcium et en magnésium. En effet, *in vivo* ces éléments sont en grande partie liée aux protéines et ne sont donc pas disponibles en solution pour participer à la précipitation de l'apatite.

Tableau I.4 : Concentrations ioniques dans différents milieux tamponnés de type SBF, comparées à celles dans le plasma sanguin humain[101].

	Ion concentration (mM)							
	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	HCO_3^-	HPO_4^{2-}	SO_4^{2-}
Human blood plasma [15]	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
Original SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0	0
Corrected SBF (c-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5
Revised SBF (r-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
Newly improved SBF (n-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	4.2	1.0	0.5

La méthode consiste à immerger le matériau dont on veut tester la « bioactivité » sous forme de monolithe ou de poudre dans la solution SBF à 37°C pendant plusieurs jours (entre 1 et 30 jours). Ensuite, le matériau est récupéré, rincé à l'eau distillée et séché. La présence d'apatite sera confirmée par caractérisation par DRX et l'épaisseur de la couche en surface par MEB.

Ce test est donc connu pour « prédire » si un matériau pourra se lier à l'os *in vivo*, et permet de réduire le nombre d'expériences d'implantation sur les animaux. Divers types de matériaux sous forme de granulés ou de blocs tels que les verres à base de silicate[102,103] ou de phosphates[104,105], ainsi que des revêtements de phosphates de calcium sur des substrats métalliques[106,107], des hydrogels contenant des bioverres[108] et d'autres matériaux ont été testés dans le SBF. Après quelques jours, ces matériaux ont formé une couche d'apatite à leur surface (figure I.20)[109] prouvant ainsi leur « bioactivité ».

De plus, la méthode d'évolution dans le SBF a été proposée dans la norme ISO 23317 : 2014 intitulée *Implants chirurgicaux — Évaluation in vitro de la capacité de formation d'apatite des matériaux d'implants* en tant que solution pour la mesure *in vitro* de la capacité de formation d'apatite à la surface des matériaux implantables.

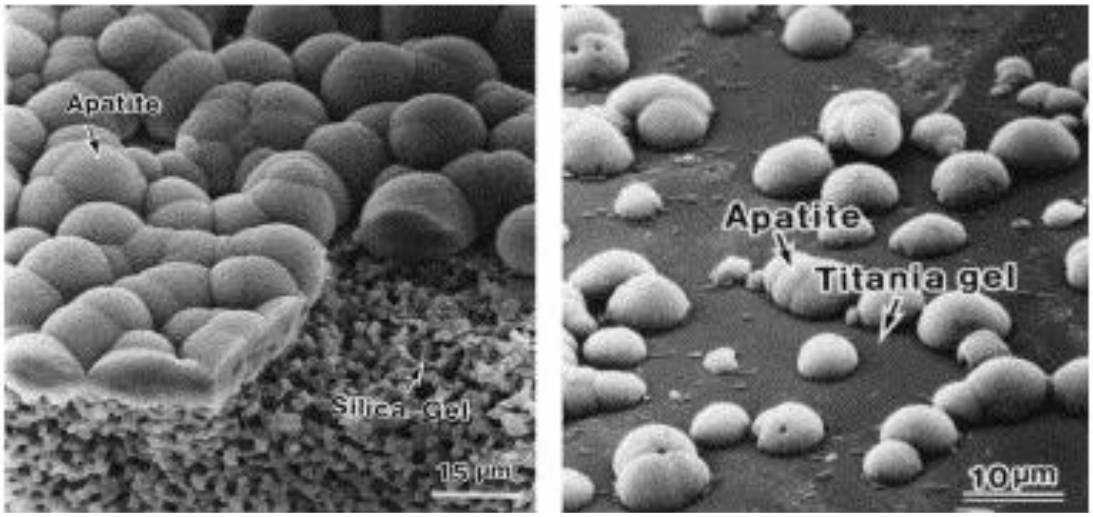


Figure I.20 : Images MEB d'une couche d'apatite formée sur un gel de silice (à gauche) et un gel de titane (à droite) après 2 semaines d'immersion dans le SBF[107].

Cette norme reste cependant controversée par la communauté scientifique[31], puisque le SBF est une solution métastable et hautement sursaturée vis-à-vis de l'apatite. Elle a donc tendance à se stabiliser en formant de l'apatite, quel que soit le matériau immergé en solution, phénomène qui peut être accentué par la libération des ions du matériau étudié. Par exemple, le bioglass® induit une augmentation locale du pH une fois immergé dans le SBF ce qui diminue la solubilité de l'apatite et accélère sa germination et croissance.

Ensuite, contrairement à ce qui est admis, la teneur en carbonate du SBF n'est pas contrôlée et peut varier lors de l'étude. Les carbonates agissant comme un tampon de pH[110], vont ainsi modifier le niveau de sursaturation de la solution vis-à-vis de phosphates et carbonates de calcium. De plus, la solution SBF ne contient pas d'acides aminés ou de protéines connus pour jouer un rôle majeur lors de la germination de l'apatite[111]. A cause de ces inconvénients, les tests dans le SBF ont pu conduire à des résultats faussement positifs mais aussi négatifs. C'est ainsi qu'une couche d'apatite s'est formée sur la couche de sulfate de calcium dihydraté ($CaSO_4,2H_2O$) lorsqu'il a été immergé dans le SBF[112], alors que lors de son implantation *in vivo* ces matériaux sont trop vite résorbés pour former une liaison avec le tissu osseux[113]. On notera aussi qu'une fois immergé dans le SBF le β-TCP ne forme pas toujours une couche d'apatite alors qu'il en forme lors de son implantation, et forme même une liaison avec l'os[114].

La solution SBF de la norme ISO 23317:2014 présente en plus des inconvénients lors de sa préparation, l'ajout consécutif de réactifs cationiques et anioniques pouvant entraîner une précipitation prématurée de phosphate de calcium, et le non contrôle de la teneur en carbonate étant susceptible de modifier le pH de la solution lors de leur ajout.

En conclusion, les études d'évolution dans le SBF peuvent fournir des informations intéressantes sur les propriétés physico-chimiques des matériaux mais cette solution est encore loin d'imiter les conditions *in vivo* et sa préparation devrait être révisée une nouvelle fois pour mieux contrôler notamment sa concentration en ions carbonate.

Pour éviter les sursaturations provoquées par les espèces interférentes dans le SBF, certaines études d'évolution sont réalisées en immergeant les matériaux seulement dans une solution de TRIS. Lee et al. ont étudié la différence d'évolution d'un verre inversé de composition $MgO\text{-}CaO\text{-}P_2O_5\text{-}Nb_2O_5$ avec des pourcentages molaires d'oxyde de phosphate différents, dans un milieu TRIS pendant 7 jours[115] et ont montré que le verre dont la concentration en P_2O_5 est la plus faible se dégrade plus que le verre avec une concentration plus élevée. Des études d'évolution de 75 mg de verre 45S5 dans une solution TRIS (50 mL) à différents pH (5, 7,3 et 9) pendant 3 jours ont également été réalisées afin d'observer l'influence du pH[116]. Ils ont montré que plus le pH était bas et plus la concentration ionique libérée en solution était élevée, en raison d'un échange d'ions plus rapide, entrainant la formation d'une couche d'apatite carbonatée à la surface du verre plus rapidement. Cette solution permet ainsi d'étudier plus facilement le relargage ionique du matériau et l'évolution du pH, ainsi que la formation d'une couche d'apatite carbonatée liée uniquement à la libération ionique[116].

Comme l'ont suggéré Maçon et al.[117], afin d'unifier les tests d'évolution en milieu aqueux pour des matériaux amorphes sous forme de poudre, il est important de mettre en œuvre un rapport massique matériau/solution identique et de s'assurer de la reproductibilité des essais.

Pour se rapprocher le plus possible de l'environnement *in vivo*, des études d'évolution dans des milieux de culture cellulaire sans cellules[118] couplées à des tests cellulaires *in vitro* peuvent être envisagées.

I.3.3. Evolution en milieu en présence d'enzymes

Lors de son implantation, le biomatériau interagit avec des cellules, notamment les ostéoblastes dont la membrane plasmique renferme des enzymes, et plus particulièrement la phosphatase alcaline (PAL) qui hydrolyse les entités pyrophosphate en orthophosphate. Les matériaux de type pyrophosphate de calcium amorphes sont connus pour être très stables ; on estime que l'hydrolyse des ions pyrophosphate sans enzyme nécessite entre 10 et 100 ans[47]. La catalyse enzymatique est donc un phénomène primordial pour permettre aux pyrophosphates de jouer un rôle dans la minéralisation osseuse en sursaturant les fluides corporels en orthophosphate.

Des études sur la dissolution de pyrophosphates cristallisés (CPPD)[119] ou de métaphosphate (HMP)[120] par des enzymes de type phosphatase alcaline à pH = 7 en milieu tampon ont montré que la dissolution des polyphosphates (et donc du pyrophosphate) pouvait être contrôlée par l'activité enzymatique et que la distance entre l'enzyme et la surface du cristal doit être proche pour que la catalyse se produise. Shinozaki et al.[119] ont émis l'hypothèse que les enzymes phosphatase alcaline étaient capables de se lier à la surface du matériau afin d'hydrolyser le pyrophosphate directement dans le matériau.

Une étude évaluant l'interaction entre la phosphatase alcaline et un pyrophosphate de calcium amorphe de composition $Ca_2P_2O_7.4H_2O$ dans une solution tampon TRIS/HCl à 37°C[56] a été réalisé en présence ou non d'enzymes pendant 6 heures. Les concentrations d'enzymes utilisées lors de cette étude était de 20 U de PAL dans 10 mL de solution TRIS pour 10 mg de matériau. A titre de comparaison la concentration en phosphatase alcaline dans les fluides biologiques est de 20 à 140 U/L mais peut varier en fonction de l'âge, du sexe ou lors de la minéralisation des tissus[121]. Les résultats ont montré que la présence de phosphatase alcaline dans le milieu augmentait la libération en ions orthophosphate par rapport au témoin. De plus, des expériences *in vitro* ont été réalisées dans lesquelles les PAL ont été exposées directement au pyrophosphate de calcium et séparées de sa surface par une membrane semi-perméable. Ces expériences n'ont montré aucune différence entre les degrés de dégradation lorsque les PAL avaient ou non accès à la surface du cristal. Grover et al.[56] ont alors suggéré que la liaison entre l'enzyme et le matériau de pyrophosphate de calcium n'était pas un facteur significatif de sa dégradation enzymatique. Mais plutôt que l'élimination des ions pyrophosphate en solution couplée à celle des ions orthophosphate due à la minéralisation en était la cause principale. Cette

étude vient confirmer que les enzymes hydrolysent les pyrophosphates de calcium, libérant en grande quantité des ions calcium et phosphates qui peuvent par la suite précipiter en apatite et ainsi participer à la minéralisation du tissu.

I.3.4. Tests *in vitro* cellulaires

Avant d'implanter les matériaux, il est obligatoire de tester leur toxicité sur des cellules. Les tests *in vitro* cellulaires sont réalisés par la mise en contact du matériau ou de ses extraits avec des cellules cibles. Par la suite la viabilité des cellules est analysée par des méthodes de coloration. Par exemple la méthode au rouge neutre colore seulement les lysosomes des cellules viables, puis après trypsinisation et lavage, les cellules libèrent le colorant. Le nombre total de cellules viables est déterminé par la quantité de colorant mesurée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 540 nm. Les cellules les plus utilisées pour des tests de cytotoxicité sur des matériaux de comblement osseux sont les cellules souches humaines de moelle osseuse (human bone marrow stromal cell : HBMSc). Les HBMSc sont des cellules souches de la moelle osseuse dont les processus impliquant leur différenciation a déjà été élucidé. Lorsque ces cellules se différencient en ostéoblastes, elles expriment des gènes spécifiques à cette différenciation. Ces gènes sont appelés marqueurs de la différenciation ostéoblastique et sont exprimés à différents stades de ce processus. On peut noter par exemple Runt-related transcription factor 2 (RunX2) qui initie la différenciation ou même la phosphatase alcaline (PAL) qui est exprimée par les ostéoblastes lors de la minéralisation osseuse. La PAL est donc considérée comme un marqueur tardif de la différenciation cellulaire.

Pour étudier la réponse cellulaire vis-à-vis de biomatériaux, il est nécessaire de le mettre en contact direct ou indirect des cellules (figure I.21)[122]. Lors des tests de contact direct, les cellules sont ensemencées sur le matériau déposé au fond de la boite de culture, alors que la méthode indirecte consiste à immerger le matériau dans un milieu de culture qui est ensuite extrait (sans le matériau), et les cellules sont immergées dans cet extrait et la toxicité de l'extrait contenant les éléments libérés par le matériau sur les cellules est ensuite mesuré.

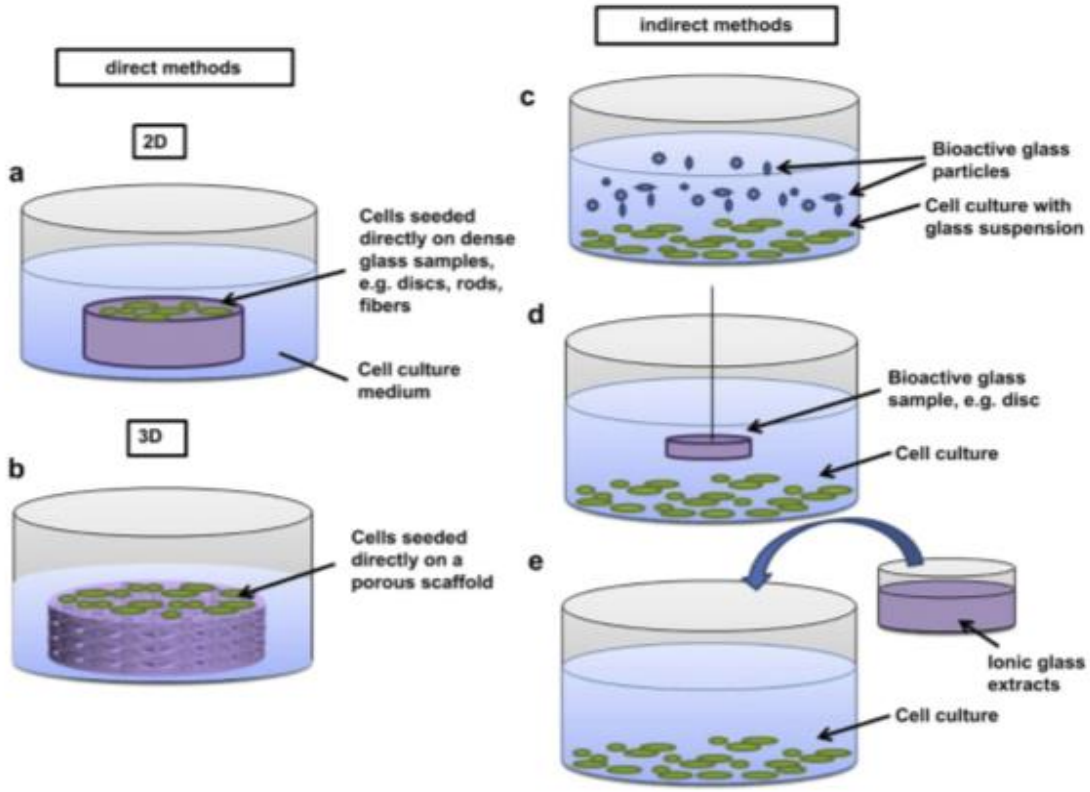


Figure I.21 : Représentation schématique des méthodes *in vitro* de mise en contact direct ou indirect des cellules avec les matériaux à tester[120].

De nombreuses études sur des matériaux de comblement osseux comme des bioverres[123,124] ou des apatites[125] ont montré que ces matériaux augmentaient l'activité de la phosphatase alcaline, ainsi que celle de l'ostéocalcine par rapport au témoin. Ce qui montre leur capacité à favoriser la différenciation et la prolifération ostéoblastique.

Cependant, les conditions *in vitro* sont encore très différentes des conditions *in vivo*, il n'est donc pas possible de transposer parfaitement le comportement *in vitro* du matériau à celui *in vivo*.

I.3.5. Evaluation d'un biomatériau *in vivo* dans un modèle animal

Les implantations *in vivo* sur les animaux ne peuvent pas être totalement remplacées par des tests *in vitro*. L'objectif principal des implantations est de tester comment le matériau réagit vis-à-vis de l'ensemble de l'organisme. Le choix du modèle animal peut varier en fonction du coût, mais en général, les études commencent sur des animaux de petite taille.

L'avantage majeur du test d'implantation est qu'il permet de se rapprocher le plus possible des conditions cliniques. L'effet du matériau sur l'organe ou tissu cible mais aussi sur des organes

plus éloignés peut être étudié, ainsi que la toxicité de ces produits de dégradation dans l'organisme. Par contre le métabolisme de l'animal est souvent différent de celui d'un humain, donc les résultats et leur interprétation peuvent être différentes. Ces tests sont réglementés par une norme ISO-10-993 qui a pour but de protéger les animaux et êtres humains.

Après implantation des matériaux, couramment dans l'os du fémur ou la *calvaria*, pendant un ou plusieurs mois, les biomatériaux sont explantés et analysés. L'étude du matériau se réalise par l'examen de coupes histologiques permettant l'observation de diverses cellules, tissus, matériaux et débris permettant éventuellement d'identifier la présence d'une encapsulation fibreuse, d'une nécrose osseuse, la présence de cellules inflammatoires ou de débris.

L'implantation de matériaux à base de pyrophosphate a montré qu'un biomatériau à base de pyrophosphate de calcium β est aussi efficace que l'os autologue pour la fusion vertébrale postérolatérale[69] . De plus, des évaluations *in vivo* de ciments à base d'ortho et de pyrophosphates (ciment de brushite contenant du pyrophosphate de calcium amorphe) implantés dans le tibia de moutons ont dévoilé qu'ils se dégradaient plus qu'un ciment à base seulement d'orthophosphate (ciment du brushite) (figure I.22) et que la formation de nouvel os était comparable à celle d'une greffe d'os autologue[56]. Sur la figure I.22, l'os nouvellement formé est coloré en vert, et nous pouvons observer que la formation d'os est plus importante à 6 et 12 mois pour le ciment qui contient du pyrophosphate. La présence de pyrophosphate semble donc stimuler la réparation osseuse.

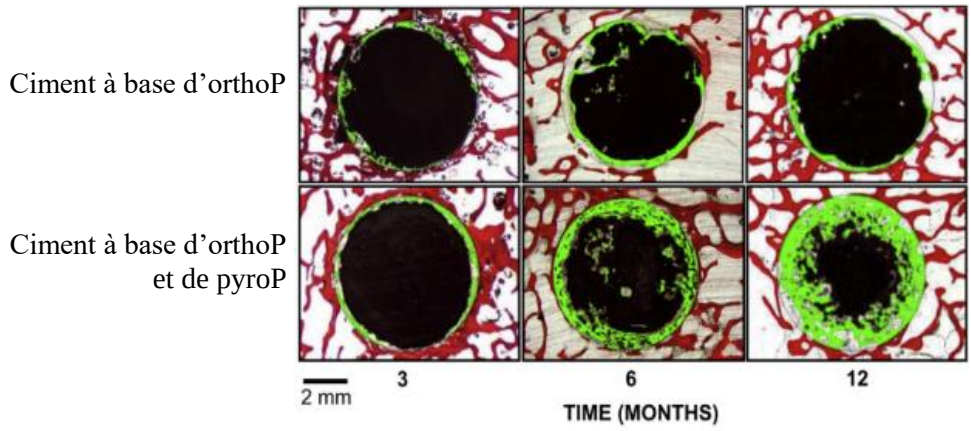


Figure I.22 : Coupes histologiques de ciments à base d'orthophosphate et de pyrophosphate implantés dans des tibias de mouton. L'os spongieux est coloré en rouge et l'os nouvellement formé est coloré en vert[55].

I.4. Objectifs et méthodologie du travail de thèse

Cette revue bibliographique a montré l'importance d'évaluer l'évolution physico-chimique d'un nouveau biomatériau dans différents milieux afin de décorréler l'effet de différents paramètres tels que le pH, la présence d'ions et de molécules présentes *in vivo*, la sursaturation, et *in fine* de réaliser des études de toxicité *in vitro* et des implantations *in vivo*. Ces études aideront également dans l'approfondissement de nos connaissances sur la structure moléculaire de cette nouvelle famille de matériaux amorphes mixtes ortho et pyrophosphates de calcium hydratés. Une meilleure compréhension de l'évolution physico-chimique et biologique *in vitro* de ces nouveaux matériaux permettra de moduler sa structure ou sa composition afin d'optimiser la réponse cellulaire et d'obtenir la meilleure reconstruction osseuse possible lors des implantations.

Les objectifs de cette thèse sont d'étudier les propriétés physico-chimiques et biologiques d'une nouvelle famille de matériaux amorphes ortho et pyrophosphates de calcium et de sodium, appelée NaPYG-0X0. En particulier l'influence du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates dans le matériau final sur ses propriétés de dégradation physico-chimique et ses propriétés biologiques seront examinées. En outre, l'évolution des matériaux amorphes NaPYG-0X0 dans différents milieux nous permettra de (in)valider les hypothèses émises lors de la thèse de L. Mayen[92] sur la structure et la composition de ces matériaux. Ainsi, l'effet de la composition du matériau amorphe (rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates) sur son évolution dans différents milieux *in vitro* et en milieu biologique sera particulièrement étudié afin de déterminer si ce rapport permettrait de contrôler le comportement du matériau dans l'environnement physiologique après implantation. Les matériaux NaPYG-0X0 sous forme de granulés seront immergés en triplicat pendant différentes durées dans différents milieux aqueux modèles et en utilisant un rapport massique matériau/solution toujours égal à 0,15 %. L'étude sera menée dans des milieux de plus en plus complexes : eau ultra-pure à différents pH, milieu acellulaire SBF, milieu de culture α-MEM sans cellule et milieu TRIS en présence ou non de phosphatases alcalines commerciales. La caractérisation complète des matériaux après évolution ainsi que le suivi du pH, de la masse restant en solution et le dosage de tous les ions libérés en solution permettront de déterminer les mécanismes physico-chimiques de leur évolution.

Ces résultats seront couplés aux résultats d'études cellulaires *in vitro* réalisées par le laboratoire BioTis à Bordeaux et aux résultats d'implantations *in vivo* réalisées dans la *calvaria* de rats par le laboratoire B3OA à Paris afin d'évaluer le potentiel de développement de ces nouveaux matériaux amorphes pour des applications de substitution osseuse.

Chapitre II : ÉLABORATION ET CARACTÉRISATION DES MATÉRIAUX MIXTES ORTHO/PYROPHOSPHATE DE CALCIUM HYDRATÉS

La synthèse des matériaux amorphes mixtes ortho/pyrophosphates de calcium hydratés, nommés NaPYG-0X0, a été décrite lors de la thèse de L. Mayen. Cependant les quantités obtenues au cours d'une synthèse ne sont pas suffisantes pour réaliser une étude physico-chimique et structurale complète sur un même lot de matériau[92]. De plus, dans la perspective d'un potentiel développement industriel de ces compositions de matériaux, nous avons cherché à adapter le protocole de synthèse pour obtenir une plus grande quantité de matériaux par lot. Dans ce deuxième chapitre, les différentes étapes de synthèse des matériaux NaPYG-0X0, ainsi que la caractérisation chimique (composition, structure) et physique (microstructure, morphologie, surface spécifique) de ces matériaux seront présentées. L'influence de différents paramètres de synthèse tels que la concentration initiale des précurseurs, le nombre de lavages et la technique de séchage, ainsi que l'influence de la stérilisation sur ces matériaux seront par ailleurs étudiés, notamment pour évaluer le potentiel d'industrialisation de cette méthode de synthèse.

L'ensemble de ces données permettra d'établir la « carte d'identité » des différents matériaux synthétisés, sur laquelle nous nous appuierons pour étudier, dans la suite de ces travaux de thèse, leur évolution dans différents milieux aqueux.

II.1. Synthèse et caractérisation des matériaux amorphes mixtes ortho/pyrophosphates de calcium hydratés : NaPYG-0X0

II.1.1. Choix des matériaux à étudier

Les matériaux amorphes mixtes ortho/pyrophosphates de calcium hydratés NaPYG-0X0 sont synthétisés par une méthode de chimie douce plus précisément par double décomposition en solution aqueuse. Les précurseurs utilisés pour synthétiser les matériaux étudiés sont trois sels commerciaux : le dichlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2,2H_2O$), le phosphate trisodique dodécahydraté ($Na_3PO_4,12H_2O$) et l'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) qui seront utilisés tels quels pour les deux premiers ($CaCl_2,2H_2O$ et $Na_3PO_4,12H_2O$), respectivement comme précurseurs du calcium et de l'orthophosphate. Le sel d'hydrogénophosphate de sodium est, lui, chauffé à 400°C pendant 15 h afin d'obtenir au laboratoire le précurseur de pyrophosphate sous la forme de pyrophosphate de sodium ($Na_4P_2O_7$) selon l'équation de la réaction 1. A cette température, les ions hydrogénophosphate sont condensés en ions diphosphate (pyrophosphate) selon l'Equation II.1.

$$2Na_2HPO_4 \rightarrow Na_4P_2O_7 + H_2O \text{ (Equation II.1)}$$

Le précurseur de pyrophosphate ainsi synthétisé est conservé dans un récipient fermé placé dans un endroit sec (dessicateur) et à l'abri de la lumière pour éviter qu'il s'hydrate et qu'il s'hydrolyse (réaction inverse à la réaction 1) avant son utilisation. Il a été prouvé par DRX et spectroscopie Raman, dans la thèse de L. Mayen que le précurseur de pyrophosphate préparé dans ces conditions correspondait bien à du pyrophosphate de sodium ($Na_4P_2O_7$) pur (sans présence d'orthophosphate et sans protonation) et que la synthèse était reproductible[92].

Afin d'étudier l'influence du rapport ortho / (ortho+pyro) phosphate des matériaux amorphes sur leur évolution physico-chimique lors des études qui vont être réalisées par la suite en milieu aqueux, nous avons décidé de travailler avec trois compositions de matériaux, une contenant une proportion de pyrophosphate majoritaire (NaPYG-010), une avec une proportion majoritaire d'orthophosphate (NaPYG-050) et une présentant des proportions relativement équilibrée d'ortho et de pyrophosphate (NaPYG-030) (Tableau II.1)

II.1.2. Synthèse des matériaux amorphes NaPYG-0X0

La synthèse par double décomposition en solution aqueuse est réalisée à partir de deux solutions préparées respectivement à partir du sel de calcium et des sels de phosphate dissous séparément. La quantité d'ions calcium est la même pour chaque composition de matériau synthétisée, seules les quantités de précurseurs ortho et pyrophosphate sont modifiées afin d'obtenir des ratios ortho / (ortho + pyro) phosphates différents. Les ions ortho et pyrophosphate sont ajoutés en excès par rapport à la quantité stœchiométrique nécessaire pour élaborer les matériaux NaPYG-0X0 afin de tamponner le pH en solution. Les concentrations de précurseurs dans les solutions avant mélange et le rapport molaire ortho / (ortho + pyro) phosphates en pourcentage sont indiqués dans le Tableau II.1.

Les masses de précurseurs de phosphate présentées dans l'annexe II.1 (phosphate trisodique docahydraté et pyrophosphate de sodium) correspondant aux concentrations nécessaires (Tableau II.1) sont dissoutes dans 3200 mL d'eau déionisée. Séparément, 8,5 g de chlorure de calcium ont été dissous dans 320 mL d'eau déionisée. Une fois les solutions de précurseurs calcium et phosphates prêtes, la solution de chlorure de calcium est ajoutée grâce à une pompe péristaltique à un débit de 100 mL/min à la solution de phosphates placée sous agitation magnétique (250 rpm) à température ambiante.

Tableau II.1 : Concentrations initiales des précurseurs calcium et phosphates dans les solutions séparées ainsi que pourcentage molaire (ortho / (ortho + pyro) phosphates dans le mélange réactionnel lors de la synthèse des trois compositions de matériaux NaPYG-0X0 étudiées.

	NaPYG-010	NaPYG-030	NaPYG-050
$CaCl_2,2H_2O$ (mmol.L^{-1}) VWR	180,2	180,2	180,2
$Na_4P_2O_7$ (mmol.L^{-1}) VWR	70,8	41,6	12,5
$Na_3PO_4,12H_2O$ (mmol.L^{-1}) VWR	12,5	41,6	70,8
Pourcentage molaire d'orthophosphate : PO_4^{3-} / ($P_2O_7^{4-}$ + PO_4^{3-})	15	50	85

Les étapes de la synthèse des matériaux amorphes mixtes ortho/pyrophosphates de calcium hydratés NaPYG-0X0 sont schématisées sur la figure II.1.

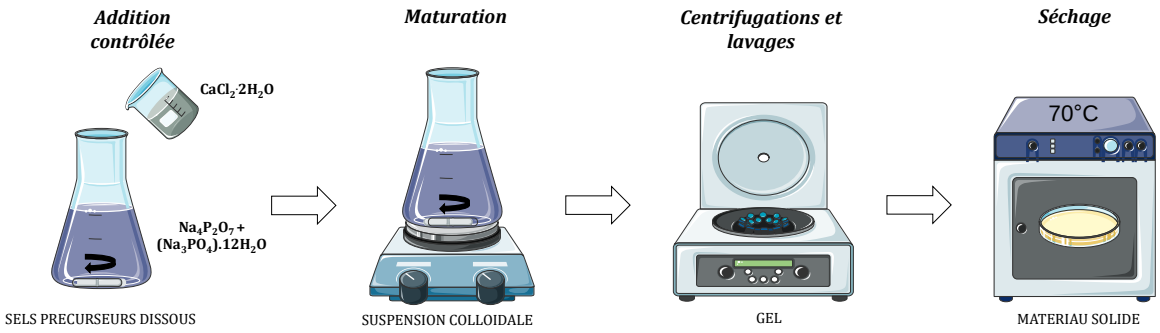


Figure II.1 : Schéma des étapes de la synthèse des matériaux NaPYG-0X0.

L'ajout de la solution de calcium dans la solution de phosphates dure environ 3 min, cette étape est suivie d'une étape de maturation d'environ 2,5 min également sous agitation magnétique. L'étape d'ajout et celle de maturation durent au total 5,5 min. Dès le début de l'ajout de la solution de calcium, on observe que la solution de phosphate se trouble en raison de la formation de colloïdes (Figure II.2). Après l'étape de maturation, la suspension colloïdale est centrifugée à 4200 rpm (g = 4122) avec une centrifugeuse HERAEUS MEGAFUGE 40 R en utilisant un rotor TX10000.

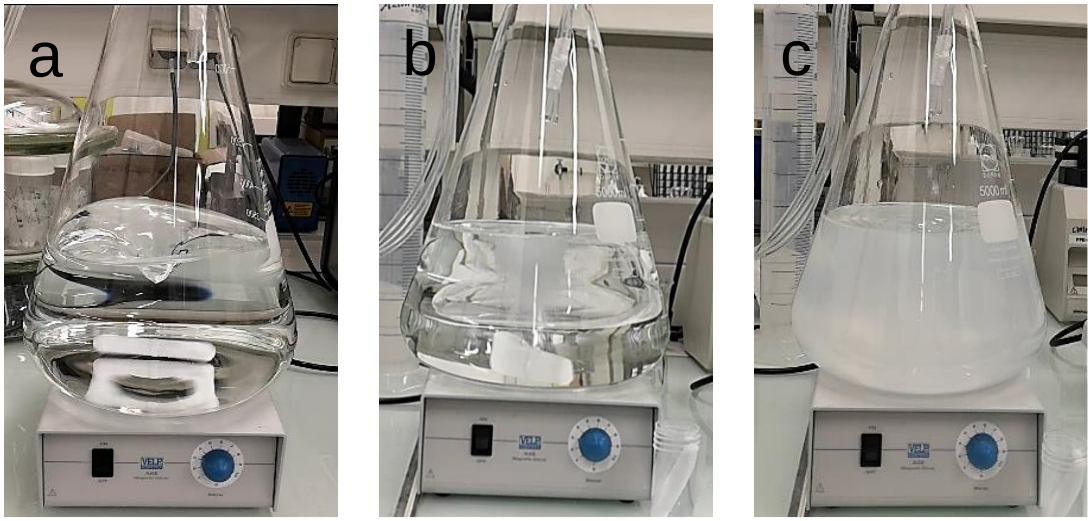


Figure II.2 : Clichés de l'évolution de la solution de phosphate lors de l'ajout de la solution de calcium à t = 0 (a), 10 (b) et 300 (c) secondes après l'ajout de la première goutte.

Suite à cette première étape de centrifugation, le surnageant est éliminé. Le matériau sous forme de gel qui se trouve dans le culot au fond du flacon est ensuite cassé par agitation magnétique (300 rpm) pendant approximativement 2 min ce qui permet d'obtenir une suspension. Cette solution est ensuite lavée en ajoutant 1600 mL d'eau déionisée sous agitation magnétique

pendant 10 minutes afin de permettre d'éliminer les contre-ions chlorure lors d'une nouvelle étape de centrifugation. Ces étapes de centrifugation et de lavage sont reproduites une fois, puis une dernière centrifugation permet d'obtenir un gel qui sera une dernière fois cassé par agitation magnétique pendant environ 1 min sans ajout d'eau et enfin coulé dans un cristallisoir plat et séché à 70°C pendant deux jours à l'étuve. Cette étape déshydrate partiellement et condense le matériau, permettant au gel de passer sous forme solide. Le matériau est ensuite récupéré sous forme de granulés de quelques millimètres de diamètre (Figure II.3).

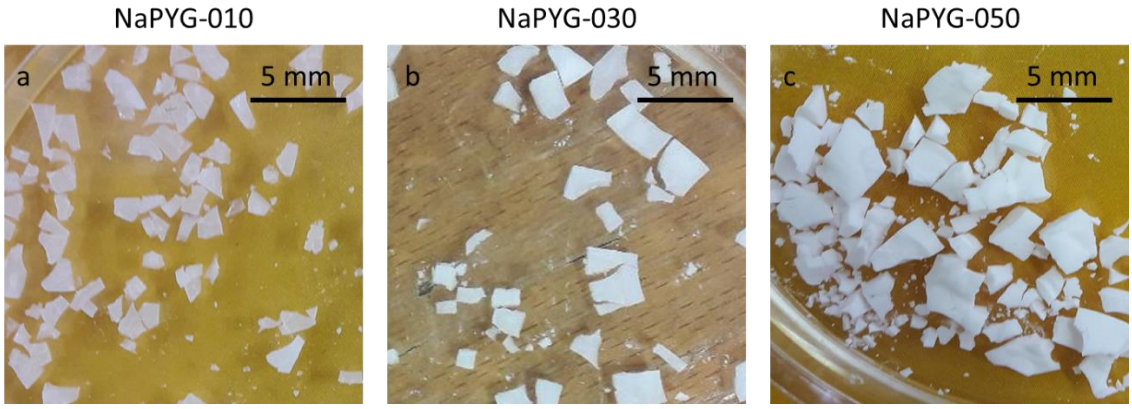


Figure II.3 : Photos des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b) et NaPYG-050 observés à l'issue de l'étape de séchage à l'étuve

Macroscopiquement, les compositions de matériaux NaPYG-0X0 élaborés présentent des différences. Le matériau NaPYG-050, qui a été élaboré avec la proportion initiale de pyrophosphate la plus faible est de couleur blanche, et nous pouvons observer que plus la proportion initiale de pyrophosphate en solution est élevée (de NaPYG-050 à NaPYG-010), plus le matériau devient translucide. En outre, plus la proportion initiale de pyrophosphate en solution est élevée plus le matériau est dur et difficile à broyer manuellement. Ces observations supposent que la composition initiale de la solution de phosphates contrôle la composition et la microstructure des matériaux NaPYG-0X0.

II.1.3. Caractérisation des matériaux amorphes mixtes ortho/pyrophosphates de calcium hydratés NaPYG-0X0

Cette partie présente les caractérisations physico-chimiques des matériaux amorphes et explique en quoi les différentes techniques utilisées sont nécessaires pour étudier la composition,

la structure et la morphologie des matériaux NaPYG-0X0. Les descriptions des appareils de caractérisation se trouvent dans l'annexe II.2.

II.1.3.1 Diffraction des rayons X

Dans un premier temps, nous avons analysé par diffraction des rayons X (DRX) les trois compositions de matériaux NaPYG-0X0 synthétisées afin de vérifier que ces matériaux sont amorphes et la présence éventuelle de phases cristallisées. La figure II.4 présente les diagrammes de diffraction des RX des matériaux NaPYG-0X0 synthétisés.

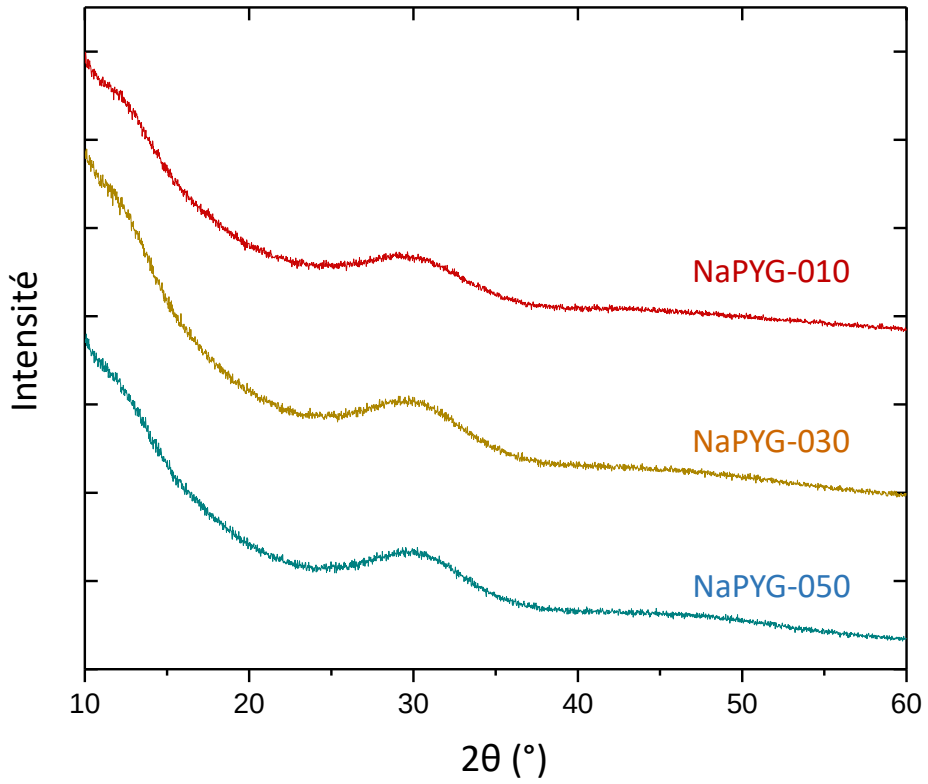


Figure II.4 : Diagrammes de diffraction des rayons X des trois compositions de matériaux NaPYG-0X0 synthétisées

Les diagrammes de DRX des trois compositions NaPYG-0X0 synthétisées présentent un halo large et diffus entre 24 et 36°, caractéristique d'un matériau amorphe.

II.1.3.2 Spectroscopies vibrationnelles FTIR et Raman

La caractérisation par les techniques de spectroscopies vibrationnelles infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et Raman permettent dans un premier temps d'identifier les différents types d'ions phosphate potentiellement présents dans les matériaux NaPYG-0X0 synthétisés (figures II.5 et II.6). En effet, les spectroscopies vibrationnelles et plus

particulièrement la spectroscopie Raman sont sensibles à l'environnement du groupement phosphate. Il existe, au total, 21 modes de vibration attribués à l'ion pyrophosphate isolé[126] et 9 pour l'ion orthophosphate[127]. Dans le cas de ces groupements au sein d'un solide plusieurs domaines de vibration des ions ortho et pyrophosphate peuvent se superposer et d'autres ne pas être détectables. De plus, la spectroscopie Raman permet d'estimer les rapports molaires d'ortho / (ortho + pyro) phosphates des matériaux NaPYG-0X0 et ainsi d'avoir une approche semi-quantitative pour déterminer leurs compositions. L'intensité relative des bandes de vibration est proportionnelle à un coefficient de diffusion Raman qui est complexe à déterminer, mais aussi à la quantité d'ions ortho et pyrophosphate dans le matériau. Lors de sa thèse, L. Mayen a corrélé le rapport ortho / (ortho + pyro) mesuré en spectroscopie Raman et RMN en phase solide pour les matériaux NaPYG-0X0[93]. Par la suite, des dosages chimiques des matériaux NaPYG-0X0 seront réalisés afin de valider ces mesures Raman. Il est donc possible de donner une estimation du ratio ortho / (ortho + pyro) phosphates en calculant le rapport d'aire des bandes de vibration les plus intenses caractéristiques de l'ion orthophosphate et de l'ion pyrophosphate.

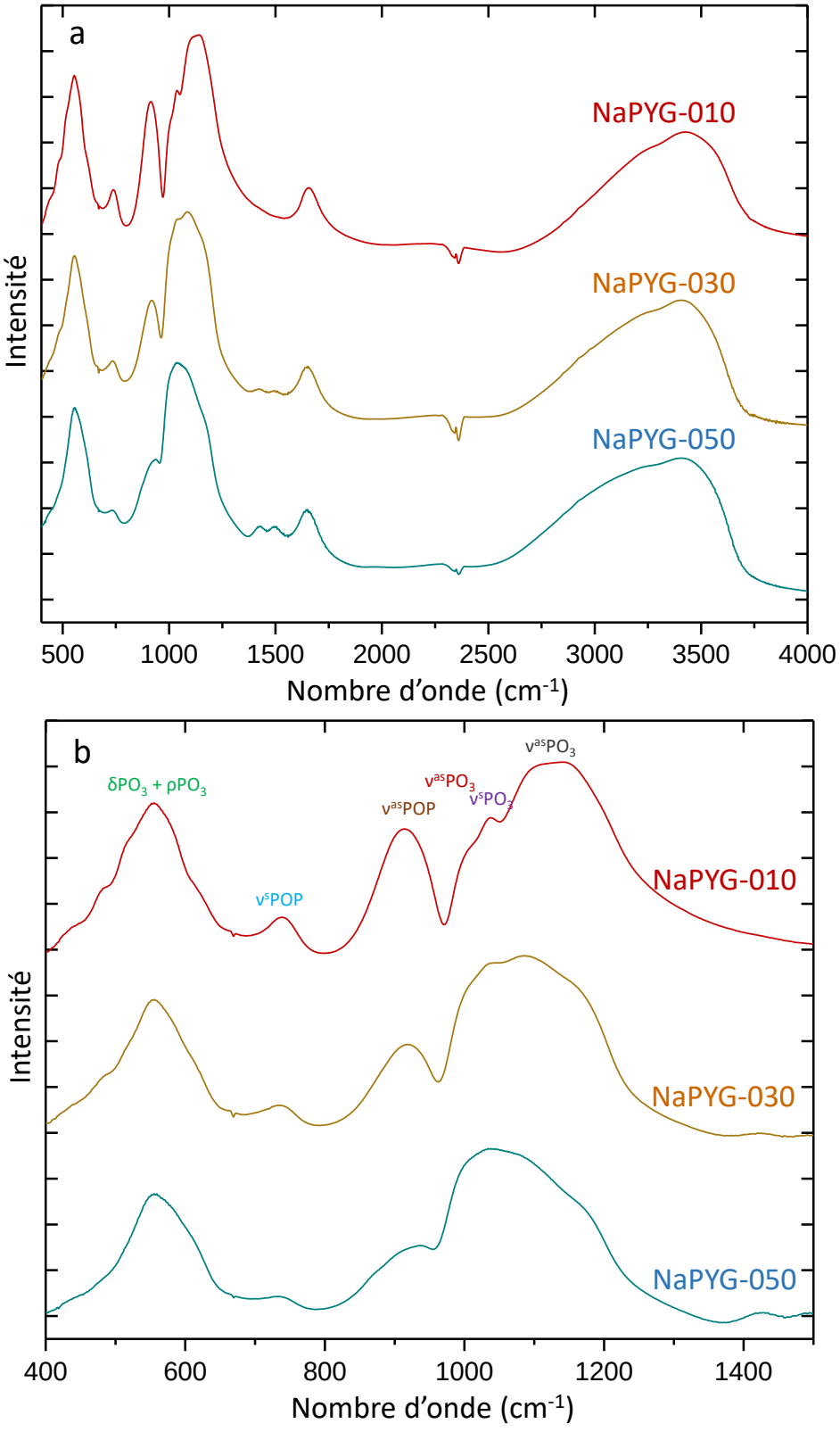


Figure II.5 : Spectres FTIR des trois compositions de matériaux NaPYG-0X0 synthétisées présentés par domaine : a) 4000-400 cm^{-1} et b) 1500-400 cm^{-1}.

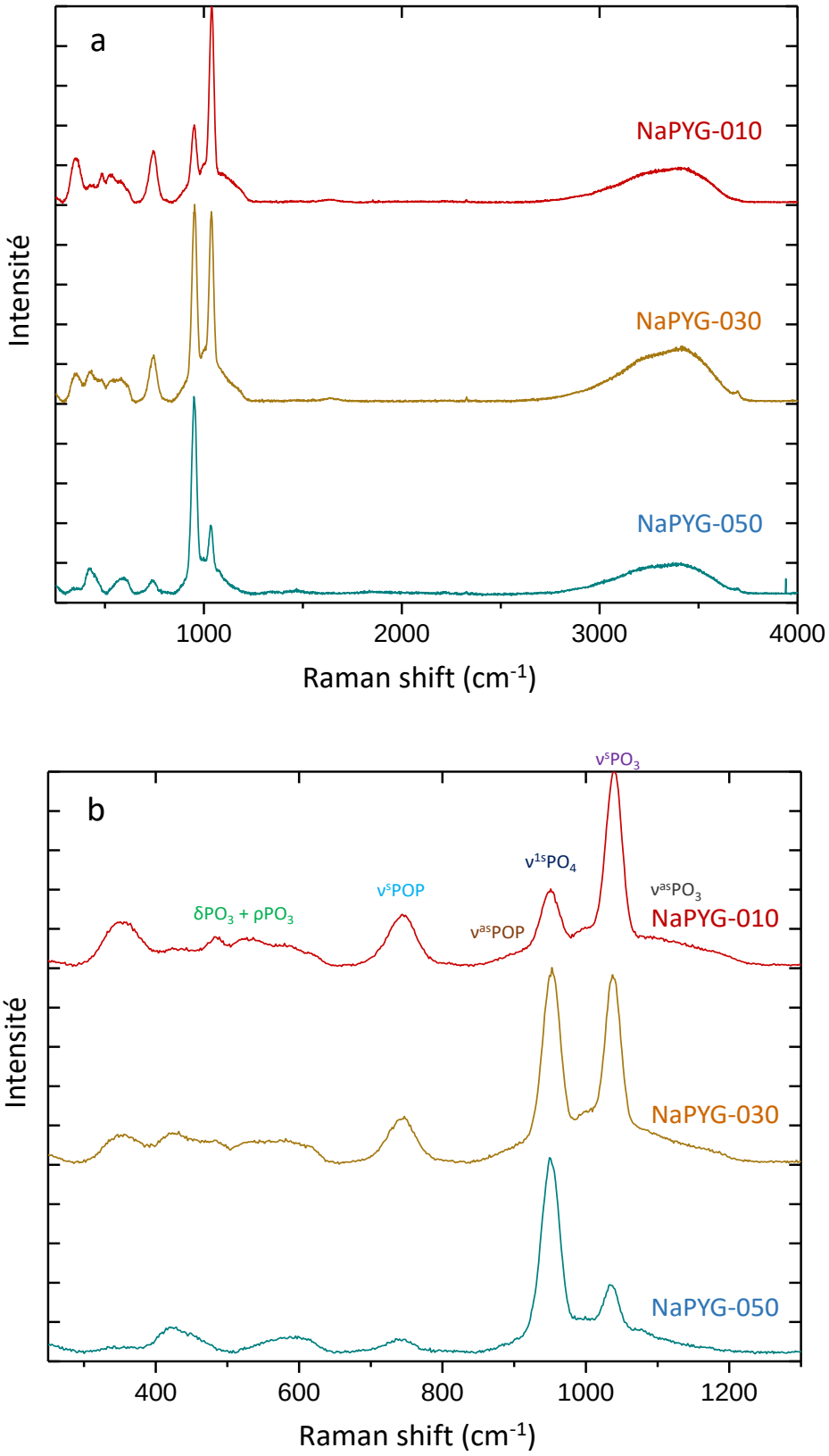


Figure II.6 : Spectres Raman des trois compositions de matériaux NaPYG-0X0 synthétisées présentés par domaine : a) 200-4000 cm^{-1} et b) 250-1300 cm^{-1}.

Les spectres Raman et FTIR montrent que les compositions NaPYG-0X0 présentent les mêmes bandes de vibration décrites dans le Tableau II.2 mais nous pouvons clairement remarquer que leurs intensités relatives sont différentes. Les plus grandes différences s'observent pour l'intensité de la bande $v^{as}POP$ entre 850 et 950 cm^{-1} par spectroscopie FTIR, mais surtout pour l'intensité des bandes $v^{s}POP$, $v^{s}PO_3$ et $v^{1s}PO_4$ situées respectivement entre 710-780, 950-960 et 1030-1040 cm^{-1} sur les spectres Raman. La bande de vibration située entre 2800 et 3750 cm^{-1} est attribuée aux liaisons O-H des molécules d'eau montrant que ces matériaux sont hydratés. En outre, les bandes de vibration ont une largeur à mi-hauteur relativement grande (entre 25 et 30 cm^{-1}) ce qui est cohérent avec le caractère amorphe des matériaux NaPYG-0X0 observé par DRX. Lorsque le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates dans la solution de mélange initial augmente, la bande de vibration la plus intense attribuée aux ions orthophosphate $v^{1s}PO_4$, entre 950 et 960 cm^{-1} augmente aux dépens de la bande de vibration la plus intense attribuée aux ions pyrophosphate, $v^{s}PO_3$ situés entre 1030 et 1040 cm^{-1} et de la bande $v^{s}POP$ entre 710 et 780 cm^{-1}.

Tableau II.2 : Position des bandes de vibration (cm^{-1}) et leur attribution pour les composés NaPYG-0X0 synthétisés.

Attributions	*Spectroscopie FTIR (cm^{-1})*	*Spectroscopie Raman (cm^{-1})*
$\delta PO_3 + \rho PO_3$	450-630	410-650
δPOP	/	350
$v^{s}POP$	730-770	700-800
$v^{as}POP$	860-940	890-910
$v^{as}PO_3$	1030-1050	1030-1080
$v^{s}PO_3$	990-1200	990-1030
$v^{1s}PO_4$	950-980	920-980
vOH	2800-3750	2800-3750

L'analyse semi-quantitative et l'estimation du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates est réalisé en décomposant les spectres Raman à l'aide du logiciel Labspec5 (Horiba). Pour tous les spectres, une correction de la ligne de base a été appliquée et la décomposition a été effectuée sur le domaine 740 à 1 200 cm^{-1} en considérant huit bandes (Tableau II.3). Les bandes ont été ajustées grâce à un modèle mixte gaussien / lorentzien avec un paramètre g laissé libre ou fixé à 0,5, ce qui correspond à la somme d'une gaussienne et d'une lorentzienne ayant la même position et la même aire. Les rapports obtenus sont des rapports de surface et sont liés à des rapports molaires (en tenant compte de la constante multiplicative). Toutefois, ces résultats ne prennent pas en compte les altérations des spectres dues à la protonation des espèces ou encore aux effets des

liaisons hydrogène. Ainsi, certains orthophosphate ou pyrophosphate protonés peuvent ne pas être inclus dans leurs catégories respectives.

Néanmoins, nous avons choisi les intensités relatives des bandes à 956 cm^{-1} associées à la vibration $\nu^{1s}PO_4$ des orthophosphate et à 1041 cm^{-1} correspondant à la bande principale (Iso asymétrique) des ions pyrophosphate pour mesurer le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates. Pour cela les taux de protonation, relativement faibles[93], ont été négligés et nous avons fait l'hypothèse que les intensités relatives des bandes choisies sont indépendantes de la composition et de la structure locale des espèces amorphes. Les résultats seraient donc représentatifs des rapports ortho / (ortho + pyro) phosphates au sein du matériau (Tableau II.3). Un exemple de décomposition de spectre est présenté sur la figure II.7.

Tableau II.3 : Positions, attributions et paramètres utilisés pour la décomposition des différentes bandes de vibration Raman du spectre des matériaux NaPYG-0X0.

Groupement	**Bande de vibration**	**Position de la bande Raman (cm^{-1}) ± 10**	**Fonction de distribution 0 < g < 1**
PO_4^{3-}	ν_1PO_4	951	0,5
$P_2O_7^{4-}$	ν_sPO_3	1037	0,5
HPO_4^{2-}	$\nu_{as}PO_3$	999	0,5
$P_2O_7^{4-}$	$\nu_{as}POP$	740	
-	-	895	
-	-	1080	Non fixé
-	-	1125	
-	-	1176	

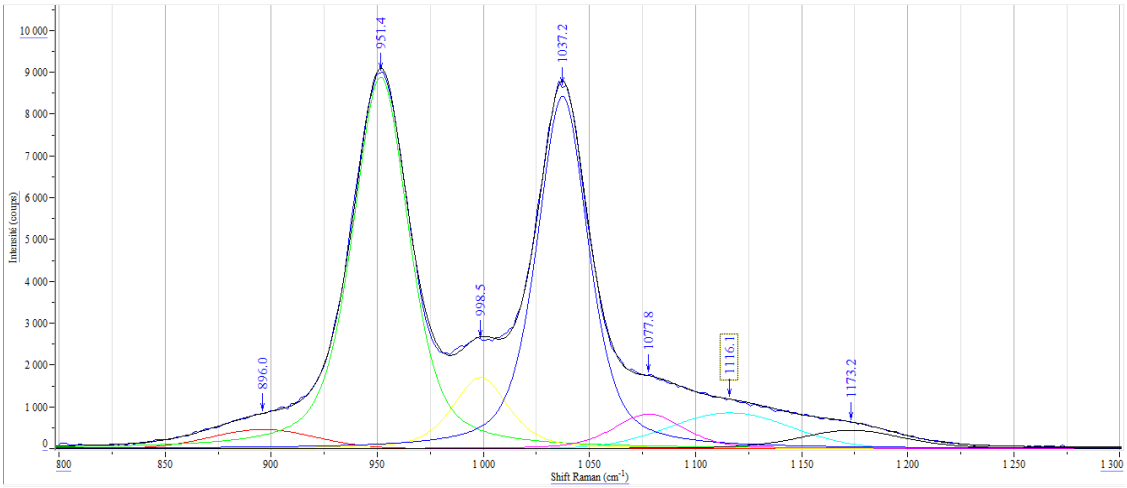


Figure II.7 : Décomposition du spectre Raman dans le domaine 800-1300 cm^{-1} pour le matériau NaPYG-030 synthétisé

La décomposition des spectres Raman a permis d'évaluer les rapports ortho / (ortho + pyro) phosphates qui sont reportés dans le Tableau II.4. Pour chaque composition, ce rapport a été mesuré sur trois lots de synthèses différents.

Tableau II.4 : Rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates dans les matériaux synthétisés déterminés à partir de la décomposition de leur spectre Raman.

Matériaux	Rapport ortho / (ortho + pyro) phosphate
NaPYG-010	0,30 (± 0,03)
NaPYG-030	0,53 (± 0,01)
NaPYG-050	0,73 (± 0,03)

Les rapports ortho / (ortho + pyro) phosphates déterminés à partir de ces données de spectroscopie Raman sont différents pour chaque composition et on observe que plus la proportion d'orthophosphate en solution dans le mélange réactionnel est élevée (Tableau II.1), plus le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates dans le matériau NaPYG-0X0 synthétisé calculé à partir des données de spectroscopie Raman est élevé. Ils devront ensuite être comparés aux rapports déterminés par les dosages chimiques pour que cette méthode semi-quantitative soit validée.

II.1.3.3 Analyses thermogravimétriques

Le suivi de l'évolution des matériaux en fonction de la température a été réalisée par analyse thermogravimétrique (ATG) afin de déterminer la quantité d'eau dans les matériaux NaPYG-0X0. Les matériaux sont chauffés suivant un programme de montée en température de 25°C à 600°C avec une vitesse de 5°C/min. La Figure II.8 montre les courbes ATG pour les matériaux NaPYG-0X0 synthétisés. Les thermogrammes des matériaux NaPYG-0X0 présentent différentes pertes de masse dont une perte de masse commune entre 100°C et 200°C attribuée à la perte d'eau dans le matériau. Pour le matériau NaPYG-010, nous pouvons observer une rupture de pente entre 150 et 200°C qui a également été remarqué lors des travaux de thèse de L. Mayen et a été attribué à une hydrolyse interne des ions pyrophosphate lors de la montée en température, ce qui ralenti la perte de masse[92]. La perte de masse correspondant à la perte d'eau totale dans les matériaux NaPYG-010, NaPYG-030 et NaPYG-050 est respectivement de 14, 16 et 17 %. On peut remarquer que plus la proportion d'orthophosphate initiale en solution et dans le matériau NaPYG-0X0 est élevée (Tableau II.1 et Tableau II.4) plus la proportion d'eau de structure est élevée au sein du matériau.

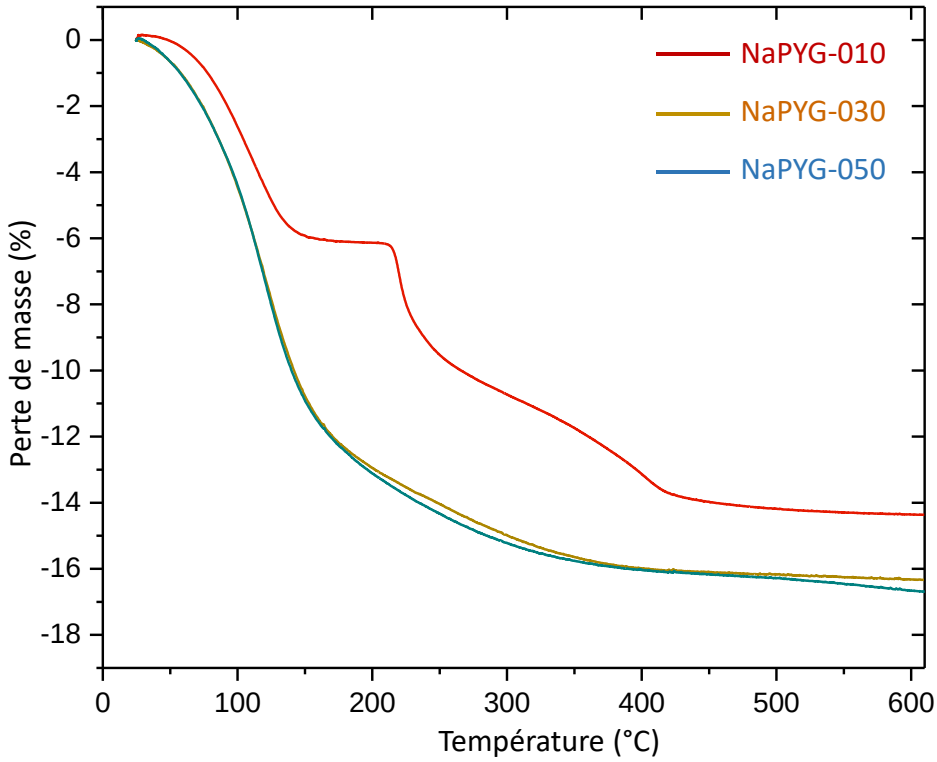


Figure II.8 : Courbes ATG des trois compositions de matériaux NaPYG-0X0 synthétisées

II.1.3.4 Analyses chimiques

L'analyse chimique des matériaux par dosages élémentaires permet de déterminer leur composition chimique, ainsi que leur rapport molaire ortho / (ortho + pyro) phosphates. Les techniques présentées mesurent des concentrations d'ions en solution ; il est donc nécessaire de dissoudre les matériaux NaPYG-0X0 synthétisés pour les doser. Les dosages des ions calcium et sodium sont réalisés par spectroscopie d'absorption atomique de flamme qui consiste à atomiser la solution à doser par une source de chaleur (flamme). La quantité de phosphate totale (orthophosphate + pyrophosphate) ainsi que celle des ions orthophosphate a été dosée par colorimétrie qui correspond à mesurer la densité optique (absorbance) de la coloration jaune d'un complexe phosphovanadomolybdique $VO_3[P(Mo_3O_{10})_4]$ en milieu acide à λ = 460 nm. Cette réaction est spécifique aux ions orthophosphate ; la concentration en ions pyrophosphate est donc évaluée en calculant la différence entre la concentration d'ions phosphate totale -mesurée dans des conditions permettant d'hydrolyser tous les pyrophosphate - et la concentration des ions orthophosphate. Les techniques de dosages sont décrites dans l'annexe II.3. La composition chimique de chaque composition de matériaux NaPYG-0X0 synthétisées est reportée dans le Tableau II.5.

Tableau II.5 : Quantités de phosphore (sous forme $P_2O_7^{4-}$, PO_4^{3-}, en mmol), de calcium (mmol) et de sodium (mmol) dans 150 mg de chacune des compositions de matériaux NaPYG-0X0 synthétisées.

Concentration en mmol/150mg	Ca : Ca^{2+}	Na : Na^+	P : $P_2O_7^{4-}$	P : PO_4^{3-}	PO_4^{3-} / (PO_4^{3-} + $P_2O_7^{4-}$)
NaPYG-010	1,00 (±0,02)	0,14 (±0,02)	0,68 (±0,01)	0,28 (±0,01)	0,29 (±0,01)
NaPYG-030	1,12 (±0,02)	0,06 (±0,02)	0,42 (±0,01)	0,47 (±0,01)	0,53 (±0,01)
NaPYG-050	1,01 (±0,02)	0,03 (±0,02)	0,21 (±0,01)	0,63 (±0,01)	0,75 (±0,01)

Comme attendu les rapports ortho / (ortho + pyro) phosphates sont différents pour les trois compositions et sont identiques avec ceux déterminés par décomposition des spectres Raman. On remarque que plus la proportion de précurseurs orthophosphate en solution est élevée et plus on retrouve d'ions orthophosphate dans le matériau NaPYG-0X0 final. Cependant, le rapport dans le matériau final n'est pas identique au rapport dans la solution de mélange initiale mais il peut y être corrélé (tableau II.6). La surconcentration en orthophosphate par rapport au pyrophosphate dans le matériau final, pour les compositions NaPYG-010 et NaPYG-030 proviendrait soit de l'hydrolyse partielle du pyrophosphate lors de l'étape de séchage à 70°C, ou serait due à l'association préférentielle de l'orthophosphate avec le calcium afin d'équilibrer les charges lors de la formation de la solution colloïdale.

Nous pouvons également observer que la quantité d'ions sodium diminue lorsque la quantité d'ions orthophosphate augmente. Cette dernière entraîne une diminution de la valeur de la charge négative des groupements phosphate. Les ions sodium substituant les ions calcium à compenser cette charge se retrouveront logiquement en moins grande quantité.

Tableau II.6 : Rapport ortho / (ortho + pyro) dans la solution de mélange initiale comparé au rapport dans le matériau final mesuré par spectroscopie Raman et par dosages chimiques de chacune des compositions NaPYG-0X0 étudiées.

Matériaux	Rapport initial ortho / (ortho + pyro) en solution	Rapport ortho / (ortho + pyro) dans le matériau (spectroscopie Raman)	Rapport ortho / (ortho + pyro) dans le matériau (dosages chimiques)
NaPYG-010	0,15 (± 0,01)	0,30 (± 0,03)	0,29 (± 0,01)
NaPYG-030	0,50 (± 0,01)	0,53 (± 0,01)	0,53 (± 0,01)
NaPYG-050	0,85 (± 0,01)	0,73 (± 0,03)	0,75 (± 0,01)

II.1.3.5 Observations microscopiques

Les images microscopiques sont obtenues à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) LEO435VP. La figure II.9 présente les micrographies MEB des matériaux NaPYG-010, -030 et -050 synthétisés.

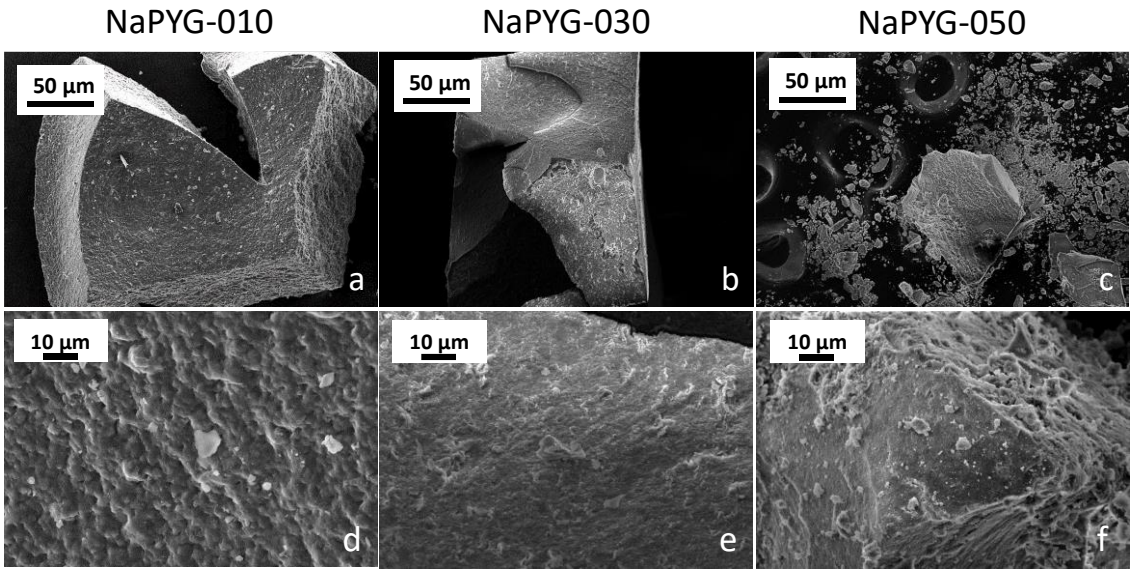


Figure II.9 : Micrographies MEB à différentes échelles des trois compositions de matériaux NaPYG-0X0 synthétisés

Les matériaux sont sous forme de granulés ayant une taille de plusieurs centaines de micromètres. A faible grossissement les blocs de matériaux NaPYG-0X0 présentent des formes irrégulières avec des arêtes franches. En zoomant on remarque que leur surface est légèrement rugueuse et compacte.

II.1.3.6 Mesure de la surface spécifique

La surface spécifique peut être déterminée par la méthode de Brunauer, Emmett et Teller (BET) basée sur l'adsorption physique de gaz à la surface d'un solide. Cette caractéristique permet de savoir si le matériau est poreux et quelle est la surface de contact du matériau avec son environnement, ce qui peut par la suite par exemple influencer l'évolution de ce matériau en milieu aqueux. En effet, il est connu que la vitesse de dégradation d'un matériau est dépendante de sa surface exposée[128]. Les matériaux ont été dégazés sous vide pendant 2 h à 70°C avant la mesure de leur surface spécifique. Les surfaces spécifiques des matériaux NaPYG-0X0 synthétisés sont reportées dans le Tableau II.7.

Tableau II.7 : Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$) des trois compositions de matériaux NaPYG-0X0 synthétisées, déterminée par la méthode BET

Matériaux	Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)
NaPYG-010	8 (± 1)
NaPYG-030	95 (± 2)
NaPYG-050	129

Nous pouvons voir que selon la composition des matériaux NaPYG-0X0 synthétisée la surface spécifique est très différente (de 8 $m^2.g^{-1}$ pour les matériaux NaPYG-010 à 129 $m^2.g^{-1}$ pour les matériaux NaPYG-050). Le matériau NaPYG-010 qui présente la plus grande proportion d'ions pyrophosphate est celui qui possède la plus faible surface spécifique (8 $m^2.g^{-1}$), largement inférieure à celle des deux autres compositions de matériaux.

Les surfaces spécifiques obtenues pour les matériaux NaPYG-030 et -050 (95 et 129 $m^2.g^{-1}$) ne sont pas surprenantes. En comparant à la littérature, généralement les matériaux synthétisés par chimie douce ou sol-gel ont une surface spécifique de plus de 100 $m^2.g^{-1}$. Par exemple le verre de silice 45S5 a une surface spécifique entre 0,15 et 2,7 $m^2.g^{-1}$ lorsqu'il est synthétisé par fusion et entre 126,5 et 164,7 $m^2.g^{-1}$ lorsqu'il est synthétisé par sol-gel[129]. De plus, la surface spécifique de

phosphate de tricalcium amorphe mesurée dans des conditions proches des nôtres était de 60 $m^2.g^{-1}$ [130,131].

Cependant, le dégazage à 70°C a surement déshydraté et probablement hydrolysé des espèces pyrophosphate des matériaux. Ces mesures ne reflètent donc pas la surface accessible réelle, puisque les matériaux ont été modifiés par les prétraitements.

II.1.4. Discussion sur la synthèse des matériaux NaPYG-0X0

Suite à la caractérisation des matériaux NaPYG-0X0 synthétisés et aux résultats obtenus lors des travaux de thèse de L. Mayen, il apparait que le rapport molaire ortho / (ortho + pyro) initial en solution permettrait de contrôler le rapport final dans le matériau NaPYG-0X0[92]. Ces rapports mesurés par spectroscopie Raman ont été corrélés aux résultats de RMN du solide lors de la thèse de L. Mayen et aux résultats des dosages chimiques lors de cette thèse, ce qui prouve que le calcul de ces rapports par décomposition des spectres Raman est une méthode fiable et rapide. De plus, en reprenant la formule chimique générale des composés NaPYG-0X0 proposée lors de la thèse de L. Mayen ($[Ca^{2+}_y\ Na^{+}_z\ H^{+}_{3+x-2y-z})\ (PO_4^{3-})_{1-x}(P_2O_7^{4-})_x]\ (H_2O)_u$) couplée aux résultats des dosages obtenus dans la présente étude ainsi qu'à la perte de masse évaluée par ATG qui a permis de remonter au nombre de molécules d'eau, il a été possible de déterminer la formule chimique des matériaux NaPYG-010, -030 et -050 synthétisés. Le coefficient stœchiométrique des protons a été calculé en équilibrant les charges afin d'assurer l'électroneutralité du solide :

NaPYG-010 : $[(Ca^{2+})_{1,35}\ (Na^{+})_{0,11}(H^{+})_{0,73}\ (PO_4^{3-})_{0,46}(P_2O_7^{4-})_{0,54}]\ (H_2O)_{6,5}$

NaPYG-030 : $[(Ca^{2+})_{1,62}\ (Na^{+})_{0,05}(H^{+})_{0,03}\ (PO_4^{3-})_{0,68}(P_2O_7^{4-})_{0,32}]\ (H_2O)_{7,8}$

NaPYG-050 : $[(Ca^{2+})_{1,54}\ (Na^{+})_{0,03}(H^{+})_{0,04}\ (PO_4^{3-})_{0,85}(P_2O_7^{4-})_{0,15}]\ (H_2O)_{7,4}$

Les protons sont en plus grande proportion dans la structure chimique du matériau NaPYG-010, le plus riche en ions pyrophosphate et le moins riche en ions calcium, vraisemblablement lié à un déficit de Ca en solution pour équilibrer les charges.

L'ensemble de ces résultats a permis d'aboutir à une représentation schématique des matériaux NaPYG-0X0 présentée sur la figure II.10.

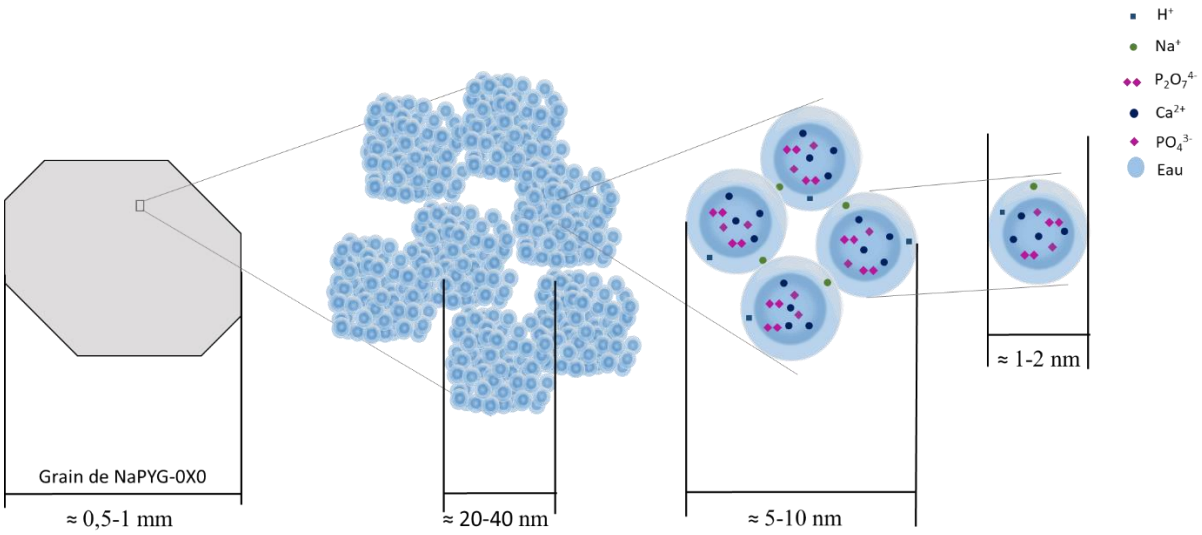


Figure II.10 : Représentation schématique de la structure des matériaux NaPYG-0X0 à différentes échelles. A l'échelle nanométrique, les matériaux sont formés de clusters liés entre eux par de l'eau inter-moléculaire et des ions sodium.

La figure II.10 est une représentation schématique du matériau NaPYG-030 à différentes échelles. Suite aux résultats de la caractérisation par MET des matériaux tirés de la thèse de L. Mayen, les matériaux seraient constitués de clusters s'agrégeant en nanoparticules de plusieurs dizaines de nanomètres. Par analogie avec les clusters de Posner qui composent les ACP, nous supposons que leur taille serait de quelques nanomètres. Les analyses de RMN en phase solide ont permis de confirmer que les clusters étaient formés par des ions calcium, ortho et pyrophosphate partiellement protonés et dont leur surface serait recouverte de molécules d'eau faiblement liées au sodium[93]. Afin d'assurer la cohésion globale du matériau, les clusters seraient probablement associés entre eux par les cations sodium et par l'eau de surface. Bien que cette structure hiérarchisée ait été observée par MET, l'hypothèse sur les plus petites entités, les clusters, doit être validée prochainement en combinant analyses de diffusion des rayons X aux grands angles (WAXS : longueur de cohérence de la PDF et aux bas angles SAXS).

Il a également été observé que les matériaux NaPYG-0X0 n'avaient pas la même surface spécifique. Cette différence peut être corrélée à la taille des différents ions phosphates. En effet, l'encombrement stérique des ions pyrophosphate est plus élevé que celui des ions orthophosphate ; ainsi un matériau comprenant plus de pyrophosphate (NaPYG-010) aura une surface spécifique plus faible que ceux composés de plus d'orthophosphates (NaPYG-030 et NaPYG-050).

Nous développerons dans la prochaine partie l'effet de différents paramètres de synthèse dans le but d'optimiser la quantité de matériaux récupérée.

II.2. Etude de l'effet de certains paramètres de synthèse des NaPYG-0X0

Lors des travaux de thèse de L. Mayen, l'influence du ratio ortho / (ortho + pyro) phosphate initial en solution et de la température de séchage sur le matériau final ont été étudiés. Ces études ont montré que le ratio initial en solution contrôle le ratio final dans le matériau et qu'une augmentation de la température de séchage (de 20 à 250°C) ne modifie pas la structure amorphe des matériaux NaPYG-0X0, excepté pour la composition comportant le plus d'orthophosphate, NaPYG-050 qui cristallise en apatite nanocristalline à 250°C.

Dans cette partie, nous avons étudié certains paramètres de synthèse en vue d'augmenter la quantité de matériau synthétisé, ainsi que l'influence des différentes étapes dans la perspective d'un éventuel développement industriel de la synthèse des matériaux NaPYG-0X0. Les matériaux pour le comblement osseux commercialisés, par exemple Glassbone® (Noraker), sont produits en assez grande quantité (plusieurs kg/jour), puis broyés et tamisés pour contrôler la distribution de taille des particules. A titre de comparaison, lors des synthèses utilisant le protocole de référence décrit précédemment (partie II.1.2) la quantité de matériaux récupérée varie entre 2 et 3,5 g en fonction de la composition et la synthèse dure environ 1 heure. C'est pour ces raisons que nous avons décidé d'augmenter la concentration des précurseurs ortho et pyrophosphate en solution, ainsi que le nombre de lavages dans le but d'obtenir plus de matériaux par lot préparé. Nous avons ensuite cherché une autre technique de séchage afin de mieux contrôler la granulométrie des poudres finales. La dernière étape avant leur mise sur le marché, consiste à stériliser les matériaux afin de supprimer tout risque de contamination lors de l'utilisation du matériau au contact avec un milieu vivant. Dans le but d'évaluer l'éventuel effet de la stérilisation gamma sur les matériaux NaPYG-0X0, nous les avons caractérisés après leur stérilisation par ce procédé à une dose de 25 kGy. Enfin la dernière partie porte sur l'augmentation de la concentration du réactif limitant, c'est-à-dire le précurseur calcium, afin d'essayer d'augmenter le rendement de la synthèse.

II.2.1. Concentration des précurseurs

L'étude de l'effet de la concentration des précurseurs en solution a été menée sur les matériaux NaPYG-010, -030 et -050 en vue d'augmenter leur quantité synthétisée par batch. Nous avons choisi de multiplier par 2 (C2) puis jusqu'à 3 fois (C3) les concentrations des précurseurs ortho, pyrophosphate et calcium (tableau II.8). Nous avons été limités par la solubilité du

pyrophosphate de sodium (environ 67 $g.L^{-1}$ dans l'eau à température ambiante[132]) qui est bien plus faible que celle du phosphate trisodique dodecahydraté (283 $g.L^{-1}$).

Tableau II.8 : Concentration des précurseurs calcium et phosphates dans les solutions initiales pour la synthèse des matériaux NaPYG-010, -030 et -050 à des concentrations plus élevées.

Concentration C en $mmol.L^{-1}$	NaPYG-010			NaPYG-030			NaPYG-050		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
$CaCl_2,2H_2O$ VWR	180	360	540	180	360	540	180	360	540
$Na_2P_2O_7$ VWR	70,8	141,6	212,4	41,6	83,2	124,8	12,5	25	37,5
$Na_3PO_4,12H_2O$ VWR	12,5	25	37,5	41,6	83,2	124,8	70,8	141,6	212,4

L'objectif de cette étude est d'augmenter les concentrations des solutions de phosphate et de calcium. Pour ce faire nous avons décidé d'utiliser des volumes plus faibles que dans le protocole décrit partie II.1.2 afin de ne pas gaspiller trop de précurseurs. Par exemple, pour synthétiser les matériaux à C1, 0,53 g de $CaCl_2.2H_2O$ a été dissout dans 20 mL d'eau déionisée et la masse des précurseurs phosphate variant en fonction de la composition a été dissout dans 200 mL. Pour augmenter les concentrations en solution à C2 et C3, nous avons ensuite respectivement doublé et triplé les masses des précurseurs phosphate et calcium dissout dans l'eau déionisée. Le tableau II.9 récapitule les masses de précurseurs utilisées pour chaque synthèse.

Tableau II.9 : Masse théorique des précurseurs calcium et phosphates dans les solutions initiales pour la synthèse des matériaux NaPYG-010, -030 et -050 à des concentrations plus élevées.

Masse en g	NaPYG-010			NaPYG-030			NaPYG-050		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
$CaCl_2,2H_2O$ VWR	0,53	1,06	1,59	0,53	1,06	1,59	0,53	1,06	1,59
$Na_2P_2O_7$ VWR	3,78	7,55	11,33	2,21	4,43	6,61	0,67	1,33	1,99
$Na_3PO_4,12H_2O$ VWR	0,95	1,90	2,85	3,16	6,33	9,49	5,38	10,75	16,13

La quantité d'eau de lavage a aussi été adaptée pour cette synthèse. Chaque lavage est donc réalisé avec 100 mL d'eau déionisée. Une fois les matériaux séchés, ils ont été pesés afin de comparer la quantité récupérée par rapport à une synthèse de référence (tableau II.10) et de calculer le rendement de la synthèse.

Tableau II.10 : Masse pesée après les synthèses ainsi que le rendement massique exprimé en pourcentage pour les trois compositions des matériaux NaPYG-0X0 élaborés avec différentes concentrations des précurseurs en solution.

	NaPYG-010			NaPYG-030			NaPYG-050		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
Masse récupérée (g)	0,30	0,79	2,2	0,25	0,68	1,32	0,34	0,82	1,29
Rendement massique (%)	5,8	7,5	13,9	4,2	5,8	7,5	2,9	6,2	6,5

Suite aux différentes synthèses nous pouvons observer que nous obtenons des rendements massiques assez faibles pour toutes les synthèses (entre 3 et 14%). Les meilleurs rendements massiques sont obtenus pour le matériau NaPYG-010 surtout lorsque les concentrations sont multipliés par 3 (~ 14%). De plus, la mise en œuvre de solutions de précurseurs plus concentrées, conduit à une augmentation de la masse de matériau récupérée ainsi que du rendement massique, et le meilleur rendement massique pour les trois compositions de matériaux est lorsque les concentrations en précurseurs sont multipliées par 3. Les matériaux ont ensuite été caractérisés par DRX (Figure II.11), spectroscopie Raman (Figure II.12) et MEB (Figure II.13) afin d'analyser si leur structure, leur composition chimique et leur morphologie n'ont pas été modifiées par la mise en œuvre de solutions plus concentrées en précurseurs.

