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 :

Mme MARION MERLE

le vendredi 9 décembre 2022

Titre :

Synthèse et caractérisation multi-échelle de carbonates de calcium amorphes pour la substitution osseuse : effet stabilisateur du pyrophosphate, dopage par des ions bioactifs et mise en forme par freeze-casting.

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 CHRISTÈLE COMBES

M. JÉRÉMY SOULIE

Rapporteurs :

M. ALEJANDRO FERNANDEZ-MARTINEZ, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

MME NADINE NASSIF, UNIVERSITE SORBONNE

Membre(s) du jury :

M. MARC BOHNER, RMS Foundation, Président

M. JÉRÉMY SOULIE, TOULOUSE INP, Membre

MME BEATRICE BISCANS, TOULOUSE INP, Membre

MME CHRISTÈLE COMBES, TOULOUSE INP, Membre

M. NICOLAS BRUN, INSTITUT CHARLES GERHARDT MONTPELLIER, Membre

REMERCIEMENTS

Cette thèse n'aurait pas pu avoir lieu sans l'aide d'un grand nombre de personnes, qui ont permis d'agrémenter ces trois années parfois difficiles, tant sur le point de vue professionnel que personnel. J'aimerais donc remercier toutes ces personnes, même s'il est parfois laborieux de retranscrire avec des mots toute la reconnaissance et/ou l'amitié que je porte à certain.es.

Je tenais en premier lieu à remercier les personnes qui ont accepté de juger mon travail, à savoir les membres du jury.

Nadine Nassif, directrice de recherche CNRS du LCMCP à la Sorbonne Université, je vous suis reconnaissante d'avoir rapporté mon manuscrit avec beaucoup d'implication et proposé des solutions pour ouvrir la discussion malgré votre impossibilité d'être présente à la soutenance.

Alejandro Fernandez-Martinez, chargé de recherche CNRS de l'ISTerre à l'Université Grenoble Alpes, vous avez de même rapporté mon manuscrit et enrichi la discussion en abordant certains aspects sous un autre angle que celui des biomatériaux, merci pour ces échanges scientifiques très pointus.

Marc Bohner, directeur de recherche de la RMS Foundation (Suisse), c'était un honneur de vous avoir comme président de jury, merci d'avoir apporté votre grande expertise du domaine pour améliorer mon manuscrit.

Nicolas Brun, chargé de recherche CNRS de l'ICGM, je vous remercie d'avoir avec beaucoup de bienveillance discuté de la porosité avec moi lors de la soutenance et soulevé des perspectives intéressantes.

Béatrice Biscans, directrice de recherche CNRS du LGC, par votre approche Procédé vous avez élargi la discussion et m'avez poussée à penser « plus loin », *i.e.* en terme d'applications à plus grand échelle.

Je remercie également la Région Occitanie pour le co-financement de ma thèse, ainsi que mon laboratoire d'accueil le CIRIMAT à Toulouse.

Cette thèse n'aurait pas pu se dérouler sans mes directeurs de thèse (de toute évidence, puisque déjà c'est eux qui ont obtenu son financement …), qui m'ont encadrée avec beaucoup de bienveillance et soutien, et avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler pendant ces trois années.

Christèle Combes, la première chose que j'ai découvert en te rencontrant est ton rire communicatif, qui peut s'entendre dès que tu es dans les parages. Malgré ton emploi du temps très chargé, tu trouves toujours le temps de venir discuter et de répondre aux questions (encore plus quand il y a des sucreries dans le bureau). Tu m'as beaucoup appris, entre autres la rigueur et la persévérance dans mon travail, mais tu as aussi su me rassurer dans les moments plus compliqués comme la rédaction. Je retiendrai aussi ton énergie, ta bonne humeur et tes chansons à Bioceramics !

Jérémy Soulié, c'était un vrai plaisir de travailler avec toi (malgré tes idées dans tous les sens, parfois difficiles à trier). Tu sais te rendre très disponible pour les autres, bien que tu sois aussi très impliqué dans de nombreux projets ou commissions scientifiques/pour les étudiants/pour la vie du

labo … et tu as été un vrai soutien en continu pendant ces trois ans. Je pense que tu as réussi à me transmettre ton enthousiasme et ta passion pour la science (*cf.* le SAXS) ainsi qu'un peu de créativité (et peut-être même me faire basculer du côté de la recherche académique …). On peut parler de tout avec toi et c'est très agréable, nos réunions s'éternisaient d'ailleurs souvent à force de digressions rugbystiques ou plus profondes. Je te souhaite le meilleur et j'espère qu'on aura l'occasion de travailler de nouveau ensemble !

De par mes travaux de recherche et sur des initiatives de Jérémy et/ou Christèle, j'ai eu la chance de collaborer avec des chercheur.ses d'autres laboratoires, que j'aimerais aussi remercier.

Christian Bonhomme et *Capucine Sassoye* du LCMCP à Paris, pour avoir toujours fait l'effort de vulgariser vos propos avec beaucoup de bienveillance pour m'expliquer des techniques sur lesquelles je n'étais pas experte.

Pierre Roblin du LGC à Toulouse, pour m'avoir initiée, avec bonne humeur et beaucoup d'humour, au SAXS auquel j'ai bien accroché, malgré m'être au début un peu arraché les cheveux sur le traitement des données !

Christophe Tenailleau et *Benjamin Duployer* du CIRIMAT, pour votre disponibilité et gentillesse lors des analyses de tomographie (et Christophe pour le prix, discutable à mon sens, de la meilleure photo du GFC !)

Dominique Poquillon du CIRIMAT, pour ton aide sur la méca, ta patience, ta rigueur et nos conversations de rugby dans le couloir. Merci aussi pour ton implication pour le labo et le bien-être des doctorant.es.

Alessandro Pugliara, Teresa Hungria et *Stéphane Le Blond du Plouy* du Centre de Microcaractérisation Raymond Castaing à Toulouse pour les analyses de microscopie électronique. En particulier, grazie Alessandro per il tuo costante buon umore !

Vanessa Soldan du METi à Toulouse pour la mise en résine et l'ultramicrotomie pour les observations MET.

Solène Tadier et *Alexandre Fantou* de Mateis à Lyon, même si notre collaboration n'a pas donné de résultats fructueux, c'était un plaisir de travailler quelques jours avec vous, de découvrir votre labo (même en travaux) et de vous recroiser plus tard en congrès ! Merci Alexandre pour m'avoir rassurée en ayant l'air aussi perdu que moi sur ton avenir, je te souhaite plein de bonnes choses pour ta fin de thèse !

Grâce à la bourse NanoX, j'ai également eu l'opportunité d'effectuer une mobilité à l'Institute for Physiological Chemistry de la Johannes Gutenberg University à Mainz en Allemagne, dans le but de me former aux essais cellulaires. Je suis reconnaissante envers le Pr. *Werner Müller* qui m'a accueillie et *Shunfeng Wang* qui m'a formée tout en étant très disponible et patient avec moi (néophyte en culture cellulaire donc pas forcément délicate avec les cellules …). Merci aussi à *Neufurth Meik* pour les conseils et à *Matthias Wiens* pour les conversations en français pendant les déjeuners et sa gentillesse.

Pour en revenir aux toulousains, j'aimerais remercier toutes les personnes du CIRIMAT en général qui m'ont aidée de près ou de loin ou que j'ai côtoyées pendant ma thèse.

Tout d'abord le personnel technique sans lequel le labo ne tournerait pas.

Un énorme merci à *David Bertrand* pour toutes les analyses d'absorption atomique que tu as dû faire pour moi (presque) sans râler, alors qu'elles étaient parfois demandées au dernier moment en panique ! Ta gentillesse et ta disponibilité font chaud au cœur quand on est sous l'eau en fin de thèse, et je pouvais aussi compter sur toi pour me conseiller une nouvelle rando ou juste me faire rêver de montagne !

Je remercie aussi grandement *Carole Thouron*, qui déjà a dû supporter un David grognon à cause de mes analyses à faire et qui devant son désespoir l'a gentiment assisté par moments ; mais aussi pour ta gentillesse et disponibilité.

Cédric Charvillat, merci pour ta passion des rayons X et les longs moments à parler de diffraction, ainsi que tes petits actes de résistance contre les appellations de « poches » rouges (alors qu'on est d'accord que ce sont des sacs).

Olivier Marsan, parmi le top trois des râleurs (et des connaisseurs de potins) de l'équipe, j'ai appris à te connaître et à t'apprécier pendant ces trois ans avec nos bureaux voisins. On a eu beaucoup de discussions longues et toujours intéressantes, des coups de gueule contre des choses « pas normales », des blagues plus ou moins douteuses (dont certaines étaient dites uniquement pour m'énerver, j'en suis sure …) ou juste des discussions sur le footing. Ça va me manquer !

J'en profite pour remercier la team footing du midi, avec Olivier, *Nicolas Caussé* et *Marie-Line Pern*. Marie-Line, à force de footing-papotage (quand j'ai enfin eu assez d'endurance pour parler pendant le retour) tu es devenue une vraie amie à laquelle je peux raconter toutes mes histoires, ta gentillesse et ton souci des autres vont beaucoup me manquer ! J'espère que tu me trouveras une remplaçante pour continuer à y aller !

Je remercie aussi *Yannick Thebault* pour son aide avec le MEB, et pour les TP Chimie-Physique avec *Jean-Luc Trompette* (grâce à ces TP j'ai pour la première fois reçu un poème de mes étudiant.es).

Merci également à l'équipe des TP inorga, *Idaline Romana* et *Laurent Ropiquet*, si précieux de par votre motivation, gentillesse et enthousiasme, j'ai beaucoup apprécié travailler avec vous ! On faisait une très bonne équipe avec *Jérémy* ou *David G.*

Pour les autres permanents, j'aimerais remercier tous.tes les chercheur.ses de l'équipe PPB (en plus de ma directrice et mon directeur déjà cités plus haut), qui ont contribué à faire que je m'y sente si bien et si intégrée.

Christophe Drouet, très fier toulousain (non Christophe, Montauban ce n'est pas le nord) pas discret du tout, tu sais apporter de la bonne humeur au labo et surtout dans notre couloir. Gourmand invétéré, tu es toujours de bon conseil et tu te donnes du mal pour aider toutes les personnes qui le nécessitent.

David Grossin, le « nouveau » chef d'équipe, plein d'humour et veillant au bien-être de tous.tes en permanence, avec des connaissances parfois surprenantes (je ne connais personne d'autre autant passionné par les normes), on a partagé des moments très sympas en TP ou en congrès autour de jeux de société par exemple !

Ghislaine Bertrand, merci pour ces longues discussions-café dans notre bureau sur de nombreux sujets passionnants, les déjeuners dehors (avec Camille et/ou Ambra entre autres), ta gentillesse et les moments partagés en congrès (et surtout ton grand soutien quand j'avais mes béquilles à Venise !).

Christian Rey, votre implication sur ma thèse (un peu mise à mal par le covid) m'a beaucoup apporté scientifiquement. C'était une grande chance pour moi de vous côtoyer lors de mes premières manips dans le labo et au RU, de discuter autant des papillons que des apatites et de vous entendre jurer avec l'accent toulousain.

Corinne Dufaure, même si on ne se croise pas souvent c'est toujours un plaisir de discuter avec toi ! Merci pour tes mots toujours gentils et justes et pour les gourmandises que tu as souvent apportées à notre bureau.

Maëlenn Aufray, je te remercie en particulier pour les cours d'escalade et ce que tu m'y as appris !

Merci également aux personnes du site de Pharma, que j'ai moins eu l'occasion de croiser, et spécialement *Audrey Tourrette, Fabien Brouillet* et *Sophie Cazalbou.*

Un grand merci aux autres personnels support, je pense en premier à nos secrétaires adorables. Merci à *Caroline Job* pour ta disponibilité et ton aide pour l'organisation de ma soutenance, à *Dominique Bonsirven* pour ton sourire et ta gentillesse et enfin à *Katia Reliquet* pour nos longues discussions à se raconter nos problèmes (sur le chemin des toilettes entre autres), les repas partagés après l'escalade, et tout le reste. Promis on gardera contact !

Je remercie aussi le service info pour leur disponibilité (et entre autres le jour de ma soutenance), et en particulier *Hervé Duffaut, Aurélien Jean* et *Karim Alloula*.

Durant ma thèse j'ai eu l'occasion d'encadrer des étudiant.es qui ont grandement fait avancer mes travaux de recherche, en plus de me permettre une expérience très enrichissante et plaisante d'encadrement. Pour cela, je remercie en premier *Gaëtane*, stagiaire très impliquée et rigoureuse, je te souhaite le meilleur pour la suite ! Je remercie aussi *Georgios* qui aura malgré tout fait des expériences que j'ai pu utiliser. J'ai beaucoup aimé travailler avec les étudiant.es de mes deux projets 3A : *Marion, Joséphine, Quentin, Mathieu, Laura* en 2020 et *Clémence, Sarah et Clothilde* en 2021. Merci à vous ! Une pensée aussi pour *Juliette* (qui n'était pas ma stagiaire) que j'ai beaucoup apprécié côtoyer !

Maintenant arrive la partie qui me tient le plus à cœur et la plus difficile à rédiger : les remerciements aux doctorant.es. En effet, c'est ce qui définit l'ambiance d'un labo et ce qui a été déterminant pour mon intégration en arrivant à Toulouse, ville que je ne connaissais pas du tout. C'est grâce à vous que j'ai autant profité de ces trois ans et que je suis aujourd'hui si attachée à cette ville, mais aussi que j'ai tenu le coup pendant les années covid, qui ont, il faut le reconnaître, pas mal impacté ma thèse.