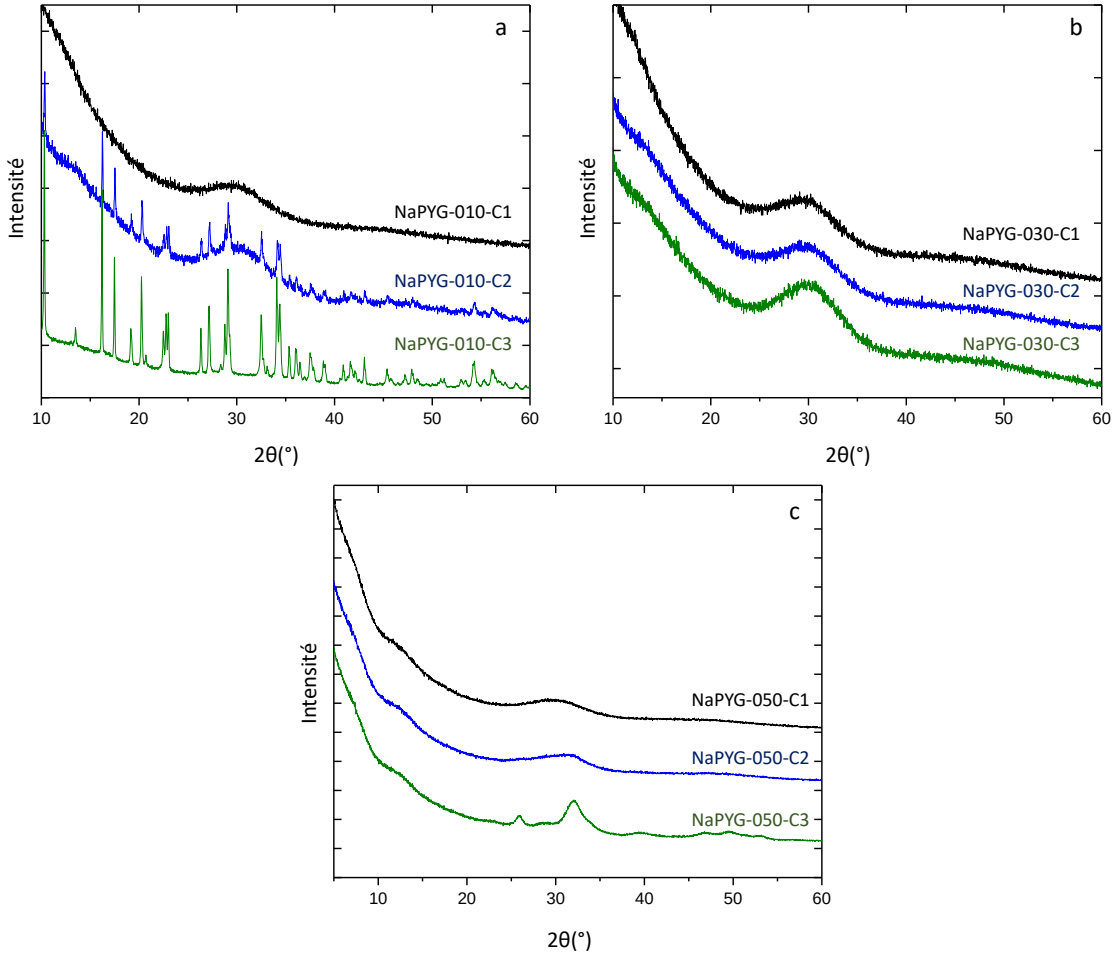


Figure II.11 : Diagrammes de diffraction des rayons X des trois matériaux NaPYG-010 (a), -030 (b) et -050 (c) synthétisés à partir de différentes concentrations de précurseurs en solution (C1, C2 et C3).

La caractérisation par DRX montre dans un premier temps, la cristallisation du matériau NaPYG-010 en canaphite-α dès que la concentration des précurseurs est multipliée par deux. Nous pouvons tout de même observer que le halo large et intense est encore présent sur le diagramme du NaPYG-010-C2, ce qui signifie que le matériau est constitué majoritairement d'une phase amorphe. Lorsque la concentration est multipliée par 3 (NaPYG-010-C3) le halo large disparait quasiment, et le matériau obtenu est identifié comme étant de la canaphite-α. Pour le matériau NaPYG-030, les trois diagrammes présentent seulement un halo large. Il semblerait donc que l'augmentation de la concentration des précurseurs n'affectent par la structure amorphe du matériau NaPYG-030 synthétisé mais pourrait la désorganiser en diminuant les distance inter-clusters. Enfin, lors de la multiplication de la concentration des précurseurs par 2 pour élaborer le matériau NaPYG-050, le diagramme RX montre que le matériau semble rester amorphe. On peut tout de même noter que le sommet du halo a été décalé vers 32° (Fig.II.11c) et pourrait correspondre à un début de cristallisation. En effet, lorsque la concentration a été multipliée par 3, de larges pics de diffraction à 25,9 et 31,8° apparaissent sur le diagramme. Ces pics

correspondent à la diffraction des plans (002) et (211) des cristaux d'apatite[63] et leur largeur semble indiquer que cette phase apatitique serait mal cristallisée (nanocristalline).

Les spectres Raman détaillés sur la figure II.12 permettent d'analyser les rapports ortho / (ortho + pyro) phosphates des matériaux synthétisés à partir de solutions de précurseurs plus concentrées.

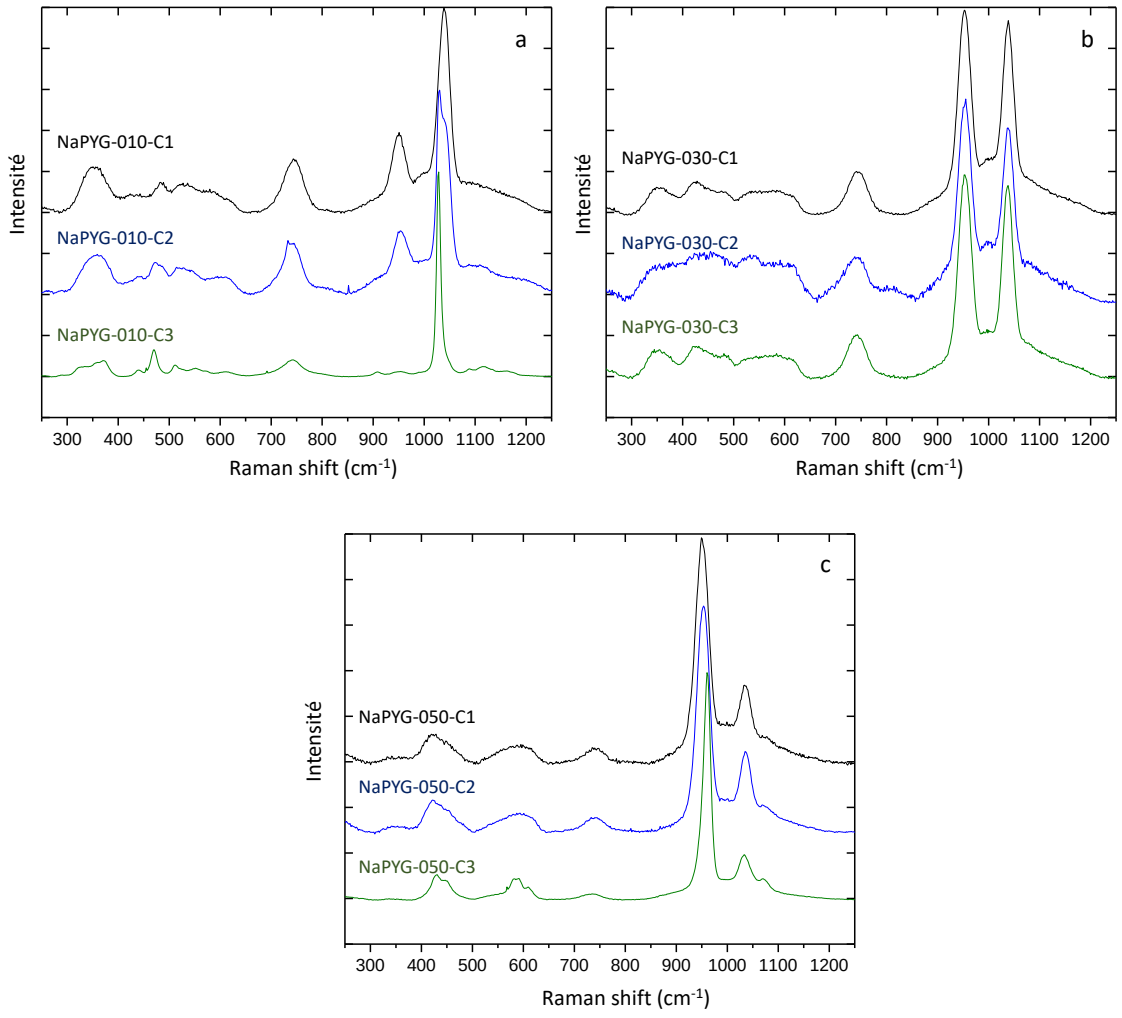


Figure II.12 : Spectres Raman des trois matériaux NaPYG-010 (a), -030 (b) et -050 (c) synthétisés à partir de différentes concentrations de précurseurs en solution (C1, C2 et C3).

Les spectres Raman du matériau NaPYG-010 montrent la diminution de l'intensité de la bande de vibration ν^1PO_4 à 956 cm^{-1} correspondant à la bande principale des ions orthophosphate (Figure 12b) jusqu'à sa disparition lorsque la concentration des précurseurs est multipliée par 3. La bande de vibration ν^sPO_3 à 1041 cm^{-1} correspondant aux ions pyrophosphate amorphe diminue en intensité lorsque la concentration augmente jusqu'à ne plus être visible alors que la bande de

vibration accolée à 1026 cm^{-1} apparait dès que la concentration est multipliée par 2. Cette bande peut être attribuée à la vibration $\nu^{s}PO_3$ des ions pyrophosphate cristallisés de la phase canaphite-α ($CaNa_2P_2O_7.4H_2O$). Lorsque la concentration des précurseurs pour élaborer le matériau NaPYG-010 est multipliée par 3, le spectre correspond au spectre de la phase canaphite-α comme observée par DRX. Pour le matériau NaPYG-030 aucune différence n'est observée entre les spectres des matériaux élaborés à partir de solutions plus concentrées et celui de référence. Les spectres Raman des matériaux NaPYG-050 synthétisés à partir de différentes concentrations en précurseurs montrent la présence des bandes de vibration à 956 et 1041 cm^{-1} sur chaque spectre indiquant que les matériaux sont toujours composés d'ortho et de pyrophosphate lorsque la concentration initiale est multipliée. Cependant, la bande de vibration $\nu^{1}PO_4$ à 956 cm^{-1} du matériau NaPYG-050-C3 s'est affinée et s'est décalée à 968 cm^{-1}. La diffusion Raman étant sensible à la cristallinité d'un matériau, nous pouvons en conclure que l'affinement de la bande de vibration $\nu^{1}PO_4$ est dû à la présence de la phase cristalline apatitique identifiée par DRX.

Les rapports ortho / (ortho + pyro) phosphates du matériau NaPYG-030 évalués à partir des spectres Raman sont présentés dans le Tableau II.11.

Tableau II.11 : Rapports ortho / (ortho + pyro) phosphates du matériau NaPYG-030 synthétisés à partir de solutions plus concentrées et évalués à partir des données spectrales Raman.

	NaPYG-030-C1	NaPYG-030-C2	NaPYG-030-C3
Rapport ortho / (ortho + pyro) phosphate	0,52 (±0,01)	0,53 (±0,01)	0,51 (±0,01)

Le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates pour le matériau NaPYG-030 synthétisés à partir de solutions plus concentrées n'est pas modifié dans le matériau final. Il en résulte donc que l'augmentation de la concentration des précurseurs ne modifie pas sensiblement la structure amorphe, ainsi que la composition moléculaire des entités phosphates du matériau NaPYG-030 obtenu. Cependant la phase cristalline, la canaphite-α, apparait dans la composition du matériau NaPYG-010, lorsque la concentration des précurseurs est multipliée par deux jusqu'à ce que cette phase soit la seule présente dans le matériau, lorsque la concentration des précurseurs est multipliée par trois. Une apatite nanocristalline entre dans la composition du matériau NaPYG-050, lorsque la concentration de précurseurs est également multipliée par trois.

La microscopie électronique à balayage du matériau NaPYG-010 (Figure II.13) permet d'observer les différentes phases identifiées par DRX.

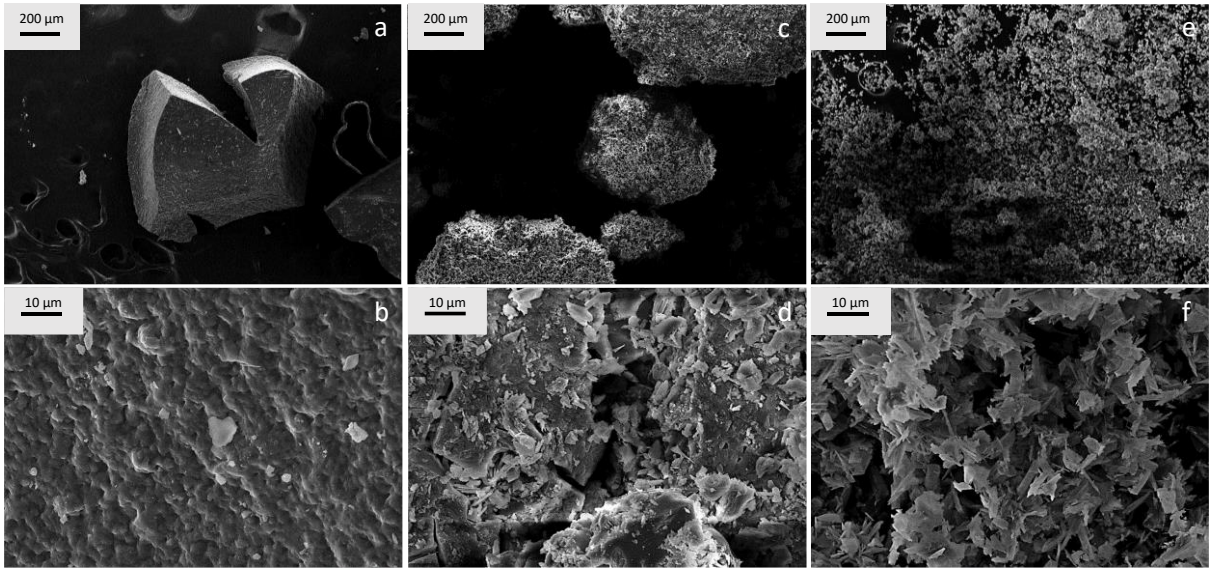


Figure II.13 : Micrographies MEB de la composition à différentes échelles du matériau NaPYG-010 synthétisé à partir de différentes concentrations en précurseurs C1 (a et b), C2 (c et d) et C3 (e et f).

Lors de sa synthèse dans les conditions de référence (C1) le matériau NaPYG-010 est caractérisé par sa surface légèrement rugueuse et compacte (Fig.II.13a et b). Lorsque la concentration des précurseurs augmente (C2), on observe de nombreux cristaux sous forme de petites plaquettes à la surface de blocs présentant eux des arêtes franches telles celles observées pour les matériaux NaPYG-0X0 de référence (Fig.II.13c et d). Une partie de la structure amorphe est probablement toujours présente au cœur du matériau, ce qui a été confirmé par DRX (Fig.II.11). Quand la concentration est multipliée par trois (C3), les blocs qui étaient recouverts par les cristaux ne sont plus visibles (Fig.II.13e et f). Le matériau est seulement constitué de cristaux sous la forme de plaquettes dont la taille varie entre 5 et 15 µm. Ces cristaux correspondant à la canaphite-α mais ils ont une forme différente à ceux observés après la synthèse de la canaphite-α synthétisée qui sera présentée dans le chapitre V. Cette différence de morphologie est surement due i) au faible temps de maturation de la solution après ajout de la solution de chlorure de calcium. Un temps de maturation plus long aurait peut-être permis aux cristaux de canaphite-α de croître plus et de s'organiser en fagots tel qu'observé dans le chapitre V pour la synthèse de canaphite-α pure selon un protocole original. ii) Soit à la présence de la partie amorphe du matériau NaPYG-010 induisant une germination hétérogène et donc une croissance différente des cristaux de canaphite-α ; iii) ou simplement à la composition du milieu, la quantité de pyrophosphate et de calcium disponibles est surement plus faible que lors de la synthèse de la canaphite-α ce qui pourrait limiter la croissance des cristaux.

Dans cette partie nous avons observé l'influence de l'augmentation de la concentration des solutions de précurseurs sur les matériaux NaPYG-010, -030 et -050. Nous avons vu que la

structure amorphe, la morphologie ainsi que la composition moléculaire du matériau NaPYG-030 n'ont pas été modifiées. En revanche, le matériau NaPYG-010 cristallise en canaphite-α dès que la concentration est multipliée par 2 et la composition NaPYG-050 cristallise en apatite nanocristalline lorsque la concentration en précurseurs est multipliée par 3. En conclusion, le matériau NaPYG-030 dont le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates initial en solution est quasiment égal à 1 est plus stable vis à vis d'une augmentation de la sursaturation, que les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-050 qui contiennent respectivement plus de pyrophosphate que d'orthophosphate ou plus d'orthophosphate que de pyrophosphate. L'hypothèse que nous pouvons formuler après cette étude est que l'optimum pour favoriser l'inhibition de la cristallisation des pyro par les ortho - et vice versa - est lorsque le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates se rapproche de 0,5.

Nous avons également montré que l'augmentation de la concentration des précurseurs en solution permet d'augmenter la quantité de matériau synthétisée ainsi que le rendement massique, cependant les quantités obtenues ne permettent pas encore d'avoir un processus de synthèse économiquement viable pour le développement des matériaux NaPYG-0X0 en tant que substituts osseux ; une optimisation du procédé d'élaboration est encore nécessaire. Toutefois, à l'échelle du laboratoire l'augmentation de la quantité de matériau par batch lorsque les concentrations sont multipliées par deux est intéressante en vue des prochaines études d'évolution des matériaux NaPYG-0X0 dans différents milieux aqueux (Chapitre III). Cependant, en augmentant les concentrations en précurseurs par deux la composition NaPYG-010 commence à cristalliser en canaphite-α. Pour inhiber cette cristallisation, il a été montré dans la thèse de L. Mayen que l'étape de lavage était fondamentale pour que le matériau final soit amorphe. Nous avons donc décidé d'augmenter le volume d'eau de lavage lors de la synthèse du NaPYG-010 avec des concentrations en précurseurs multipliées par deux afin de voir si cela pourrait empêcher la formation de la phase cristalline.

II.2.2. Volume d'eau de lavage

Le volume d'eau de lavage a ainsi été multiplié par deux (L2) et trois (L3) lorsque la concentration en précurseurs pour la synthèse du matériau NaPYG-010 est multipliée par deux. Le protocole utilisé est donc le même que celui reporté dans la partie II.2.1, sauf que les matériaux NaPYG-010 dont la concentration en précurseurs est multipliée par deux sont lavés en ajoutant 200 mL (C2L2) et 300 mL (C2L3) d'eau déionisée sous agitation magnétique pendant environ 10 minutes lors des deux étapes de lavage, au lieu de 100 mL. Les matériaux NaPYG-010 synthétisés en triplicat ont ensuite été analysés et leurs caractérisations par DRX et MEB sont présentées respectivement sur les figures II.14 et II.15.

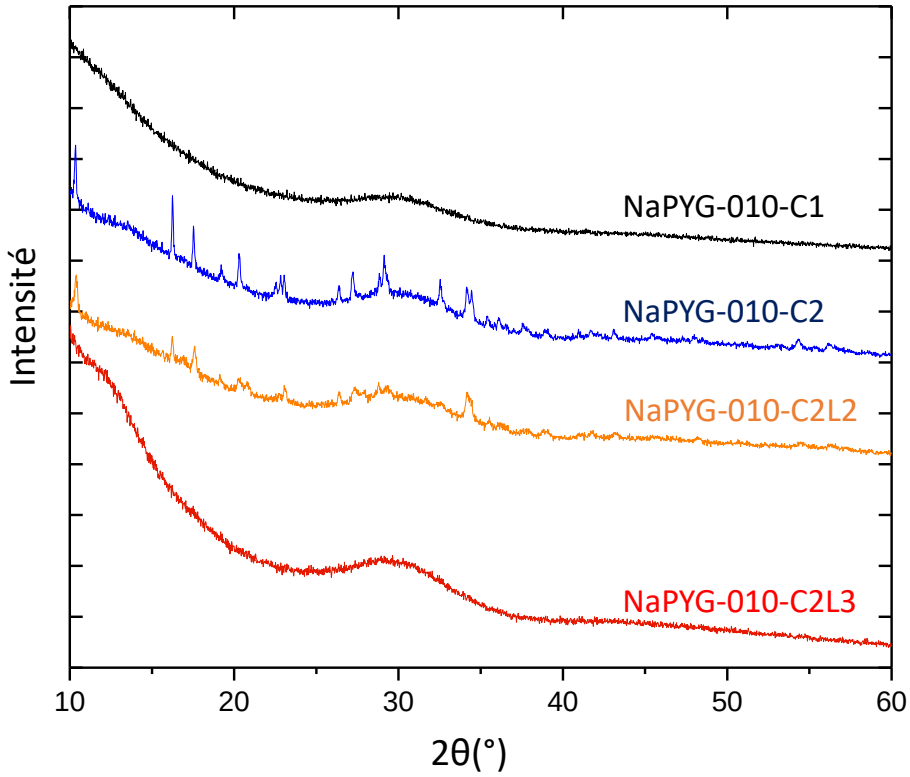


Figure II.14 : Diagrammes de diffraction des rayons X du NaPYG-010 synthétisée à partir de différentes concentrations en précurseurs C1 et C2 et différents volumes d'eau de lavage (L2 et L3).

Les diagrammes de diffraction des RX du NaPYG-010 dont la concentration des précurseurs a été multipliée par deux (Fig.II.14a) montrent que les matériaux lavés avec deux fois plus de quantité d'eau présentent une proportion moins élevée de phase cristallisée de type canaphite-α (pics de diffraction à 10,5° et 34° sont moins intenses) que lorsqu'ils sont lavés avec 100 mL d'eau. Sur le diagramme RX du matériau pour lequel le volume d'eau de lavage a été triplé, on observe la présence d'un halo assez large entre 25 et 35° démontrant que le matériau est amorphe.

La quantité d'eau de lavage est donc un facteur clé pour conduire à un matériau amorphe de type NaPYG-0X0 en éliminant les ions résiduels en solution n'étant pas déjà impliqués dans les clusters de la phase amorphe. Cependant, doubler la quantité d'eau de lavage lorsque la concentration des précurseurs est doublée n'est pas suffisant, car la proportion de phase canaphite-α - bien que réduite - est toujours présente ; il faudrait donc la tripler.

La figure II.15 présente les images MEB des matériaux NaPYG-010-C2L2 (a et b) et NaPYG-010-C2L3 (c et d).

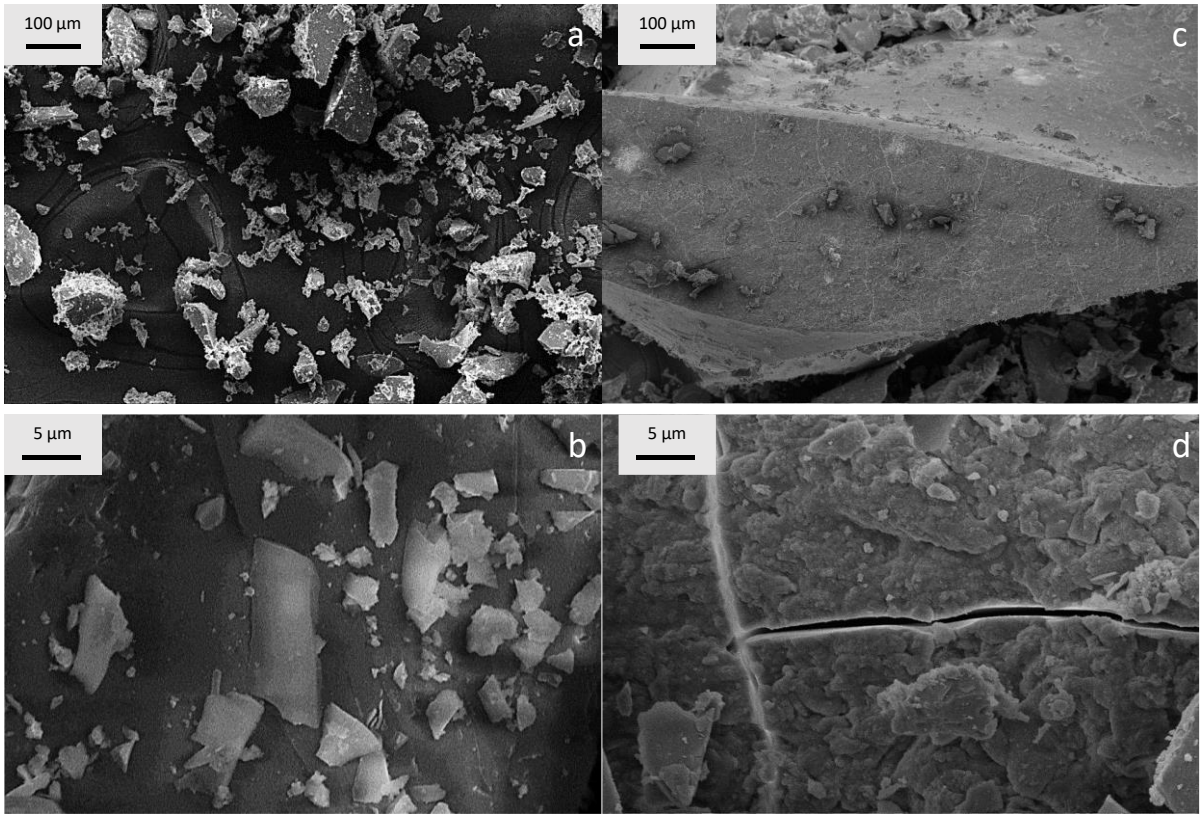


Figure II.15 : Micrographie MEB à plusieurs échelles du matériau NaPYG-010 synthétisé en doublant les concentrations en précurseurs (C2) et en doublant les volumes d'eau des lavages (a et b) ou en les triplant (c et d).

Le matériau NaPYG-010-C2L2 possède la même morphologie que le matériau NaPYG-010-C2 observé précédemment : des grains de taille entre 50 et 300 µm dont la surface est légèrement rugueuse caractéristique de la structure amorphe du matériau mais avec des cristaux de taille micrométrique (entre 2 et 10 µm) sur leur surface. Néanmoins, le nombre de cristaux semble inférieur lorsque la quantité d'eau de lavage augmente. Pour le matériau NaPYG-010-C2L3, les matériaux amorphes observés sont formés de grand blocs de forme angulaires et irrégulières de surface légèrement rugueuse et compacte identique au matériau NaPYG-010 initial. Il est aussi possible d'observer plusieurs fissures sur les blocs de plus grandes tailles (fig.II.15c et d).

Le prochain paramètre du protocole que nous avons modifié est la technique de séchage, afin d'essayer de contrôler la granulométrie des matériaux synthétisés. Cette prochaine étape pourrait nous permettre d'éviter de broyer les matériaux en vue des études d'évolution en milieu aqueux.

II.2.3. Technique de séchage

La technique de séchage utilisée pour la synthèse des NaPYG-0X0 correspond à étaler le gel dans un cristallisoir plat à 70°C après la dernière étape de centrifugation et déstructuration du gel. Malheureusement la taille des grains obtenus après séchage n'est pas contrôlée.

Lors des études d'évolution des matériaux en milieu aqueux (Chapitre III), les différentes compositions de matériaux NaPYG-0X0 qui n'ont pas la même surface spécifique, devront présenter une taille de grain similaire afin que leur dégradation en milieu aqueux puisse autant que possible être comparée. Par ailleurs, les matériaux utilisés pour la substitution osseuse, lorsqu'ils sont implantés pour les tests *in vivo* ne doivent pas avoir un diamètre trop petit car ils se dissoudraient trop rapidement pouvant entrainer une réaction inflammatoire, ni trop grand pour que le tissu osseux puisse se former facilement entre les grains. Il a donc été décidé de travailler avec une taille de grain comprise entre 100 et 500 µm. Dans l'industrie comme en laboratoire, l'utilisation de tamis est courante pour contrôler cette taille, cependant nous avons voulu éviter cette opération supplémentaire au laboratoire à cause des risques de contamination potentielle des matériaux lors de cette étape de tamisage. Un autre procédé couramment utilisé pour contrôler la taille de particules est le broyage. Cependant en raison du risque de perte considérable de matériau lors de ce type d'opération (environ 50%), pour réduire par exemple la taille des poudres en dessous de 100 µm, il a donc été décidé d'essayer une nouvelle technique de séchage qui pourrait permettre de mieux contrôler la taille des particules de matériaux NaPYG-0X0 : la lyophilisation. En effet, il a été montré que si des nanoparticules immergées en milieux aqueux de façon à former une solution colloïdale sont refroidies à des températures très faibles avant d'être séchées, il était possible d'influencer sur la taille des agglomérats des poudres finales[133–135].

Le protocole de synthèse n'est donc pas modifié jusqu'à l'étape de lavage du gel. Une fois le gel obtenu, il est immergé dans un bain d'azote liquide pendant 30 minutes afin de le congeler rapidement (trempe) et favoriser ainsi la germination de petits cristaux de glace entre les particules de matériau, puis le produit congelé est séché au lyophilisateur pendant1 nuit. Ce procédé de séchage a été testé seulement sur les matériaux NaPYG-010 et -030 (respectivement NaPYG-010N et NaPYG-030N) puis ils ont été caractérisés par DRX (Figure II.16), spectroscopie Raman (Figure II.17), MEB (Figure II.18 et II.19) et enfin la taille des particules obtenues a été mesurée à l'aide d'un granulomètre à diffraction laser et comparée à celle des matériaux synthétisés dans les conditions de référence (séchage à l'étuve à 70°C) (Figure II.18 et II.19).

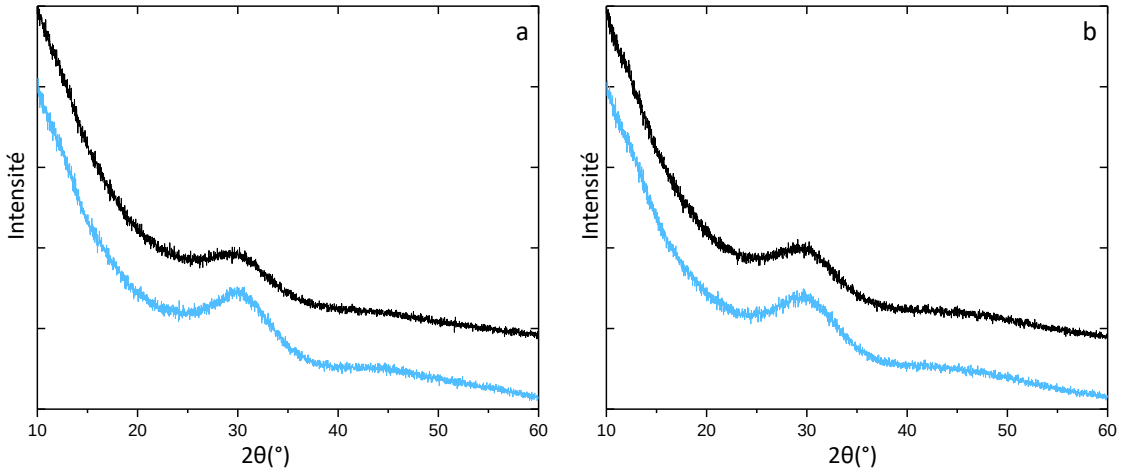


Figure II.16 : Diagramme de diffraction des rayons X des matériaux NaPYG-010 (a) et NaPYG-030 (b) après séchage au lyophilisateur (en bleu) comparé à celui après séchage à l'étuve à 70°C (en noir).

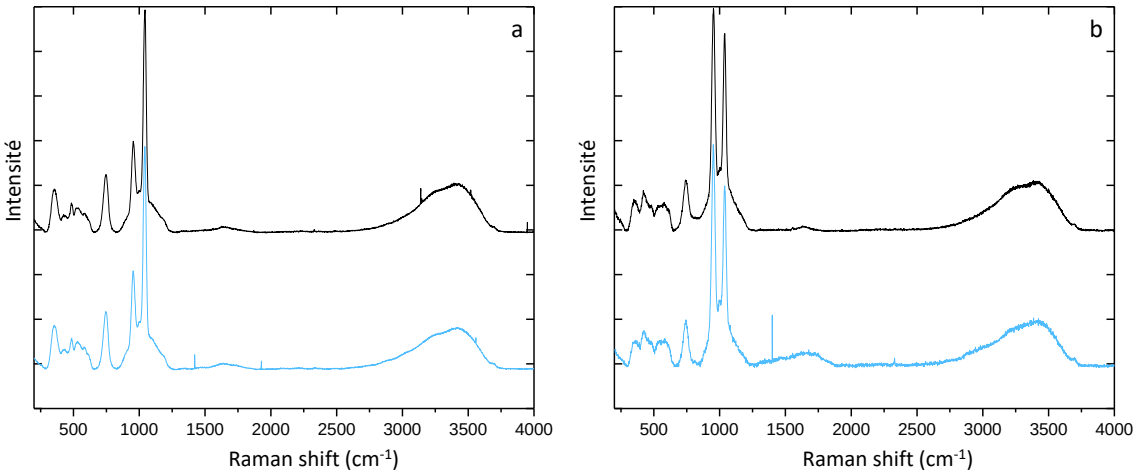


Figure II.17 : Spectres Raman des matériaux NaPYG-010 (a) et NaPYG-030 (b) après séchage au lyophilisateur (en bleu) comparé à celui après séchage à l'étuve à 70°C (en noir).

Les diagrammes de diffraction des RX (Figure II.16) et les spectres Raman (Figure II.17) des matériaux NaPYG-010 et -030 montrent que la structure et la composition chimique du matériau ne sont pas modifiées lorsqu'il est séché au lyophilisateur après une trempe dans l'azote liquide.

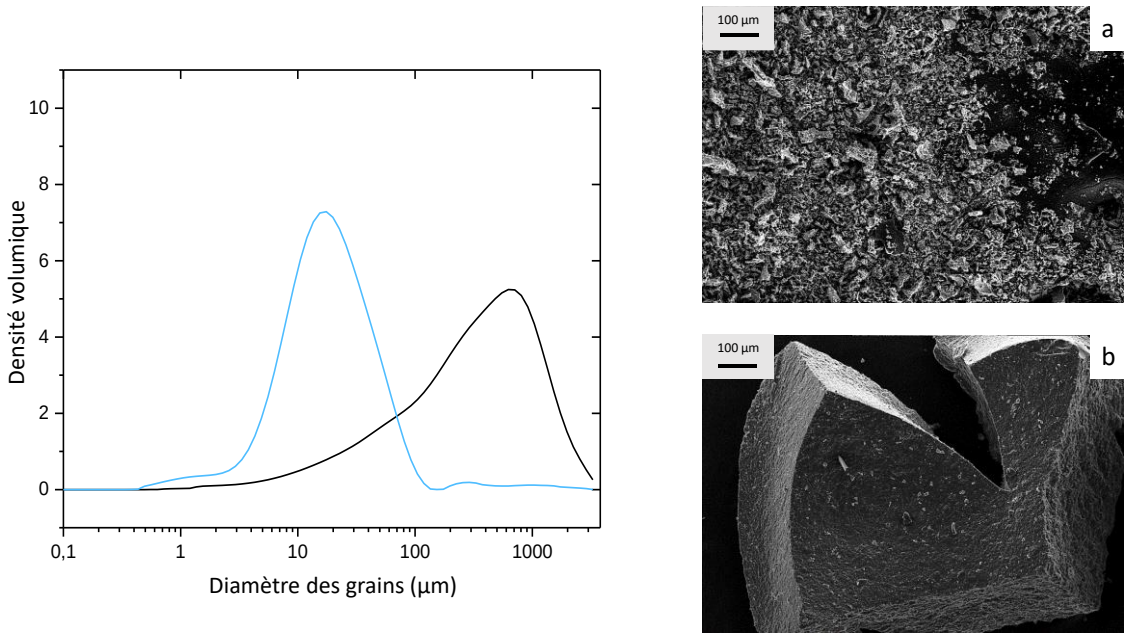


Figure II.18 : Distribution granulométrique (à gauche) et micrographies MEB (a et b, à droite) du matériau NaPYG-010 séché avec le lyophilisateur (distribution granulométrique en bleu et a) et à l'étuve à 70°C (distribution granulométrique en noir et b).

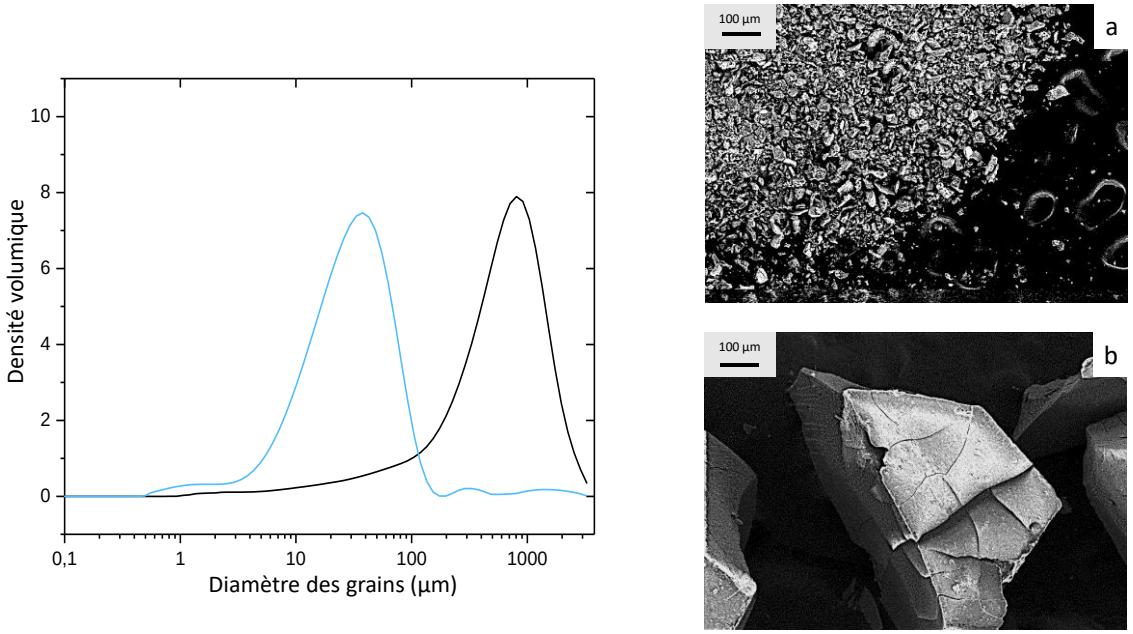


Figure II.19 : Distribution granulométrique (à gauche) et micrographies MEB (a et b, à droite) du matériau NaPYG-030 séché avec le lyophilisateur (distribution granulométrique en bleu et a) et à l'étuve à 70°C (distribution granulométrique en noir et b).

L'analyse granulométrique, ainsi que l'observation microscopique au MEB des matériaux NaPYG-010 et -030 séchés selon les deux procédés montrent que le diamètre moyen des particules dv(0,5) est de 30 (± 8) µm pour NaPYG-010 et de 45 (± 15) µm pour NaPYG-030 lorsqu'ils sont séchés au lyophilisateur. Ce diamètre est beaucoup plus élevé, 580 (± 230) et 790 (± 215) µm respectivement pour NaPYG-010 et NaPYG-030 séchés à l'étuve à 70°C (méthode de séchage de référence). De plus, la distribution granulométrique est moins étendue : l'indice de polydispersité est de 0,5 à 100 µm quand les matériaux sont séchés au lyophilisateur alors qu'elle est de 1 à 1200 µm lorsqu'ils sont séchés à l'étuve. Ces résultats montrent que l'utilisation du procédé de séchage par lyophilisation après trempe du gel dans l'azote liquide permet un meilleur contrôle du diamètre des particules de NaPYG-0X0 synthétisés et permet d'atteindre des particules de diamètres plus petits. Cette diminution de la taille des grains serait due à une congélation rapide de la solution qui entraînerait une vitesse de germination élevée de petits cristaux de glace. Par conséquent, pour une quantité d'eau donnée la taille de ces cristaux serait donc inférieure. Il serait certainement possible de contrôler la taille des grains en faisant varier la vitesse de congélation, par exemple en mettant les solutions colloïdales au congélateur (-20°C) pendant plusieurs dizaines minutes plutôt que de les immerger dans l'azote liquide.

Le prochain paramètre étudié est l'effet de la stérilisation sur les matériaux NaPYG-0X0. Bien que ce paramètre ne rentre pas dans le protocole de synthèse, un biomatériau est obligatoirement stérilisé avant d'être implanté. Il est donc nécessaire d'inspecter si la stérilisation modifie la structure des matériaux NaPYG-0X0.

II.2.4. Influence de la stérilisation des matériaux NaPYG-0X0

Les matériaux conçus pour la santé ne peuvent pas être implantés s'ils ne sont pas stériles. Un matériau stérile est un matériau exempt de tout micro-organisme viable. Afin de supprimer les micro-organismes d'un matériau plusieurs méthodes peuvent être utilisées, mais la stérilisation par rayon gamma est la plus utilisée industriellement. Ce traitement consiste à irradier les matériaux par une dose contrôlée de rayon gamma, empêchant les cellules/bactéries de se diviser, ce qui entraine la mort des micro-organismes. La norme ISO 11137-3:2017 indique que la méthode VDmax15 garantit l'obtention de la stérilité des matériaux pour des applications médicales. Elle consiste à appliquer une dose de 25 kGy pour stériliser le matériau puis à s'assurer qu'il n'y ait plus de microorganismes vivants sur le matériau. Les matériaux NaPYG-010, -030 et -050 synthétisés dans les conditions de référence ont été ensuite stérilisés en milieu industriel (IONISOS©, Dagneux) à une dose d'irradiation de 25 kGy de rayons gamma selon la norme

qualité pour la stérilisation du matériel médical (norme ISO 11137-3:2017). Les matériaux ont ensuite été caractérisés par DRX, spectroscopie Raman et MEB (figures II.20, II.21 et II.22) pour analyser si ce traitement de stérilisation modifiait les matériaux NaPYG-0X0.

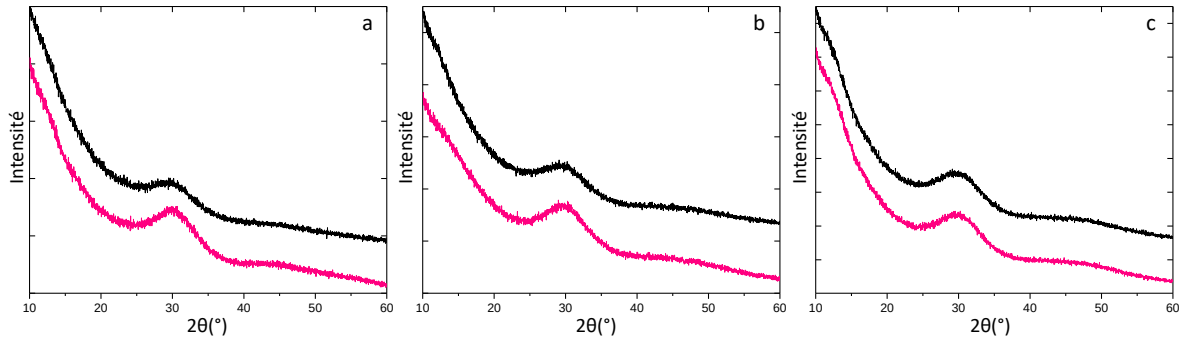


Figure II.20 : Diagramme de diffraction des rayons X des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b) et NaPYG-050 (c) avant (noir) et après stérilisation par rayonnement gamma (rose).

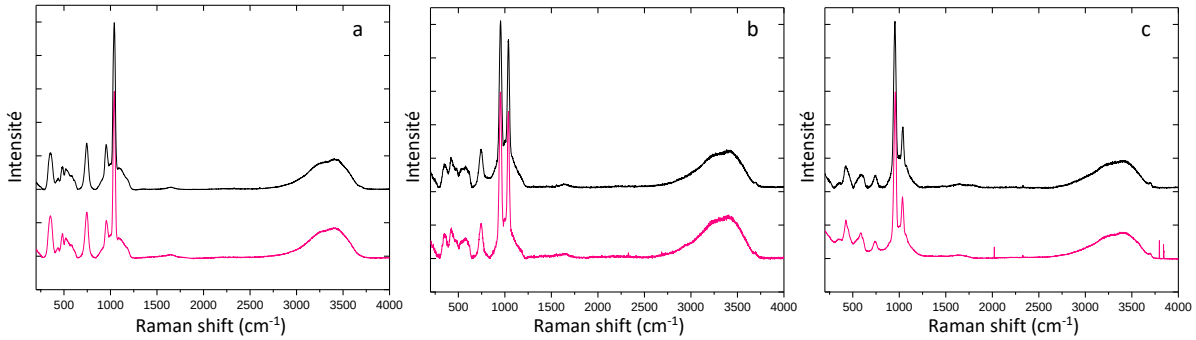


Figure II.21 : Spectres Raman des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b) et NaPYG-050 (c) avant (noir) et après stérilisation par rayonnement gamma (rose).

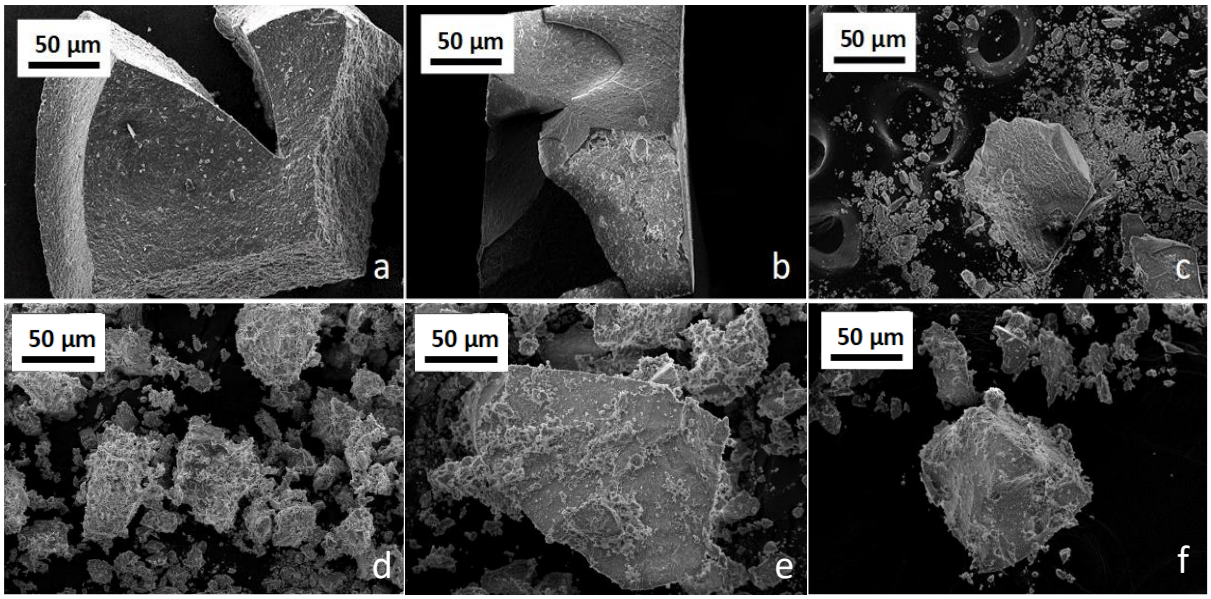


Figure II.22 : Micrographie MEB des matériaux NaPYG-010 (a et d), NaPYG-030 (b et e) et NaPYG-050 (c et f) avant et après stérilisation par rayonnement gamma.

Le halo large observé sur le diagramme DRX (figure II.20) montre que le matériau est resté amorphe et les spectres Raman (figure II.21) confirment que l'irradiation au rayonnement gamma n'a pas modifié la composition des matériaux NaPYG-0X0. En effet on retrouve les mêmes bandes de vibration des liaisons chimiques, avec la même intensité relative, pour tous les matériaux avant et après stérilisation au rayonnement gamma. D'un point de vue macroscopique, les matériaux NaPYG-0X0 n'ont pas été modifiés suite à cette étape de stérilisation (Fig.II.22). Ils apparaissent toujours sous forme de grains de plusieurs dizaines de micromètres, de couleur blanche. Sur les micrographies MEB, la surface des matériaux NaPYG-0X0 semble plus rugueuse après stérilisation et on observe plus de grains de taille inférieure à 20 µm. Cette différence est probablement due aux chocs reçus par les matériaux lors du transport par colis jusqu'au et depuis le site de IONISOS©.

II.2.5. Etude préliminaire de changement d'échelle pour la synthèse des matériaux NaPYG-0X0

Les matériaux amorphes sous forme de poudre composent en grande partie le marché des substituts osseux et le bioverre de type 45S5 représente 95% de la part de marché de la disponibilité des produits. Les matériaux NaPYG-0X0 pourraient devenir de nouveaux substituts

osseux sous forme de granulés, et élargir ainsi la gamme de produits sur le marché afin d'offrir une nouvelle solution de comblement et réparation osseuse dont la vitesse de dégradation serait contrôlée par leur composition (rapport ortho / (ortho + pyro) phosphate).

Les matériaux NaPYG-0X0 n'ont cependant été synthétisés qu'à l'échelle du laboratoire. Lors de la thèse de L. Mayen[92], la quantité de matériaux obtenue par synthèse était d'environ 0,2 g. Au cours des présents travaux de thèse une nouvelle centrifugeuse a été installée au laboratoire afin de traiter de plus grands volumes par centrifugation ce qui a permis de produire environ 3 g de matériau par synthèse, ce qui reste encore très éloigné du kilogramme par lot visé dans la perspective d'un développement industriel. Cette faible quantité produite est due au faible rendement massique de cette synthèse qui est d'environ 5 %. Des études d'optimisation de la synthèse ont été réalisées en augmentant la concentration de tous les réactifs et en augmentant le volume d'eau de lavage mais les matériaux synthétisés cristallisaient pour les compositions NaPYG-010 et NaPYG-050 ; ces essais ont été présentés dans le chapitre II. Plusieurs autres paramètres peuvent encore être optimisés afin d'augmenter le rendement tout en gardant la structure amorphe du matériau. Il a été proposé d'augmenter le temps de centrifugation ou de remplacer l'étape de centrifugation par une étape de filtration pour récupérer plus de poudre entre chaque étape de lavage. En effet la centrifugation n'est pas une étape couramment utilisée pour la synthèse de substituts osseux commerciaux car elle prend trop de temps. Une solution serait de remplacer l'étape de centrifugation par un système de filtration Nutsche comprenant l'étape de filtration, de lavage et de séchage sous pression. Une autre hypothèse serait d'augmenter la concentration du précurseur du calcium, le chlorure de calcium dihydraté, le calcium étant le réactif limitant de la synthèse des matériaux NaPYG-0X0. Cette dernière suggestion a été réalisée seulement sur la synthèse du matériau NaPYG-050 en multipliant la concentration de $CaCl_2,2H_2O$ par 2,5. Cette valeur a été inspirée par les premiers travaux publiés sur cette nouvelle famille de matériaux amorphes mixtes ortho et pyrophosphates élaborés avec un précurseur à base de potassium à la place du sodium comme ions monovalents[88]. Le matériau a donc été synthétisé en utilisant le même protocole que celui décrit dans le chapitre II en multipliant la concentration de $CaCl_2,2H_2O$ par 2,5. Le rendement massique de cette synthèse a été multiplié par deux ; il atteint 10 %. Le matériau a ensuite été caractérisé par DRX (figure II.23).

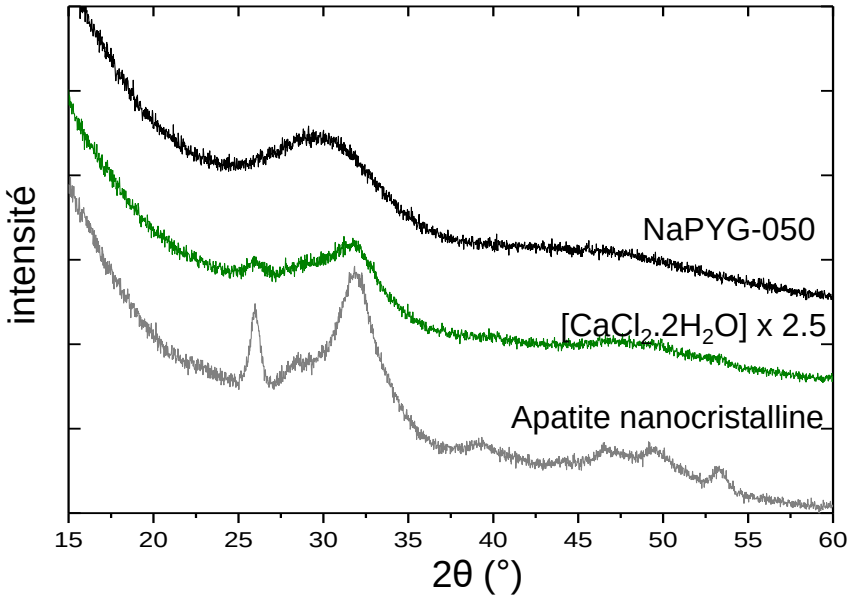


Figure II.23 : Diagrammes DRX du matériau NaPYG-050 élaboré avec les paramètres de synthèse décrits dans le chapitre II (en noir) et celui élaboré à partir d'une concentration en $CaCl_2,2H_2O$ multipliée par 2,5 (en vert). Le diagramme RX d'une poudre d'apatite nanocristalline synthétique pure de référence est également présenté.

Sur le diagramme de diffraction RX du matériau synthétisé en augmentant la concentration de $CaCl_2,2H_2O$ nous pouvons distinguer que des pics peu intenses et très larges apparaissent sur le halo à environ 26° et 32°. Ces pics peuvent être attribués aux plan (002) et (211) de l'apatite nanocristalline dont le diagramme de diffraction RX est aussi présenté sur la figure VI.1. Le matériau a donc très légèrement cristallisé sous forme d'apatite nanocristalline. Une étude devrait être prochainement réalisée en multipliant la concentration de $CaCl_2,2H_2O$ par deux et en remplaçant l'étape de centrifugation par une étape de filtration afin d'essayer d'augmenter le rendement massique sans que la structure amorphe du matériau ne soit modifiée du fait d'un lavage trop peu efficace.

En l'état, le protocole de synthèse des NaPYG-0X0 que nous mettons en œuvre au laboratoire ne permet pas de produire une quantité suffisante de matériau par lot. Pour augmenter cette quantité, différents paramètres ont été étudiés en vue d'optimiser la synthèse mais le rendement massique actuellement de 5 %, doit encore être amélioré. Les prochains travaux sur le rendement massique porteront sur l'augmentation de la concentration initiale du précurseur de calcium entre 1 et 2,5 fois, la maturation du matériau actuellement d'environ 2 minutes et 30 secondes devra surement être augmentée et une étape de filtration pourrait probablement remplacer l'étape de centrifugation.

II.3. Conclusion

Lors de ce chapitre, nous avons étudié différents paramètres du protocole de synthèse afin de permettre l'obtention d'une plus grande quantité de matériaux NaPYG-0X0 sans que la structure et la composition des matériaux ne soient modifiées. Pour rappel, suite à la synthèse de référence des matériaux NaPYG-0X0, les matériaux obtenus sont seulement composés de calcium, de sodium, d'orthophosphate et de pyrophosphate et d'eau et ont une structure amorphe. Lorsque nous avons augmenté la concentration des solutions de précurseurs, le matériau NaPYG-030 n'a pas été modifié sensiblement alors que les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-050 ont cristallisé partiellement dès que la concentration a été multipliée respectivement par deux et par trois. Nous avons donc cherché à inhiber la cristallisation du matériau NaPYG-010 lorsque la concentration en solution de précurseurs doublait en augmentant la quantité d'eau utilisée pour l'étape de lavage afin d'éliminer les ions résiduels en solution et potentiellement impliqués dans cette phase cristalline non-désirée. Cette étude a montré que lorsque la quantité d'eau de lavage augmentait la phase cristallisée contenue dans le matériau NaPYG-010 diminuait drastiquement et ne se formait pas lorsque le volume d'eau de lavage était triplé. Ensuite nous avons cherché à contrôler la taille des grains de matériaux NaPYG-0X0 synthétisés en utilisant une méthode de séchage par lyophilisation après une trempe du gel dans l'azote liquide. Nous avons observé que la structure et la composition des matériaux n'étaient pas modifiées. Il est intéressant de remarquer que les diamètres des grains de NaPYG-0X0 obtenus par lyophilisation étaient bien plus petits et leur distribution granulométrique était plus étroite par rapport à ceux obtenus par la technique de séchage de référence (à l'étuve à 70°C). Cependant la taille de grains des matériaux utilisés lors des implantions ne doit pas être trop petite (> 100 µm)[136,137] et nous obtenons par cette méthode, un diamètre moyen des grains inférieur à 50 µm. Nous avons donc décidé pour les études de l'évolution *in vitro* et *in vivo*, d'utiliser les matériaux synthétisés dans les conditions de référence, exposées dans la partie II.1.2. En effet, en augmentant les concentrations en précurseurs par deux et en triplant la quantité d'eau pour chaque lavage, nous obtiendrons certes une plus grande quantité de matériau mais nous diminuerons le rendement massique et la synthèse serait plus longue. La quantité de matériau synthétisée par heure ne serait donc pas optimisée.

L'étude de différents paramètres de synthèse a permis d'approfondir notre connaissance sur les matériaux NaPYG-0X0 et en particulier leur formation. Ainsi les compositions NaPYG-010 et NaPYG-050 ont tendance à cristalliser respectivement en canaphite-α et apatite nanocristalline alors que le matériau NaPYG-030 est stable même lorsque la concentration des

précurseurs augmente beaucoup. Enfin la stérilisation par irradiation au rayon gamma n'a pas modifié ni la structure, ni la composition des matériaux NaPYG-0X0 ; elle pourra donc être utilisée avant les études cellulaires *in vitro* et les implantations de ces matériaux *in vivo*.

Chapitre III : ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DES MATÉRIAUX AMORPHES NaPYG-0X0 DANS DIFFÉRENTS MILIEUX AQUEUX ACELLULAIRES

L'étude de l'évolution en milieu aqueux d'un matériau dont le but est la substitution osseuse est une première étape essentielle afin de mieux appréhender ses propriétés physico-chimiques et en particulier sa réactivité en l'absence de cellules. Les études *in vitro* réalisées avec les matériaux amorphes composés seulement d'orthophosphate de calcium ont montré leur très grande réactivité et leur tendance à se transformer spontanément en orthophosphate de calcium cristallins, principalement en apatite, suite à leur immersion en milieu aqueux[78,138,139]. Les matériaux amorphes constitués uniquement de pyrophosphate ont aussi été étudiés en milieu acellulaire et ont montré, au contraire, une grande stabilité en solution[66,71]. Par ailleurs, le pyrophosphate est connu pour être hydrolysé *in vivo* et *in vitro* en milieu aqueux[140]. Cette hydrolyse peut être favorisée par des enzymes (phosphatase alcaline)[56] ou dans des milieux acides[66,141], comme lors d'une réaction inflammatoire, conduisant à des ions orthophosphate. Néanmoins, l'évolution des matériaux mixtes ortho / pyrophosphates NaPYG-0X0 en milieu aqueux n'a jamais été étudiée, alors que cette étude est cruciale afin de mieux appréhender leur comportement physico-chimique et biologique une fois implantés. L'étude des ions et composés libérés en milieu aqueux couplée à la caractérisation du solide après évolution permettra de comprendre leur mécanisme d'évolution physico-chimique en solution aqueuse. De plus, les évolutions réalisées dans différents milieux aqueux mimant partiellement différentes étapes ou conditions d'implantation d'un substitut osseux, permettent de comprendre séparément le rôle des différents constituants du milieu physiologique sur les matériaux NaPYG-0X0.

L'objectif de cette étude est d'observer l'évolution physico-chimique des matériaux amorphes mixtes ortho et pyrophosphate de calcium NaPYG-0X0 en solution aqueuse afin de déterminer les mécanismes physico-chimiques impliqués et si le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates est un paramètre clé contrôlant l'évolution *in vitro* de ces matériaux. Pour ce faire, les trois compositions (NaPYG-010, NaPYG-030 et NaPYG-050) étudiées précédemment seront immergées pendant différentes durées dans de l'eau ultra-pure acidifiée (autour de pH 2 et pH 4) ou non, dans une solution SBF ou dans un milieu de culture α-MEM acellulaire. De plus, les études d'évolution des matériaux NaPYG-0X0 dans les milieux SBF et α-MEM seront comparées à l'évolution du matériau 45S5. En outre, le bioverre 45S5 est connu pour former une couche d'apatite en milieu ionique, nous comparerons donc la vitesse de formation de cette phase ainsi que son mécanisme avec éventuellement l'apatite qui se développera sur les matériaux NaPYG-0X0. Même si la composition du matériau 45S5 est différente de celle des matériaux étudiés lors de cette thèse, cette comparaison reste toutefois intéressante puisque c'est un matériau amorphe composé de calcium, de sodium et de phosphate sous forme d'oxyde. Après le temps d'évolution choisi, le matériau solide restant sera séparé du milieu d'évolution et caractérisé par spectroscopie Raman, MEB et DRX, tandis que le pH et les concentrations en calcium, sodium, orthophosphate et pyrophosphate seront mesurées dans les milieux.

Ce chapitre présentera dans un premier temps le protocole utilisé pour réaliser les études *in vitro* d'évolution des trois compositions de matériaux NaPYG-0X0. Puis, les résultats des études dans l'eau à différents pH initiaux et dans les milieux ioniques (SBF et α-MEM) seront analysés.

III.1. Protocole d'évolution

Le protocole mis en œuvre pour l'étude de l'évolution des matériaux NaPYG-0X0 est schématisé sur la figure III.1. Il est divisé en quatre étapes : la préparation des échantillons, l'immersion du matériau dans le milieu, la séparation du matériau du milieu aqueux par filtration au temps choisi et enfin la caractérisation du milieu et du matériau solide par diverses techniques.

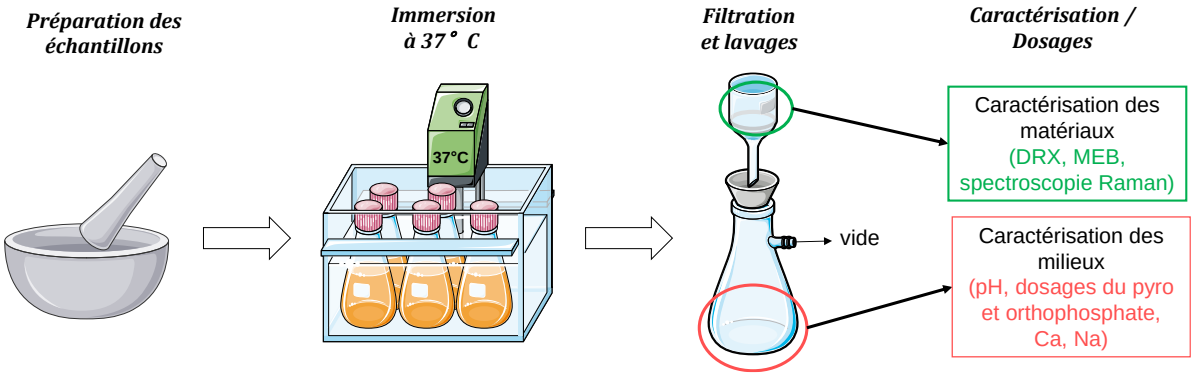


Figure III.1 : Schéma des étapes du protocole d'évolution des matériaux NaPYG-0X0 en milieu aqueux

III.1.1. Préparation des matériaux

Afin de mener les études d'évolution des matériaux NaPYG-0X0 dans différents milieux aqueux, nous allons, pour chaque test, exposer une même quantité de matériau à un même volume de solution. Afin de considérer les éventuels effets de taille de particules sur leur évolution, nous avons cherché à obtenir des tailles de particules moyennes équivalentes pour toutes les compositions de matériaux NaPYG-0X0 étudiées. Ainsi, suite à leur synthèse, les matériaux NaPYG-0X0 ont été broyés manuellement à l'aide d'un mortier et d'un pilon pendant 5 min en vue d'obtenir des distributions de taille de particules proches. La distribution de taille des particules ainsi que le diamètre moyen des particules dv(0,5) ont été mesurés grâce à un granulomètre laser ; les distributions granulométriques avant et après broyage sont présentées sur la Figure III.2.

Les valeurs du diamètre moyen des particules avant broyage, 650 (± 236), 525 (± 254) et 592 (± 206) µm respectivement pour les compositions NaPYG-010, -030 et 050, ont logiquement diminué jusqu'à 332 (± 215), 265 (± 134) et 248 (± 126) après broyage. De plus, le broyage a réduit l'écart entre le plus petit diamètre moyen et le plus grand, qui était de 125 µm avant le

broyage et est passé à 84 µm. Il est aussi notable que même si l'étendue de la distribution granulométrique reste élevée, elle a diminué après broyage : entre 2 et 2500 µm avant broyage et entre 2 à 1500 µm après, avec plus de 50% des particules de diamètre compris entre 175 et 550 µm. Bien qu'elles ne soient toujours pas parfaitement superposables après broyage, grâce à ce dernier, les distributions granulométriques des trois matériaux sont plus proches du point de vue de la forme de la distribution et de la position du mode.

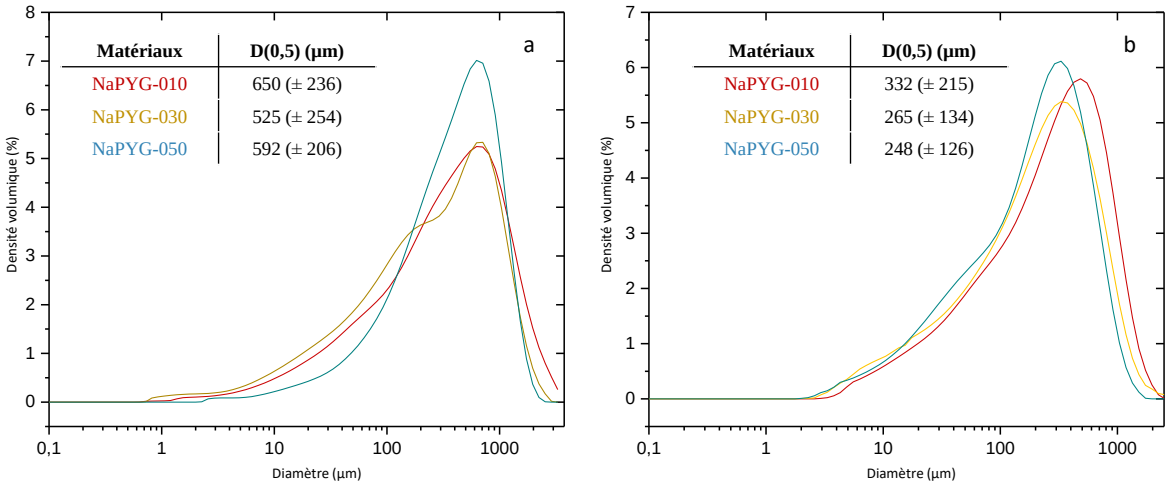


Figure III.2 : Distribution granulométrique des matériaux NaPYG-0X0 avant (a) et après broyage (b) manuel au mortier et pilon.

III.1.2. Immersion des matériaux NaPYG-0X0 en milieu aqueux

Les matériaux broyés sont ensuite immergés à 37°C en triplicat pendant différentes durées d'évolution. Le protocole utilisé suit le modèle proposé par Maçon et al.[117], publié dans le but d'unifier les études d'évolution en milieux aqueux de matériaux amorphes (verres bioactifs et leurs équivalents). La méthode utilisée est une version modifiée de la norme ISO23317:2014, cette dernière étant plus appropriée pour les particules à surface spécifique élevée. En effet, bien que les surfaces spécifiques soient sensiblement différentes pour chacune des compositions (8 ± 1, 95 ± 2 et 129 $m^2.g^{-1}$ pour respectivement NaPYG-010, -030 et -050), nous avons choisi de nous placer à un rapport masse de poudre/volume de solution constant (150 mg/100 mL). Les incertitudes des mesures de la surface spécifique liées à la déshydratation des matériaux lors du dégazage (partie II.1.3.6) nous empêche de nous placer à un rapport surface spécifique/volume de solution constant.

Ainsi, 150 mg de matériau sont pesés et immergés dans 100 mL de solution, le tout placé dans un pilulier comportant un barreau aimanté et fermé de façon étanche. L'ensemble est ensuite

plongé dans un bain-marie thermostaté à 37°C - sous agitation magnétique à 120 tr/min. Chaque composition de matériaux est testée en triplicat pour chaque temps d'évolution. Le pH et la température du milieu sont vérifiés avant lancement de l'expérience. Les matériaux évoluent pendant différents temps comportant au moins un temps court (1 heure et/ou 7 heures), un temps intermédiaire (2 et/ou 6 jours) et un temps long (15 jours). Ces durées d'évolution ont été choisies en accord avec les biologistes impliqués dans le projet ANR Pyverres pour essayer de corréler ces évolutions acellulaires à des tests *in vitro* cellulaires qu'ils ont réalisés sur les matériaux NaPYG-0X0 (cf. Chapitre IV) et tenter si possible d'appréhender séparément l'effet des cellules de l'évolution physico-chimique de ces matériaux.

III.1.3. Séparation des matériaux du milieu aqueux

A l'issue des différents temps d'évolution, les matériaux sont filtrés sous vide, à l'aide d'un filtre en cellulose (47 mm de diamètre) dont la taille des pores est de 0,2 µm de diamètre. Le montage « tulipe » est présenté sur la figure III.3.

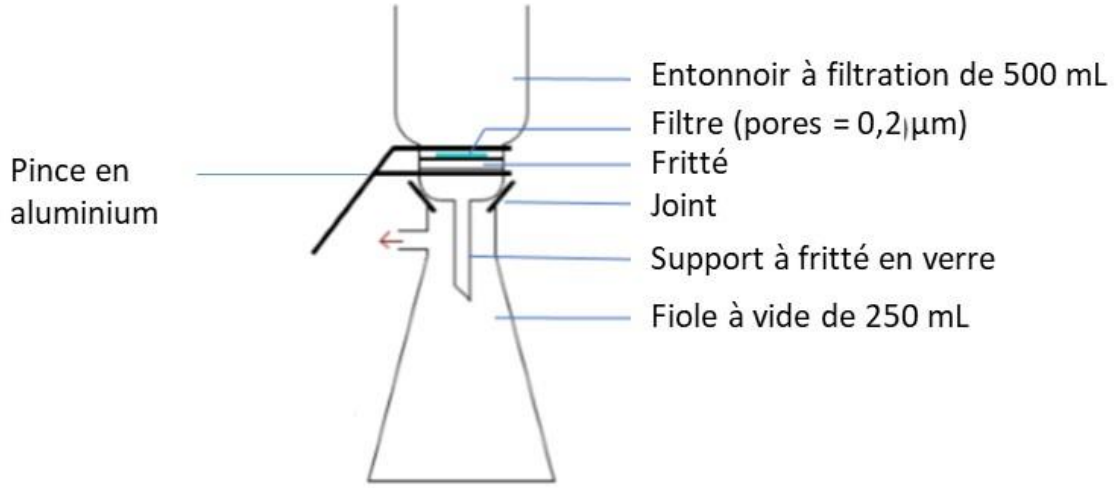


Figure III.3 : Schéma du montage tulipe pour la filtration des matériaux NaPYG-0X0 à l'issue de leur étude d'évolution

Une fois le milieu filtré, le matériau est ensuite lavé deux fois : une première fois avec 100 mL d'eau ultra-pure et une seconde fois avec 50 mL l'éthanol. Le premier lavage à l'eau permet d'entraîner les ions libres. Quant à l'éthanol, il sert principalement à sécher le matériau plus rapidement ; par ailleurs il permettra également d'éliminer plus facilement certaines molécules notamment lors des tests d'évolution dans le milieu de culture α-MEM. À l'issue de la filtration le matériau est placé une nuit dans un dessiccateur avant d'être pesé puis caractérisé par MEB, DRX et spectroscopie Raman.

Le milieu, quant à lui, est récupéré et placé dans un récipient, puis son pH est mesuré. Il est ensuite stocké au congélateur afin d'éviter toute contamination microbienne. En effet, nous avons eu la mauvaise surprise d'observer une contamination des milieux des évolutions dans l'eau ultra-pure non acidifiée qui avaient été stockés au réfrigérateur ; les dosages de ces milieux-là n'ont pas pu être réalisés. Le cas échéant, les ions calcium, sodium, orthophosphate et pyrophosphate sont ensuite dosés dans tous les autres milieux étudiés.

Les matériaux sont caractérisés dans un premier temps au diffractomètre RX sur poudre, puis au spectromètre Raman et enfin par microscope électronique à balayage. La description des méthodes d'analyse des matériaux est fournie dans l'annexe II.2. Parallèlement, le pH des solutions est mesuré directement après filtration du matériau à l'aide d'un pHmètre étalonné, puis les solutions sont conservées au congélateur en attendant de pouvoir doser les ions sodium et calcium par absorption atomique de flamme, les ions orthophosphate et pyrophosphate par méthode colorimétrique pour le premier et à l'aide d'un kit commercial PPi Light® de chez Lonza©. Les méthodes de dosages des solutions récupérées après évolution des matériaux sont décrites dans l'annexe III.1.

III.2. Evolution des matériaux NaPYG-0X0 dans l'eau

Dans un premier temps les matériaux NaPYG-0X0 ont été immergés dans de l'eau ultra-pure, c'est-à-dire une eau ne contenant aucun composé organique et minéral, dont la résistivité a été mesurée à 18 MΩ.cm. L'eau étant le solvant et composé principal du sang il constitue le milieu aqueux le plus simple dans lequel étudier le comportement des matériaux NaPYG-0X0. Nous avons ensuite mené une seconde série d'expériences en plaçant les matériaux dans de l'eau préalablement acidifiée à différents pH (pH 2 et 4) avec de l'acide nitrique (HNO_3, Normapur 20422.242) pour étudier l'effet du pH acide sur les matériaux NaPYG-0X0, car il est connu qu'un pH acide favorise l'hydrolyse *in vitro* et *in vivo* du pyrophosphate en orthophosphate[98,99]. De plus, suite à une implantation, un microenvironnement local acide est généré principalement par les macrophages (phase inflammatoire), diminuant le pH (pH 4 - 5) pendant une courte période[100]. D'où notre choix de réaliser une étude à pH 4 pour s'approcher des conditions de pH liées à l'inflammation post-opératoire. Nous avons également testé les matériaux NaPYG-0X0 à un pH encore plus acide afin de vérifier la stabilité de ces matériaux dans des conditions de pH extrêmes. L'acide nitrique a été choisi ici car c'est un acide fort (pKa = -1,37) qui sera complètement dissocié, ainsi le pH reflètera la disponibilité totale des protons en solution, sans qu'aucun "réservoir" supplémentaire ne soit disponible une fois les protons consommés.

Nous allons donc dans ce qui suit présenter les différents résultats obtenus pour l'évolution des matériaux NaPYG-0X0 dans l'eau ainsi que dans l'eau acidifiée à pH 2 et à pH 4.

III.2.1. Evolution des matériaux NaPYG-0X0 dans l'eau ultra-pure

Les matériaux NaPYG-0X0 ont été immergés dans l'eau ultra-pure à 37°C pendant un temps court (7 heures), deux temps intermédiaires (2 et 6 jours) et un temps long (15 jours). Les caractérisations des matériaux et des milieux sont présentées à la suite.

III.2.1.1 Caractérisation des matériaux

Suite à leur séparation du milieu, les matériaux ont été pesés et la figure III.4 présente l'évolution de la masse des trois types d'échantillons (NaPYG-010, NaPYG-030 et NaPYG-050)

par rapport à la masse initialement introduite (rapport exprimé en %) en fonction du temps d'immersion.

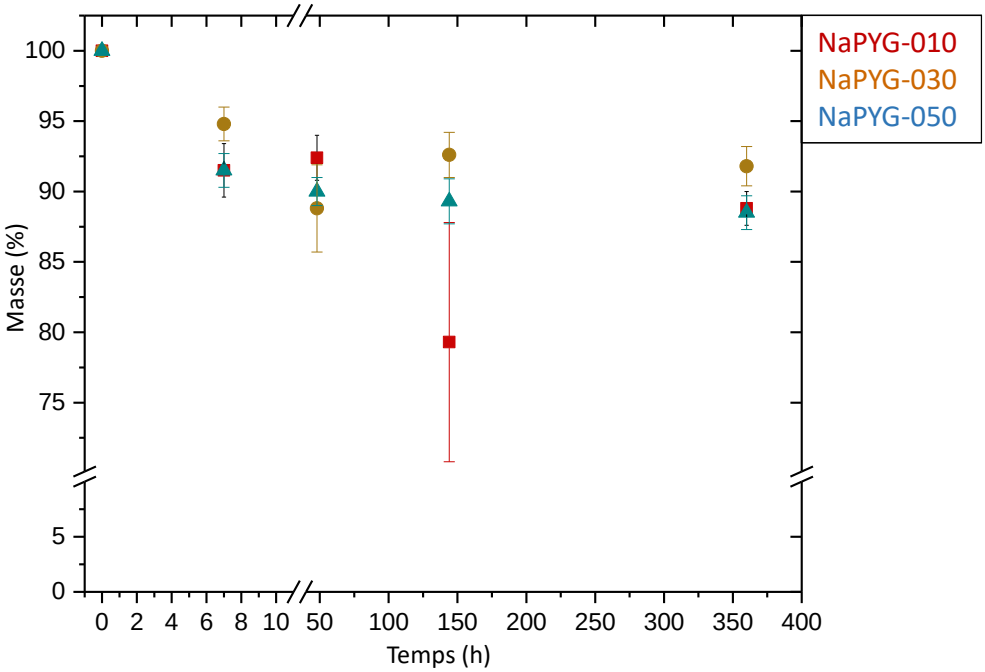


Figure III.4 : Evolution de la quantité de matériaux NaPYG-0X0 en fonction de la durée d'immersion dans l'eau ultra-pure. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique par rapport à la masse de départ.

La masse de matériaux NaPYG-0X0 a diminué au cours des 2 premiers jours d'évolution, puis s'est stabilisée jusqu'à 15 jours (360 heures) d'évolution. A 15 jours, la perte de masse est d'environ 10% pour les trois compositions de matériaux NaPYG-0X0. L'évolution de la perte de masse pour les trois compositions semble relativement identique excepté le point à 6 jours d'évolution pour le matériau NaPYG-010 qui présente une incertitude très élevée. Cette perte de masse plus importante peut s'expliquer par une perte de matériau accidentelle lors d'une étape de transfert du matériau (du poste de filtration au dessiccateur pour le séchage ou sur la balance de pesée).

III.2.1.1.1 Diffraction des rayons X

La structure des matériaux NaPYG-0X0 après leur évolution dans de l'eau ultra-pure a été étudiée par DRX (Figure III.5). Après 15 jours d'évolution dans de l'eau ultra-pure, les matériaux NaPYG-010 et -030 sont restés amorphes, alors que le matériau NaPYG-050 apparaît cristallisé à 6 jours. Cette cristallisation visible sur le diagramme de diffraction RX à 6 jours d'évolution montre de larges pics (Fig. 5c) témoignant de la présence d'une phase mal cristallisée. En

particulier, les pics à 25,9 ° et 31,8 ° correspondant à la diffraction des plans (002) et (211) des cristaux d'apatite[63], montrant que le matériau NaPYG-050 a évolué vers une phase d'apatite nanocristalline entre 2 et 6 jours d'immersion dans l'eau. Rappelons que la composition initiale de NaPYG-050 est celle qui comporte la proportion la plus élevée d'orthophosphate par rapport aux matériaux NaPYG-010 et -030.

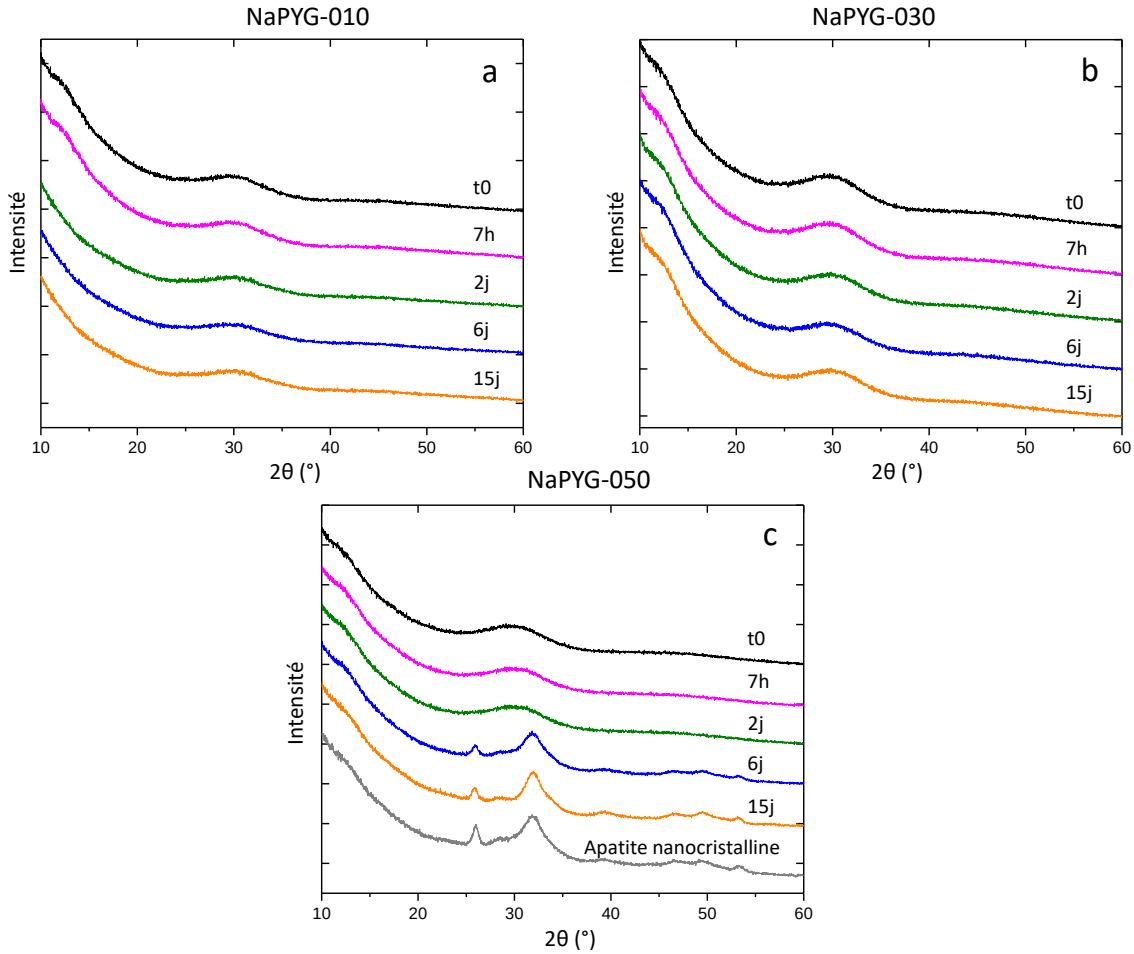


Figure III.5 : Diagrammes de diffraction des RX des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b) et NaPYG-050 (c) après différents temps d'évolution dans l'eau ultra-pure. Le diagramme de DRX d'une apatite nanocristalline synthétique pure de référence est également présenté.

De plus, le calcul de la taille apparente des cristallites d'apatite par la formule de Scherrer (Equation III.1, Tableau III.1) appliquée au plan (002), a pu nous apporter plus d'informations sur l'apatite formée au cours de l'évolution du matériau NaPYG-050, notamment une estimation de la longueur des cristaux formés :

$$L(hkl) = \frac{0{,}94 \times \lambda}{\cos\theta \times \sqrt{(\beta_1^2 - \beta_0^2)}} \quad \text{(Equation.III.1)}$$

Avec:

- L (hkl) (Å): taille moyenne des cristallites dans la direction perpendiculaire au plan (hkl), ici (002)

- λ: longueur d'onde ($\lambda(K_{\alpha 1Cu})$ = 1,540598 Å)

- 0,94: constante de Scherrer

- θ (rad): angle de Bragg

- β_0 (rad): largeur à mi-hauteur du pic de diffraction (hkl) d'une hydroxyapatite stœchiométrique calcinée à 900°C pendant 3h (0,00128 rad pour le plan (002))

- β_r (rad): largeur à mi-hauteur du pic de diffraction (hkl) considéré sur l'échantillon étudié.

Tableau III.1 : Largeur à mi-hauteur du pic de diffraction (002) de l'apatite et taille apparente de cristallites correspondante calculée à partir de la formule de Scherrer

Temps d'évolution de NaPYG-050	6 jours	15 jours
Largeur à mi-hauteur du plan (002) (rad)	$0,96 \times 10^{-2}$	$0,87 \times 10^{-2}$
Tailles apparente des cristallites (Å)	157 (± 5)	173 (± 5)

Nous pouvons voir que la largeur à mi-hauteur du pic de diffraction (002) de l'apatite du matériau NaPYG-050 a diminué (tableau III.1) entre 6 et 15 jours d'évolution dans l'eau ultra-pure, correspondant à une augmentation de la taille des cristallites traduisant une augmentation de l'état de cristallinité de l'apatite au cours du temps.

III.2.1.1.2 Spectroscopie Raman

En complément, la spectroscopie Raman nous permet de distinguer les ions orthophosphate et pyrophosphate dans la structure du matériau, dont les bandes les plus intenses sont respectivement la bande $\nu^{1s}PO_4$ à 950 cm^{-1} et la bande $\nu^{s}PO_3$ à 1039 cm^{-1} (Figure III.6). Ces deux bandes sont présentes sur les spectres des trois compositions, ainsi que la bande $\nu^{s}POP$ à 745 cm^{-1}. Nous ne distinguons pas d'autres bandes de vibration après plusieurs jours d'immersion dans l'eau et leur intensité ne semble pas modifiée, excepté pour celles du matériau NaPYG-050. Etant donné que la diffusion Raman est également sensible à la cristallinité d'un composé, nous pouvons

remarquer que la bande de vibration correspondant à PO_3 à 950 cm^{-1} est devenue plus étroite pour les matériaux NaPYG-050 à partir de 2 jours d'immersion dans l'eau ultra-pure. L'amincissement de la bande orthophosphate à 950 cm^{-1} pour NaPYG-050 après 2 jours (Fig. III.6c) est dû à la présence d'une phase cristalline (apatite nanocristalline, Figure III.6c) dans l'échantillon après évolution, en accord avec les résultats DRX (Figure III.5c). Le rapport de la surface des deux bandes attribuées aux ions ortho et pyrophosphate nous permet de déterminer le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates dans le matériau comme décrit dans le chapitre II[71,92]. Nous pouvons ainsi observer qu'après 6 et 15 jours d'évolution dans de l'eau ultra-pure, le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates de NaPYG-010 et -030 n'a pas changé de manière significative (tableau III.2). Dans le cas du matériau NaPYG-050, la différence semble significative et est due à la présence d'une phase cristalline, qui a pour effet d'augmenter l'intensité absolue de la bande orthophosphate à 950 cm^{-1}, en plus de l'affiner.

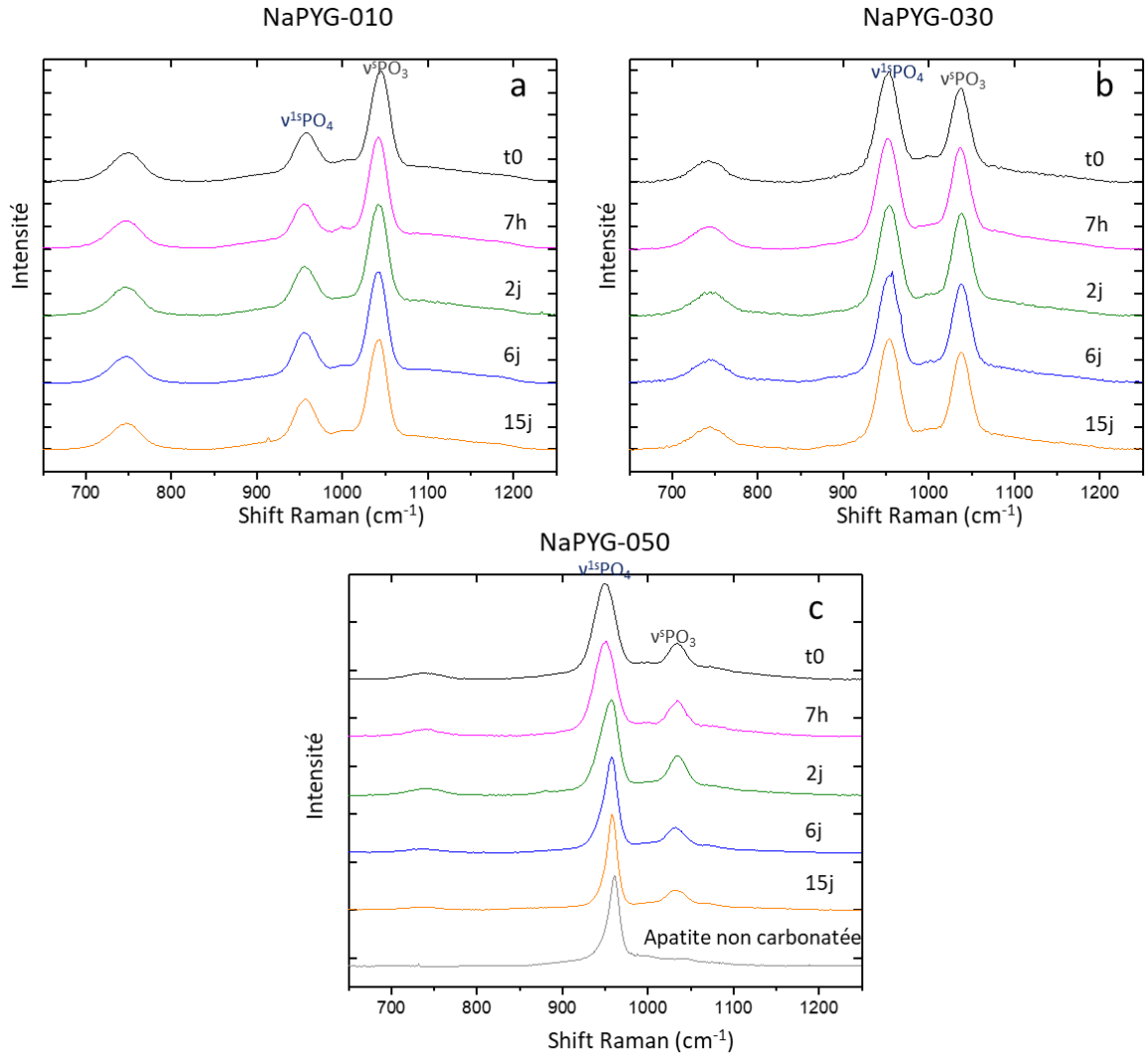


Figure III.6 : Spectres Raman normalisés des matériaux NaPYG-010 (a), -030 (b) et -050 (c) après différents temps d'évolution dans l'eau ultra-pure. Le spectre d'une apatite nanocristalline synthétique non carbonatée et maturée 6 h est également présenté (c).

Tableau III.2 : Evolution du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphate des matériaux NaPYG-0X0 au cours de leur immersion dans l'eau ultra-pure, évaluée à partir de la surface des bandes Raman après décomposition mathématiques des bandes phosphate à 950 et 1039 cm^{-1}.

milieu	Eau ultra-pure		
Temps d'évolution (jours)	0	6	15
NaPYG-010	0,29 (± 0.01)	0,30 (± 0.01)	0,30 (± 0.01)
NaPYG-030	0,53 (± 0.01)	0,54 (± 0.01)	0,53 (± 0.01)
NaPYG-050	0,74 (± 0.01)	0,83 (± 0.01)	0,79 (± 0.01)

III.2.1.1.3 Observation microscopique

Les micrographies MEB de la figure III.7 montrent qu'après évolution dans l'eau ultra-pure, des fissures sont apparues à la surface des compositions NaPYG-010 (Fig III.7b et 7c) et NaPYG-050 (Fig III.7i). Cependant les fissures observées sur les grains de NaPYG-010 semblent plus profondes que les fissures en surface des grains de NaPYG-050, qui ressemblent plus à un écaillage. Ce phénomène à la surface du matériau NaPYG-050, visible au MEB à 15 jours (Fig III.7i) peut être soit attribué à une dégradation du matériau au cours de son évolution, soit à un revêtement formé en surface de 2-5 µm, qui a pu probablement se craqueler en séchant rapidement après rinçage à l'éthanol. En effet, la surface lisse du matériau à proximité des fissures semble différente de la surface un peu plus rugueuse du matériau initial (Fig. III.7g). Nous n'avons observé aucune évolution morphologique significative pour le matériau NaPYG-030 (Fig. III.7e et 7f).

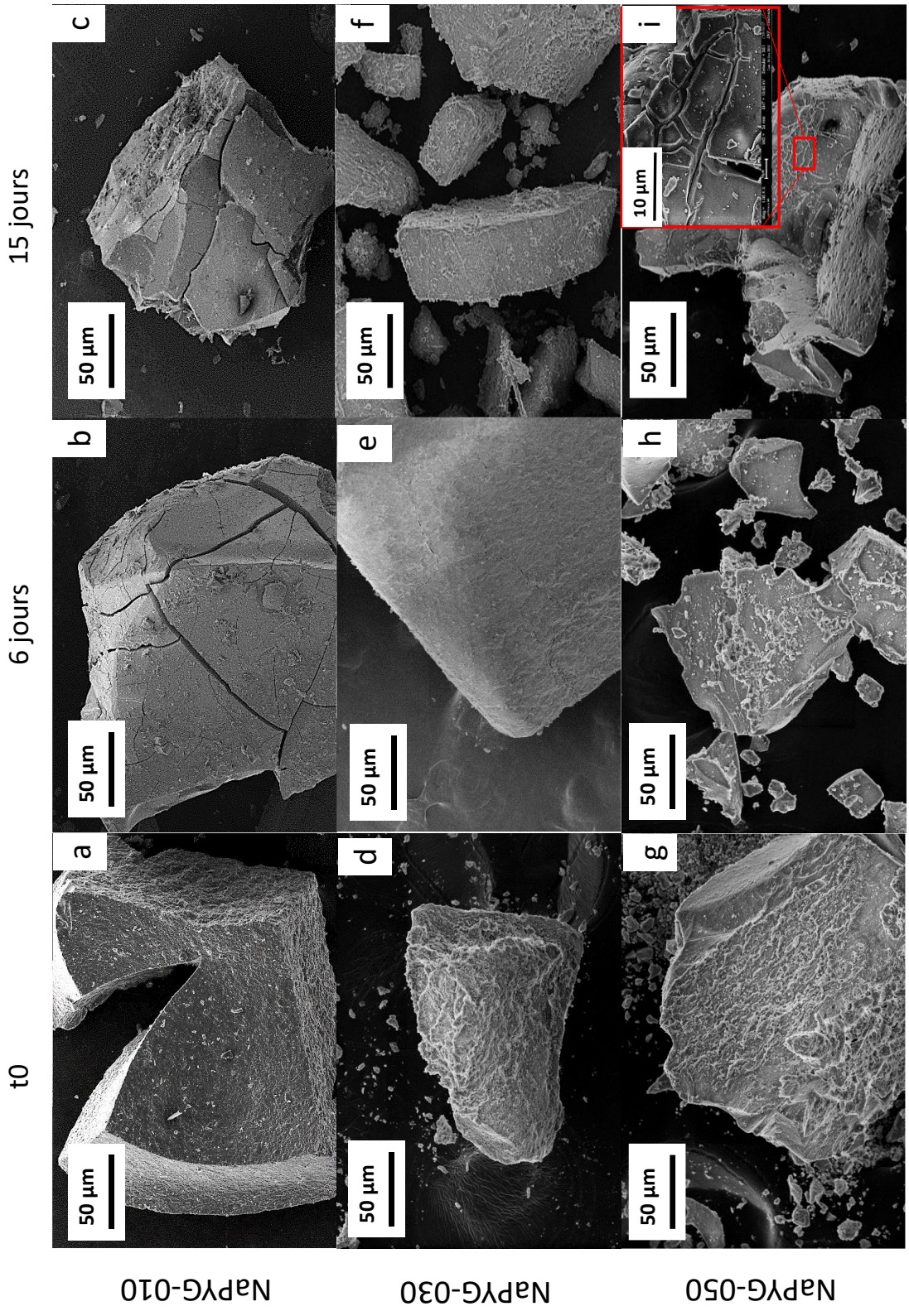


Figure III.7 : Micrographies MEB des matériaux initiaux NaPYG-010 (a, b et c), NaPYG-030 (d, e et f) et NaPYG-050 (g, h et i) et après 6 et 15 jours d'évolution dans de l'eau ultra-pure.

III.2.1.2 Caractérisation des milieux

Le dosage des milieux n'a pas pu être réalisé à cause d'une contamination microbienne dans tous les milieux liquides suite à leur stockage au réfrigérateur, cependant les valeurs de pH ont été mesurées dans chaque solution juste après la séparation du matériau et du milieu. Les valeurs de pH ont augmenté jusqu'à 8,2 et 7,8 pour les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 à 15 jours d'évolution alors que pour le matériau NaPYG-050 le pH a augmenté jusqu'à une valeur de 8 à 7 heures puis a diminué jusqu'à 6,8 à 15 jours d'évolution. L'augmentation du pH en solution pourrait être une preuve que les matériaux ont libéré des ions notamment phosphates en solution. Pour rappel, l'acide phosphorique présente trois acidités décrites par les trois équilibres en solution aqueuse suivants :

- $H_3PO_4 + H_2O \leftrightarrow H_2PO_4^- + H_3O^+$ ($pK_{a1} = 2,1$) Equation III.2
- $H_2PO_4^- + H_2O \leftrightarrow HPO_4^{2-} + H_3O^+$ ($pK_{a2} = 7,1$) Equation III.3
- $HPO_4^{2-} + H_2O \leftrightarrow PO_4^{3-} + H_3O^+$ ($pK_{a3} = 12,3$) Equation III.4

Le cas échéant, la libération de phosphate pourrait entraîner une augmentation de sa concentration en solution et donc tamponner son pH. La diminution du pH observée ensuite lors de l'évolution du NaPYG-050 peut être expliquée en considérant que la précipitation d'un phosphate de calcium, notamment de l'apatite, conduit à une acidification du milieu en raison du déplacement de l'équilibre $HPO_4^{2-} \leftrightarrow PO_4^{3-} + H_3O^+$ vers la droite lors de l'intégration des PO_4^{3-} dans le réseau pour former l'apatite, provoquant ainsi une diminution du pH.

III.2.1.3 Discussion

Au contraire des matériaux amorphes à base d'orthophosphate qui, en solution, ont tendance à cristalliser rapidement en apatite nanocristalline, les matériaux NaPYG-0X0 ont montré une certaine stabilité lors des évolutions pendant 15 jours dans l'eau ultra-pure, en particulier les compositions NaPYG-010 et NaPYG-030 c'est-à-dire ceux initialement parmi les plus riches en ions pyrophosphate. Pour rappel, la perte de masse après 15 jours était d'environ 10% pour toutes les compositions, le caractère amorphe ainsi que le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates pour les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 n'avaient pas été significativement modifiés. En revanche, le matériau NaPYG-050 qui contient initialement le plus d'ions orthophosphate, a cristallisé en apatite nanocristalline entre 2 et 6 jours d'évolution. De plus, le pH en solution n'a pas évolué de la même façon. En comparant avec l'évolution du 45S5 dans de l'eau déionisée[142], on remarque que l'évolution du pH est similaire à celle de NaPYG-050. Il augmente lors des premières minutes puis diminue après quelques heures d'évolution. Il est difficile de tirer des conclusions sur ces évolutions sans les dosages chimiques des solutions,

cependant, plusieurs hypothèses peuvent être émises en ce qui concerne la stabilité des matériaux NaPYG-010 et -030 et la cristallisation du matériau NaPYG-050.

La faible perte de masse observée peut être due à la perte d'eau présente dans les matériaux ou à une dégradation partielle des matériaux. En effet, la proportion massique d'eau dans les matériaux NaPYG-0X0 est d'environ 15% ; il est donc probable que les 10% de perte observés correspondent en grande partie à une perte d'eau en plus de la perte de masse liée aux transferts du matériau lors de la séparation entre le matériau et le milieu ou le séchage dans le dessiccateur. Cependant l'augmentation du pH en solution pour chaque matériau est le signe d'une libération d'ions, en particulier phosphates, en solution.

La stabilité des matériaux NaPYG-010 et -030, les plus riches en pyrophosphate, est potentiellement due à la charge et la taille des ions pyrophosphate (par rapport aux ions orthophosphate) ainsi qu'à la flexibilité de leur liaison P-O-P. En effet, leur charge (-4) permet une interaction plus forte avec les cations et la variabilité de l'angle POP induit une multitude de configurations, ces deux caractéristiques permettent ainsi une stabilisation du réseau amorphe. La taille plus grande de ces ions réduit par ailleurs leur aptitude à diffuser et tend donc à diminuer la dégradabilité du matériau. Au-delà de leur stabilité, ces composés diffèrent par leur capacité à favoriser la cristallisation de phases phosphocalciques comme l'apatite. En effet, les ions pyrophosphate sont connus pour avoir un effet inhibiteur de la cristallisation des orthophosphates de calcium, même à des concentrations relativement faibles[66,143,144]. Ici aussi, ils semblent avoir un rôle prépondérant en inhibant la cristallisation des phases orthophosphates de calcium à partir d'une certaine quantité, puisque seul le matériau contenant le moins de pyrophosphate (NaPYG-050) forme une phase cristalline apatitique.

Les spectres Raman du matériau NaPYG-050 après 15 jours d'évolution dans l'eau ultra-pure montrent une bande $\nu^{1s}PO_4$ fine centrée à 958 cm^{-1} comparable à celle d'une apatite mal cristallisée. Nous n'observons cependant aucune formation de carbonates, dont la bande de vibration principale $\nu^1(CO_3^{2-})$ se situe à 1085 cm^{-1}, ce qui signifierait que l'apatite formée n'est pas une apatite carbonatée et pourrait avoir comme formule : $Ca_{10-x}(PO_4)_{6-x}(HPO_4^{2-})_x(OH)_{2-x}$ [8]. Cette cristallisation pourrait avoir deux origines :

- Le relargage d'ions calcium et phosphate entrainant la précipitation de phosphate de calcium sous forme d'amas de prénucléation conduisant à la formation de phosphate de calcium amorphe (ACP) puis à des cristaux d'apatite, à la surface des solides initiaux[78,145].
- Le matériau NaPYG-050 étant déjà un phosphate de calcium amorphe dont la composition est proche ($[(Ca^{2+})_{1,54}(Na^+)_{0,03}(H^+)_{0,04}(PO_4^{3-})_{0,85}(P_2O_7^{4-})_{0,15}](H_2O)_{7,4}$) (partie II.1.3.4) de celle de l'apatite, la phase cristalline résulterait d'une évolution au cœur de la matrice amorphe du matériau NaPYG-050. En effet, comme précisé dans le chapitre précédent, il a été proposé de

décrire les matériaux NaPYG-0X0 comme étant composés de clusters mixtes d'ortho et pyrophosphate hydratés dont l'eau inter-clusters chélaterait des ions sodium « libres ». La libération de ces cations en solution induirait une réorganisation locale autour des clusters d'orthophosphate pouvant mener à leur évolution thermodynamique vers de l'apatite nanocristalline.

III.2.2. Evolution des matériaux NaPYG-0X0 dans l'eau acidifiée à pH 4

Les matériaux NaPYG-0X0 sont immergés dans l'eau ultra-pure acidifiée jusqu'à pH 4 avec de l'acide nitrique à 37°C, pendant deux temps courts (1 et 7 heures), un temps intermédiaire (2 jours) et un temps long (15 jours). Dans cette étude les matériaux sont exposés à un pH qui pourrait être celui du milieu physiologique lors d'une phase inflammatoire suivant une implantation[146] ou lors de la cicatrisation d'un tissu[147]. Cette étude d'immersion à pH acide permettra également d'appréhender la stabilité des compositions de matériaux NaPYG-0X0 dans de telles conditions. La caractérisation des matériaux et des milieux est présentée à la suite.

III.2.2.1 Caractérisation des matériaux

L'évolution de la masse de matériau (exprimée en pourcentage par rapport à la masse initiale) en fonction du temps d'immersion est présentée sur la figure III.9. La perte de masse pour les trois compositions de matériaux est différente et a évolué différemment tout au long du test selon la composition du matériau. A 15 jours, la perte de masse est d'environ 10% pour les compositions de matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 mais une perte de masse plus élevée, soit d'environ 25%, a été observée pour NaPYG-050. La perte de masse de NaPYG-010 a augmenté jusqu'à 20% après 7 h, puis s'est stabilisée à environ 10% à 2 jours et jusqu'à 15 jours. Pour NaPYG-030, la perte de masse a été moins prononcée tout au long du test ; elle a augmenté au début du test puis s'est stabilisée entre 6 et 8%. Pour NaPYG-050, la perte de masse a augmenté tout au long de l'évolution pour atteindre une perte de masse de 25% à 15 jours.

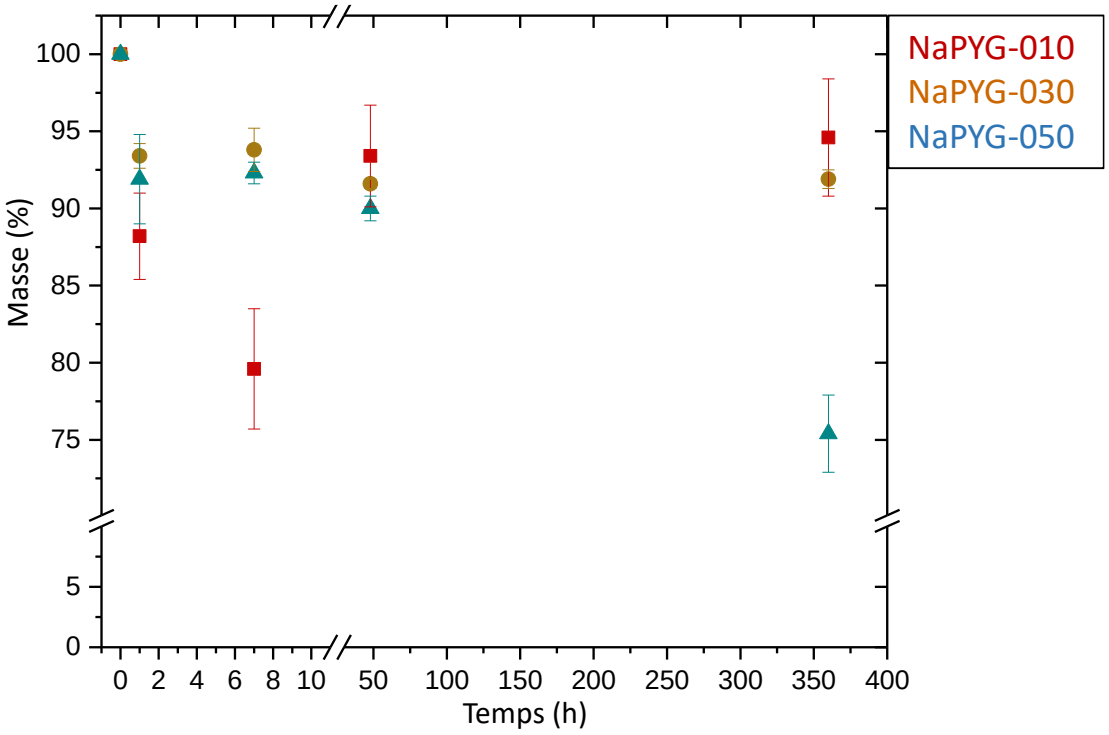


Figure III.9 : Evolution de la quantité de matériaux NaPYG-0X0 en fonction de la durée d'immersion dans l'eau acidifiée à pH 4. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique de matériau restant par rapport à la masse de départ.

III.2.2.1.1 Diffraction des rayons X

La structure des matériaux NaPYG-0X0 a été étudiée par DRX après les différents temps d'évolution dans de l'eau ultra-pure acidifiée à pH 4 (Figure III.10). Après 2 jours et 15 jours d'évolution, le matériau NaPYG-030 est resté amorphe (Fig.III.10b). Le matériau NaPYG-010 reste également amorphe à 2 jours d'évolution mais commencerait à cristalliser à 15 jours. On peut observer un pic défini mais de faible intensité à 31° (Fig.III.10a). Une phase cristalline pourrait se former, cependant nous ne pouvons l'identifier clairement avec un seul pic de diffraction. La spectroscopie Raman devrait permettre de préciser un peu plus cette attribution. De plus, le matériau NaPYG-050 dont le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates est le plus élevé a cristallisé à partir de 2 jours : les larges pics à 25,9° et 31,8° (Fig.III.10c) témoignent de la présence d'une apatite mal cristallisée comme lors de l'évolution de ce matériau dans l'eau ultra-pure non acidifiée. La taille apparente des cristallites d'apatite formés a été calculée à l'aide de la formule de Scherrer appliquée à la raie de diffraction (002). Nous pouvons voir que la largeur à mi-hauteur du pic de diffraction (002) a diminué entre 2 et 15 jours dans l'eau ultra-pure acidifiée correspondant à une augmentation de la taille apparente des cristallites (tableau III.3). La taille apparente des cristallites à 15 jours d'évolution à pH acide est légèrement supérieure (181 ±5 Å)

à celle observée lors des évolutions dans l'eau ultra-pure (173 ±5 Å) probablement dû à une sursaturation du milieu vis-à-vis de l'apatite qui a été atteinte plus tôt et donc à la durée de maturation des cristaux d'apatite plus longue. En effet, les cristaux s'étant formés plus tôt (entre 7 heures et 2 jours), ils ont eu plus de temps pour maturer/croitre.

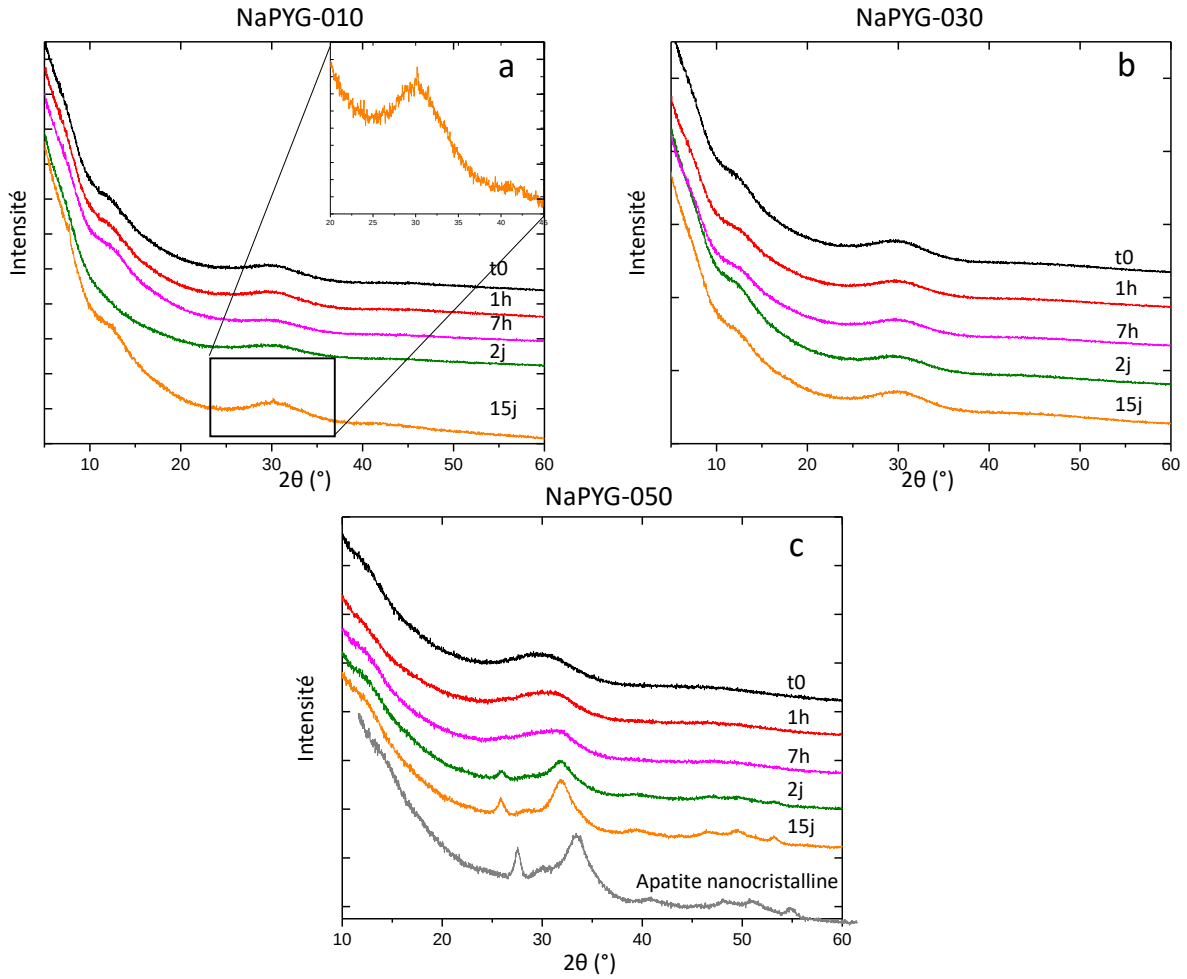


Figure III.10 : Diagrammes de diffraction des RX des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b) et NaPYG-050 (c) après les différents temps d'évolution dans l'eau acidifiée à pH 4. Le diffractogramme RX de l'apatite nanocristalline synthétique pure de référence est également présenté (c).

Tableau III.3 : Largeur à mi-hauteur du pic de diffraction (002) de l'apatite formée lors des évolutions dans l'eau ultra-pure acidifiée à pH 4 et taille apparente des cristallites calculée à partir de la formule de Scherrer

temps	**6 jours**	**15 jours**
Largeur à mi-hauteur du plan (002) (rad)	$1{,}10 \times 10^{-2}$	$0{,}84 \times 10^{-2}$
Tailles des cristaux (Å)	136 (± 5)	181 (± 5)

III.2.2.1.2 Spectroscopie Raman

La proportion des ions phosphates (orthophosphate et pyrophosphate) dans les matériaux NaPYG-0X0 au cours de l'évolution a été analysée par spectroscopie Raman (Figure III.11). Lors de cette étude, nous observons que le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates n'a pas varié pour la composition NaPYG-030 alors qu'il a augmenté pour les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-050. Pour NaPYG-010, un épaulement de la bande pyrophosphate à 1036 cm^{-1} apparait à 15 jours d'évolution. Cet épaulement et l'apparition d'une bande de faible intensité à 1080 cm^{-1} correspondent aux bandes de vibration d'une phase cristalline de pyrophosphate de calcium tétrahydratée : mCPPT-β ($Ca_2P_2O_7$, $4H_2O$)[71]. Par ailleurs, nous avions relevé la présence d'un pic de diffraction à 31° large et de faible intensité sur le diagramme de diffraction RX (Fig.III.10c) qui n'avait pu être clairement identifié ; en accord avec les résultats de l'analyse par spectroscopie Raman, la position de ce pic de diffraction peut être attribué à la phase mCPPT-β. Comme pour les évolutions dans l'eau ultra-pure, la bande orthophosphate du matériau NaPYG-050 est devenue plus étroite à 15 jours d'évolution du fait de la présence d'apatite nanocristalline dans le matériau au cours de l'évolution. L'augmentation du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates pour les matériaux NaPYG-010 et -050 est due à l'augmentation de l'intensité absolue de la bande de vibration correspondante aux pyrophosphate ou aux orthophosphate lors de la formation d'une phase cristalline, mCPPT-β ou apatite nanocristalline respectivement, dans les matériaux, ce qui est en accord avec les analyses DRX.

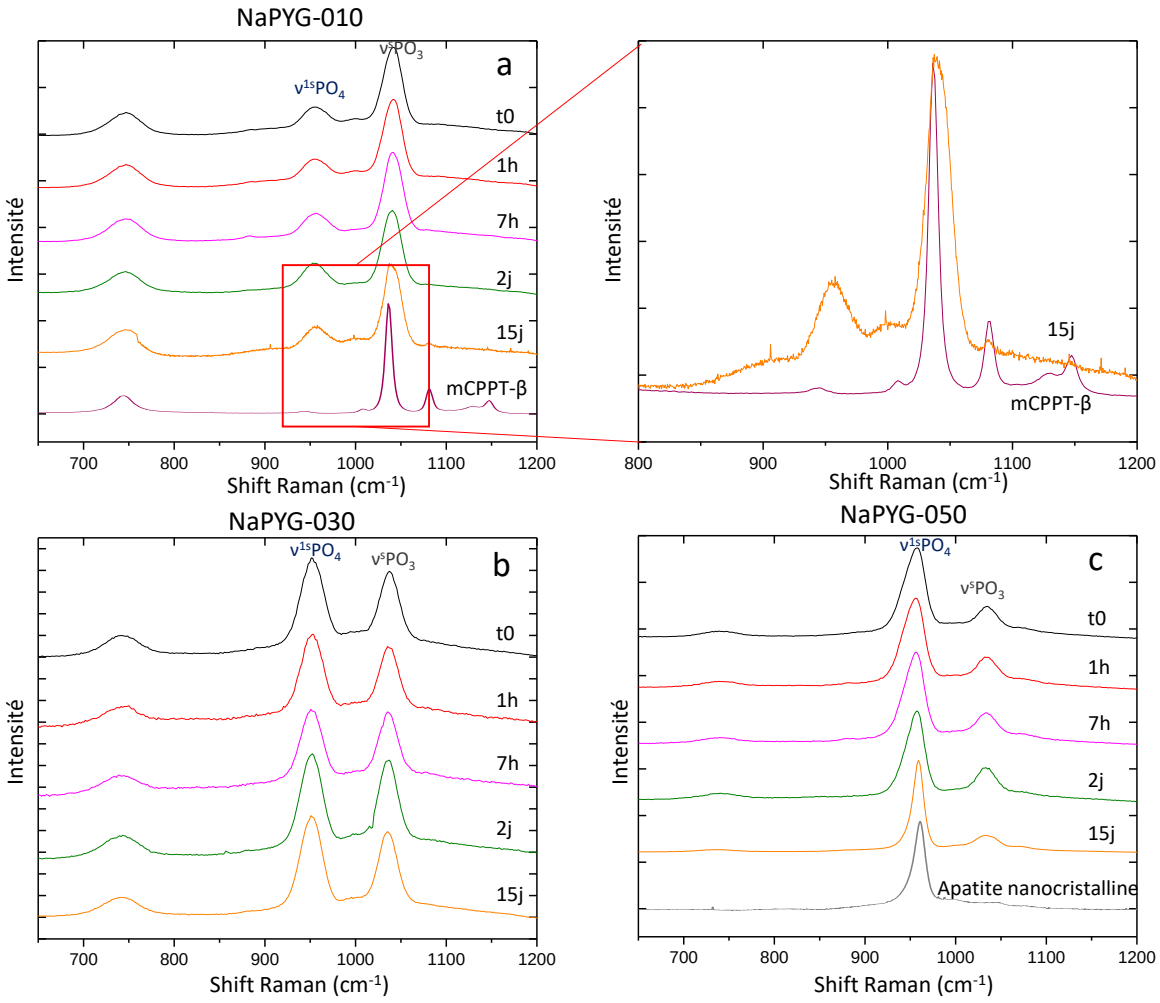


Figure III.11 : Spectres Raman des matériaux NaPYG-010 (a), -030 (b) et -050 (c) après différents temps d'évolution dans l'eau acidifiée à pH 4. Le spectre d'une apatite nanocristalline synthétique pure de référence est également présenté (c).

Tableau III.4 : Evolution du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates des matériaux NaPYG-0X0 au cours de leur immersion dans l'eau acidifiée à pH 4, évaluée par décomposition des bandes phosphate Raman.

milieu	Eau acidifiée à pH 4		
Temps d'évolution (jours)	0	2	15
NaPYG-010	0,29 (± 0.01)	0,32 (± 0.01)	0,33 (± 0.01)
NaPYG-030	0,53 (± 0.01)	0,54 (± 0.01)	0,54 (± 0.01)
NaPYG-050	0,74 (± 0.01)	0,75 (± 0.01)	0,83 (± 0.01)

III.2.2.1.3 Observation microscopique

Après évolution dans l'eau acidifiée à pH 4, nous avons observé des cristaux micrométriques à faciès plat formés à la surface de NaPYG-010 après 2 jours d'évolution (Fig.III.12a et 12b) qui devraient correspondre aux cristaux de mCPPT-β identifiés notamment par spectroscopie Raman à 15 jours. NaPYG-030 n'a montré aucune évolution morphologique (Fig. 12c et 12d) et quelques fissures en surface ont été observées pour NaPYG-050 comme lors des évolutions dans l'eau ultra-pure après 15 jours d'évolution (Fig. 12e et 12f). La présence de nombreuses fissures à la surface des grains de NaPYG-050 pourrait correspondre à un revêtement d'apatite nanocristalline qui a été détectée par DRX et spectroscopie Raman.

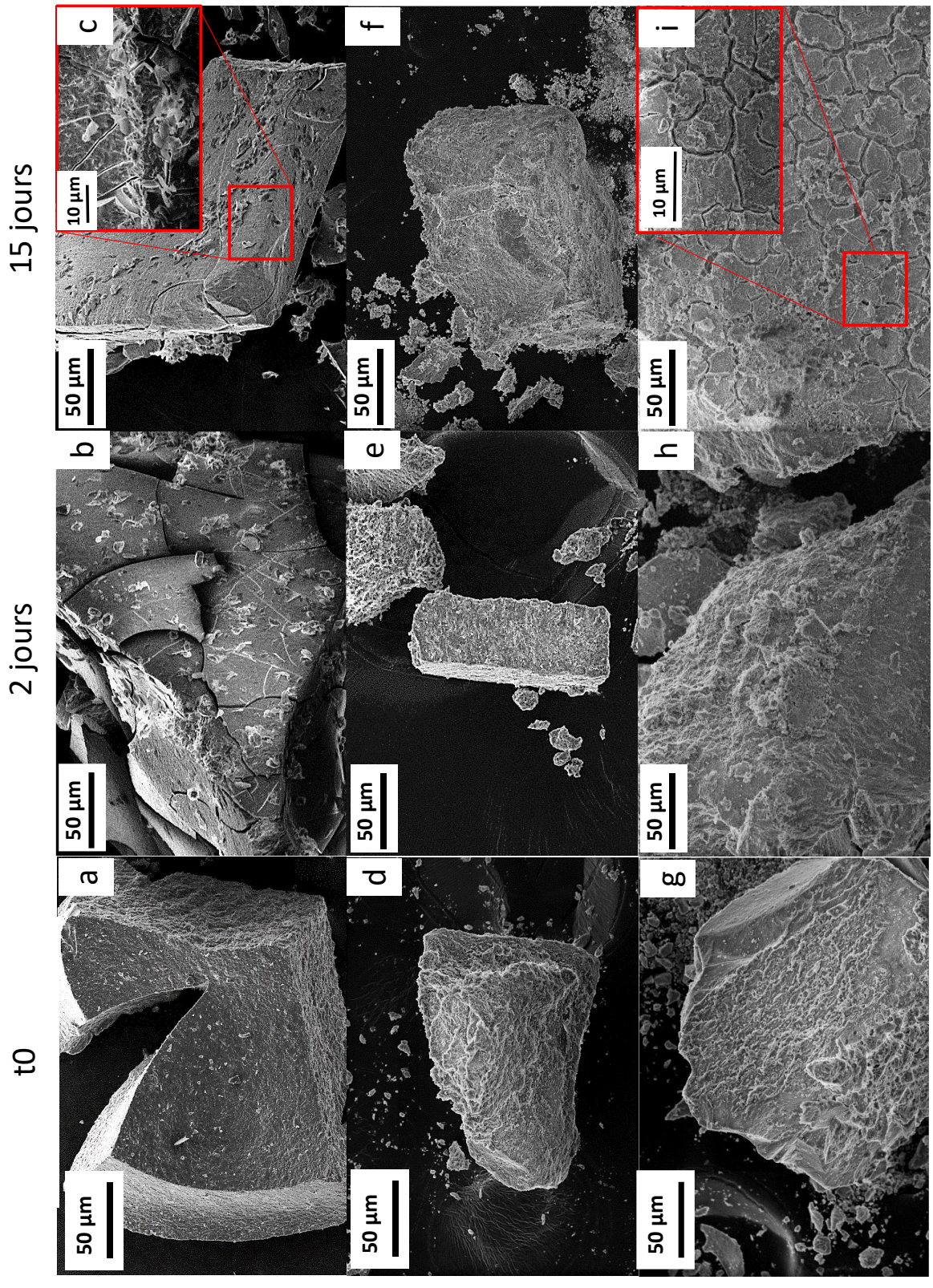


Figure III.12 : Micrographies MEB des matériaux NaPYG-010 (a, b et c), NaPYG-030 (d, e et f) et NaPYG-050 (g, h et i) initiaux et après 2 et 15 jours d'évolution dans de l'eau acidifiée à pH 4.

III.2.2.2 Caractérisation des milieux

III.2.2.2.1 Evolution du pH

Nous avons constaté que le pH après 1 heure d'évolution des matériaux NaPYG-0X0 dans l'eau initialement acidifiée était différent pour les trois compositions de matériaux testées : 8.3, 7.8 et 7 pour NaPYG-010; -030 et -050, respectivement. Suite à cette augmentation relativement rapide (en 1h) de pH 4 à plus de 7, le pH reste alors stable au cours de l'évolution. Une telle augmentation du pH pendant le test devrait probablement être liée à une libération rapide de phosphate en solution et à son effet tampon.

III.2.2.2.2 Dosages chimiques

La quantité d'ions libérés des matériaux NaPYG-0X0 a été mesurée dans les solutions après séparation entre le liquide et le solide (filtration) au temps d'évolution choisi (Figure III.13). Les dosages des solutions correspondant à l'évolution du matériau dans l'eau acidifiée à pH 4 ont montré une libération d'ions calcium, sodium et orthophosphate dans les premières heures (augmentation de leur concentration en solution) puis leur relative stabilité après 7 heures d'évolution. La concentration d'ions pyrophosphate libérés en solution en fonction du temps est faible pour les matériaux NaPYG-050 et -030 après 7 heures, et est même inférieure à la limite de détection du kit commercial (< 0,02 µM) pour le matériau NaPYG-050. Pour les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030, la concentration d'ions pyrophosphate a augmenté pendant la première heure jusqu'à atteindre 0,04 mM et 0,008 mM respectivement, puis elle a diminué au cours de l'évolution. Ce résultat pourrait être lié à l'hydrolyse des ions pyrophosphate en ions orthophosphate, connue pour être favorisée par un pH acide et/ou par une augmentation de la température[140]. De plus, la libération de ces ions phosphate a tamponné la solution vers un pH neutre à légèrement basique ce qui est en accord avec l'augmentation du pH de la solution observée après 1 h d'évolution du matériau. En effet, une solution tampon s'est formée rapidement et pourrait être à l'origine de la stabilisation de la perte de masse observée notamment pour les compositions NaPYG-010 et NaPYG-030 qui sont les matériaux contenant initialement la plus grande quantité de pyrophosphate. Les concentrations de calcium et d'orthophosphate libérées sont inférieures à 0,5 mM après 15 jours d'évolution pour les trois compositions de matériaux NaPYG-0X0. Cette quantité représente moins de 5% de la quantité initiale de calcium et phosphate respective dans les matériaux. Pour toutes les compositions, la concentration de sodium libérée est la concentration ionique la plus élevée, libérée par les matériaux NaPYG-0X0, ce qui

montre que les ions sodium sont probablement moins liés que les ions Ca^{2+} dans le matériau (les ions Na^{+} étant assez labiles).

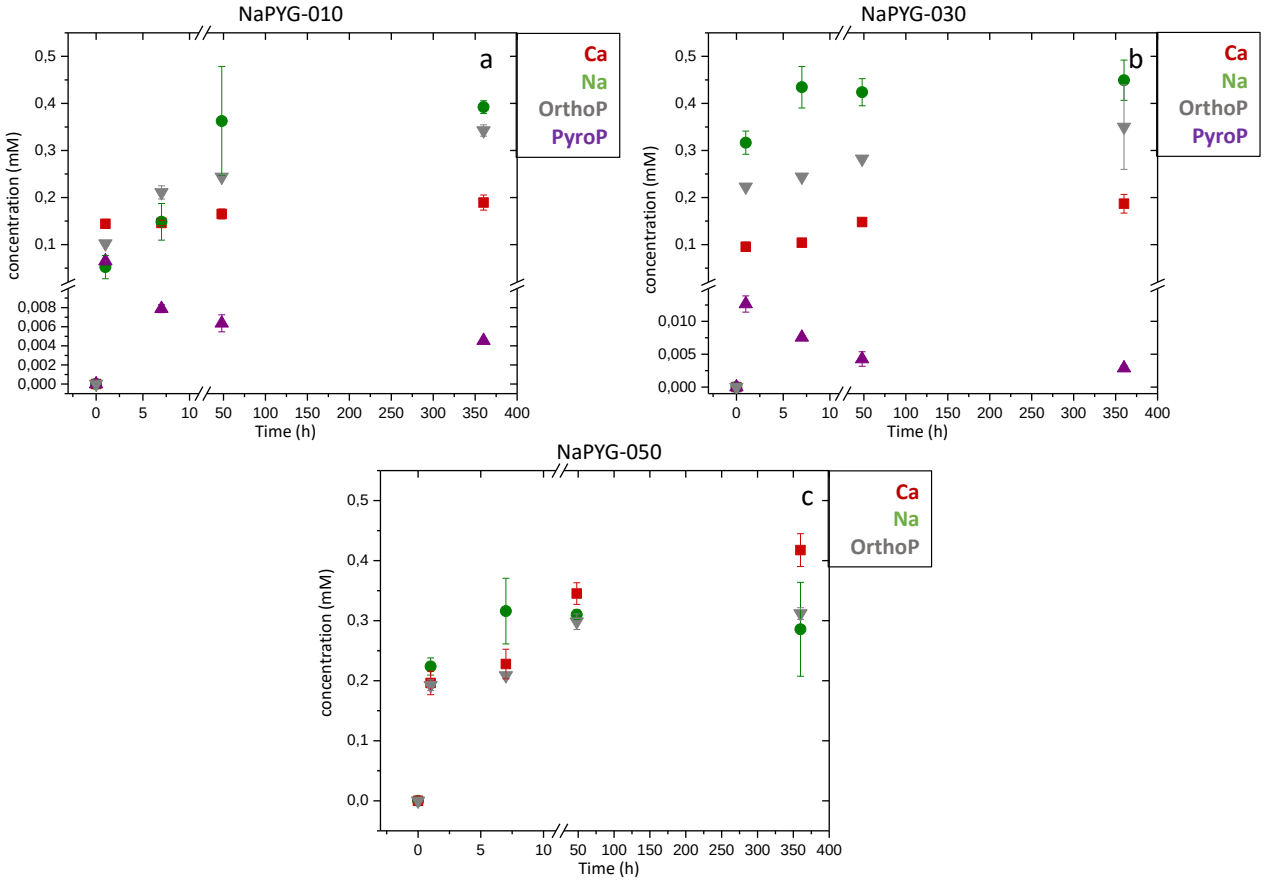


Figure III.13 : Concentration des ions calcium, sodium, orthophosphate et pyrophosphate en solution en fonction de la durée d'immersion des matériaux NaPYG-0X0 dans l'eau acidifiée à pH 4. La concentration de pyrophosphate dans les solutions dans lesquelles NaPYG-050 a été immergé n'a pas pu être mesurée (en dessous de la limite de détection de la méthode de dosage, c'est-à-dire en dessous de 0,02 µM).

III.2.2.3 Discussion

Alors que le pH de départ est plus faible, augmentant le nombre de protons en solution par rapport aux évolutions dans l'eau ultra-pure, la perte de masse n'est pas plus élevée lors de ces évolutions à pH acide à l'exception de NaPYG-050. Cependant, lorsque l'on observe les concentrations ioniques en solution elles ne représentent que 3,5 % de la masse initiale pour le matériau NaPYG-050 à 15 jours d'évolution. De plus, cette quantité d'ions en solution est négligeable par rapport à la quantité initiale en calcium et phosphate dans le matériau mais représente environ 30%, 75% et 100% de la quantité initiale de sodium pour respectivement les

matériaux NaPYG-010, NaPYG-030 et NaPYG-050 ce qui démontre que le sodium est le type d'ions le plus labile de cette famille de matériaux.

En diminuant le pH, il est possible que les protons en solution se soient échangés dans la matrice du matériau en priorité avec les ions sodium (plus labiles) et /ou aient protoné les ions phosphates du matériau, jusqu'à épuiser la quantité de protons disponibles, ce qui a provoqué l'augmentation du pH en solution. Cette importante libération de sodium probablement associée à une perte d'eau a pu diminuer la cohésion des matériaux conduisant à la dissolution des clusters de phosphate de calcium en solution. Cette dissolution peut se traduire par la libération des ions pyrophosphate en solution, qui sont ensuite hydrolysés. À l'échelle micronique, cette libération d'ions du réseau pourrait induire des fissures dans les matériaux NaPYG-0X0 comme observées par MEB (Fig.III.12). Ces réactions n'ont pas modifié la structure amorphe de NaPYG-030, par contre une phase cristalline de pyrophosphate de calcium tétrahydratée (mCPPT-β) s'est formée lors de l'évolution de NaPYG-010 et une phase apatitique lors de l'évolution de NaPYG-050. Les sursaturations en solution pour les phases de phosphates de calcium ont été calculées grâce aux logiciels MINTEQ et PHREEQC (figure 14) pour chaque solution séparée du matériau après chaque temps d'évolution étudié, en considérant le pH et les concentrations ioniques mesurés en solution. Cependant, les bases de données d'origine utilisées par PHREEQC ne comportaient pas les différents équilibres des phases de pyrophosphate de calcium répertoriés dans l'annexe III.2. C'est pourquoi une base de données d'origine nommée « minteq » a été ajoutée pour y inclure les données thermodynamiques concernant les pyrophosphates de calcium et ions associés. Notons que dans PHREEQC et MINTEQ la sursaturation relative (σ) d'une phase solide est définie comme étant le rapport du produit d'activité ionique lié à la dissolution du solide sur le produit de solubilité du solide[148]. L'indice de sursaturation calculé sera donc la différence entre le logarithme du produit d'activité ionique et le logarithme du produit de solubilité d'une phase présente en solution. S'il est positif alors la solution est sursaturée par rapport à la phase.

$$\sigma = IAP / K_s$$

$$SI = \log(\sigma)$$

avec :

σ : sursaturation relative

IAP : produit d'activité ionique lié à la dissolution

K_s : produit de solubilité

SI : indice de sursaturation

Dès 1 heure d'évolution, la solution est sursaturée vis-à-vis de l'hydroxyapatite pour toutes les compositions, mais également vis-à-vis du pyrophosphate dicalcique dihydraté, m-CPPD et t-CPPD, et tétrahydraté, m-CPPT-β, pour les solutions dans lesquelles les matériaux NaPYG-010 et -030 ont évolué. Les indices de sursaturation vis-à-vis des phases pyrophosphates de calcium sont plus élevées que l'indice pour l'hydroxyapatite, et donc logiquement ces phases sont formées dans les solutions d'évolution des matériaux NaPYG-010 et -030. Par contre pour la composition NaPYG-050, les milieux sont sursaturés seulement vis-à-vis de l'hydroxyapatite puisque les dosages n'ont pas révélé d'ion pyrophosphate en solution.

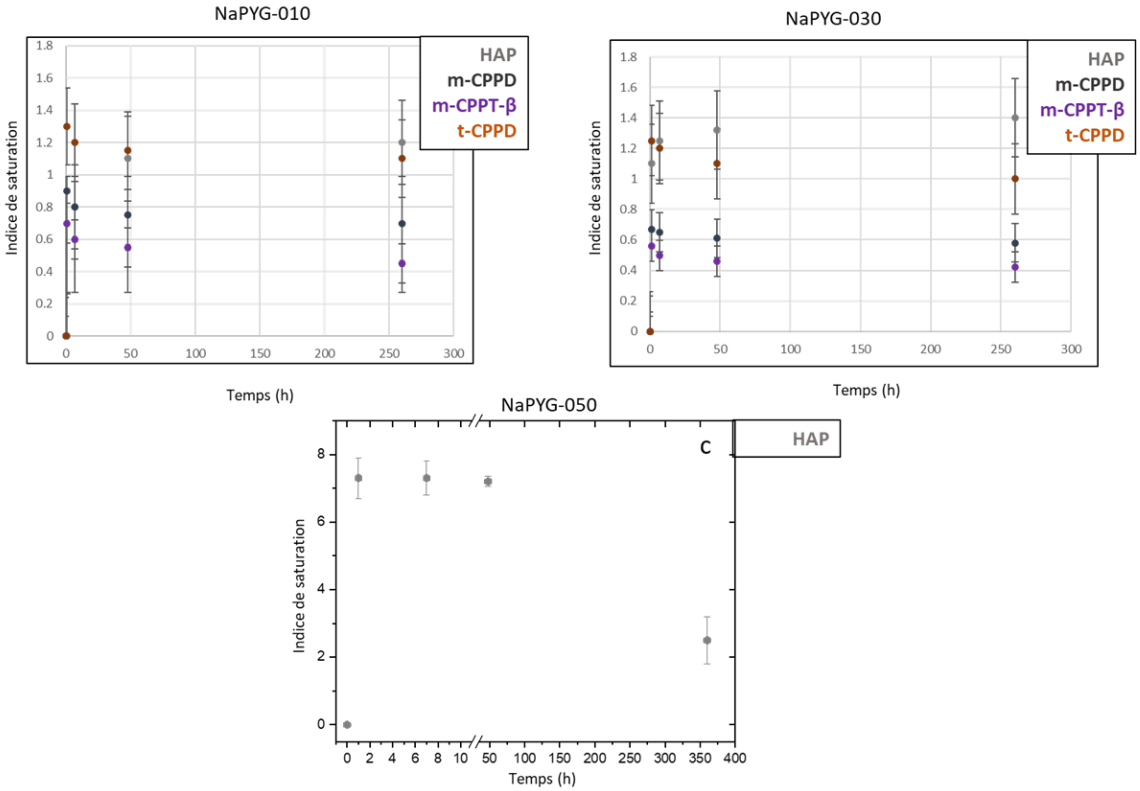


Figure III.14 : Indice de saturation vis-à-vis de différentes phases d'ortho- et pyrophosphates de calcium des solutions recueillies après différents temps d'évolution des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b) et NaPYG-050 (c) dans l'eau acidifiée à pH 4, calculé grâce à MINTEQ et PHREEQC.

A titre de comparaison et même si la nature des matériaux diffère, lors de l'évolution du 45S5 à pH 5, une augmentation du pH d'environ deux unités et un fort relargage ionique ont été mesurés dans les premières heures[116]. En comparant au NaPYG-050, la quantité d'ions en solution après 1 heure d'évolution est beaucoup plus élevée pour le 45S5 et de l'apatite a été formée après 3 jours d'évolution. Malgré la faible quantité d'ions libérés en solution par le NaPYG-050, de l'apatite s'est également formée à 2 jours d'évolution. En extrapolant le mécanisme de formation

de l'apatite décrit par Hench au matériau NaPYG-050[149], la première étape est la dissolution du matériau par l'échange entre les protons du milieu et les cations du matériau, puis les ions calcium et phosphate sont consommés pendant la précipitation d'apatite.

Pour le matériau NaPYG-010, il n'y a plus de perte de masse après la première heure d'évolution, par contre la quantité d'ions pyrophosphate en solution diminue. Les ions calcium libérés en solution précipitent ensuite avec les ions pyrophosphate dans les conditions d'obtention (37°C, pH légèrement acide) de la phase mCPPT-β ($Ca_2P_2O_7$,$4H_2O$). Dans la littérature cette phase a été formée par double décomposition d'une solution de pyrophosphate de potassium et de nitrate de calcium tétrahydraté ou à partir d'un intermédiaire amorphe a-CPP, dans les deux cas à des températures inférieures à 50°C et à pH légèrement acide[71,73].

III.2.3. Evolution des matériaux NaPYG-0X0 dans l'eau acidifiée à pH 2

Les matériaux NaPYG-0X0 ont été immergés dans l'eau ultra-pure acidifiée avec de l'acide nitrique jusqu'à pH 2 à 37°C, pendant deux temps courts (1 et 7 heures), un temps intermédiaire (2 jours) et un temps long (15 jours). Les caractérisations des matériaux et des milieux sont présentées à la suite. Ces évolutions à un pH acide extrême permettent d'étudier les mécanismes de dégradation des matériaux NaPYG-0X0 liés majoritairement à une protonation des groupements pyrophosphate et/ou à leur hydrolyse

III.2.3.1 Caractérisation des matériaux

Comme pour les évolutions dans l'eau ultra-pure, les matériaux ont été pesés et la figure III.15 présente l'évolution de la perte de masse des trois compositions de matériaux (NaPYG-010, NaPYG-030 et NaPYG-050) en fonction du temps d'immersion. L'évolution de la perte de masse pour les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 est différente de celle de NaPYG-050. A 15 jours, la perte de masse est d'environ 45% pour les compositions de matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 mais une perte de masse plus élevée d'environ 90% a été observée pour NaPYG-050. La perte de masse de NaPYG-010 et NaPYG-030 a augmenté jusqu'à 30 – 40 % après 7 h, puis a diminué à environ 20% à 2 jours avant d'augmenter de nouveau jusqu'à 45% à 15 jours. Pour NaPYG-050, la perte de masse a été beaucoup plus prononcée tout au long du test. Dès la première heure la masse a chuté et une perte de masse de 90% a été mesurée. Elle s'est ensuite stabilisée tout au long de l'évolution.

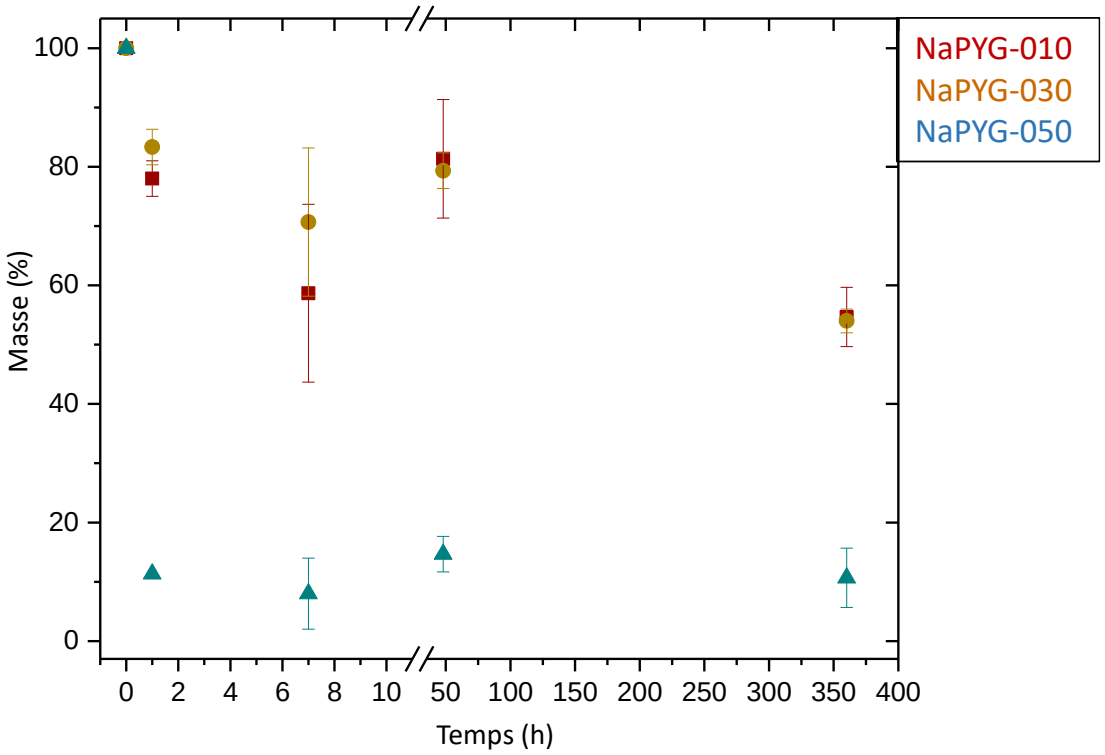


Figure III.15 : Evolution de la quantité de matériaux NaPYG-0X0 en fonction de la durée d'immersion dans l'eau acidifiée à pH 2. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique par rapport à la masse de départ.

III.2.3.1.1 Diffraction des rayons X

L'analyse par diffraction des rayons X des matériaux NaPYG-0X0 suite à leur évolution dans l'eau acidifiée à pH 2 est présentée sur la figure III.16. Les matériaux NaPYG-0X0 ont perdu leur caractère totalement amorphe quelle que soit leur composition. Pour le matériau NaPYG-010 un pic de diffraction peu intense à 31° pouvant correspondre à une phase cristalline de type pyrophosphate de calcium tétrahydratée (mCPPT-β, $Ca_2P_2O_7$, $4H_2O$) est apparu sur le halo diffus dès 7h d'évolution, puis nous observons des pics de diffraction plus intenses correspondant à une phase cristalline de pyrophosphate de calcium dihydratée (t-CPPD, $Ca_2P_2O_7$, $2H_2O$) à 15 jours d'évolution. Les matériaux NaPYG-030 et NaPYG-050 restent amorphes jusqu'à 2 jours et 7 heures d'évolution respectivement, puis des pics de diffraction correspondant à la phase mCPPT-β apparaissent sur le halo diffus, dont le pic à 31° observé lors de l'évolution du matériau NaPYG-010 à pH 4. De plus, la contribution du halo diffus correspondant à la contribution amorphe des matériaux décroit sur le diagramme de DRX et semble quasiment avoir disparu pour les compositions NaPYG-010 et NaPYG-050 à 15 jours d'évolution.

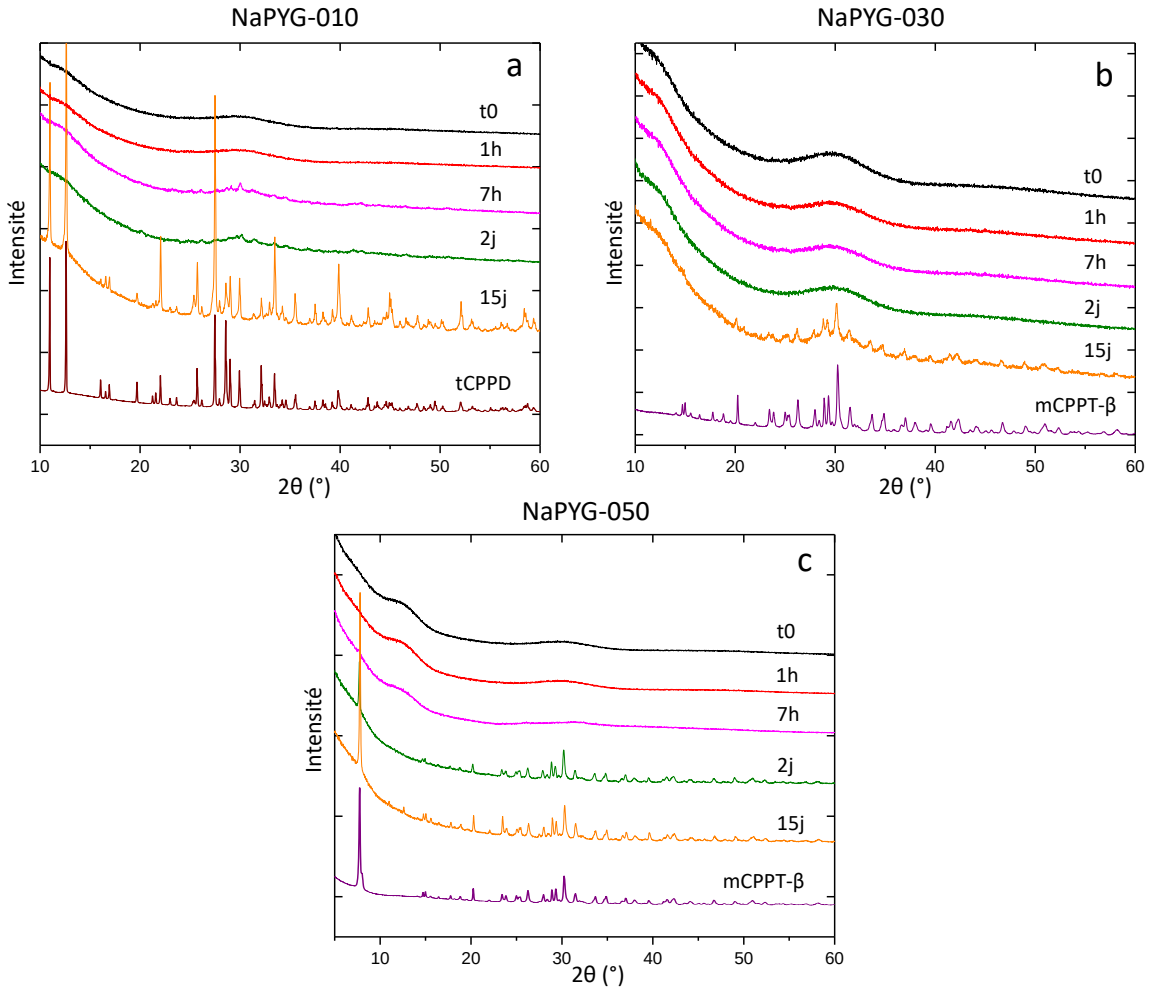


Figure III.16 : Diagrammes DRX des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b) et NaPYG-050 (c) après différents temps d'évolution dans l'eau acidifiée à pH 2. Le diagramme de diffraction RX de phases tCPPD (a) et mCPPT-β (b et c) synthétiques pures de référence sont également présentés.

III.2.3.1.2 Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman a permis d'identifier et de quantifier l'évolution des proportions d'ions ortho et pyrophosphates dans les matériaux NaPYG-0X0 (Figure III.17). Pour les compositions NaPYG-010 et NaPYG-050 la bande à 960 cm^{-1} attribuée aux groupements orthophosphate n'est plus visible à 15 jours d'évolution. De plus, la bande de vibration à 1040 cm^{-1} correspondant aux groupements pyrophosphate s'est affinée et sa largeur à mi-hauteur est équivalente à celle de la bande Raman caractéristique des phases de pyrophosphate de calcium hydratées cristallisées de type tCPPD et mCPPT-β, ce qui est en accord avec les diagrammes DRX (Figure III.16). Le matériau NaPYG-030 est toujours composé d'ortho et pyrophosphates à 15 jours d'évolution bien que la bande de vibration à 960 cm^{-1} correspondant aux ions

orthophosphate soit de faible intensité. La bande de vibration à 1040 cm^{-1} correspondant aux ions pyrophosphate s'est affinée mais la largeur à mi-hauteur est plus élevée que celle caractéristique de la phase mCPPT-β. Pour les trois compositions le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates a diminué lors des deux premiers jours d'évolution et est passé de 0,29 à 0,27 ; de 0,53 à 0,47 et de 0,74 à 0,27 pour respectivement les matériaux NaPYG-010, -030 et -050 (tableau III.5).

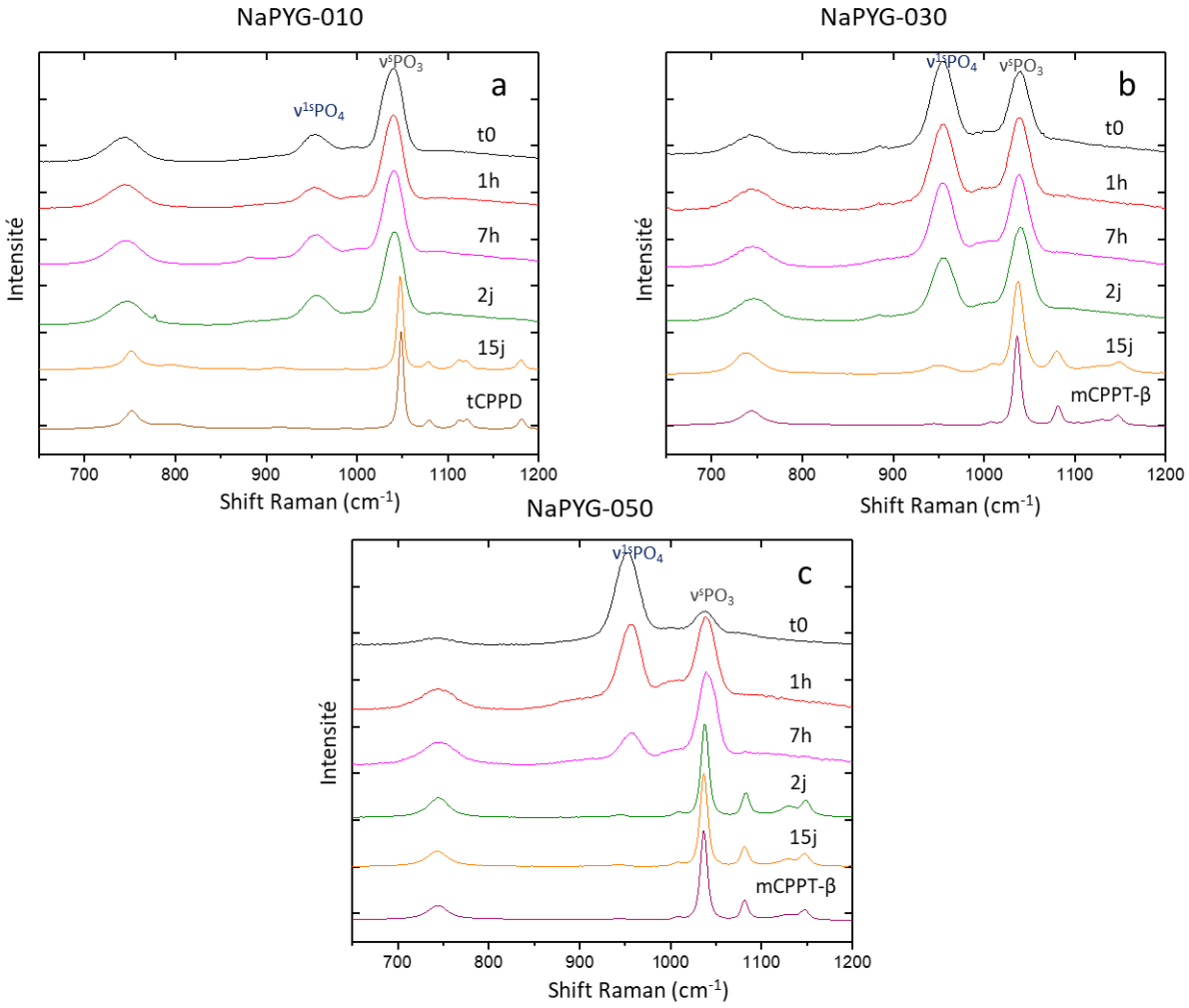


Figure III.17 : Spectres Raman des matériaux NaPYG-010 (a), -030 (b) et -050 (c) après différents temps d'évolution dans l'eau acidifiée à pH 2. Les spectres de phases pures de référence de tCPPD (a) et mCPPT-β (b et c) sont également présentés.

Tableau III.5 : Evolution du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphate des matériaux NaPYG-0X0 au cours de leur immersion dans l'eau acidifiée à pH 2, évalué par décomposition des bandes de phosphates Raman à 960 et à 1039 cm^{-1}.

milieu	Eau acidifiée à pH 2			
Temps d'évolution (heures ou jours)	0	7 h	2 j	15 j
NaPYG-010	0,29 (± 0.01)	0,27 (± 0.01)	0,27 (± 0.01)	/
NaPYG-030	0,53 (± 0.01)	0,50 (± 0.01)	0,47 (± 0.01)	0,17 (± 0.01)
NaPYG-050	0,74 (± 0.01)	0,52 (± 0.01)	0,27 (± 0.01)	/

III.2.3.1.3 Observation microscopique

Les micrographies MEB des matériaux ayant évolué dans l'eau acidifiée à pH 2 présentées sur la figure III.18 montrent la formation de cristaux micrométriques sur la surface rugueuse et compacte des matériaux NaPYG-010 et NaPYG-050 après 2 jours (Fig.III.8a et 18e) et sur le NaPYG-030 à 15 jours d'évolution (Fig.III.18d). Ces cristaux ont une taille de 20 µm, et se présentent sous forme de plaquettes semblant s'empiler les unes sur les autres. Leur morphologie correspond à la description des cristaux de mCPPT-β faites par plusieurs auteurs[71,74], et confirment les résultats des analyses par DRX et spectroscopie Raman (Figures III.16 et III.17)). Pour NaPYG-010, à 15 jours d'évolution nous pouvons observer des cristaux sous forme d'aiguilles de longueur variant entre 5 et 25 µm et de largeur entre 1 à 3 µm. Cette morphologie des cristaux semble correspondre à celle observée pour les phases de pyrophosphate de calcium dihydratées (mCPPD et tCPPD)[75]. De plus, les grains de plusieurs centaines de micromètres et de surface rugueuse correspondants aux matériaux amorphes initiaux ne sont plus observés à 15 jours d'évolution pour les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-050 ; ces derniers semblent ainsi avoir été transformés complètement sous forme de phases cristallines de type tCPPD pour NaPYG-010 et mCPPT-β pour NaPYG-050 et ce en cohérence avec l'absence de halo diffus noté sur leur diagramme de diffraction des RX respectif.

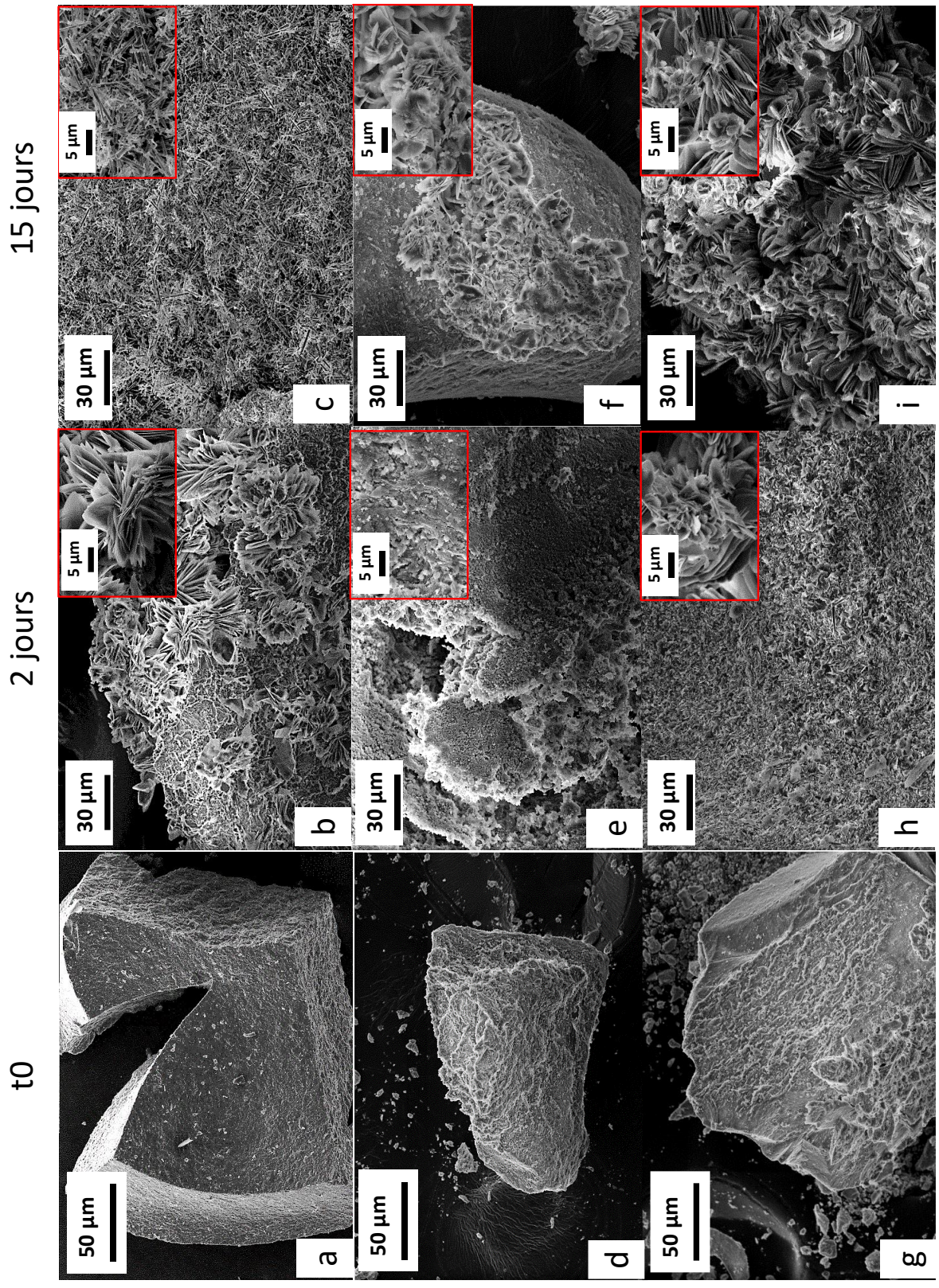


Figure III.18 : Micrographies MEB des matériaux NaPYG-010 (a, b et c), NaPYG-030 (d, e et f) et NaPYG-050 (g, h et i) initiaux et après 2 et 15 jours d'évolution dans de l'eau acidifiée à pH 2.

III.2.3.2 Caractérisation des milieux

III.2.3.2.1 Evolution du pH

Le pH après 1 heure d'évolution dans l'eau initialement acidifié à pH 2 a augmenté pour les trois compositions: 5,2, 6 et 4,1 pour NaPYG-010, -030 et -050, respectivement (Figure III.19). Suite à cette augmentation de pH 2 à plus de 4, le pH reste alors stable au cours de l'évolution. Une telle augmentation du pH pendant le test devrait probablement être liée à une libération de phosphate en solution dès la première heure d'évolution, ce qui a ensuite tamponné la solution.

A noter également que les pHs des solutions récupérées après interaction notamment avec les NaPYG-010 et NaPYG-050 sont dans la gamme de pH permettant aux phases t-CPPD et m-CPPT-β de se former/précipiter respectivement dans un milieu tamponné [Gras 2014].

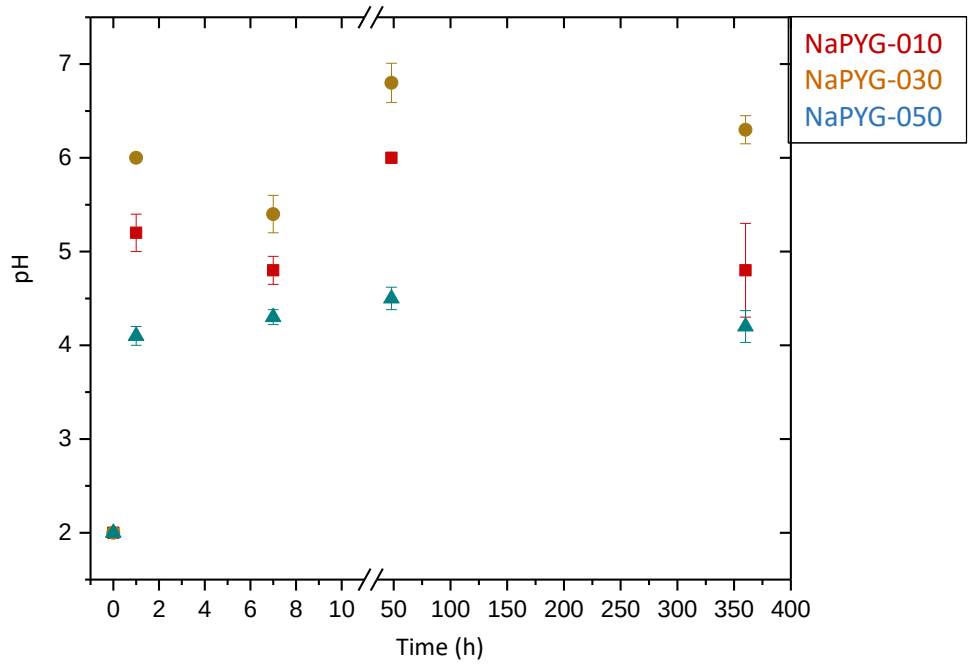


Figure III.19 : Evolution du pH en solution en fonction du temps lors des évolutions des matériaux NaPYG-0X0 dans l'eau acidifiée à pH 2.

III.2.3.2.2 Dosages chimiques

Les dosages des solutions correspondant à l'évolution des matériaux NaPYG-0X0 dans l'eau acidifiée à pH 2 ont montré une libération d'ions calcium, sodium, orthophosphate et pyrophosphate dans les premières heures (figure III.20). La concentration en ion sodium en solution a fortement augmenté durant la première heure d'évolution pour NaPYG-030 et NaPYG-050 et jusqu'à 7h pour NaPYG-010 puis s'est stabilisée jusqu'à 15 jours. On remarque aussi que

les concentrations en calcium et orthophosphate en solution ont évolué de cette même façon pour le matériau NaPYG-050 : elles ont atteint respectivement une concentration de 10 et 5 mM puis sont restées stables jusqu'à 15 jours. De plus, la concentration en ions pyrophosphate a augmenté dans les premières heures pour les trois compositions NaPYG-0X0 jusqu'à 0,26, 0,19 et 0,04 mM respectivement pour NaPYG-010, NaPYG-030 et NaPYG-050 puis a fortement diminué. Ce résultat, vu précédemment lors des évolutions à pH 4 pourrait être dû à l'hydrolyse en solution des ions pyrophosphate en ions orthophosphate et/ou à la cristallisation de pyrophosphate de calcium. Enfin les concentrations en calcium et orthophosphate pour les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 ont augmenté jusqu'à 7 h d'évolution puis ont diminué à 2 jours d'évolution avant d'augmenter à nouveau à 15 jours pour arriver respectivement à des concentrations en calcium de 2,7 et 4,4 mM et en orthophosphate de 2,2 et 3,1 mM. Les quantités d'ions de l'ensemble des ions libérés en solution sont beaucoup plus élevées que lors des évolutions à pH 4 et représentent 25, 32 et 66 % de la masse initiale des matériaux NaPYG-010, NaPYG-030 et NaPYG-050, respectivement.