Pour commencer par les MEMO « l'équipe des garçons », je pense d'abord aux « vieux » *Maxime* et *Aurélien* avec qui j'ai partagé des bières dès mon arrivée (et l'escalade pour Aurélien) ; aux moins vieux *Clément* et *Pierre* mon (presque) voisin de terre natale (qui n'était pas MEMO, je sais) ; et aux docs actuel.les auxquel.les je souhaite plein de courage pour la fin (plus ou moins proche) *Kevin C., Kevin G., Vanina*, et *Déni, Mélissa* (garde ta joie de vivre et ta gentillesse, tu es quelqu'un de bien) pour les PHYPOL. Merci à *Adrien*, pour tous les footings et autres moments passés ensemble, pour tes blagues nulles et de nous avoir supporté aux soirées Koh Lanta – cocktails. Egalement à *Mathieu* pour ton amour du rugby et ta trop grande gentillesse et serviabilité, j'ai encore espoir d'un jour t'apprendre à dire non. Un grand merci enfin à *Loïc*, pour ta capacité d'écoute, nos longues discussions en fin de soirée (alors qu'il serait plus judicieux d'aller dormir), ta joie de vivre et ton talent au bière pong. Je te souhaite plein de bonheur et réussite pour la suite !

Continuons par les docs de la meilleure équipe, à savoir la mienne ou équipe PPB. Je suis si heureuse d'avoir pu toustes vous connaître, au labo ou en-dehors pour ceux qui avaient déjà soutenu quand je suis arrivée, merci de m'avoir intégrée si rapidement à cette belle PPB team.

Camille, même si on ne s'est jamais côtoyés au labo j'ai eu la chance de te rencontrer (la belle époque du Colombus des vendredis midis) et d'apprendre à apprécier ton caractère, tes piques continuelles et ton emploi du temps de ministre (bon ok on se ressemble beaucoup finalement). Merci pour tout le soutien que tu m'as apporté, d'avoir autant été à l'écoute, d'avoir hébergé nos soirées confinement - Koh Lanta, et de toujours trouver un peu de temps pour qu'on se voie. Tu es un ami précieux, je suis sûre qu'on arrivera à rester en contact.

Clémentine, la reine des potins (tu as un vrai talent là-dessus, j'ai toujours été impressionnée) et une des plus engagée que je connaisse, tu es une belle personne avec qui j'ai eu des discussions très profondes et passionnantes à Venise. J'aime beaucoup l'écoute que tu portes à tout le monde et tes efforts pour que chacun.e se sente à son aise, ainsi que ta manière de voir le monde et les relations aux autres. Un grand merci à *Hugo* par la même occasion, pour nos discussions sur le militantisme ou le féminisme, c'est toujours agréable de parler avec toi tant tu es cultivé et ouvert d'esprit. Je vous souhaite plein de bonnes choses dans votre nouvelle vie à deux à Bordeaux !

Marine, petit bout de femme au caractère bien trempé, tu es aussi gentille et attachante que franche et directe quand quelque chose ne te plaît pas. Merci d'être aussi patiente et d'autant nous relancer sans râler quand on veut se prévoir un week-end (pas facile avec nos emplois du temps) et de nous accueillir dans ton petit cocon à Castres. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans ta nouvelle aventure, tu vas assurer !

Ambra, la mia professoressa d'italiano, avec qui j'ai eu la chance de partager beaucoup de moments lors de tes aller-retours à Toulouse (parfois même comme voisine, si pratique). C'est toujours si chouette de te voir, avec toute ta bonne humeur et ton énergie. Merci pour nos nombreux Spritz (parfois pas forcément faits dans les règles de l'art, mais on ne le répètera pas) et autres cocktails (réussis ou non), pour les week-end à Lyon ou ailleurs, les repas ou bières improvisées chez moi, ou les soirées hispanophones avec *Nacho*, qui lui m'a permis de rester au niveau en espagnol.

Et maintenant vient le tour (par ordre plus ou moins chronologique) de celleux avec qui j'ai partagé le bureau/labo à un moment ou à un autre, qui ont dû supporter mon énergie de mes premières années de thèse ou ma fatigue de rédaction (et le silence que je sollicitais, le casque vissé aux oreilles). Un énorme merci tout d'abord à *Elise, Maylis, Edo, Zineb, Amina, Louize, Mathieu* et *Gabriele* d'avoir cuisiné (beaucoup et bien) pour mon pot de thèse et de m'avoir aidée pour l'organisation (avec *Prescillia* et *Caro*), vous étiez incroyables.

Maximilien, malgré tes blagues très imites un peu déconcertantes au début, j'ai appris à t'apprécier pendant ma première année de thèse dans le même bureau que toi. Je te remercie pour tes conseils et réponses à mes questions scientifiques ou de méthodologie, et pour avoir égayé nos vendredis matins en lendemain de soirée avec du Balavoine dans le bureau ou des bandes annonces de films nuls. Je suis sûre que tu fais un très bon prof et que tes élèves t'adorent !

Prescillia, ma Pripri c'est si difficile de tout résumer en un paragraphe. J'ai vite changé de première impression sur toi (tu comprendras ce que je veux dire) en apprenant à te connaître. Tu es une personne incroyable, tu m'as toujours impressionnée par ta faculté de travail et la diversité de tes connaissances (j'ai toujours eu l'impression que tu avais réponse à toutes mes questions). J'ai également été ravie d'avoir l'occasion de travailler avec toi, j'espère qu'on pourra remettre ça ! Mais au-delà du professionnel tu m'as tant apporté personnellement ces trois années, tu as toujours été là pour moi dans les moments difficiles (comme les confinements où j'étais invitée à manger et dormir chez toi ou les bières bues sur le parking en temps de covid) … J'espère pouvoir te rendre la pareille et être à la hauteur. Garde ta persévérance, ta joie de vivre, ton ouverture sur les autres (mais ne danse plus trop n'importe où s'il te plait), et on se reverra pour des verres / repas / randos / soirées / volleys / molkys / capuccini … Ou tout ça à la fois !

Eren, drama-queen dans l'âme toujours si rayonnant, merci pour toutes nos conversations et pour ta bienveillance. Quand on parle avec toi on ne se sent jamais jugés sur notre anglais et c'est si agréable. Je te souhaite une belle aventure américaine !

Mathilde et *El Mehdi*, mes contemporains de soutenance étant peu sur site, félicitations pour votre travail respectif, c'était pour tous les deux toujours un plaisir d'être avec vous au labo ou en dehors !

Zineb, comme une jolie fleur, je t'ai vue t'ouvrir et t'épanouir pendant tes deux premières années ici, tu as beaucoup changé depuis ton arrivée et semble bien dans ta peau et ta thèse. J'ai beaucoup apprécié nos (très) longues discussions sur des sujets profonds, nos sorties extra-labo au stade ou au bar (en surprise après ton tennis par exemple, ou même sur une de tes propositions, comme quoi tout arrive !). Pour continuer sur mes conseils de « doyenne », aie confiance pour ta 3ème année, ne te mets pas trop de pression (pour ne pas finir fanée, pour continuer sur la métaphore), je suis certaine que tu rédigeras un très beau manuscrit dont tu seras fière pour la suite.

Edoardo, mon italien préféré, tu t'es si vite intégré malgré ton arrivée lors des couvre-feux et confinements, tu étais dès le début toujours partant pour un apéro-lac ou n'importe quelle sortie (et ça n'a pas changé d'ailleurs). J'ai tant de bons souvenirs avec toi, que ce soit au labo pendant nos cours d'expressions plus ou moins italiennes (plutôt romaines à vrai dire), chez Marcello, en balade dans la région, en congrès (dont Venise où tu as dû prendre soin de moi qui n'étais pas en plein forme), déchainés en soirée ou juste quand Britney passait à la radio sur le trajet retour du labo en voiture. Tu es si gentil, disponible pour les autres et drôle. Sei una persona meravigliosa e mi mancherai moltissimo !

Elise, mon amuseuse préférée, tu es la meilleure pour nous faire rire au bureau, avec tes questions surprenantes (mais attention ronds > carrés) ou tes bruits soudains et déconcertants. Tu es un vrai soleil qui illumine nos journées. Tu es aussi la meilleure partenaire de sortie ou festival, avec qui danser toute la nuit même sous la pluie. Mais au-delà de ça tu es également une très bonne amie, très attentive et soucieuse des autres, et tu as été d'un très bon soutien pendant ma fin de thèse parfois difficile. J'ai par ailleurs beaucoup aimé t'emmener en rando et vivre cette nuit en refuge avec toi. Je te souhaite le meilleur pour la suite (professionnellement mais pas que), je serai là pour toi si besoin, et surtout garde en tête que tu es quelqu'un de bien et que tu peux y arriver !

Stephanie et *Andrew*, thanks a lot for having been such nice friends. You got integrated so quickly (Chartreusitos helped), I loved teaching you French habits (especially French cheesy meals as raclette or tartiflette) and I think you helped me a lot improving my English. If you ever come back to Europe tell me, and if not maybe one day I'll visit you! Bonne chance Stephanie pour la dernière ligne droite de ta thèse !

Sylvain, j'ai vraiment appris à te connaître pendant notre « winter » school à Davos, et j'ai beaucoup apprécié nos longues discussions voyages ou autres. Tu es si passionné de sciences, c'est toujours intéressant d'en parler avec toi (entre personnes contaminées par le virus du SAXS, on se comprend …) et tu as parfois une culture générale surprenante. J'espère que tu auras par la suite un travail dans lequel tu t'éclateras et qui te fera vibrer autant qu'actuellement.

Maëlys, comme tu en rêvais voilà une jolie écriture avec des bouclettes pour tes remerciements. Stagiaire tellement intégrée que tu as ta place dans notre bureau (bien pratique cette cyber-attaque non ?), tu as dû subir ma fin de rédaction et passer le mois de septembre à chuchoter avec Elise au bureau sans jamais t'en plaindre. Tu me rappelles parfois un peu moi plus jeune, mais en plus expressive et joyeuse. Tu es toujours à l'écoute et fais attention aux autres, et si drôle quand tu nous racontes toutes tes aventures. Je te souhaite plein de voyages seule pour prendre confiance en toi (c'est en plus une si belle expérience) et de bien profiter du Canada !

Les petites dernières du bureau, *Amina* et *Louize*, avec qui j'ai partagé moins de moments, merci pour votre bonne humeur et pour m'avoir laissé m'éterniser un peu au bureau avant que je ne parte. Merci Loulou pour les spectacles avec Maëlys et pour ta grande douceur.

J'ai moins pu croiser les nouveaux docs du 2ème étage avec les congrès/vacances/déplacements que j'ai fait, mais je souhaite à *Gabriele, Youness* et *Antoine* plein de bonnes choses pour la suite, vous êtes arrivés dans une très bonne équipe !

Une petite pensée aussi aux doctorant.es de pharma, que j'ai moins côtoyé.es mais avec qui j'ai des bons souvenirs, *Maylis*, *Clémence* (profite bien de ton East London) ; et *Laure, Andrea et Fahd*, bon courage à vous trois pour la fin !

Après avoir fait le tour (je l'espère !) de toutes les personnes ayant partagé ma vie de labo, vient le tour des copains et copines d'en dehors, de Centrale ou de prépa.

D'abord les toulousain.es : *Manon*, merci d'avoir été là dès le début, pour les brunchs au soleil derrière ta baie vitrée, et les discussions autour d'un thé pendant des heures ou d'un verre (aux blindtests entre autres). *Thomas*, difficile d'être dispos en même temps, mais c'est toujours très sympa de partir en rando ou d'aller boire une bière (qui se termine en 3 ou 4 un lundi soir …) en parlant rugby avec toi ! *Virgile*, de même on s'est peu croisés à Toulouse mais c'était à chaque fois un plaisir, tu as l'air si bien ici et d'avoir trouvé ta voie, je te souhaite plein de réussite pour ta vie future !

La team lyonnaise (que je rejoindrai surement un jour) dont mes ancien.nes colocs : *Pauline, Joséphine* (qui m'a fait tomber amoureuse des Pyrénées avec les week-end à Luz), *Tim*, *Arthur Lett*, mais aussi *Agathe* et *Olivier*, merci d'être venus à Toulouse pour me soutenir pour ma soutenance (quel jeu de mots), je m'amuse toujours autant quand on est ensemble. Idem pour *Charlotte* la bordelaise (même si on n'a pas trouvé le temps de se voir quand on n'habitait pas si loin …). *Arthur R.*, see you soon à Lyon !

Les parisien.nes (ou ancien.nes parisien.nes) : *Alice* (si inspirante et toujours d'accord pour que je squatte, merci d'avoir installé le pot de thèse avec Tim), *Léna* et *Adrien, Maxence*, la future docteure *Maëlle* et Docteure *Lola*.

La french team de mon (court) séjour en Allemagne : *Irene, Agnès, Sofia, Raphaël, Lynn* et *Chloé B.* rejointe à Bonn.

Bien évidemment les filles du TCMS rugby, qui ont souffert avec moi les lundis après matchs (des bleus partout et la voix cassée du retour en bus) ou pendant les entraînements en hiver, et qui ont égayé mes dimanches soirs de 3ème mi-temps (mais pas que), une équipe si soudée (mais pouvant être si bête) c'est si beau. Merci en particulier à *Coco* (capitaine !), *Juju, Capu, Emilia, Laura, Andréa, Chouquette, Aurélie, Cindy, Payou, Tiff, Mel* et toutes les autres. TC un jour TC toujours !

Egalement merci aux autres copains copines revu.es le temps d'un week end (ou non) mais qui sont dans mon cœur et que je n'ai pas cité.es ici.

Enfin pour finir, le plus important pour moi : ma famille.

Merci à mes cousins *Valentin* et *Anabelle*, pour les week end à Londres ou Toulouse (ou les Noëls). Je remercie énormément mes parents *Alain* et *Margo* pour la logistique de la soutenance en premier lieu, mais aussi pour avoir été d'un énorme soutien (même à distance) pendant ces trois ans, sans lequel ma thèse n'aurait pas pu être une réussite. Que dire de mes deux sœurs incroyables, *Magali* et ta petite famille *Steve* et *Lara* ; et *Mélanie* dont je suis si fière, et qui m'a beaucoup aidée pour le pot avec *Antoine*.

Last but not least, un immense merci à *Victor*, pour m'avoir supportée tout ce temps même à distance, pour avoir été patient dans tous mes moments de doute, rassurant et compréhensif (en particulier pendant ma rédaction).

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS 13

INTRODUCTION 15

CHAPITRE 1. ETAT DE L'ART 17

I LE TISSU OSSEUX ET LA RECONSTRUCTION OSSEUSE 17
I.1 Le tissu osseux 17
I.1.1 Structure et composition du tissu osseux 17
I.1.2 Cellules et enzymes osseuses 21
I.2 Le remodelage et la reconstruction osseuse 22
I.2.1 Remodelage 22
I.2.2 Reconstruction 24
I.3 Cahier des charges pour un biomatériau utilisable comme substitut osseux 25
I.3.1 Biocompatibilité 25
I.3.2 Bioactivité 26
I.3.3 Biorésorption 26
I.3.4 Stabilité mécanique 27
II LES BIOMATERIAUX POUR LA RECONSTRUCTION OSSEUSE 27
II.1 Phases minérales cristallines 28
II.1.1 Phases cristallines de phosphate de calcium 28
II.1.1.1 Apatites 29
II.1.1.2 Pyrophosphate de calcium 30
II.1.2 Phases cristallines de carbonate de calcium 31
II.1.2.1 Phases cristallines anhydres 32
II.1.2.1.i Calcite 34
II.1.2.1.ii Aragonite 35
II.1.2.1.iii Vatérite 36
II.1.2.2 Phases cristallines hydratées 38
II.1.2.2.i Carbonate de calcium hémi-hydraté (CCHH) 38
II.1.2.2.ii Carbonate de calcium monohydraté ou calcite monohydratée (MHC) 39
II.1.2.2.iii Carbonate de calcium hexahydraté ou ikaïte 40
II.2 Les phases amorphes calciques bio-inspirées 42
II.2.1 Techniques de caractérisation structurale 42
II.2.1.1 Techniques expérimentales 42
II.2.1.2 Apport de la modélisation 44
II.2.2 Les phases amorphes de phosphate 44
II.2.2.1 Orthophosphate amorphe (ACP) 44
II.2.2.1.i Structure et composition de l'ACP 45
II.2.2.1.ii Germination, cristallisation et biominéralisation 46
II.2.2.1.iii Synthèse des ACP 48
II.2.2.2 Pyrophosphate amorphe (ACPP) 49
II.2.2.3 Amorphes mixtes ortho et pyrophosphate de calcium 50
II.2.3 Carbonate de calcium amorphe (ACC) 50
II.2.3.1 Organisation à petite échelle : ACC biogéniques et synthétiques 50
II.2.3.2 Théories de la germination et croissance cristalline 54
II.2.3.3 Rôle de l'eau 57
II.2.3.4 Synthèse et additifs 58
II.3 Elaboration et mise en forme des carbonates de calcium pour la substitution osseuse 61
II.3.1 Mise en forme de matériaux inorganiques 61
II.3.2 Mise en forme de matériaux composites 63
III OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE 65

CHAPITRE 2. SYNTHESE ET CARACTERISATION DES PYACC : INFLUENCE DU TAUX DE PYROPHOSPHATE SUR LEUR COMPOSITION ET LEUR STRUCTURE MULTI-ECHELLE 69

I SYNTHESE DES POUDRES DE PYACC 69
II INFLUENCE DU TAUX DE PYROPHOSPHATE SUR LA (NON) CRISTALLINITE DES PYACC 71
II.1 Obtention d'une phase amorphe 71
II.2 Composition chimique 75
III MISE EN EVIDENCE D'UNE ORGANISATION MULTI-ECHELLE DES PYACC 80
III.1 A l'échelle des agrégats de particules 80
III.2 A l'échelle des particules 83
III.3 A l'échelle sub-particulaire 84
IV CONSTRUCTION D'UN MODELE EXPERIMENTAL DE L'ORGANISATION DES PYACC 91
IV.1 Structure proto-cristalline ? 91
IV.2 Répartition des pyrophosphates 95
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 101

CHAPITRE 3. DOPAGE DE PYACC PAR DES IONS BIOACTIFS : SYNTHESE, CARACTERISATION, EVOLUTION EN MILIEUX AQUEUX ET EVALUATION DES PROPRIETES BIOLOGIQUES *IN VITRO* 103

I ETAT DE L'ART : IONS DOPANTS BIOACTIFS ET ETUDES D'EVOLUTION 103
I.1 Principaux ions dopants d'intérêt biologique 103
I.1.1 Bioactivité des ions 103
I.1.2 Dopage ionique des phosphates de calcium 105
I.1.3 Dopage ionique du carbonate de calcium amorphe 106
I.2 Etudes d'évolution en milieux aqueux 106
I.3 Evaluation biologique in vitro en présence de cellules 108
II SYNTHESE ET CARACTERISATION DES ACC DOPES 109
II.1 Synthèses de poudres de 10PyACC dopées avec des cations d'intérêt 109
II.2 Caractérisation des poudres 10PyACC dopées synthétisées 110
III EVOLUTION DES POUDRES DE PYACC DOPEES ET NON DOPEES EN MILIEUX AQUEUX 119
III.1 Méthodologie 120
III.2 Evolution des poudres dans l'eau 122
III.2.1 Poudres de référence 5PyACC et 10PyACC 122
III.2.2 Poudres dopées avec du strontium *a*Sr 128
III.2.3 Poudres dopées avec du cuivre *a*Cu 133
III.2.4 Poudres dopées avec du zinc *a*Zn 138
III.2.5 Récapitulatif des tendances principales des évolutions dans l'eau des poudres de PyACC non dopées ou dopées 143
III.3 Evolution des poudres dans le SBF 144
III.3.1 Poudres de référence 5PyACC et 10PyACC 145
III.3.2 Poudres dopées avec du strontium *a*Sr 149
III.3.3 Poudres dopées avec du cuivre *a*Cu 152
III.3.4 Poudres dopées avec du zinc *a*Zn 157
III.3.5 Récapitulatif des tendances principales des évolutions dans le SBF des poudres de PyACC non dopées ou dopées 160
III.4 Conclusion sur les essais d'évolution dans l'eau et le SBF des poudres 10PyACC dopées et non dopées.. 160
IV EVALUATION *IN VITRO* DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES DIFFERENTES POUDRES PYACC SYNTHETISEES 162
IV.1 Etat de l'art sur les essais in vitro 162
IV.2 Impact de la stérilisation sur les poudres d'ACC dopées 163
IV.3 Evaluation de la cytocompatibilité des différentes poudres amorphes synthétisées 165
IV.4 Evaluation des propriétés de biominéralisation des poudres synthétisées 168
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 170

CHAPITRE 4. VERS LA MISE EN FORME DE SCAFFOLDS MACROPOREUX PAR FREEZE-CASTING A PARTIR DE POUDRES COMPOSITES DE PYACC 173

I SYNTHESE ET CARACTERISATION D'UN MATERIAU COMPOSITE ALGINATE-PYACC 174
I.1 L'alginate pour la substitution osseuse 174
I.2 Synthèse du matériau composite alginate-PyACC et caractérisation 175
I.2.1 Etat de l'art des composites alginate-particules inorganiques synthétisés *in situ* 175
I.2.2 Protocole de synthèse *in situ* 176
I.2.3 Caractérisation 176
I.3 Etude de l'évolution en milieux aqueux 180
I.3.1 Evolution dans l'eau 181
I.3.2 Evolution dans le SBF 184
I.4 Evaluation des propriétés biologiques in vitro 187
I.5 Conclusion sur les poudres composites alginate-PyACC co-précipitées in situ 189
II FREEZE-CASTING : JUSTIFICATION DU CHOIX DU PROCEDE ET ETAT DE L'ART 190
II.1 Cahier des charges pour des applications de substitution osseuse 190
II.2 Génération de porosité : choix du procédé 190
II.3 Procédé de freeze-casting 191
II.3.1 Principe du procédé 191
II.3.2 Influence des paramètres liés au procédé 191
II.3.3 Influence des paramètres liés à la suspension 193
II.4 Techniques de caractérisation des scaffolds obtenus par freeze-casting 194
II.4.1 Techniques de caractérisation de la composition chimique et structurale 195
II.4.2 Techniques de caractérisation 2D 195
II.4.3 Techniques de caractérisation 3D 196
II.5 Matériaux poreux issus du freeze-casting pour la substitution osseuse 198
III ELABORATION DE SCAFFOLDS MACROPOREUX COMPOSITES AVEC DIFFERENTS TAUX DE CHARGE PAR FREEZE-CASTING 200
III.1 Description du dispositif mis en œuvre 200
III.2 Protocole d'élaboration des scaffolds composites 201
IV INFLUENCE DU TAUX DE CHARGE SUR LA POROSITE DES SCAFFOLDS 202
IV.1 Caractérisations macroscopiques 202
IV.2 Caractérisations de la structure poreuse 206
IV.2.1 Mise en évidence de l'existence de différentes zones de porosité 207
IV.2.2 Evaluation quantitative de l'évolution de la porosité dans les scaffolds 211
IV.2.3 Discussion de l'effet chimique des charges sur la porosité et les murs 220
V INFLUENCE DU TAUX DE CHARGE SUR LES PROPRIETES MECANIQUES DES SCAFFOLDS 222
V.1 Répartition spatiale des charges dans les scaffolds 222
V.2 Essais mécaniques 224
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 228

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 231

REFERENCES 235

ANNEXES 267

I ANNEXE DU CHAPITRE 1 267
AI.1 Diffractogrammes RX des phases de carbonate de calcium 267
AI.2 Spectres d'absorption infrarouge et Raman des phases de carbonate de calcium 268
II ANNEXE DU CHAPITRE 2 270
AII.1 Précurseur de pyrophosphate de sodium 270
AII.2 Isothermes d'adsorption-désorption 270
AII.3 Cristallisation sous le faisceau MET 273
AII.4 Calcul du nombre d'ions carbonate par clusters 273

III ANNEXE DU CHAPITRE 3 274
AIII.1 Spectres d'absorption infrarouge superposés des poudres dopées 274
AIII.2 Spectres d'absorption infrarouge complets des poudres après évolution dans l'eau et le SBF 275
AIII.3 Essais d'évolution des poudres dopées dans l'eau : données brutes de libération 276
AIII.4 Essais d'évolution des poudres dopées dans le SBF: données brutes de libération 277
AIII.5 Quantification du zinc dans les poudres dopées ayant évolué dans le SBF 278
IV ANNEXE DU CHAPITRE 4 279
AIV.1 Essai d'évolution de la poudre composite dans l'eau : données brutes de libération 279
AIV.2 Données issues des tests mécaniques pour chaque triplicat 279
V MATERIEL ET METHODES 280
V.1 Produits utilisés 280
V.2 Protocoles de synthèse 280
V.2.1 Synthèse des poudres de PyACC 280
V.2.2 Synthèse des poudres de PyACC dopées 281
V.2.3 Synthèse des poudres composites d'Alg-PyACC 281
V.2.4 Récapitulatif des quantités utilisées pour les synthèses 282
V.3 Protocole pour les essais d'évolution des poudres en milieux aqueux 283
V.4 Composition des suspensions pour le freeze-casting 285
V.5 Techniques de caractérisation de diffusion/diffraction des rayons X 286
V.5.1 Diffraction des rayons X 286
V.5.2 Diffusion des rayons X aux petits angles 286
V.5.3 Diffusion des rayons X aux grands angles 291
V.6 Techniques de caractérisation structurales et chimiques 292
V.6.1 Spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier 292
V.6.2 Spectroscopie Raman 292
V.6.3 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire en phase solide 292
V.6.4 Dosages chimiques 294
V.6.4.1 Coulomètrie à CO_2 294
V.6.4.2 Dosage du phosphore par spectroscopie visible 294
V.6.4.3 Dosage du calcium par complexométrie 295
V.6.4.4 Spectroscopie d'émission de plasma à couplage inductif 295
V.6.4.5 Spectrométrie d'absorption atomique de flamme 295
V.6.5 Analyses thermogravimétriques et analyses thermiques différentielles 297
V.7 Techniques de caractérisation de la morphologie, de la porosité et des propriétés mécaniques . 298
V.7.1 Détermination de la surface spécifique des poudres 298
V.7.2 Microscopie électronique à balayage 298
V.7.3 Microscopie électronique à transmission 300
V.7.4 Mesure de densité des scaffolds 300
V.7.5 Porosimétrie mercure 301
V.7.6 Micro-tomographie à rayons X 301
V.7.7 Essais de compression uniaxiale 302
V.8 Essais cellulaires 304

LISTE DES ABREVIATIONS

3T3	Lignée de cellules d'embryons de souris
ACC	Carbonate de calcium amorphe
ACP	Phosphate tricalcique amorphe
ACPP	Pyrophosphate de calcium amorphe
10Alg-10PyACC (10Alg) 20Alg-10PyACC (20Alg)	Poudre composite de 10PyACC co-précipité avec 10 ou 20 % mass. d'alginate
ATP	Adénosine triphosphate
AUC	Ultracentrifugation analytique
BCP	Phosphate de calcium biphasique
BMP	Protéines morphogénétiques osseuses
BSA	Albumine de sérum bovin
CAM	Cocktail d'activation de minéralisation
CaP	Phosphate de calcium
CC	Carbonate de calcium
CCHH	Carbonate de calcium hémihydraté
CIRIMAT	Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux
CNT	Théorie de la nucléation classique
CP (RMN)	Polarisation croisée (RMN)
CPP	Pyrophosphate de calcium anhydre
CPPD	Pyrophosphate de calcium dihydraté
*a*Cu-10PyACC (*a*Cu)	10PyACC dopé avec *a* % mol. de Cu^{2+}, *a* = 1 ; 5 ou 10
Đ	Dispersité
DCPA	Phosphate dicalcique anhydre (monétite)
DCPD	Phosphate dicalcique dihydraté (brushite)
D_F	Diamètre de Féret
DFT	Théorie de la fonctionnelle de la densité
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
D_M	Diamètre maximum de la loi log normale appliquée à la distribution des diamètres de Féret
DMC	Carbonate de diméthyle
DOLLOP	*Dynamically ordered liquid-like oxyanions polymers*
ESB	Société Européenne des Biomatériaux
EXAFS	*Extended X-Ray Absorption Fine Structure*
FCS	Sérum fœtal de veau
GDL	D-glucono-δ-lactone
HA	Hydroxyapatite
HETCOR (RMN)	Corrélation hétéronucléaire (RMN)
IUPAC	Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée
MAS (RMN)	*Magic Angle Spinning*, RMN acquise en rotation à l'angle magique
MHC	Calcite monohydratée
M_n	Masse molaire en nombre
MTT	Sel de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium)
M_w	Masse molaire en poids
NPC	Protéines non-collagéniques
OCP	Phosphate octocalcique
ORM	Ostéoradionécrose mandibulaire