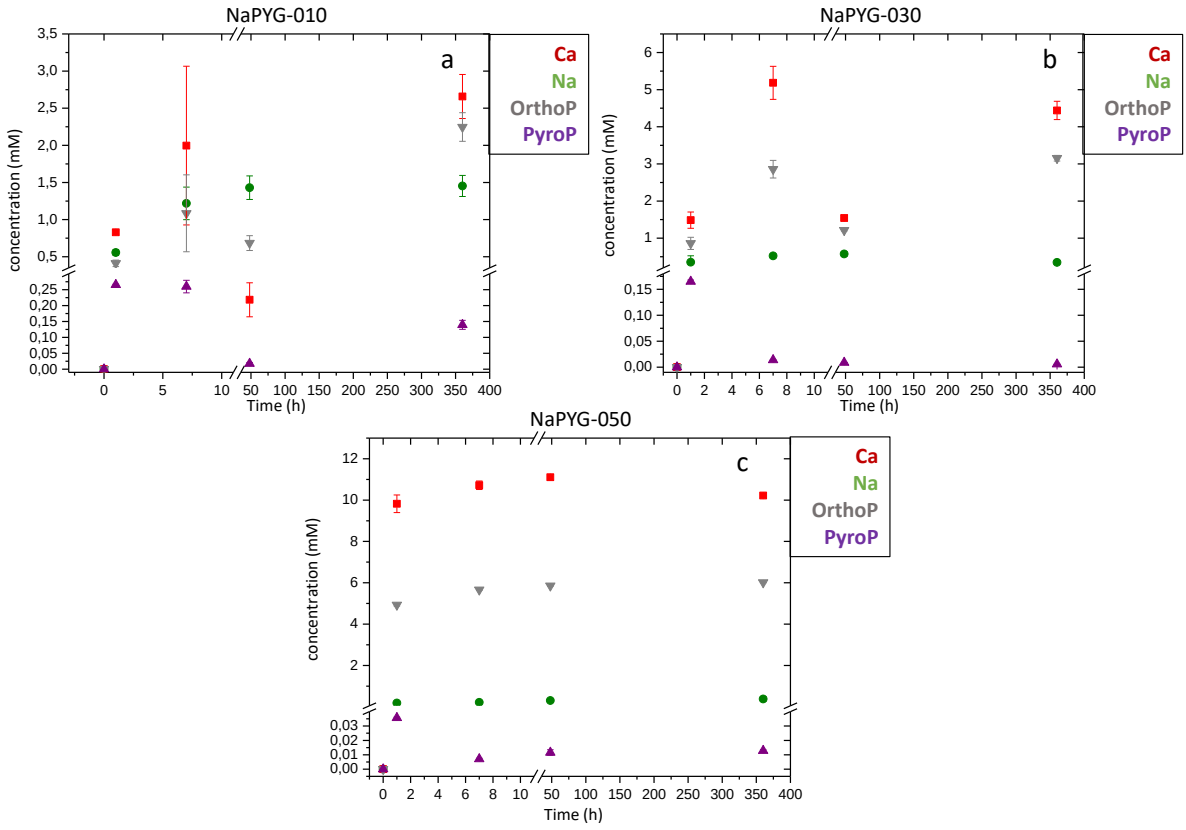


Figure III.20 : Concentration des ions calcium, sodium, orthophosphate et pyrophosphate en solution en fonction de la durée d'immersion des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b) et NaPYG-050 (c) dans l'eau acidifiée à pH 2.

III.2.3.3 Discussion

Lors des évolutions à pH 2, une perte de masse plus élevée que lors des évolutions à pH neutre ou 4 a été observée. Cette perte de masse peut être expliquée logiquement par le plus grand nombre de protons en solution, s'échangeant avec les cations sodium et calcium des matériaux et/ou protonant les ions phosphates dissouts en solution, ce qui entraine l'augmentation du pH dès les premières minutes d'évolution. De plus, les matériaux NaPYG-0X0 ont tous cristallisé en pyrophosphate de calcium tétrahydraté (mCPPT-β) ou dihydraté (tCPPD) à 15 jours. Cette cristallisation s'est produite simultanément à la diminution de la proportion d'orthophosphate dans les matériaux. La totalité de l'orthophosphate a été libérée en solution pour les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-050 à 15 jours d'évolution alors que la matrice du matériau NaPYG-030 contient toujours de l'ortho et du pyrophosphate. Ainsi les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-050 ont totalement cristallisé alors que le matériau NaPYG-030 est composé d'une partie amorphe et d'une phase cristalline mCPPT-β. Ces observations confortent l'hypothèse que la stabilité du réseau amorphe des matériaux NaPYG-0X0 repose sur la présence conjointe d'ions ortho et pyrophosphate dans leur matrice[92].

Comme nous avons pu le montrer lors des évolutions à pH 4, le sodium est l'élément dont la quantité a été libérée en plus grande quantité et le plus vite par rapport à sa concentration initiale dans les matériaux, pour toutes les compositions NaPYG-0X0 étudiées. Pour les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-050 près de 100% de la quantité initiale de sodium a été libérée en solution à 15 jours alors que 70% de cette quantité a été mesurée pour NaPYG-030. Le sodium jouerait donc un rôle structurant important dans les matériaux NaPYG-0X0. Cette hypothèse repose sur le rôle majeur du sodium dans la structuration de l'eau inter-cluster et donc sur la cohésion globale du solide[93].

A la différence des évolutions à pH 4, dans lequel le matériau NaPYG-050 a cristallisé en apatite, les matériaux ont tous cristallisé en des phases de pyrophosphate de calcium hydratées lors des évolutions à pH plus acide. Afin d'expliquer cette cristallisation les indices de sursaturation des solutions recueillies vis-à-vis des phases phosphocalciques ont été calculés par le logiciel MINTEQ et PHREEQC et sont présentés sur la figure III.21. Ils montrent que les solutions d'évolution pour NaPYG-010 et NaPYG-050 ne sont sursaturées vis-à-vis d'aucune phase d'orthophosphate de calcium quel que soit le temps d'évolution. L'augmentation du pH en solution n'était pas suffisamment élevée (en dessous de pH 5) pour permettre une formation significative d'apatite, alors que les phases de pyrophosphate de calcium hydraté telles que m-CPPT-β ou t-CPPD se forme à pH modérément acide[71]. Pour NaPYG-030, au contraire la solution est sursaturée par rapport à l'apatite dès 2 jours, cependant la valeur de l'indice de sursaturation est inférieure à celle de la phase pyrophosphate de calcium t-CPPD.

La concentration en ions pyrophosphate augmente pendant la première heure d'évolution puis diminue brusquement pour toutes les compositions. Cette évolution est due à leur hydrolyse favorisée en milieu acide, puisque nous observons une augmentation des ions orthophosphate en solution, mais aussi la formation de pyrophosphate de calcium cristallisé pour chaque matériau. Comme vu précédemment, au cours des évolutions à pH 4, la phase mCPPT-β se forme lors des évolutions du matériau NaPYG-010. A partir d'une solution à pH 2, nous avons vu qu'elle est visible à 7 heures d'évolution pour NaPYG-010, 15 jours pour NaPYG-030 et 2 jours pour NaPYG-050. Cependant, à 15 jours d'évolution pour NaPYG-010, la seule phase cristalline présente est un pyrophosphate de calcium dihydraté (tCPPD) qui est la phase de pyrophosphate de calcium hydratée la plus stable thermodynamiquement : il est possible que la phase mCPPT-β ait été une phase intermédiaire formée au cours de l'évolution (autour de 2 jours par exemple) de NaPYG-010 puis qu'elle ait évolué en tCPPD par dissolution reprécipitation. Par ailleurs, différents auteurs ont montré que la phase tCPPD peut être obtenue facilement en laissant maturer un pyrophosphate de calcium amorphe pendant 7 jours[72] ou 2 semaines[71]. En laissant les matériaux NaPYG-030 et NaPYG-050 immergés plus longtemps, le mCPPT-β devrait aussi tendre vers la phase tCPPD thermodynamiquement la plus stable.

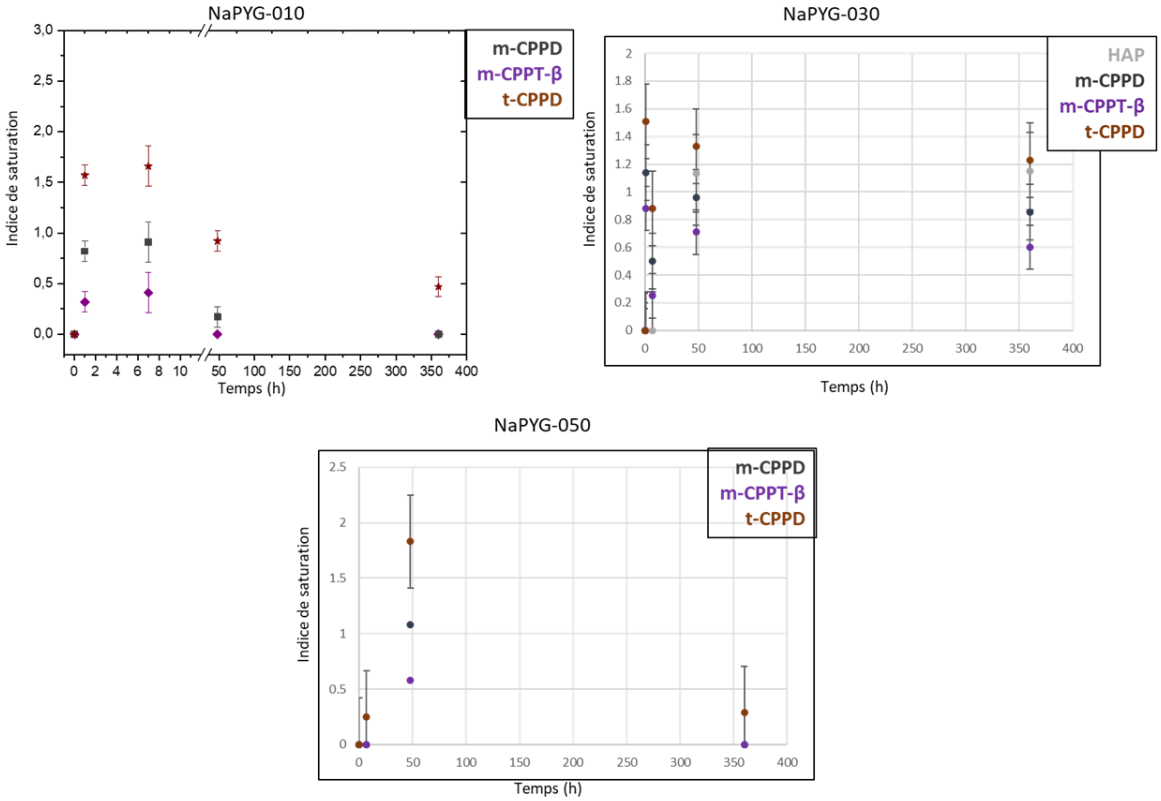


Figure III.21 : Indice de sursaturation vis-à-vis de différentes phases de phosphates de calcium, des solutions recueillies après différents temps d'évolution des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b) et NaPYG-050 (c) dans l'eau acidifiée à pH 2, calculé grâce à MINTEQ et PHREEQC.

III.2.4. Discussion et conclusion sur les évolutions des matériaux NaPYG-0X0 dans l'eau et sur l'effet du pH de la solution

Les évolutions dans l'eau à différents pH initiaux ont montré que l'évolution physico-chimique des matériaux NaPYG-0X0 en milieu aqueux dépendait de la composition de ces derniers ainsi que du pH. Le matériau NaPYG-050 comportant plus d'orthophosphate que de pyrophosphate a tendance à cristalliser en apatite. Cependant lors des évolutions à pH 2, le pH en solution est resté trop faible et des ions pyrophosphate étaient présents en solution à une concentration supérieure à 10^{-4} mM, ce qui a empêché l'apatite de précipiter. Les compositions NaPYG-010 et surtout NaPYG-030 qui contient autant d'orthophosphate que de pyrophosphate ont montré une grande stabilité lors de ces évolutions. Cependant le matériau NaPYG-010 dont la quantité de pyrophosphate est supérieure à celle d'orthophosphate montre une tendance à cristalliser en pyrophosphate de calcium hydraté (mCPPT-β et/ou tCPPD). Il a été montré par L. Mayen que la présence conjointe d'ions orthophosphate et pyrophosphate dans le matériau est nécessaire pour maintenir une structure amorphe[92]. Les études d'évolution des différentes compositions de matériaux NaPYG-0X0 démontrent que plus il y a un équilibre entre les quantités d'ions ortho et pyrophosphate dans le matériau initial plus la phase amorphe semble stable en milieu aqueux.

L'évolution à un pH plus ou moins acide a entrainé une dégradation des matériaux NaPYG-0X0 plus élevée et plus rapide. Comme attendu, l'augmentation du nombre de protons disponibles en solution a permis plus d'échanges avec les cations alcalins (Na^+ et Ca^{2+}) présents dans les matériaux. Pour toutes les compositions, le sodium est l'élément se libérant le plus vite et en plus grande quantité, ce qui prouverait que celui-ci est l'élément le plus labile dans la matrice des matériaux NaPYG-0X0. L'hypothèse décrite dans la thèse de L. Mayen selon laquelle la cohésion de clusters ortho/pyrophosphates de calcium serait maintenue *via* la structuration de l'eau interclusters par le sodium permettrait en partie d'expliquer ces résultats. En effet, lorsque la totalité du sodium est libérée, les clusters perdraient plus facilement leur cohésion et ces « phases » verraient leur équilibre déplacé vers la solvatation de leurs espèces ioniques constituantes (i.e. calcium, orthophosphate et pyrophosphate).

III.3. Evolution des matériaux NaPYG-0X0 dans différents milieux tampon

Les matériaux NaPYG-0X0 ont aussi été immergés dans des milieux tampon de type solution SBF (simulated body fluid) et alpha-MEM (alpha-minimum essential medium) dont les concentrations ioniques sont pratiquement équivalentes à celle du plasma humain. Les précédents test d'évolution des matériaux NaPYG-0X0 ont montré leur réactivité en solution aqueuse *in vitro* (libération de sodium, phosphates, cristallisation) ce qui permet de qualifier ces matériaux de bioactifs. Par ailleurs, il est admis que lorsqu'un matériau bioactif est immergé dans un fluide biologique, une couche d'apatite se forme à sa surface (ISO/FDIS 23317). Kokubo a proposé une solution modèle synthétique (simulated body fluid : SBF) pour étudier la bioactivité d'un matériau *in vitro*[97]. Avant d'aborder des tests *in vitro* sur les matériaux NaPYG-0X0 en présence de cellules, il est intéressant d'une part, d'étudier l'évolution de ces matériaux dans un milieu de culture sans cellule afin de dissocier les effets du milieu et des cellules sur ces matériaux et, d'autre part, de comparer leur évolution dans le SBF et le α-MEM afin d'identifier l'effet potentiel de constituants absents du SBF et présents dans le milieu α-MEM. De plus, afin de valider cette étude, l'évolution des matériaux NaPYG-0X0 sera comparée à celle du matériau commercial, du matériau commercial, Glassbone® (granulés de bioverre de type 45S5) fourni par l'entreprise NORAKER. En effet, des tests d'immersion du 45S5 en milieu tampon ont déjà été réalisés et ont montré qu'une couche d'apatite carbonatée se formait à sa surface. Les objectifs de cette étude sont donc d'étudier la « bioactivité » des matériaux NaPYG-0X0 au sens des travaux de Kokubo, d'analyser leur évolution physico-chimique dans les milieux SBF et α-MEM et enfin de les comparer avec un matériau amorphe / métastable de type verre bioactif de référence (le bioverre 45S5). Même si le matériau 45S5 est différent des matériaux NaPYG-0X0 de par son élaboration, sa composition ou sa nature, il sera tout de même intéressant de comparer les libérations des ions phosphate et calcium ainsi que les vitesses de formation d'apatite, dans l'éventualité que de l'apatite se forme sur les différentes composition NaPYG-0X0.

III.3.1. Evolution des matériaux NaPYG-0X0 dans le milieu de type solution SBF

La méthode impliquant la solution SBF est incluse dans la norme ISO 23317:2014 intitulée *Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials* comme solution pour la mesure *in vitro* de la capacité de formation d'apatite à la surface des matériaux implantables. Cependant cette méthode reste controversée dans la communauté scientifique[31] sur différents points :

- La sursaturation initiale du milieu vis-à-vis de l'apatite, rend la solution thermodynamiquement instable entraînant, tôt ou tard, des précipitations spontanées d'apatite,
- La teneur en carbonate n'est pas contrôlée et peut varier au cours de l'étude,
- L'absence d'acides aminés ou de protéines connus pour jouer un rôle majeur dans la germination et la croissance cristalline de l'apatite[111].

Malgré ces limites, il s'agit de la méthode la plus couramment utilisée pour comparer la « réactivité » des biomatériaux. C'est pour cette raison que nous l'avons choisie moyennant une adaptation. En effet, afin de garantir que la concentration en ions carbonate soit connue et contrôlée le protocole de préparation de la solution SBF que nous avons utilisé pour cette étude a été adapté de celui de la norme ISO-23317-2014 qui ne permet pas de contrôler la concentration initiale en ions carbonate. Les différentes concentrations d'ions dans la solution de SBF sont les mêmes que celles reportées dans la norme ISO mais le protocole de préparation est différent. Nous avons procédé comme suit :

Les solutions anionique et cationique sont préparées séparément (en doublant donc la concentration en ions inorganiques par rapport à celles indiquées dans la norme), comme indiqué dans le tableau III.6. Puis, le pH des deux solutions est ajusté à pH 7,4 avec du tampon TRIS (Sigma-Aldrich), avant de commencer le test d'évolution des matériaux NaPYG-0X0, ce qui permet de diminuer la concentration en TRIS dans la solution SBF tout en permettant de tamponner le milieu à 7,4. Ensuite, les deux solutions (anionique et cationique) sont mélangées à volume équivalent et, le sel de carbonate de sodium (4,2 mM $NaHCO_3$, VWR) est ajouté, pour garantir que la concentration en ions carbonate en début de test soit celle attendue dans la solution de SBF.

Tableau III.6 : Composition des solutions cationique et anionique avant d'être mélangées à volume égal afin d'obtenir la solution SBF.

Solution cationique

Réactif	Concentration (mM)
NaCl (VWR 27788.297)	137
KCl (VWR 26764.298)	6
$MgCl_2.6H_2O$ (NormaPur 25108.295)	3
$CaCl_2.2H_2O$ (VWR 22317.297)	5
HCl 1M (NormaPur 20252.290)	39 mL

Solution anionique

Réactif	Concentration (mM)
NaCl (VWR 27788.297)	137
$K_2HPO_4.3H_2O$ (VWR 26931.263)	2
Na_2SO_4 (NormaPur 28114.296)	1
HCl 1M (NormaPur 20252.290)	39 mL

Les matériaux NaPYG-0X0 et 45S5 sont ensuite immergés pendant un temps court (7 h), deux temps intermédiaires (2 et 6 jours) et un temps long (15 jours) dans la solution SBF.

III.3.1.1 Caractérisation des matériaux

La figure III.22 présente l'évolution du pourcentage massique des matériaux NaPYG-0X0 et 45S5 par rapport à leur masse initiale respective en fonction de leur temps d'immersion dans une solution SBF. Les trois compositions NaPYG-0X0 étudiées ont montré une perte de masse différente après 15 jours d'immersion dans la solution SBF : les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 ont perdu respectivement 6 et 10 % de leur masse initiale alors que la masse récupérée de NaPYG-050 après 15 jours d'évolution est supérieure à la masse initiale immergée. De plus, leur perte de masse est au moins trois fois inférieure à celle du 45S5. Cependant l'évolution de la perte de masse est relativement similaire pour les quatre matériaux étudiés : la perte de masse augmente lors des deux premiers jours pour NaPYG-010, NaPYG-030 et 45S5 et jusqu'à 7 heures pour NaPYG-050 puis elle diminue jusqu'à 6 jours avant de se stabiliser.

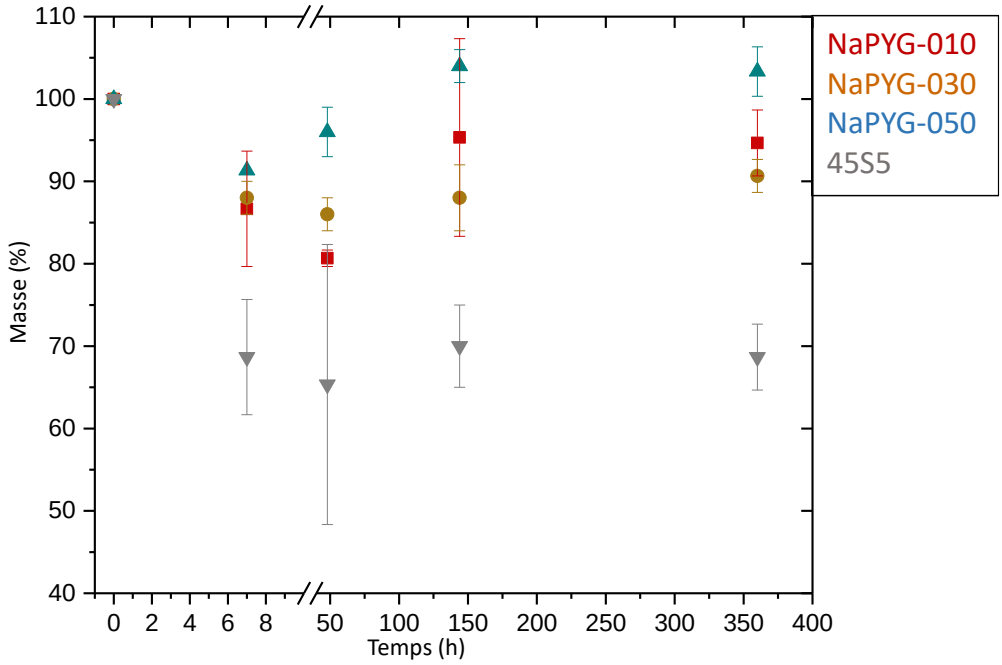


Figure III.22 : Evolution de la quantité de matériaux NaPYG-0X0 et 45S5 en fonction de la durée d'immersion dans la solution SBF. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique par rapport à la masse de départ.

III.3.1.1.1 Diffraction des rayons X

Les diagrammes de diffraction des RX (Figure III.23) montrent que les matériaux NaPYG-010 et -030 sont restés amorphes après 15 jours d'immersion dans la solution SBF. En revanche, à 6 jours d'évolution, le diagramme DRX de NaPYG-050 et du 45S5 révèle la présence de larges pics de diffraction à 25,9° et 31,8° correspondant respectivement aux plans cristallographiques (002) et (211) d'une apatite nanocristalline. La taille apparente des cristallites d'apatite calculée par la méthode Scherrer est de 143 (± 5) Å pour NaPYG-050 et 219 (± 5) Å pour le 45S5 à 15 jours, confirmant la formation d'une apatite mal cristallisée lors de l'évolution de NaPYG-050 et du 45S5 dans la solution SBF (Tableau III.7).

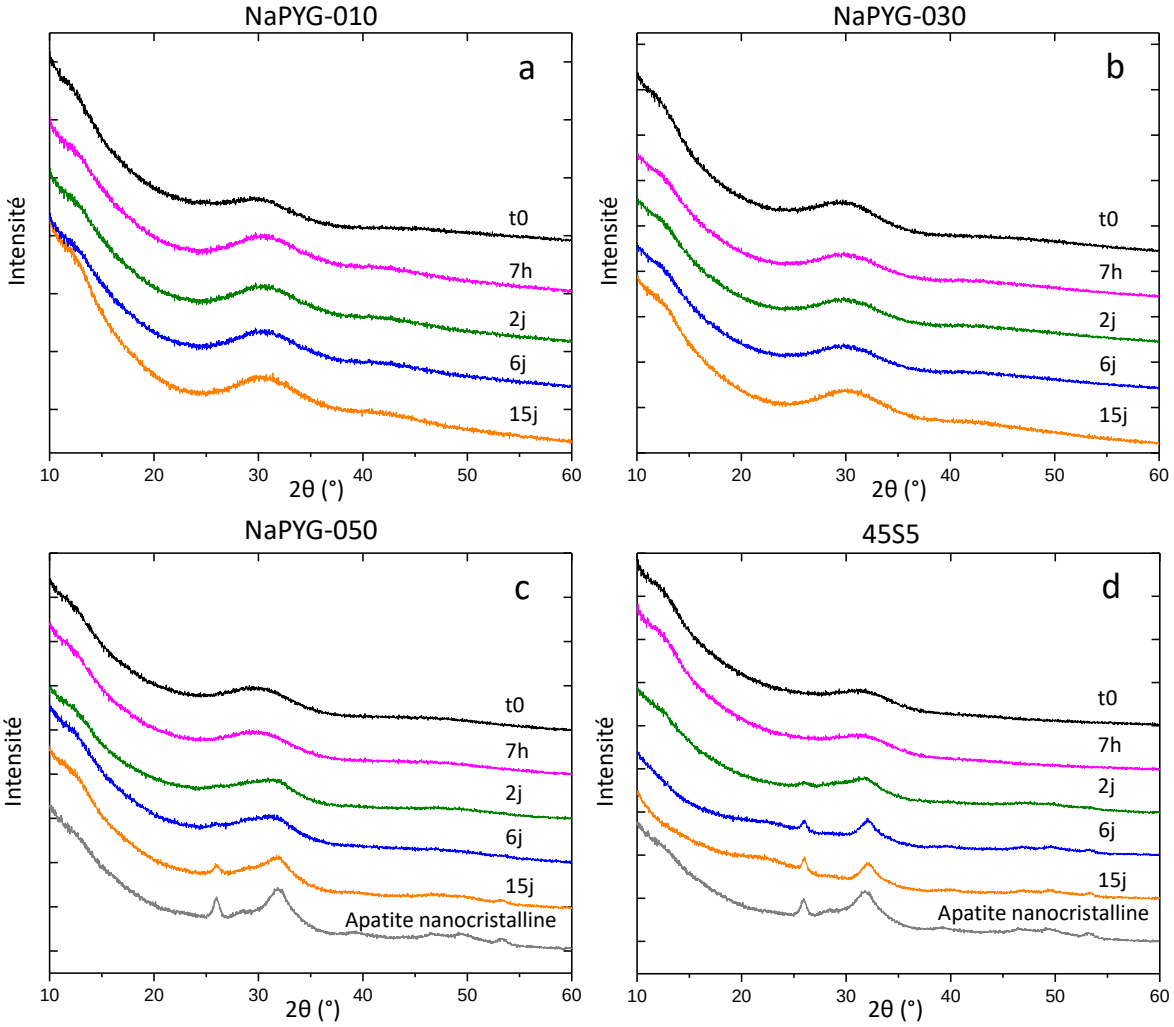


Figure III.23 : Diagrammes de diffraction des RX des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b), NaPYG-050 (c) et 45S5 (d) après différents temps d'évolution dans la solution SBF. Le DRX d'une apatite nanocristalline synthétique pure de référence est également présenté (c et d).

Tableau III.7 : Largeur à mi-hauteur du pic de diffraction (002) de l'apatite formée lors des évolutions de NaPYG-050 et 45S5 dans la solution SBF et taille apparente des cristallites, calculée à partir de la formule de Scherrer.

Temps	NaPYG-050 à 6 jours	NaPYG-050 à 15 jours	45S5 à 15 jours
Largeur à mi-hauteur du plan (002) (rad)	$2{,}09 \times 10^{-2}$	$1{,}08 \times 10^{-2}$	$6{,}98 \times 10^{-3}$
Taille apparente des cristallites (Å)	71 (± 5)	139 (± 5)	219 (± 5)

III.3.1.1.2 Spectroscopie Raman

Les spectres Raman des matériaux NaPYG-0X0 présentés sur la figure III.24 montrent que la bande de vibration $\nu^{s}PO_4$ est devenue plus fine et centrée à 960 cm^{-1} ce qui correspond à la bande de vibration $\nu^{s}PO_4$ de l'apatite. De plus, un léger épaulement à 1070 cm^{-1} apparait à partir de 6 jours d'évolution qui pourrait être dû à la présence de carbonates. Pour le matériau 45S5, les spectres Raman deviennent très similaires à celui de l'apatite nanocristalline à partir de 6 jours d'immersion dans la solution SBF. Les bandes de vibration entre 800 et 1150 cm^{-1} et à 635 cm^{-1} associées aux élongations des liaisons Si-O-Si dans les tétraèdres de silice sont modifiées et deviennent moins intenses, alors que les bandes de vibration de $\nu^{s}PO_4$ et des groupements carbonate situés respectivement à 960 cm^{-1} et 1085 cm^{-1} deviennent plus intenses au cours du temps d'immersion. Nous pouvons aussi remarquer que la bande de vibration $\nu^{s}PO_4$ s'affine et se déplace vers les nombres d'onde plus élevés, ce qui devrait être dû à la formation d'une phase cristalline apatitique. Enfin, aucune évolution du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates n'a été observée pour les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 lors de leur évolution dans la solution SBF (Tableau III.8). Au contraire, le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates de NaPYG-050 déterminé à partir des données spectrales Raman (figure III.24c) a augmenté légèrement à partir de 6 jours d'évolution.

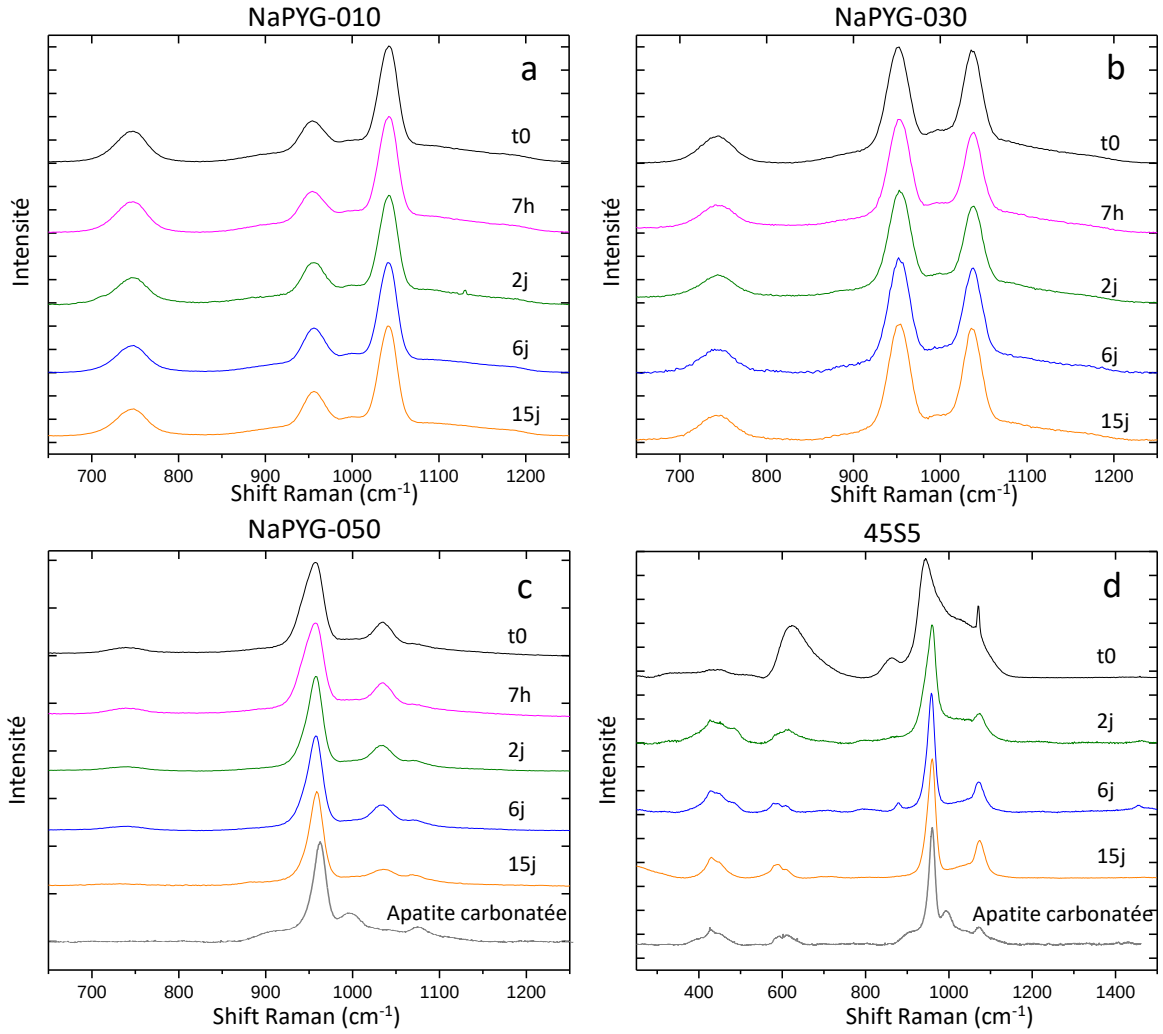


Figure III.24 : Spectres Raman des matériaux NaPYG-010 (a), -030 (b), -050 (c) et 45S5 (d) après 7h, 2, 6 et 15 jours d'évolution dans la solution SBF. Le spectre d'une apatite carbonatée synthétique de référence est aussi présenté (c et d).

Tableau III.8 : Evolution du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphate des matériaux NaPYG-0X0 au cours de leur immersion dans la solution SBF, évalué par décomposition des bandes phosphate Raman.

milieu	SBF		
Temps d'évolution (jours)	0	6	15
NaPYG-010	0,29 (± 0.01)	0,30 (± 0.01)	0,30 (± 0.01)
NaPYG-030	0,53 (± 0.01)	0,54 (± 0.01)	0,53 (± 0.01)
NaPYG-050	0,74 (± 0.01)	0,75 (± 0.01)	0,78 (± 0.01)

III.3.1.1.3 Observation microscopique

Aucune évolution morphologique significative des matériaux NaPYG-010 et -030 n'a été observée par MEB pendant les 15 jours de test (Figure III.25), seules quelques fissures sont apparues à la surface de NaPYG-010 et NaPYG-030 après 15 jours (Fig. III.25c et 25f) comme lors des évolutions dans l'eau. Pour NaPYG-050, nous pouvons voir quelques microparticules à la surface du matériau après 15 jours d'immersion dans la solution SBF. Ces particules sphériques ont une taille comprise entre 0,5 et 2 µm et pourraient correspondre à l'apatite nanocristalline mise en évidence par analyse par DRX et par spectroscopie Raman (Figures III.23c et III.24c) et généralement observée sur les matériaux bioactifs après immersion dans le milieu SBF[101,117]. En outre la surface du verre 45S5 a été modifiée au cours de l'immersion dans le SBF. Il s'est formé une couche de particules sphériques recouvrant la surface lisse du verre initial. Cette couche est constituée de micro-agglomérats de diamètre plus ou moins grands allant de 1 à 10 µm, typiques des précipités d'apatite formés lors d'évolution dans le SBF.

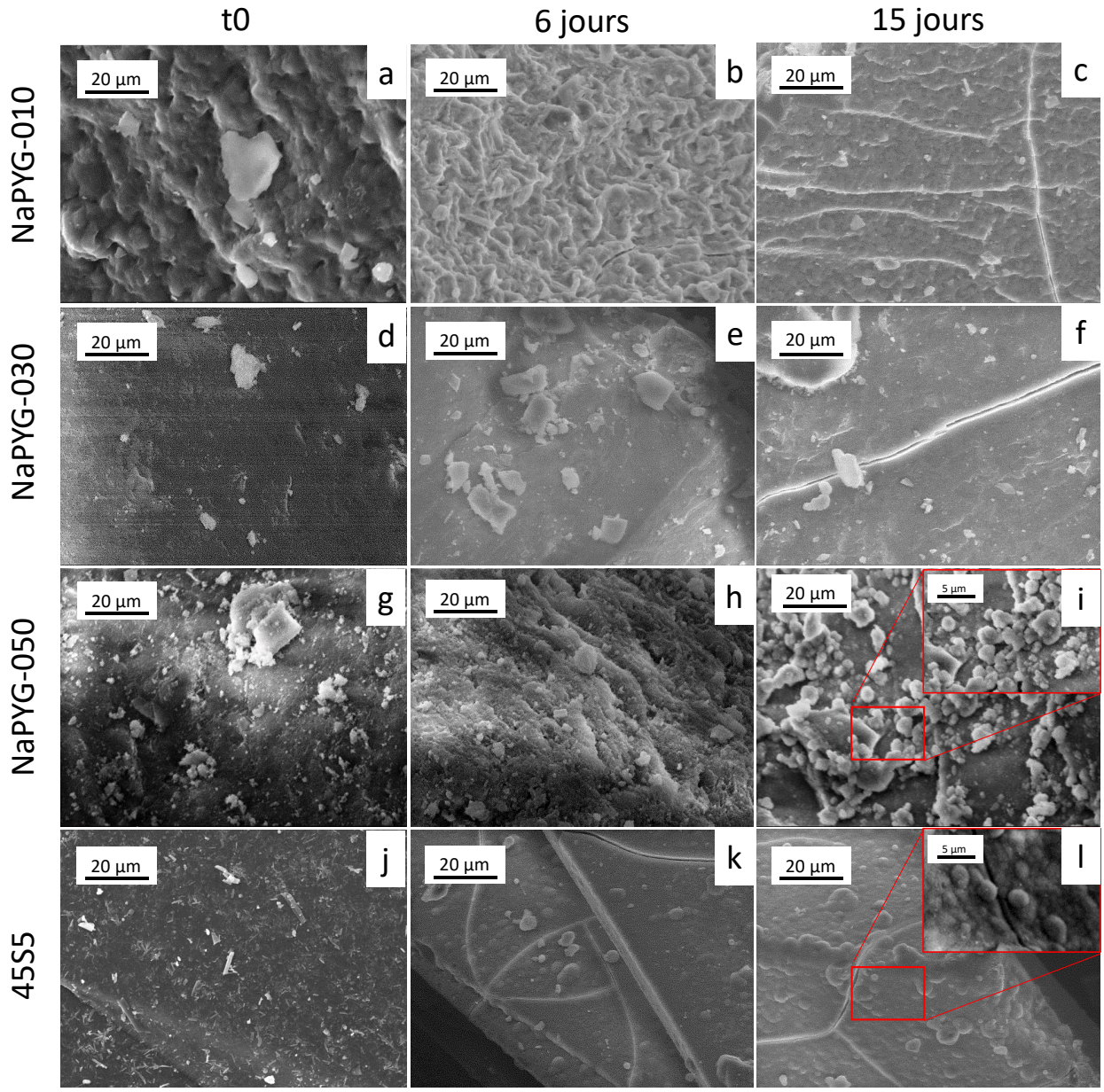


Figure III.25 : Micrographies MEB des matériaux NaPYG-010 (a, b et c), NaPYG-030 (d, e et f), NaPYG-050 (g, h et i) et 45S5 (j, k et l) initiaux et après 6 et 15 jours d'évolution dans le milieu SBF.

III.3.1.2 Caractérisation des milieux

III.3.1.2.1 Evolution du pH

La mesure du pH en solution suite à l'immersion des matériaux NaPYG-0X0 dans la solution SBF semble montrer une relative stabilité tel qu'attendu pour ce type de milieu tamponné, bien qu'une légère augmentation du pH de la solution de SBF (de pH 7,4 à 7,6) ait tout de même été observée après 15 jours pour toutes les compositions de matériaux testées.

III.3.1.2.2 Dosages chimiques

La quantité élevée de sodium dans la solution de SBF (142 mM) empêche la mesure précise de toute évolution de la concentration de sodium liée à l'immersion du matériau NaPYG-0X0 et 45S5 pendant le test (Figure III.26). Nous avons montré que la concentration de calcium a augmenté au cours des 2 premiers jours (de 2,5 initialement à 5,7, 7,1 et 4,5 mM pour les matériaux NaPYG-010, -030 et -050, respectivement), puis est restée assez stable (pour NaPYG-010 et 030) et a légèrement diminué (pour NaPYG-050) jusqu'à la fin du test (15 jours). La concentration d'orthophosphate a légèrement augmenté au 2^{ième} jour : 1,5, 1,9 et 1,6 mM pour les matériaux NaPYG-010, -030 et -050, respectivement. Au-delà de 2 jours d'immersion, la concentration en orthophosphate a diminué pour toutes les compositions de matériaux testées. En particulier pour le matériau NaPYG-050 après 15 jours d'évolution, les ions orthophosphates ont atteint une concentration qui est inférieure à celle dans la solution de SBF initialement (1 mM). Au cours de l'essai, la concentration de pyrophosphate dans la solution de SBF a varié en fonction du temps d'immersion des matériaux NaPYG-010 et -030 : d'abord une augmentation puis une diminution de l'ordre de 2,5 à 2 µM pour NaPYG-010 et de 1,5 à 0,3 µM pour NaPYG-030. Cependant, la concentration de pyrophosphate dans les solutions de SBF lors des évolutions de NaPYG-050 à tous temps d'immersion étudiés n'a pas pu être mesurée car elle était inférieure à la limite de détection de la méthode utilisant le kit PPi Light commercial, soit 0,02 µM. Les évolutions de concentrations ioniques lors de l'immersion du 45S5 sont cohérentes avec la littérature. La concentration en phosphate diminue du fait de la précipitation de l'apatite, alors que les concentrations de calcium augmentent au fil du temps, le phosphate étant le facteur limitant de la formation d'apatite. La libération de calcium du verre compense le calcium consommé pendant la formation d'apatite. Nous pouvons également observer une augmentation de la concentration en ion silicium dès 2 jours à environ 2 mM, puis cette concentration reste assez stable, ce qui est encore en accord avec la littérature[117].

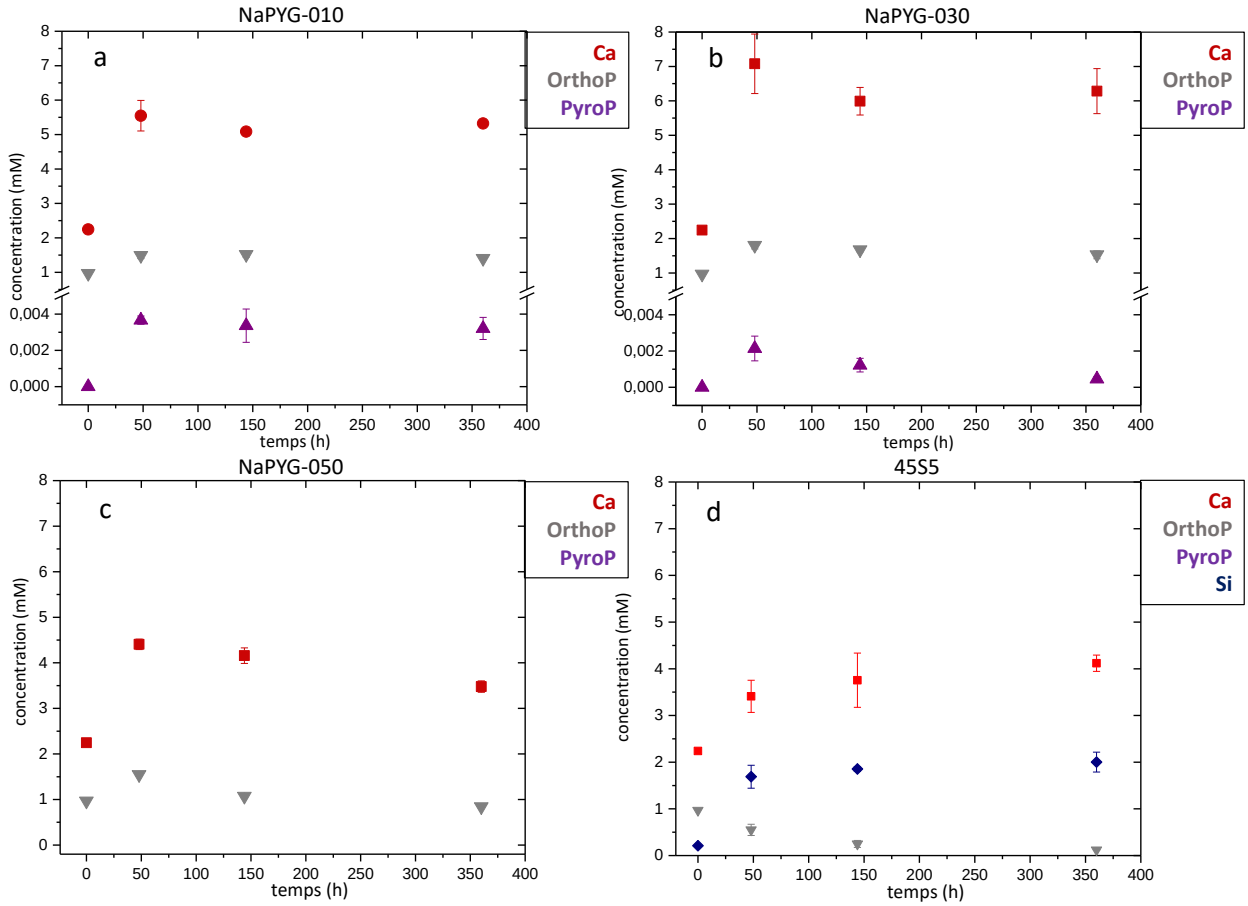


Figure III.26 : Concentration des ions calcium, orthophosphate, pyrophosphate et silicate en solution en fonction de la durée d'immersion des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b), NaPYG-050 (c) et 45S5 (d) dans la solution SBF. La concentration en pyrophosphate dans les solutions récupérées après immersion du matériau NaPYG-050 n'a pas pu être mesurée (en dessous de la limite de détection de la méthode de dosage, c'est-à-dire en dessous de 0,02 µM).

III.3.1.3 Discussion

On peut constater dans un premier temps que le verre 45S5, matériau de référence choisi pour cette étude, a évolué de la même façon que ce qui est reporté dans la littérature, c'est-à-dire que la quantité d'ions libérés en solution est semblable à celle déterminée dans d'autres études réalisées avec un protocole différent de celui que nous avons mis en œuvre[117]. De plus, une couche d'apatite s'est formée au cours de l'évolution du bioverre 45S5, validant ainsi notre test. Les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 se sont encore une fois montrés stables lors des évolutions dans la solution SBF. Leur perte de masse à 15 jours était différente et a été estimée entre 5 et 15 %, le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates n'a pas évolué et aucune phase cristalline ne s'est formée en 15 jours. Au contraire, une phase apatitique s'est formée une nouvelle fois lors des

évolutions de NaPYG-050 et la masse pesée à 15 jours était même supérieure à la masse initiale de matériau immergé.

La grande stabilité des matériaux NaPYG-0X0 dans ce milieu peut s'expliquer par la forte concentration en ions sodium initialement présente dans la solution SBF. Cette grande quantité induit un équilibre entre le solide et la solution et limite ainsi la libération de sodium du matériau, et dans ce cas, le calcium est échangé avec les protons en solution. Les calculs d'indice de sursaturation dans les solutions SBF avant et après évolution montrent que toutes ces solutions sont sursaturées vis-à-vis de l'apatite (figure III.27).

Cependant, il n'y a pas de formation d'apatite pour NaPYG-010 et NaPYG-030, très probablement en raison de la présence d'ions pyrophosphate, car ils sont, comme précisé précédemment, un inhibiteur de cristallisation de l'apatite même à très faible concentration[54,143] : ces ions sont bien présents dans les solutions correspondantes lors des évolutions. En revanche, cette concentration en ions pyrophosphate est inférieure à 10^{-4} mM (non détectable), lors des évolutions de NaPYG-050 dans le SBF et se trouve donc en dessous de la concentration inhibitrice ; l'apatite peut donc précipiter. Cependant la taille des cristaux d'apatite formés est inférieure à celle des cristaux formés lors des évolutions dans l'eau ultra-pure. Le pH proche de la neutralité n'a pourtant pas ralenti la libération de calcium en solution, mais les cristaux d'apatite se sont formés plus lentement dans le milieu SBF (entre 7 h et 2 jours dans l'eau acidifié initialement à pH 4 et entre 2 et 6 jours dans le SBF). La sursaturation vis-à-vis des phases de phosphate octocalcique et de phosphate tricalcique étant beaucoup plus élevée que lors des évolutions dans l'eau, a pu influencer la formation d'apatite en solution, *via* la formation de ces phases intermédiaires.

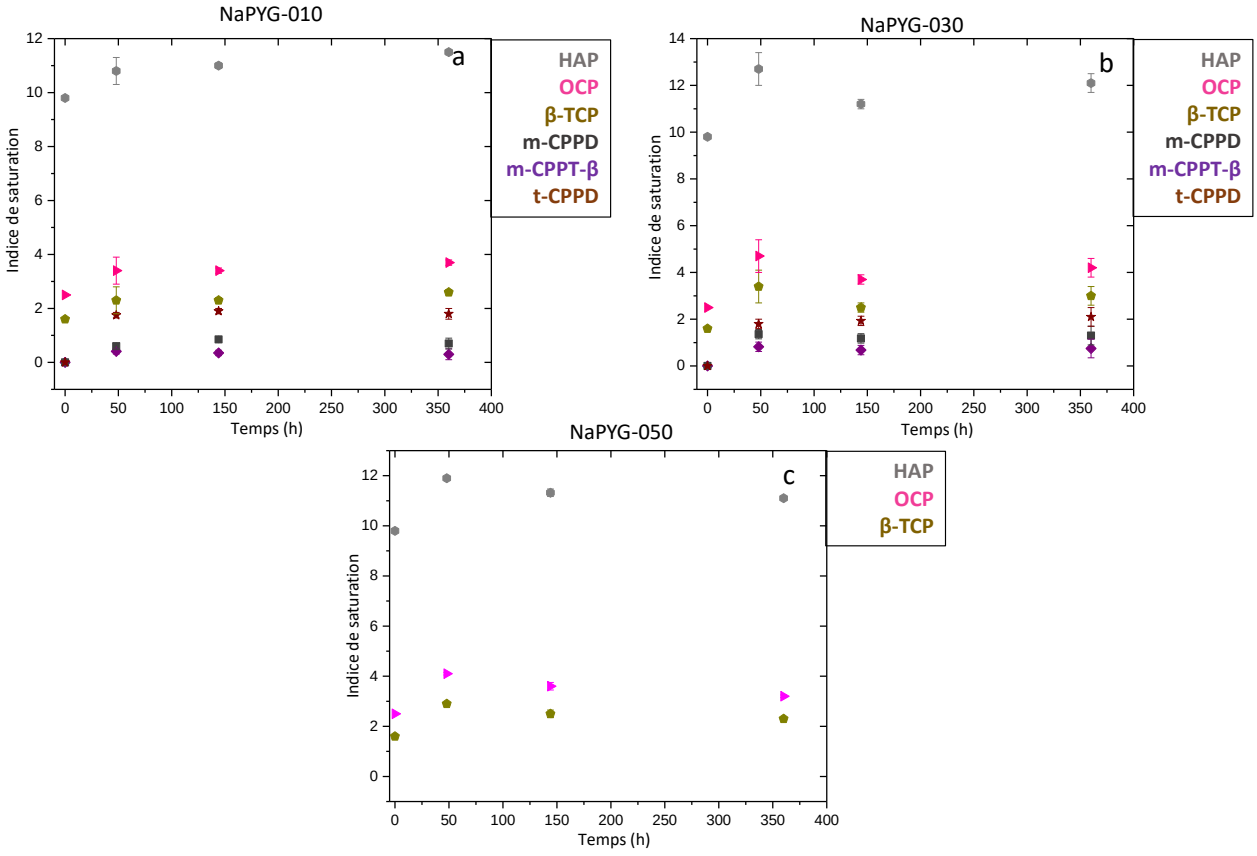


Figure III.27 : Indice de sursaturation des solutions SBF vis-à-vis des phases ortho-phosphocalciques, lors des évolutions des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b) et NaPYG-050 (c) dans la solution SBF, calculé grâce à MINTEQ et PHREEQC.

III.3.2. Evolution des matériaux NaPYG-0X0 en milieu de culture α-MEM sans cellules

Le α-minimum essential medium (α-MEM) est une solution dont le pH est tamponné à 8,2 contenant des acides aminés, des sels inorganiques, des vitamines, des ribonucléosides ainsi qu'un indicateur coloré (rouge phénol). La composition de la solution α-MEM utilisée lors de cette étude est présentée dans le tableau III.9. Cette solution constitue un milieu idéal pour la culture de cellules et sera utilisée lors des tests *in vitro* cellulaire réalisés par le laboratoire Biotis à Bordeaux (Chapitre IV). Il est donc préalablement nécessaire de savoir comment les matériaux NaPYG-0X0 évoluent dans ce milieu α-MEM exempt de cellules, afin de dissocier l'effet du milieu à celui des cellules sur les matériaux NaPYG-0X0.

Tableau III.9 : Liste non exhaustive des composants et leur concentration dans la solution α-MEM utilisée pour les études d'évolution.

Composition	mmol/L
Sels inorganiques	
$CaCl_2$	1,8
$MgSO_4$	0,8
KCl	5,3
$NaHCO_3$	26,2
NaCl	117,2
NaH_2PO_4,H_2O	1
Vitamines	
Acide ascorbique	0,3
Acides aminés	
L-Arginine	0,7
L-Phénylalanine	0,2
L-Tryptophane	0,1
Autres composants	
Spyruvate de sodium	1

Afin d'éviter tout développement d'une contamination des échantillons pendant ce test, les échantillons sont préparés sous conditions stériles, c'est-à-dire que les matériaux NaPYG-0X0 sont immergés dans le milieu α-MEM placés dans des piluliers en réalisant ces manipulations sous une hotte à flux laminaire et en utilisant de la verrerie et des barreaux aimantés lavés à l'éthanol ainsi que des piluliers stériles. Tous les piluliers contenant les matériaux immergés dans le milieu α-MEM sont placés dans le bain thermostaté à 37°C pendant un temps intermédiaire (2 jours) et un temps long (15 jours).

III.3.2.1 Caractérisation des matériaux

L'évolution de la masse des matériaux en fonction de leur temps d'immersion dans le milieu α-MEM est présentée sur la figure III.28. Elle montre que la perte de masse de la composition NaPYG-030 est différente de celle des autres matériaux. En effet, elle est plus faible (entre 5 et 10%), que celles de NaPYG-010, NaPYG-050 et 45S5 qui augmente respectivement jusqu'à 54%, 41% et 32% à 2 jours puis diminue ensuite jusqu'à 15 jours d'évolution.

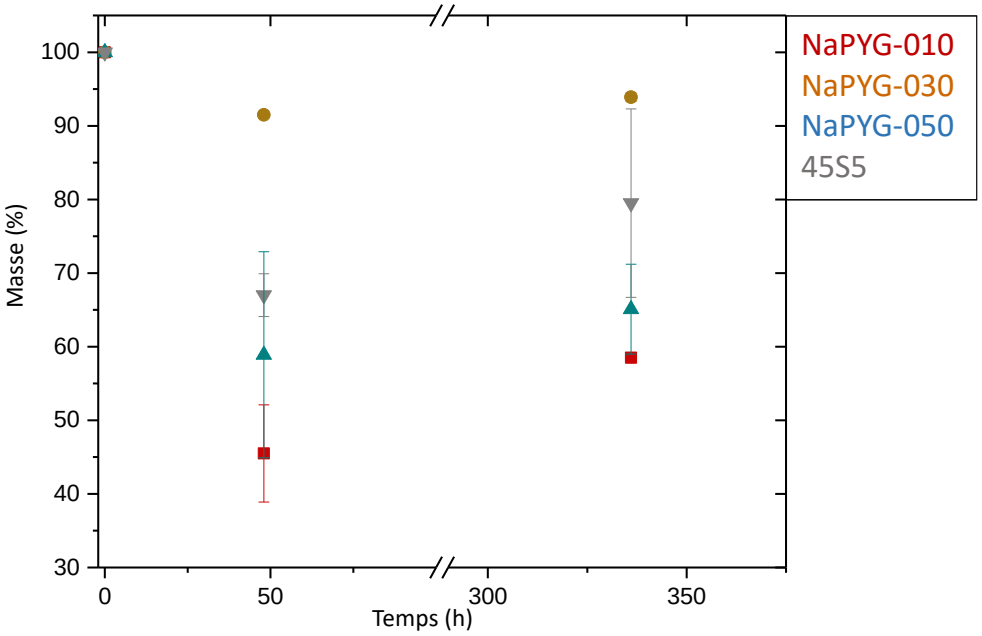


Figure III.28 : Evolution de la quantité de matériaux NaPYG-0X0 et 45S5 en fonction de leur durée d'immersion dans le milieu α-MEM. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique de matériau restant par rapport à la masse de départ.

III.3.2.1.1 Diffraction des rayons X

Les diagrammes de diffraction des RX présentés sur la figure III.29 montrent que les matériaux NaPYG-010 et -030 sont restés amorphes après 15 jours d'immersion dans le milieu α-MEM. Le pic de diffraction présent à 17° correspond au porte échantillon du diffractomètre RX en aluminium et ne correspond donc pas à la composition des matériaux. En revanche, à 15 jours d'évolution, le diagramme RX de NaPYG-050 montre de larges pics de diffraction à 25,9° et 31,8° correspondant respectivement aux plans cristallographiques (002) et (211) d'une apatite nanocristalline (Fig.III.29c). La taille apparente des cristallites d'apatite calculée à partir de la formule de Scherrer est de 122 Å (± 5). Pour le diagramme DRX du 45S5 à 15 jours il est difficile d'observer un pic de diffraction, cependant un pic de très faible intensité semble apparaitre vers 30° et le halo semble s'affiner.

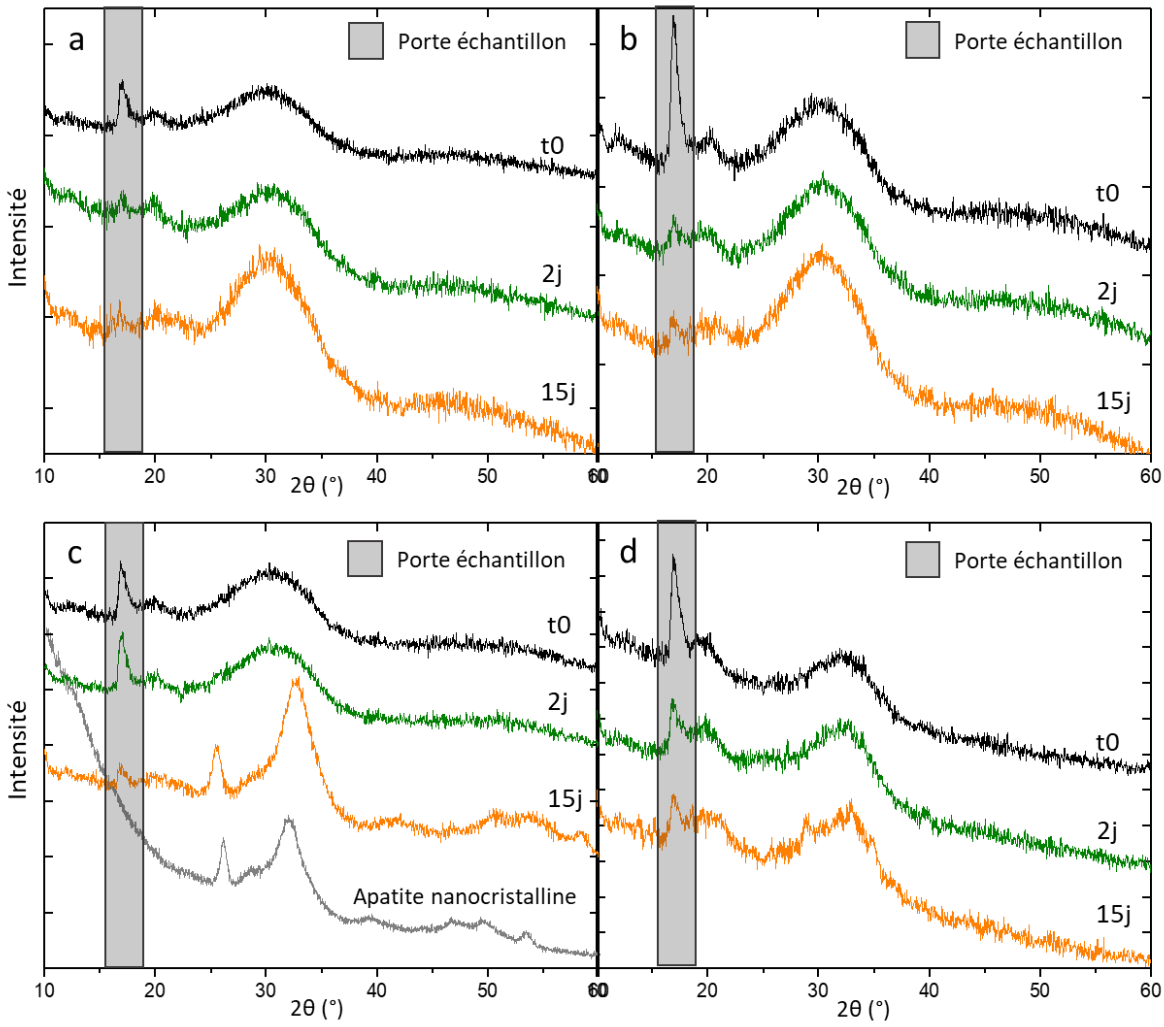


Figure III.29 : Diagrammes de diffraction des RX des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b), NaPYG-050 (c) et 45S5 (d) initiaux et après 2 et 15 jours d'évolution dans le milieu α-MEM. Le diagramme RX d'une apatite nanocristalline synthétique pure de référence est également présenté (c).

Tableau III.10 : Largeur à mi-hauteur du pic de diffraction (002) de l'apatite formée lors des évolutions de NaPYG-050 dans le milieu α-MEM et taille apparente des cristallites correspondante calculée à partir de la formule de Scherrer.

Temps	NaPYG-050 à 15 jours
Largeur à mi-hauteur du plan (002) (rad)	$1{,}22 \times 10^{-2}$
Tailles des cristaux (Å)	122 (± 5)

III.3.2.1.2 Spectroscopie Raman

La figure III.30 présente les spectres Raman des matériaux étudiés suite à leur évolution dans le milieu α-MEM. A 15 jours d'évolution, la bande de vibration $\nu^{s}PO_4$ est devenue plus fine et s'est décalée vers les plus grands nombres d'onde et dès 2 jours une bande de vibration à 1085 cm^{-1} attribuée aux carbonates est apparue comme lors des évolutions dans le SBF. De plus, une bande faiblement intense est apparue à 1005 cm^{-1} et peut être assignée aux groupements ν_1SO_4 issus des ions sulfates présents dans la composition du α-MEM. La présence de sulfate sur le matériau après séparation du milieu serait due à un mauvais lavage des matériaux puisqu'ils ont aussi été observés sur d'autres matériaux sans lien avec le temps d'immersion. Pour le matériau 45S5 le spectre Raman à 15 jours a évolué de la même façon que dans le SBF : l'intensité des bandes de vibration attribuées aux liaisons Si-O-Si a diminué et celles associées aux groupements orthophosphate et carbonate à 960 et 1085 cm^{-1} ont augmenté. En outre, la bande de vibration attribuée à $\nu^{s}PO_4$ s'est décalée vers les plus grands nombres d'onde. Le traitement mathématique des spectres de NaPYG-010 et NaPYG-030 ne montre aucune évolution du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates dans les matériaux alors que celui de NaPYG-050 a diminué (Tableau III.11).

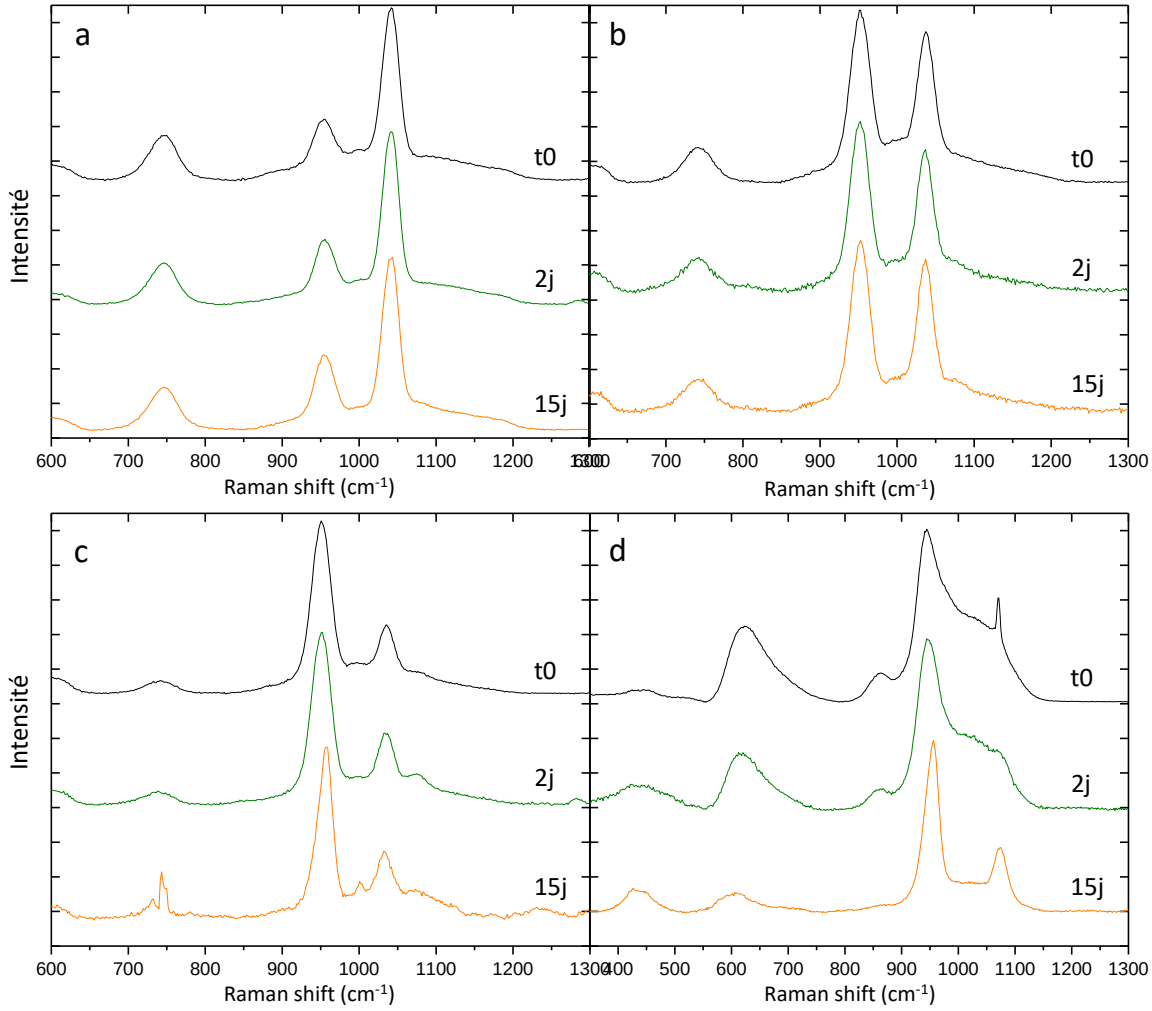


Figure III.30 : Spectres Raman des matériaux NaPYG-010 (a), -030 (b), -050 (c) et 45S5 (d) initiaux et après 2 et 15 jours d'évolution dans le milieu α-MEM.

Tableau III.11 : Evolution du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates dans les matériaux NaPYG-0X0 en fonction de leur temps d'immersion dans le milieu α-MEM, évalué par décomposition des bandes de phosphate Raman.

milieu	α-MEM		
Temps d'évolution (jours)	0	2	15
NaPYG-010	0,29 (± 0.01)	0,29 (± 0.01)	0,30 (± 0.01)
NaPYG-030	0,53 (± 0.01)	0,53 (± 0.01)	0,53 (± 0.01)
NaPYG-050	0,74 (± 0.01)	0,73 (± 0.01)	0,65 (± 0.01)

III.3.2.1.3 Observation microscopique

Les micrographies des matériaux après 15 jours d'évolution dans le milieu α-MEM sont présentés sur la figure III.31. Quelques fissures sont observées à la surface des matériaux NaPYG-010 et -030, sinon aucune évolution morphologique significative de ces matériaux n'a été relevée par MEB. Cependant nous pouvons remarquer un écaillage de la surface associé à des fissures profondes (supérieure à 20 μm) pour le matériau NaPYG-050, comme il a été observé pour les évolutions du matériau NaPYG-050 dans l'eau ultra-pure et acidifiée à pH 4. Cet écaillage pourrait s'identifier également à un revêtement (d'apatite nanocristalline) qui se serait fissuré lors du séchage. Pour le bioverre 45S5, une couche uniforme de microparticules s'est aussi formée sur sa surface à 15 jours d'évolution, semblable à celle formée dans le SBF.

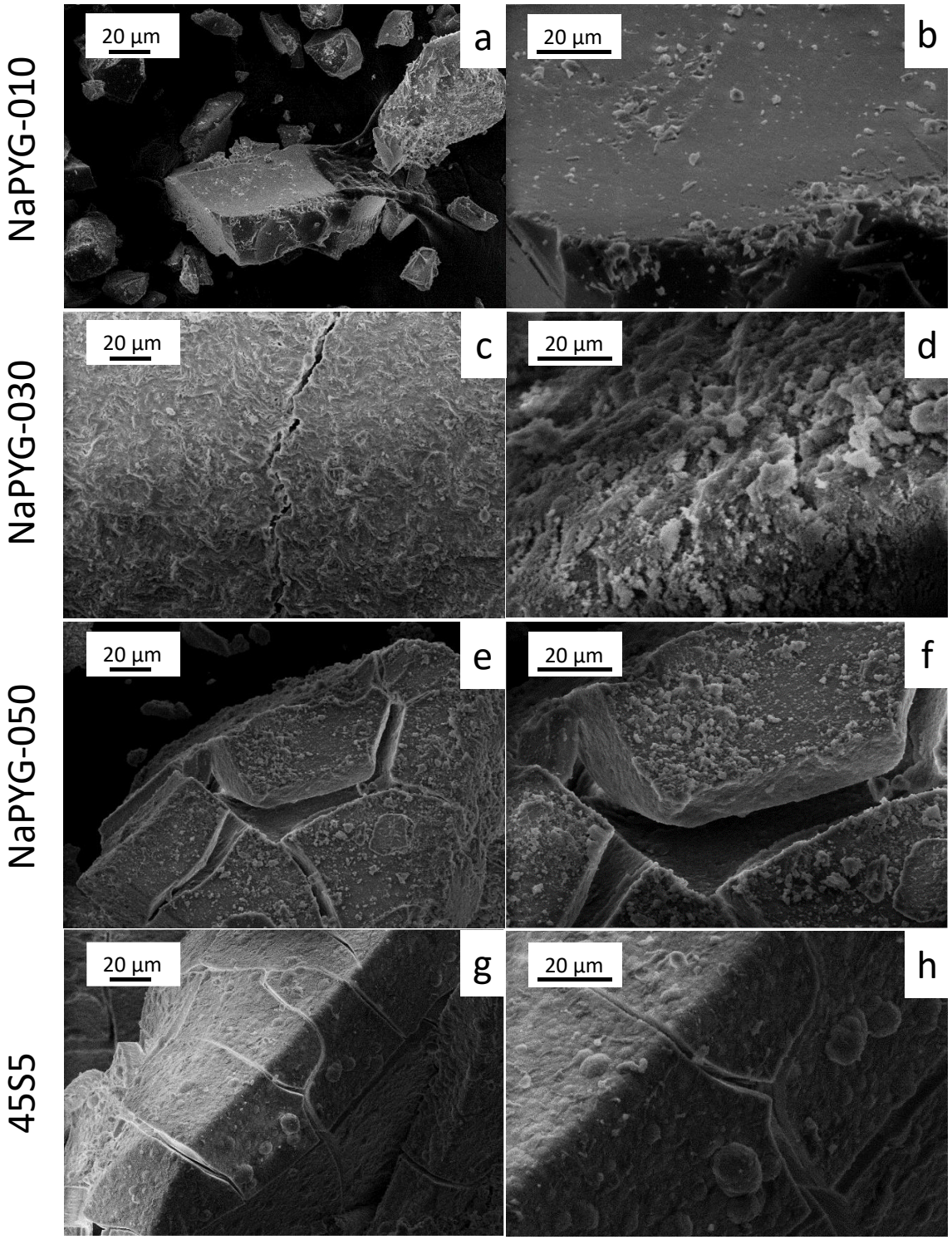


Figure III.31 : Micrographies MEB à deux grossissements différents des matériaux NaPYG-010 (a et b), NaPYG-030 (c et d), NaPYG-050 (e et f) et 45S5 (g et h) après 15 jours d'évolution dans le α-MEM.

III.3.2.2 Caractérisation des milieux

III.3.2.2.1 Evolution du pH

Le pH du milieu α-MEM dans lequel les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 ont été immergés n'a pas évolué au cours de l'étude par contre celui du milieu d'évolution du matériau NaPYG-050 après 15 jours a connu une baisse de pH de quasiment une unité pH (0,8 ± 0,4). L'évolution du pH du milieu du NaPYG-050 peut être interprété comme un signe d'une précipitation légère d'apatite, celle-ci libérant des protons en solution lors de sa formation. Le pK_a du couple $H_2PO_4^-$ / HPO_4^{2-} est de 7,09. Cela signifie qu'au pH initial de 8,2, les ions HPO_4^{2-} sont largement majoritaires par rapport aux ions $H_2PO_4^{2-}$ et PO_4^{3-}. Lors de la formation de l'apatite, l'orthophosphate est intégré principalement au réseau sous la forme PO_4^{3-}, ce qui explique le relargage de protons en solution selon l'équation de réaction :

$$HPO_4^{2-}{}_{(aq)} + H_2O_{(l)} \leftrightarrow PO_4^{3-}{}_{(s)} + H_3O^+{}_{(aq)}$$

Le pH des solutions dans lequel le 45S5 a évolué a diminué jusqu'à 7,9 (± 0,1) à 2 jours d'évolution puis a augmenté à 8,2 (± 0,1) à 15 jours d'évolution. Cette diminution du pH dans les premiers jours peut être due à la formation d'apatite comme expliqué pour NaPYG-050.

III.3.2.2.2 Dosages chimiques

Comme pour les dosages dans le SBF, la quantité élevée de sodium dans le milieu α-MEM (145 mM) empêche de discerner précisément toute évolution de la concentration de sodium liée à l'immersion du matériau NaPYG-0X0 et 45S5 pendant le test. Sur la figure III.32, nous pouvons observer que la concentration en orthophosphate a augmenté dans toutes les solutions lors des évolutions des NaPYG-0X0 et du 45S5. Elle a augmenté à 2 jours entre 1,2 et 1,4 mM puis s'est stabilisée pour les matériaux NaPYG-010, NaPYG-030, alors qu'elle a diminué pour revenir à 1 mM pour le 45S5 et au contraire, a continué d'augmenter à 2 mM pour NaPYG-050 à 15 jours d'évolution. La concentration en calcium dans les milieux dans lesquels les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 ont évolué a diminué à 1,6 mM à 15 jours d'évolution (initialement à 1,8 mM) alors que pour NaPYG-050 elle a augmenté jusqu'à 2,6 mM. Pour le 45S5 la concentration en calcium a augmenté à 2,1 mM à 2 jours puis elle a diminué à 1,7 mM. Cette augmentation suivie d'une diminution des concentrations en ions calcium et orthophosphate en solution à 2 jours est due à un relargage d'ions de la part du 45S5 puis à la précipitation de l'apatite confirmée par DRX et spectroscopie Raman.

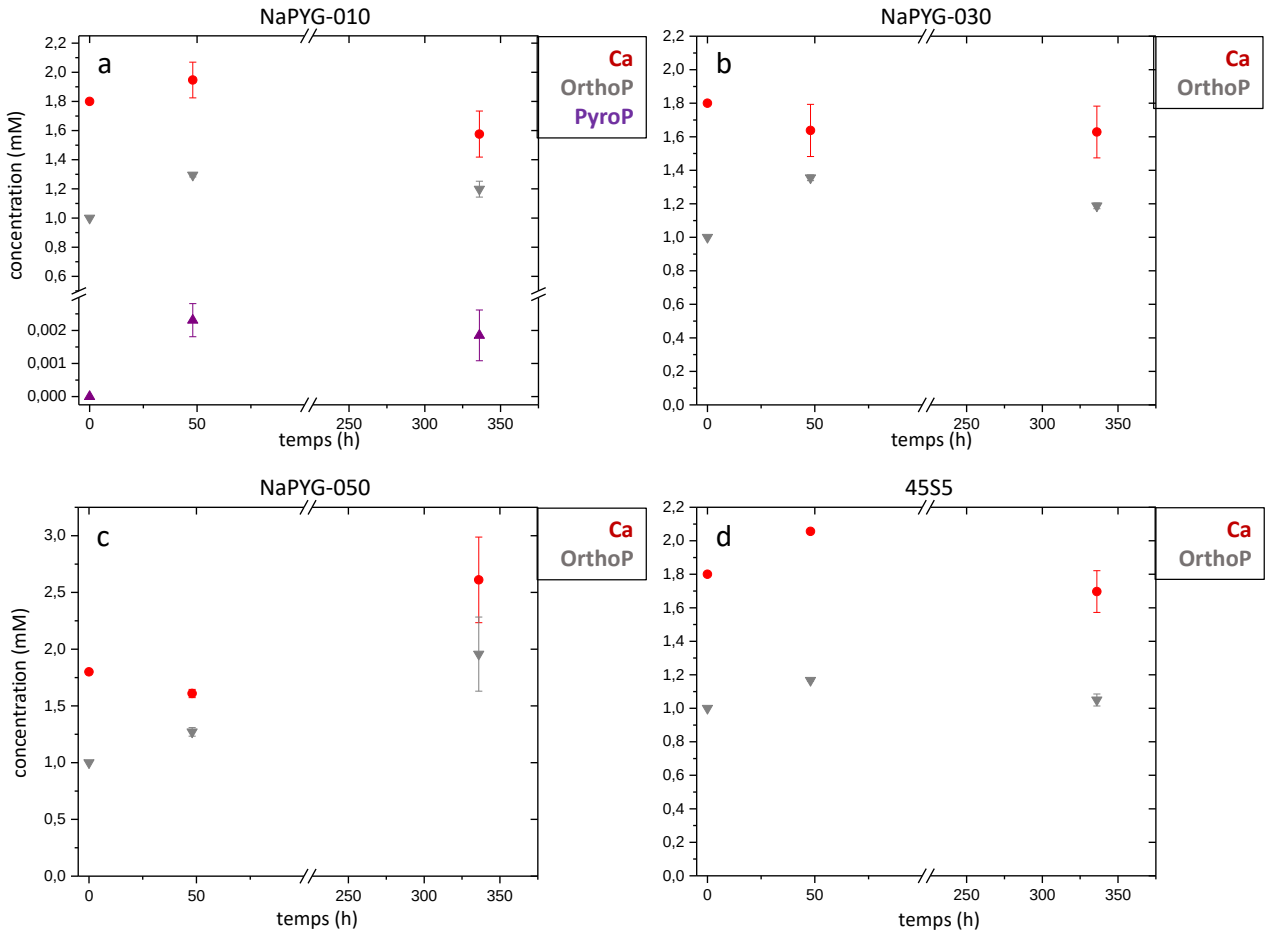


Figure III.32 : Concentration des ions calcium, orthophosphate et pyrophosphate en solution en fonction de la durée d'immersion des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b), NaPYG-050 (c) et 45S5 (d) dans le milieu α-MEM. La concentration de pyrophosphate dans les solutions après interaction avec NaPYG-030 et NaPYG-050 n'a pas pu être mesurée (en dessous de la limite de détection de la méthode de dosage, c'est-à-dire en dessous de 0,02 µM).

III.3.2.3 Discussion

Lors des évolutions en milieu de culture α-MEM sans cellules la perte de masse des matériaux est beaucoup plus élevée que lors des évolutions dans le SBF sauf pour NaPYG-030 et 45S5, pourtant la libération d'ions est moins élevée. La perte de masse mesurée pour NaPYG-010 est attribuée à une perte lors de la séparation du matériau du milieu et/ou du séchage de celui-ci ; c'est probablement un artefact expérimental. De plus la structure, le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates et la morphologie des matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 n'ont pas évolué.

Pour le matériau NaPYG-050, la diminution du pH a été attribuée à une précipitation d'apatite, dont la présence est confirmée par analyse DRX. Les cristaux d'apatite formés ont une taille inférieure aux cristaux formés dans le SBF. Comme pour NaPYG-050, le diagramme DRX

du 45S5 à 15 jours ne montre qu'une légère cristallisation du matériau. Les indices de sursaturation en solution ont été calculés avec MINTEQ et comme pour le SBF ce milieu est sursaturé vis-à-vis de l'apatite. La présence d'ions pyrophosphate a probablement empêché la formation d'apatite lors des évolutions du NaPYG-010 et la très faible libération d'ion calcium et phosphate lors des évolutions du NaPYG-030 n'a pas suffi pour en former.

En outre, la plus faible formation d'apatite pour NaPYG-050 et 45S5 que lors de leur évolution dans le SBF a aussi été décrite pour d'autres matériaux dans la littérature. Les changements observés dans les taux de libération d'ions pour le milieu de culture cellulaire étaient constamment plus lents et inférieurs à ceux du SBF, à l'exception des silicates. Ce résultat peut être associé à la plus faible teneur initiale en calcium dans le α-MEM que dans le SBF et aux composants organiques (ribonucléosides, vitamines et acides aminés) présents dans le milieu de culture cellulaire mais absents dans le SBF. En effet, ces derniers tout comme les protéines pourraient être attirés par les charges positives des ions calcium présents sur la surface des matériaux[150,151], et seraient adsorber à leur surface par des liaisons hydrogène[152]. Ces éléments organiques, une fois adsorbées pourraient alors limiter la dégradation du matériau en formant une couche barrière entre le milieu aqueux et le matériau lui-même. Cette barrière, cependant, est perméable, permettant la diffusion des espèces ioniques et de l'eau, bien que cette dernière soit ralentie, retardant la survenue des phénomènes précédemment décrits[129].

III.4. Conclusion sur les études d'évolution des matériaux NaPYG-0X0 dans différents milieux aqueux

Les matériaux NaPYG-0X0 ont montré une évolution physico-chimique différente lors des évolutions en milieux aqueux. Pour rappel, les compositions des trois matériaux NaPYG-0X0 étudiées sont différentes allant d'une faible quantité d'orthophosphate (NaPYG-010) à une forte quantité (NaPYG-050) en passant par une composition intermédiaire (NaPYG-030). Le matériau NaPYG-050 a formé de l'apatite dans chaque milieu d'évolution sauf à pH acide extrême. Cette cristallisation, comme pour le 45S5 serait due à la libération de calcium et d'orthophosphate en solution. Une fois le milieu sursaturé, ces éléments précipitent ensuite pour former de l'apatite nanocristalline, qui semblerait se présente sous la forme d'un revêtement sur la surface du matériau. De plus, les matériaux NaPYG-010 et -030 ont montré une grande stabilité lors des évolutions probablement due à leur proportion de pyrophosphate plus élevée que pour le matériau NaPYG-050. Cependant le matériau NaPYG-010 a montré des changements structuraux plus rapides que NaPYG-030, ce qui impliquerait que ce n'est pas la proportion de pyrophosphate qui rend le matériau stable mais plutôt la coexistence d'ortho et pyrophosphates dans le matériau. Plus le rapport ortho/pyro est proche de 1, plus le matériau amorphe mixte ortho et pyrophosphate de calcium hydraté est stable.