PAA	Acide poly(acrylique)
pa-ACC	ACC proto-aragonite
PAL	Phosphatase alcaline
pAsp	Acide poly(aspartique)
pc-ACC	ACC proto-calcite
PCL	Poly(ε-caprolactone)
PDF	Fonction de distribution des paires
PDI	Indice de polydispersité
PDLA	Poly(D-lactide)
PDLLA	Poly(D,L-lactide)
PE (ou HDPE)	Poly(éthylène) (ou poly(éthylène) haute densité)
PET	Poly(tétrafluoroéthylène)
PGA	Poly(acide glycolique)
PILP	*Polymer-induced liquid-precursor*
PLA	Poly(acide lactique)
PLGA	Poly(acide lactique-*co*-glycolique)
PMMA	Poly(méthacrylate de méthyle)
PNC	Clusters de prénucléation
pNP pNPP	p-nitrophénol p-nitrophényl phosphate
PolyP	Polyphosphate
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
pv-ACC	ACC proto-vatérite
PyACC (*z*PyACC)	Carbonate de calcium amorphe stabilisé avec du pyrophosphate (avec *z* % mol.)
REDOR (RMN)	Double résonance rotationnelle (RMN)
RMC	Monte Carlo Inversée
RPMI	Milieu de culture des cellules 3T3
RUNX2	Protéine *Runt-related transcription factor 2*
S*x*	Scaffold élaboré par freeze-casting à partir de la poudre composite 20Alg avec une fraction de charges inorganiques de *x* % mass. (*x* = 0 ; 10 ; 30 ; 50 ou 70)
SANS/SAXS	Diffusion des neutrons/rayons X aux petits angles
SaOS-2	Cellules ostéogéniques humaines d'ostéosarcome
SBF	Fluide corporel simulé (*Simulated Body Fluid)*
SLD	Densité de longueur de diffusion (*Scattering Length Density*)
*a*Sr-10PyACC (*a*Sr)	10PyACC dopé avec *a* % mol. de Sr^{2+}, *a* = 1 ; 5 ou 10 %
STP	Triphosphate de sodium
TCP	Phosphate tricalcique
TIPS	Séparation de phase induite thermiquement
TRIS	Tampon de tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UMB	Unités multicellulaires de base
WAXS	Diffusion des rayons X aux grands angles
XANES	*X-Ray Absorption Near Edge Structure*
*a*Zn-10PyACC (*a*Zn)	10PyACC dopé avec *a* % mol. de Zn^{2+}, *a* = 1 ; 5 ou 10 %

INTRODUCTION

En raison du vieillissement de la population, le nombre de traumatismes ou de pathologies induisant des défauts osseux de taille critique et limitant l'autoréparation est en constante augmentation. Les greffes osseuses, généralement utilisées comme « gold standard » pour leurs capacités de réparation du tissu osseux après implantation sur de tels défauts présentent néanmoins des inconvénients, associés entre autres à la disponibilité limitée des greffons (autogreffe) et aux risques de contamination (allogreffe). Ce contexte a motivé le développement des substituts osseux synthétiques comme alternative, dont les céramiques et en particulier les phosphates de calcium (CaP) sont parmi les plus étudiés et utilisés. Cependant, selon les applications, une vitesse de résorption plus élevée des implants est nécessaire afin de permettre à l'os néoformé d'occuper la totalité du volume du défaut. Une des stratégies prometteuses est l'utilisation de biomatériaux composés de carbonate de calcium (CC), dont les phases sont pour la plupart plus solubles et donc potentiellement dégradées *in vivo* plus rapidement que les CaP. La famille des CC compte plusieurs phases cristallines anhydres et hydratées et une phase amorphe hydratée (ACC). Cette dernière, du fait de sa métastabilité est la plus soluble en solution, libérant lors de sa dissolution des ions carbonate et calcium constitutifs de l'apatite osseuse. Alors que cette réactivité est intrinsèquement liée à la structuration multi-échelle des ACC (de l'organisation moléculaire au micron) elle est relativement peu décrite dans la littérature. Elle peut pourtant expliquer leur métastabilité en solution et permettre d'anticiper leur dégradation *in vivo*. En revanche, les mécanismes de formation et de cristallisation de l'ACC ont été largement étudiés, et différentes stratégies de synthèse ont été proposées pour le stabiliser vis-à-vis de la cristallisation. Une des plus communes est l'ajout d'additifs stabilisateurs pendant la synthèse. Parmi ceux-ci, l'ion magnésium est beaucoup mentionné, mais des alternatives reposant sur les ions phosphate ont aussi été expérimentées, présentant l'avantage de libérer, outre Ca^{2+} et CO_3^{2-}, des ions PO_4^{3-} (ou HPO_4^{2-}), « briques » essentielles du minéral osseux. L'utilisation du dimère pyrophosphate ($P_2O_7^{4-}$) comme stabilisateur est par contre étudiée de manière marginale. Pourtant, cet ion présente plusieurs intérêts : i) il est connu comme inhibiteur de cristallisation de la calcite, ii) il peut être clivé *in vivo* par des enzymes dont la phosphatase alcaline (PAL), iii) il a montré des propriétés bioactives *in vitro* et *in vivo* dans des formulations de biomatériaux.

Dans ce contexte, cette thèse porte sur le développement de matériaux à base de carbonate de calcium amorphe stabilisé par l'ion pyrophosphate. Plusieurs grandes problématiques sont associées à ces matériaux peu décrits.

La première interrogation est liée à leur nature même : est-il possible de moduler la stabilisation de tels ACC via le pourcentage d'ions pyrophosphate potentiellement intégrés à leur composition ? Quel est l'effet de ce ratio sur la structure et l'organisation multi-échelle de ces solides et comment caractériser cette corrélation ?

Par ailleurs, au-delà de leurs caractéristiques intrinsèques, est-il possible de leur conférer des propriétés biologiques additionnelles pour accroître leur potentiel en tant que substitut osseux pour des applications ciblées ? En particulier et à l'instar des CaP, leur capacité à intégrer des ions dopants aux propriétés ostéogéniques, pro-angiogéniques et/ou antibactériennes et les cinétiques de libération associées présentent un enjeu majeur.

Enfin, comment est-il possible d'élaborer ces poudres métastables sous forme de matériaux tridimensionnels sans dégrader leur structuration et composition, avec une porosité contrôlée afin de

favoriser colonisation cellulaire et vascularisation, améliorant ainsi leur intégration après implantation ?

Ces travaux de thèse, cofinancés par la région Occitanie (BioPhORM n°19008740/ALDOCT-000734) et réalisés au CIRIMAT font écho à ces questionnements et les résultats qui en sont issus ont été organisés en quatre chapitres pour articuler au mieux quelques éléments de réponse.

Le premier chapitre est une revue bibliographique, consacrée dans un premier temps à la description de l'os et de ses caractéristiques, puis des biomatériaux utilisés pour la substitution osseuse, en se focalisant d'abord sur les phosphates de calcium puis les carbonates de calcium. Les phases amorphes CaP et CC seront plus spécifiquement décrites du fait de leurs similarités, notamment quant à leurs mécanismes de synthèse, de formation, de cristallisation ou de mise en forme. Ce chapitre se clôture sur une présentation du positionnement plus précis du sujet de thèse au regard de cet état de l'art et sur les objectifs de ce travail.

Le deuxième chapitre, cœur de ce travail, est dédié au matériau d'intérêt, l'ACC stabilisé par l'ion pyrophosphate (PyACC) et en particulier à l'étude de l'influence du taux de pyrophosphate sur la structure et la composition de poudres de carbonate de calcium amorphe ainsi stabilisées. Dans ce but, diverses techniques de caractérisation avancées dont le SAXS, le WAXS-PDF et la RMN en phase solide sont utilisées, permettant *in fine* de proposer un modèle expérimental de l'organisation hiérarchique sur plusieurs échelles des poudres synthétisées.

Le troisième chapitre concerne le dopage des PyACC par des ions bioactifs (Sr^{2+}, Cu^{2+} et Zn^{2+}) connus pour leur comportement ostéogénique, pro-angiogénique et/ou antibactérien et la caractérisation des poudres dopées obtenues. L'évolution physico-chimique de celles-ci dans deux milieux aqueux acellulaires, l'eau et une solution simulant les fluides biologiques humains (*simulated body fluid*, SBF) a été étudiée, en terme de transformation de phases et de libération d'ions actifs. La cytocompatibilité et la capacité de minéralisation des différentes poudres dopées ont été évaluées via des tests cellulaires *in vitro* préliminaires.

Enfin, le chapitre 4 porte sur l'étude de la faisabilité d'élaboration et de mise en forme de poudres composites de PyACC co-précipitées avec de l'alginate. La génération de scaffolds macroporeux par le procédé de freeze-casting a en particulier été développée. L'impact du taux de charges minérales sur les caractéristiques de la porosité ainsi que sur les propriétés mécaniques des scaffolds macroporeux obtenus a notamment été analysé.

La conclusion générale résume et corrèle l'ensemble des résultats et propose des perspectives à ces travaux.

CHAPITRE 1. ETAT DE L'ART

Ces travaux de thèse portent sur la synthèse et la caractérisation de matériaux à base de carbonate de calcium pour la substitution osseuse. Par conséquent, ce chapitre présente dans un premier temps le tissu osseux en particulier sa structure, sa composition et les cellules et enzymes qu'il contient, ainsi que les mécanismes de remodelage et reconstruction osseux, et finalement le cahier des charges pour élaborer un biomatériau bioactif et résorbable pour la substitution osseuse. Une revue bibliographique sur deux types de matériaux inorganiques est ensuite présentée : les phosphates de calcium, qui sont majoritairement décrits et utilisés en tant que substituts osseux, et les carbonates de calcium, qui sont également des matériaux d'intérêt bien que moins développés pour la réparation du tissu osseux. Une attention particulière sera portée aux principales phases les constituant et leurs caractéristiques. Cette revue se focalise par la suite sur les phases calciques amorphes (phosphate et carbonate) et présente leur organisation à l'échelle nanométrique, les théories de la nucléation et de la cristallisation ainsi que les principales voies de synthèse et additifs utilisés. Pour finir, les objectifs de la thèse sont exposés.

I LE TISSU OSSEUX ET LA RECONSTRUCTION OSSEUSE

Comprendre la composition et structuration du tissu osseux ainsi que les mécanismes en œuvre lors du remodelage ou de la reconstruction naturelle du tissu est essentiel pour élaborer des substituts osseux adaptés, dont les propriétés peuvent aider les processus biologiques.

I.1 LE TISSU OSSEUX

I.1.1 Structure et composition du tissu osseux

Le squelette humain est composé de 206 os, qui sont classés en plusieurs catégories : les os longs, dont une dimension est nettement plus grande que les autres, comme le fémur ou l'humérus ; les os courts, avec leurs trois dimensions égales (carpes ou tarses) ; les os plats tels que la scapula (omoplate) ou la calvaria (os du crâne), dont une dimension est plus petite que les deux autres ; et enfin les os intermédiaires, regroupant ceux qui n'appartiennent pas aux autres catégories, comprenant les os allongés (clavicule), les os rayonnés (vertèbres), les os arqués (mandibule), les os sésamoïdes (rotule ou patella) … Cet ensemble d'os assure trois fonctions principales. La première est le support mécanique du corps, garantissant le soutien et l'intégrité corporels et permettant la mobilité via les articulations. De plus, le squelette protège les organes internes, le système nerveux et la moelle épinière. Il permet enfin l'homéostasie [a] (en constituant une réserve d'ions calcium, phosphate et magnésium) et l'hématopoïèse [b] [1,2].

Ces fonctions sont en partie assurées grâce à la structuration des os. En effet, l'os mature est organisé en deux parties distinctes :

- L'**os cortical** : c'est la partie la plus dense, qui représente environ 80 % de la masse osseuse [3,4]. Il est composé de lamelles concentriques orientées de manière longitudinale à l'os, entourant le canal haversien dans lequel passent les vaisseaux sanguins et les nerfs, l'ensemble formé étant appelé ostéon (ou parfois ostéone) de diamètre compris entre 200 et 250 µm [5], représenté sur la Figure 1.1. Chaque ostéon contient entre 6 et 20 lamelles [6]. Sa structure

[a] Régulation des concentrations ioniques.
[b] Production et renouvellement des cellules sanguines (globules rouges, blancs et plaquettes).

lamellaire confère à l'os cortical une grande résistance mécanique (de 130 à 230 MPa) [7–9] ainsi qu'une faible porosité globale avec des tailles de pores entre 10 – 50 µm [10] ; ces deux caractéristiques permettant de protéger la partie interne de l'os.

- L'**os spongieux** ou **trabéculaire** : il est peu dense et représente les 20 % restants de la masse osseuse. Les lamelles plates minces de sa structure, appelées trabécules de diamètre compris entre 50 et 300 µm [5], forment des pores de 200 à 600 µm de diamètre [10] par lesquels passent la moelle épinière et des vaisseaux sanguins. Elles lui confèrent une faible résistance mécanique (2 à 12 MPa) [7–9] mais une grande porosité. Celle-ci augmente la surface d'échange avec les nutriments et ions contenus dans le tissu adipeux environnant [3].

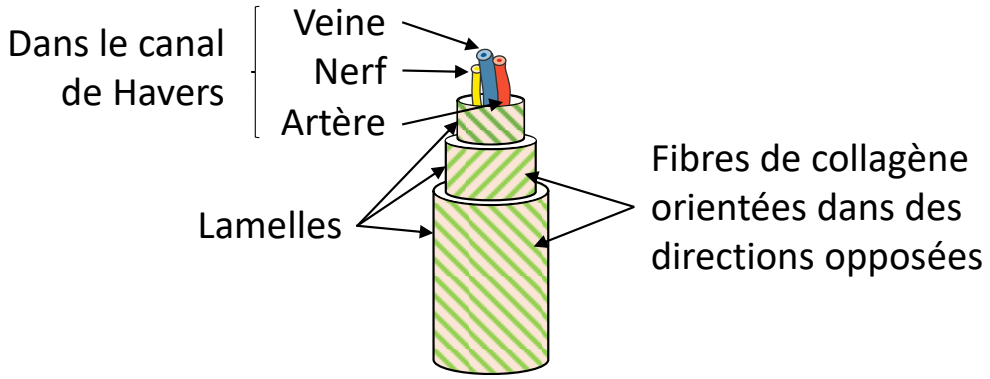


Figure 1.1 : Schéma d'un ostéon, avec ses lamelles concentriques constituées de fibres de collagène orientées dans des directions opposées, et des vaisseaux sanguins et nerfs passant dans le canal de Havers.

L'os cortical est situé en périphérie des os tandis que l'os trabéculaire est plutôt interne. Plus précisément, dans les os longs la diaphyse [c] est composée de tissu cortical et creusée du canal médullaire contenant la moelle osseuse jaune, réserve de graisses. Les épiphyses [d] sont formées de tissu trabéculaire, et sont riches en moelle osseuse rouge hématopoïétique. Les os courts contiennent un noyau d'os spongieux entouré de tissu cortical. Dans les os plats, deux couches d'os cortical entourent une couche d'os spongieux interne.

La Figure 1.2 illustre l'organisation des os et la structuration des parties corticales et trabéculaires. Le périoste est l'enveloppe des os, par laquelle les vaisseaux sanguins pénètrent puis rejoignent les capillaires des vaisseaux de Havers via les vaisseaux de Volkmann [11].

[c] Partie allongée centrale des os longs.
[d] Extrémités des os longs.

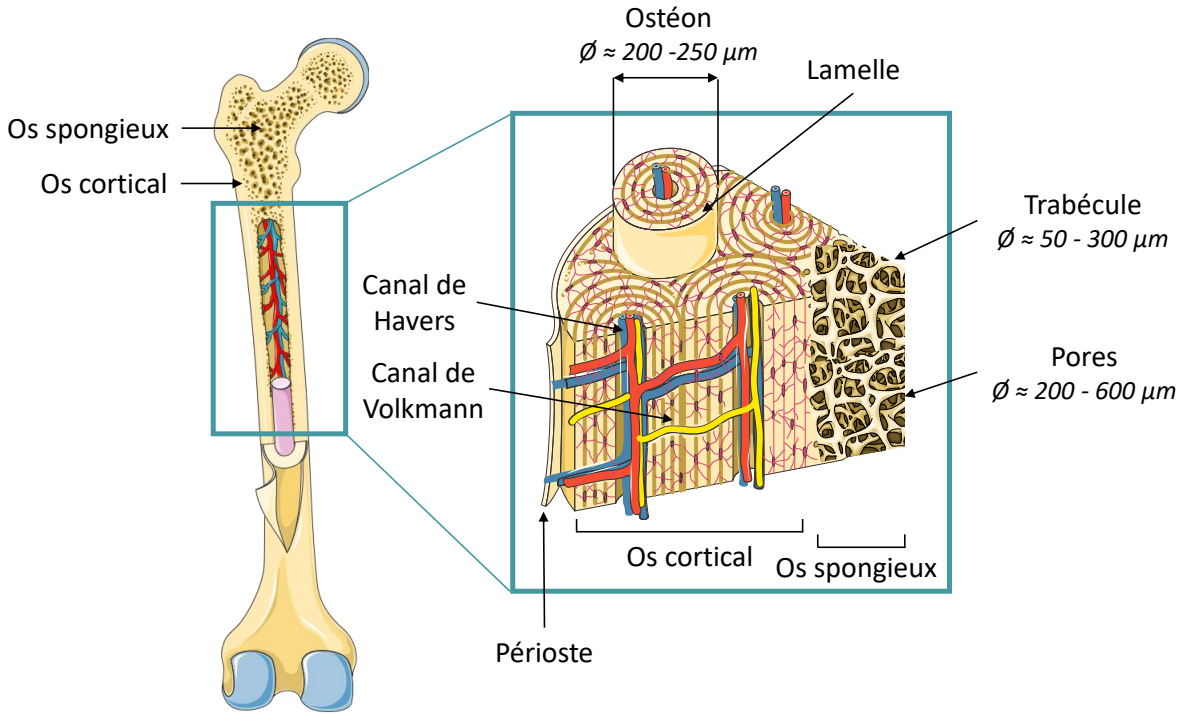


Figure 1.2 : Schéma représentant la structuration de l'os, à l'échelle macroscopique et microscopique, réalisé en utilisant les éléments de « Servier Medical Art » (https://smart.servier.com) sous licence Creative Commons, sur les bases d'un schéma de K. Beifuss [11].

D'autre part, la nature composite de la matrice extracellulaire est également un élément clé du tissu osseux. Elle est composée d'une **phase organique** (constituant 35 % mass. de la masse osseuse), d'abord synthétisée par les cellules osseuses puis ensuite minéralisée. La phase minérale représente 60 % mass. de l'os, les 5 % mass. restants provenant des cellules spécifiques [4,12]. La matrice organique est constituée de 92 % de protéines collagéniques, dont 90 % de collagène de type I et 2 % de type V [4,13], ainsi que de protéines non collagéniques (NCP). Le collagène de type I est une protéine fibrillaire dont les molécules en triple hélice (appelées tropocollagène) de 1,5 à 3,5 nm de diamètre s'auto-assemblent en fibrilles de 50 – 70 nm de diamètre (Figure 1.3). Ces dernières réticulent et forment des fibres de 150 – 250 µm de diamètre, qui s'organisent parallèlement selon une direction préférentielle dans des couches [5] (comme illustré sur la Figure 1.1). Les couches superposées d'orientation différente créent le tissu osseux lamellaire [4,5]. Les rangées de fibres de collagène horizontales sont espacées longitudinalement de 40 nm, et chaque fibre a une périodicité de 67 nm (*i.e.* deux fibres alignées latéralement sont espacées verticalement de 67 nm) [5], comme schématisé sur la Figure 1.3. Ces espaces créés laissent place à la germination hétérogène puis croissance des cristaux de la phase minérale. La structure collagénique apporte à l'os une résistance à la rupture par sa capacité de déformation et l'élasticité de son réseau.

Parmi les protéines non collagéniques (NCP) qui régulent la minéralisation et le remodelage osseux, on retrouve l'ostéocalcine (qui capte le calcium et stimule les ostéoblastes), l'ostéonectine (responsable de la cohésion entre les fibres de collagène et les cristaux minéraux) et l'ostéopontine (déclenchant le remodelage) [4]. Les facteurs de croissance et les cytokines (protéines régulatrices), la fibronectine et les protéoglycanes complètent la phase organique [1,6,14].

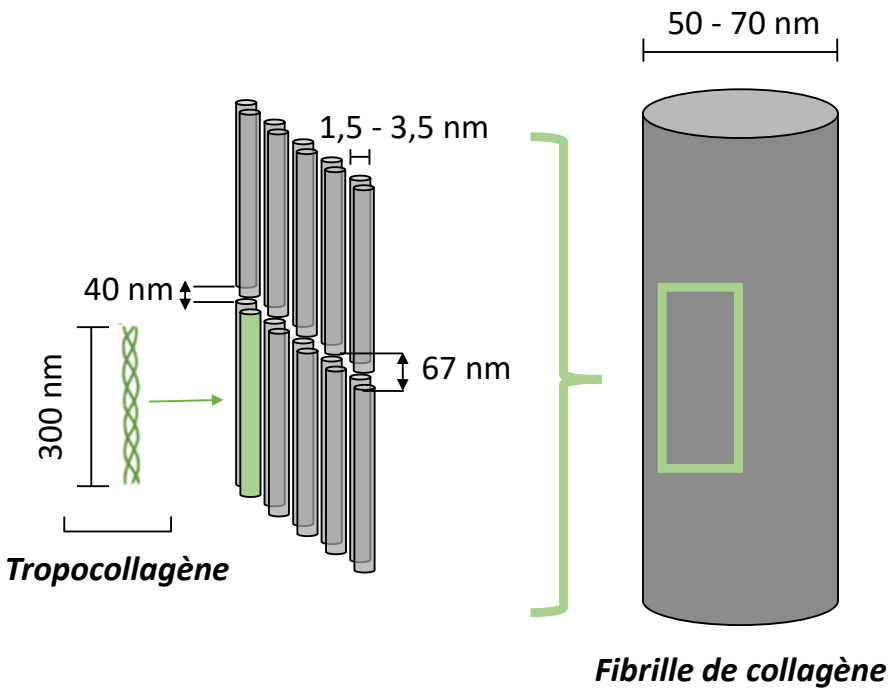


Figure 1.3 : Schéma de la formation d'une fibrille de collagène, à partir de molécules de tropocollagène [5,15].

La **phase minérale** est composée d'apatite phosphocalcique. Cette apatite biologique diffère de l'hydroxyapatite stœchiométrique de formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ par sa faible cristallinité et sa non-stœchiométrie. En effet, dans le tissu osseux des ions carbonate (CO_3^{2-}) et hydrogénophosphate (HPO_4^{2-}) substituent partiellement des ions phosphate (PO_4^{3-}) [16,17], ce qui crée des lacunes en calcium et en hydroxyde pour compenser le défaut de charge négative associé à ces substitutions anioniques. Il a d'ailleurs été montré que les substitutions par CO_3^{2-} dans l'apatite augmentent avec l'âge [17]. Par conséquent, la formule générale suivante de l'apatite osseuse a été proposée [17] : $Ca_{10-x}(PO_4)_{6-x}(HPO_4,CO_3)_x(OH)_{2-x}$ avec $0 \leq x \leq 2$. Des substitutions cationiques mineures, par des ions comme Mg^{2+}, Na^+, K^+ ont aussi été mises en évidence [10], mais on retrouve aussi des éléments traces en quantités bien moindres, tels que Si, Sr, Zn [18]. Le Tableau 1.1 présente les valeurs des concentrations des éléments principaux et de quelques éléments traces dans l'os, d'après Boanini *et al.* [18]. Le tissu osseux contient alors 99 % du calcium et 85 % des phosphates [19] de l'organisme, ce qui lui confère un rôle de réservoir et de régulation métabolique de ces ions dans le corps.

*Tableau 1.1 : Concentrations des principaux éléments et de quelques éléments traces, pour un os cortical bovin (excepté pour *, où la valeur est donnée pour des tibias de souris et rats) [18].*

ELEMENT	CONCENTRATION
Ca	36,6 % mass.
P	17,1 % mass.
CO_2	4,8 % mass.
Na	1,0 % mass.
K	0,07 % mass.
Mg	0,6 % mass.
Sr	0,05 % mass.
Cl	0,1 % mass.
F	0,1 % mass.
Zn	39 ppm
Si	500 ppm*

Cristallographiquement, l'apatite osseuse a une structure hexagonale dont les cristaux forment des plaquettes nanométriques allongées selon l'axe *c* (d'environ 50 nm de long, 25 nm de large et 10 nm d'épaisseur) qui s'alignent parallèlement à l'axe des fibres de collagène et ainsi donnent de la rigidité au tissu osseux. Ils possèdent à leur surface une couche hydratée contenant des ions divalents labiles (Ca^{2+}, HPO_4^{2-}, CO_3^{2-}), entourant un cœur apatitique (Figure 1.4) [17,20,21]. Les échanges ioniques avec les fluides biologiques environnants sont favorisés par cette couche [22,23], qui diminue de plus l'énergie de surface des cristaux et confère une grande réactivité de surface au minéral [24]. Elle apporte aussi les ions nécessaires à la croissance du cœur apatitique, et diminue à ses dépens lors de la maturation des cristaux [17,23].

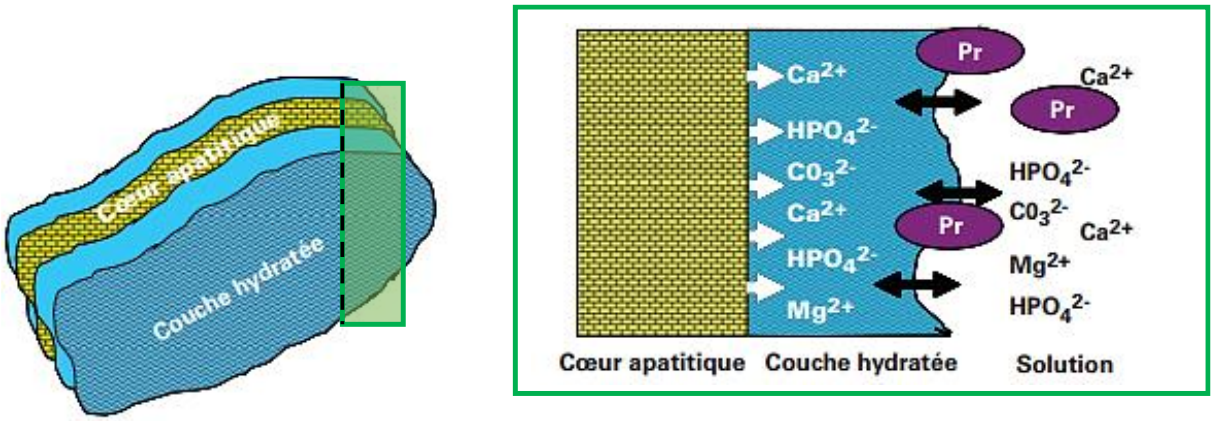


Figure 1.4 : Modèle des nanocristaux d'apatite biomimétique, comportant un cœur apatitique et une couche hydratée en surface. La coupe transversale de la plaquette d'apatite (droite) montre la composition ionique de cette couche, principalement des ions divalents qui peuvent s'échanger avec ceux de la solution ou encore avec les protéines (Pr). Adapté de Eichert et al. [20] et Combes et Rey [25].