Ensuite, l'hypothèse émise par L. Mayen, énonçant que les matériaux NaPYG-0X0 seraient composés de clusters liés entre eux par des ions sodium et par de l'eau inter-cluster est un peu plus justifiée par les résultats d'évolution décrits dans ce chapitre. En effet, lors des évolutions à pH 2 (partie III.2.3), les analyses DRX et de spectroscopie Raman ont confirmé que la structure des compostions NaPYG-010 et -050 récupérés étaient complètement cristalline et nous n'observons plus la morphologie du matériau initial, seulement des cristaux sous forme de plaquettes ou d'aiguilles sur les micrographies MEB. Ces résultats couplés aux dosages chimiques, attestant que 100% de leur quantité de sodium était libérée en solution démontrerait que le sodium est situé en périphérie et que son rôle est prépondérant dans la structuration des clusters qui composent les matériaux amorphes. Au contraire, le sodium n'a pas été libéré en totalité lors des évolutions du matériau NaPYG-030 à pH 2 et la structure amorphe était encore présente après 15 jours, ce qui renforce l'hypothèse que le sodium est l'élément principal qui maintient la structure amorphe en associant les clusters entre eux. Une fois le sodium libéré, les clusters composés de phosphate et de calcium ne seraient liés que grâce à l'eau inter-cluster qui ne suffirait plus à maintenir la structure du matériau. Ainsi, les clusters se dissocieraient en libérant le reste des ions en solution. Lors des évolutions à pH 2, l'acidité du milieu a favorisé la

cristallisation en pyrophosphate de calcium hydraté plutôt qu'en apatite. Le schéma III.33 résume les évolutions des matériaux NaPYG-0X0 étudiées dans ce chapitre.

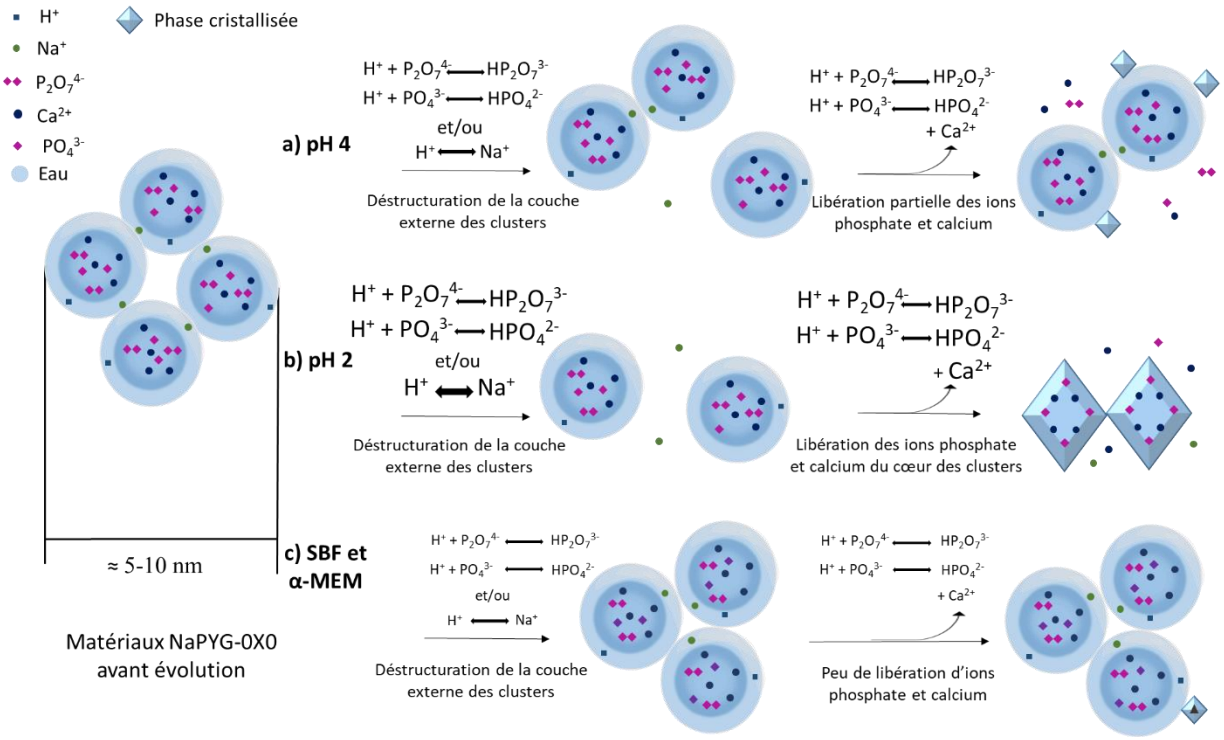


Figure III.33 : Représentation schématique de l'évolution des matériaux NaPYG-0X0 dans l'eau acidifiée à pH 4 (a), à pH 2 (b) et en milieux ioniques tamponnés (c).

a) à pH 4, la structure des matériaux reste amorphe mais la formation de phases cristallines en surface est possible due à la libération des ions phosphate et calcium.

b) à pH 2, la forte libération des ions sodium induit la dissociation des clusters et ainsi la libération du phosphate et du calcium en solution. L'acidité du milieu ainsi que la présence d'ions pyrophosphate en solution favorisent la cristallisation en phase pyrophosphate de calcium hydratée, tout en inhibant la cristallisation en apatite.

c) dans les solutions ioniques tamponnées, la structure des matériaux reste amorphe mais la formation d'apatite en surface est possible si la libération d'ions pyrophosphate $\leq 10^{-4}$ mM.

Suite aux évolutions *in vitro* en milieux aqueux acellulaires, qui ont montré que les matériaux NaPYG-0X0 n'évoluaient pas de la même façon selon leur composition initiale et le type de milieu, il est nécessaire d'étudier le comportement de ces matériaux dans des milieux plus complexes, au contact de cellules ou d'enzymes participant à la minéralisation osseuse. Ces prochaines études permettront d'évaluer si les matériaux NaPYG-0X0 sont cytotoxiques ou non, et s'ils ne le sont pas, de les implanter *in vivo* dans un modèle animal.

Chapitre IV : ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES MATÉRIAUX NaPYG-0X0

En parallèle des études d'évolution physico-chimiques, l'étude des propriétés biologiques des matériaux NaPYG-0X0 a été réalisée en collaboration avec les laboratoires Bioingénierie Tissulaire (BioTis) à Bordeaux et Biologie, Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaires (B3OA) à Paris, partenaires du projet ANR PyVerres (2017-2021). Les études biologiques couplées aux résultats d'évolution physico-chimique *in vitro* (Chapitre IV) sont essentielles pour mieux appréhender le comportement du biomatériau vis à vis de son environnement et du tissu hôte pendant et après l'implantation.

Dans un premier temps, le pyrophosphate étant connu pour être hydrolysé par des enzymes présentes dans la membrane cellulaire des ostéoblastes (phosphatases alcalines)[153], une étude d'évolution des matériaux NaPYG-0X0 en présence d'enzymes de type phosphatase alcaline (PAL) a été réalisée dans un milieu tampon. Même si on ne connait que peu de choses sur la fonction physiologique de ces enzymes[154], la phosphatase alcaline osseuse localisée dans la membrane plasmique des ostéoblastes jouerait un rôle dans la minéralisation en augmentant la concentration locale en orthophosphate par hydrolyse du pyrophosphate extracellulaire. Des connaissances plus approfondies sur son mécanisme d'action permettraient d'adapter la composition des biomatériaux de substitution osseuse. Malheureusement, il n'existe que peu d'exemples d'études portant sur l'évolution *in vitro* de biomatériaux en présence d'enzymes de type PAL[56,119,120,155]. Lors d'une étude d'incubation de cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté triclinique (t-CPPD, $Ca_2P_2O_7.2H_2O$) dans un tampon TRIS.HCl en présence de PAL, Shinozaki et al.[119] ont explicité que l'enzyme se liait aux pyrophosphates présents au sein des cristaux t-CPPD, reconnus comme substrats des PAL, selon un principe de stéréosélectivité.

Ainsi, les PAL se fixeraient préférentiellement aux pyrophosphates en surface des cristaux, puis la dissolution du matériau se produirait localement là où les enzymes se sont fixées. Dans une autre étude, Grover et al.[56], ont exposé du pyrophosphate de calcium amorphe ($Ca_2P_2O_7.4H_2O$) à des PAL et ont démontré que les enzymes favorisaient le clivage du pyrophosphate qui se trouvait alors libéré en solution sous forme d'ions orthophosphate. Pour déterminer si ce processus était médié par la surface ou non, des cristaux de pyrophosphate de calcium dihydratés ont été immergés dans un tube à dialyse, empêchant l'accès de l'ALP à la surface des cristaux[56]. Une accélération notable de la dissolution du matériau a été observée par rapport au témoin, suggérant que ce processus n'était pas contrôlé par la fixation de l'enzyme à la surface du solide, contrairement à ce que Shinozaki avait avancé.

L'étude de l'évolution des matériaux NaPYG-0X0 en présence d'enzymes proposera une méthode pour comprendre le comportement des enzymes vis à vis de ces matériaux composés d'ortho et de pyrophosphates.

Dans un second temps, la biocompatibilité des trois compositions de matériaux NaPYG-0X0 sélectionnées et présentées dans les chapitres précédents, a été étudiée par l'analyse de la cytotoxicité, de l'activité métabolique et du transcriptome par laboratoire Biotis à Bordeaux. Enfin, deux séries d'implantation *in vivo* chez le rat, dont une est encore en cours, ont été menées par le laboratoire B3OA à Paris, avec les deux compositions de NaPYG-0X0 sélectionnées comme étant les plus prometteuses suite aux tests cellulaires *in vitro*.

Cette approche pluridisciplinaire a permis de réaliser une première étude complète des matériaux NaPYG-0X0, primordiale pour évaluer le potentiel de développement de ce nouveau biomatériau.

IV.1. Etude de l'évolution physico-chimique *in vitro* des matériaux NaPYG-0X0 après contact avec des cellules ou des enzymes

IV.1.1. Evolution de biomatériaux en présence d'enzymes

Les études physico-chimiques *in vitro* de l'évolution de biomatériaux en milieux aqueux cellulaires ou non sont nombreuses dans la littérature, mais rares sont les études qui se focalisent sur l'effet des enzymes sur le matériau. Pourtant elles jouent un rôle fondamental dans la minéralisation osseuse. En effet la phosphatase alcaline est connue pour hydrolyser les ions pyrophosphate en ions orthophosphate et ainsi participent à la minéralisation du tissu osseux[156]. La concentration en phosphatase alcaline (PAL) dans les flux sanguins varie en fonction de l'âge, du sexe ou du groupe sanguin et peut fortement augmenter lorsque les tissus osseux sont fortement stimulés, lors de la croissance osseuse par exemple. Son taux normal mesuré dans le sang provenant de toutes les sources tissulaires se situe entre 20 et 140 $U.L^{-1}$ [121]. Les concentrations d'enzymes sont mesurées en unité enzymatique (symbole U), représentant la quantité d'enzymes nécessaire pour traiter une micromole de substrat en une minute dans des conditions opératoires. Comme son nom peut le suggérer, la phosphatase alcaline fonctionne de manière optimale à pH basique entre 8 et 10. Cette partie présente l'étude menée sur l'évolution des matériaux NaPYG-0X0 en présence de phosphatases alcalines dans une solution de tampon TRIS (tris(hydroxyméthyl)aminométhanediol), comparée à celle du matériau commercial Glassbone® (Noraker), bioverre de type 45S5, qui nous servira de matériau amorphe bioactif de référence pour cette étude.

IV.1.1.1 Protocole de l'étude de l'évolution

Le ratio masse de matériau/volume de solution utilisé et la technique de broyage des matériaux sont les mêmes que lors de l'étude des évolutions physico-chimiques présentée dans le chapitre IV.

Des enzymes commerciales de la muqueuse intestinale bovine (Sigma-Aldrich P6774) ont été ajoutées dans une solution de tampon TRIS à 0,5 M tamponnée à pH 8,1 avec de l'acide chlorhydrique (NormaPur 20252.290). La concentration en phosphatase alcaline (PAL) choisie pour cette étude est de 1660 $U.L^{-1}$: elle a été augmentée par rapport à la concentration dans les fluides biologiques afin d'observer l'effet des enzymes sur les matériaux étudiés lors de courts temps d'évolution. Dans une première étude, 75 mg de matériau ont été immergés pendant 6 jours

dans 50 mL de la solution de tampon TRIS avec enzymes ALP à 37°C sous agitation magnétique (120 rpm). Leur évolution a été comparée à une étude témoin où les matériaux NaPYG-0X0 et le 45S5 sont immergés dans une solution TRIS à 0,5 M sans enzyme. Dans la seconde partie de cette étude, le matériau contenant le plus de pyrophosphate a été immergé dans cette même solution contenant des enzymes et dans 2 mL d'un milieu de type α-MEM avec des cellules mésenchymateuses pendant 2 et 7 heures, 1 et 2 jours pour étudier son évolution en fonction du temps et comparer les études d'évolution *in vitro* en présence de PAL et en présence de cellules.

Pour ces deux études, les matériaux sont ensuite séparés du milieu puis caractérisés par les mêmes techniques que celles décrites dans le chapitre IV.

IV.1.1.2 Comparaison des évolutions des matériaux NaPYG-0X0 en présence ou non d'enzymes

IV.1.1.2.1 Caractérisation des matériaux

Suite à leur séparation du milieu, les matériaux ont été pesés et la figure IV.1 présente la masse restante après évolution dans le milieu TRIS en présence d'enzymes comparé à celle des matériaux témoins qui ont évolué en milieu TRIS en l'absence d'enzyme.

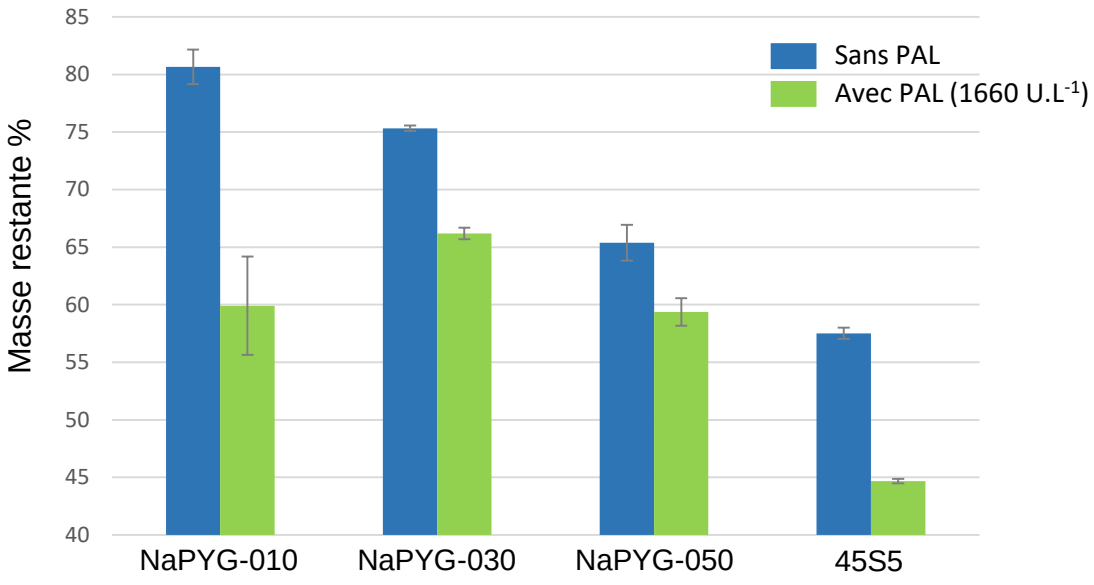


Figure IV.1 : Masse de matériau NaPYG-0X0 restante après 6 jours d'évolution dans la solution TRIS en présence (en vert) ou non (en bleu) de phosphatase alcaline. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique par rapport à la masse de départ.

La perte de masse observée lors des évolutions des matériaux NaPYG-0X0 sans phosphatase alcaline varie entre 20 et 35%. Il a aussi été observé que plus le matériau contient initialement de pyrophosphate, moins la perte de masse du matériau est élevée. De plus, la perte de masse du matériau 45S5 est de 43%, elle est plus élevée que celle des matériaux NaPYG-0X0 comme observé lors des évolutions dans la solution SBF (entre 0 et 10% pour les matériaux NaPYG-0X0 et 30% pour le matériau 45S5, cf. chapitre IV.3.a). On peut remarquer que lors des évolutions en présence d'enzymes la perte de masse est plus élevée pour toutes les compositions de matériaux NaPYG-0X0 étudiées, et varie entre 35 et 45%. Pour les matériaux NaPYG-0X0, il est observé que plus le matériau initial contient de pyrophosphate, plus la différence de perte de masse du matériau en présence ou non d'enzymes est grande. Ces premiers résultats mettent en exergue la corrélation entre la proportion initiale de pyrophosphate dans les matériaux NaPYG-0X0 et leur aptitude à être dégradés par la PAL. Plus surprenant, le matériau 45S5 formé principalement d'un réseau vitreux de silice et ne comportant que peu de phosphate[157] se dégrade plus (environ 45% de matériau restant) en présence qu'en absence de phosphatase alcaline (57% de matériau restant). Ce résultat pourrait être dû à la similitude des centres actifs de l'enzyme silicase et de la PAL, toutes deux composées de deux zinc[158], et permettrait ainsi d'expliquer le fait que la PAL puisse avoir également une action sur le 45S5 à base de silice.

IV.1.1.2.1.1. Diffraction des rayons X

La figure IV.2 présente les diagrammes de diffraction des RX des matériaux NaPYG-010 (Fig.IV.2a), -030 (Fig.IV.2b) et -050 (Fig.IV.2c) et du 45S5 (Fig.IV.2d) lors des évolutions dans le milieu tampon TRIS en présence ou non d'enzymes. En raison d'une panne du diffractomètre Bruker - D8 Advance, ces analyses de diffraction des RX ont été réalisées à l'aide d'un diffractomètre INEL EQUINOX équipé d'une anticathode au cobalt et d'un compteur courbe qui limite la résolution du diagramme RX.

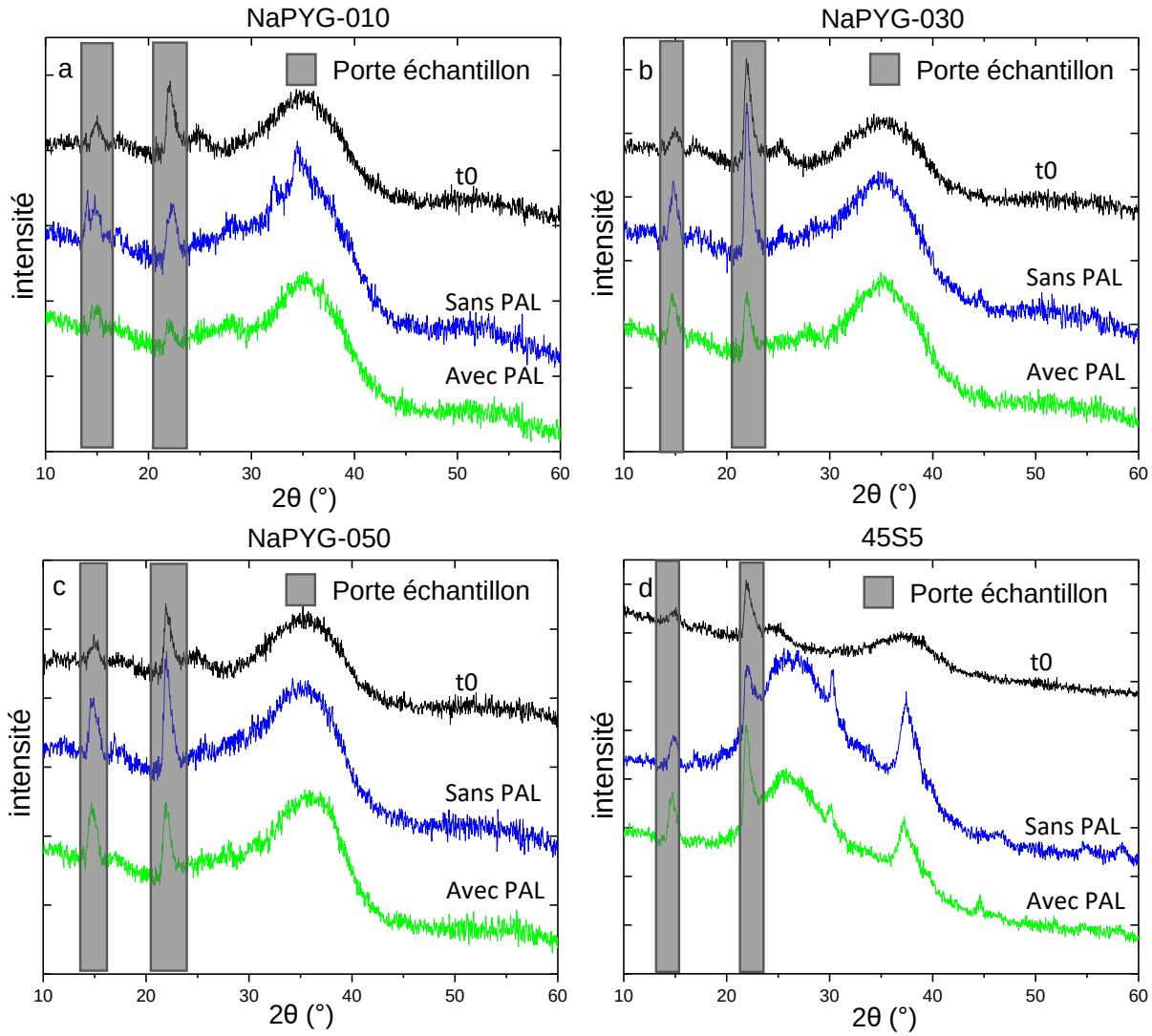


Figure IV.2 Diagrammes DRX ($\lambda_{K\alpha1}$ = 1,789 Å) des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b), NaPYG-050 (c) et 45S5 (d) après 6 jours d'évolution dans le milieu tampon TRIS en présence (en vert) ou non (en bleu) d'enzymes.

Les pics de diffraction à 14° et 22° présents sur tous les diagrammes de diffraction des RX sont attribués à l'aluminium constituant le porte échantillons. Les diagrammes de diffraction des RX des matériaux NaPYG-030 et NaPYG-050 (Fig. 2b et 2c) ne montrent pas de différence notable après évolution des matériaux dans la solution de tampon TRIS avec et sans enzymes : le halo large entre 30° et 40° est toujours présent et aucun pic de diffraction supplémentaire n'apparait. Pour le matériau NaPYG-010, deux pics de diffraction à 32° et 34° peu intenses et mal résolus sont observables après évolution dans la solution de tampon TRIS sans enzyme alors que le matériau reste amorphe lorsque des enzymes sont présentes dans ce milieu. Ces pics de diffraction pourraient correspondre à ceux de la phase cristalline de pyrophosphate de calcium dihydratée m-CPPD ($Ca_2P_2O_7.2H_2O$). Enfin, lors des évolutions du 45S5 dans le tampon TRIS,

de larges pics de diffraction à 30° et 37° apparaissent après 6 jours d'évolution en présence ou non d'enzymes et sont attribués aux plans (002) et (211) de l'apatite.

IV.1.1.2.1.2. Spectroscopie Raman

La caractérisation par spectroscopie Raman présentée sur la figure IV.3, a permis d'identifier les bandes de vibration d'intérêt et de déterminer le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates à partir du rapport des bandes caractéristiques des ions orthophosphate et pyrophosphate (Tableau IV.1).

Les spectres des matériaux NaPYG-0X0 qui ont évolué dans le milieu tampon TRIS en présence ou non d'enzymes ne montrent pas l'apparition de nouvelles bandes de vibration. Il a également été observé que lors des évolutions de NaPYG-050 en présence d'enzymes, la bande correspondant aux groupements orthophosphate à 960 cm^{-1} s'affine et se décale vers les nombres d'onde plus élevés, ce qui pourrait être dû à une cristallisation du matériau, qui n'a cependant pas été révélé par DRX. Pour le matériau 45S5, après 6 jours d'immersion dans le milieu tampon TRIS avec ou sans enzymes, la bande de vibration entre 800 et 1150 cm^{-1} attribuée aux élongations des liaisons Si-O-Si dans les tétraèdres de silice est modifiée et devient moins intense, alors que la bande de vibration de $\nu^{1s}PO_4$ à 960 cm^{-1} devient plus intense. En outre, la bande correspondant aux groupements carbonate située à 1070 cm^{-1} apparait, que le matériau ait évolué en présence ou non d'enzymes, mais elle est plus intense lorsque le 45S5 évolue en présence de PAL. Nous pouvons aussi remarquer que la bande de vibration $\nu^{1s}PO_4$ s'affine et se déplace vers les nombres d'onde plus élevés, ce qui devrait être dû à la formation d'une phase cristalline apatitique mise en évidence par analyse DRX. De plus, le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates dans les matériaux n'évolue pas de la même façon lorsque des enzymes sont présentes dans le milieu. En effet, pour les trois compositions de matériaux NaPYG-0X0 étudiées le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates a diminué après 6 jours dans le tampon TRIS sans PAL alors qu'il a augmenté lorsque les matériaux ont été exposés aux PAL.

En présence d'enzymes, l'hydrolyse des ions pyrophosphate serait catalysée, entraînant la formation d'orthophosphate ce qui augmenterait le rapport ortho / (ortho + pyro), alors que sans enzyme, les ions pyrophosphate seraient moins hydrolysés et les ions orthophosphate seraient libérés en solution plus facilement surement dû à leur charge plus faible diminuant les interactions avec le réseau ionique et à leur plus petite taille augmentant leur diffusivité.

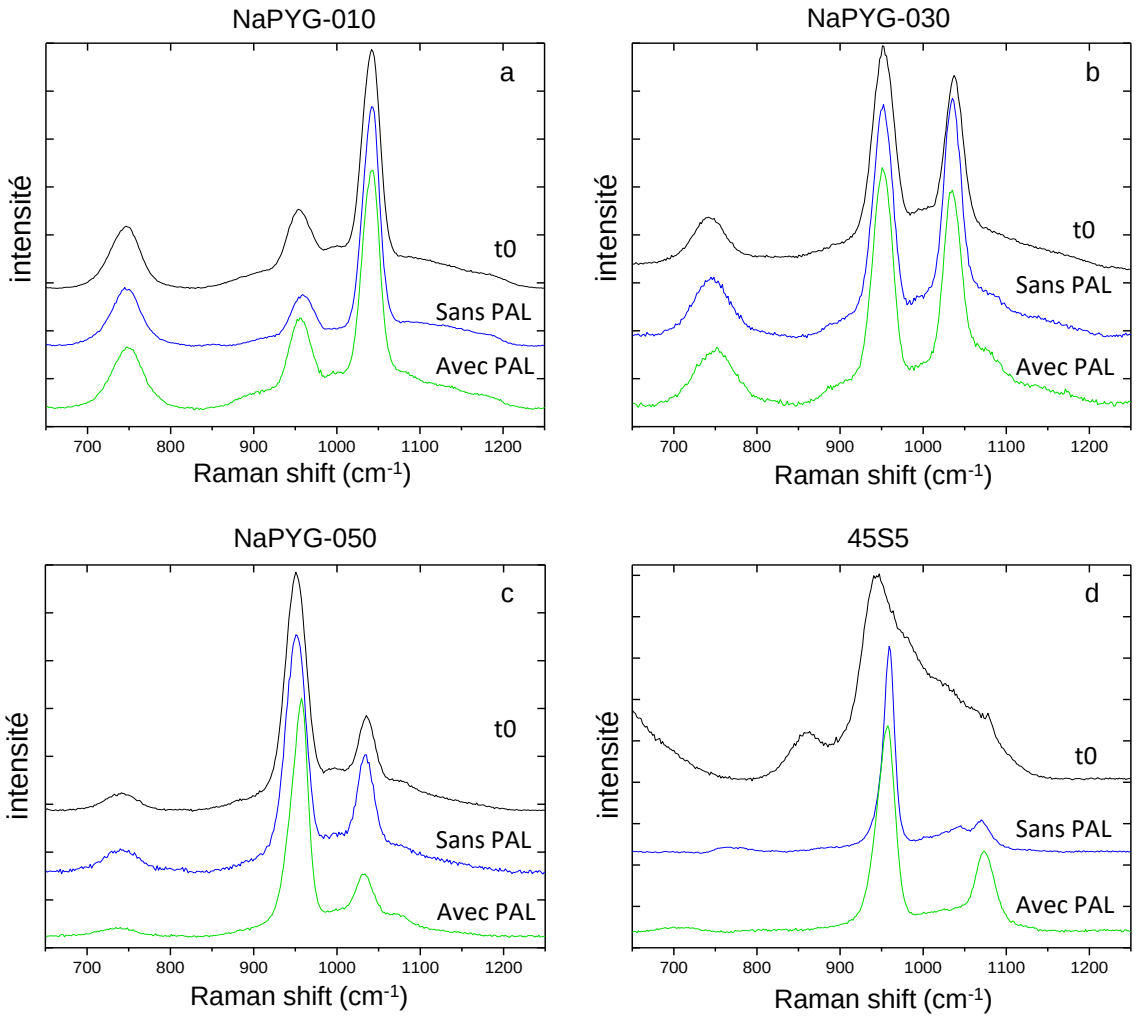


Figure IV.3 : Spectres Raman des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b), NaPYG-050 (c) et 45S5 (d) après 6 jours d'évolution dans le milieu tampon TRIS en présence (en vert) ou non (en bleu) d'enzymes.

Tableau IV.1 : Evolution du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates des matériaux NaPYG-0X0 après 6 jours d'immersion dans le tampon TRIS avec et sans enzymes, par décomposition des bandes phosphates Raman.

Rapport ortho/(ortho + pyro) phosphates	t = 0	TRIS avec enzymes t = 6 jours	TRIS sans enzyme t= 6 jours
NaPYG-010	0,29 (± 0,01)	0,31 (± 0,01)	0,24 (± 0,01)
NaPYG-030	0,53 (± 0,01)	0,55 (± 0,01)	0,51 (± 0,01)
NaPYG-050	0,74 (± 0,01)	0,83 (± 0,01)	0,68 (± 0,01)

IV.1.1.2.1.3. Observations microscopiques

Les micrographies de la figure IV.4 ne montrent aucune différence morphologique significative après évolution en présence ou non d'enzymes pour les compositions NaPYG-030 (Fig. IV.4c et 4d) et NaPYG-050 (Fig. IV.4e et 4f). Pour le matériau NaPYG-010, ayant évolué dans le TRIS sans enzyme, nous pouvons observer des cristaux sous forme d'aiguilles de longueur variant entre 5 et 25 µm et de largeur entre 1 à 3 µm sur la surface fissurée du matériau amorphe (Fig. IV.4a). Cette morphologie aciculaire des cristaux semble correspondre à celle de la phase de pyrophosphate de calcium dihydraté monoclinique (mCPPD) ce qui conforterait l'hypothèse de la présence d'une faible proportion de cette phase au vu des pics de diffraction peu intenses et larges observés par DRX[71]. Quelques fissures sur la surface du matériau amorphe sont seulement observées après évolution du NaPYG-010 en présence d'enzymes. Enfin, nous pouvons voir que la surface du bioverre 45S5 a été modifiée que ce soit en présence ou en l'absence d'enzymes (Fig. 4g et 4h). Il s'est formé une couche de particules sphériques recouvrant la surface lisse du verre initial. Cette couche est constituée de micro-agglomérats de diamètre plus ou moins grand allant de 1 à 10 µm, typique de précipités d'apatite formés lors d'évolution du 45S5 en milieu tampon[116,159] et déjà observés lors des évolutions dans la solution SBF (chap.IV.3.a).

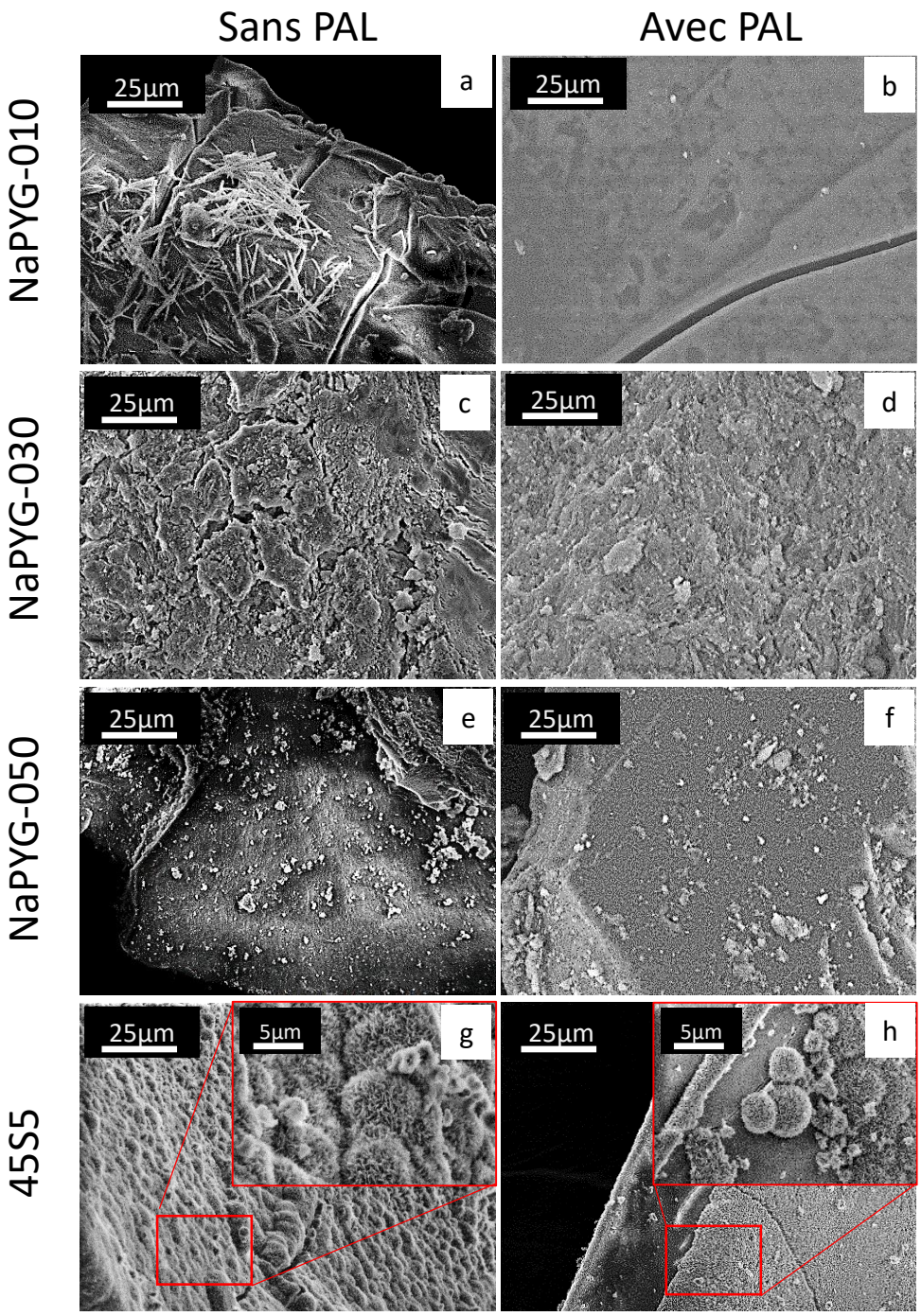


Figure IV.4 : Micrographies MEB des matériaux NaPYG-010 (a et b), NaPYG-030 (c et d), NaPYG-050 (e et f) et 45S5 (g et h) après 6 jours d'évolution dans un milieu TRIS en présence ou non d'enzymes (PAL).

IV.1.1.2.2 Caractérisation des milieux

IV.1.1.2.2.1. Evolution du pH

Dans chaque milieu le pH a été mesuré juste après avoir été filtré après le temps d'évolution choisi. Il est dans tous les cas resté stable (pH = 8,1) probablement en raison de la concentration élevée en tampon TRIS (0,5 M).

IV.1.1.2.2.2. Dosages chimiques

Les dosages du sodium, du calcium, du phosphore total et du pyrophosphate ont été réalisés dans tous les milieux TRIS après 6 jours d'évolution avec et sans enzymes (Figure IV.5). La concentration en ions pyrophosphate mesurée dans les solutions en présence d'enzymes était inférieure à la limite de détection de la méthode de dosage, c'est-à-dire en dessous de 0,02 µM et n'apparait donc pas sur les diagrammes de la figure IV.5. La concentration en pyrophosphate en solution à la suite de l'évolution sans enzyme est reportée dans le tableau IV.2.

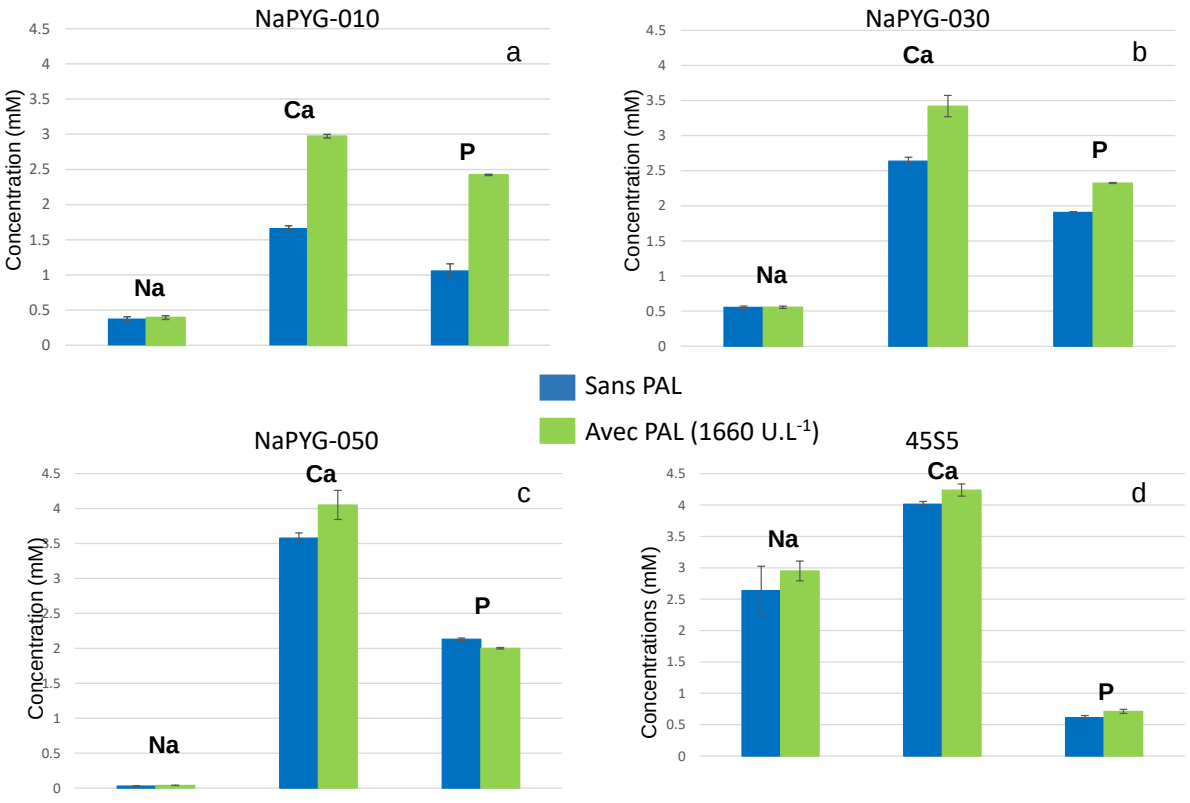


Figure IV.5 : Concentration des ions calcium, sodium et orthophosphate en solution après 6 jours d'immersion des matériaux NaPYG-010 (a), NaPYG-030 (b) et NaPYG-050 (c) et 45S5 (d) dans le tampon TRIS avec (en vert) et sans enzymes PAL (en bleu).

Tableau IV.2 : Concentration en ions pyrophosphate en solution à l'issue de l'évolution dans le milieu tampon TRIS sans enzyme.

Matériaux ayant évolué dans le milieu TRIS sans enzyme	NaPYG-010	NaPYG-030	NaPYG-050
Concentration en ions pyrophosphate (µM)	0,27 (± 0,06)	0.16 (± 0,02)	0,13 (± 0,07)

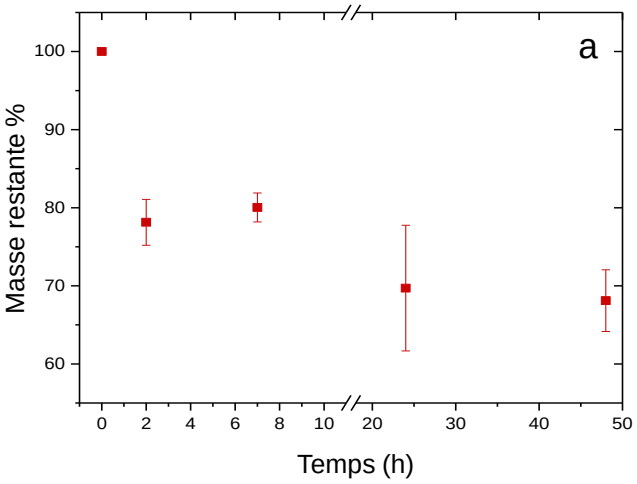
Après 6 jours d'évolution dans un milieu TRIS, la quantité d'ions calcium et orthophosphate libérée en solution est plus élevée lorsque les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 sont immergés en présence d'enzymes (environ 2,4 mM d'ions orthophosphate libérés pour les 2 compositions, 3 et 3,4 mM d'ions calcium relargués pour NaPYG-010 et NaPYG-030 respectivement), alors que pour le matériau NaPYG-050, c'est seulement la quantité de calcium libérée qui est plus élevée (4 mM avec enzymes contre 3,6 mM sans enzyme). De plus, pour toutes les compositions de matériaux NaPYG-0X0 étudiées, la quantité d'ions sodium libérée est équivalente lors des évolutions avec et sans enzymes : elle est de 0,39, 0,55 et 0,04 mM respectivement pour NaPYG-010, -030 et -050. Nous pouvons observer que la quantité totale d'ions libérés est plus élevée lorsque les matériaux évoluent en présence de PAL et que la différence de quantité d'ions libérés à l'issue de l'évolution avec et sans enzyme est plus élevée lorsque le matériau contient une proportion plus élevée d'ions pyrophosphate. Ces résultats sont en accord avec les différences de perte de masse mesurées avec et sans enzymes en fonction de la composition initiale des matériaux NaPYG-0X0 (Fig. IV.1). Il apparait ainsi une corrélation entre la quantité d'ions pyrophosphate présente initialement dans le matériau et l'activité hydrolytique des enzymes PAL et donc sa contribution dans la dégradation (perte de masse) des matériaux amorphes mixtes ortho et pyrophosphates de calcium (NaPYG-0X0). Pour le matériau 45S5, cependant, la quantité d'ions calcium, sodium et phosphate libérée est la même après évolution avec et sans enzyme (environ 2,7, 4 et 0,6 mM respectivement pour Na^+, Ca^{2+} et PO_4^{3-}) alors que nous avons vu que la perte de masse est plus élevée lorsque le matériau évolue en présence d'enzymes (environ 10 mg de différence) (Fig. IV.1). Cette différence est surement due à la quantité d'ions silicate qui n'a pas pu être mesurée lors de cette étude et qui devrait surement être plus grande quand le 45S5 évolue en présence d'enzymes PAL, ce qui impliquerait que les enzymes catalyseraient également l'hydrolyse des ponts Si-O-Si qui composent principalement le réseau au sein du matériau 45S5.

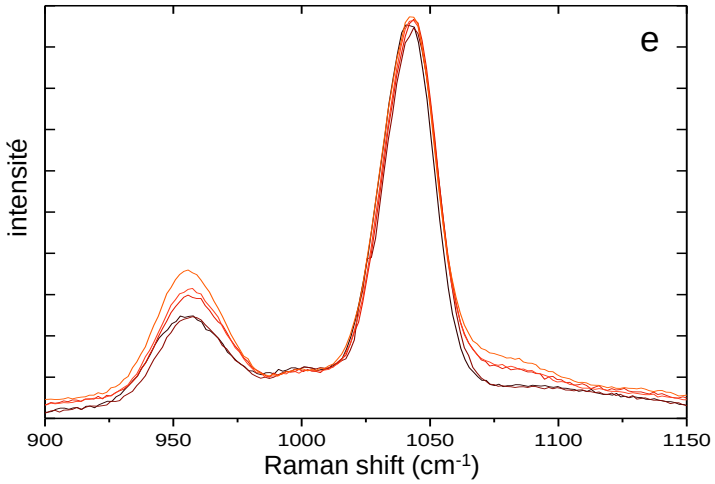
IV.1.1.3 Evolution du matériau NaPYG-010 en milieu tampon TRIS en présence d'enzymes en fonction du temps

Les résultats de l'étude d'évolution des matériaux en présence et absence d'enzymes présentés dans la partie précédente, ont montré que plus le matériau initial contient d'ions pyrophosphate, plus l'effet de la présence d'enzymes est marqué. Nous avons donc cherché à étudier plus finement l'évolution du matériau comprenant le plus de pyrophosphate (NaPYG-010) en fonction du temps avec les enzymes PAL, notamment afin de voir l'effet des enzymes sur des durées d'activité plus courtes. Pour éviter que les plus petits grains ne soient dissous trop vite sans intervention de l'enzyme, nous avons également décidé de contrôler la taille des grains par tamisage. Le matériau NaPYG-010 a donc été broyé et tamisé afin d'obtenir des tailles de particules entre 300 et 500 µm, puis il a été immergé dans les mêmes conditions que l'étude précédente, dans un milieu tampon TRIS en présence de PAL pendant différents temps d'évolution (2 heures, 7 heures, 1 et 2 jours), puis caractérisé par DRX, spectroscopies Raman et MEB et le calcium, le sodium et l'orthophosphate ont été dosés dans les solutions.

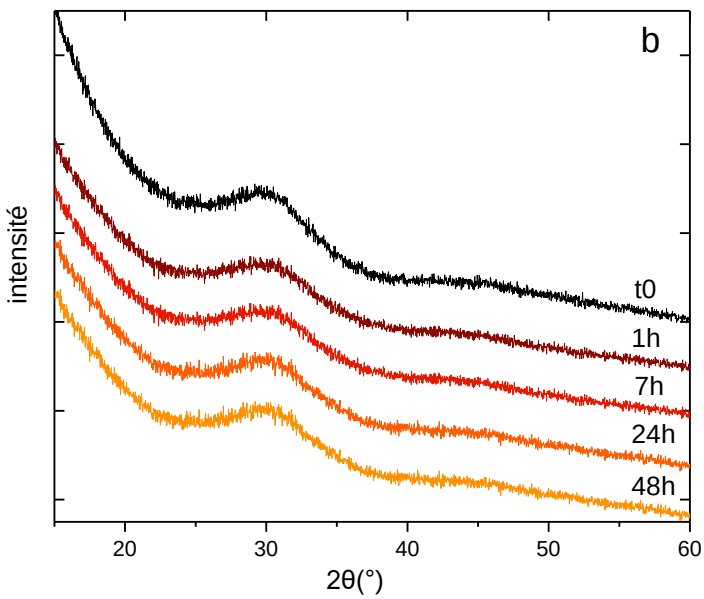
IV.1.1.3.1 Caractérisation des matériaux

La figure IV.6 présente les pertes de masse, ainsi que les caractérisations du matériau NaPYG-010 après différentes durées d'immersion dans le milieu tampon TRIS (2 heures, 7 heures, 1 et 2 jours) en présence d'enzymes. Nous pouvons observer que la perte de masse se produit principalement dès les deux premières heures d'évolution (22 %), puis elle continue d'augmenter jusqu'à 32% à 48 heures (Fig.IV.6a). Les diagrammes de diffraction des RX (Fig.IV.6b) montrent que le matériau reste amorphe, que sa morphologie n'est pas modifiée significativement mais que, comme déjà observé sur la Figure IV.4b pour une exposition du matériau durant 6 jours, des fissures de différentes tailles sont observées sur les micrographies à 7 et 48 heures d'évolution (Fig.IV.6c et IV.6d), formées probablement lors du séchage des échantillons. Les fines aiguilles qui apparaissent en surface pour des durées d'immersion de 6 jours (Figure IV.4a) sans enzyme ne sont toujours pas visibles pour des temps allant jusqu'à 2 jours dans un milieu avec des PAL. A partir des spectres Raman normalisés (Fig.IV.6e), nous montrons que l'intensité de la bande de vibration attribuée aux ions orthophosphate à 960 cm^{-1} augmente avec le temps d'immersion, se traduisant par une légère augmentation du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates au sein du matériau NaPYG-010 au cours du temps, ce qui suggère une évolution du matériau exposé aux enzymes dans ces conditions. L'augmentation de l'intensité des bandes à 1080 cm^{-1} est difficile à considérer à cause du grand nombre de bandes de vibration pouvant être attribuées à cette position.





Temps (h)	Ratio ortho/(ortho + pyro (± 0,01)	Intensité normalisée de la bande ortho à 960 cm^{-1}
0	0.29	0,25
1	0,29	0,25
7	0.30	0,30
24	0.30	0,31
48	0.31	0,36



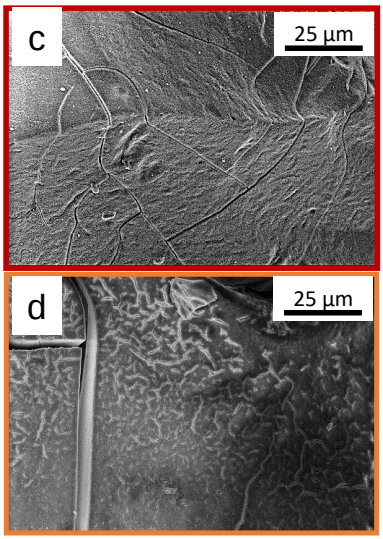


Figure IV.6 : Perte de masse (a), diagramme de diffraction des RX (b), micrographies MEB (c et d) et spectre Raman avec tableau du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates et intensité normalisée de la bande orthophosphate à 960 cm^{-1} (e) du matériau NaPYG-010 au cours des 2 premiers jours évolution en présence d'enzymes.

IV.1.1.3.2 Caractérisation des milieux

Le calcium, l'orthophosphate et le sodium des solutions dans lesquelles le matériau a évolué ont ensuite été dosés et le pH a été mesuré après chaque temps d'évolution. Celui-ci est resté stable à 8,1 tout au long de l'étude. L'évolution des quantités d'ions libérées en solution est présentée sur la figure IV.7.

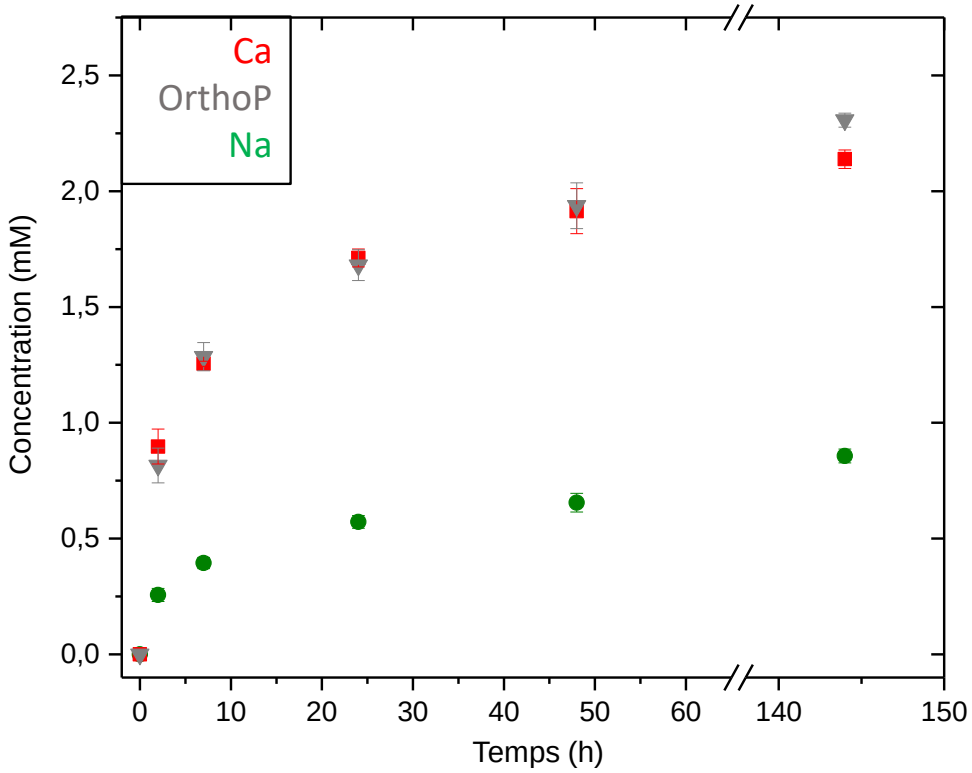


Figure IV.7 : Evolution des concentrations des ions calcium, sodium et orthophosphate en solution en fonction du temps d'immersion du matériau NaPYG-010 dans une solution tampon TRIS en présence d'enzymes.

La quantité d'ions libérés augmente au cours du temps, et cette augmentation est plus élevée au cours des deux premières heures (0,9, 0,8 et 0,3 mM respectivement pour les ions calcium, orthophosphate et sodium), ce qui explique l'évolution des pertes de masse observées précédemment. Les quantités d'ions calcium et phosphate libérées au cours du temps sont équivalentes et représentent 20% de la quantité totale de calcium et phosphate dans le matériau initial à 2 jours d'évolution. La quantité de sodium est inférieure aux deux autres éléments dosés (0,7 mM à 2 jours d'évolution) mais représente 45% de la quantité totale de sodium dans le matériau initial. L'évolution des concentrations ioniques en solution ne semblent pas montrer un début de dégradation rapide, lié à une forte libération du sodium dès la première heure comme lors des évolutions dans l'eau à pH 4 et 2. La comparaison de ces résultats pourrait renforcer

l'hypothèse d'une dégradation des matériaux favorisée en milieu acide par l'hydrolyse du pyrophosphate au sein du matériau.

IV.1.1.4 Discussion sur l'effet de l'enzyme sur les matériaux amorphes

Pour toutes les compositions de matériaux NaPYG-0X0 étudiées ainsi que pour le bioverre 45S5, nous pouvons remarquer que les matériaux se dégradent plus lorsqu'ils évoluent en présence d'enzymes. Ces pertes de masse sont corrélées aux relargages ioniques, toujours plus élevés lorsque les matériaux sont immergés avec des enzymes ; à noter toutefois que pour le bioverre 45S5, le dosage du silicium n'a pas pu être réalisé. Lors de l'évolution en milieu TRIS avec enzymes, le matériau NaPYG-010 se dégrade beaucoup plus vite que sans enzyme. Au bout de 10 heures d'immersion en présence d'enzymes les quantités d'ions calcium et phosphate libérées sont équivalentes à 6 jours d'évolution sans PAL.

De plus, la présence d'ions pyrophosphate a été mesurée lors des évolutions sans enzyme alors qu'avec enzymes ils étaient non détectables en solution. Il a aussi été observé que la composition de matériau contenant le plus de pyrophosphate, NaPYG-010, conduisait à la formation de quelques cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté monoclinique (mCPPD) en surface lorsqu'il était immergé dans une solution TRIS sans enzyme. La formation de ces cristaux est probablement due à la recristallisation des ions calcium et pyrophosphate libérés lors de l'évolution du matériau NaPYG-010. La phase mCPPD est une phase qui a été peu étudiée car son obtention sous forme d'une phase pure n'était pas reproductible[73], jusqu'aux travaux de thèse de P. Gras[71] qui a synthétisé cette phase par double décomposition à haute température (90°C) et à pH modérément acide (5.8). Cependant les cristaux ne sont pas présents lors des évolutions du NaPYG-010 en présence d'enzymes, ce qui peut être lié soit à l'inhibition de la cristallisation des phases pyrophosphate de calcium par les ions orthophosphate présents en plus grande quantité en solution, soit à l'hydrolyse par les enzymes des ions pyrophosphate libérés en solution qui n'ont pas le temps de recristalliser avec les ions calcium, comme avancé par Grover et al.[56].

Nous avons aussi observé que le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates des matériaux NaPYG-0X0 a évolué inversement selon qu'ils ont été immergés dans un milieu tampon TRIS avec ou sans enzymes et que ce rapport augmente au cours du temps lors de l'évolution du matériau NaPYG-010. En effet, ils étaient composés de moins de pyrophosphate après 6 jours d'évolution en présence de PAL comparé à leur évolution sans enzyme. L'activité des enzymes PAL l'hydrolyse des pyrophosphates en phase solide, puisque la quantité de pyrophosphate « diminue » au sein du matériau, ce qui est aussi le cas pour le 45S5. En outre, lors des évolutions en présence d'enzymes, la quantité d'ions orthophosphate en solution (2,4 mM pour NaPYG-010

à 6 jours) est largement supérieure à la quantité totale d'ions phosphate (ortho + pyro) en solution sans PAL (1,1 mM pour NaPYG-010 à 6 jours). Dans les conditions de notre étude, nous montrons que les enzymes PAL sont capables d'interagir avec le matériau et favorisent sa dégradation en hydrolysant les liaisons P-O-P dans les matériaux NaPYG-0X0 (et vraisemblablement les liaisons Si-O-Si dans le bioverre 45S5). La capacité de ces enzymes à se lier à la surface d'un matériau selon un principe stéréosélectif, a été suggéré par Shinozaki et al.[119], qui ont montré que les enzymes PAL se liaient aux faces d'un cristal de pyrophosphate de calcium dihydraté (CPPD) ayant la plus haute énergie de surface, initiant la dégradation du matériau.

Suite aux calculs des sursaturations à l'aide des logiciels MINTEQ et PHREEQC, il apparait que tous les milieux TRIS récupérés après immersion des matériaux NaPYG-0X0 sont sursaturés vis-à-vis de l'hydroxyapatite après 6 jours d'évolution en présence ou non d'enzymes, ce qui explique la formation d'apatite à la surface du 45S5. L'absence de formation d'apatite sur les autres matériaux (NaPYG-0X0), peut se justifier par la concentration en ions pyrophosphate en solution supérieure à 0,1 µM lors des évolutions des matériaux NaPYG-0X0 sans enzyme, ce qui inhibe la formation d'apatite[54,153]. Cependant, l'apatite ne se forme pas alors que cette concentration est inférieure à 0,02 µM lors des évolutions avec enzymes. La concentration en pyrophosphate en solution a surement dû diminuer entre la filtration du matériau et la mesure de celle-ci. En effet, les enzymes ne sont surement pas toutes liées au matériau et certaines ont dû rester en solution après la filtration, et ont donc continué à hydrolyser les ions pyrophosphate libérés en solution.

La figure IV.8 présente schématiquement la dégradation du matériau par les enzymes phosphatases alcalines en suivant les hypothèses de Grover et al.[56] et de Shinozaki et al.[119].

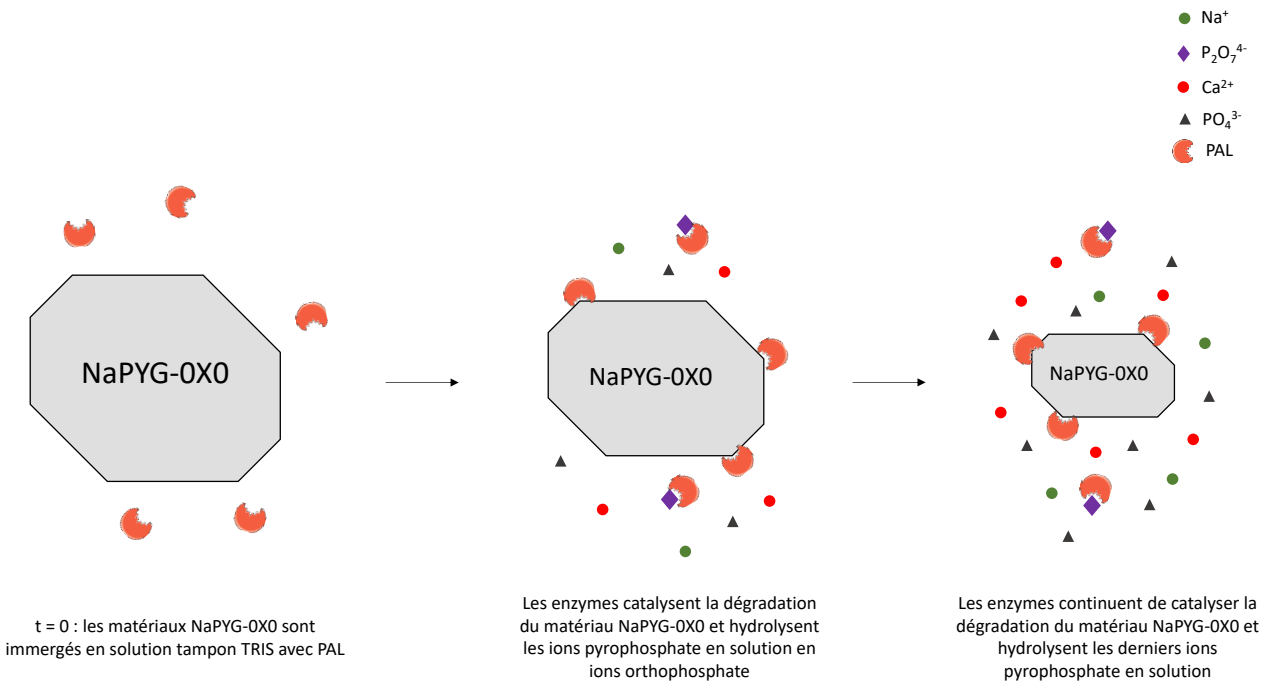


Figure IV.8 : Représentation schématique de l'action d'enzymes de type phosphatase alcaline en présence des matériaux NaPYG-0X0 dans un milieu tampon TRIS à 0,5 M en combinant les mécanismes de Grover et al. (action de la PAL en solution) et de Shinozaki et al. (action de la PAL en surface du matériau).

Nous avons montré au cours de cette étude que la présence d'enzymes de type phosphatase alcaline induit la dégradation à la surface ou au sein des matériaux NaPYG-0X0 et la libération d'ions en solution. Les deux réactions enzymatiques schématisées sur la figure IV.8 peuvent se dérouler simultanément à partir du moment où le matériau NaPYG-0X0 est immergé en milieu tampon TRIS en présence de PAL.

Les résultats obtenus lors des évolutions en présence d'enzymes sont intéressants, mais il faut les prendre avec du recul puisque la concentration en PAL utilisée est environ 200 fois plus élevée que les concentrations classiquement rencontrées dans les fluides biologiques. Afin d'étudier la dégradation des matériaux NaPYG-0X0 dans un environnement plus représentatif des conditions *in vivo*, il a été proposé d'analyser leur comportement en milieu de culture α-MEM au contact de cellules mésenchymateuses.

IV.1.2. Caractérisations des matériaux NaPYG-010 après contact avec des cellules mésenchymateuses

La phosphatase alcaline est présente *in vivo* dans la membrane plasmique de cellules mésenchymateuses, qui se différencieront par la suite en ostéoblastes. Afin de situer les résultats

obtenus lors des évolutions des matériaux NaPYG-010 en présence d'enzymes PAL par rapport à des conditions se rapprochant plus des conditions physiologiques, les matériaux NaPYG-010 ont été mis en contact avec des cellules mésenchymateuses placées dans un milieu de culture de type α-MEM pendant différents temps puis caractérisés. Cette étude permettra dans un premier temps d'analyser si la composition NaPYG-010 est toxique envers les cellules mésenchymateuses, puis dans un second temps de comparer le comportement physico-chimique de ce matériau dans deux milieux aqueux différents (α-MEM et tampon TRIS) et au contact de ces cellules *in vitro*, ou d'enzymes.

IV.1.2.1 Protocole

Afin de pouvoir comparer l'évolution du matériau NaPYG-010 en présence de cellules avec celles en présence d'enzymes déjà réalisées en fonction du temps, 50 mg de matériau ont été placé durant 2 heures, 7 heures, 1 jour et 2 jours au contact de cellules mésenchymateuses dans 2 mL d'une solution α-MEM additionnée de 10 % de sérum de veau fœtal. Les poudres de NaPYG-010 ont été broyées et tamisées afin d'obtenir des poudres de même granulométrie que précédemment (300 - 500 µm).

C'est ainsi que les poudres tamisées ont été mises en contact de cellules stromales mésenchymateuses humaines (HBMSCs) dans des puits recouverts de gélatine pour éviter l'adhésion des cellules à la plaque de culture. En effet, les cellules préfèrent être en contact avec le plastique des boites de culture plutôt qu'avec les poudres. Un test préliminaire de viabilité par un kit viabilité live/dead Assay a donc été réalisé pour s'assurer de la présence des cellules et leur viabilité sur les matériaux (Figure IV.9) lorsque le fond du puit était couvert de gélatine d'agarose. On peut observer que les cellules vivantes (fluorescence verte) forment des clusters entre les grains et sont bien en contact des particules.

A la suite des différents temps d'évolution les poudres ont été transférées dans des tubes à hémolyse afin d'éclater les cellules avec du tampon de lyse associé au β-mercaptoéthanol. Les matériaux ont ensuite été rincés à l'eau puis à l'éthanol avant d'être séchés à l'étuve à 37°C.

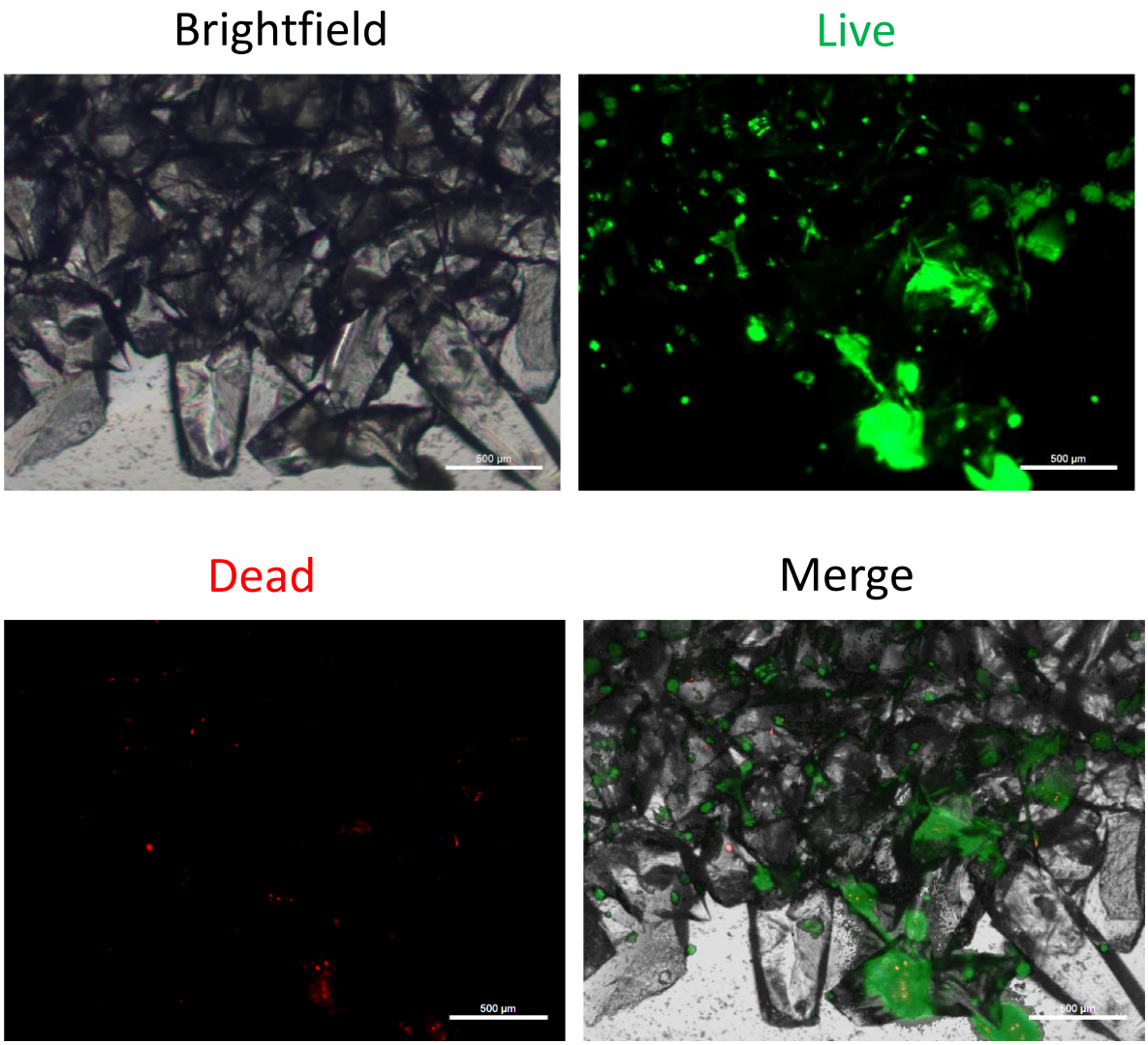
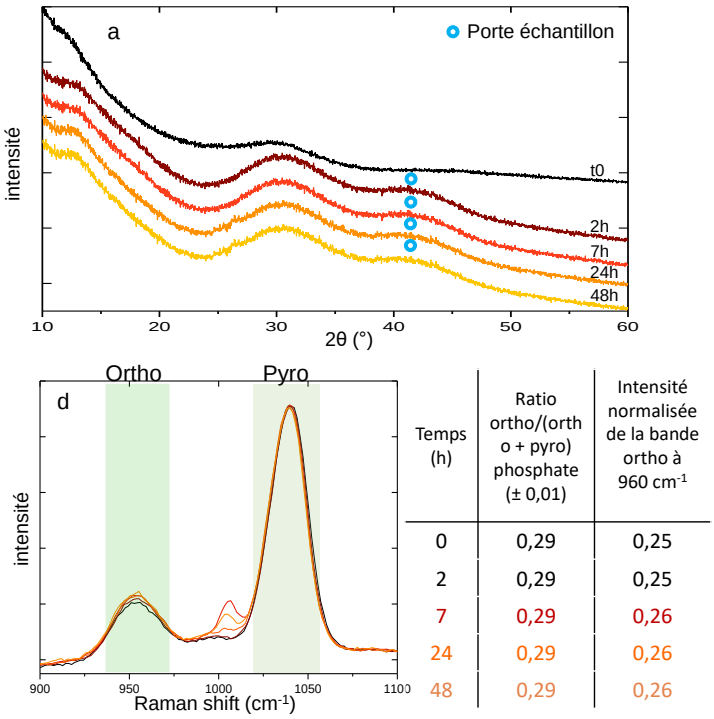


Figure IV.9 : Micrographie par microscopie à fluorescence des particules NaPYG-010 lors du test live/dead. Les cellules vivantes sont représentées par la fluorescence verte et les cellules mortes fluorescent en rouge.

IV.1.2.2 Résultats

La figure IV.10 présente les caractérisations par DRX, spectroscopie Raman et MEB des matériaux NaPYG-010 après avoir été au contact des cellules pendant différentes durées. La perte de masse n'a pas pu être mesurée car un pourcentage conséquent de particules est resté coincé dans la gélatine ; la mesure de la perte de masse était donc fortement biaisée. Nous pouvons observer sur les diagrammes de diffraction des RX que le large halo entre 25 et 35° est toujours présent et qu'un deuxième est apparu entre 37 et 45° en raison de la faible quantité de poudre analysée qui laisse apparaitre les raies de diffraction correspondant au porte échantillons en PMMA (Fig.IV.10a). Quelques fissures sont visibles sur les micrographies MEB à 7 heures

(Fig.IV.10b) et des particules d'environ 50 µm sans morphologie particulière pouvant être des débris de matériaux ou des résidus organiques sont présentes à la surface du matériau amorphe à 24 heures d'évolution (Fig.IV.10c). Sur les spectres Raman (Fig.IV.10d), les bandes attribuées aux ortho et pyrophosphate sont toujours positionnées respectivement à 960 et 1040 cm^{-1} et une nouvelle bande de vibration est apparue à 1008 cm^{-1} dont l'attribution s'avère compliquée en raison du grand nombre de composants dans le α-MEM ; elle pourrait tout de même être attribuée aux groupements sulfates (sel de sulfate de calcium ou magnésium présent dans la composition de α-MEM). De plus, l'examen du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates calculé à partir des aires des bandes Raman caractéristiques ainsi que l'intensité normalisée de la bande orthophosphate à 960 cm^{-1} montre qu'ils n'ont pas significativement évolué.



Temps (h)	Ratio ortho/(ortho + pyro) phosphate (± 0,01)	Intensité normalisée de la bande ortho à 960 cm^{-1}
0	0,29	0,25
2	0,29	0,25
7	0,29	0,26
24	0,29	0,26
48	0,29	0,26

Figure IV.10 : Caractérisation DRX (a), micrographie MEB à 7h (b) et 24 h (c), spectres Raman avec tableau du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates et l'intensité normalisée de la bande orthophosphate à 960 cm^{-1} (d) du matériau NaPYG-010 après immersion dans une solution α-MEM au contact des cellules stromales mésenchymateuses humaines (HBMSCs).

Les caractérisations réalisées sur le matériau NaPYG-010 lors des évolutions au contact des cellules ont été comparées aux résultats des évolutions du même matériau aux mêmes temps mais en présence d'enzymes en milieu TRIS. La structure du matériau est restée amorphe et il présentait des fissures à sa surface dans les deux cas. Cependant, la spectroscopie Raman a montré que pour les matériaux ayant évolué en présence d'enzymes (1660 $U.L^{-1}$) le rapport ortho / (ortho

+ pyro) phosphates mais surtout l'intensité de bande orthophosphate normalisée à 960 cm^{-1} augmentent dès les premières heures d'évolution (Figure IV.6) alors qu'ils n'ont pas évolué lorsque les poudres sont en présence de cellules (Figure IV.10d). On remarque également sur cette dernière figure que la bande normalisée à 1049 cm^{-1} caractéristique des groupements pyrophosphate augmente visiblement au cours du temps de contact avec les cellules HBMSC. Ce comportement peut s'expliquer par la concentration de phosphatase alcaline dans le milieu TRIS avec enzymes qui est 200 fois supérieure à celles dans les fluides biologiques, ainsi qu'au pH des solutions : il est optimal pour l'activité des PAL (8,1) lors de l'évolution dans le tampon TRIS avec enzymes alors que le pH est de 7,4 lorsque le matériau est testé en présence de cellules. Les cellules mésenchymateuses au contact des matériaux n'ont pas dû exprimer autant de PAL et l'activité de ces enzymes a été réduite due à la neutralité du pH en milieu biologique. Il est aussi notable que le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates est resté inchangé comme lors des 2 premiers jours de l'évolution dans le α-MEM (chap.III.3.b). Les cellules n'ont donc pas eu une contribution significative sur l'évolution physico-chimique du matériau jusqu'à 2 jours. Cependant, il aurait fallu doser le milieu α-MEM en présence de cellules pour conclure, ce qui n'a pas pu être réalisé, même si le rapport solide/solution est très différent des autres tests d'évolution.

IV.2. Etudes cellulaires *in vitro*

Les phosphates de calcium sont connus pour être non toxiques vis à vis des cellules osseuses, puisque leurs constituants sont impliqués naturellement dans le métabolisme *in vivo*. Cependant la cytotoxicité et la cytocompatibilité des matériaux NaPYG-0X0 n'ont jamais été examinées. Les objectifs de ces études cellulaires sont dans un premier temps, de démontrer la non toxicité des matériaux NaPYG-0X0 sur des cellules mésenchymateuses humaines, puis d'étudier la différenciation ostéoblastique de ces cellules au contact des matériaux NaPYG-0X0 en mesurant l'expression de gènes spécifiques à cette différenciation comme RunX2, l'ostéocalcine, la phosphatase alcaline et l'ostéopontine

IV.2.1. Etude de la cytotoxicité et de l'activité métabolique

L'étude de cytotoxicité et de l'activité métabolique des matériaux NaPYG-0X0 sur des cellules mésenchymateuses a été réalisée indirectement à partir d'extrait de matériau selon la norme ISO-10993, c'est-à-dire que les cellules sont ajoutées au milieu de culture dans lequel les matériaux sous forme de pastille ont été immergés pendant 24 heures. La viabilité des cellules en contact avec les produits de dissolution des biomatériaux a ensuite été analysée par mesure photométrique des processus métaboliques cellulaires et comparée à la viabilité de cellules en contact avec le plastique de la boîte de culture qui servira de matériau témoin non cytotoxique. Ces tests ont été réalisés sur 5 pastilles de chaque composition de matériaux NaPYG-0X0 afin de prouver la répétabilité des résultats.

IV.2.1.1 Matériels et méthodes

IV.2.1.1.1 Mise en forme des pastilles de NaPYG-0X0

Les analyses de la cytotoxicité et de l'activité métabolique ont été réalisées sur les trois compositions NaPYG-0X0 étudiées lors des chapitres précédents, sous forme de pastilles de diamètre 8,35 mm et de hauteur 1,5 mm qui serviront aussi pour réaliser en parallèle des tests qPCR afin d'extraire de l'ARN en vue d'une étude plus approfondie d'expression des gènes. En effet, 0,5 µg d'ARN doit être extrait des cellules pour étudier la différenciation cellulaire par RTqPCR. Seule la composition NaPYG-030 a permis d'extraire suffisamment d'ARN pour poursuivre les caractérisations. En effet, pour les tests cellulaires il est plus simple d'utiliser des matériaux sous forme de pastilles à surface plane plutôt que des matériaux sous forme de granulés.

Les pastilles ont été mises en forme en compressant 150 mg de granulés de NaPYG-0X0 broyés grossièrement au mortier et pilon dans un moule cylindrique en acier inox puis compressés à l'aide d'une presse mécanique à 7045 N comme schématisé en annexe IV.1. Les pastilles ont ensuite été stérilisées par rayon gamma à une dose de 25 kGy par l'entreprise IONISOS et enfin envoyées au laboratoire BioTis qui a réalisé les études de cytotoxicité et d'activité métabolique (collaboration avec Joelle Amédée et Robin Siadous).

IV.2.1.1.2 Protocole des tests de la cytotoxicité et de l'activité métabolique

Une étude indirecte de cytotoxicité et d'activité métabolique ont été réalisées sur 5 pastilles stériles de chaque composition NaPYG-010, -030 et -050 par le laboratoire Biotis. Les pastilles ont été placées dans 2 mL de milieu α-MEM pendant 24h, puis incubées dans une étuve à 37°C. Après 24 h d'immersion (E24h [1]), le milieu ou extrait est récupéré et remplacé par une même quantité de milieu α-MEM. Une deuxième (E24h [2]) et troisième (E24h [3]) extraction ont lieu toutes les 24 h en remplaçant à chaque fois le milieu. La dernière extraction a lieu 3 jours après le troisième extrait (E+J3). En parallèle, 100 000 cellules souches mésenchymateuses (HBMSCs) sont ensemencées dans un milieu α-MEM avec 10% de sérum de veau fœtal et incubées à 37°C pendant 24 h. Le milieu de culture est remplacé par les différents extraits de chaque échantillon NaPYG-0X0 (E24h [1], E24h [2], E24h [3] et E+J3) et un test témoin négatif (milieu de culture α-MEM dépourvu de matériau) est également incubé. Suite à l'élimination de l'extrait, les cellules sont rincées, puis un test de viabilité cellulaire au rouge neutre et un test d'activité métabolique MTT sont réalisés. Il est important que les cellules soient vivantes après contact avec les extraits des matériaux, mais il faut également que les cellules restent actives, c'est-à-dire qu'elles continuent d'exercer leur fonction. Le test au rouge neutre détecte les cellules vivantes via l'absorption du rouge neutre par les lysosomes alors que le test MTT forme un précipité violet dans les mitochondries, proportionnel à la quantité de cellules actives métaboliquement. Après 3 h d'incubation avec les colorants, les plaques sont lues au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 540 nm. Plus la coloration est intense, moins les extraits sont toxiques.

IV.2.1.2 Résultats

Les résultats des tests de cytotoxicité et d'activité métabolique des matériaux NaPYG-0X0 sont présentés sur la figure IV.11. Ils sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (plastique de la boîte de culture), c'est à dire les cellules n'ayant jamais été en contact avec les extraits des matériaux. Un matériau est considéré comme toxique lorsque le pourcentage de

viabilité cellulaire est inférieur à 75% (ISO-10993). En plus de la cytotoxicité mesurée par le test au rouge neutre, le test MTT a également été réalisé pour mesurer si les mitochondries des cellules vivantes présentaient une activité métabolique.

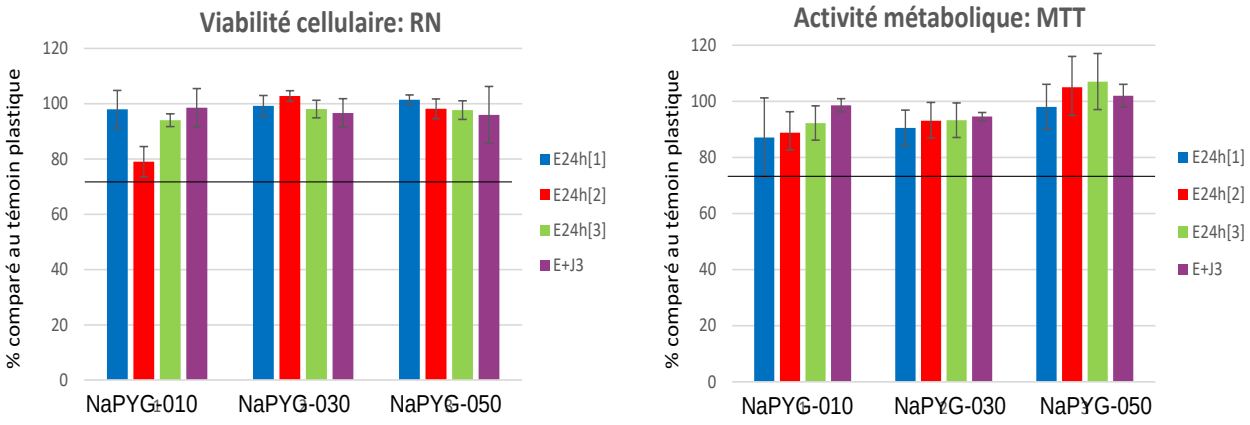


Figure IV.11 : Viabilité cellulaire et activité métabolique de cellules HBMSCs au contact des différents extraits des matériaux NaPYG-0X0, exprimées en pourcentage par rapport au témoin plastique

Les trois compositions de matériaux NaPYG-0X0 présentent toutes une viabilité cellulaire supérieure à 75% quel que soit l'extrait considéré (test au rouge neutre), ce qui est accord avec les tests de viabilité Live/dead réalisés précédemment (Fig.IV.9). De plus, les cellules présentent une bonne activité métabolique (test MTT) puisqu'elle est environ de 90 % pour les compositions NaPYG-010 et -030 et même supérieure à 100% pour le matériau NaPYG-050. Nous pouvons donc en conclure que les matériaux NaPYG-0X0 ne présentent pas de toxicité vis à vis de cellules mésenchymateuses humaines et que ces cellules sont normalement actives en présence des extraits de ces matériaux.

En parallèle, une étude directe de la cytotoxicité a été réalisée en ensemençant les pastilles de NaPYG-0X0 avec 10^5 cellules mésenchymateuses humaines afin d'extraire de l'ARN en vue d'une étude plus approfondie d'expression des gènes. Afin de poursuivre l'évaluation de la cytocompatibilité, une étude de l'expression génique de cellules ensemencées sur le NaPYG-030 par quantitative Reverse transcriptase polymerase chain reaction ou RTqPCR a été menée. L'étude de la cytocompatibilité est présentée dans la partie suivante.

IV.2.2. Etude de la cytocompatibilité

La différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes fonctionnels est une étape essentielle à l'ostéogénèse. Pour que les matériaux NaPYG-0X0 soient capables d'induire une formation osseuse, les cellules souches doivent donc pouvoir se différencier en ostéoblastes lorsqu'elles sont au contact de ces matériaux. Afin de déterminer le niveau de différenciation ostéoblastique, l'expression des gènes marqueurs de cette différenciation RunX2, le facteur de transcription initiant la différenciation, la phosphatase alcaline (PAL), marqueur de la formation osseuse précoce, l'ostéocalcine (OCN) et l'ostéopontine (OPN) qui sont des marqueurs tardifs qui apparaissent lorsque les cellules produisent la matrice avant minéralisation ont été mesurés. Le niveau d'expression des gènes est proportionnel à la quantité d'ARN messager (ARNm) qu'il a généré durant sa stimulation.

IV.2.2.1 Protocole

La quantification d'ARNm sur les matériaux de NaPYG-030 sous forme de pastille de 1 cm^2 stérilisés aux rayons gamma (25 kGy) se divise en quatre étapes :

- L'ensemencement des pastilles de NaPYG-030 par 10^5 hBMSCs suite à leur immersion pendant 24 h dans un milieu α-MEM avec 10% de sérum de veau fœtal. L'ensemencement a duré 3 et 14 jours à raison de 4 matériaux par temps et par marqueurs dans un incubateur à 37°C en changeant le milieu de culture tous les 2 jours.
- L'extraction des ARN totaux avec un kit d'extraction d'ARN sur colonne Quiagen (RNeasy Minikit), permettant de lyser les cellules hBMSCs et de séparer les ARN totaux de la majorité des protéines et de l'ADN.
- La synthèse d'un ADN complémentaire (ADNc) par rétro-transcription d'un ARNm en ADN afin d'obtenir une copie du gène codant.
- Puis cet ADNc est amplifié par RT-qPCR grâce à des amorces (courtes séquences d'ADN) spécifiques du gène d'intérêt.

L'expression d'un gène a été réalisé pour chaque temps d'ensemencement, sur 5 pastilles de NaPYG-030 afin de prouver la répétabilité de ces résultats. En parallèle, 15000 cellules hBMSCs par cm^2 ont été ensemencées dans des puits de 1 cm^2 d'une plaque de culture plastique pendant 3 jours et servira de témoin pour l'étude.

IV.2.2.2 Résultats

La figure IV.12 présente le niveau d'expression des gènes exprimé en quantité relative d'expression du gène par rapport à celle dans la condition témoin plafonnant à 1 sur tous les graphes. Les marqueurs ostéoblastiques RunX2 et l'ostéocalcine ont un niveau d'expression quasiment égal à celui du témoin à 3 et 14 jours. L'ostéopontine est plus exprimée de 10 à 20 fois dans les cellules cultivées sur les pastilles NaPYG-030 que sur le témoin plastique. Et enfin l'expression de la phosphatase alcaline a fortement diminué à 14 jours alors qu'elle est environ égale à celle du témoin à 3 jours. Il semble donc que le matériau NaPYG-030 n'inhibe pas l'expression du marqueur initiant la différenciation en ostéoblaste (RunX2) et d'un marqueur tardif de la minéralisation (OCN). L'autre marqueur tardif (OPN) est beaucoup plus exprimé sur la composition NaPYG-030 que sur le témoin, et pourrait montrer que le matériau favorise la différenciation ostéoblastique. Cependant, le matériau NaPYG-030 inhibe l'expression de la phosphatase alcaline à 14 jours. Cette inhibition pourrait s'expliquer par la libération des ions pyrophosphate trop importante par rapport aux PAL, ce qui satureraient l'activité de l'enzyme. De plus, lors de la minéralisation osseuse l'expression de la phosphatase alcaline diminue et celle de l'ostéopontine augmente comme lors de cette étude[160,161]. Les matériaux NaPYG-030 favoriseraient donc la différenciation ostéoblastique.

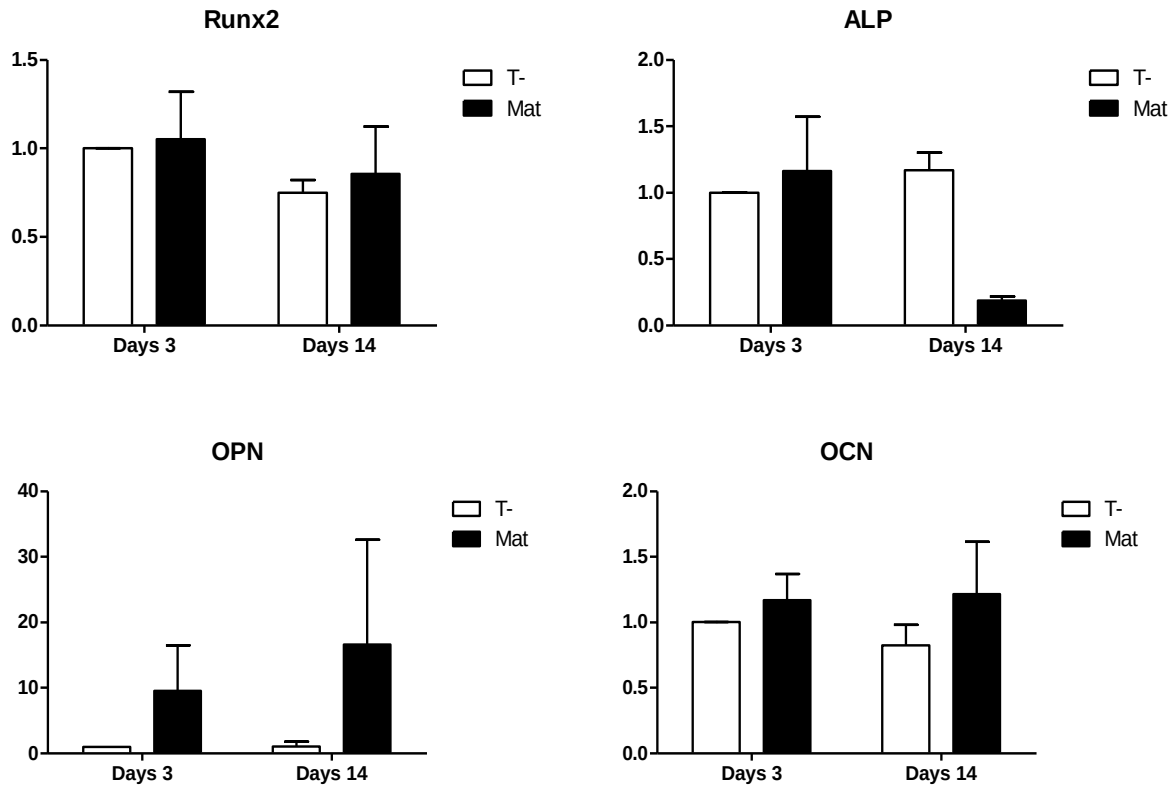


Figure IV.12 : Expression des gènes RunX2, la phosphatase alcaline, l'ostéopontine et l'ostéocalcine, marqueurs de la différenciation ostéoblastique des cellules hBMSCs en présence du matériau NaPYG-030 (Mat en noir) ou d'un échantillon témoin plastique (T en blanc), exprimée en quantité relative d'expression du gène par rapport à celle dans la condition témoin.

Les études *in vitro* cellulaires ont dans un premier temps montré la non toxicité de toutes les compositions de matériaux NaPYG-0X0 étudiées vis-à-vis des hBMSCs et les cellules présentent une forte activité métabolique, surtout pour la composition NaPYG-050. Ensuite, l'expression de gènes marqueurs de la différenciation ostéoblastique des cellules mésenchymateuses a été mesurée en présence du matériau NaPYG-030 et comparée à l'expression en présence d'un matériau témoin. Les gènes RunX2 et ostéocalcine ont été autant exprimés en présence du matériau NaPYG-030 qu'en présence du témoin. De plus, l'ostéopontine, marqueur tardif a été beaucoup plus exprimée en présence du matériau, prouvant que le matériau NaPYG-030 est capable d'induire une formation osseuse. Suite à ces premiers travaux, l'étude de la cytocompatibilité devra être menée sur les autres compositions de matériaux NaPYG-0X0 et surtout sur le matériau NaPYG-050, pour lequel les cellules ont exprimé une meilleure activité métabolique et qui forme de l'apatite nanocristalline lorsqu'il est immergé en milieu aqueux (Chap.III). Des tests d'implantation *in vivo* ont été réalisés sur le matériau NaPYG-030 pour approfondir l'étude de sa biocompatibilité.

IV.3. Implantations *in vivo*

Les implantations *in vivo* ont été menées par le laboratoire Biologie, Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaires (B3OA) à Paris (collaboration avec le Pr F. Anagnostou). Une première série d'essais d'implantation chez le petit animal a été réalisée avec le matériau NaPYG-030 préalablement stérilisé par rayonnement gamma (25 kGy), sous forme de granulés grossièrement broyés et de pastilles (Ø = 8,35 mm ; h = 1,5 mm) mises en forme de la même façon que lors des études *in vitro* cellulaires (chap.4.3.a.i) , implantés dans la *calvaria* (ou voûte crânienne) de rats Wistar mâles de 400 g, âgés de 12 semaines. Le matériau 45S5 fourni par NORAKER a aussi été implanté dans la *calvaria* du même lot de rats pour servir de matériau témoin à cette étude *in vivo*. Ensuite, sur la base des résultats des tests *in vitro* cellulaires, une deuxième série d'implantations toujours en cours, a été effectuée sur les matériaux NaPYG-030 et NaPYG-050 sous forme de granulés implantés dans la *calvaria* de rat. Les objectifs de ces études sont d'analyser comment les matériaux NaPYG-0X0 interagissent avec le tissu hôte et s'ils induisent l'ostéoconduction.

IV.3.1. Première série d'implantations

IV.3.1.1 Matériels et méthodes

Les rats ont subi une opération avec un trépan afin d'extraire de l'os de la *calvaria*, puis ce défaut osseux cylindrique de 8 mm de diamètre (défaut de taille critique) a été comblé par le matériau à tester. La pastille de NaPYG-030 a été placée sur et non dans le défaut critique (car son diamètre était supérieur au diamètre du défaut) de la *calvaria* d'un rat et environ 35 et 80 mg de poudres de NaPYG-030 (n = 9 rats) et 45S5 (n = 5 rats) respectivement, ont pu combler la totalité du défaut (figure IV.13). Une série de rats a été sacrifiée au bout de 7 jours afin d'étudier l'inflammation locale en mesurant le niveau d'expression de gènes impliqués lors des réactions du système immunitaire (facteur de nécrose tumorale, interleukine 6 et chimiokine XCL1). Une autre série a été sacrifiée à 28 jours pour caractériser le tissu formé par histologie et le devenir du matériau *in vivo* du point de vue physico-chimique (MEB et spectroscopie Raman).

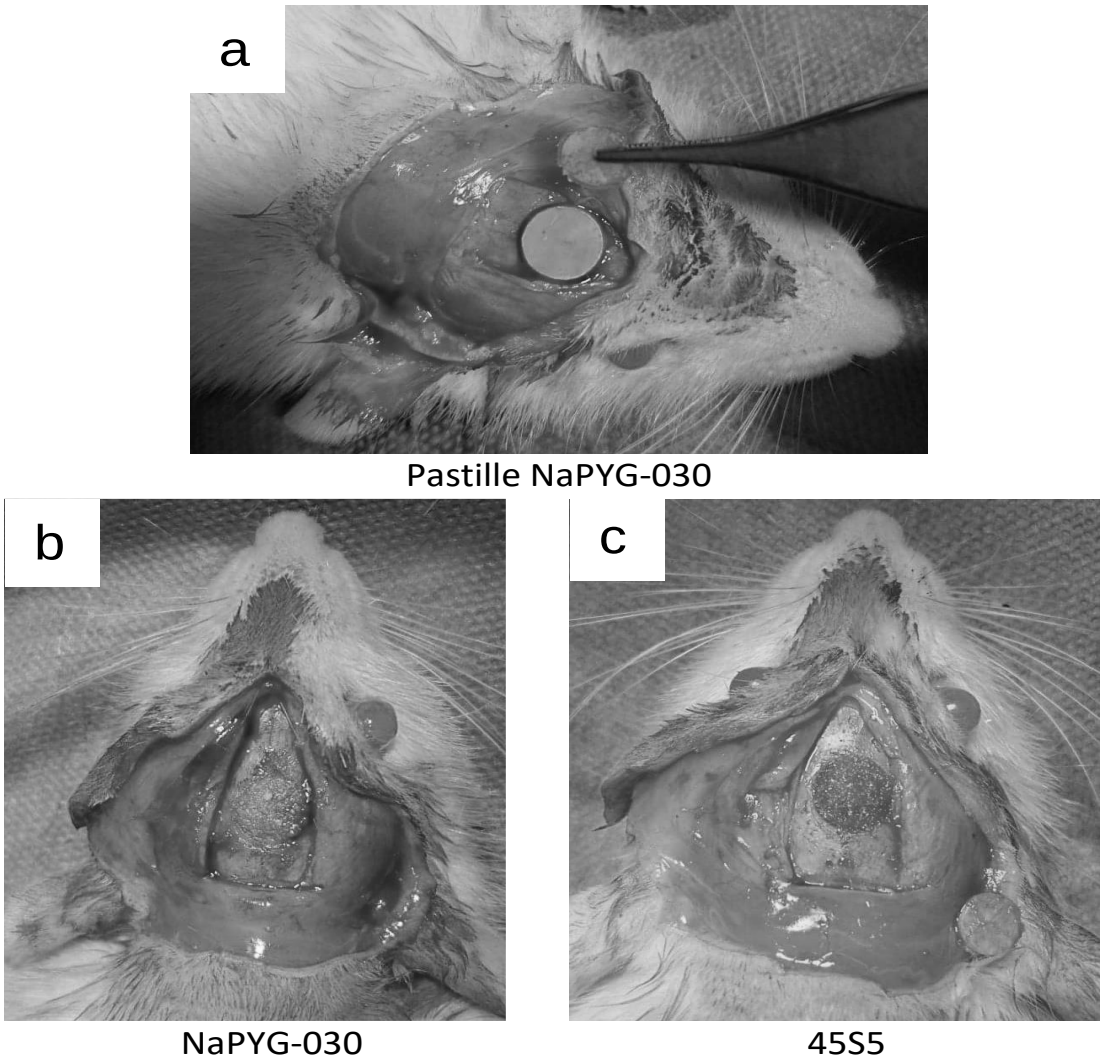


Figure IV.13 : Photographies du défaut critique circulaire dans la *calvaria* de rat, comblé par le matériau NaPYG-030 sous forme de pastille (a), de poudre (b) et du matériau 45S5 (c) réalisées au laboratoire B3OA.

IV.3.1.2 Résultats

IV.3.1.2.1 Mesure de l'inflammation locale au 7ème jour

Sept jours après l'implantation, l'expression du gène facteur de nécrose (TNF), et des gènes marqueurs de l'inflammation interleukine 6 (IL6) et chimiokine XCL1 (CXCL1), intervenant lorsque l'organisme se défend contre un corps étranger, a été mesurée par PCR (figure IV.14), suite au sacrifice de 6 rats dont le défaut critique avait été comblé avec le matériau 45S5 (n = 3) ou NaPYG-030 (n = 6) sous forme de granulés. Plus le niveau de leur expression est élevé, plus l'inflammation sera importante et plus le matériau aura du mal à induire la formation d'os nouveau.

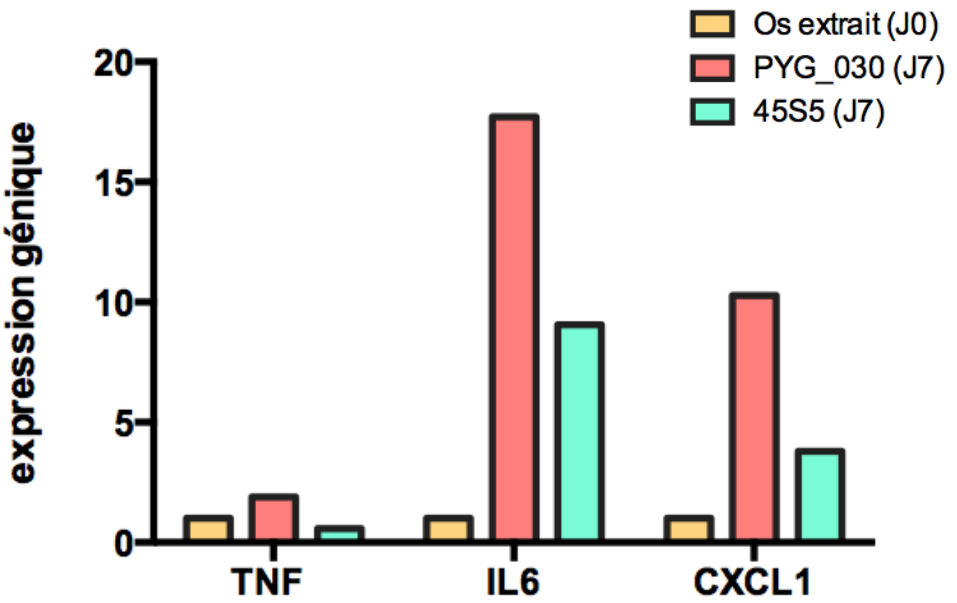


Figure IV.14 : Expression de TNF, IL6, CXCl1 en présence de matériau NaPYG-030 (en rose) et du bioverre 45S5 (en bleu) après 7 jours d'implantation comparé à l'expression de ces gènes au contact de l'os de la *calvaria* extrait à J0 qui servira d'échantillon témoin (en jaune) exprimé en quantité relative d'expression du gène par rapport à celle dans la condition témoin.

Nous pouvons observer que le niveau d'expression des gènes TNF, IL6 et CXCL1 est grandement supérieur pour le matériau NaPYG-030 que pour l'os extrait (témoin dont l'expression est fixée à 1). De plus, il est aussi deux fois plus élevé que le niveau d'expression des gènes en présence du 45S5. Il y a donc une surexpression des gènes marqueurs de l'inflammation au septième jour de l'implantation du matériau NaPYG-030. Il devrait entraîner une inflammation lors de sa dégradation surement due à la forte libération de sodium détectée lors des évolutions en milieux acellulaires (Chap.IV). En effet, il a été montré qu'une forte concentration de sodium peut entraîner une inflammation[162], et ainsi une diminution locale du pH, ce qui favoriserait l'hydrolyse des ions pyrophosphate libérés par les matériaux NaPYG-0X0.

IV.3.1.2.2 Caractérisation du tissu et du matériau au 28ème jour

Suite au sacrifice des rats à 28 jours, les matériaux implantés ont été prélevés. Ils ont été fixés dans du formol, puis déshydratés dans des bains d'alcool avant d'être fixés de nouveau par polymérisation dans des blocs de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA). Les blocs ont été découpés afin d'obtenir des coupes transversales de plusieurs dizaines de micromètres

d'épaisseur, qui ont été polies puis collées sur des lames de verre. Les coupes ont été colorées à la picrofuchsine (colore en rose le tissu osseux) et au bleu de Stevenel (colore en bleu le noyau des cellules) afin d'être observées par microscopie à fluorescence. Elles ont aussi été analysées par MEB et spectroscopie Raman après avoir été polies afin d'enlever les colorations.

IV.3.1.2.2.1. Echantillon sous forme de pastille

Les résultats de l'étude d'implantation du matériau NaPYG-030 sous forme de pastille ne seront pas présentés dans cette thèse car la pastille n'a pas pu être placée dans le défaut complet, à cause de sa taille qui était surdimensionnée. De plus, les résultats ne sont pas significatifs car l'étude a été réalisée avec seulement une pastille sur 1 rat contre n = 9 ou 5 avec les granulés de NaPYG-030 et 45S5.

Il a donc été décidé d'abandonner les implantations sous forme de pastilles pour le moment car aucun tissu osseux nouveau ne s'est formé à son contact. Au contraire, une encapsulation fibreuse tout autour du matériau a été observée. Une étude sur la mise en forme de la pastille doit être réalisée afin d'obtenir une pastille de dimension adaptée au défaut, une moins grande compacité et une plus grande porosité tout en gardant la même tenue mécanique. Les cellules pourraient ainsi coloniser plus facilement le matériau et former un tissu.

IV.3.1.2.2.2. Echantillons sous forme de granulés

En parallèle, les matériaux NaPYG-030 et 45S5 sous forme de granulés ont également été implantés dans la *calvaria* pendant 28 jours. La figure IV.15 présente les coupes histologiques des explants de ces matériaux. Dans un premier temps, nous pouvons remarquer que la granulométrie du matériau 45S5 est homogène (entre 300 et 500 µm) alors que celle de NaPYG-030 ne l'est pas. Pour le matériau 45S5, les grains se sont peu dégradés à 28 jours et du tissu s'est formé au contact des grains (en rose) (Fig.IV.15a). Il a également été observé un tissu autour de certains grains de NaPYG-030, cependant ce tissu ne semble pas être en contact direct avec le matériau (Fig.IV.15b). En effet, une couche grisâtre correspondant à une encapsulation fibreuse les sépare. De plus, les particules de NaPYG-030 sont en moins grande quantité que celles du 45S5 et ne sont plus en contact entre elles, dû à la dégradation des plus petits grains. Ce qui montre que le matériau a, sous forme de granulés, une bonne résorbabilité.

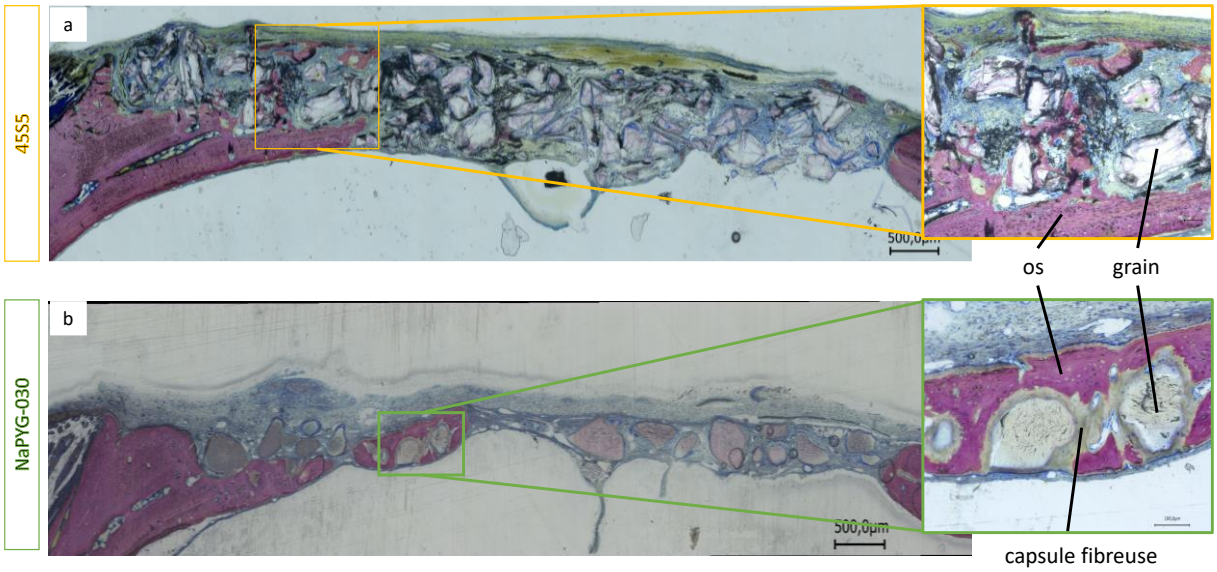


Figure IV.15 : Coupes histologiques de 45S5 (a) et de NaPYG-030 implantés sous forme de granulés (b) avec grossissement de l'image afin d'observer le tissu osseux néoformé (coloré en rose par la Picrofuchsine) et les cellules (colorées en bleu par le bleu de Stevenel) autour des matériaux après 28 jours.

Afin de caractériser le tissu formé autour du matériau NaPYG-030, les coupes ont été analysées par MEB et spectroscopie Raman (figure IV.16). Les images MEB ont été prises en électrons rétrodiffusés, ce qui permet de faire apparaitre un contraste chimique soit en fonction du numéro atomique des éléments présents soit en fonction de la densité des matériaux. Les images MEB de la coupe histologique montrent l'os de couleur blanche et les matériaux NaPYG-030 implantés de couleur grise. Comme observé précédemment, les grains de matériaux sont espacés entre eux. De plus, des grains de même couleur que l'os ont été observés autour de certains granulés de matériau NaPYG-030 et seraient alors constitués des mêmes éléments chimiques que l'os ou auraient la même densité (Fig.IV.16a). En zoomant (Fig.IV.16b), nous remarquons que les grains blancs sont au contact du matériau et sont composés de pores pouvant être identifiés aux canaux de Havers des ostéons, unités de base du tissu osseux. Une cartographie Raman a été réalisée pour voir s'il était possible de déterminer la composition des différents constituants observés sur la micrographie (Fig.IV.16c : l'orthophosphate apparait en vert, le pyrophosphate en bleu et la résine en PMMA en rouge). Le matériau correspondant au NaPYG-030 est coloré en violet car il est composé de pyrophosphate, d'orthophosphate, et de la résine s'est infiltrée dessus ou dans le matériau/défaut, par contre le tissu en contact avec le matériau est complètement coloré en vert intense. Le spectre Raman du matériau (Fig.IV.16d) révèle que les bandes caractéristiques des groupements orthophosphate et pyrophosphate à 960 et 1040 cm^{-1} sont présentes respectivement alors que les autres bandes à 800 et 1000 cm^{-1} sont attribuées à la résine en PMMA. Les spectres du tissu montrent qu'il n'est pas directement en contact du matériau et semble être composé uniquement d'orthophosphate (Fig.IV.16f) alors que celui en

contact direct du grain de NaPYG-030 est composé majoritairement d'orthophosphate mais également de pyrophosphate (Fig.IV.16e).

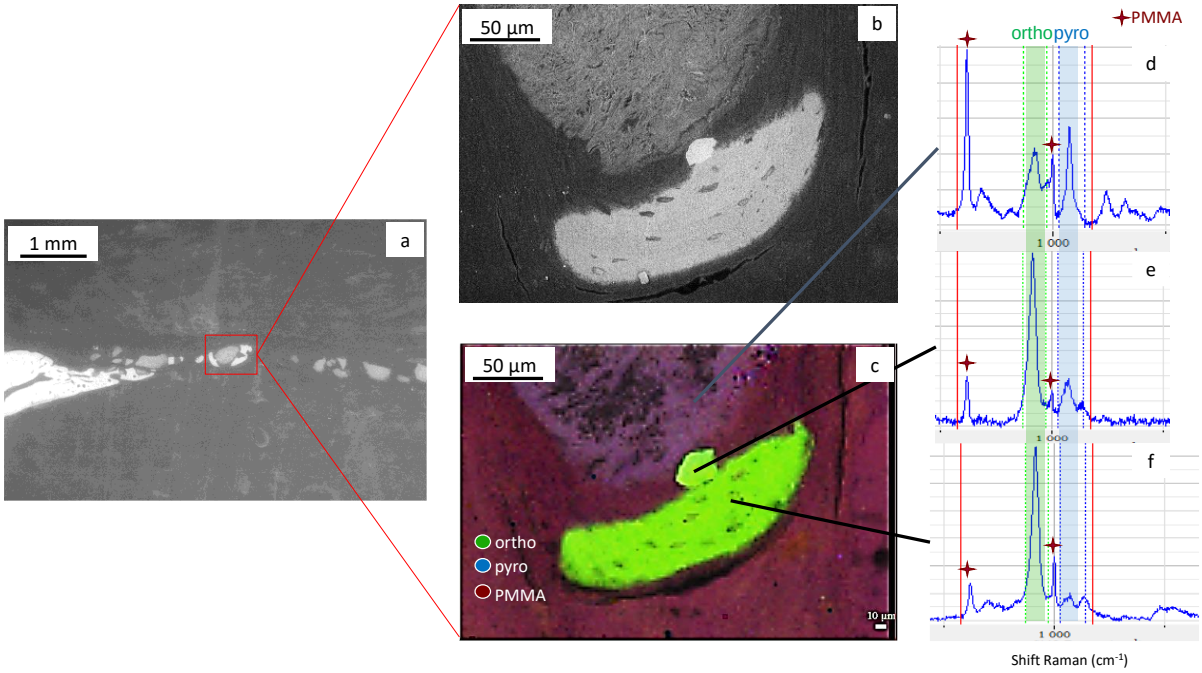


Figure IV.16 : Micrographies de la coupe histologique de granulés de NaPYG-030 implantés pendant 28 jours (a et b) associé à une cartographie Raman (c) et aux spectres Raman des différentes zones de l'image (d, e et f) (en vert, l'orthophosphate, en bleu, le pyrophosphate et en rouge, la résine en PMMA).

Pour conclure sur cette première série d'implantations, le matériau sous forme de granulés présente des résultats prometteurs car un tissu osseux s'est formé. Cependant ce tissu a été observé directement au contact du matériau seulement sur un seul grain, alors qu'une encapsulation fibreuse s'est formée autour de la majorité des autres granulés du matériau NaPYG-030, surement dû à l'hétérogénéité de la distribution de taille des grains. Afin d'expliquer le comportement *in vivo* du matériau, nous proposons l'hypothèse suivante. Les particules de plus petit diamètre ont dû se dissoudre, libérant une forte dose de sodium (avec du calcium et du phosphate) entraînant une réaction inflammatoire observée à 7 jours (partie.4.a.ii.1). Cette réaction pourrait ainsi diminuer localement le pH et favoriser l'hydrolyse du pyrophosphate présent dans les matériaux NaPYG-0X0. De plus, les granulés restants à 28 jours se sont retrouvés trop espacés, rendant difficile la formation d'un tissu osseux entre les grains. L'hypothèse pouvant donc être formulée sur la formation d'un nouveau tissu osseux au contact du matériau serait que les cellules dégradent la surface des grains de NaPYG-030 en hydrolysant le pyrophosphate, formant une couche déficiente en pyrophosphate autour des grains. Le pyrophosphate est ensuite complètement hydrolysé et un tissu osseux nouveau se forme au contact de la surface externe déficiente en pyrophosphate. Il est possible que le matériau NaPYG-030 contienne trop de pyrophosphate

rendant la dégradation du matériau trop lente. Des études complémentaires seront nécessaires afin de vérifier cette hypothèse. Nous avons donc décidé de lancer une nouvelle série d'implantations pendant 60 jours avec les compositions NaPYG-030 et NaPYG-050, cette dernière contient moins de pyrophosphate, sous forme de granulés de granulométrie contrôlée. Le matériau 45S5 est également utilisé comme matériau témoin pour cette nouvelle série.

IV.3.2. Seconde série d'implantations

Cette série d'implantations a été réalisée avec le même modèle animal que la précédente, c'est-à-dire la *calvaria* de rat Wistar, mâles, âgés de 11 semaines. Ainsi juste avant le début de la période de confinement lié au contexte sanitaire COVID-19, au total 37 rats ont subi une implantation, 11 rats avec le bioverre 45S5, 11 avec la poudre NaPYG-030 et 15 avec celle de NaPYG-050. Grâce à la solidarité collective au sein du B3OA il a été possible de maintenir en vie tous les animaux de cette série pendant toute cette période singulière de confinement et ainsi permettre le déroulement de l'essai quasi normalement. Néanmoins l'analyse histologique et le traitement des données sont ralenties en raison des mesures de reprise d'activité progressive au sein du laboratoire. Les analyses sur la réponse inflammatoire tissulaire locale à 7 jours d'implantation, ainsi que la caractérisation des tissus par histologie sont donc en cours de traitement. Les premiers résultats dont nous disposons à l'heure actuelle sur cette série sont les suivis *in vivo* par micro tomodensitométrie (µCT). Cette analyse est non destructive et permet d'obtenir des images à haute résolution de l'implant. La figure IV.17 présente les radiographies en vues de dessus de rats pris aléatoirement implantés avec les matériaux 45S5, NaPYG-030 et NaPYG-050 à différents temps. Ces premiers résultats sont prometteurs car nous pouvons observer qu'un élément blanc, pouvant être identifié à du tissu osseux, envahit de plus en plus l'implant au cours du temps et semble se former entre les grains de toutes les compositions. De plus, la quantification du volume de radio-opacité des implants de NaPYG-030 et -050 se situe dans la même gamme que celle du 45S5, c'est-à-dire entre 35 et 50 %. Les résultats d'histologie à 60 jours et l'étude de la réponse tissulaire locale à 7 jours pourront compléter quantitativement et avec plus de précision les informations apportées par ses radiographies afin de conclure sur l'étude biologique des matériaux NaPYG-0X0.

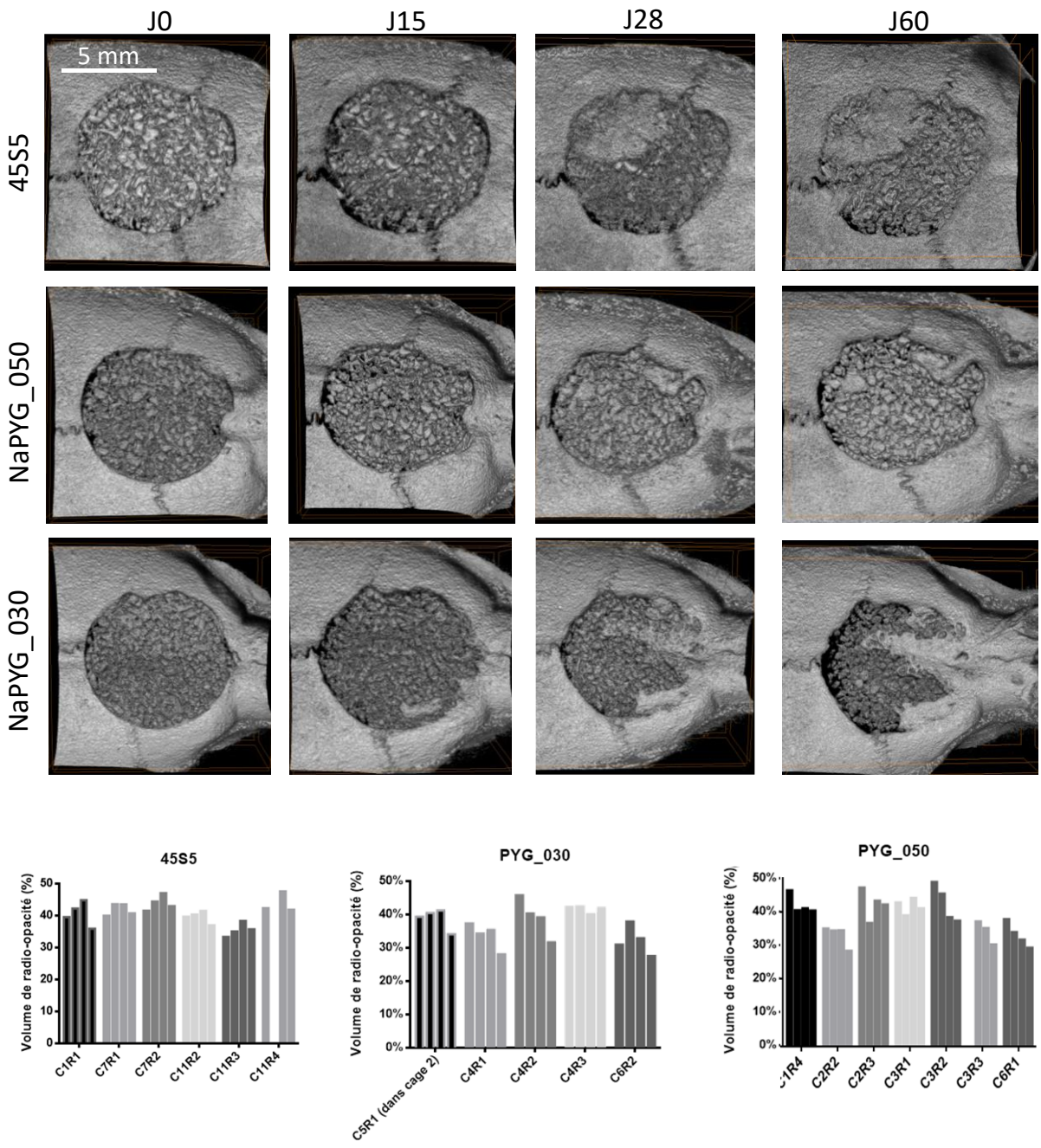


Figure IV.17 : Radiographies haute résolution par micro tomodensitométrie (µCT) de têtes de rats (vue de dessus) et quantification de la radio-opacité avec les implants de 45S5, NaPYG-030 et NaPYG-050 sous forme de poudre après différentes durées d'implantation (0 à 60 jours).

IV.4. Conclusion et perspectives

Ce chapitre a rassemblé les différentes études que nous avons menées afin d'appréhender pour la première fois le comportement des matériaux NaPYG-0X0 en présence d'enzymes PAL et de cellules mésenchymateuses HBMSCs, ainsi que les propriétés biologiques de la composition de matériau NaPYG-030. La présence d'enzymes PAL en solution avec les matériaux induit une dégradation de ceux-ci et une libération d'ions accélérée. Le mode d'action de ces enzymes reste encore à l'étude, cependant de façon générale le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates des matériaux NaPYG-0X0 augmente lorsqu'ils sont immergés en présence d'enzymes. L'augmentation de ce rapport supposerait qu'une partie de l'hydrolyse du pyrophosphate se déroule à la surface ou au sein des matériaux en plus de l'hydrolyse des ions pyrophosphate en solution.

Les tests biologiques ont montré que toutes les compositions de matériaux NaPYG-0X0 étudiées ne présentaient aucune cytotoxicité. De plus, lorsque les cellules étaient en contact du matériau NaPYG-030, des gènes marqueurs de la minéralisation osseuse, et notamment l'ostéopontine ont été autant exprimés voir surexprimés par rapport au test témoin. L'expression de ces gènes devra être mesurée avec les autres compositions NaPYG-0X0, surtout pour le matériau NaPYG-050 qui a montré une meilleure cytocompatibilité et qui forme de l'apatite nanocristalline lorsqu'il est immergé en milieu aqueux, pour voir si la composition chimique du matériau influe sur la biocompatibilité.

Enfin, les résultats préliminaires des tests d'implantation *in vivo* du matériau NaPYG-030 sont prometteurs car nous avons pu observer la formation d'un tissu osseux. Cependant, une encapsulation fibreuse entre le matériau et l'os néoformé a été relevée, surement due à l'hétérogénéité de la granulométrie des matériaux implantés. Une nouvelle série d'implantation de matériaux NaPYG-030 et -050 a pu être réalisée en contrôlant la taille des granulés (entre 300 et 500 µm) pendant le contexte difficile lié au COVID-19 et l'analyse histologique, ainsi que le traitement des données seront réalisés prochainement.

Globalement les tests cellulaires *in vitro* relatifs à l'étude de cytotoxicité, de biocompatibilité ainsi que les premiers résultats d'implantation chez le petit animal nous permettent d'envisager de poursuivre les études sur ces nouveaux matériaux en vue d'une application en tant que substituts osseux.

Chapitre V : SYNTHÈSE, CARACTÉRISATION DE LA CANAPHITE-α ET ÉTUDE DE SON ÉVOLUTION DANS DIFFÉRENTS MILIEUX AQUEUX CELLULAIRES/ACELLULAIRES

Le protocole utilisé pour synthétiser la composition de matériau NaPYG-000 seulement à partir de pyrophosphate de sodium ($Na_4P_2O_7$) et de chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2.2H_2O$) comme précurseurs a conduit à la formation d'un matériau composé d'un solide amorphe et d'une phase cristallisée : le pyrophosphate disodique de calcium tétrahydraté ou canaphite ($CaNa_2P_2O_7.4H_2O$). Bien que la formation de cette phase cristallisée n'ait jamais été reportée *in vivo*, l'étude de sa formation et de son évolution en milieu aqueux présente un intérêt biologique étant donné qu'elle est constituée de calcium, sodium et pyrophosphate, notamment si on se réfère à deux autres phases de pyrophosphate de calcium dihydraté, monoclinique et triclinique (m-CPPD et t-CPPD), qui peuvent se former *in vivo*[70,163] dans les articulations des patients souffrant de pseudogoutte.

Il a déjà été démontré que la canaphite pouvait se former sous ses variétés allotropiques α et β, lors de l'étude de dépôt cristallins de m-CPPD et de t-CPPD par modélisation *in vitro*, dans un gel de gélatine de qualité biologique à pH physiologique[164]. Son développement en tant que phase d'intérêt biologique ou même en tant que biomatériau n'est pas à négliger. Il est donc intéressant d'étudier le comportement physico-chimique et biologique *in vitro* de la canaphite-α dans des solutions aqueuses en présence ou non de cellules/enzymes afin de mieux comprendre

les maladies associées au dépôt de cristaux de pyrophosphate de calcium mais aussi pour examiner son potentiel en tant que matériau de substitution osseux bioactif ; ses propriétés de dégradation devraient être différentes par rapport aux matériaux bien connus à base d'orthophosphate de calcium, dû à l'hydrolyse des pyrophosphate ou/et la présence de sodium.

Ce chapitre présentera la synthèse et les caractérisations par DRX, spectroscopies FTIR et Raman, MEB, les analyses thermogravimétrique et chimiques, ainsi que les études de l'évolution *in vitro* de la canaphite-α dans les mêmes milieux aqueux que ceux dans lesquels l'évolution des matériaux NaPYG-0X0 a été réalisée (chapitre III et IV). Nous analyserons l'évolution de la canaphite-α dans l'eau ultra-pure et l'effet du pH sur son évolution physico-chimique, puis son immersion dans des milieux tampon sera considérée. Enfin, les propriétés biologiques *in vitro* de cette phase cristalline seront reportées pour la première fois.

V.1. Synthèse et caractérisation de la canaphite-α

Lors de la synthèse des matériaux NaPYG-0X0, la composition du matériau NaPYG-000 élaboré à partir d'une solution de phosphate ne contenant que des ions pyrophosphate forme majoritairement une phase cristallisée identifiée comme étant la canaphite-α, ainsi qu'une phase amorphe[92]. Afin d'obtenir uniquement la phase cristalline canaphite, le protocole a été légèrement modifié. La synthèse de cette phase a été reportée dans plusieurs études par ajout d'une solution de pyrophosphate de sodium dans une solution de sels de calcium à pH neutre et à température ambiante[165] ou après 24 heures d'évolution *in vitro* dans un système s'inspirant de la diffusion du pyrophosphate de sodium dans le cartilage hyalin articulaire à 37°C[166]. La canaphite a également été formée lors de la modélisation de l'évolution *in vitro* des phases m-CPPD et t-CPPD dans un gel de gélatine à pH physiologique[164]. Une autre méthode de synthèse de la canaphite-α par précipitation a été mise au point sans qu'il soit nécessaire de neutraliser la solution de pyrophosphate, en mélangeant des solutions cationiques et anioniques, puis en laissant maturer le précipité pendant 1 jour[167]. Cependant ces différentes techniques de synthèse n'ont jamais pu prouver que la canaphite synthétisée était une phase pure. Plus récemment, le CIRIMAT a mis au point une méthode de synthèse reproductible de la canaphite-α pure par double décomposition en solution d'un sel de chlorure de calcium dihydraté $CaCl_2.2H_2O$ et de pyrophosphate tétrasodique anhydre $Na_4P_2O_7$ à température ambiante. Cette méthode originale sera expliquée dans ce chapitre.

Cette partie expose la méthode originale de synthèse de la canaphite-α que nous avons mise au point en adaptant le protocole d'élaboration du matériau NaPYG-000 afin d'éviter la présence d'une phase amorphe. Les caractérisations par DRX, spectroscopies FTIR et Raman, analyses chimiques et microscopie électronique à balayage sont également présentées.

V.1.1.Synthèse de la canaphite-α

Les étapes de la synthèse de la canaphite-α sont schématisées sur la figure V.1.

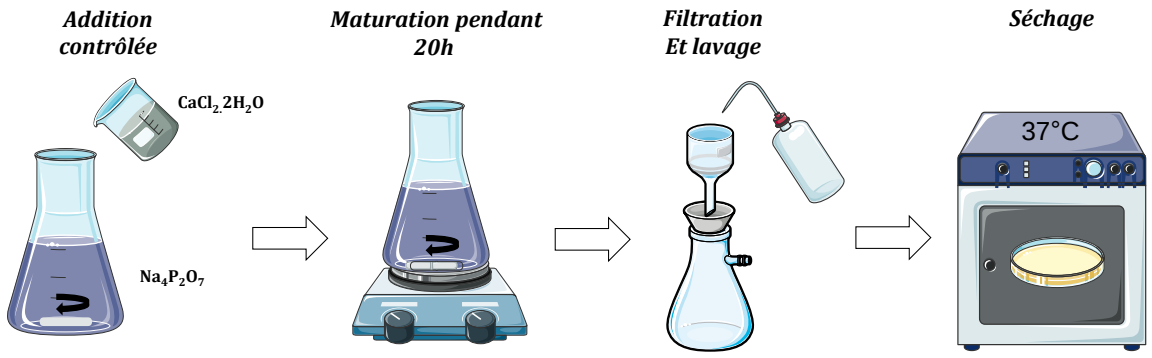


Figure V.1 : Représentation schématique des étapes de synthèse de la canaphite-α.

Pour la canaphite-α, les solutions de précurseurs sont préparées séparément en dissolvant 8,5 g de chlorure de calcium dans 320 mL d'eau déionisée comme lors de la synthèse des matériaux NaPYG-0X0 et 70,8 g de pyrophosphate de sodium dans 3200 mL d'eau déionisée. Après dissolution, l'ajout de la solution de chlorure de calcium s'effectue toujours à un débit de 100 $mL.min^{-1}$ avec une pompe péristaltique. Cependant, suite à cet ajout le mélange réactionnel est laissé à maturer pendant 20 h sous agitation lente et à température ambiante. Dès l'ajout des premières gouttes de la solution de calcium, on observe la formation d'un précipité blanc. A l'issue de l'étape de maturation, la suspension est filtrée sur Büchner avec un filtre (pores de 0,2 µm de diamètre), puis lavée avec environ 1600 mL d'eau déionisée, et la poudre récupérée est enfin séchée dans une étuve à 37°C pendant une nuit. Le matériau synthétisé se présente sous la forme d'une poudre fine de couleur blanche. Les caractérisations de la canaphite-α sont présentées à la suite.

V.1.2. Caractérisation de la canaphite-α

Cette partie présente les caractérisations physico-chimiques de la canaphite-α synthétisée.

V.1.2.1 Diffraction des rayons X

La figure V.2 présente le diagramme de diffraction des RX de la canaphite-α synthétisée.

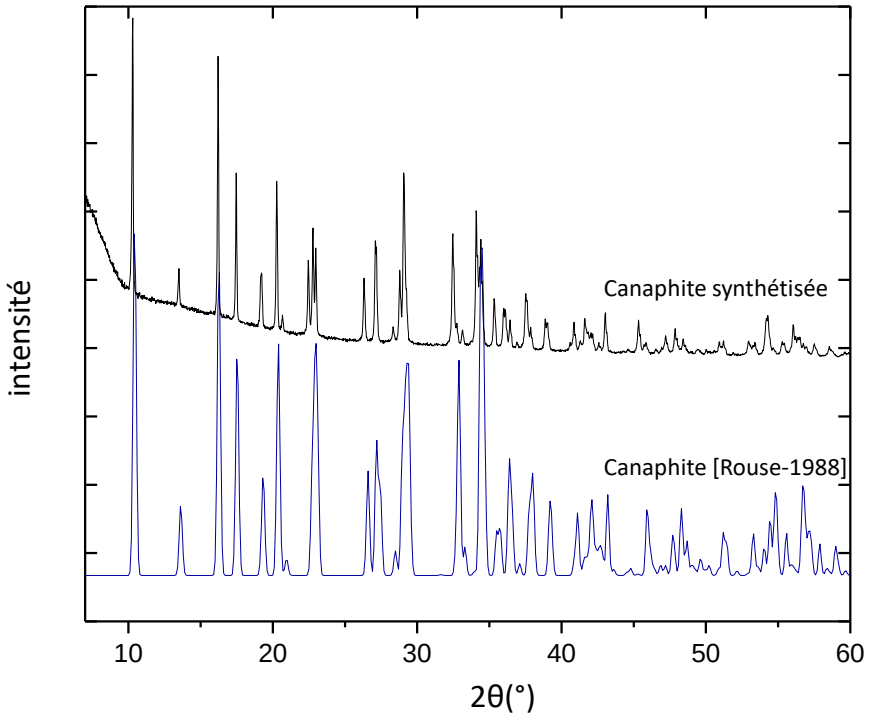


Figure V.2 : Diagramme de diffraction des rayons X de la canaphite-α synthétisée.

La canaphite synthétisée est une phase canaphite-α pure conforme à la canaphite-α de la fiche ICSD n°26015. Ce protocole de synthèse original ainsi que la caractérisation multiéchelle complète de la canaphite-α a fait l'objet d'un article récemment publié[168]. Cette phase cristalline est une phase hydratée de pyrophosphate de calcium et sodium de formule chimique : $CaNa_2P_2O_7 \cdot 4H_2O$.

V.1.2.2 Spectroscopies vibrationnelles FTIR et Raman

Les spectroscopies vibrationnelles FTIR et Raman nous ont permis d'étudier la canaphite synthétisée au niveau moléculaire. Les spectres infrarouge et Raman de la canaphite-α synthétisée sont présentés sur les figures V.3 et V.4. Il en ressort cinq principaux domaines des bandes pyrophosphate identifiables[169] : i) 410-650 cm^{-1} correspondant au mode interne de bandes de vibration des ions pyrophosphate (δPO_3 et ρPO_3 de P_2O_7); ii) Quatre domaines attribués au pyrophosphate, y compris la vibration de la liaison POP (δPOP) autour de 350 cm^{-1}, l'étirement symétrique du pont POP (ν^sPOP, à 743 cm^{-1}) et les bandes asymétriques et symétriques intenses de $\nu^{as}PO_3$, entre 990 et 1050 cm^{-1} et de ν^sPO_3 entre 1090 et 1160 cm^{-1} (figures V.3 et V.4). De plus, des bandes de vibration relativement intenses correspondant aux liaisons OH des molécules d'eau structurale sont comprises entre 2800 et 3750 cm^{-1} et sont caractéristiques d'une phase hydratée.

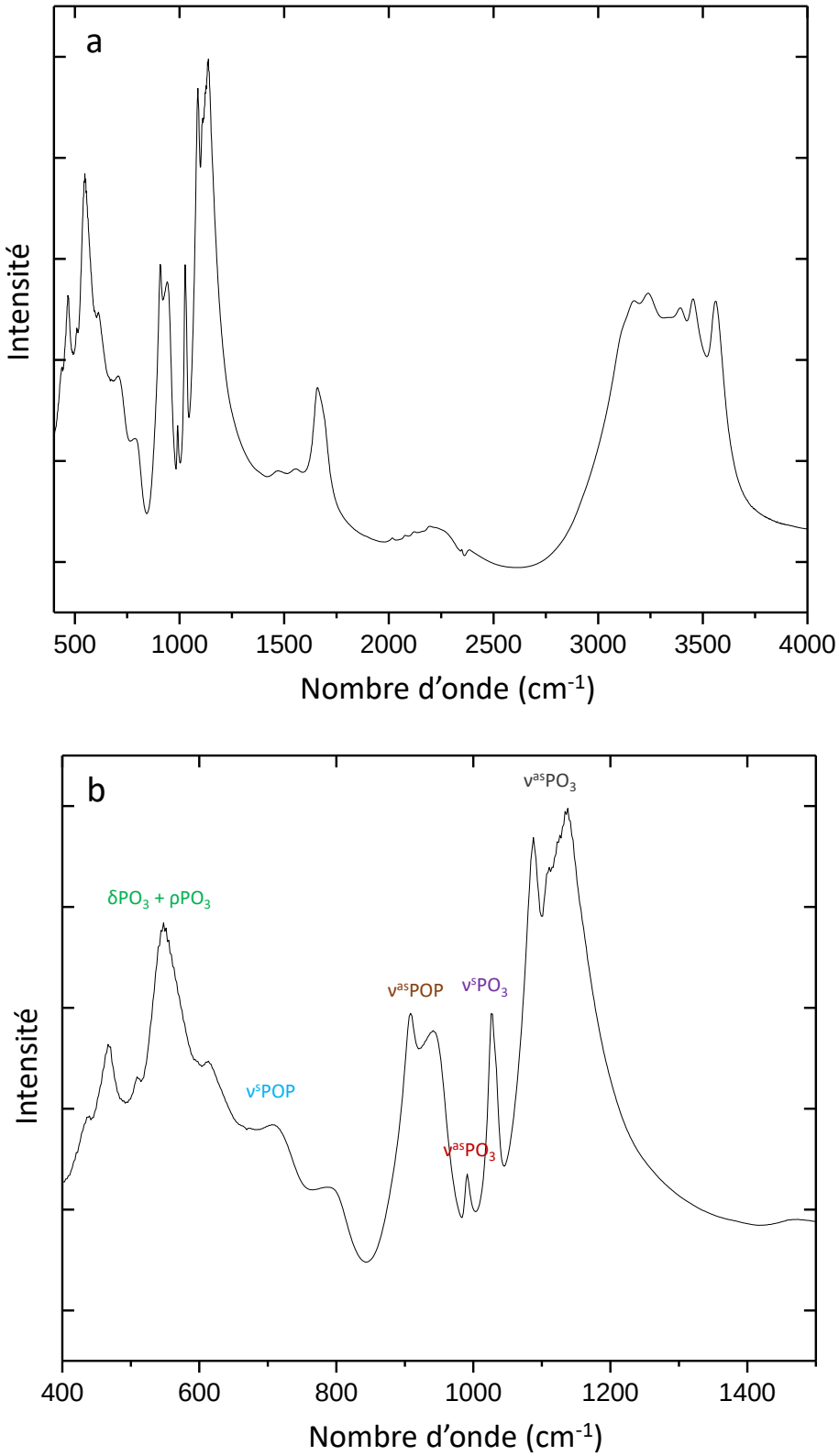


Figure V.3 : Spectre FTIR de la canaphite-α synthétisée présentés par domaines : a) 400-4000 cm^{-1} et b) 400-1500 cm^{-1}.

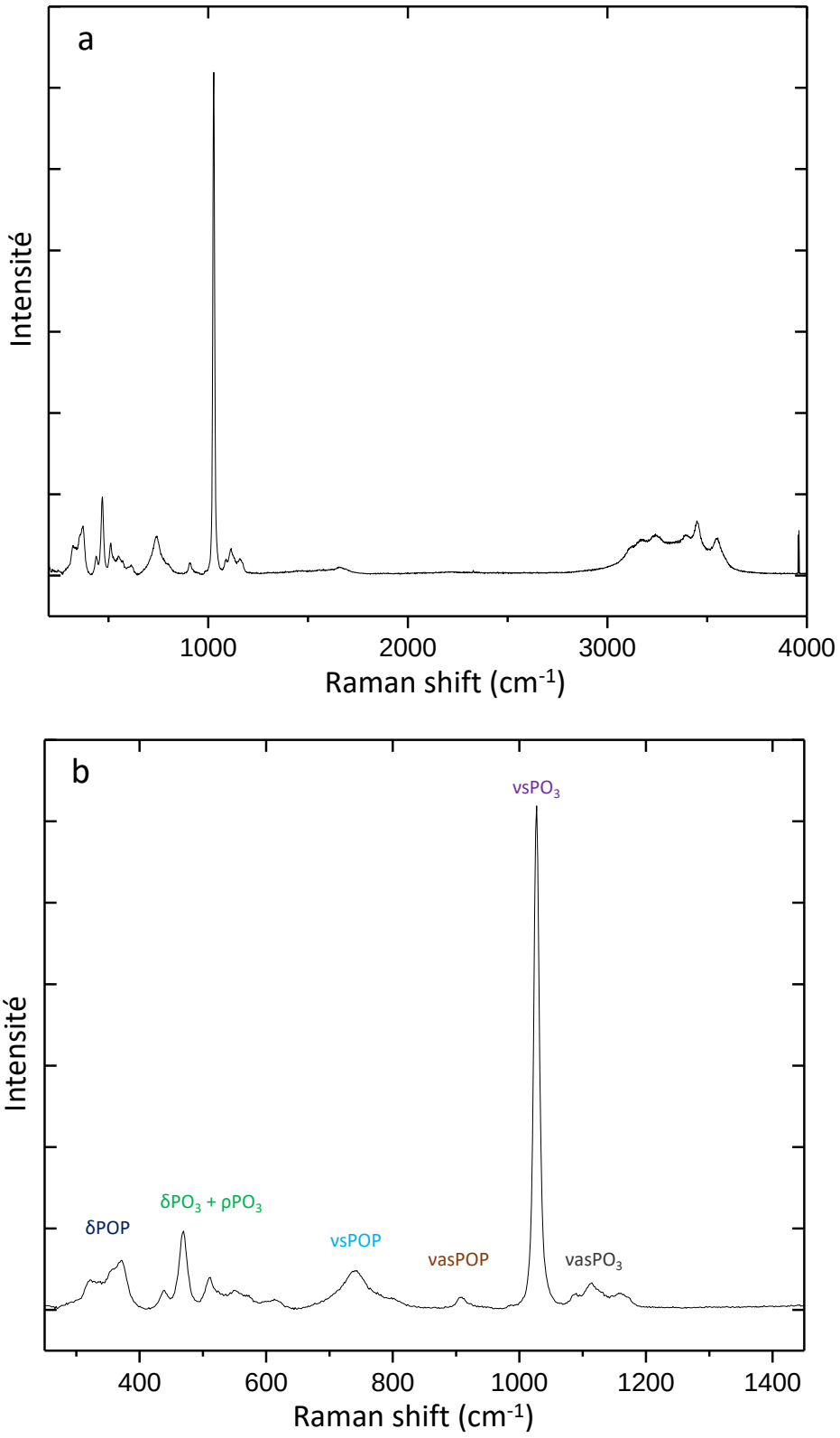


Figure V.4 : Spectre Raman de la canaphite-α synthétisée présentés par domaines : a) 200-4000 cm^{-1} et b) 250-1500 cm^{-1}.

V.1.2.3 Analyses thermogravimétriques

L'analyse thermogravimétrique a été réalisée en utilisant les mêmes paramètres que pour l'analyse des matériaux NaPYG-0X0, c'est-à-dire une montée en température de 25°C à 600°C avec une vitesse de 5°C/min. La figure V.5 présente la courbe ATG de la canaphite-α synthétisée.

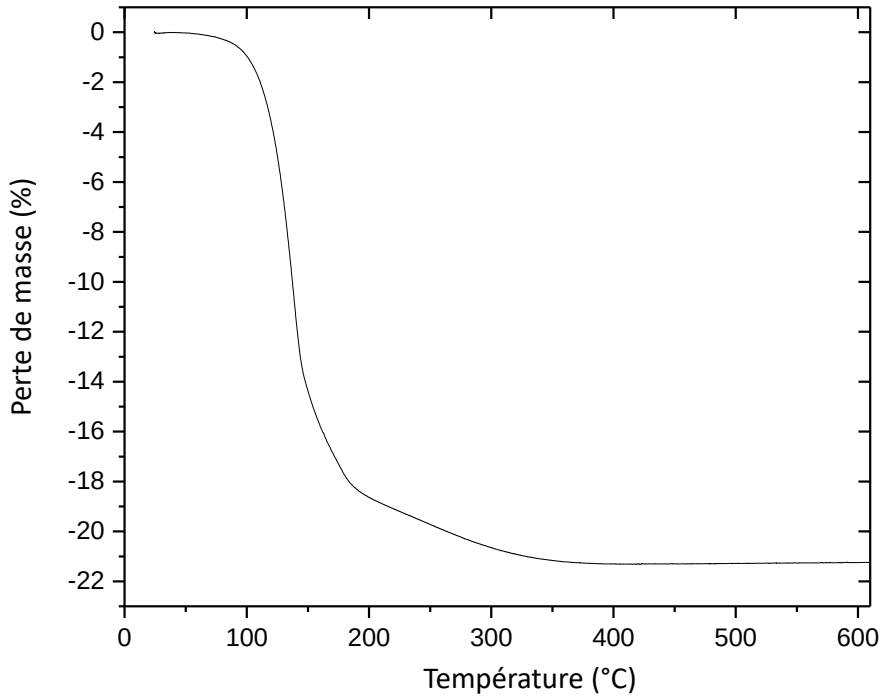


Figure V.5 : Courbe ATG de la canaphite-α synthétisée.

Le thermogramme présente la perte de masse de la canaphite-α synthétisée. La perte de masse principale se situe entre 100°C et 200°C et peut être attribuée à la perte d'eau du matériau, puis se stabilise à 400°C. La perte d'eau totale dans la canaphite-α est de 21,2 % m/m, ce qui a permis de déterminer le nombre de molécules d'eau associées au matériau synthétisé : 3,85 ± 0,05 molécules d'eau. Cette valeur est assez proche de la valeur théorique (4) et de celle trouvée en utilisant le même protocole de synthèse[92].

V.1.2.4 Analyses chimiques

La composition chimique de la canaphite-α synthétisée a été vérifiée par les mêmes dosages chimiques que ceux réalisés pour les matériaux NaPYG-0X0 (partie II.1.3.4). La poudre a été dissoute en milieu aqueux pour pouvoir être dosée. Les résultats des dosages sont reportés en dans le Tableau V.2.

Tableau V.1 : Quantités de phosphore (sous forme $P_2O_7^{4-}$, PO_4^{3-}, en mmol), de calcium (mmol) et de sodium (mmol) déterminées par analyses chimiques pour 150 mg de canaphite-α synthétisée.

Concentration en mmol/150mg	Ca^{2+}	Na^+	$P_2O_7^{4-}$	PO_4^{3-}	$PO_4^{3-}/ (PO_4^{3-} + P_2O_7^{4-})$
Valeur théorique	0,45	0,9	0,9	0	0
Valeur mesurée	0,47 (±0,01)	0,83 (±0,02)	0,90 (±0,01)	0 (±0,01)	0

Les dosages montrent que le matériau ne présente aucun ion orthophosphate. De plus les rapports atomiques Ca/Na et Ca/P sont proches (respectivement 0,57 ± 0,02 et 0,52 ± 0,02) des valeurs théoriquement attendues (0,5 et 0,5). Une différence est tout de même notable et peut être due au nombre de molécules d'eau légèrement inférieur à la composition de référence. En effet cet écart a aussi été remarqué pour la canaphite-α élaborée lors des travaux de thèse de L. Mayen[92].

V.1.2.5 Observations microscopiques

Les micrographies de la canaphite-α synthétisée sont présentés sur la figure V.6.

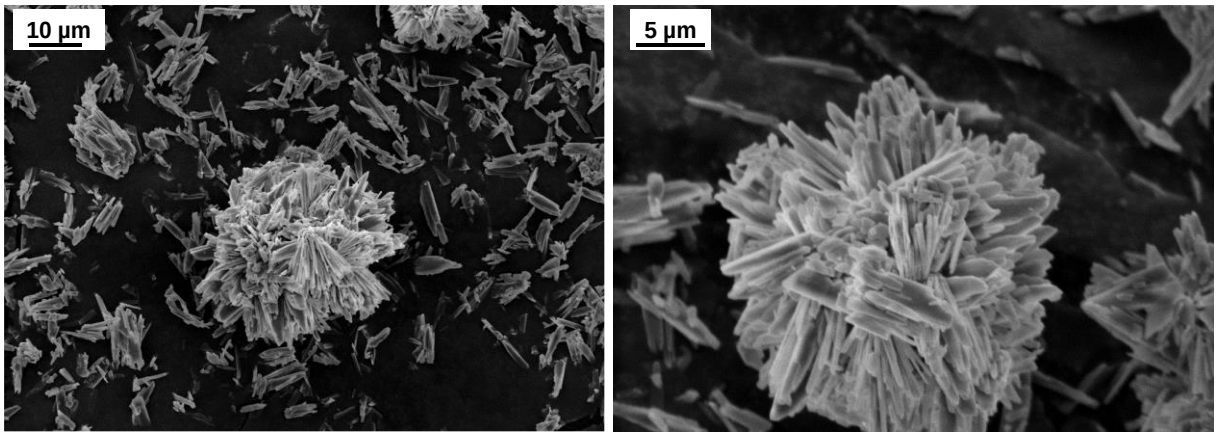


Figure V.6 : Micrographie MEB de la canaphite-α synthétisée à différentes échelles.

Les images MEB montrent que les cristaux de canaphite-α se présentent comme des aiguilles ou plaquettes étroites s'agglomérant en fagots de diamètre compris entre 20 et 50 µm. Les cristaux individuels en aiguilles ont une taille de 11 µm de longueur, 2 µm de largeur et 0,1

µm d'épaisseur. Les cristaux ont la même morphologie que les cristaux de canaphite-α synthétiques dont la synthèse et la caractérisation complète a été récemment publiée[168]. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ces agglomérats en forme d'aiguilles résultent d'un processus de formation en sphérulite de catégorie 2. Ce phénomène a déjà été décrit pour la phase de pyrophosphate de calcium dihydratée monoclinique, m-CPPD[71] et pour la canaphite-α[168]. Les auteurs en ont conclu que les cristaux de canaphite-α se sont développés radialement sur un cristal déjà formé conduisant à un fagot sphérique.

La prochaine partie présente l'évolution de la canaphite-α synthétisée dans différents milieux aqueux afin d'étudier ses propriétés physico-chimiques.

V.2. Evolution de la canaphite dans l'eau ultra-pure et effet du pH

Suite à la synthèse de la canaphite-α, le matériau a été immergé dans l'eau ultra-pure acidifiée ou non à l'acide nitrique à un pH initial égal à 4 ou à 2 en suivant le même protocole que celui décrit dans le chapitre III mais sans broyer la poudre ; en effet les cristaux de canaphite-α font environ 10 µm de longueur et sont suffisamment petits et homogènes en taille pour reproduire le rapport poudre/solution pour chaque essai (Figure V.6). Le matériau est immergé pendant 1 heure, 7 heures, 2 jours et 15 jours puis filtré et lavé. La mesure de la perte de masse, la caractérisation de la poudre récupérée par DRX, spectroscopie Raman, MEB ainsi que l'évolution du pH et des concentrations ioniques en solution lors des évolutions dans l'eau ultra-pure à différents pH initiaux sont présentés ensemble afin de pouvoir être comparés.

V.2.1. Caractérisation du matériau

La perte de masse de la canaphite-α après chaque temps d'évolution a été mesurée. La figure V.7 présente l'évolution de cette masse par rapport à la masse initialement introduite (rapport exprimé en % massique restant) en fonction du temps d'évolution dans chaque milieu.

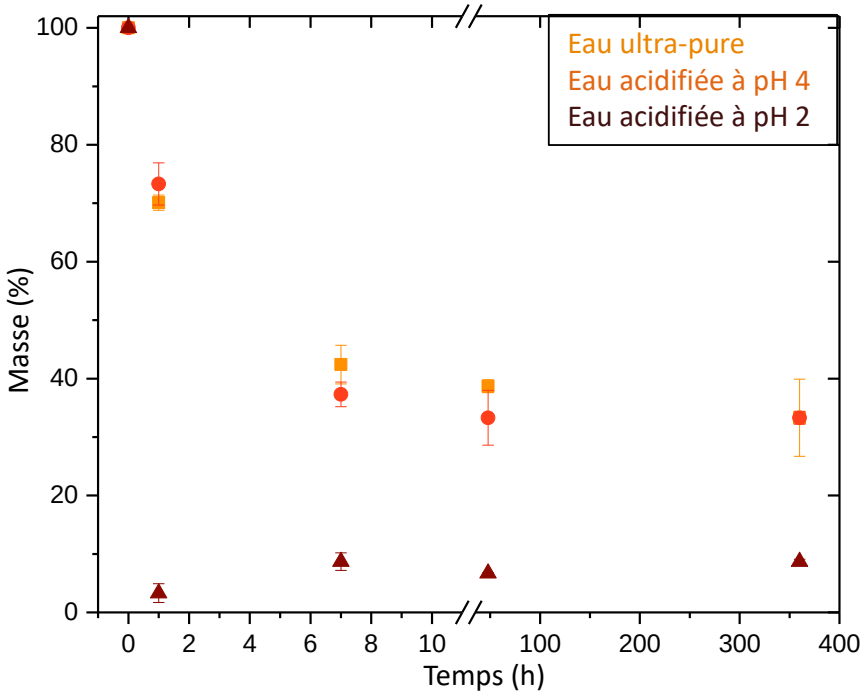


Figure V.7 : Evolution de la masse de canaphite-α en fonction de la durée d'immersion dans l'eau ultra-pure acidifiée à pH 2 et pH 4 ou non. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique par rapport à la masse de départ.

La perte de masse de la canaphite-α lors des évolutions dans l'eau ultra-pure et dans l'eau acidifiée à pH 4 diminue de la même façon pour les quatre temps d'immersion choisis. Une diminution rapide jusqu'à 40 % de la masse initiale est observée dans les sept premières heures d'évolution puis la perte de masse se stabilise et à 15 jours d'évolution on retrouve 33 % de la masse initiale. Par contre lors des évolutions à un pH initial de 2, plus de 95 % de la masse initiale a disparu pendant la première heure, puis la perte de masse diminue légèrement jusqu'à environ 90 % à 7 heures et se stabilise jusqu'à 15 jours d'évolution.

La poudre récupérée pour chaque essai a été caractérisée par DRX, spectroscopie Raman et MEB.

V.2.1.1 Diffraction des rayons X

La figure V.8 présente les diagrammes de diffraction RX de la canaphite-α aux différents temps d'immersion dans l'eau ultra-pure acidifiée à pH 4 (Fig.V.2b) et 2 (Fig.V.2c) ou non (Fig.V.2a). Nous pouvons observer qu'à 7 heures d'immersion dans l'eau ultra-pure et l'eau acidifiée initialement à pH 4, un pic de diffraction à 8° apparait ; il est caractéristique de la phase monoclinique de pyrophosphate de calcium tétrahydraté bêta (m-CPPT-β, $Ca_2P_2O_7{\cdot}4H_2O$). Les

pics de diffraction correspondant à la canaphite-α sont encore présents à 7 heures d'évolution. A 2 jours d'immersion dans l'eau ultra-pure et acidifiée à pH 4 les diagrammes de diffraction RX ne montrent plus les pics de diffraction de la canaphite-α, mais seulement ceux de la phase m-CPPT-β, puis à 15 jours, de nouveaux pics de diffraction apparaissent, dont les plus intenses à 11 et 13°. Nous pouvons attribuer ces pics à la phase triclinique de pyrophosphate de calcium dihydraté (t-CPPD, $Ca_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$) qui est la phase cristallisée la plus stable des pyrophosphates de calcium hydratés. De plus, le pic de diffraction à 8° de la phase m-CPPT-β est toujours présent à 15 jours d'évolution dans ces deux milieux. Lors des évolutions à un pH initial de 2 (Fig.V.2c), nous retrouvons les mêmes phases cristallographiques cependant elles apparaissent plus tôt. En effet, le pic de diffraction à 8° identifié à la phase m-CPPT-β est déjà présent sur le diagramme RX à 1 heure d'immersion et à 7 heures les pics de diffraction de la canaphite-α ne sont pratiquement plus visibles. Enfin à 2 et 15 jours d'évolution, les pics de diffraction observés sont tous attribués à la phase t-CPPD. Le tableau V.1 présente les largeurs à mi-hauteur des pics à 7,7° représentant le plan (100) lorsque la phase m-CPPT-β s'est formée ou à 11° correspondant au plan (010) lorsque la phase t-CPPD a cristallisé.

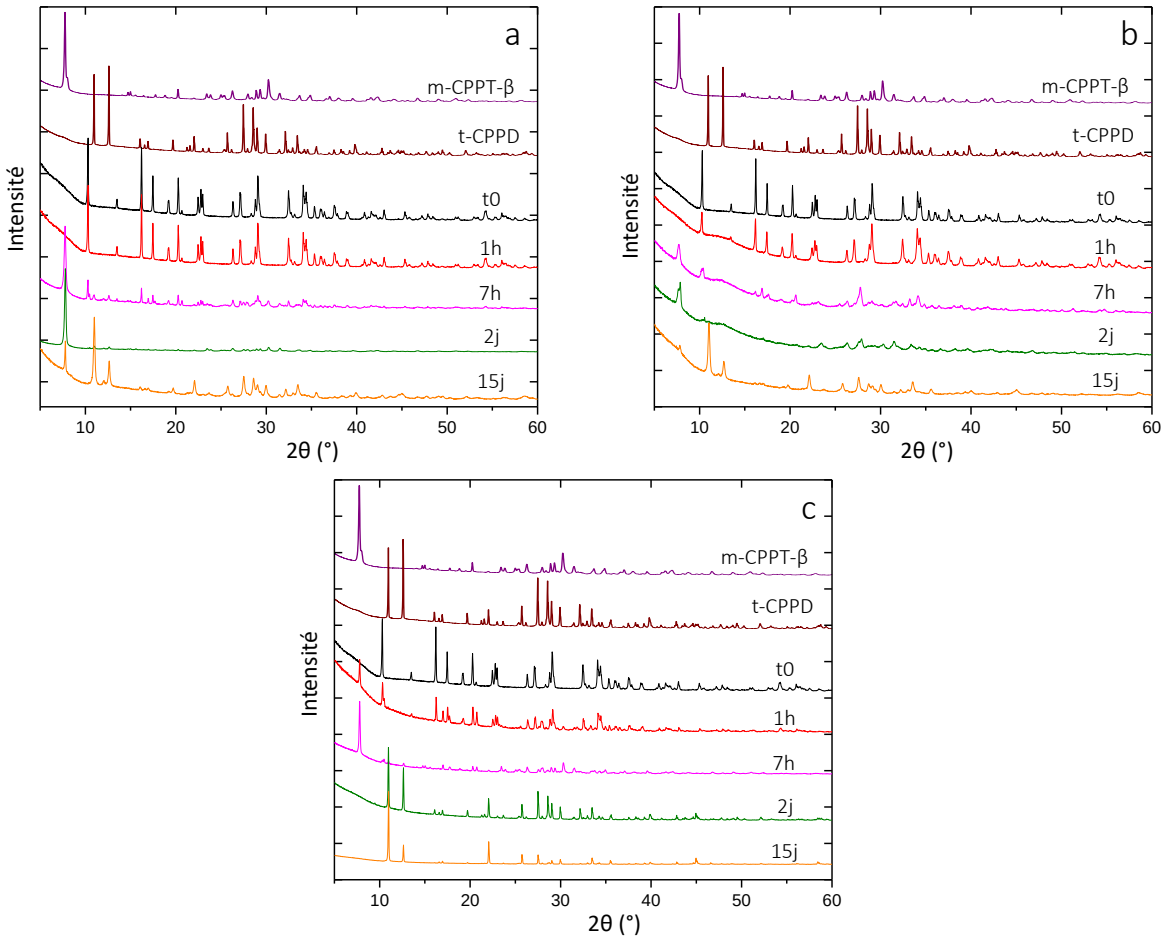


Figure V.8 : Diagrammes de diffraction des RX de la canaphite-α après différents temps d'évolution dans l'eau ultra-pure (a), l'eau ultra-pure acidifiée initialement à pH 4 (b) et pH 2 (c). Les DRX d'une phase m-CPPT-β et t-CPPD synthétique pure de référence sont également présentés.

V.2.1.2 Spectroscopie Raman

La figure V.9 présente les spectres Raman de la canaphite-α lorsqu'elle a évolué dans l'eau ultra-pure à différents pH initiaux. Dans tous les milieux, les spectres à une heure d'évolution correspondent au spectre Raman de la canaphite-α avec la bande $\nu^{s}PO_3$ centrée à 1027 cm^{-1}. Les spectres de la canaphite après évolution dans l'eau ultra-pure (Fig.V.3a) et dans l'eau acidifiée à pH 2 (Fig.V.3c) montrent qu'à 7 heures la bande $\nu^{s}PO_3$ s'est décalée à 1037 cm^{-1} correspondant à la bande $\nu^{s}PO_3$ de la phase m-CPPT-β, dont le spectre est également présenté sur la figure V.9. De plus, cette bande présente un épaulement situé du côté des grands nombres d'onde vers 1050 cm^{-1}. Ensuite à 2 jours, l'épaulement grandit en intensité et devient une bande apparente positionnée à 1049 cm^{-1}, que nous pouvons identifier à la bande $\nu^{s}PO_3$ de la phase t-CPPD, dont le spectre Raman est également présenté sur la figure V.3. Enfin, les spectres après 15 jours d'évolution dans l'eau ultra-pure et dans l'eau acidifiée à pH 2, indiquent que la bande $\nu^{s}PO_3$ s'est

décalée à 1049 cm^{-1}, avec un léger épaulement vers les faibles nombres d'onde pour le spectre à 15 jours d'évolution dans l'eau ultra-pure (Fig.V.3a). Pour les évolutions à un pH initial de 4 (Fig.V.3b), les spectres à 7 heures et 2 jours d'évolution présentent une bande $\nu^{s}PO_3$ toujours centrée à 1027 cm^{-1}, mettant en évidence un épaulement vers les plus grands nombres d'onde. Le spectre à 15 jours dévoile un décalage de la bande $\nu^{s}PO_3$ à 1049 cm^{-1} correspondant à la position de la bande $\nu^{s}PO_3$ de la phase t-CPPD.

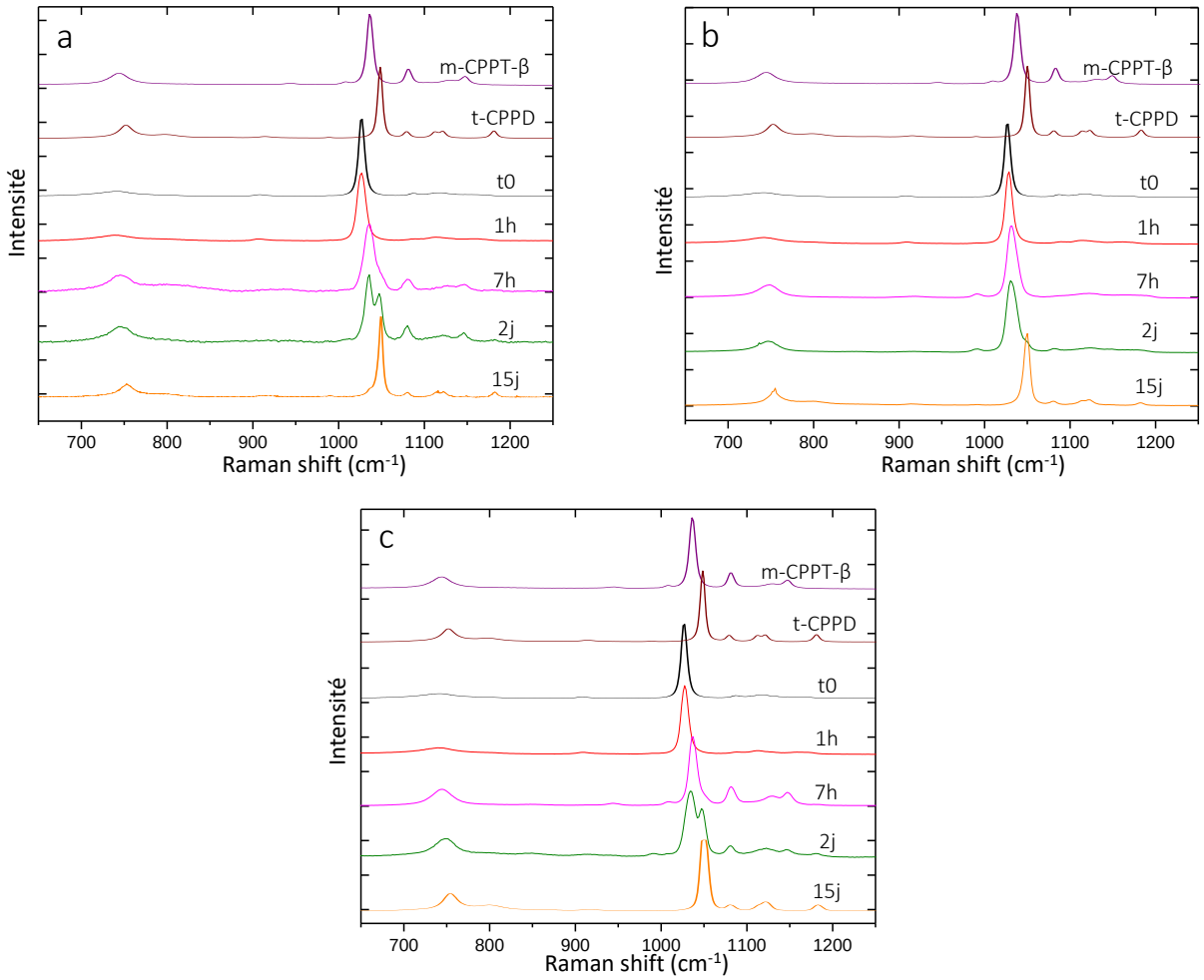


Figure V.9 : Spectres Raman dans le domaine 650 et 1250 cm^{-1} de la canaphite-α après différents temps d'évolution dans l'eau ultra-pure (a), l'eau ultra-pure acidifiée initialement à pH 4 (b) et pH 2 (c). Les spectres Raman d'une phase m-CPPT-β et t-CPPD synthétique pure de référence sont également présentés.

V.2.1.3 Observation microscopique

Les micrographies MEB de la canaphite-α avant et après évolution dans les différents milieux aqueux sont présentées respectivement sur les figures V.10. Pour les trois milieux aqueux

étudiés, les micrographies à 1 heure (Fig.V.10a, 10e et 10i) montrent des plaquettes d'environ 10 µm de longueur et 2 µm de largeur regroupées en fagots de 50 µm. Cette morphologie est la même que celle décrite pour la canaphite-α (Fig.V.6) et dans l'article que nous avons récemment publié [Mayen 2020]. A 7 heures et 2 jours d'évolution dans l'eau ultra-pure (Fig.V.10b et 10c) et dans l'eau acidifiée à pH 4 (Fig.V.10f et 10g), des plaquettes au faciès plat plus large que précédemment et superposées les unes sur les autres apparaissent, ainsi que des cristaux sous forme d'aiguilles de longueur variant entre 5 et 15 µm et de largeur entre 1 à 3 µm. Ces morphologies de cristaux en plaquettes et aiguilles sont caractéristiques respectivement des cristaux de m-CPPT-β et de t-CPPD[71], ce qui confirment les résultats des analyses par DRX et par spectroscopie Raman (Figures V.8 et V.9). Pour ces deux études d'évolution, nous pouvons observer que les matériaux récupérés à 15 jours sont composés en majorité d'aiguilles regroupées. Lors des évolutions dans l'eau ultra-pure au pH initial 2, la morphologie des cristaux de canaphite-α semble être légèrement modifiée. En effet, les cristaux forment des plaquettes plus petites (~ 5 µm) et plus fines dès 1 heure d'évolution (Fig.V.10k et 10l). Les plaquettes se sont ensuite regroupées en fagots de plus de 100 µm de largeur à 2 jours (Fig.V.10k). La morphologie des cristaux de canaphite-α semble donc avoir été modifiée comme suggérée par les analyses DRX et de spectroscopie Raman montrant un changement de phase du matériau (Figures V.8 et V.9).