Pour que le squelette puisse assurer ses fonctions de maintien et protection pendant toute la durée d'une vie, il est nécessaire qu'il s'adapte et se remodèle, en particulier pendant la phase de croissance. Pour cela, des cellules et enzymes du tissu osseux ont des fonctions particulières.

I.1.2 Cellules et enzymes osseuses

Les cellules osseuses se regroupent en deux catégories principales : les cellules **ostéoformatrices** et les cellules **ostéorésorbantes**, agissant lors du remodelage osseux.

Les cellules ostéoformatrices sont toutes issues de cellules souches mésenchymateuses, mais ont des stades de différenciation et des fonctions différentes [1,3,4,6] :

- Les **cellules ostéogéniques** (ou ostéoprogénitrices) dérivent des cellules multipotentes de la moelle osseuse et peuvent se diviser, pour se régénérer ou se différencier en ostéoblastes ou cellules bordantes. Plusieurs protéines ont un rôle clé dans cette différenciation, comme la *runt-related transcription factor 2* (RUNX2) ou les protéines morphogénétiques osseuses (BMP).
- Les **ostéoblastes** sont les cellules matures responsables de la formation osseuse et de la minéralisation de la matrice. Ils sécrètent le collagène I, des protéines comme la phosphatase alcaline (PAL) et des facteurs de croissance et cytokines. Ils subissent ensuite une apoptose (mort cellulaire programmée) ou se transforment en ostéocytes ou cellules bordantes lorsque la matrice est créée.
- Les **ostéocytes** représentent 94 % des cellules du tissu osseux. C'est l'appellation donnée aux ostéoblastes une fois qu'ils sont emmurés au sein de la substance ostéoïde créée de manière concentrique autour d'eux. Ils ne contribuent alors plus à la formation osseuse mais

participent encore au remodelage osseux, entre autres par l'homéostasie de Ca et PO_4. Des extensions cytoplasmiques, appelées canalicules, les connectent et assurent le transport des nutriments et des minéraux. Elles les relient aussi aux cellules bordantes.

- Les **cellules bordantes** sont en fait des ostéoblastes inactifs, situés en périphérie de l'os (dans le périoste ou l'endoste [e]) et qui restent dans un état de quiescence (sans capacité de synthèse osseuse). Elles s'organisent en une couche à la surface de l'os néoformé.

Les cellules ostéorésorbantes, ou **ostéoclastes**, sont des macrophages particuliers dérivant de cellules hématopoïétiques [1,3,6]. Ces cellules géantes (50 – 100 µm de diamètre) [1] plurinucléées s'ancrent à la surface de l'os par le biais d'une structure en brosse formée par leur membrane cytoplasmique, puis résorbent l'os en générant un environnement acide via une pompe à protons. Elles sont ensuite détruites par apoptose.

Les enzymes sont constituées de chaînes peptidiques d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques, et leur rôle est de catalyser une réaction biologique spécifique, grâce à leur site actif se liant au substrat. Parmi les enzymes osseuses, la **phosphatase alcaline** (PAL) est une des plus étudiée, car elle sert de marqueur de l'activité des ostéoblastes. En effet, elle se situe dans leur membrane plasmique et a un rôle clé dans la minéralisation osseuse, qui n'est pas encore totalement élucidé. Cette glycoprotéine catalyse la réaction monoester de phosphate + H_2O ↔ alcool + phosphate, et clive les liaisons P-O-P, avec une meilleure efficacité en milieu basique [4,26]. Mais il existe aussi d'autres types d'enzymes osseuses, dont certaines sont libérées par les ostéoclastes, comme la cathepsine K (qui décompose le collagène) ou la phosphatase acide tartrate résistante, qui dégrade elle aussi la matrice organique à pH acide, mais en s'attaquant à la fixation des cristaux d'apatite sur les fibrilles de collagène par déphosphorylation des protéines ayant cette fonction (ostéopontines). Ces deux enzymes peuvent servir de marqueurs de l'activité des ostéoclastes, mais sont plus difficiles à doser que la PAL [4,6].

I.2 Le remodelage et la reconstruction osseuse

Afin d'adapter le squelette à la croissance osseuse, aux contraintes mécaniques et traumatismes subis, les cellules osseuses résorbent et reconstruisent le tissu osseux en permanence lui conférant ainsi la capacité à cicatriser.

I.2.1 Remodelage

Le remodelage osseux est un phénomène permanent et permet de recréer de l'os nouveau. Il a lieu dans des unités indépendantes, de 100 – 400 µm de diamètre, nommées unités multicellulaires de base (UMB, ou *basic/bone modeling/multicellular units*) [1,4]. Celles-ci ne sont pas toutes activées en même temps, on estime que 10 % sont actives en permanence chez le jeune adulte [4]. Le remodelage osseux se déroule selon le processus décrit dans la Figure 1.5 [1,3,4] :

- Phase **quiescente** : c'est un état de repos, pouvant être long, dans lequel les cellules bordantes recouvrent le tissu osseux et en empêchent l'accès aux ostéoclastes.
- Phase d'**activation** : sous l'influence d'un signal hormonal ou physique, les précurseurs des ostéoclastes migrent sur la surface osseuse et fusionnent pour former des ostéoclastes. Les cellules bordantes se rétractent, afin de permettre à ces derniers de s'ancrer sur la surface via une intégrine spécifique de l'ostéopontine.

[e] Membrane tapissant la face interne de l'os (à la différence du périoste, qui recouvre la face externe).

- Phase de **résorption** : une fois fixés sur la surface, les ostéoclastes agissent par petits groupes et créent des microenvironnements locaux, dans lesquels le milieu est acidifié (à pH 5) par la libération de protons via leur structure de « bordure en brosse ». La matrice minérale est alors dissoute, et les enzymes additionnelles secrétées (cathepsines et hydrolases) dégradent la matière organique. La lacune de résorption créée, parfois appelée lacune de Howship, peut mesurer jusqu'à 50 µm de profondeur dans l'os trabéculaire, et contient en son centre un vaisseau sanguin. Les ostéoclastes libèrent aussi des facteurs de croissance pendant cette phase.
- Phase d'**inversion** : la dégradation de la matrice minérale cause l'augmentation de la concentration de calcium dans la lacune, ce qui désorganise les phénomènes d'adhésion des ostéoclastes en dissociant les intégrines. Les cellules ostéogéniques ou pré-ostéoblastes sont attirées par les facteurs de croissance libérés par les ostéoclastes lors de la phase précédente, et se différencient en ostéoblastes, qui viennent tapisser les parois de la lacune.
- Phase d'**ostéoformation** : les ostéoblastes prolifèrent et apposent une matrice collagénique, appelée ostéoïde, de manière concentrique autour d'eux, en comblant la lacune.
- Phase de **minéralisation** : elle est progressive, et se fait via la germination/croissance de cristaux d'apatite au sein des fibrilles de collagène. Les ostéoblastes piégés dans la matrice d'ostéoïde deviennent des ostéocytes.
- Phase **quiescente** : les ostéoblastes ayant achevé la minéralisation et non transformés en ostéocytes deviennent inactifs sous forme de cellules bordantes, qui recouvrent la surface de l'os néoformé.

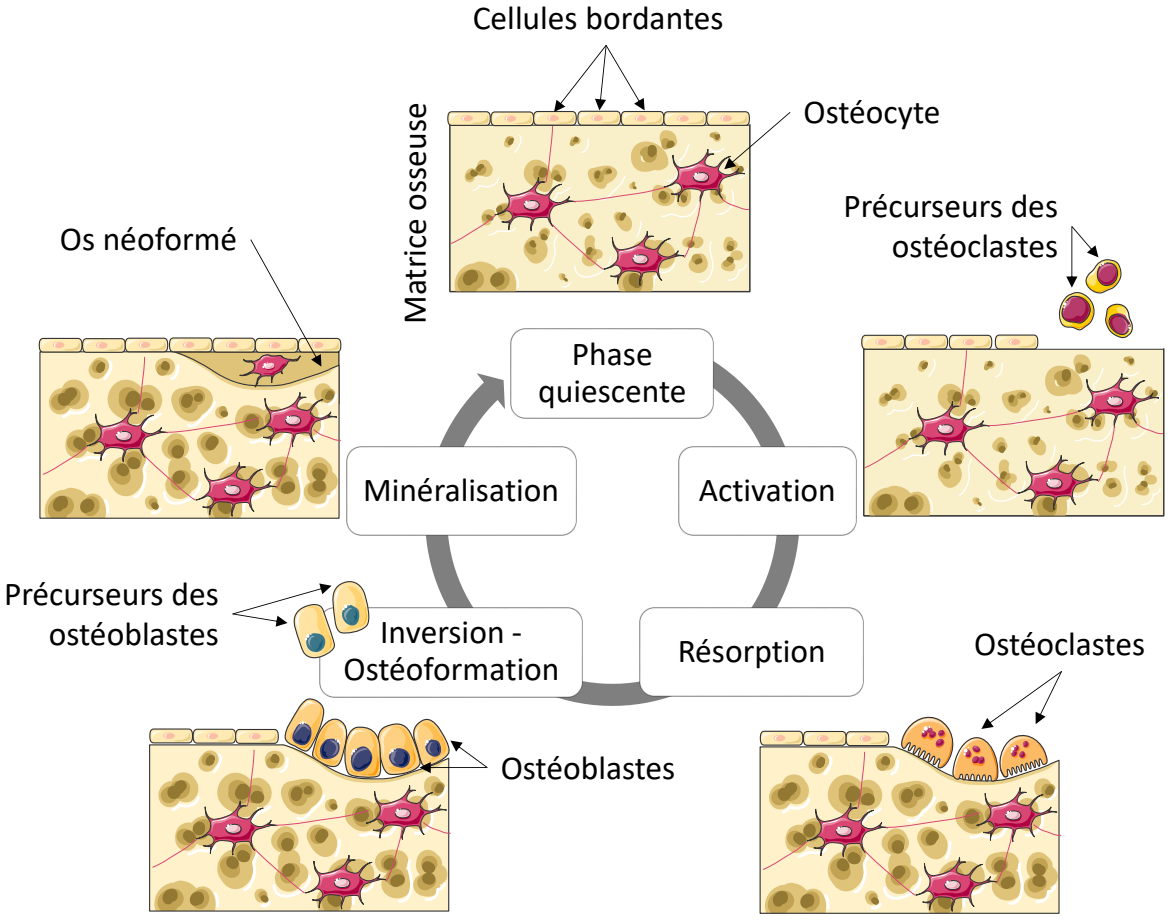


Figure 1.5 : Schéma représentant les phases du processus de remodelage osseux, adapté de Servier Medical Art (https://smart.servier.com).

Ce processus de remodelage assure un équilibre entre résorption de la matrice osseuse ancienne et néoformation. Le cycle total dure 3 à 4 mois, avec 1 à 2 semaines de résorption et environ 3 mois d'ostéoformation [1,4]. On estime que 10 % du squelette total est renouvelé par an à l'âge adulte [1], mais ce renouvellement est différencié selon les tissus osseux : les UMB de l'os cortical ont une fréquence de renouvellement moins élevée que celles de l'os trabéculaire (ce qui implique que 3 – 4 % de l'os cortical est remodelé par an contre 25 % de l'os trabéculaire) [4]. Le remodelage n'est pas non plus le même au cours d'une vie : il y a d'abord une phase de croissance (plus de formation que de résorption) jusqu'à 3 ans après la puberté, puis une phase d'équilibre jusqu'à 35 ans, et enfin une phase de déficit (avec une résorption plus importante), touchant plus sévèrement les femmes [4]. Lorsque ce déficit (naturel) est exacerbé de manière pathologique, une perte de masse osseuse est constatée avec un risque accru de fractures, comme dans le cas de l'ostéoporose, une des maladies osseuses les plus courantes. Un remodelage excessif, causé par l'augmentation de l'activité des ostéoclastes et de celle des ostéoblastes engendre aussi une pathologie nommée maladie de Paget, qui se traduit par des faiblesses osseuses localisées et des déformations des os [27].

I.2.2 Reconstruction

Après une fracture ou une intervention chirurgicale, des processus d'autocicatrisation se mettent en place dans le tissu osseux pour qu'il recouvre ses propriétés structurales et mécaniques initiales. La cicatrisation peut être primaire (directe) ou secondaire (indirecte).

La **cicatrisation primaire** a lieu dans une très faible minorité des cas, quand les fragments osseux restent en contact malgré la fracture ou à moins de 0,1 mm [28]. Dans ce cas le processus de remodelage osseux décrit en I.2.1 se met en œuvre.