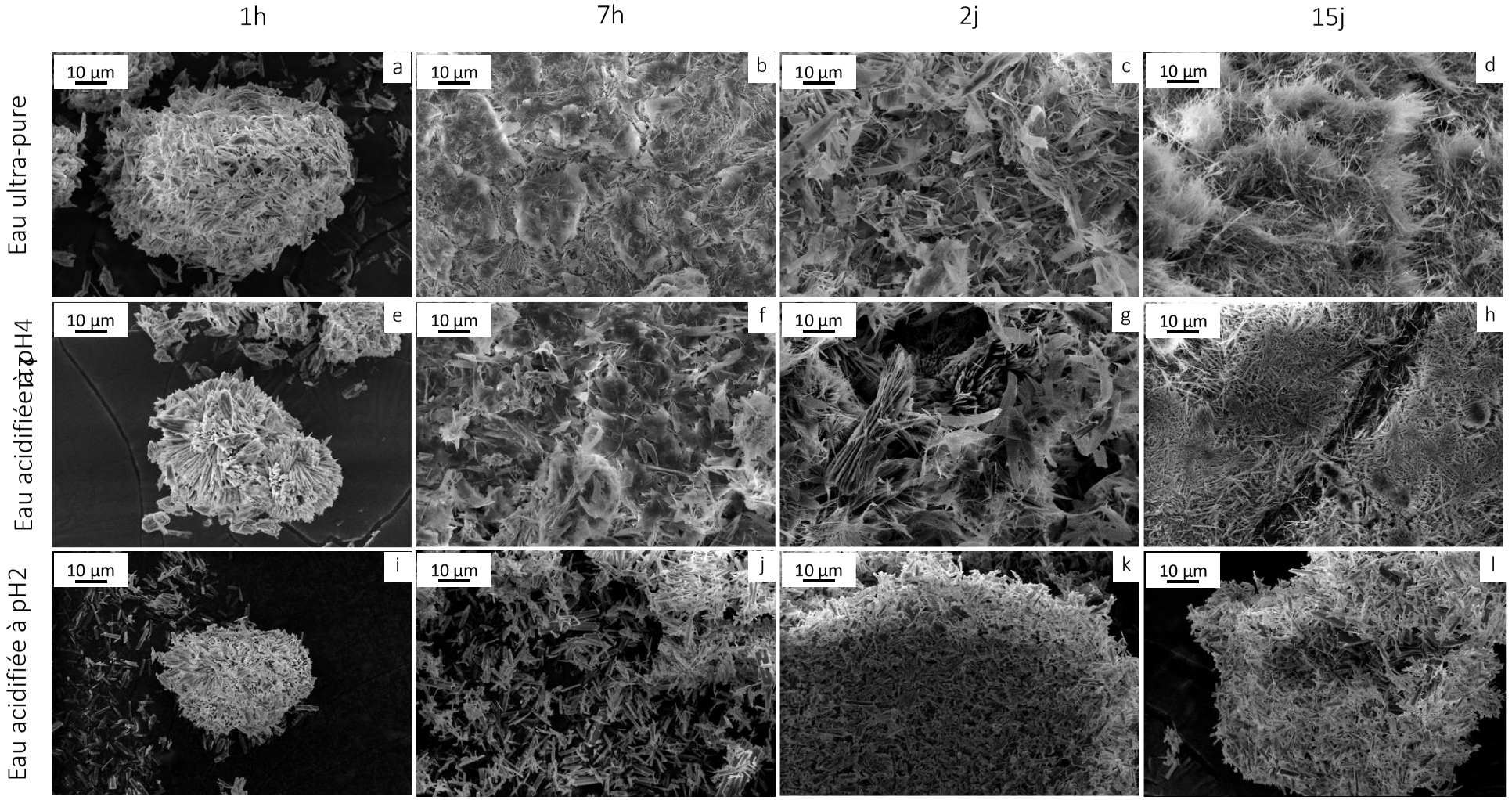


Figure V.10 : Micrographies MEB de la canaphite-α après différents temps d'évolution dans de l'eau ultra-pure (a, b, c et d), dans l'eau acidifiée à pH 4 (e, f, g et h) et dans l'eau acidifiée à pH 2 (i, j, k et l) .

V.2.2. Caractérisation des milieux

En parallèle, le pH des solutions a été mesuré pour chaque temps d'immersion et le dosage des ions calcium, sodium, orthophosphate et pyrophosphate a été réalisé.

V.2.2.1 Evolution du pH

La figure V.11 présente l'évolution du pH dans les solutions lors des études d'immersion dans l'eau ultra-pure (en considérant un pH = 7 initialement), l'eau acidifiée à pH 4 et à pH 2. Les solutions lors des évolutions dans l'eau ultra-pure ou acidifiée à pH 4 ont environ les mêmes valeurs de pH aux temps d'immersion choisis. En effet, même si leur pH initial n'est pas le même on retrouve un pH légèrement supérieur à 8 à 1 heure d'évolution, puis le pH augmente jusqu'à pH 10 à 7 heures d'immersion avant de se maintenir à cette valeur jusqu'à 15 jours. Lors des évolutions à pH 2, à 1 heure d'immersion, le pH augmente légèrement jusqu'à 2,4, puis une hausse du pH de 2 unités par rapport au pH initial est rapportée à 7 heures d'évolution. Il diminue légèrement à pH 3,2 à 2 jours puis semble se stabiliser jusqu'à 15 jours.

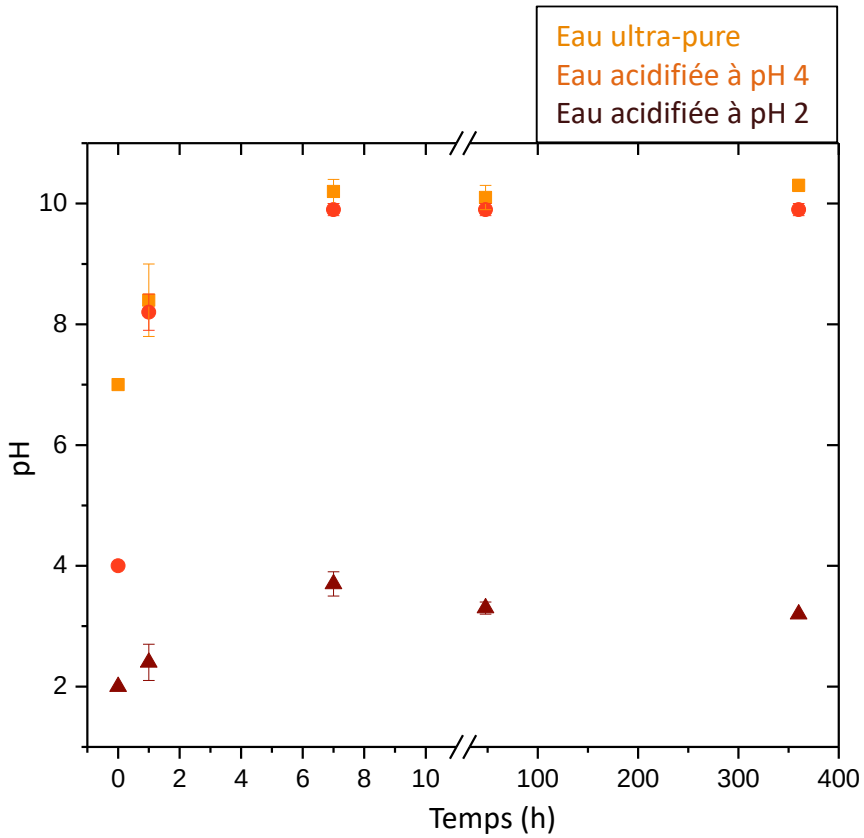


Figure V.11 : Evolution du pH en solution en fonction du temps lors des évolutions de la canaphite-α dans l'eau ultra-pure, l'eau acidifiée à pH 4 ou à pH 2.

V.2.2.2 Dosages chimiques

Les dosages des solutions récupérées après évolution de la canaphite dans l'eau ultra-pure n'ont pas pu être réalisés du fait d'une contamination (problème rencontré également pour l'étude de l'évolution des matériaux NaPG-0X0 dans l'eau ultra pure, cf. chapitre III). Dans tous les autres cas, la quantité des ions calcium et sodium a été mesurée par spectrométrie d'absorption atomique, l'orthophosphate par dosage colorimétrique et le pyrophosphate grâce à un kit commercial PPi Light dans les milieux correspondant aux évolutions dans l'eau acidifiée à pH 4 et pH 2 (figure V.12). Nous pouvons remarquer que des ions orthophosphate sont présents en solution en raison de l'hydrolyse des ions pyrophosphate favorisée dans des solutions à pH acide. Lors des évolutions à pH 4 les éléments sont légèrement libérés à 1 heure : 0,5 mM pour le calcium, l'ortho et le pyrophosphate et environ 1 mM pour le sodium. Dès 7 heures d'immersion, les éléments sont libérés en plus grande quantité sauf le calcium dont la concentration ne dépasse pas 1 mM en solution pour les temps étudiés. L'ortho et le pyrophosphate ont une concentration libérée respective avoisinant les 3 mM de 7 heures à 15 jours d'évolution. Le sodium est l'élément dont la concentration est la plus élevée en solution, allant de 5,5 mM à 7 heures, puis à un peu plus de 7 mM à 2 et 15 jours. Par contre pour les évolutions à pH 2, les concentrations ioniques libérées sont plus élevées qu'à pH 4, ce qui est en accord avec les évolutions de perte de masse. Dès 1 heure, plus de 8 mM de sodium sont relargués, ce qui correspond pratiquement à la totalité de sodium initialement présent dans le matériau. Cette concentration diminue ensuite légèrement à 7 mM à 7 heures puis se stabilise en solution. Les ions pyrophosphate libérés en solution ont une concentration avoisinant les 6 mM pour tous les temps d'évolution étudiés alors que les concentrations en ions calcium et orthophosphate ont une concentration maximale en solution à 1 heure (3,8 mM pour le calcium et 2,8 mM pour l'orthophosphate) correspondant à environ 75% du calcium total de la canaphite-α, avant de diminuer légèrement à 2 jours. La concentration en calcium reste stable à 15 jours (2,7 mM) alors que celle de l'orthophosphate augmente jusqu'à 3,3 mM.

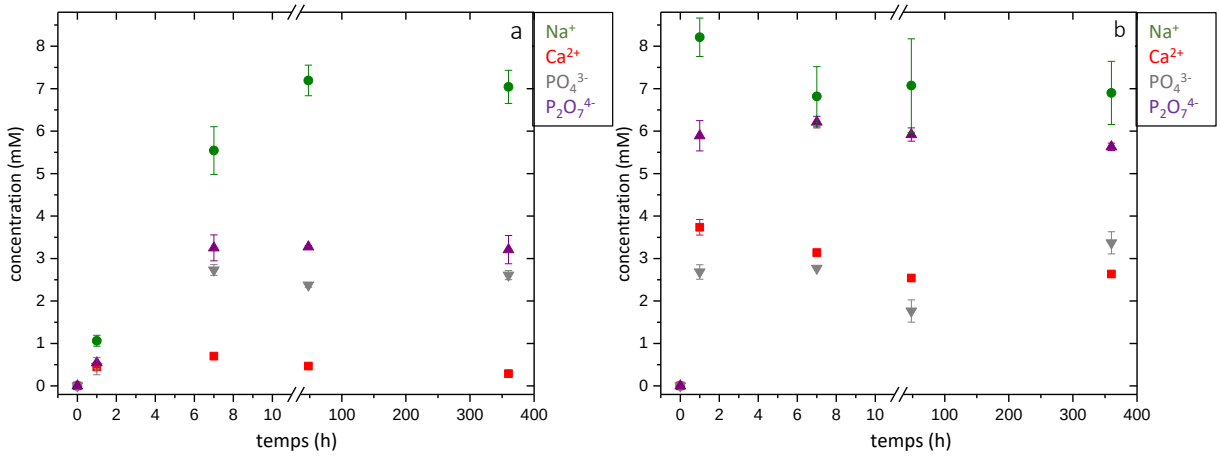


Figure V.12 : Concentration des ions calcium, sodium, orthophosphate et pyrophosphate en solution en fonction de la durée d'immersion de la canaphite-α dans l'eau ultra-pure acidifiée à pH 4 (a) et pH 2 (b).

V.2.3. Discussion sur l'effet du pH

Lors des évolutions dans l'eau à différents pH initiaux, la canaphite-α a perdu environ 70 % de sa masse initiale dans l'eau ultra-pure et l'eau acidifiée à pH 4, et plus de 90% dans l'eau acidifiée à pH 2. Dans tous les milieux, le pH a augmenté de manière significative dû à la libération des ions phosphates. Pour chaque étude, il s'est formé dans un premier temps une phase de pyrophosphate de calcium tétrahydratée, m-CPPT-β, puis une phase de pyrophosphate de calcium dihydratée t-CPPD. Les indices de sursaturation des solutions par rapport aux phases de pyrophosphate de calcium ont été calculés grâce au logiciel PHREEQC et les indices de sursaturation des phases d'orthophosphates de calcium (hydroxyapatite, phosphate tricalcique et phosphate octocalcique) grâce aux logiciel MINTEQ en fixant le pH et la température comme lors des évolutions des matériaux NaPYG-0X0 (figure V.13). Nous pouvons observer que les milieux sont sursaturés par rapport aux phases de pyrophosphate de calcium qui ont été identifiées par analyse DRX et spectroscopie Raman (m-CPPT-β et t-CPPD), ainsi que la phase m-CPPD à tous les temps à pH 4 et dans la solution à 7 h à pH 2. De plus, les solutions des évolutions à pH 4 sont également sursaturées par rapport à l'hydroxyapatite, au β-TCP et à l'OCP.

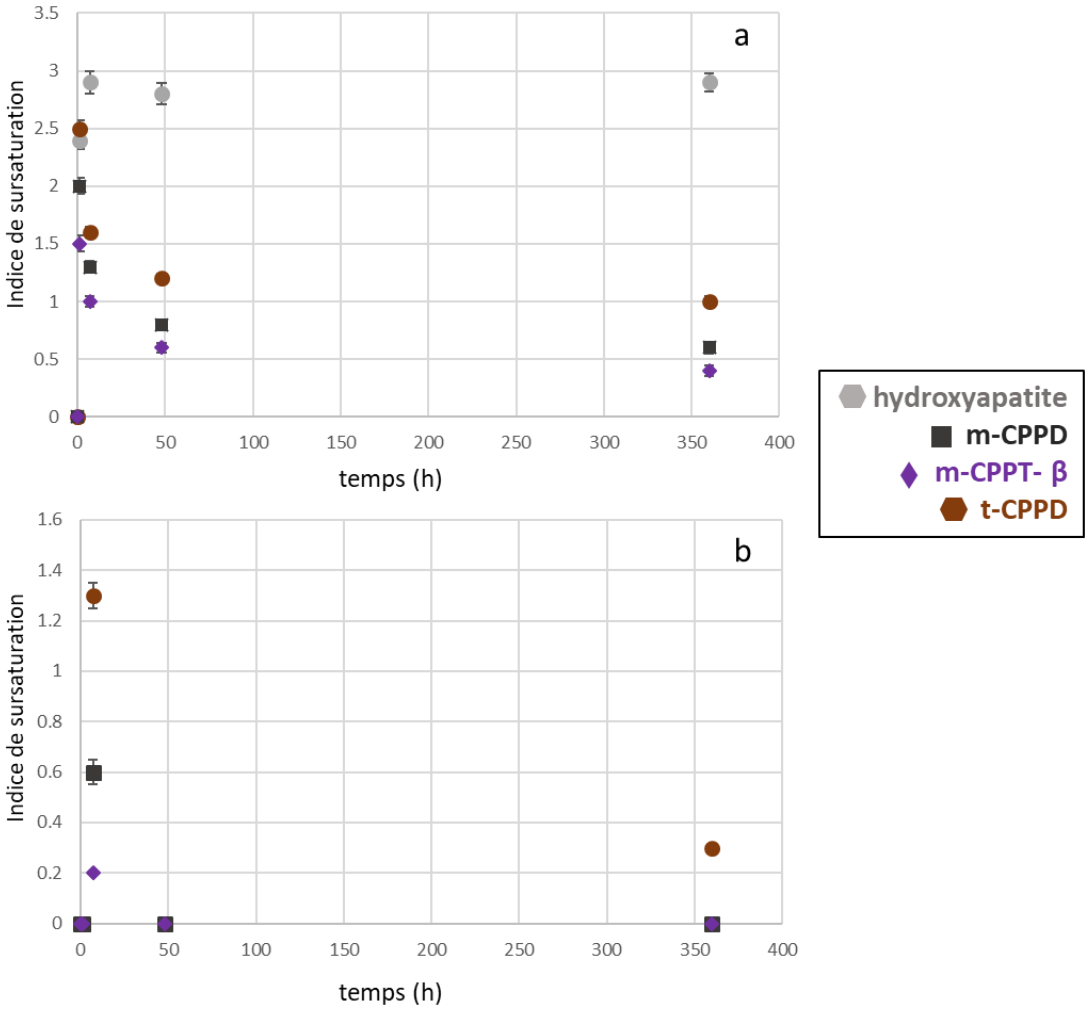


Figure V.13 : Indice de sursaturation des solutions recueillies après différents temps d'évolution de la canaphite-α dans l'eau acidifiée à pH 4 (a) et à pH 2 (b) vis-à-vis de différents phases d'ortho et pyro phosphates de calcium, calculé grâce à MINTEQ et PHREEQC.

Comme l'évolution de la canaphite-α n'a pas mené à une phase cristallisé d'orthophosphate de calcium alors que les solutions à pH 4 sont sursaturées vis-à-vis de différents orthophosphates de calcium, nous pouvons en conclure que les ions pyrophosphate dans les milieux ont inhibé leur cristallisation[54] comme ce qui a été observé de manière récurrente précédemment (Chapitres III et IV). Il a également été montré que le sodium est libéré pratiquement dans son intégralité par rapport à sa quantité initiale dans le matériau dès la première heure à pH 2 et à 2 jours à pH 4. La canaphite-α évolue donc de la même façon dans les différents milieux mais la cinétique d'évolution (transformation de phase à l'état solide et/ou dissolution/reprécipitation) est différente. En effet, lors du passage de la canaphite-α à m-CPPT-β, tout le sodium présent dans la canaphite initiale est libéré ce qui pourrait suggérer un mécanisme de transformation « solide »,

c'est-à-dire une restructuration du cristal due à la perte de sodium. Grâce aux dosages des milieux, il a également été observé que des ions pyrophosphate et calcium ont été libérés en solution en quantité relativement élevée dès 7 heures et 1 heure d'évolution respectivement à pH 4 et pH 2. Cette forte libération suivi d'une légère diminution de la concentration en ion calcium laisse à penser que la formation de la phase m-CPPT-β et/ou le passage de m-CPPT-β à t-CPPD seraient réalisés selon un mécanisme de dissolution/reprécipitation. Lors de sa thèse, P. Gras[71] a montré qu'en laissant maturer une phase amorphe a-CPP pendant 2 semaines à pH légèrement acide et température physiologique celle-ci cristallise en phase m-CPPT-β, puis lorsque le pH et la température augmente jusqu'à pH 5,8 et 50°C, la phase m-CPPT-β évolue vers une phase dihydratée m-CPPD. Lors des évolutions de la canaphite-α, le pH n'est pas stabilisé, et donc dans les premiers temps d'immersion le pH reste modérément acide, la phase m-CPPT-β pourrait se former dans ces conditions idéales par dissolution/reprécipitation. Puis lorsque le pH augmente au cours du temps, les conditions deviennent optimales pour la formation de phases dihydratées telles que m-CPPD et t-CPPD. A pH de l'eau ultra-pure et à pH initial 4 la vitesse d'évolution est pratiquement identique, mais elle est accélérée à pH 2.

V.3. Evolution en milieux tampons

La canaphite-α a ensuite été immergée dans un milieu SBF réalisé en suivant le même protocole que lors de l'étude de l'évolution des matériaux NaPYG-0X0 (chapitre III) pendant 7 heures, 2 jours et 15 jours, ainsi que dans un milieu de culture acellulaire α-MEM pendant 2 et 15 jours. Suite à la filtration de l'échantillon aux temps choisis et au lavage du matériau restant, le matériau a été caractérisé par DRX, spectroscopie Raman et MEB et la quantité de calcium, d'orthophosphate et de pyrophosphate ainsi que le pH ont été mesurés en solution. La quantité élevée de sodium dans la solution de SBF (142 mM) et α-MEM (145 mM) gêne la détermination précise d'éventuel changement de concentration de cet ion en solution liée à l'immersion de la canaphite-α. Les résultats des évolutions dans les 2 milieux tamponnés à pH 7,5 pour le SBF et 8.2 pour le α-MEM sont présentés ensemble afin de pouvoir comparer les éventuels effets des différents milieux tamponnés sur l'évolution physico-chimique de la canaphite-α.

V.3.1. Caractérisation des matériaux

La figure V.14 présente la masse restante pesée après les différents temps d'évolution dans chaque milieu tamponné et exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale. La perte de masse de la canaphite-α lors des évolutions dans le SBF s'élève à environ 14% à 7 heures d'immersion et cette valeur ne varie pas significativement par la suite (2 et 15 jours). Dans le milieu de culture le matériau n'a pas non plus perdu beaucoup de masse : la perte s'élève à 12 % à 2 jours et seulement 20 % après 15 jours d'évolution.

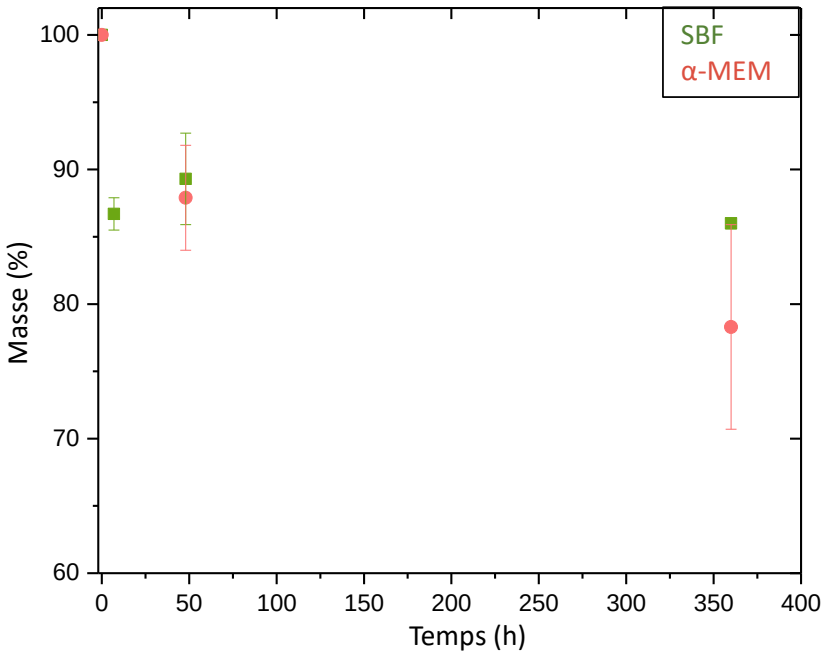


Figure V.14 : Evolution de la quantité de matériau restant en fonction de la durée d'immersion de la canaphite-α dans le milieu SBF et le milieu de culture α-MEM. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique par rapport à la masse de départ

La canaphite-α est ensuite caractérisée par des analyses DRX et de spectroscopie Raman ainsi que par des observations par MEB.

V.3.1.1 Diffraction des rayons X et spectroscopie Raman

La figure V.15 présente dans un premier temps les diagrammes de diffraction des RX et les spectres Raman de la canaphite-α ayant évolué dans les solutions SBF (Fig.V.15a et Fig.V.15c) et α-MEM (Fig.V.15b et Fig.V.15d). Sur les diagrammes RX, nous pouvons observer qu'aucun nouveau pic de diffraction n'apparait ou ne disparait par rapport au diagramme de la canaphite-α initial lors des évolutions dans ces deux milieux (Fig.V.15a et 15b). Les spectres Raman confirment les analyses DRX car la bande de vibration $\nu^{s}PO_3$ de la canaphite-α à 1027 cm^{-1} ne se décale pas et n'est pas modifiée lors des évolutions dans les deux milieux tampons (Fig.V.15c et 15d). Aucune nouvelle bande de vibration n'apparait sur les spectres des matériaux après immersion. Aucune nouvelle phase ne s'est donc formée au cours de l'évolution dans le SBF et dans le α-MEM.

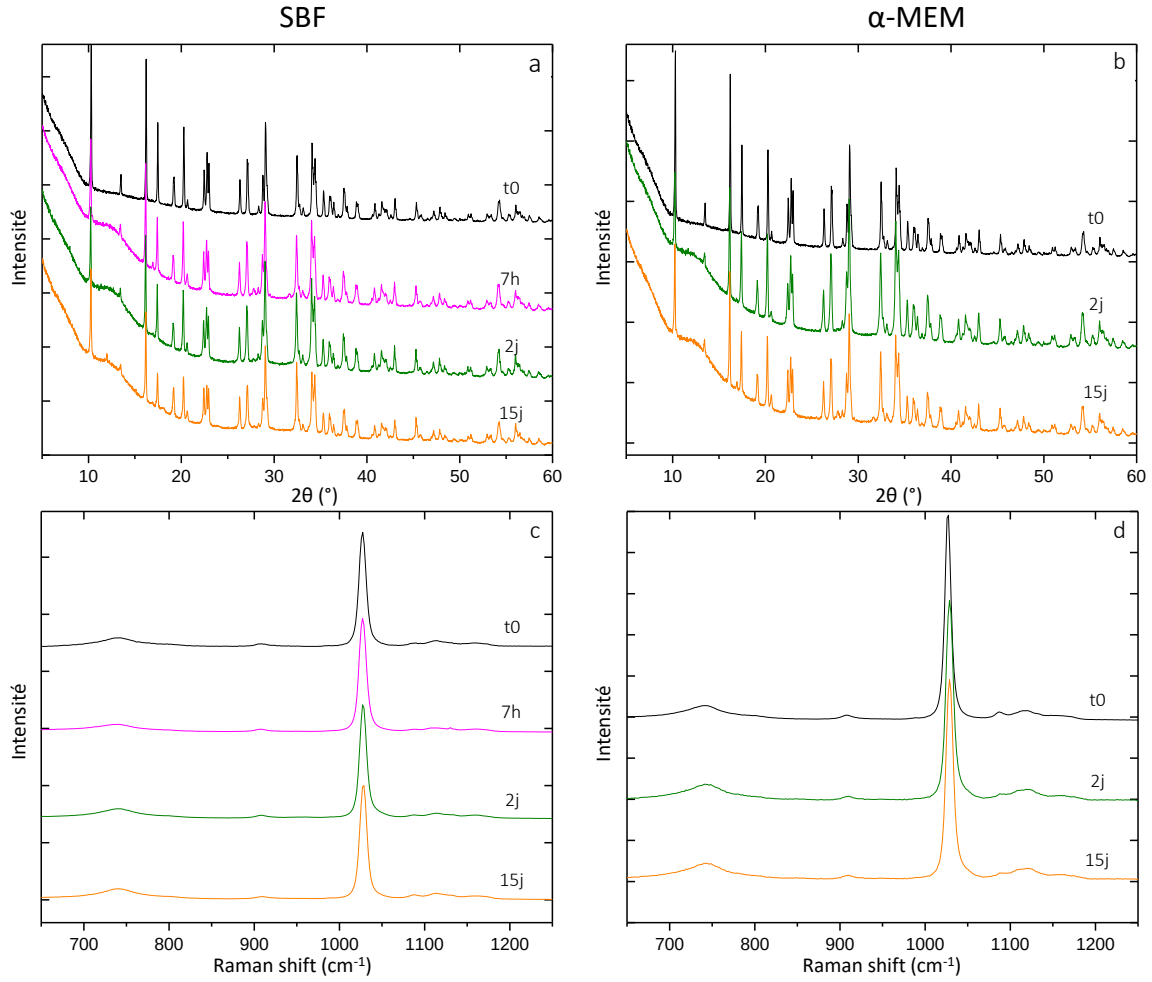


Figure V.15 : Diagrammes de diffraction RX et spectres Raman de la canaphite-α après différents temps d'évolution dans le SBF (a et c) et dans le α-MEM (b et d).

V.3.1.2 Observation microscopique

Les matériaux ont ensuite été observés au MEB après 2 et 15 jours d'évolution. Les images sont présentées sur la figure V.16. Les cristaux récupérés après 2 jours d'évolution dans le SBF (Fig.V.16b) ont toujours une morphologie en forme de plaquettes, cependant des cristaux de plus petites tailles que les cristaux de canaphite-α (~10 µm de longueur) ont également pu être observés. Ces petites plaquettes peuvent correspondre à des débris de canaphite-α qui se seraient formés en raison de l'agitation magnétique. A 15 jours d'évolution dans les milieux SBF et le α-MEM les cristaux de canaphite-α se sont regroupés en plus gros fagots (~100 µm) que ceux du matériau initial (Fig.V.16c et 16e). L'agglomération des cristaux de pyrophosphate m-CPPD immergés en présence d'albumine a déjà été rapportée et serait due à la forte interaction des protéines entre elles[170]. En effet, les protéines formeraient un revêtement à la surface des cristaux

via des interactions faibles, mais de fortes interactions entre elles favoriseraient l'agglomération des cristaux de m-CPPD et pourrait expliquer l'agglomération des cristaux de canaphite-α observée lors des évolutions en milieu α-MEM.

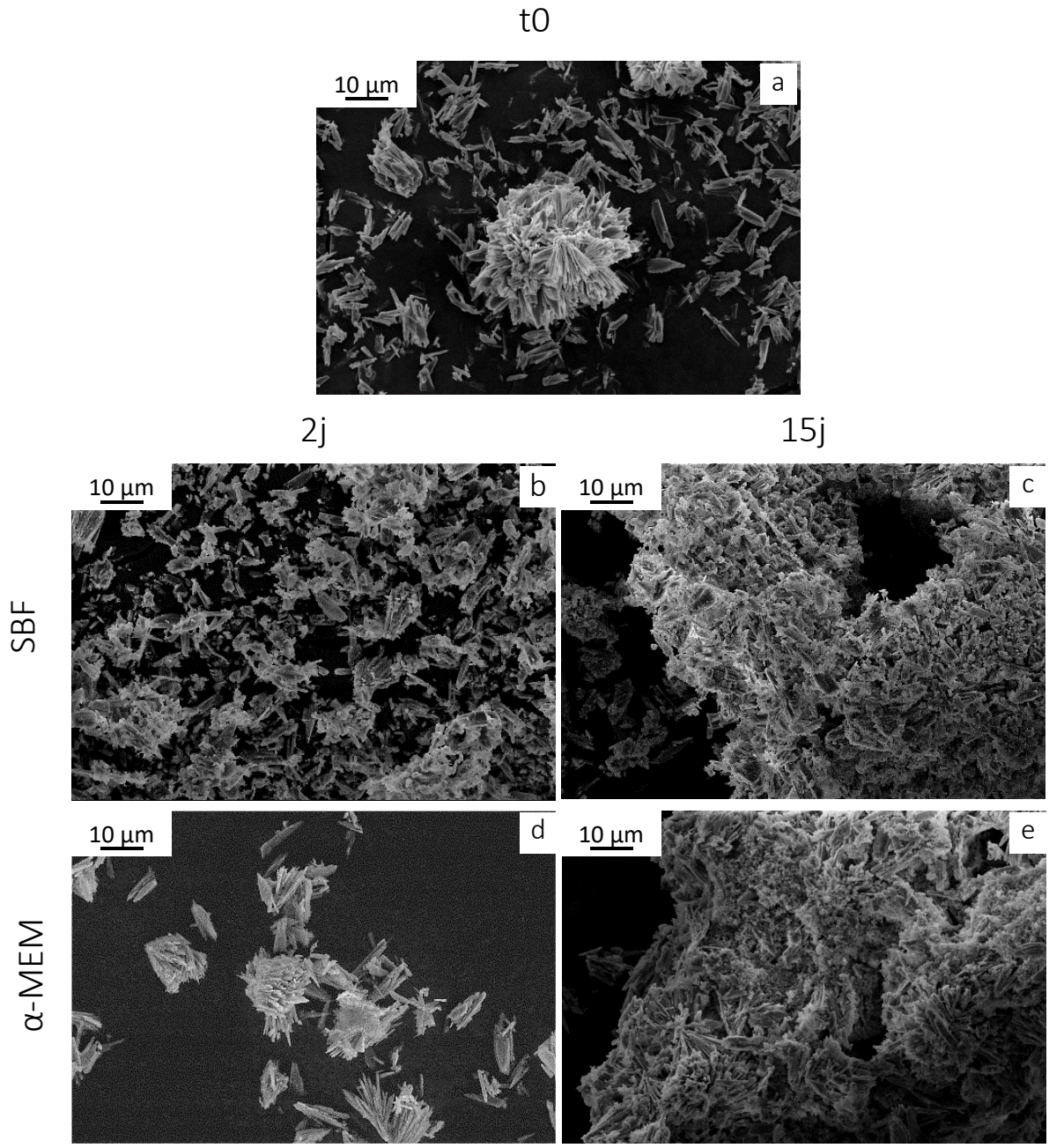


Figure V.16 : Micrographies MEB de la canaphite-α initiale (a) et après différents temps d'évolution (2 et 15 jours) dans le SBF (b et c) et dans le α-MEM (d et e).

V.3.2. Caractérisation des milieux

V.3.2.1 Evolution du pH

Le pH des solutions a été mesuré juste après séparation du matériau et la figure V.17 présente son évolution. Dans le milieu SBF le pH a légèrement augmenté de 0,1 unité à 7 heures, puis a atteint pH 7,7 à 2 jours, avant de diminuer à 7,6 à 15 jours. Dans le milieu de culture par contre, le pH a diminué à pH 7,8 à 2 jours puis a augmenté à pH 8,4 à 15 jours.

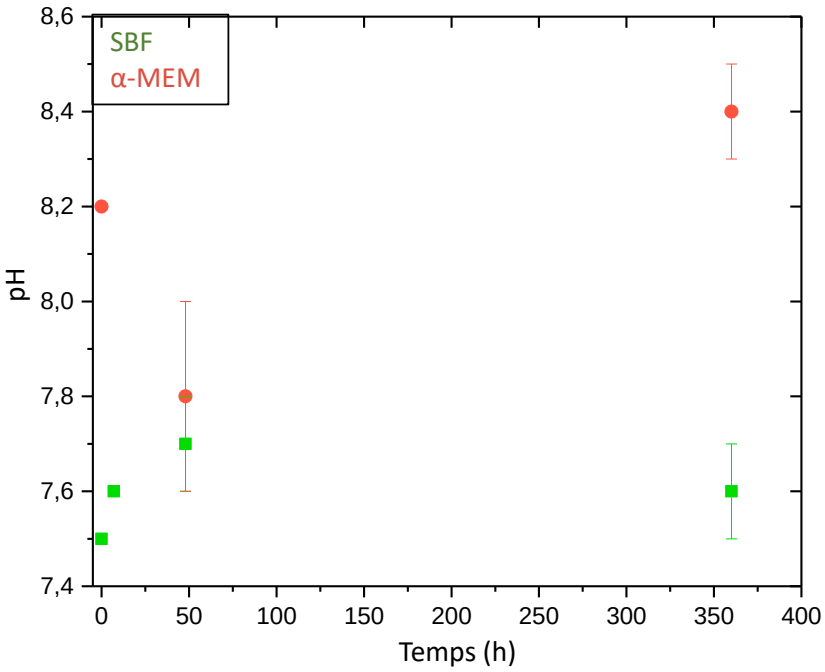


Figure V.17 : Mesure du pH en solution SBF (en vert) et α-MEM (en rose) lors des évolutions de la canaphite-α après différents temps.

V.3.2.2 Dosages chimiques

Les milieux ont été dosés après l'évolution de la canaphite-α et les concentrations du calcium, de l'orthophosphate et du pyrophosphate après les différents temps d'immersion sont présentées sur la figure V.18. Dans un premier temps, nous pouvons observer que toutes les solutions titrées contiennent des ions pyrophosphate. Nous rapportons une concentration d'environ 10 µM dans les solutions de SBF et de 20 µM dans les solutions de α-MEM pour chaque temps choisi. Lors des évolutions dans le SBF (Fig.V.18a), la concentration de calcium et d'orthophosphate à 7 heures d'évolution a augmenté respectivement de 0,5 et 0,7 mM par rapport à leur concentration initiale dans la solution, puis leur concentration diminue pour revenir à la valeur initiale à 2 jours (environ 2,5 mM pour le calcium et 1 mM pour l'orthophosphate). A 15

jours d'immersion dans le SBF, la concentration en orthophosphate est toujours à 1 mM et celle de calcium est plus basse de 0,5 mM par rapport à sa valeur initiale. Pour les évolutions en milieu de culture (Fig.V.18b), la concentration en orthophosphate a augmenté de 0,2 mM à 2 jours puis est revenue à la valeur initiale à 15 jours d'immersion, alors que la quantité de calcium a diminué de 0,2 mM à 2 jours et de 0,8 mM à 15 jours. L'augmentation du pH observée dans la solution SBF peut s'expliquer par la libération de phosphate en solution.

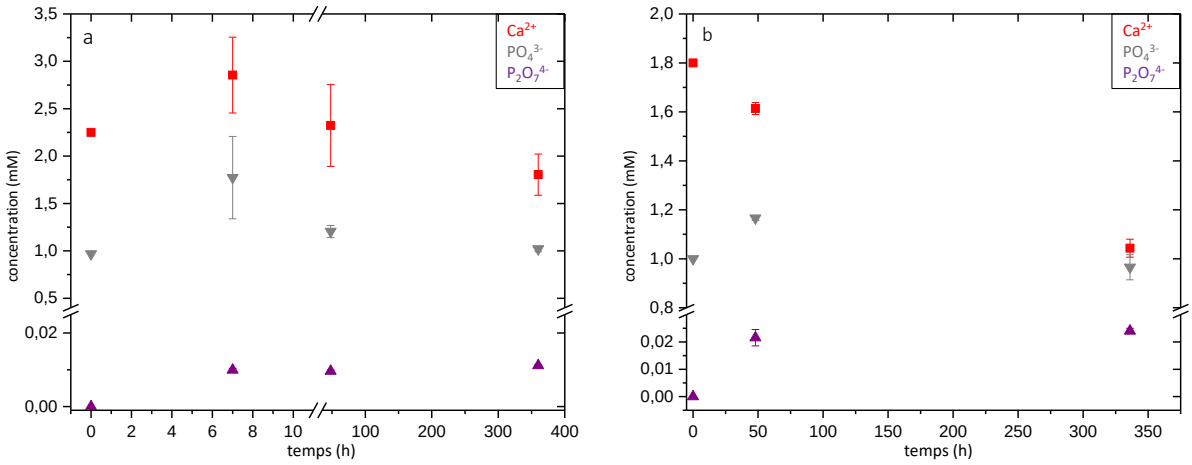


Figure V.18 : Concentration des ions calcium, orthophosphate et pyrophosphate en solution en fonction de la durée d'immersion de la canaphite-α dans les solutions SBF (a) et α-MEM (b).

V.3.3. Discussion

Globalement l'ensemble des résultats obtenus, montre qu'en milieu tamponné tel que la solution SBF et le milieu α-MEM, la canaphite-α est relativement stable contrairement aux évolutions identifiées précédemment dans l'eau à différents pH. Les indices de sursaturation des solutions ont été calculées et sont présentés sur la figure V.19. Nous pouvons observer que le milieu est sursaturé par rapport à plusieurs phases d'orthophosphate de calcium dont l'hydroxyapatite qui a l'indice de sursaturation le plus élevé. Cependant elle n'a pas précipité très probablement en raison de la présence d'ions pyrophosphate en solution[54], connus pour inhiber la cristallisation de l'hydroxyapatite. D'autres phases de pyrophosphate de calcium ne se sont pas non plus formées contrairement au test d'évolution dans l'eau acidifiée ou non, soit dû à la plus grande quantité en ions orthophosphate que pyrophosphate en solution ce qui a inhibé la formation de cristaux pyrophosphate de calcium, soit à cause de la forte concentration en sodium dans la solution SBF et l'α-MEM. En effet, les ions sodium en solution ont limité l'échange ionique entre les protons du milieu et le sodium du matériau en diminuant le gradient de concentration du sodium vers la solution, réduisant ainsi la dégradation de la canaphite. Ainsi la comparaison des évolutions dans l'eau acidifiée ou non d'une part, et les milieux tamponnés riches en sodium (SBF et α-MEM) d'autre part, révèle le rôle clé joué par le sodium dans la stabilité en solution de la

canaphite-α en fonction de la plus ou moins grande labilité du sodium dans la phase selon la composition du milieu et donc des échanges ioniques possibles entre la canaphite et le milieu. De plus, les micrographies MEB ont révélé une agglomération des cristaux à 15 jours d'évolution en milieu de culture qui serait dû à l'adsorption à la surface des cristaux de protéines présentes en solution favorisant l'interaction protéine-protéine et donc l'agglomération des cristaux[170]. Ainsi, les protéines composées des acides aminés présents dans le milieu α-MEM se seraient adsorbées à la surface des cristaux de canaphite-α. De part des interactions fortes entre elles, les protéines en surface se condenseraient, entrainant ainsi la formation d'agglomérats de cristaux. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par des analyses de surface des cristaux après évolution tel que de l'AFM (microscope à force atomique).

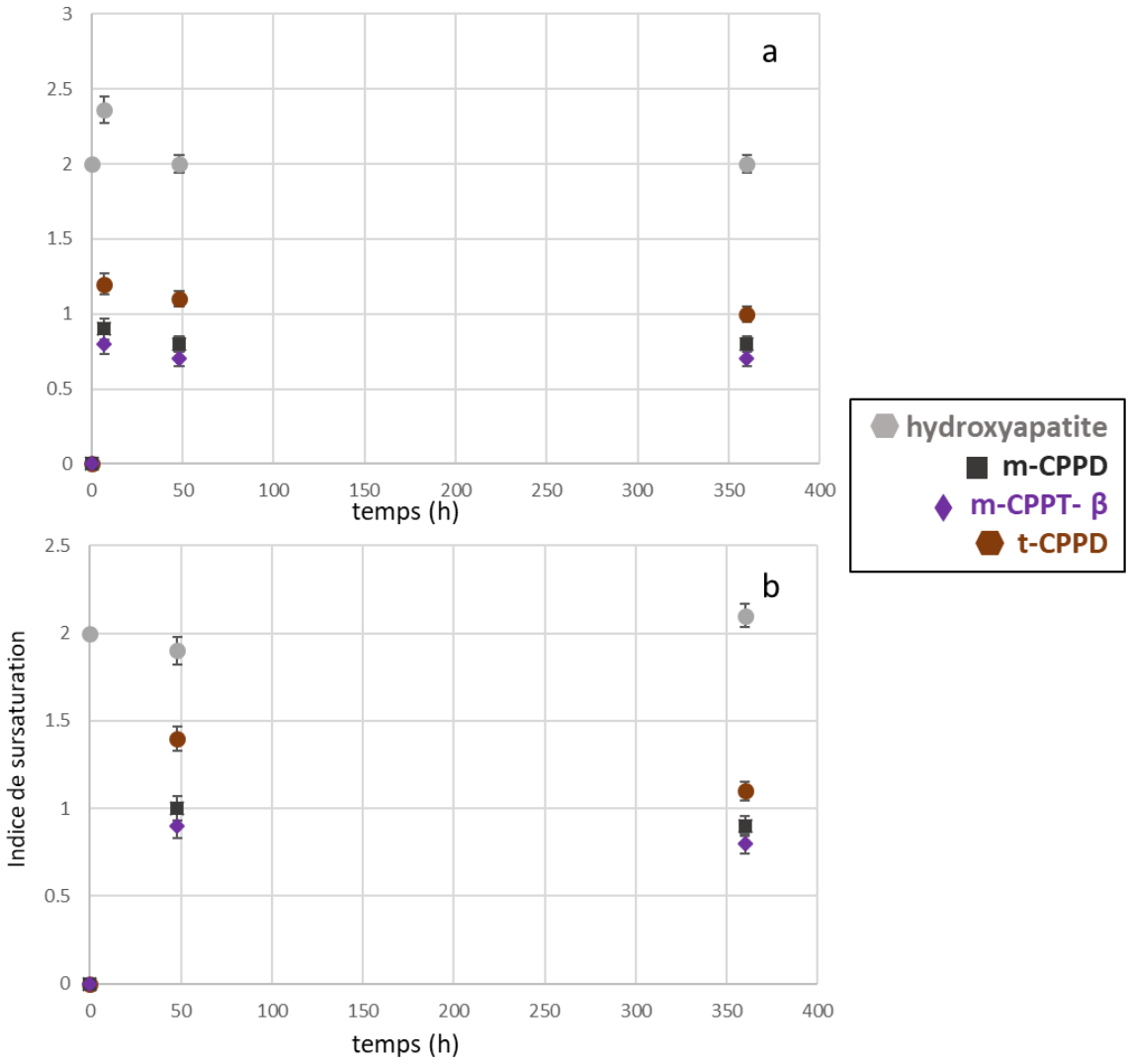


Figure V.19 : Indice de sursaturation vis-à-vis de différents phases d'ortho et pyro phosphates de calcium des solutions recueillies après différents temps d'évolution de la canaphite-α dans les solutions SBF (a) et α-MEM (b), calculé grâce à MINTEQ et PHREECQ.

V.4. Etude de l'évolution de la canaphite-α en présence d'enzymes

Afin de compléter cette étude de l'évolution de la canaphite-α dans divers milieux aqueux, nous avons exploré comment ce matériau composé uniquement de pyrophosphate se comportait en présence d'enzymes de type phosphatase alcaline (PAL). La canaphite-α sous forme de poudre a été immergée pendant 6 jours dans un milieu TRIS en présence des mêmes enzymes commerciales que celles utilisées lors de l'étude présentée dans le chapitre IV et en milieu TRIS sans PAL qui servira de témoin, afin de pouvoir examiner l'effet potentiel de ces enzymes sur la canaphite-α. Le protocole, les concentrations en TRIS (0,5 M) et en PAL (1660 $U.L^{-1}$) sont les mêmes que lors de l'étude de l'évolution des matériaux NaPYG-0X0 (chap. IV).

Dans une seconde série de tests, la poudre de canaphite-α est immergée dans le même type de solution avec enzymes mais pendant des temps plus courts (1 h, 7 h, 1 j et 2 j) et à titre de comparaison, une évolution au contact de cellules HBMSCs, incluant naturellement de la PAL, a été également réalisée par le laboratoire BioTis sur une échelle de temps analogue. Pour finir, la cytotoxicité et l'activité métabolique de la canaphite-α sur des HBMSCs ont été étudiées en collaboration avec le laboratoire BioTis.

V.4.1. Comparaison de l'évolution de la canaphite-α en milieu tampon TRIS avec et sans enzymes

Après 6 jours d'immersion dans une solution TRIS (0,5 M) tamponnée à pH 8,1, en présence ou non de PAL, les matériaux ont été séparés des milieux, puis lavés à l'eau et à l'éthanol et enfin caractérisés par DRX, spectroscopie Raman et MEB, et les ions calcium, sodium, orthophosphate et pyrophosphate ont été dosés dans les solutions.

V.4.1.1 Caractérisation des matériaux

La masse des matériaux après évolution a été pesée et la masse restante exprimée en pourcentage par rapport à la masse initiale immergée est présentée sur la figure V.20. Pour les évolutions dans les deux milieux (TRIS avec et sans PAL), le matériau s'est dégradé et nous mesurons 28 % de masse restante à 6 jours d'évolution en milieu sans enzyme alors qu'il ne reste plus que 13 % après évolution en présence de PAL.

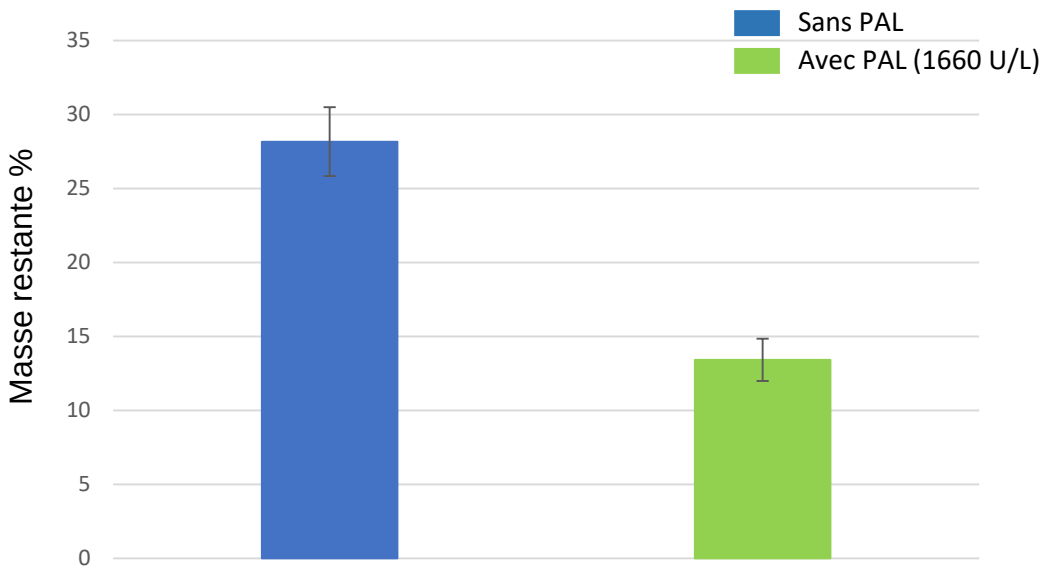


Figure V.20 : Masse restante de canaphite-α après 6 jours d'immersion dans une solution TRIS à 0,5 M en présence (en vert) ou non (en bleu) de phosphatase alcaline (PAL). Les résultats sont exprimés en pourcentage massique par rapport à la masse de départ.

V.4.1.1.1 Diffraction des rayons X

La figure V.21 présente les diagrammes de diffraction RX des matériaux après évolution dans la solution TRIS avec et sans enzymes, ainsi que celui des phases de pyrophosphate de calcium dihydratées (m-CPPD et t-CPPD) et tetrahydratée (m-CPPT-β) de référence. Après 6 jours dans le milieu TRIS sans enzyme, le diagramme RX montre plusieurs pics de diffraction que nous pouvons attribuer à trois phases de pyrophosphate de calcium. En effet, le pic de diffraction à 7° correspond à celui de la phase m-CPPT-β ($Ca_2P_2O_7{\cdot}4H_2O$), à 11° le pic peut être attribué à la phase m-CPPD ($Ca_2P_2O_7{\cdot}2H_2O$) et ceux à 11 et 13° peuvent se rapporter à la phase t-CPPD ($Ca_2P_2O_7{\cdot}2H_2O$). Ces phases ont déjà été identifiées lors des évolutions de la canaphite-α dans l'eau. Plus surprenant, à 6 jours d'immersion en présence d'enzymes le diagramme de diffraction RX ne montre plus aucun pic de diffraction ; toute la canaphite-α a disparu et le matériau restant est donc amorphe.

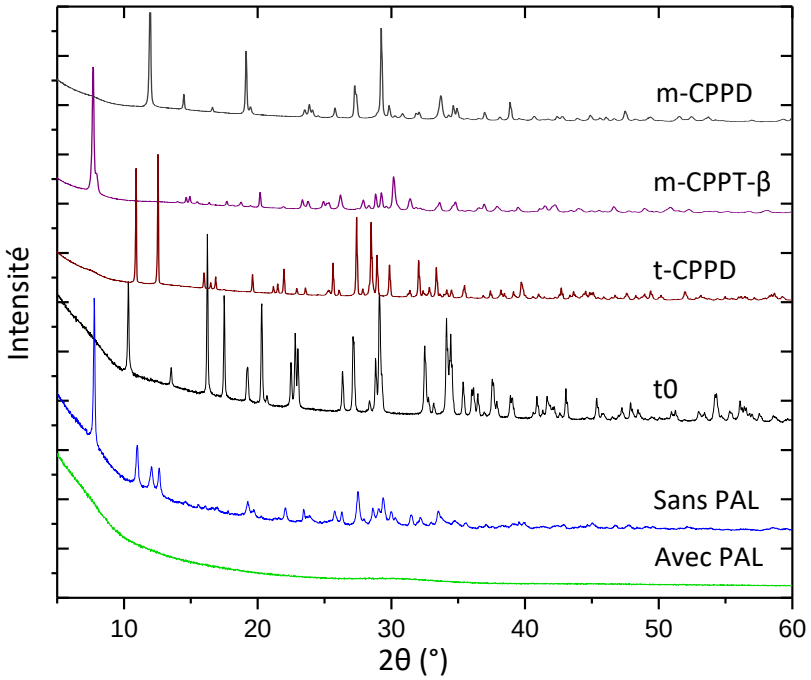


Figure V.21 : Diagrammes de diffraction RX de la canaphite-α après 6 jours d'immersion dans une solution TRIS en présence ou non d'enzymes. Les diagrammes de diffraction RX des phases canaphite-α, m-CPPT-β, m-CPPD et t-CPPD synthétiques pures de référence sont également présentés.

V.4.1.1.2 Spectroscopie Raman

Les matériaux ont également été caractérisés par spectroscopie Raman et leurs spectres sont présentés sur la figure V.22. Le spectre du matériau ayant évolué dans le milieu TRIS sans enzyme voit sa bande de vibration $\nu^{s}PO_3$ se décaler à 1049 cm^{-1}, correspondant à la bande $\nu^{s}PO_3$ de la phase t-CPPD dont le spectre est également illustré sur la figure V.16. D'autre part, on peut remarquer que le spectre de la canaphite-α ayant évolué en présence de PAL a été modifié (voir le domaine spectral 650-1250 cm^{-1} sur la figure V.22). Nous pouvons observer que la bande $\nu^{s}PO_3$ s'est légèrement décalée vers les plus grands nombres d'onde et que celle-ci s'est élargie, comme la bande $\nu^{s}POP$ à 750 cm^{-1} qui sont maintenant aussi large que les bandes de vibrations du spectre de phosphate de calcium amorphe (aCPP). Comme la spectroscopie Raman est sensible à la cristallinité du matériau, cet élargissement est surement dû à l'amorphisation de la canaphite-α, révélée par DRX (Fig.V.21). De plus, une bande de vibration à 960 cm^{-1} est apparue et peut être attribuée à la bande $\nu^{s}PO_4$ des groupements orthophosphate. Encore une fois, ces résultats montrent que lorsque la canaphite-α évolue dans un milieu sans sodium, elle forme des phases pyrophosphate de calcium hydratées.

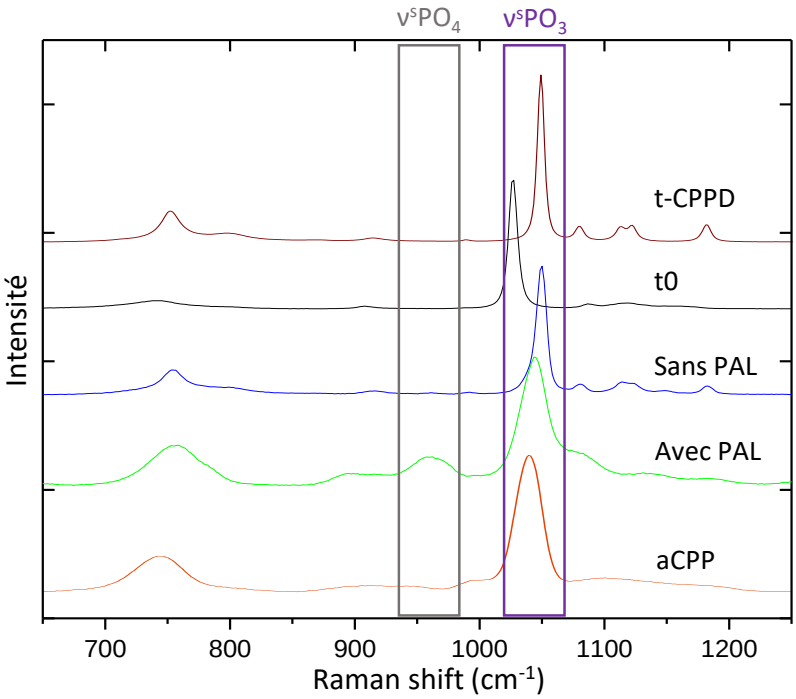


Figure V.22 : Spectres Raman de la canaphite-α après 6 jours d'immersion dans une solution TRIS en présence ou non d'enzymes. Les spectres des phases canaphite-α, t-CPPD et d'un phosphate de calcium amorphe (aCPP) synthétiques pures de référence sont également présentés.

V.4.1.1.3 Observation microscopique

Les micrographies des matériaux ayant évolué dans le TRIS avec (Fig.V.23b) et sans enzymes (Fig.V.23a) sont présentées sur la figure V.17. Après 6 jours d'évolution dans la solution TRIS (Fig.V.23a), 2 formes distinctes de cristaux sont observées : des plaquettes à faciès plat de longueur environ 5 µm pouvant correspondre à la phase m-CPPT-β et des aiguilles de longueur variant entre 5 et 10 µm et de largeur entre 1 à 3 µm pouvant être identifiées à la phase m-CPPD et/ou t-CPPD[71]. Sur la micrographie du matériau qui a évolué en présence de PAL (Fig.V.23b), nous pouvons reconnaître la forme des plaquettes de canaphite-α d'environ 10 µm de longueur, cependant les particules ont des arêtes moins nettes et semblent toutes se lier entre elles pour former un matériau plus cohésif avec une surface rugueuse.

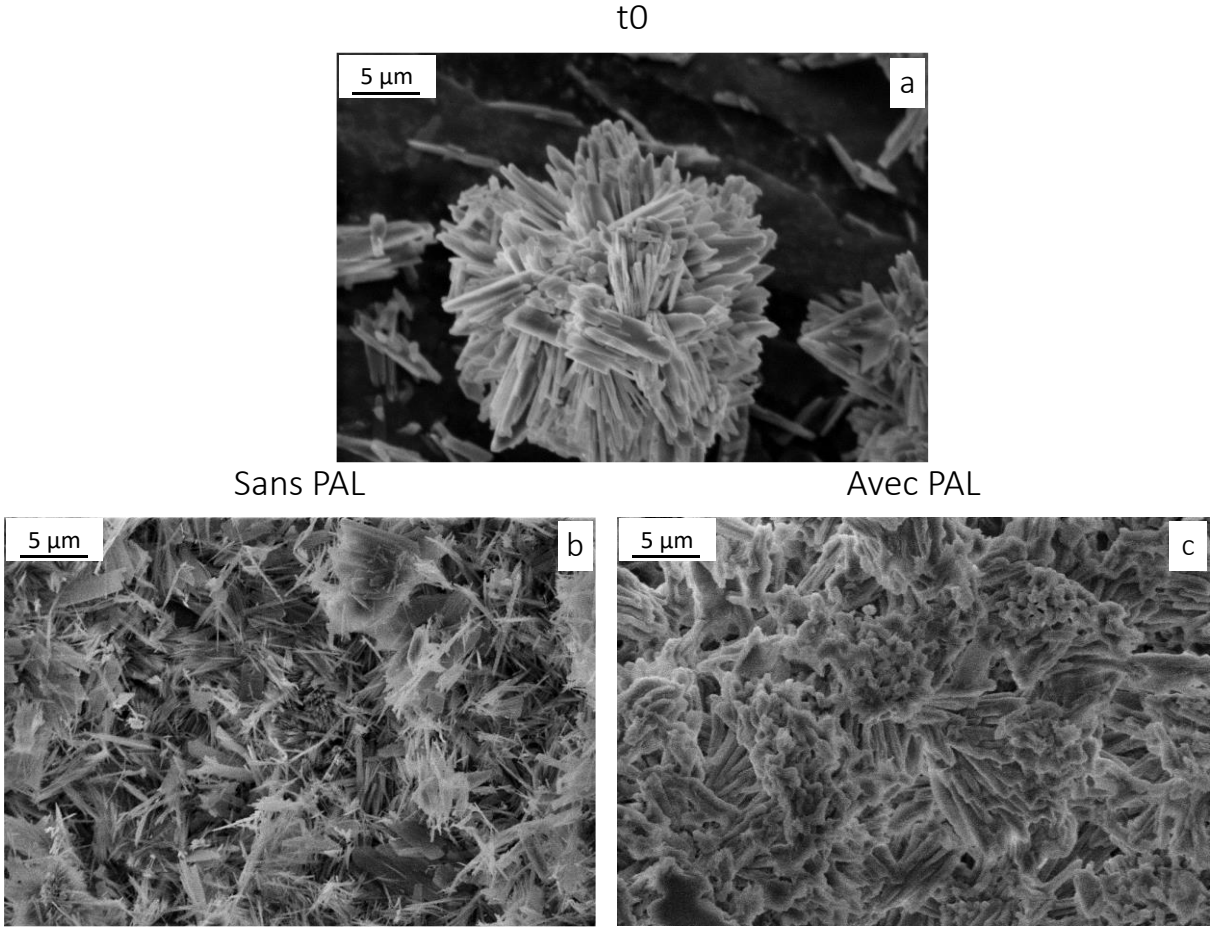


Figure V.23 : Micrographies MEB de la canaphite-α avant (a) et après 6 jours d'évolution dans une solution de TRIS (0,5 M) avec (c) et sans enzymes (b).

V.4.1.2 Caractérisation des milieux

Lors des évolutions de la canaphite-α dans la solution TRIS, le pH n'a pas changé, il est resté à pH 8,1 dans les solutions avec et sans enzymes. Les concentrations ioniques du sodium, du calcium, de l'ortho et du pyrophosphate ont également été mesurées et sont présentées sur la figure V.24. Pour l'évolution dans les deux milieux le sodium est l'élément le plus libéré (entre 6 et 7 mM) par la canaphite-α et représente pratiquement la totalité du sodium présent dans le matériau initial. Les quantités d'orthophosphate et de calcium sont plus élevées dans les solutions comportant des PAL. Nous rapportons 5 et 1,5 mM d'orthophosphate et de calcium dans le milieu TRIS avec enzymes alors que leur concentration respective n'est que de 0,3 mM dans la solution TRIS après 6 jours d'évolution. La concentration en pyrophosphate est au contraire supérieure en milieu TRIS sans enzyme. En effet, elle est de 35 µM alors que cette concentration ne dépasse

pas les 25 µM en présence d'enzymes. Cette différence est surement due à l'hydrolyse partielle des ions pyrophosphate par les PAL décrit dans le chapitre IV.

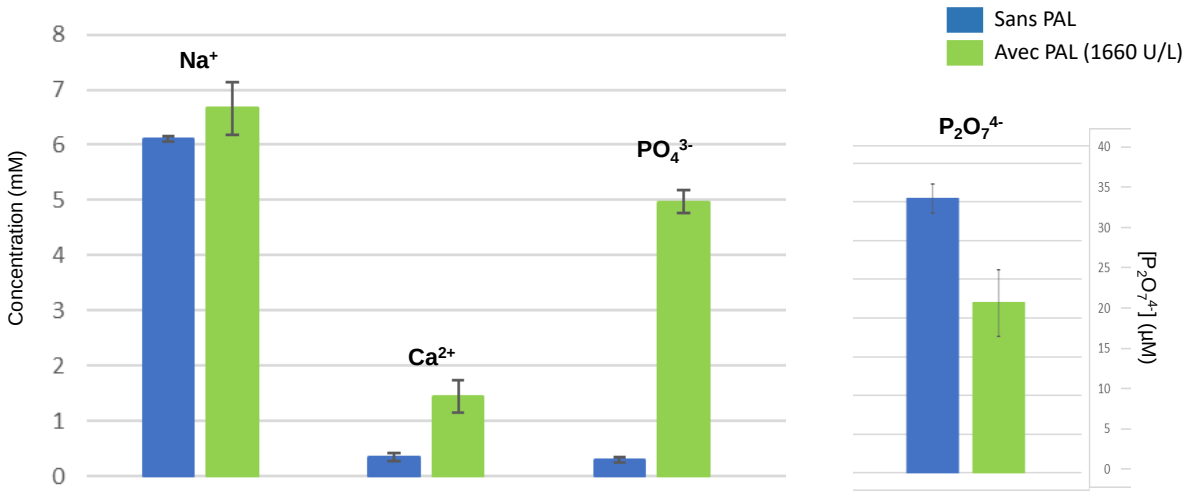


Figure V.24 : Concentration des ions sodium, calcium, orthophosphate et pyrophosphate à 6 jours d'immersion de la canaphite-α, en solution TRIS avec et sans enzymes. L'axe correspondant à la concentration en ions pyrophosphate est donné sur la droite de la figure.

V.4.2. Evolution en fonction du temps

Afin de compléter les premiers résultats sur l'évolution de la canaphite-α en présence d'enzymes PAL et d'essayer de préciser à partir de quel moment un matériau amorphe est formé, une seconde série d'essais a été lancée en immergeant la canaphite-α a dans une solution TRIS avec ou sans enzymes (mêmes conditions que précédemment), mais pour des durées plus courtes (2 h, 7 h, 1 j et 2 j). Par ailleurs, la canaphite-α a également été immergée dans 2 mL de solution α-MEM à laquelle a été additionné 10 % de sérum de veau fœtal et 100 000 cellules HBMSCs pour comparer les évolutions avec et sans cellules sachant que les enzymes PAL sont présentes dans la membrane cellulaire de ces cellules après différenciation. Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans la partie IV.I.1.1.

V.4.2.1 Caractérisation des matériaux

La masse des matériaux après évolution en présence de HBMSCs n'a pas pu être mesurée car un pourcentage conséquent de poudres est resté dans la gélatine utilisée pour éviter l'adhésion des cellules à la plaque de culture, et aurait biaisé la pesée. Les matériaux ont été caractérisés par DRX et spectroscopie Raman et la canaphite-α ayant évolué dans le TRIS en présence d'enzymes a également été observée au MEB.

La figure V.25 présente l'évolution de la masse de matériau en fonction du temps après immersion dans la solution TRIS en présence de PAL. Dès 2 heures, la masse restante ne représente que 20 % de la masse initiale. La dégradation semble ensuite se stabiliser puisque nous retrouvons le même résultat aux autres temps d'immersion. L'essentiel de la dégradation du matériau semble se dérouler durant les deux premières heures d'évolution.

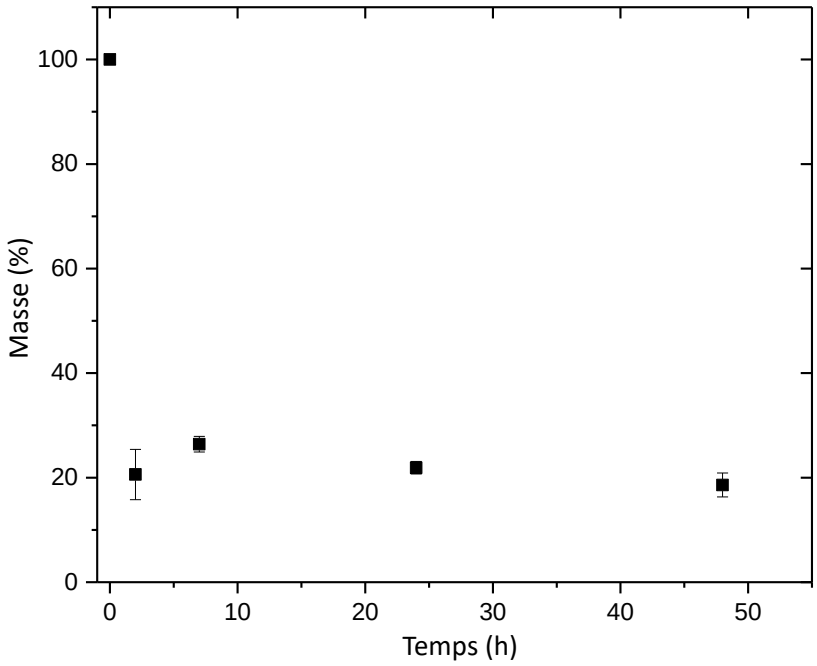


Figure V.25 : Evolution de la quantité de canaphite-α en fonction de la durée d'immersion dans une solution TRIS en présence de PAL sur 48 h. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique par rapport à la masse de départ.

Les résultats des analyses DRX et de spectroscopie Raman des matériaux après évolution dans la solution TRIS avec enzymes et dans le milieu α-MEM avec cellules ont ensuite été comparés et sont présentés sur la figure V.26. La caractérisation DRX montre que la canaphite-α a déjà disparu au bout de 2 heures d'évolution dans le TRIS en présence d'enzymes et qu'un matériau amorphe s'est formé (Fig.V.26a). Grâce à la spectroscopie Raman, nous pouvons observer que ce matériau amorphe présente une bande de vibration $\nu^{s}PO_3$ décalée vers les plus grands nombres d'onde et élargie dès 2 heures d'évolution par rapport à celle de la canaphite-α (Fig.V.26c). De plus, la bande de vibration que nous avons précédemment attribuée aux vibrations $\nu^{s}PO_4$ des groupements orthophosphate commence à apparaître sur le spectre à 2 heures d'évolution, puis son intensité s'amplifie au cours du temps. Nous pouvons aussi noter qu'un épaulement sur la bande $\nu^{s}PO_3$ à environ 1080 cm^{-1} se forme à partir d'un jour d'évolution et peut être attribué aux élongations ν_3 des orthophosphates[171]. En milieu de culture cellulaire, nous

pouvons observer sur le diagramme de diffraction des RX (Fig.V.26b) et sur le spectre Raman (Fig.V.26d) que la structure cristallisée de la canaphite-α n'a pas été modifiée. L'épaulement à 1005 cm^{-1} sur la bande $\nu^{s}PO_3$ des spectres à 7 heures et 2 jours d'évolution dans le milieu α-MEM également observé lors des évolutions des matériaux NaPYG-0X0 dans ce milieu (cf. Chap.III) peut être identifié aux groupements ν_1SO_4 des sulfates présents initialement dans le milieu de culture.

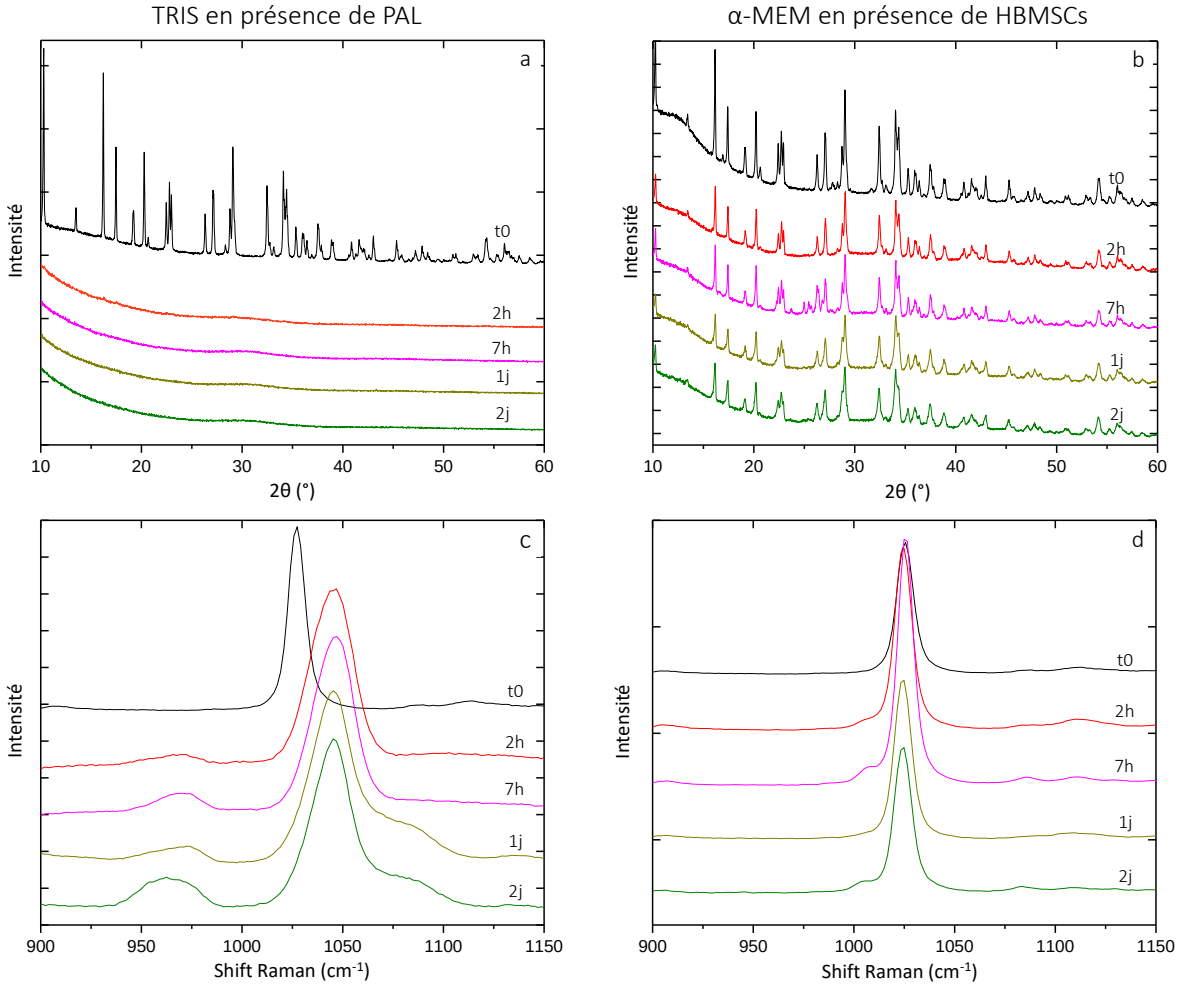


Figure V.26 : Diagrammes de diffraction des RX et spectres Raman de l'évolution de la canaphite-α en fonction du temps dans une solution TRIS en présence d'enzymes commerciales PAL (a et c) et dans une solution α-MEM au contact de cellules HBMSCs (b et d).

Sur les micrographies MEB du matériau immergé en milieu TRIS avec enzymes présentées sur la figure V.27 nous remarquons que la morphologie des cristaux de canaphite-α a été complètement modifiée mais différemment que sur la micrographie à 6 jours présentée sur la figure V.23. Dès 2 heures d'évolution les cristaux semblent s'être liés pour former un gros monolithe de 50 µm environ de largeur et longueur (Fig.V27b), et à 7 heures le matériau ne montre

plus de morphologie particulière (Fig.V27c). Enfin à 1 et 2 jours d'immersion en solution, le matériau commence à former une surface lisse qui entoure un cœur formé d'un réseau poreux sans forme particulière (Fig.V27d et 27e).

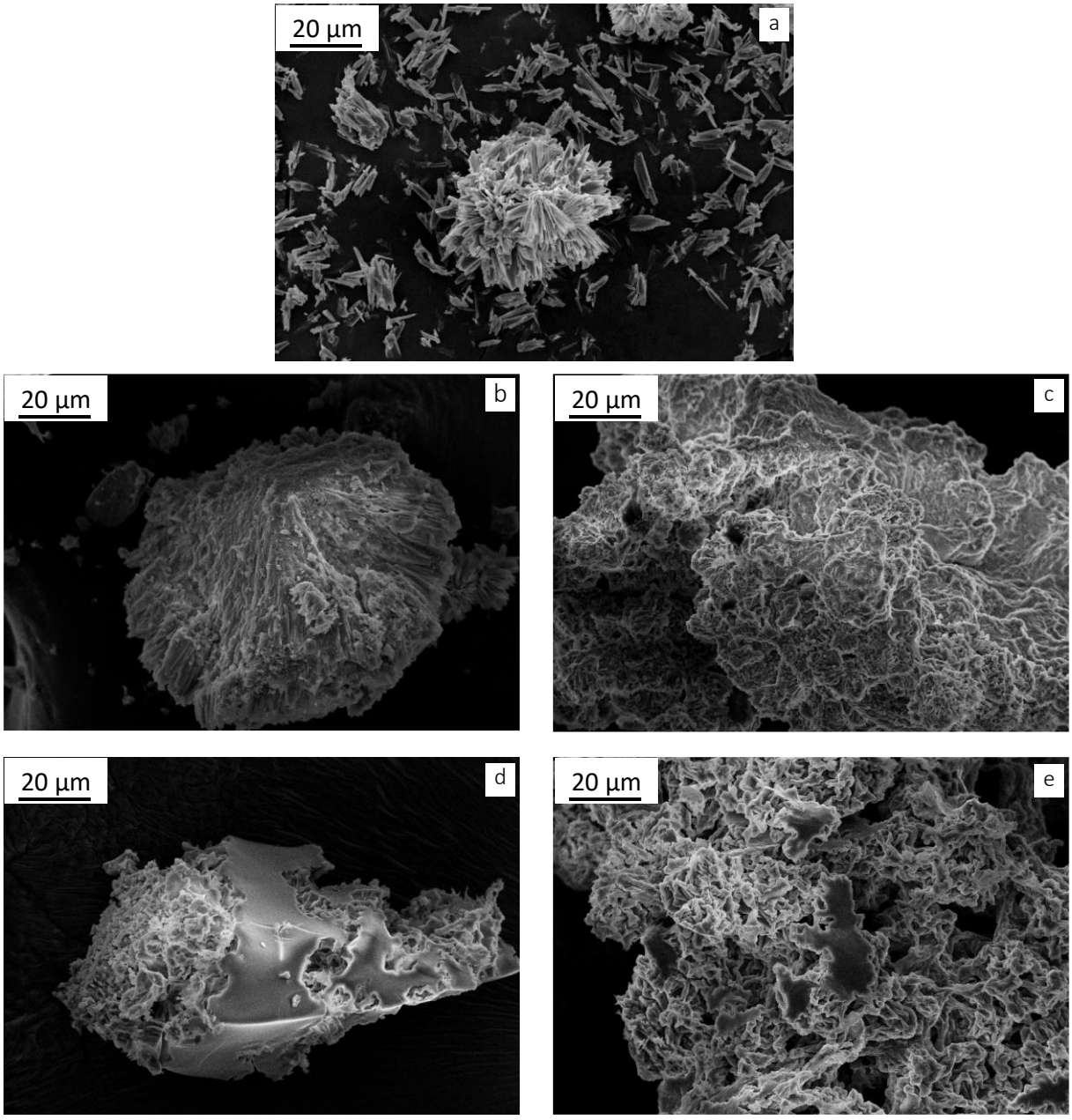


Figure V.27 : Micrographies MEB de la canaphite-α avant (a) et après 1 h (b), 7 h (c), 1 j (d) et 2 j (e) d'évolution dans une solution de TRIS (0,5 M) en présence d'enzymes commerciales PAL.

V.4.2.2 Caractérisation des milieux

Lors des évolutions dans le TRIS en présence d'enzymes le pH est resté stable à 8,1 à tous les temps étudiés. La concentration en sodium, calcium et phosphate total a été mesurée dans

chaque solution (figure V.28). La libération des ions s'effectue en grande partie dans les 2 premières heures d'évolution puis cette concentration se stabilise pendant les 2 jours suivants sauf pour le phosphate pour qui elle continue d'augmenter. Afin de confirmer les dosages réalisés à 6 jours d'immersion, nous pouvons remarquer que le sodium est l'élément libéré en plus grande quantité, à 2 heures sa concentration en solution est de 8,3 mM, ce qui représente environ 100 % de la quantité de sodium dans le matériau initial. La concentration en calcium monte jusqu'à 1,1 mM à 2 heures, et celle de phosphate à 3 mM. La concentration de phosphate est donc la seule qui continue d'augmenter au cours des 2 jours de l'étude et atteint environ 5 mM à 2 jours d'immersion.

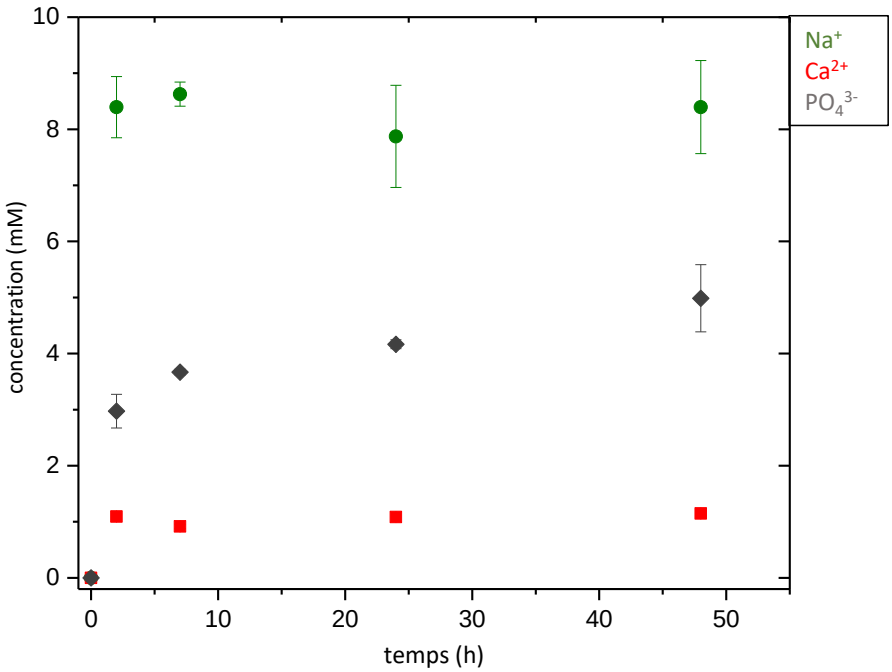


Figure V.28 : Concentration des ions calcium, sodium et phosphate en solution en fonction de la durée d'immersion (0 à 48 h) de la canaphite-α dans une solution TRIS à 0,5 M en présence d'enzymes commerciales PAL.

V.4.3. Discussion sur l'étude de l'évolution de la canaphite-α en présence de PAL

L'action des enzymes PAL sur la canaphite-α a été démontrée lors de cette étude. Le matériau initial a été complètement modifié que ce soit au niveau de sa morphologie, de sa structure cristallographique et de sa composition chimique. En considérant les 2 hypothèses d'évolution de la canaphite-α décrites précédemment, c'est-à-dire la transformation « solide » due à la libération de sodium et la dissolution du matériau puis sa reprécipitation en phase

pyrophosphate de calcium hydratée, il est possible d'expliquer l'effet des enzymes. Dans un premier temps, nous pouvons noter que le sodium a été libéré dans sa totalité durant les 2 premières heures d'immersion. Cependant le sodium a aussi été libéré lors des évolutions dans les autres milieux menant à des phases cristallisées de pyrophosphate de calcium hydraté et non pas à des solides amorphes. Les indices de sursaturation des milieux ont été calculés pour les phases orthophosphate de calcium par le logiciel MINTEQ et les solutions sont grandement sursaturées par rapport à l'hydroxyapatite dès 2 h cependant elle n'a pas précipité, surement à cause de la présence d'ions pyrophosphate (bien que leur concentration n'ait pas été mesurée dans ces milieux). Le mécanisme de réaction de la canaphite-α en présence d'enzymes, pourrait s'expliquer selon les hypothèses suivantes :

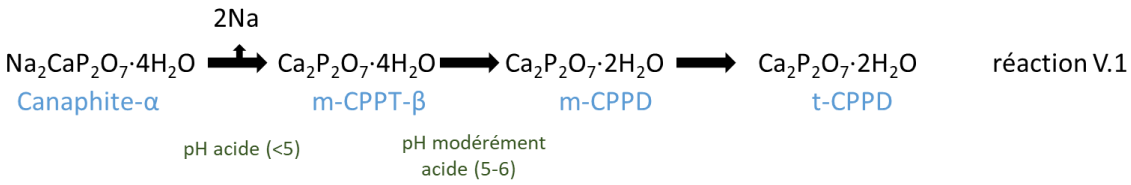
- Le milieu TRIS étant sans sodium, le sodium du matériau est libéré en solution dès les premières heures d'évolution
- Dans le même temps les enzymes se lient à la canaphite-α et hydrolysent le pyrophosphate du matériau
- Des ions PO_4^{3-} et $P_2O_7^{4-}$ sont libérés en solution
- Les ions $P_2O_7^{4-}$ sont très rapidement hydrolysés en solution (absence de détection) et ne peuvent reprécipiter en phase pyrophosphate de calcium comme observé lors des évolutions dans l'eau.
- La germination hétérogène de phases orthophosphate de calcium en surface des cristaux résiduels semble possible du fait de l'affinité chimique et de la sursaturation élevée, mais leur croissance est inhibée par la présence de pyrophosphate en solution. Ce qui mènerait à la formation d'une phase amorphe.