La **cicatrisation secondaire** est la plus courante, elle intervient quand les fragments osseux sont espacés. Trois étapes se succèdent alors [27,29–31], illustrées sur la Figure 1.6 :

- L'**inflammation** : immédiatement après la fracture, une grande quantité de sang afflue dans la zone lésée, un hématome se forme (1), constitué de substance fibreuse appelée tissu de granulation, et occupe tout l'espace inter-fragmentaire. Des cellules inflammatoires (macrophages, monocytes, lymphocytes) nettoient le site et phagocytent les débris de tissu nécrosés dans une réaction inflammatoire parallèle. Les ostéoclastes commencent à résorber les extrémités osseuses dévitalisées. Des facteurs de croissance et cytokines sont aussi libérés, afin d'initier la deuxième phase.
- La **réparation** : elle a lieu une à deux semaines après la fracture. Par le biais des facteurs de croissance et en réaction aux contraintes mécaniques subies par l'os, des cellules mésenchymateuses migrent sur la zone lésée via les tissus vascularisés et se différencient en ostéoblastes, chondroblastes et fibroblastes [f] qui transforment le tissu granulaire de l'hématome en tissu cartilagineux minéralisé, appelé cal mou (2), assurant une première stabilisation de la fracture. Après une phase d'angiogenèse [g] le cal mou est résorbé par les ostéoclastes et le cal dur est formé (3), composé de tissu osseux fibrillaire (mais non organisé en lamelles) formant un pont entre les fragments.
- Le **remodelage** : après plusieurs mois ou plusieurs années, et par le même processus que celui de remodelage naturel, l'os fibrillaire du cal dur est résorbé puis l'os lamellaire est néoformé (4), le site fracturé retrouve alors ses propriétés initiales. Cette étape est dépendante des

[f] Les chondroblastes sont les cellules du cartilage, et les fibroblastes celles du tissu conjonctif.
[g] Processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins.

contraintes auxquelles le tissu osseux est soumis, ainsi que des facteurs liés au mode de vie de l'individu, à son âge, à la nature du tissu osseux initial, à la localisation, au type d'os …

Il a été montré que la taille et la forme de l'espace inter-fragmentaire sont prépondérantes pour déterminer si l'autocicatrisation est possible ou non [32]. En effet, plus cet espace est grand, plus le cal formé est petit. Lorsque le défaut osseux a une taille critique, taille sur laquelle il n'y a actuellement pas de consensus mais généralement étant supérieure à 2,5 cm [33], le processus décrit plus haut n'est pas réalisable sans une aide externe, et une intervention chirurgicale est nécessaire, pour implanter ou injecter un substitut osseux permettant une reconstruction complète.

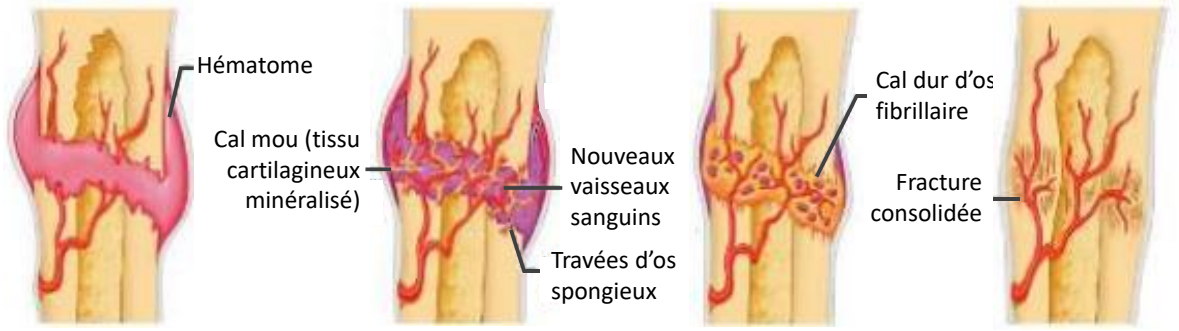


Figure 1.6 : Schéma du processus de cicatrisation osseuse après une fracture. Issu de la thèse de S. Jacquart [34] et adapté de Marieb et Hoehn [27].

I.3 CAHIER DES CHARGES POUR UN BIOMATERIAU UTILISABLE COMME SUBSTITUT OSSEUX

La définition des biomatériaux a été donnée par la Société Européenne des Biomatériaux (ESB) à la conférence de Chester (Royaume-Uni) en 1986 et 1991, comme « un matériau conçu pour interagir avec les systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle » [35]. D'autres définitions existent, comme celle recommandée par l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) en 2012 « matériau en contact avec des tissus, organismes ou micro-organismes vivants » [36] ou celle proposée par Park et Lakes en 2007 [37] « matériau utilisé pour réaliser des dispositifs remplaçant une partie ou une fonction du corps d'une manière sûre, fiable, et acceptable économiquement et physiologiquement ». Quelle que soit la définition, les biomatériaux doivent répondre à plusieurs exigences pour être utilisés en reconstruction osseuse.

I.3.1 Biocompatibilité

La **biocompatibilité** est une propriété indispensable à tout biomatériau. Celle-ci a été définie lors de la conférence de consensus de l'ESB en 1987 telle que la « capacité d'un matériau à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique » [35]. D. Williams a ensuite précisé cette définition, par la « capacité d'un biomatériau à assurer la fonction désirée dans le cadre d'une thérapie médicale, sans provoquer d'effets locaux ou systémiques indésirables chez le receveur ou le bénéficiaire de cette thérapie, mais en générant la réponse cellulaire ou tissulaire bénéfique la plus appropriée à la situation, et en optimisant les performances cliniquement pertinentes de cette thérapie » [38]. Plus globalement, il s'agit de la capacité du matériau à être accepté par le système immunitaire, sans toxicité pour l'organisme ni réaction inflammatoire importante. Il est important que ses produits de dégradation (s'il y a altération par les tissus ou fluides biologiques après implantation) ne soient pas toxiques non plus. La norme ISO 10993-1 (mise à jour en 2018) « *Biological evaluation of medical*

devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process » indique le type d'essai nécessaire pour tester la biocompatibilité d'un dispositif médical, en fonction de la durée et nature du contact [25,35]. La biofonctionnalité, l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaires lors du contact avec le matériau sont aussi des propriétés pouvant être évaluées pour caractériser au mieux la biocompatibilité, mais non exigées par la norme [39]. L'utilisation de cellules différenciées pour les essais, contenant des protéines spécifiques au site d'implantation, peut déjà donner des informations de biocompatibilité plus précises que la simple non cytotoxicité [35].

I.3.2 Bioactivité

La **bioactivité** est définie par l'IUPAC telle que la « capacité d'une substance à provoquer une réponse d'un système vivant » [36], mais celle-ci est appliquée aux polymères pour la biologie. Une autre définition a été donnée pour les bioverres, telle qu'étant la « propriété particulière que possède un matériau d'engendrer, par une succession de réactions de surface, une liaison intime à l'interface avec les tissus hôtes » [40,41] ; elle peut s'appliquer à une plus large gamme de matériaux. Pour les matériaux de substitution osseuse, certaines propriétés liées à la bioactivité sont recherchées spécifiquement. La première est l'**ostéoconduction**, qui correspond à la propriété passive d'un matériau à servir de support pour la repousse osseuse, dans lequel les cellules et vaisseaux sanguins du tissu (osseux) hôte peuvent s'infiltrer [8,40]. La deuxième est **l'ostéoinduction**, ou la capacité d'induire la différenciation de cellules souches en cellules ostéogéniques et/ou d'induire la prolifération de celles-ci, afin de synthétiser une matrice osseuse minéralisable en site non osseux [40,42]. Cette propriété pourrait être exacerbée par la composition chimique, la forme, la surface ou la porosité des biomatériaux utilisés [10]. Pour les substituts osseux, on définit aussi l'**ostéointégration**, ou capacité du matériau à adhérer à la surface du tissu osseux hôte sans couche de tissu fibreux [40,42]. Celle-ci dépend de paramètres physiques (rugosité de surface du matériau) et chimiques (nature des liaisons avec l'os) [25]. La **porosité** du substitut apparaît ici comme un élément clé, car influant sur les propriétés de colonisation vasculaire et cellulaire et donc sur la bioactivité. Il a par ailleurs été montré qu'en plus des macropores (> 100 µm) permettant la colonisation des cellules et l'angiogenèse, la présence de petits pores (< 5 µm), qui favorisent l'interaction avec les cellules et leur attachement, est nécessaire pour améliorer la bioactivité des substituts [43,44].

I.3.3 Biorésorption

Certains biomatériaux sont non dégradables (comme les alliages métalliques constituant les prothèses de hanche par exemple), mais pour la plupart des applications la résorbabilité est un prérequis, condition essentielle pour obtenir une reconstruction du tissu osseux (comme dans le cas d'un défaut critique). Il est nécessaire de contrôler la vitesse de résorption du biomatériau après implantation, car celle-ci influe sur la vitesse de réparation de l'os lésé. En effet, une résorption trop lente bloque la néoformation, ne laissant pas d'espace à l'os nouveau, alors qu'une résorption trop rapide crée une mauvaise interface entre le matériau et le tissu environnant et ainsi un mauvais soutien mécanique. Un compromis est donc nécessaire entre le maintien d'une surface stable comme support de la néoformation et la dégradation du substitut. Pour l'adapter, il est possible d'optimiser la géométrie de l'implant, en formant des pores interconnectés permettant une résorption plus rapide car avec plus de sites de dissolution [25,45]. Une autre solution est de modifier la physico-chimie du matériau. Plusieurs leviers ont été utilisés pour y parvenir : opter pour des phases plus réactives (moins stables thermodynamiquement), des polymères semi-cristallins plutôt que cristallins, ou incorporer des séquences dégradables [45].

Les mécanismes de dégradation en milieu physiologique dépendent des matériaux utilisés [25,45]. Pour certains, des réactions chimiques sont responsables de la dissolution (pour le gypse par exemple), de

l'hydrolyse (polylactides) ou de la corrosion (alliages de magnésium) de l'implant. Les frottements à l'interface entre le tissu osseux et l'implant (comme pour des prothèses de hanche) peuvent aussi dégrader le matériau en produisant des débris d'usure conduisant à une inflammation. Les enzymes ou cellules osseuses (ostéoclastes) peuvent également résorber le biomatériau, c'est le cas pour le collagène ou le phosphate tricalcique β (β-TCP) respectivement. Enfin, pour certains matériaux la dégradation a lieu via une combinaison de plusieurs mécanismes, comme pour la brushite qui se dissout *in vivo* et recristallise en apatite, ensuite résorbée par les ostéoclastes dans un processus similaire à celui du remodelage osseux présenté en I.2.1.

I.3.4 Stabilité mécanique

Le biomatériau doit assurer un soutien mécanique et un contact permanent avec le tissu hôte, pour permettre une bonne reconstruction osseuse. Pour cela il doit être stimulé mécaniquement : si le dispositif médical empêche la stimulation en concentrant toutes les contraintes, un phénomène de *stress-shielding* apparaît, entraînant la résorption des tissus osseux environnants [8,25]. Il est donc nécessaire d'approcher au mieux les propriétés mécaniques de l'os que l'on cherche à remplacer, même si des propriétés identiques ne sont pas accessibles, du fait de la composition et structuration complexes du tissu osseux humain lui conférant des propriétés singulières. La résistance mécanique de l'implant est ainsi à moduler en fonction de la nature du tissu osseux et de la zone d'implantation (l'os pouvant être porteur, *i.e.* soutenant le poids du corps, ou non-porteur).

Selon les applications du substitut osseux, d'autres propriétés peuvent aussi être requises, comme par exemple la radio-opacité permettant un suivi par radiographie X de son évolution une fois implanté [25].

II LES BIOMATERIAUX POUR LA RECONSTRUCTION OSSEUSE

Les greffes osseuses constituent les substituts osseux idéaux et sont souvent qualifiées de *gold standard,* car répondant en totalité aux exigences d'ostéoconduction et ostéoinduction. Les autogreffes, *i.e.* pour lesquelles le greffon est prélevé sur un autre site anatomique du même patient (en général la crête iliaque), sont intégrées rapidement et en totalité [46]. Cependant elles nécessitent d'effectuer deux opérations sur le même patient, le site prélevé peut ne pas fournir assez de tissu osseux et il y a des risques engendrés au niveau de celui-ci (douleurs, pertes de sang, infection) [28,29,47]. L'allogreffe, pour laquelle le greffon est issu d'un autre individu de la même espèce, offre une bonne alternative aux limitations de l'autogreffe, en particulier celles liées du site donneur. Elle peut aussi être adaptée au défaut en lui imposant la géométrie voulue [28]. Néanmoins, le risque majeur concerne les possibilités de rejet et l'introduction de pathogènes dans l'organisme du patient [28,29]. De fait, l'apparition du SIDA dans les années 1990 a limité l'utilisation des allogreffes [43,48]. Pour pallier à ces inconvénients et en raison du vieillissement de la population entraînant un nombre croissant de greffes osseuses requises, il a été nécessaire de développer des substituts osseux synthétiques.

Les métaux sont parmi les premiers substituts osseux à avoir été utilisés [8]. En plus d'être biocompatibles, ils ont l'avantage d'avoir une tenue mécanique très bonne, tout comme leur résistance à la fatigue et à la torsion, et un module élastique élevé. Cela en fait des matériaux de choix pour les sites porteurs tels que les prothèses de hanche. Les alliages de titane et l'acier inoxydable ont par exemple beaucoup été implantés depuis le début des années 1900 [8]. Toutefois, ils sont bio-inertes (ne présentent pas de bioactivité), donc n'induisent pas d'ostéogénèse et ont une ostéointégration limitée. De plus, si leurs propriétés mécaniques sont supérieures à celles de l'os dans lequel ils sont implantés, l'implant concentre les contraintes mécaniques, générant un phénomène de *stress-shielding* et donc la résorption du tissu osseux. De surcroît, le contact avec les fluides biologiques peut

entraîner une corrosion des métaux, libérant des ions ou des débris créant des réactions immunitaires fortes [8,37].