Alternativement l'hydrolyse « solide » des ions pyrophosphate et le maintien des ions orthophosphate dans la « structure » initiale, permettraient d'expliquer cette amorphisation. Le matériau issu des évolutions est donc composé d'ortho, de pyrophosphate et de calcium.

De plus, il a été montré lors des évolutions dans la solution tampon TRIS sans enzyme que la phase m-CPPD cristallisait à 6 jours d'évolution. Pour expliquer ce phénomène deux hypothèses sont possibles : la première hypothèse est liée à la capacité inhibitrice des ions orthophosphate dans la cristallisation des ions pyrophosphate et vice-versa. En effet, lors des évolutions en milieux aqueux, la canaphite-α n'a pas cristallisé en phase pyrophosphate de calcium dihydratée à chaque fois que la concentration en ions pyrophosphate était inférieure à la concentration en ions orthophosphate en solution. Cette observation, démontre la capacité inhibitrice des ions orthophosphate vis-à-vis de la cristallisation en phase pyrophosphate de calcium lorsque leur concentration est supérieure à celle des ions pyrophosphate. La seconde hypothèse est basée sur la très faible dégradation de la canaphite-α en milieu fortement concentré

en sodium. Lorsque la canaphite-α évolue dans des milieux sans sodium, elle recristallise (eau à différents pH et milieu TRIS sans enzyme), alors que quand du sodium est présent en solution (milieux tamponnés SBF et α-MEM) la canaphite-α ne recristallise pas. Le sodium dans le milieu limite drastiquement la dégradation du matériau en prévenant l'échange ionique entre les protons du milieu et le sodium du matériau. Pour valider l'une et/ou l'autre des hypothèses il serait nécessaire de refaire une étude d'évolution dans un milieu acide en présence de sodium. Ainsi, si la canaphite-α évolue en phase m-CPPT-β, m-CPPD ou t-CPPD alors que la concentration en sodium est élevée en solution nous pourrons en conclure que le mécanisme d'évolution de la canaphite-α est une dissolution/reprécipitation.

La réaction d'évolution de la canaphite-α en milieux aqueux sans enzyme et sans sodium pourrait se traduire, pour le moment par la réaction suivante :



réaction V.1

Lors de la première étape la canaphite-α libère tout le sodium ainsi que du calcium et du pyrophosphate en solution et se réorganise en phase m-CPPT-β. Parallèlement les ions pyrophosphate et calcium libérés précipitent en phase m-CPPT-β puisque les conditions de pH et de température sont propices à sa formation[71]. Ensuite l'augmentation du pH en solution favorise la formation de phases pyrophosphate de calcium dihydratées telle que m-CPPD par un mécanisme de dissolution/reprécipitation qui évoluera finalement vers la phase la plus stable thermodynamiquement : t-CPPD.

V.5. Etudes de la cytotoxicité et de l'activité métabolique de la canaphite-α

Les études de la cytotoxicité et de l'activité métabolique de la canaphite-α sous forme de pastille ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire BioTis, avec exactement le même protocole que pour les matériaux amorphes NaPYG-0X0 (Chap.IV). Les résultats présentés sur la figure V.29 sont exprimés en pourcentage par rapport à l'absorbance mesurée sur le témoin plastique et les matériaux sont considérés comme non cytotoxiques et ayant une activité métabolique si ce pourcentage est supérieur à 75%. Les cellules HBMSCs au contact des extraits de canaphite-α montrent une viabilité toujours supérieure à 75% au cours des 4 temps étudiés et donc la canaphite-α n'est pas toxique vis-à-vis de ces cellules. Par contre leur activité métabolique diminue au cours de temps et passe en dessous de la limite des 75% à 6 jours d'étude (E+J3). Les cellules sont donc bien en vie mais de moins en moins actives lorsqu'elles sont en contact d'extrait de canaphite-α. Cette diminution de l'activité métabolique pourrait être expliquée par une grande quantité de sodium libérée lors de la dégradation de la canaphite-α par les cellules, ce qui provoquerait une réaction d'inflammation[162].

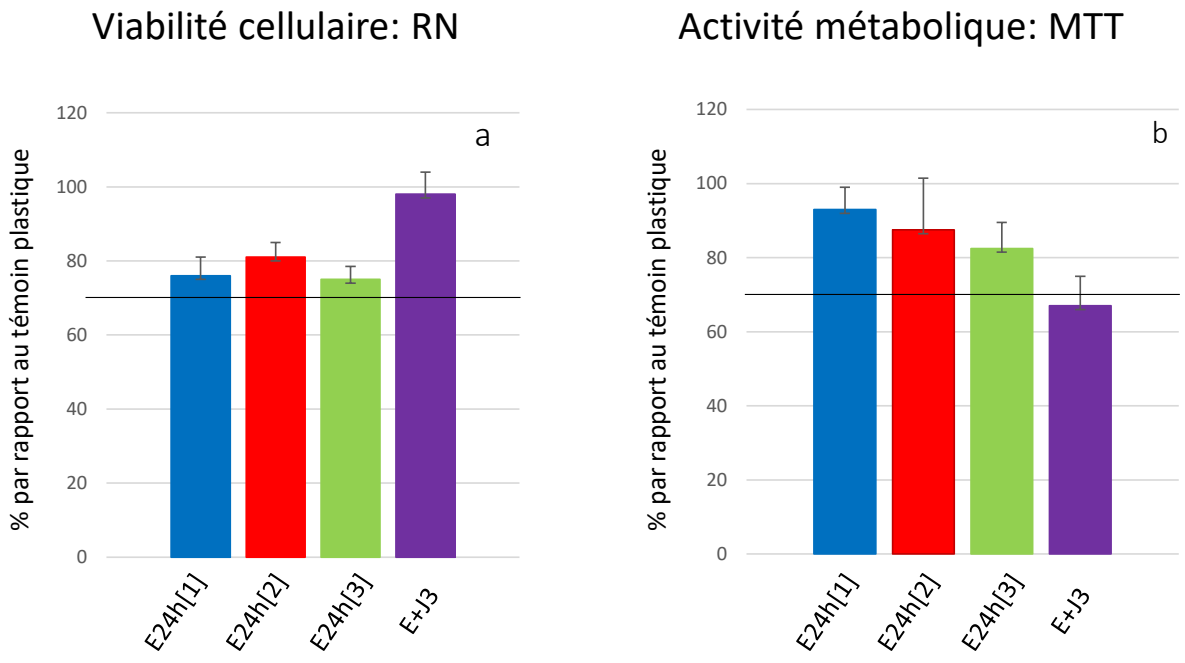


Figure V.29 : Viabilité cellulaire (a) et activité métabolique (b) de cellules HBMSCs au contact des différents extraits de la canaphite-α, exprimées en pourcentage par rapport au témoin plastique.

V.6. Conclusion

Les études d'évolution en milieu aqueux de la canaphite-α ont montré que le matériau n'est pas stable dans l'eau. En effet, lors des évolutions dans l'eau à différents pH la canaphite-α libère dans un premier temps le sodium. Lorsque la totalité du sodium est libéré le matériau se restructure en phase de pyrophosphate de calcium tétrahydratée m-CPPT-β. Cette phase métastable forme une phase de pyrophosphate de calcium dihydratée m-CPPD, et enfin t-CPPD qui est la phase pyrophosphate de calcium hydraté la plus stable thermodynamiquement. Nous avons aussi observé que si le pH diminue jusqu'à pH 2 la cinétique d'évolution est plus rapide. Dans les milieux fortement concentrés en sodium tels que la solution SBF et le milieu α-MEM, la dégradation de la canaphite-α est limitée. Il semblerait donc que le sodium soit fondamental dans la structure du matériau, tant que le sodium n'est pas libéré la structure et la stabilité de la canaphite-α sont maintenue. Cette hypothèse est soutenue par les évolution dans le tampon TRIS sans sodium, dans lequel la canaphite-α a recristallisé en plusieurs phases de pyrophosphate de calcium hydratées (m-CPPT-β, m-CPPD et t-CPPD). Pour conclure sur l'effet du sodium, une étude d'évolution de la canaphite en milieu acide et concentré en sodium serait nécessaire. L'étude de l'évolution en milieu TRIS en présence d'enzymes a montré que les PAL ont une grande influence sur la dégradation de la canaphite-α. En effet, en hydrolysant le pyrophosphate contenu dans le matériau, l'enzyme accélère la libération du sodium et des autres ions en solution. Les PAL hydrolysent les ions pyrophosphate en solution en orthophosphate ce qui inhibe la cristallisation en phase pyrophosphate de calcium. L'hypothèse nous paraissant la plus cohérente, serait qu'en hydrolysant le pyrophosphate dans le matériau, de l'orthophosphate se forme puis se lie par liaison hydrogène aux orthophosphate des autres composés amorphes désorganisant ainsi la structure cristalline de la canaphite, ce qui forme les grains de plusieurs dizaines de micromètres observés au MEB. Enfin il a été montré pour la première fois que le canaphite-α n'est pas un matériau cytotoxique pour les cellules HBMSCs mais que l'activité métabolique de ces cellules diminue en fonction du temps d'immersion de la canaphite-α dans l'extrait avec lequel elles sont ensuite mises en contact, surement due à la grande quantité de sodium libérée. En mesurant les concentrations ioniques et surtout celle du sodium de l'extrait il serait possible de conclure et d'expliquer cette diminution de l'activité métabolique observée.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans le domaine des substituts osseux, le développement de nouveaux matériaux de comblement capables d'induire une réponse biologique de l'organisme est de plus en plus recherché. La possibilité de stimuler les cellules présentes dans le tissu osseux par les éléments libérés par le matériau et de viser une dégradation biologiquement contrôlée fait partie des objectifs à court et moyen termes du projet ANR PyVerres (2017-2021) qui porte sur le développement de nouvelles compositions de matériaux amorphes mixtes ortho et pyrophosphates de calcium hydratés (NaPYG-0X0) et dans le cadre duquel s'inscrit cette thèse. Le premier objectif de ces travaux était d'étudier l'évolution physico-chimique des matériaux en fonction de leur rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates. Dans ce but, l'évolution de trois compositions de faible à forte proportion d'orthophosphate ont été étudiées dans des milieux de plus en plus complexes (eau ultra-pure acidifiée ou non à pH 2 et pH 4, milieux tampons SBF, α-MEM et TRIS en présence ou non d'enzymes de type phosphatase alcaline).

Les matériaux amorphes ont montré une grande stabilité dans les milieux concentrés en sodium (SBF, α-MEM) exceptée la composition pour laquelle la quantité d'orthophosphate était la plus élevée (NaPYG-050) ; une couche d'apatite s'est formée à la surface. Dans les milieux aqueux sans sodium, les matériaux ont eu tendance à cristalliser soit en pyrophosphates de calcium hydraté de type m-CPPT-β, m-CPPD ou t-CPPD lorsqu'ils étaient composés d'une proportion élevée de pyrophosphate, soit en apatite nanocristalline lorsque la quantité d'orthophosphate était initialement plus élevée. L'importance du rôle structurant du sodium dans la cohésion des clusters constituant les matériaux NaPYG-0X0 avait été évoqué dans la thèse de L. Mayen et a été confortée par les résultats des présents travaux. De plus, nous avons montré que plus le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates dans le matériau se rapproche de 0,5, plus il est stable et conserve sa structure amorphe. Cela a validé le rôle-clé de l'orthophosphate dans l'inhibition de la cristallisation du pyrophosphate et inversement. Ainsi, la co-présence de ces

deux types d'ions phosphates en quantité relativement équilibrée stabilise ces matériaux amorphes.

Les évolutions en présence d'enzymes de type phosphatase alcaline ont permis de montrer *in vitro* que les enzymes de type phosphatase alcaline interagissaient avec le matériau et favorisaient sa dégradation. Même si le mécanisme de cette dégradation n'est pas totalement élucidé, nous avons fait l'hypothèse que les enzymes se liaient à la surface des matériaux pour hydrolyser le pyrophosphate au sein de celui-ci mais qu'elles hydrolysaient également les ions pyrophosphate libérés en solution. Plus le matériau contient de pyrophosphate initialement, plus la différence de dégradation du matériau en présence ou non d'enzymes est grande. Dans tous les milieux dans lesquels les matériaux NaPYG-0X0 ont évolué, nous avons rapporté des concentrations plus ou moins élevées d'ions phosphate, calcium et sodium en solution provenant des matériaux.

La caractérisation des propriétés biologiques de ces matériaux a ensuite révélé qu'ils n'étaient pas cytotoxiques et que la composition NaPYG-030 était même capable d'initier la différenciation ostéoblastique des cellules mésenchymateuses et ainsi la minéralisation osseuse. Les résultats des études préliminaires d'implantation *in vivo* dans la *calvaria* de rats sont encourageantes car du tissu osseux a pu se former autour des grains de NaPYG-030, cependant une encapsulation fibreuse a été observée séparant le matériau du tissu nouvellement formé.

Pour conclure ces études d'évolution des matériaux amorphes en milieux acellulaires et cellulaires, nous pouvons qualifier les trois compositions de matériau étudiées bioactives, bien qu'une couche d'apatite ne se forme sur la surface de deux d'entre elles, puisqu'elles libèrent des ions actifs métaboliquement comme le phosphate et le calcium, et le NaPYG-030 a même prouvé sa capacité à favoriser la différenciation ostéoblastique. De plus, nous avons montré que les matériaux évoluaient différemment en milieux aqueux selon leur rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates, prouvant que ce rapport est un paramètre-clé corrélé à la dégradation de ces matériaux

Le second objectif de cette thèse était le transfert de technologie à une PME en vue d'un potentiel développement industriel des matériaux amorphes NaPYG-0X0. Nous avons donc tenté d'améliorer le rendement massique en modifiant certains paramètres comme la concentration des précurseurs, cependant nous montrons que les matériaux obtenus sont cristallisés. En effet, le solide le plus riche en pyrophosphate a cristallisé en canaphite-α ($CaNa_2P_2O_7.4H_2O$) dès que la concentration des précurseurs a été multipliée par deux. L'augmentation de la quantité d'eau de lavage est une alternative et a permis de pallier ce problème et a conduit à un matériau amorphe, mais l'utilisation d'une trop grande quantité d'eau n'est pas viable industriellement, d'autant que l'augmentation du rendement massique n'était pas suffisante.

Par ailleurs, le protocole de synthèse de ces matériaux a également permis d'obtenir une phase cristallisée, la canaphite-α ($CaNa_2P_2O_7.4H_2O$) lorsque seuls le pyrophosphate de sodium ($Na_4P_2O_7$) et le chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2.2H_2O$) étaient utilisés comme précurseurs. La caractérisation physico-chimique et biologique de cette dernière pour une application en tant que substitut osseux a fait l'objet du dernier objectif de la thèse. Lorsque le milieu aqueux est concentré en sodium, la canaphite-α ne montre que peu de d'évolution physico-chimique, alors que dans des milieux sans sodium elle cristallise en pyrophosphate de calcium tétrahydraté (mCPPT-β) puis dihydraté (tCPPD). L'hypothèse retenue pour cette formation était la concomitance d'une transformation « solide » par la perte du sodium et d'une réaction de dissolution/précipitation. Ces mêmes mécanismes couplés à l'observation de l'hydrolyse totale des ions pyrophosphate par les enzymes ont permis d'expliquer l'amorphisation de la canaphite-α lorsqu'elle est immergée en présence de phosphatases alcalines. Enfin la caractérisation de la cytotoxicité de cette phase cristallisée a révélé une diminution de l'activité métabolique des cellules avec le temps surement due à une libération rapide et massive de sodium provoquant une réaction inflammatoire.

Suite à ces résultats prometteurs sur les solides amorphes et en vue d'une future industrialisation dans le but d'élargir la palette de substituts osseux amorphes sur laquelle le bioverre 45S5 occupe une place privilégiée, plusieurs perspectives s'offrent à nous. Les prochaines études à court terme devraient permettre de caractériser plus finement les matériaux NaPYG-0X0 par des analyses SAXS pour confirmer l'hypothèse faite sur l'organisation multi-échelle de ces matériaux, reposant sur une brique élémentaire « cluster » constituée de calcium et d'ortho-/pyrophosphates et dont la cohésion est assurée au sein du matériau par des molécules d'eau intercluster structurées par du sodium. Le rôle du sodium dans la composition pourrait être examiné plus précisément par des études d'évolution en milieux combinant une concentration élevée en sodium et un pH acide. Il sera ensuite nécessaire de continuer les analyses à hautes températures. Ces dernières, combinées à la variabilité initiale de la composition en espèces phosphates permettrait d'atteindre de nouvelles phases et d'élargir la gamme des propriétés physico-chimiques/biologiques en partie *via* une meilleure compréhension structurale.

Sur le plan des propriétés biologiques, une nouvelle série d'implantations des matériaux NaPYG-030 et -050 avec une granulométrie contrôlée a été réalisée juste avant le début du confinement en raison du contexte sanitaire lié à la pandémie Covid-19 et permettra une fois l'ensemble des résultats dépouillés de confirmer ou d'infirmer les résultats préliminaires sur la présence d'un tissu osseux nouvellement formé. De plus, la biocompatibilité des autres compositions, en particulier NaPYG-050 formant de l'apatite nanocristalline lors des évolutions en milieu aqueux, devra être étudiée ; l'apparition de cette phase étant prometteuse pour favoriser l'ostéointégration *in vivo*. La synthèse par double décomposition étant relativement facile à

adapter, l'ajout d'éléments antibactériens et/ou angiogéniques ioniques tels que le cuivre ou l'argent dans la composition des matériaux NaPYG-0X0 pourra également être envisagé et leur effet sur les propriétés structurales, physico-chimiques et biologiques des matériaux évalués.

Un approfondissement de l'étude systématique des paramètres de synthèse dans le cadre d'un plan d'expériences sera indispensable en vue d'augmenter le rendement massique et ainsi envisager un transfert de technologie vers l'entreprise. Dans ce même but, certaines étapes du protocole pourront être adaptées pour optimiser les aspects économiques et environnementaux. Par exemple, l'étape de centrifugation pourrait être remplacée par une étape de filtration qui permettrait de combiner cette dernière avec l'étape de lavage et ainsi diminuer la quantité d'eau utilisée.

Enfin, au-delà de la fabrication de pastilles décrite dans ce document, la mise en forme des matériaux NaPYG-0X0 est, une perspective prometteuse. En effet l'utilisation d'empreintes dures (polymères) ou dynamiques (émulsions, micelles) pendant la phase de gel ou à partir du matériau final sous forme de poudre (freeze-casting) permettrait d'atteindre des macroporosités favorisant la colonisation cellulaire ou l'angiogenèse.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. D.H. Copp, D. FUNCTION OF BONE AS A MINERAL. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **16**, 738–744 (1963).
2. Le Garff, E. Taphonomie osseuse humaine au micro-scanner. (2018).
3. Favard, L. Examen clinique de l'épaule douloureuse chronique. *Rev. Chir. Orthopédique Réparatrice Appar. Mot.* **93**, 23 (2007).
4. Carter, D. R. & Spengler, D. M. Mechanical Properties and Composition of Cortical Bone. *Clin. Orthop. Relat. Res. 1976-2007* **135**, 192 (1978).
5. Landis, W. J. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone* **16**, 533–544 (1995).
6. Rey, C., Collins, B., Goehl, T., Dickson, I. R. & Glimcher, M. J. The carbonate environment in bone mineral: A resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study. *Calcif. Tissue Int.* **45**, 157–164 (1989).
7. Rey, C. *et al.* Surface properties of biomimetic nanocrystalline apatites; applications in biomaterials. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **60**, 63–73 (2014).
8. Rey, C., Combes, C., Drouet, C., Sfihi, H. & Barroug, A. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. *Mater. Sci. Eng. C* **27**, 198–205 (2007).
9. Cazalbou, S., Combes, C., Eichert, D. & Rey, C. Adaptative physico-chemistry of bio-related calcium phosphates. *J. Mater. Chem.* **14**, 2148 (2004).
10. Thomas, T. PHYSIOLOGIE DU TISSU OSSEUX. 20.
11. Sharma, U., Pal, D. & Prasad, R. Alkaline Phosphatase: An Overview. *Indian J. Clin. Biochem.* **29**, 269–278 (2014).
12. Harris, H. The human alkaline phosphatases: What we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta* **186**, 133–150 (1990).
13. BONEBRAKE, R., RA, B., JT, M., GG, H. & HF, P. ZINC ACCUMULATION IN SYNOVIAL FLUID. *ZINC Accumul. SYNOVIAL FLUID* (1972).
14. Leung, K., Fung, K., Sher, A., Li, C. & Lee, K. Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *J. Bone Joint Surg. Br.* **75-B**, 288–292 (1993).
15. Bradshaw, R. A. *et al.* Amino acid sequence of Escherichia coli alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 3473–3477 (1981).
16. McComb, R. B., Bowers, G. N. & Posen, S. *Alkaline Phosphatase*. (1979).
17. Kim, E. E. & Wyckoff, H. W. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. *J. Mol. Biol.* **218**, 449–464 (1991).
18. Coleman, J. E. Structure and Mechanism of Alkaline Phosphatase. *ALKALINE PHOSPHATASE* 45.
19. Orimo, H. The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *J. Nippon Med. Sch.* **77**, 4–12 (2010).
20. Giudicelli, J. & Souberbielle, J. C. LE REMODELAGE OSSEUX ET L'EXPLORATION DE L'OSTEOPOROSE. 22 (1998).
21. Blair, H. C., Teitelbaum, S. L., Ghiselli, R. & Gluck, S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* **245**, 855–857 (1989).
22. Alexandre, C., Thomas, T., Lafage-Proust, M. H. & Vico, L. Progrès dans les maladies osseuses et le métabolisme phospho-calcique. *Rev. Rhum.* **74**, 65–71 (2007).
23. Laroche, M., Moineuse, C., Durroux, R., Mazières, B. & Puget, J. Can ischemic hip disease cause rapidly destructive hip osteoarthritis? A case report. *Joint Bone Spine* **69**, 76–80 (2002).

24. Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H. & Tsiridis, E. Bone substitutes: An update. *Injury* **36**, S20–S27 (2005).
25. EBSCOhost | 37296529 | Human Histologic Evaluation of a Bovine-Derived Bone Xenograft in the Treatment of Periodontal Osseous Defects.
26. Gazdag, A. R., Lane, J. M., Glaser, D. & Forster, R. A. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *JAAOS - J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **3**, 1–8 (1995).
27. Cook, S., Dalton, J., Prewett, A. & Whitecloud, P. In vivo evaluation of demineralized bone matrix as a bone graft substitute for posterior spinal fusion. *Spine* **20**, 877–886 (1995).
28. Tuchman, A. *et al.* Iliac Crest Bone Graft versus Local Autograft or Allograft for Lumbar Spinal Fusion: A Systematic Review. *Glob. Spine J.* **6**, 592–606 (2016).
29. Chevalier, J., Gremillard, L. & Deville, S. Low-Temperature Degradation of Zirconia and Implications for Biomedical Implants. *Annu. Rev. Mater. Res.* **37**, 1–32 (2007).
30. Perrichon, A. *et al.* A testing protocol combining shocks, hydrothermal ageing and friction, applied to Zirconia Toughened Alumina (ZTA) hip implants. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **65**, 600–608 (2017).
31. Bohner, M. & Lemaitre, J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials* **30**, 2175–2179 (2009).
32. 50 Years Ago in CORR: The Use of Plaster of Paris to Fill Defects in Bone Leonard F. Peltier, MD CORR 1961;21:1-31 - ProQuest.
33. Combes, C. & Rey, C. Biomatériaux à base de phosphates de calcium. 23.
34. Effect of experimental parameters on the in vitro release kinetics of transforming growth factor β1 from coral particles - Demers - 2002 - Journal of Biomedical Materials Research -
35. Orsini, G. *et al.* Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss® particles: A light, scanning, and transmission electron microscopy study in man. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **74B**, 448–457 (2005).
36. Freiman, S. W. & Hench, L. L. Further Analysis of Glass Crystallization Kinetics. *J. Am. Ceram. Soc.* **52**, 111–112 (1969).
37. Jones, J. R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater.* **9**, 4457–4486 (2013).
38. Hench, L. L. Bioactive Glasses and Glass-Ceramics. *Materials Science Forum*
39. Hench, L. L., Splinter, R. J., Allen, W. C. & Greenlee, T. K. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res.* **5**, 117–141 (1971).
40. Merwin, G. E. Bioglass Middle Ear Prosthesis: Preliminary Report: *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* (2016).
41. A thermodynamic connection to the fragility of glass-forming liquids | Nature.
42. Lao, J., Dieudonné, X., Fayon, F., Montouillout, V. & Jallot, E. Bioactive glass–gelatin hybrids: building scaffolds with enhanced calcium incorporation and controlled porosity for bone regeneration. *J. Mater. Chem. B* **4**, 2486–2497 (2016).
43. Hench, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* **74**, 1487–1510 (1991).
44. Bahniuk, M. S., Pirayesh, H., Singh, H. D., Nychka, J. A. & Unsworth, L. D. Bioactive Glass 45S5 Powders: Effect of Synthesis Route and Resultant Surface Chemistry and Crystallinity on Protein Adsorption from Human Plasma. *Biointerphases* **7**, 41 (2012).
45. Dziadek, M., Zagrajczuk, B., Jelen, P., Olejniczak, Z. & Cholewa-Kowalska, K. Structural variations of bioactive glasses obtained by different synthesis routes. *Ceram. Int.* **42**, 14700–14709 (2016).
46. Mesko, M. G. & Day, D. E. Immobilization of spent nuclear fuel in iron phosphate glass. *J. Nucl. Mater.* **273**, 27–36 (1999).
47. Van Wazer, J. R., Callis, C. F., Shoolery, J. N. & Jones, R. C. Principles of Phosphorus Chemistry. II. Nuclear Magnetic Resonance Measurements [1]. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5715–5726 (1956).
48. Abou Neel, E. A., Pickup, D. M., Valappil, S. P., Newport, R. J. & Knowles, J. C. Bioactive functional materials: a perspective on phosphate-based glasses. *J Mater Chem* **19**, 690–701 (2009).
49. Carta, D. *et al.* A structural study of sol–gel and melt-quenched phosphate-based glasses. *J. Non-Cryst. Solids* **353**, 1759–1765 (2007).

50. Pickup, D. M., Speight, R. J., Knowles, J. C., Smith, M. E. & Newport, R. J. Sol–gel synthesis and structural characterisation of binary TiO2–P2O5 glasses. *Mater. Res. Bull.* **43**, 333–342 (2008).
51. Uo, M., Mizuno, M., Kuboki, Y., Makishima, A. & Watari, F. Properties and cytotoxicity of water soluble Na2O–CaO–P2O5 glasses. *Biomaterials* **19**, 2277–2284 (1998).
52. Daculsi, G., LeGeros, R. Z., Heughebaert, M. & Barbieux, I. Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif. Tissue Int.* **46**, 20–27 (1990).
53. Knaack, D. *et al.* Resorbable calcium phosphate bone substitute. *J. Biomed. Mater. Res.* **43**, 399–409 (1998).
54. Fleisch, H., Maerki, J. & Russell, R. G. G. Effect of Pyrophosphate on Dissolution of Hydroxyapatite and Its Possible Importance in Calcium Homeostasis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **122**, 317–320 (1966).
55. Koo, S. *et al.* Titanium implant osseointegration with calcium pyrophosphate in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **76B**, 373–380 (2006).
56. Grover, L. M. *et al.* The effect of amorphous pyrophosphate on calcium phosphate cement resorption and bone generation. *Biomaterials* **34**, 6631–6637 (2013).
57. Adamiano, A. *et al.* Biomineralization of a titanium-modified hydroxyapatite semiconductor on conductive wool fibers. *J. Mater. Chem. B* **5**, 7608–7621 (2017).
58. Kwon, S.-H., Jun, Y.-K., Hong, S.-H. & Kim, H.-E. Synthesis and dissolution behavior of β-TCP and HA/β-TCP composite powders. *J. Eur. Ceram. Soc.* **23**, 1039–1045 (2003).
59. Wang, S. *et al.* Vertical alveolar ridge augmentation with β-tricalcium phosphate and autologous osteoblasts in canine mandible. *Biomaterials* **30**, 2489–2498 (2009).
60. Aminzare, M. *et al.* Hydroxyapatite nanocomposites: Synthesis, sintering and mechanical properties. *Ceram. Int.* **39**, 2197–2206 (2013).
61. Cazalbou, S., Eichert, D., Drouet, C., Combes, C. & Rey, C. Minéralisations biologiques à base de phosphate de calcium. *Comptes Rendus Palevol* **3**, 563–572 (2004).
62. Drouet, C. *et al.* Apatites biomimétiques - Des biominéraux aux analogues de synthèse pour le biomédical. 30 (2018).
63. Demnati, I. Développement et caractérisation de revêtements bioactifs d'apatite obtenus par projection plasma à basse énergie: application aux implants biomédicaux. 246.
64. Mackenzie, N. C. W. *et al.* Altered Bone Development and an Increase in FGF-23 Expression in Enpp1−/− Mice. *PLOS ONE* **7**, e32177 (2012).
65. Webb, N. C. The crystal structure of β-Ca2P2O. *Acta Crystallogr.* **21**, 942–948 (1966).
66. Slater, C. *et al.* Enhanced stability and local structure in biologically relevant amorphous materials containing pyrophosphate. *J. Mater. Chem.* **21**, 18783 (2011).
67. Windarti, T., Taslimah, Haris, A., Astuti, Y. & Darmawan, A. Synthesis of β-Calcium Pyrophosphate by sol-gel method. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **172**, 012058 (2017).
68. Zyman, Z., Goncharenko, A. & Rokhmistrov, D. Phase evolution during heat treatment of amorphous calcium phosphate derived from fast nitrate synthesis. *Process. Appl. Ceram.* **11**, 147–153 (2017).
69. Lee, J. H. *et al.* The First Clinical Trial of Beta-Calcium Pyrophosphate as a Novel Bone Graft Extender in Instrumented Posterolateral Lumbar Fusion. *Clin. Orthop. Surg.* **3**, 238 (2011).
70. Kohn, N. N., Hughes, R. E., Mccarty, D. J. & Faires, J. S. The Significance of Calcium Phosphate Crystals in the Synovial Fluid of Arthritic Patients: The 'Pseudogout Syndrome'. *Ann. Intern. Med.* **56**, 738–745 (1962).
71. Gras, P. Etude physico-chimique et structurale de pyrophosphates de calcium hydratés : application aux micro-calcifications associées à l'arthrose. 290.
72. Mandel, G. S. *et al.* Calcium pyrophosphate crystal deposition disease: Preparation and characterization of crystals. *J. Cryst. Growth* **87**, 453–462 (1988).
73. Brown, E. H., Lehr, J. R., Smith, J. P. & Frazier, A. W. Fertilizer Materials, Preparation and Characterization of Some Calcium Pyrophosphates. *J. Agric. Food Chem.* **11**, 214–222 (1963).

74. Christoffersen, M. R., Balic-Zunic, T., Pehrson, S. & Christoffersen, J. Growth and precipitation of a monoclinic calcium pyrophosphate tetrahydrate indicating auto-inhibition at pH7. *J. Cryst. Growth* **212**, 500–506 (2000).
75. Gras, P., Rey, C., Marsan, O., Sarda, S. & Combes, C. Synthesis and Characterisation of Hydrated Calcium Pyrophosphate Phases of Biological Interest: Hydrated Calcium Pyrophosphate Phases of Biological Interest. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 5886–5895 (2013).
76. Betts, F. & Posner, A. S. An X-ray radial distribution study of amorphous calcium phosphate. *Mater. Res. Bull.* **9**, 353–360 (1974).
77. Symmetry of Posner's Cluster | Journal of the American Chemical Society. https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja994286n.
78. Dey, A. *et al.* The role of prenucleation clusters in surface-induced calcium phosphate crystallization. *Nat. Mater.* **9**, 1010–1014 (2010).
79. Mahamid, J., Sharir, A., Addadi, L. & Weiner, S. Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish: Indications for an amorphous precursor phase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 12748–12753 (2008).
80. Lotsari, A., Rajasekharan, A. K., Halvarsson, M. & Andersson, M. Transformation of amorphous calcium phosphate to bone-like apatite. *Nat. Commun.* **9**, 4170 (2018).
81. Layrolle, P., Ito, A. & Tateishi, T. Sol-Gel Synthesis of Amorphous Calcium Phosphate and Sintering into Microporous Hydroxyapatite Bioceramics. *J. Am. Ceram. Soc.* **81**, 1421–1428 (1998).
82. Gras, P. *et al.* Crystallisation of a highly metastable hydrated calcium pyrophosphate phase. *CrystEngComm* **15**, 2294 (2013).
83. Pickup, D. M. *et al.* Characterisation of phosphate coacervates for potential biomedical applications. *J. Biomater. Appl.* **28**, 1226–1234 (2014).
84. Guo, H. *et al.* Quantitative phase analyses of biomedical pyrophosphate-bearing monetite and brushite cements by solid-state NMR and powder XRD. *Ceram. Int.* **46**, 11000–11012 (2020).
85. Bunker, B. C., Arnold, G. W. & Wilder, J. A. Phosphate glass dissolution in aqueous solutions. *J. Non-Cryst. Solids* **64**, 291–316 (1984).
86. Kasuga, T., Hosoi, Y., Nogami, M. & Niinomi, M. Apatite Formation on Calcium Phosphate Invert Glasses in Simulated Body Fluid. *J. Am. Ceram. Soc.* **84**, 450–52 (2001).
87. Soulie, J., Combes, C., Rey, C. & Gras, P. Pyrophosphate type material, process for preparing such a material and use for bone repair. (2019).
88. Soulié, J. *et al.* Development of a new family of monolithic calcium (pyro)phosphate glasses by soft chemistry. *Acta Biomater.* **41**, 320–327 (2016).
89. Eidelman, N., Brown, W. E. & Meyer, J. L. The effect of pyrophosphate concentrations on calcium phosphate growth on well-crystallized octacalcium phosphate and hydroxyapatite seed crystals. *J. Cryst. Growth* **108**, 385–393 (1991).
90. Thouverey, C., Bechkoff, G., Pikula, S. & Buchet, R. Inorganic pyrophosphate as a regulator of hydroxyapatite or calcium pyrophosphate dihydrate mineral deposition by matrix vesicles. *Osteoarthritis Cartilage* **17**, 64–72 (2009).
91. Gennari, F. J. Disorders of potassium homeostasis: Hypokalemia and hyperkalemia. *Crit. Care Clin.* **18**, 273–288 (2002).
92. Mayen, L. Etude physico-chimique d'une nouvelle famille de matériaux mixtes ortho- et pyro-phosphates de calcium à visée biomédicale. (Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2019).
93. Mayen, L. *et al.* A soft-chemistry approach to the synthesis of amorphous calcium ortho/pyrophosphate biomaterials of tunable composition. *Acta Biomater.* **103**, 333–345 (2020).
94. Nommeots-Nomm, A., Hupa, L., Rohanová, D. & Brauer, D. S. A review of acellular immersion tests on bioactive glasses—influence of medium on ion release and apatite formation. *Int. J. Appl. Glass Sci.* **11**, 537–551 (2020).
95. Maeno, Y. *et al.* Serum Concentrations of Cross-Linked N-Telopeptides of Type I Collagen: New Marker for Bone Resorption in Hemodialysis Patients. *Clin. Chem.* **51**, 2312–2317 (2005).

96. Julien, M. *et al.* Phosphate-Dependent Regulation of MGP in Osteoblasts: Role of ERK1/2 and Fra-1. *J. Bone Miner. Res.* **24**, 1856–1868 (2009).
97. Kokubo, T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials* **12**, 155–163 (1991).
98. Delahaye, F., Montagne, L., Palavit, G., Claude Touray, J. & Baillif, P. Acid dissolution of sodium–calcium metaphosphate glasses. *J. Non-Cryst. Solids* **242**, 25–32 (1998).
99. Brauer, D. S., Rüssel, C. & Kraft, J. Solubility of glasses in the system P2O5–CaO–MgO–Na2O–TiO2: Experimental and modeling using artificial neural networks. *J. Non-Cryst. Solids* **353**, 263–270 (2007).
100. Silver, I. A., Murrills, R. J. & Etherington, D. J. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp. Cell Res.* **175**, 266–276 (1988).
101. Kokubo, T. & Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* **27**, 2907–2915 (2006).
102. Pereira, M. M., Clark, A. E. & Hench, L. L. Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glassesin vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* **28**, 693–698 (1994).
103. Filgueiras, M. R., Torre, G. L. & Hench, L. L. Solution effects on the surface reactions of a bioactive glass. *J. Biomed. Mater. Res.* **27**, 445–453 (1993).
104. Massera, J. *et al.* Thermal properties and surface reactivity in simulated body fluid of new strontium ion-containing phosphate glasses. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **24**, 1407–1416 (2013).
105. Brauer, D. S., Karpukhina, N., O'Donnell, M. D., Law, R. V. & Hill, R. G. Fluoride-containing bioactive glasses: Effect of glass design and structure on degradation, pH and apatite formation in simulated body fluid. *Acta Biomater.* **6**, 3275–3282 (2010).
106. Barrere, F., van Blitterswijk, C. A., de Groot, K. & Layrolle, P. Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBF×5 solution. *Biomaterials* **23**, 1921–1930 (2002).
107. Asada, M., Miura, Y., Osaka, A., Oukami, K. & Nakamura, S. Hydroxyapatite crystal growth on calcium hydroxyapatite ceramics. *J. Mater. Sci.* **23**, 3202–3205 (1988).
108. Eglin, D., Maalheem, S., Livage, J. & Coradin, T. In vitro apatite forming ability of type I collagen hydrogels containing bioactive glass and silica sol-gel particles. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **17**, 161–167 (2006).
109. Li, P. *et al.* Apatite Formation Induced by Silica Gel in a Simulated Body Fluid. *J. Am. Ceram. Soc.* **75**, 2094–2097 (1992).
110. Teitelbaum, S. L., Tondravi, M. M. & Ross, F. P. Osteoclasts, macrophages, and the molecular mechanisms of bone resorption. *J. Leukoc. Biol.* **61**, 381–388 (1997).
111. Juhasz, J. A., Best, S. M., Auffret, A. D. & Bonfield, W. Biological control of apatite growth in simulated body fluid and human blood serum. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 1823–1829 (2008).
112. Lu, X. & Leng, Y. Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. *Biomaterials* **26**, 1097–1108 (2005).
113. Walsh, W. R. *et al.* Response of a Calcium Sulfate Bone Graft Substitute in a Confined Cancellous Defect. *Clin. Orthop. Relat. Res. 1976-2007* **406**, 228–236 (2003).
114. Kotani, S. *et al.* Bone bonding mechanism of ?-tricalcium phosphate. *J. Biomed. Mater. Res.* **25**, 1303–1315 (1991).
115. Lee, S., Maçon, A. L. B. & Kasuga, T. Structure and dissolution behavior of orthophosphate MgO–CaO–P 2 O 5 –Nb 2 O 5 glass and glass-ceramic. *Mater. Lett.* **175**, 135–138 (2016).
116. Bingel, L., Groh, D., Karpukhina, N. & Brauer, D. S. Influence of dissolution medium pH on ion release and apatite formation of Bioglass® 45S5. *Mater. Lett.* **143**, 279–282 (2015).
117. Maçon, A. L. B. *et al.* A unified in vitro evaluation for apatite-forming ability of bioactive glasses and their variants. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **26**, (2015).
118. Shah, F. A., Brauer, D. S., Wilson, R. M., Hill, R. G. & Hing, K. A. Influence of cell culture medium composition on *in vitro* dissolution behavior of a fluoride-containing bioactive glass: Fluoride-Containing Bioactive Glass. *J. Biomed. Mater. Res. A* **102**, 647–654 (2014).

119. Shinozaki, T., Xu, Y., Cruz, T. F. & Pritzker, K. P. Calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) crystal dissolution by alkaline phosphatase: interaction of alkaline phosphatase on CPPD crystals. *J. Rheumatol.* **22**, 117–123 (1995).
120. Eisenstein, N., Williams, R., Cox, S., Stapley, S. & Grover, L. Enzymatically regulated demineralisation of pathological bone using sodium hexametaphosphate. *J. Mater. Chem. B* **4**, 3815–3822 (2016).
121. Corathers, S. D. Focus on diagnosis: the alkaline phosphatase level: nuances of a familiar test. *Pediatr. Rev.* **27**, 382–384 (2006).
122. Hoppe, A., Güldal, N. S. & Boccaccini, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* **32**, 2757–2774 (2011).
123. Xynos, I. D., Edgar, A. J., Buttery, L. D. K., Hench, L. L. & Polak, J. M. Ionic Products of Bioactive Glass Dissolution Increase Proliferation of Human Osteoblasts and Induce Insulin-like Growth Factor II mRNA Expression and Protein Synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 461–465 (2000).
124. Jones, J. R. 3 - Bioactive ceramics and glasses. in *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers* (eds. Boccaccini, A. R. & Gough, J. E.) 52–71 (Woodhead Publishing, 2007).
125. Pascaud, P. Apatites nanocristallines biomimétiques comme modèles de la réactivité osseuse : étude des propriétés d'adsorption et de l'activité cellulaire d'un bisphosphonate, le tiludronate. (Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2012).
126. Cornilsen, B. C. Solid state vibrational spectra of calcium pyrophosphate dihydrate. *J. Mol. Struct.* **117**, 1–9 (1984).
127. Nejjar, R. *et al.* Etude vibrationnelle des monophosphates SrM2(PO4)2 avec M=Co, Ni. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **58**, 2951–2960 (2002).
128. Sepulveda, P., Jones, J. R. & Hench, L. L. Effect of Particle Size on Bioglass® Dissolution. *Key Engineering Materials* (2001).
129. Sepulveda, P., Jones, J. R. & Hench, L. L. In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses. *J. Biomed. Mater. Res.* **61**, 301–311 (2002).
130. Holmes, J. M. & Beebe, R. A. Surface areas by gas adsorption on amorphous calcium phosphate and crystalline hydroxyapatite. *Calcif. Tissue Res.* **7**, 163–174 (1971).
131. Surface Areas of Synthetic Calcium Phosphates and Bone Mineral - James M. Holmes, Ralph A. Beebe, Aaron S. Posner, Richard A. Harper, 1970.
132. Alianza SIDALC.
133. Abdelwahed, W., Degobert, G. & Fessi, H. Freeze-drying of nanocapsules: Impact of annealing on the drying process. *Int. J. Pharm.* **324**, 74–82 (2006).
134. de Waard, H. *et al.* Controlled Crystallization of the Lipophilic Drug Fenofibrate During Freeze-Drying: Elucidation of the Mechanism by In-Line Raman Spectroscopy. *AAPS J.* **12**, 569–575 (2010).
135. Costantino, H. R. *et al.* Protein spray freeze drying. 2. Effect of formulation variables on particle size and stability. *J. Pharm. Sci.* **91**, 388–395 (2002).
136. Lebre, F. *et al.* The shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation. *Sci. Rep.* **7**, 2922 (2017).
137. Mankani, M. H., Kuznetsov, S. A., Fowler, B., Kingman, A. & Robey, P. G. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: Effect of carrier particle size and shape. *Biotechnol. Bioeng.* **72**, 96–107 (2001).
138. Dorozhkin, S. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials* **2**, 399–498 (2009).
139. Dorozhkin, S. V. Biocomposites and hybrid biomaterials based on calcium orthophosphates. *Biomatter* **1**, 3–56 (2011).
140. Flodgaard, H. & Fleron, P. Thermodynamic Parameters for the Hydrolysis of Inorganic Pyrophosphate at pH 7.4 as a Function of [Mg2+], [K+], and Ionic Strength Determined from Equilibrium Studies of the Reaction. *J. Biol. Chem.* **249**, 3465–3474 (1974).

141. Mistry, D. & Powles, N. The relative hydrolytic reactivities of pyrophosphites and pyrophosphates. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 5727–5733 (2013).
142. Cerruti, M., Greenspan, D. & Powers, K. Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5. *Biomaterials* **26**, 1665–1674 (2005).
143. Termine, J. D. & Conn, K. M. Inhibition of apatite formation by phosphorylated metabolites and macromolecules. *Calcif. Tissue Res.* **22**, 149–157 (1977).
144. Ibsen, C. J. S. & Birkedal, H. Pyrophosphate-Inhibition of Apatite Formation Studied by In Situ X-Ray Diffraction. *Minerals* **8**, 65 (2018).
145. Kazanci, M., Fratzl, P., Klaushofer, K. & Paschalis, E. P. Complementary Information on In Vitro Conversion of Amorphous (Precursor) Calcium Phosphate to Hydroxyapatite from Raman Microspectroscopy and Wide-Angle X-Ray Scattering. *Calcif. Tissue Int.* **79**, 354–359 (2006).
146. Swenson, H. M. & Muhler, J. C. Induced Fuso-Spirochetal Infection in Dogs. *J. Dent. Res.* **26**, 161–165 (1947).
147. Chakkalakal, D. A., Mashoof, A. A., Novak, J., Strates, B. S. & McGuire, M. H. Mineralization and pH relationships in healing skeletal defects grafted with demineralized bone matrix. *J. Biomed. Mater. Res.* **28**, 1439–1443 (1994).
148. Ley-Ngardigal, K. Effets d'additifs ioniques sur la précipitation de cristaux de pyrophosphate de calcium associés à l'arthrose. (2016).
149. Hench, L. L. & Andersson, Ö. Bioactive glasses. in *An Introduction to Bioceramics* vol. Volume 1 41–62 (WORLD SCIENTIFIC, 1993).
150. He, G., Dahl, T., Veis, A. & George, A. Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nat. Mater.* **2**, 552–558 (2003).
151. Feng, B., Chen, J. & Zhang, X. Interaction of calcium and phosphate in apatite coating on titanium with serum albumin. *Biomaterials* **23**, 2499–2507 (2002).
152. Moreno, E. C., Kresak, M. & Hay, D. I. Adsorption thermodynamics of acidic proline-rich human salivary proteins onto calcium apatites. *J. Biol. Chem.* **257**, 2981–2989 (1982).
153. Omelon, S. *et al.* Control of Vertebrate Skeletal Mineralization by Polyphosphates. *PLOS ONE* **4**, e5634 (2009).
154. Golub, E. E. & Boesze-Battaglia, K. The role of alkaline phosphatase in mineralization: *Curr. Opin. Orthop.* **18**, 444–448 (2007).
155. Xu, Y., Cruz, T. F. & Pritzker, K. P. Alkaline phosphatase dissolves calcium pyrophosphate dihydrate crystals. *J. Rheumatol.* **18**, 1606–1610 (1991).
156. Lomashvili, K. A., Garg, P., Narisawa, S., Millan, J. L. & O'Neill, W. C. Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: Potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int.* **73**, 1024–1030 (2008).
157. Pedone, A., Charpentier, T., Malavasi, G. & Menziani, M. C. New Insights into the Atomic Structure of 45S5 Bioglass by Means of Solid-State NMR Spectroscopy and Accurate First-Principles Simulations. *Chem. Mater.* **22**, 5644–5652 (2010).
158. Custódio, M., Lôbo-Hajdu, G., Hajdu, E. & Muricy, G. *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability*. (2007).
159. Kirste, G. *et al.* Effect of chloride ions in Tris buffer solution on bioactive glass apatite mineralization. *Int. J. Appl. Glass Sci.* **8**, 438–449 (2017).
160. Cowles, E. A., DeRome, M. E., Pastizzo, G., Brailey, L. L. & Gronowicz, G. A. Mineralization and the Expression of Matrix Proteins During In Vivo Bone Development. *Calcif. Tissue Int.* **62**, 74–82 (1998).
161. Beck, G. R., Sullivan, E. C., Moran, E. & Zerler, B. Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* **68**, 269–280 (1998).
162. Kirabo, A. A new paradigm of sodium regulation in inflammation and hypertension. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **313**, R706–R710 (2017).

163. Richette, P., Bardin, T. & Doherty, M. An update on the epidemiology of calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease. *Rheumatology* **48**, 711–715 (2009).
164. Mandel, N. S., Mandel, G. S., Carroll, D. J. & Halverson, P. B. Calcium pyrophosphate crystal deposition. *Arthritis Rheum.* **27**, 789–796 (1984).
165. Cheng, P. T., Pritzker, K. P. H. & Nyburg, S. C. α-Calcium disodium pyrophosphate tetrahydrate. *Acta Crystallogr. B* **36**, 921–924 (1980).
166. Pritzker, K. P., Cheng, P. T., Omar & Nyburg, S. C. Calcium pyrophosphate crystal formation in model hydrogels. II. Hyaline articular cartilage as a gel. *J. Rheumatol.* **8**, 451–455 (1981).
167. Cave, M. R. Investigation of layered calcium phosphates and related materials for Biomaterial applications. (University of Birmingham, 2010).
168. Mayen, L. *et al.* Advances in the synthesis and structure of α-canaphite: a multitool and multiscale study. *CrystEngComm* **22**, 3130–3143 (2020).
169. PENEL, G. *et al.* Infrared and Raman microspectrometry study of fluor-fluor-hydroxy and hydroxy-apatite powders. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **8**, 271–276 (1997).
170. Renaudin, F. *et al.* Adsorption of Proteins on m-CPPD and Urate Crystals Inhibits Crystal-Induced Cell Responses: Study on Albumin-Crystal Interaction. *J. Funct. Biomater.* **10**, 18 (2019).
171. Yamini, D., Devanand Venkatasubbu, G., Kumar, J. & Ramakrishnan, V. Raman scattering studies on PEG functionalized hydroxyapatite nanoparticles. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **117**, 299–303 (2014).
172. Brauer, D. S., Karpukhina, N., Law, R. V. & Hill, R. G. Effect of TiO2 addition on structure, solubility and crystallisation of phosphate invert glasses for biomedical applications. *J. Non-Cryst. Solids* **356**, 2626–2633 (2010).
173. Brauer, D. S., Rüssel, C., Li, W. & Habelitz, S. Effect of degradation rates of resorbable phosphate invert glasses on in vitro osteoblast proliferation. *J. Biomed. Mater. Res. A* **77A**, 213–219 (2006).
174. Zreiqat, H. *et al.* Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J. Biomed. Mater. Res.* **62**, 175–184 (2002).
175. Yamasaki, Y. *et al.* Synthesis of functionally graded MgCO3 apatite accelerating osteoblast adhesion. *J. Biomed. Mater. Res.* **62**, 99–105 (2002).
176. Metikoš-Huković, M., Kwokal, A. & Piljac, J. The influence of niobium and vanadium on passivity of titanium-based implants in physiological solution. *Biomaterials* **24**, 3765–3775 (2003).
177. Xu, Z. *et al.* Potential of niobium-based thin films as a protective and osteogenic coating for dental implants: The role of the nonmetal elements. *Mater. Sci. Eng. C* **96**, 166–175 (2019).
178. Eisenbarth, E., Velten, D., Müller, M., Thull, R. & Breme, J. Nanostructured niobium oxide coatings influence osteoblast adhesion. *J. Biomed. Mater. Res. A* **79A**, 166–175 (2006).
179. Matsuno, H., Yokoyama, A., Watari, F., Uo, M. & Kawasaki, T. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials* **22**, 1253–1262 (2001).
180. Flambard, A. *et al.* Structure and nonlinear optical properties of sodium–niobium phosphate glasses. *J. Non-Cryst. Solids* **354**, 3540–3547 (2008).

ANNEXES

Annexe II.1 : Masses des précurseurs pour la synthèse des trois compositions de matériaux NaPYG-0X0

	NaPYG-010	NaPYG-030	NaPYG-050
$CaCl_2,2H_2O$ (g) VWR	8,5	8,5	8,5
$Na_4P_2O_7$ (g) VWR	60,2	35,4	10,6
$Na_3PO_4,12H_2O$ (g) VWR	15,2	50,6	86,0

Annexe II.2 : Description des techniques utilisées afin de caractériser les matériaux NaPYG-0X0 et de la canaphite-α avant et après évolution en milieu aqueux

Analyses granulométriques : Suite à leur synthèse, les matériaux NaPYG-0X0 ont été broyés à l'aide d'un mortier et d'un pilon en céramique. Les tailles de particules ont été mesurées en utilisant un granulomètre à diffraction laser (Malvern Mastersizer 3000). Les diamètres de particules moyens en volume D indiqués ont été obtenus à partir d'au moins trois essais répétés et d (50) est le diamètre sous lequel tombent 50% des particules.

Analyses thermogravimétriques : elles ont été réalisées à l'aide d'un instrument Setaram (Setsy Evolution System). La montée en température va de 25 à 600°C avec une vitesse de chauffage de 5 ° C par minute dans un flux d'air.

Diffraction à rayons X : L'analyse par diffraction des rayons X sur poudre (DRX) a été réalisée à l'aide d'un diffractomètre Bruker D8 Advance avec une anticathode en cuivre (λ ($K_{\alpha1}$) = 1,54056 Å, λ ($K_{\alpha2}$) = 1,54433 Å), et un pas de 0,03° entre 10° et 60°. Les échantillons ont été broyés dans un mortier avant les mesures. Certaines caractérisations (Chap. IV.1.1.2.1.1) ont été menées avec un DRX INEL EQUINOX équipé d'une anticathode au cobalt (λ ($K_{\alpha1}$) = 1,789 Å) et d'un compteur courbe qui limite la résolution du diagramme RX.

Spectroscopie Raman : Les analyses de diffusion Raman ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal Raman Labram HR 800 Horiba Yvon Jobin. L'échantillon a été exposé à un rayonnement laser continu fourni par un laser à diode Argon de 532 nm d'une puissance de 14 mW. Les analyses ont été réalisées sous un microscope BX 41 Olympus équipé d'une lentille × 100 avec une ouverture numérique de 0,9, ce qui confère au système une résolution latérale de 1,0 µm et une résolution axiale de 4,5 µm. Le spectre de chaque microdomaine a été acquis grâce à un réseau de 600 lignes par mm avec une résolution spectrale de 1,5 cm^{-1} et collecté avec un détecteur à puits quantique refroidi à -60°C par double effet Peltier (CCD Synapse). Un étalon de silicium certifié a été utilisé pour calibrer la fréquence de l'équipement en utilisant la ligne de silicium de premier ordre à 520,7 cm^{-1}. Chaque spectre a été acquis avec un temps d'intégration de 30 s et 3 accumulations. Le traitement des spectres et leur décomposition pour l'analyse semi-quantitative des espèces phosphatées impliquées dans les matériaux NaPYG-0X0 a été réalisé à l'aide du logiciel Labspec5 (Horiba).

Spectroscopie FTIR : Les spectres d'absorption infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ont été réalisés grâce à un spectrophotomètre FTIR iS50 (Nicolet) dans le moyen infrarouge (MIR) 4000-400 cm^{-1}. Les échantillons ont été broyés dans un mortier en agate puis mélangé au bromure de potassium KBr en proportion : 2 mg d'échantillon pour 300 mg de matrice KBr. Une pastille a ensuite été réalisée par pressage uniaxial avec une pression de 8 tonnes.

Microscopie : Les analyses de microscopie électronique à balayage (MEB) ont été effectuées sur un microscope LEO 435 VP avec une tension d'accélération dans la plage de 8 à 10 kV. Tous les échantillons ont été collés sur des disques de carbone adhésifs et enduits par pulvérisation d'argent pendant 3 min avant leur observation.

Annexe II.3 : Description des techniques de dosages des matériaux NaPYG-0X0 et de la canaphite-α synthétisés

Dosage des ions calcium et sodium dans les matériaux NaPYG-0X0 synthétisés :

La spectrométrie d'absorption atomique de flamme (SAA-F) a été utilisée pour doser la quantité d'ions calcium et sodium dans les matériaux NaPYG-0X0. Les analyses ont été effectuées avec un spectromètre Contr AA 300 (Analytik Jena). L'analyse par spectrométrie d'absorption atomique est une mesure réalisée en plusieurs étapes :

1) Vaporisation de la solution

2) Evaporation du solvant dans la flamme

3) Fusion puis volatilisation

4) Atomisation et excitation

5) Réactions secondaires dans la flamme entre atomes, radicaux et molécules

6) Mesure spectrale des atomes à déterminer

Environ 100 mg de NaPYG-0X0 ont été pesés avec précision et dissous dans une solution de 100 mL d'eau acidifiée jusqu'à 0,06 M avec de l'acide nitrique HNO_3 (NormaPur). De plus, des modificateurs de matrice, CsCl et $La(NO_3)_3$, ont été ajoutés à une concentration de 2 g/L à l'échantillon afin de favoriser le titrage du calcium et d'éliminer les interférences liées à la présence d'ions phosphate dans les solutions. Les paramètres utilisés pour doser le calcium et le sodium étaient une hauteur de brûleur de 9 mm, un débit de gaz de 185 L/h et un rapport combustible / comburant de 0,549. Les gammes étalon pour le dosage du calcium et du sodium sont respectivement de [0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5] ppm et [0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 0,8 ; 1] ppm.

Dosage des ions ortho et pyrophosphate dans les matériaux NaPYG-0X0 synthétisés :

La quantité totale de phosphates et d'ions orthophosphate dans les matériaux initiaux NaPYG-0X0 a été dosée en utilisant une méthode colorimétrique avec le spectrophotomètre UV-visible à faisceau unique Hitachi U-1100. La quantité d'ion pyrophosphate a été obtenue en soustrayant la quantité d'ion orthophosphate de la quantité d'ion phosphates totaux. Cette méthode colorimétrique consiste à mesurer la densité optique (absorbance) de la coloration jaune d'un complexe phosphovanadomolybdique $VO_3[P(Mo_3O_{10})_4]$ formé en milieu acide et absorbant à λ =

460 nm. Pour mesurer la concentration en ion orthophosphate, environ 100 mg de matériaux ont été pesés avec précision et dissous dans 100 mL d'eau acidifiée avec 1 mL d'acide perchlorique (6M). Ces solutions ont ensuite été diluées par 10 dans 100 mL d'eau acidifiée avec 5 mL d'acide perchlorique puis placé au réfrigérateur pendant 1 h. Parallèlement, pour mesurer la quantité de phosphore total (impliquant les ions ortho- et pyrophosphate) dans les matériaux NaPYG-0X0, l'hydrolyse du pyrophosphate en orthophosphate a été réalisée en solution. Les matériaux ont été dissous dans 50 mL d'eau acidifiée avec 5 mL d'acide perchlorique (6M), puis ont été immergées dans un bain-marie à 100°C pendant 1 h. Avant la mesure, 10 mL d'indicateur coloré ont été ajoutés à chacune des solutions à doser, puis après 30 minutes l'absorbance des solutions a été mesurée dans des tubes en quartz à la longueur d'onde de 460 nm. Le réactif colorimétrique a été préparé préalablement en mélangeant une solution de molybdate d'ammonium (80 g/L) et une solution de monovanadate d'ammonium (4 g/L) dans la proportion 50/50 v/v. La gamme d'étalonnage pour la détermination de la concentration en phosphore était [0 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25] ppm.

Annexe III.1 : Description des techniques de dosages des solutions dans lesquelles les matériaux NaPYG-0X0 et la canaphite-α ont évolué.

La spectrométrie d'absorption atomique de flamme (SAA-F) a été utilisée pour quantifier les ions calcium et sodium dans les solutions de filtrat après le test d'évolution. Les analyses ont été réalisées avec le même instrument (Contr AA 300 Analytik Jena) et les mêmes paramètres que ceux déjà décrits pour le titrage du calcium et du sodium dans les matériaux NaPYG-0X0 initiaux (Annexe II.3).

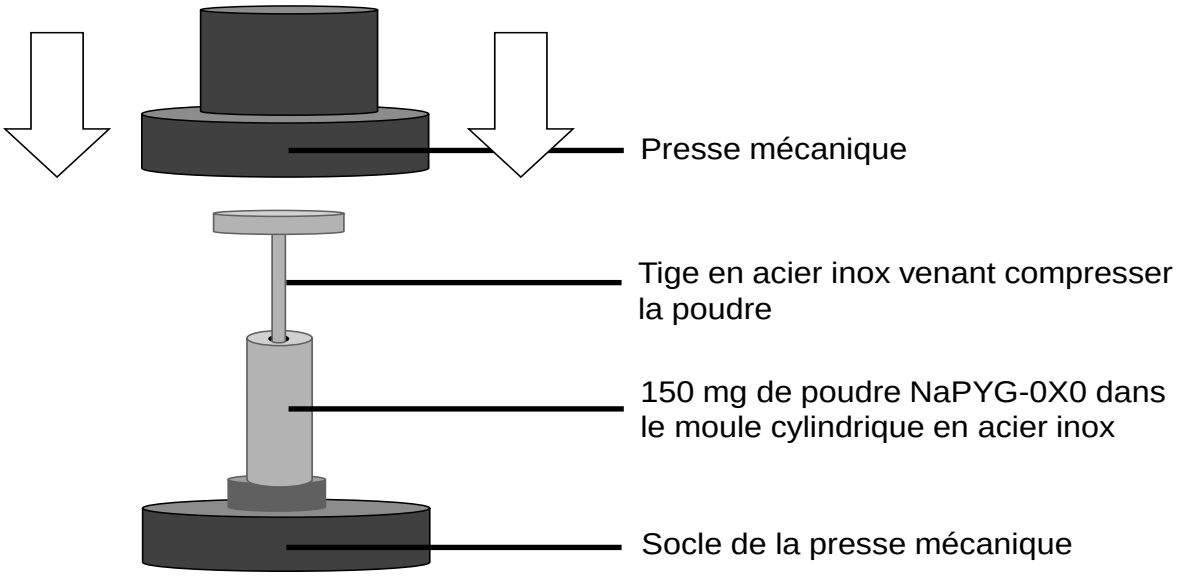
Les ions orthophosphate ont été dosés en utilisant la même méthode colorimétrique que celle décrite précédemment pour le titrage de l'orthophosphate dans les matériaux NaPYG-0X0 initiaux avec le spectrophotomètre UV-visible à faisceau unique Hitachi U-1100 (Annexe II.3).

Le dosage des ions pyrophosphate a été réalisé avec un luminomètre Junior LB 9509 (Berthold). Une méthode bioluminescente avec le kit PPi Light® (Lonza©) a été utilisée pour mesurer la quantité d'ions pyrophosphate dans les solutions. La gamme d'étalonnage pour la détermination du pyrophosphate était [0 ; 0,05 ; 0,5 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10] µM, solutions formées à partir de $Na_4P_2O_7$. Le réactif bioluminescent est préparé en ajoutant le réactif de conversion PPi Light et le réactif Ode détection PPi Light aux solutions d'étalonnage et d'échantillon placées dans des tubes en plastique transparent. Ensuite, la luminescence a été mesurée pendant 1 s en utilisant le luminomètre.

Annexe III.2 : Liste des équilibres de dissociation des CPP et d'association des ions pyrophosphate et calcium.

Réactions d'équilibre	Constantes thermodynamiques (Ks = produit de solubilité)
$H^+ + P_2O_7^{4-} = HP_2O_7^{3-}$	Log(Ks) = 9,6 ΔH = 1,897 kJ
$H^+ + HP_2O_7^{3-} = H_2P_2O_7^{2-}$	Log(Ks) = 6,7
$H^+ + H_2P_2O_7^{2-} = H_3P_2O^{7-}$	Log(Ks) = 2,0 ΔH = -3,126 kJ
$Na^+ + P_2O_7^{4-} = NaP_2O_7^{3-}$	Log(Ks) = 2,3
$Ca^{2+} + P_2O_7^{4-} = CaP_2O_7^{2-}$	Log(Ks) = 6,5
$Ca^{2+} + HP_2O_7^{3-} = CaHP_2O_7^-$	Log(Ks) = 4,3
$Ca_2(P_2O_7) = 2Ca^{2+} + P_2O_7^{4-}$	Log(Ks) = -18,35
$Ca_2(P_2O_7).2H_2O = 2Ca^{2+} + P_2O_7^{4-} + 2H_2O$	Log(Ks) = -17,6
$Ca_2(P_2O_7) = 2Ca^{2+} + P_2O_7^{4-}$	Log(Ks) = -17,1
$CaH_2P_2O_7 = Ca^{2+} + H_2P_2O_7^{2-}$	Log(Ks) = -17,1
$CaH_2P_2O_7 = Ca^{2+} + H_2P_2O_7^{2-}$	Log(Ks) = -2,7
$H_4P_2O_7 = H^+ + H_3P_2O_7^-$	Log(Ks) = -1,5 ΔH = 2,541 kJ

Annexe IV.1 : Représentation schématique du dispositif de presse pour la réalisation de pastille.



Annexe VI : Etude du comportement physico-chimique des matériaux NaPYG-0X0 à hautes températures

Une nouvelle approche envisagée dans le but de comparer les matériaux NaPYG-0X0 avec des matériaux déjà connus a consisté à synthétiser des matériaux amorphes composés d'ortho et de pyrophosphates par fusion. Cette synthèse est couramment utilisée dans le groupe du Pr. Brauer à l'Otto Schott Institute of Materials Research (Friedrich-Schiller-Universitat) de Jena pour réaliser des verres phosphates[99,105,172,173]. Des matériaux composés d'ortho et de pyrophosphate ont déjà été synthétisés par fusion en utilisant de l'oxyde de niobium, de l'oxyde de magnésium, du carbonate de calcium et de l'acide phosphorique[115]. Nous avons donc décidé de débuter notre étude en utilisant les mêmes éléments chimiques que dans ces travaux publiés mais à partir de précurseurs différents.

Synthèse par fusion de matériaux comparables aux NaPYG-0X0

Outre le calcium et le phosphate, le matériau synthétisé sera constitué, en reprenant une nomenclature verrière, d'oxydes de magnésium, de niobium et de calcium. Sa composition sera donc différente des matériaux NaPYG-0X0. Cependant l'idée dans un premier temps est plus d'approcher les rapports d'ortho et de pyrophosphates de ceux des NaPYG-0X0 indépendamment des ions additionnels. Les ions magnésium sont utilisés pour stimuler la formation osseuse et augmenter l'adhésion et la stabilité des cellules osseuses[174,175] ; ils seront impliqués dans la structure du verre en tant qu'oxyde intermédiaire. Le niobium a quant à lui une très bonne résistance à la corrosion[176] et certaines études montrent qu'il possède de bonnes propriétés de biocompatibilité[177,178] et d'ostéoconduction[179]. Il servira d'oxyde formateur de réseau en réticulant les groupes phosphates ensemble[180]. L'objectif de cette étude est de synthétiser des verres par fusion de formulation MgO-CaO-P_2O_5-Nb_2O_5 et qui seront composés d'ortho et de pyrophosphates à différentes proportions.

Protocole

Les matériaux G-0X0 ont été préparés en mélangeant manuellement les poudres $MgCO_3$, $CaCO_3$, $Ca(H_2PO_4)_2$,H_2O et Nb_2O_5 dont la masse totale est d'environ 50 g, afin d'obtenir différentes compositions présentées dans le tableau VI.1. Sachant que lorsque la concentration molaire en oxyde de phosphate est égale ou supérieure à 33% le verre obtenu ne comporte plus

d'orthophosphate dans sa composition nous avons décidé de garder un rapport $MgO/CaO/Nb_2O_5$ constant pour chaque matériau élaboré et de simplement varier la quantité de P_2O_5 [115]. La nomenclature des matériaux synthétisés par fusion (G-0X0) est en lien avec la nomenclature des matériaux NaPYG-0X0. Plus le matériau contient de pyrophosphate dans sa composition théorique plus X est petit.

Tableau VI.1 : Composition théorique des différents matériaux G-0X0 synthétisés par fusion, exprimée en pourcentage molaire

	MgO (% mol)	CaO (% mol)	P_2O_5 (% mol)	Nb_2O_5 (% mol)
G-010	31,875	31,875	32	4,25
G-030	33,05	33,05	29,5	4,4
G-050	34,2	34,2	27	4,6

Les mélanges de précurseurs de haute pureté ont ensuite été fondus dans un four électrique à 1500°C dans des creusets en platine pendant environ 30 minutes. Puis une étape de trempe, entre deux plaques de cuivre pour refroidir le matériau fondu rapidement pour chercher à éviter sa cristallisation a été réalisée comme nous pouvons le voir sur la figure VI.1.



Figure VI.1 : Photographie du matériau G-0X0 obtenu sur une plaque de cuivre, après l'étape de trempe entre deux plaques de cuivre.

Nous pouvons observer sur la photographie de la figure VI.1 que le matériau est composé principalement d'une partie transparente mais aussi d'une partie blanche. La coloration blanche due à la cristallisation du matériau a été causée lors de l'étape de coulage. En effet, lorsque le matériau sort du four, si l'étape de trempe n'est pas réalisée suffisamment rapidement, le matériau cristallise dans le creuset du fait des petites entités phosphates (ortho et pyro) qui diffusent plus rapidement que les longues chaines phosphatées. Les deux parties (transparente et blanche) ont ensuite été séparées et nous présenterons par la suite les résultats des caractérisations de la partie transparente (a priori matière vitreuse). La caractérisation DRX de la partie blanche (a priori matière cristallisée) est exposée sur la figure VI.2.

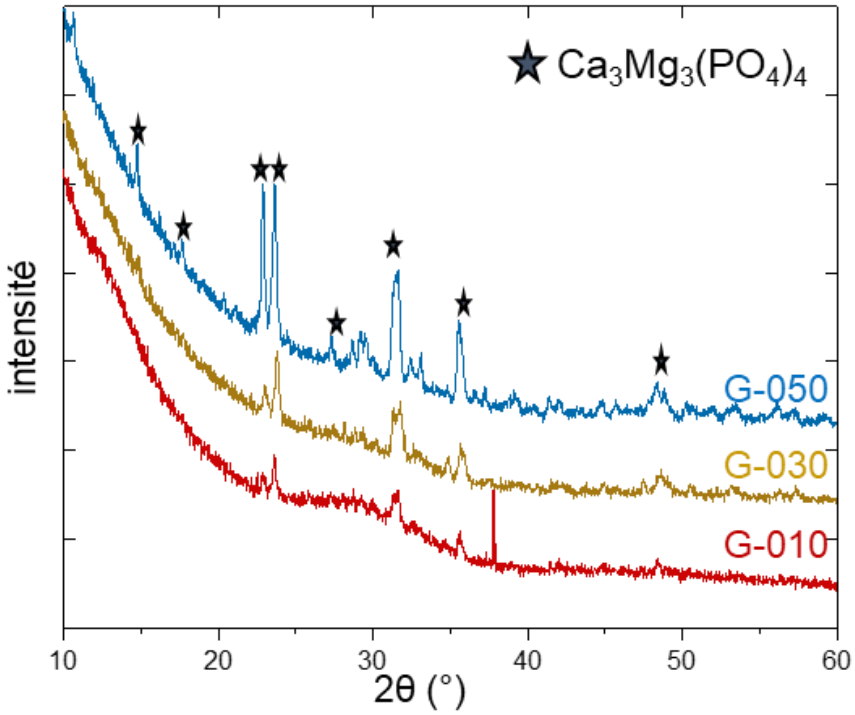


Figure VI.2 : Diagramme de diffraction des RX des trois parties blanches des compositions de matériaux G-0X0 synthétisées par fusion.

La phase cristallisée correspondrait à du $Ca_3Mg_3(PO_4)_4$. Cette cristallisation est probable car le magnésium, le calcium ainsi que le phosphate font parties des éléments présents dans les précurseurs utilisés. Seul le niobium n'est pas détecté en tant que phase entière. Il est incorporé en plus petite quantité que les autres éléments donc soit il a pu s'insérer dans la structure de cette phase soit il n'est présent que dans la partie amorphe en tant que formateur de réseau.

Les trois compositions synthétisées ont ensuite été analysées au CIRIMAT par spectroscopie Raman et DRX.

Résultats

La figure VI.3 présentent les diagrammes RX (Fig.VI.3a) ainsi que les spectres Raman (Fig.VI.3b) des matériaux synthétisés (partie translucide seulement). Nous pouvons observer sur les diagrammes RX des trois compositions, un halo large entre 25 et 35° sans pic de diffraction, ce qui signifie que les trois matériaux ont une structure amorphe. De plus, la spectroscopie Raman a permis d'identifier les éléments formant le réseau des verres dans les matériaux. Sur tous les spectres, une bande de vibration principale à 965 cm^{-1} est présente et attribuée aux vibrations symétrique PO_4 des ions orthophosphate, ainsi que des bandes de vibration à 840 et 905 cm^{-1} pouvant être caractéristiques respectivement des oxydes de niobium NbO_4 et NbO_6 [115]. Sur le spectre du matériau G-010, dont la concentration molaire initiale d'oxyde de phosphate est la plus élevée (32 %) des épaulements à 755, 1040 et 1130 cm^{-1} sont observés ; ils sont caractéristiques des ions pyrophosphate présents dans le matériau. En effet la bande à 755 cm^{-1} est attribuée aux vibrations symétriques P-O-P, celle à 1040 cm^{-1} aux vibrations symétriques PO_3 et celle à 1130 cm^{-1} aux vibrations P-O. Sur les spectres des matériaux G-030 et G-050 ces épaulements sont difficilement visibles par spectroscopie Raman. Enfin, l'intensité de la bande à 840 cm^{-1} caractérisant les oxydes de niobium semble diminuer lorsque la quantité de phosphate dans le mélange initial augmente. Ce qui est cohérent, car plus la concentration en oxyde de phosphate est élevée, plus celle en oxyde de niobium diminue. Le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates a ensuite été déterminé à partir de la décomposition des bandes Raman selon le protocole décrit dans le chapitre II : il est égal à 0,76. Ce rapport est proche du rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates du matériau NaPYG-050 (0,73 ± 0,08).

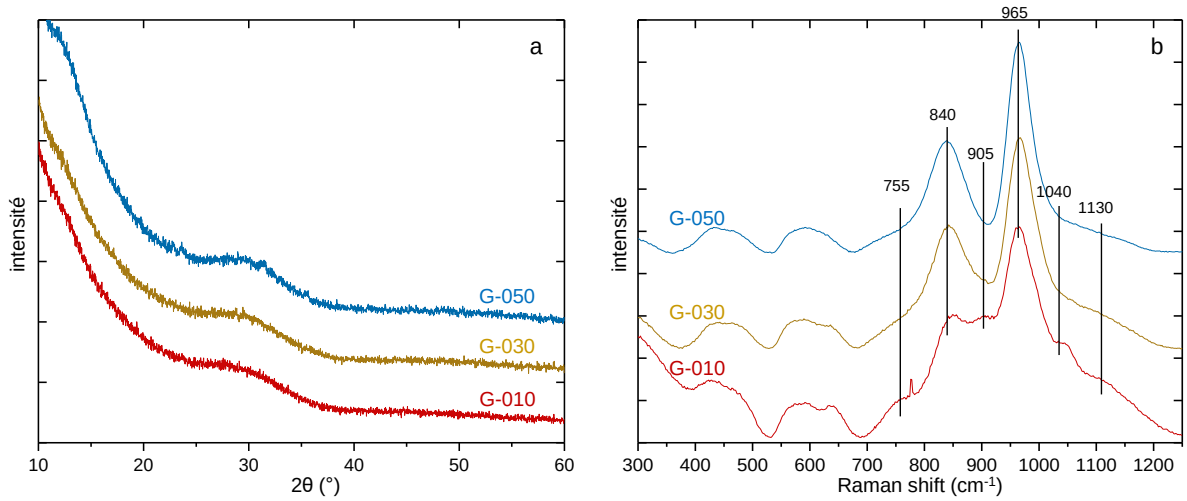


Figure VI.3 : Diagramme de diffraction des DRX (a) et spectre Raman (b) des trois compositions de matériaux G-0X0 synthétisées par fusion.

Pour conclure sur cette première étude préliminaire, nous avons réussi à synthétiser principalement un matériau amorphe par fusion composé d'ortho et de pyrophosphate. La phase cristalline a été identifiée a du $Ca_3Mg_3(PO_4)_4$ (figure VI.2). La présence de pyrophosphate dans les compositions G-030 et G-050 n'a pas pu être prouvée par spectroscopie Raman ; des caractérisations plus approfondies pourront être effectuées par RMN du solide par exemple afin de calculer plus précisément le rapport ortho / (ortho + pyro) phosphates pour la composition de matériau G-010. Des caractérisations thermiques (ATG/ATD) pourront aussi être réalisées afin de montrer que ces matériaux sont bien des verres. Et enfin nous pourrons ensuite synthétiser d'autres compositions en faisant varier la concentration molaire d'oxyde de phosphate entre 32 et 33% afin de synthétiser des matériaux si possibles avec les mêmes rapports ortho / (ortho + pyro) phosphates que les NaPYG-0X0 étudiés au cours de cette thèse.

Etude des matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 à hautes températures

Un autre objectif de cette mission à Jena était d'essayer de fondre les matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 synthétisés au CIRIMAT et ainsi étudier leur comportement à hautes températures. Nous avons donc profité des équipements du laboratoire de Jena et notamment des fours verriers pour porter à fusion environ 5 g de matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 à 1450°C pendant 30 min dans des creusets en platine. La faible masse de matériau fondu allié à sa viscosité a rendu difficile l'étape de coulage jusqu'aux plaques de cuivre car ils ont refroidi trop rapidement

et n'ont pu être trempés correctement. Les matériaux récupérés ont été caractérisés par DRX au CIRIMAT (figure VI.4). Nous pouvons observer des pics de diffraction sur les diagrammes RX des matériaux, ce qui montre qu'ils ont cristallisé. Les pics de diffraction ont été analysés grâce au logiciel EVA et les phases correspondant au mieux pour le matériau NaPYG-030 fondu sont une phase de pyrophosphate de calcium anhydre, β-$Ca_2P_2O_7$, et une phase d'orthophosphate de calcium anhydre, α-TCP (α-$Ca_3(PO_4)_2$). En raison de sa faible quantité dans les matériaux NaPYG-0X0, le sodium a probablement pu s'insérer dans la structure des phases β-$Ca_2P_2O_7$ et α-TCP qui seraient ainsi non stœchiométriques, et serait dans ce cas indétectable en DRX comme phase à part entière (Na_2O par exemple). Pour le matériau NaPYG-010 fondu, les phases identifiées par DRX correspondent à du pyrophosphate de calcium anhydre, α-$Ca_2P_2O_7$, et à une phase alumino-phospho-silicate de sodium et calcium, $Na_2Ca_3Al_2(PO_4)_2(SiO_4)_2$. Cette dernière est un peu suspecte car les matériaux NaPYG-0X0 ne sont pas composés d'aluminium ni de silicium ; il est possible qu'il y ait eu une erreur dans l'identification des phases ou plus vraisemblablement que le creuset utilisé pour la fusion du NaPYG-010 ait été mal nettoyé. En effet, le groupe du Pr. Brauer est susceptible de travailler avec des oxydes de silicium et d'aluminium et il fort probable que des traces de ces éléments soient demeurées à l'intérieur du creuset. Lors de la fonte du matériau, ces éléments ont pu recristalliser en cette phase. Il est donc difficile de conclure sur le comportement à hautes températures du matériau NaPYG-010.

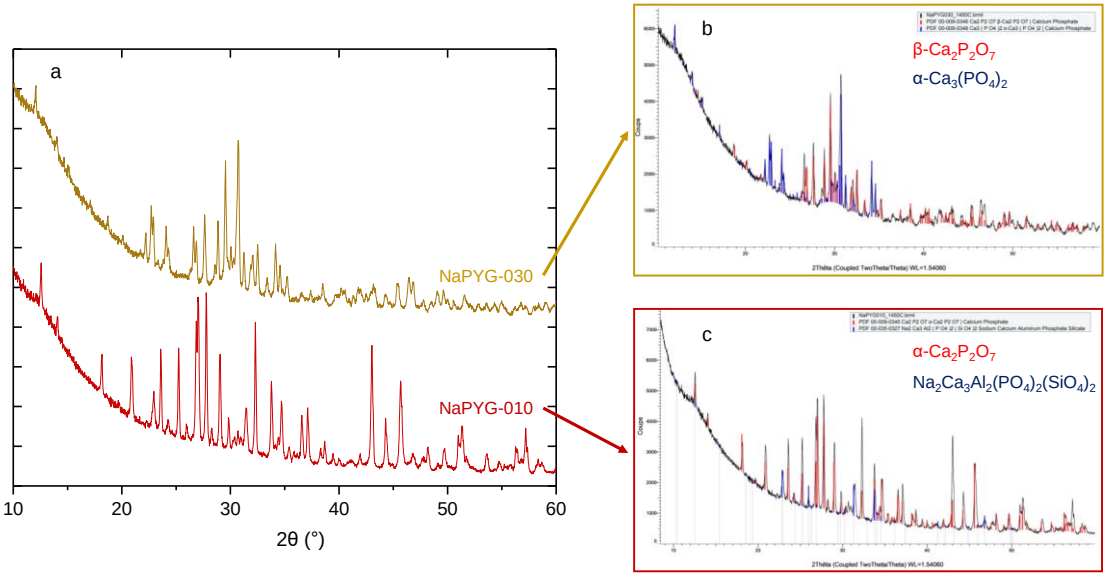


Figure VI.4 : Diagrammes DRX des matériaux NaPYG-010 et NaPYG-030 fondus à 1450°C pendant 30 minutes (a). Les diagrammes de NaPYG-030 et NaPYG-010 sont indexés avec les pics des phases β-$Ca_2P_2O_7$, α-$Ca_3(PO_4)_2$ pour NaPYG-030 (b) et α-$Ca_2P_2O_7$, $Na_2Ca_3Al_2(PO_4)_2(SiO_4)_2$ pour NaPYG-010 (c).

Lors de la fusion du matériau NaPYG-030, une phase de pyrophosphate de calcium et une phase d'orthophosphate de calcium se sont formées. La phase α-TCP est connue pour se former

par calcination de la phase β-TCP vers 1125°C[63]. L'orthophosphate présent dans le matériau NaPYG-030 a surement dû cristalliser en β-TCP lors de sa calcination vers 800°C puis en α-TCP lorsque la température est montée à 1125°C. La phase anhydre β-$Ca_2P_2O_7$ a également été observée lors de la déshydratation entre 300 et 450°C de la phase m-CPPT-β lors des travaux de thèse de P. Gras[71]. Cette phase s'est probablement formée lors de la déshydratation du matériau NaPYG-030, engendrant la cristallisation d'une phase de pyrophosphate de calcium puis en β-$Ca_2P_2O_7$ lorsque la température était supérieure à 450°C. La formation de ces phases serait donc due à une déshydratation du matériau NaPYG-030 selon le schéma de réactions suivant :