Les polymères sont aussi beaucoup utilisés, pour leur biocompatibilité, les possibilités de mise en forme, leur nature ductile et la présence de groupements fonctionnels intégrés dans leurs chaînes ou à leur surface. On distingue deux types de polymères : les polymères biodégradables et les non biodégradables. Les premiers regroupent les polymères naturels, tels que le collagène ou les polysaccharides (chitosane, alginate), qui sont rapidement dégradés par des enzymes *in vivo*, et les synthétiques, comme le poly(acide lactique) (PLA), le poly(acide glycolique) (PGA), le poly(ε-caprolactone) (PCL) et leurs copolymères, plus disponibles que les polymères naturels, et dont les propriétés mécaniques et de dégradation peuvent être modulées par leur cristallinité et masse molaire. Les polymères non dégradables sont stables en milieu physiologique, et leurs propriétés dépendent essentiellement de leur mise en forme. Les plus utilisés pour la substitution osseuse sont le poly(éthylène) haute densité (HDPE), le poly(tétrafluoroéthylène) (PET) ou le poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA). Cependant les propriétés mécaniques (en particulier la résistance à la compression) sont limitées, et leur non-dégradabilité entraîne une absence de bioactivité [8,47,49].

Les céramiques implantables ont été introduites dans les années 1960. Elles peuvent être bio-inertes, comme l'alumine Al_2O_3 ou la zircone ZrO_2 ; bioactives, comme les céramiques phosphocalciques ; et éventuellement biorésorbables. Les propriétés mécaniques des céramiques bio-inertes les destinent souvent à des sites porteurs, comme les têtes de prothèses de hanche alors que les céramiques bioactives sont utilisées principalement pour du comblement et de la reconstruction osseuse en sites non porteurs. Leur mise en forme est variée, allant des monolithes à des revêtements, en passant par des scaffolds poreux ou des ciments. Les principales céramiques bioactives utilisées sont les phosphates de calcium (CaP) et les carbonates de calcium (CC), qui seront détaillés dans les parties suivantes. Il faut aussi mentionner l'utilisation croissante de bioverres. Ceux-ci, développées pour la première fois par L. Hench en 1969 [9], étaient originellement des verres de silice (de composition SiO_2, Na_2O, P_2O_5), auxquels des oxydes modificateurs de matrice ont été ajoutés plus tardivement dans le but d'adapter les propriétés mécaniques et de dégradation aux applications biomédicales. Le produit le plus utilisé actuellement est le Bioglass® 45S5 de NovaBone. Les bioverres ont une bioactivité intéressante, entre autres grâce aux ions libérés, mais leurs propriétés mécaniques restent restreintes et limitent l'utilisation aux sites non porteurs ou défauts de petite taille [28,37,49].

Dans la suite de ce chapitre, nous nous concentrerons sur les phases calciques, à savoir les orthophosphates, les pyrophosphates et les carbonates de calcium. Ces phases minérales se retrouvent dans des tissus sains et/ou dans des calcifications ectopiques ou pathologiques, chez des espèces animales, végétales ou chez l'homme, et certaines d'entre elles ont également fait preuve de leur efficacité dans des compositions de biomatériaux pour la reconstruction osseuse.

II.1 PHASES MINERALES CRISTALLINES

II.1.1 Phases cristallines de phosphate de calcium

Les céramiques les plus étudiées et utilisées comme substituts pour le comblement et la reconstruction du tissu osseux sont les phosphates de calcium (CaP), en raison de leur composition chimique similaire à celle de l'os. Ils stimulent la néoformation osseuse par la libération d'ions calcium et phosphate lors de leur dissolution, déclenchant une réponse ostéoinductive par la différenciation ostéogénique, observée *in vitro* [50,51] et *in vivo* [52], et favorisant la formation d'un tissu osseux minéralisé à la surface de l'implant [10,53].

Cette famille regroupe tous les composés contenant une combinaison du calcium avec des ions orthophosphate (PO_4^{3-}), hydrogénophosphate (HPO_4^{2-}) et elle est souvent étendue aux dimères, les ions pyrophosphate ($P_2O_7^{4-}$). Il est intéressant d'étudier ces composés préalablement aux carbonates de calcium (ces derniers constituant le cœur de ce travail de thèse) pour plusieurs raisons. Comme dit plus haut, les CaP sont la référence en termes de substituts osseux, et la littérature regorge d'études variées sur le sujet, à la différence des CC synthétiques dont l'utilisation comme biomatériaux reste marginale. Les méthodologies décrites pour l'étude des CaP pourraient donc être transposées aux CC. De plus, les théories de la germination/croissance cristalline proposant des explications à la formation des deux types de phases minérales sont similaires (et seront expliquées en détail plus loin), permettant des analogies, qui pourraient aider à la compréhension des mécanismes, dont certains sont encore controversés et discutés actuellement. En particulier, la germination du carbonate de calcium amorphe (ACC) a été beaucoup étudiée, tandis que dans le cas des phosphates de calcium amorphes c'est plutôt sur leur cristallisation (surtout en solution et *in vivo* lors de la biominéralisation) que les efforts se sont majoritairement portés. Enfin, il a été montré que l'ion pyrophosphate a des propriétés d'inhibition de cristallisation, entre autres pour des phases de phosphate de calcium, et pourrait être utilisé comme tel dans d'autres compositions avec des carbonates de calcium par exemple.

Dans cette sous-partie seront donc présentées seulement quelques phases de phosphate et pyrophosphate de calcium : l'apatite, phase la plus courante et constitutive du minéral osseux et le pyrophosphate de calcium anhydre, également utilisé comme biomatériau.

II.1.1.1 Apatites

Les apatites forment une famille de composés de formule $Me_{10}(XO_4)_6Y_2$, où Me est un cation, XO_4 et Y des anions, et présentent la particularité d'accepter un grand nombre de substitutions sur tous les sites [54–56]. En effet, les cations sur le site de Me sont généralement divalents (Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}) mais il peut aussi y avoir des lacunes ; l'anion XO_4 peut être trivalent (PO_4^{3-}, AsO_4^{3-}, SO_4^{3-}), divalent (CO_3^{2-}, HPO_4^{2-}) ou tétravalent (SiO_4^{4-}) mais il n'accepte pas de lacune ; et enfin le site de Y accepte des anions monovalents (OH^-, F^-, Cl^-, Br^-, I^-) mais aussi divalents (CO_3^{2-}) ou des lacunes. Généralement, l'incorporation d'ions dopants dans l'apatite est une stratégie permettant d'influencer les processus cellulaires et d'améliorer la bioactivité des biocéramiques (avec des ions métalliques par exemple, comme le zinc, cuivre, silicium, strontium …) ou de distordre le réseau cristallin pour augmenter la solubilité, comme la substitution de carbonate dans l'hydroxyapatite stœchiométrique (HA) [44]. Les apatites cristallisent avec une maille hexagonale ($P6_3/m$).

Leur synthèse peut se réaliser d'une part en voie humide [55], par neutralisation directe entre $Ca(OH)_2$ et H_3PO_4, par double décomposition entre des sels de calcium et de phosphates solubles, par hydrolyse de phases de CaP non apatitiques, par sol-gel ou via des méthodes non aqueuses. Dans le cas particulier de la double décomposition, les conditions expérimentales (pH, température, vitesse d'ajout, durée de maturation) doivent être très contrôlées pour obtenir la composition chimique désirée [57]. D'autre part, en voie sèche, l'hydroxyapatite est obtenue par calcination entre 900 °C et 1100 °C de réactifs solides, avec le ratio Ca/P adapté (par exemple $CaCO_3$ et TCP) [55].

L'hydroxyapatite stœchiométrique, de formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, est la phase de CaP la plus stable au pH physiologique [54]. Elle était la phase de choix à implanter dès les premiers essais cliniques en 1979 [43,58] pour ses similarités avec le minéral osseux et sa grande résistance mécanique, montrant aussi une bonne ostéoconduction et/ou ostéoinduction [59–63]. Cependant l'HA est presque inerte et très peu dégradable une fois implantée. De plus, les CaP denses sont fragiles et supportent mal les grandes contraintes mécaniques. Le développement de nouveaux substituts osseux a alors émergé, cherchant

à accélérer l'autoréparation de l'os, qui retrouverait ainsi ses propriétés mécaniques inhérentes [43]. Pour cela, les apatites biomimétiques, sous-stœchiométriques et faiblement cristallines comme le minéral osseux, ont été étudiées. La synthèse de ces dernières se fait par co-précipitation à pH proche du pH physiologique et à température ambiante [23].

L'HA est parfois associée à une autre phase de CaP, le phosphate tricalcique β (β-TCP) notamment, une des phases les plus implantées et ce depuis les années 1970 [64], et participant à la néoformation osseuse *in vivo* [65–67]. En effet, celle-ci est plus soluble et résorbable que l'HA [25,54,59], permettant de moduler la vitesse de résorption des céramiques biphasiques (BCP) composées du mélange des deux phases [68]. Il a été montré que pour favoriser l'ostéoinduction un compromis est nécessaire entre maintien d'une surface stable comme support de la néoformation osseuse et assurant une grande surface de contact [69] et dégradation du substitut libérant des ions nécessaires à la minéralisation [70], compromis vérifié par les BCP.

II.1.1.2 Pyrophosphate de calcium

Le dimère pyrophosphate $P_2O_7^{4-}$, présent *in vivo*, arbore un rôle de régulateur de la minéralisation, en inhibant la cristallisation de l'hydroxyapatite [71]. Il est hydrolysé en orthophosphate entre autres par la phosphatase alcaline (PAL) sécrétée par les ostéoblastes, qui supprime son potentiel inhibiteur et sursature le fluide environnant vis-à-vis d'orthophosphates de calcium, induisant la biominéralisation [71].

Il existe plusieurs phases de pyrophosphate de calcium : les phases hydratées (dont certaines ont été identifiées comme constituant des calcifications intra-articulaires pathologiques [72,73]), et la phase anhydre, pouvant faire partie de la composition de biomatériaux de substitution osseuse [74]. Le pyrophosphate de calcium anhydre (CPP) est obtenu principalement par la condensation de la monétite [h] ou de la brushite [i] entre 750 et 800 °C [75] ou à partir d'orthophosphate de calcium amorphe (ACP) chauffé à 980 °C [76]. Trois formes existent : la forme α-, monoclinique, est obtenue à plus haute température (> 1175 °C) [76,77] ; la forme γ- est métastable, se forme au-delà de 475 °C et se transforme en forme β- à 600 °C [76] ; et la forme β- (tétragonale) est la plus stable thermodynamiquement. Cette dernière est celle utilisée dans des substituts osseux, entre autres pour des fusions lombaires en association avec une autogreffe [74], et a montré dans une étude *in vivo* une résorption plus rapide que l'HA [78].

Ces phases de pyrophosphate de calcium sont surtout introduites en tant que phase additionnelle dans des compositions de substituts osseux à base d'autres phases phosphocalciques, ce qui engendre via leur hydrolyse par la PAL une vitesse de dégradation modulable ainsi que la libération d'ions PO_4^{3-}, essentiels à la formation de l'apatite osseuse. De tels matériaux, mettant à contribution les enzymes pour leur dégradation et la néoformation osseuse *in vivo*, ont été conçus et testés *in vitro* et *in vivo* par Grover *et al*. [71] pour la première fois en 2013, montrant une plus grande quantité d'os formé après 6 à 12 mois d'implantation pour un ciment brushitique [j] incluant du pyrophosphate de calcium amorphe que pour le ciment brushitique de référence. Cette démarche s'inscrit dans un changement de paradigme pour la définition des substituts osseux lors de la dernière décennie : il tend à rechercher l'induction d'une réponse spécifique dans l'organisme (*i.e*. la bioactivité) plutôt que l'imitation du tissu initial (composition, structure) mais sans interaction avec le site d'implantation.

[h] Phosphate dicalcique anhydre (DCPA) de formule $CaHPO_4$.
[i] Phosphate dicalcique dihydraté (DCPD) de formule $CaHPO_4.2H_2O$.
[j] Ciment formant de la brushite après sa réaction de prise.

II.1.2 Phases cristallines de carbonate de calcium

Le carbonate de calcium est le biominéral le plus abondant [79] et il est trouvé dans de nombreux organismes vivants [80], mais son utilisation pour la reconstruction osseuse reste marginale (contrairement aux CaP décrits ci-dessus). Le premier à avoir été utilisé comme substitut osseux est le corail, composé majoritairement d'aragonite [81], et présentant une structure poreuse interconnectée avec des pores de dimensions adaptées à la colonisation cellulaire. Les coraux ont une vitesse de résorption plus rapide (quelques semaines) [82,83] que la plupart des phosphates de calcium qui peuvent rester dans le corps pendant plusieurs années, pouvant alors bloquer ou ralentir la néoformation osseuse. Cependant, les CC biogéniques ont une grande variabilité biologique, peuvent contenir des contaminants (complexifiant leur utilisation du fait des incertitudes quant à leur comportement *in vivo*) et se raréfient [81,83,84]. Pour pallier à cela, des carbonates de calcium synthétiques ont été développés.

Différentes variétés polymorphes appartiennent à la famille des carbonates de calcium : les phases cristallines anhydres, les phases cristallines hydratées et une phase amorphe hydratée. A la différence des phosphates de calcium, la stœchiométrie entre calcium et carbonate est toujours identique pour toutes les phases, de formule $CaCO_3$. Les phases anhydres sont la calcite, l'aragonite, et la vatérite, citées ici par ordre de stabilité thermodynamique décroissant [85]. Les phases hydratées comptent trois phases cristallines, le carbonate de calcium hémihydraté, monohydraté (aussi appelé calcite monohydratée) et hexahydraté (ou ikaïte). Le Tableau 1.2 liste les différents polymorphes et leur constante de solubilité, et la Figure 1.7 compare les constantes de solubilité de ces phases en fonction de la température [86].

*Tableau 1.2 : Nom, formule chimique, structure cristallographique et constante de solubilité (pK_{sp}) à 25 °C des différents polymorphes de carbonate de calcium [85,87–91]. * La structure de la vatérite est encore sujette à débats, voir II.1.2.1.iii.*

NOM	FORMULE CHIMIQUE	STRUCTURE	pK_{sp} à 25°C
Calcite	$CaCO_3$	Rhomboédrique	8,48
Aragonite	$CaCO_3$	Orthorhombique	8,34
Vatérite	$CaCO_3$	Hexagonale / Monoclinique *	7,91
Carbonate de calcium hémihydraté (CCHH)	$CaCO_3.½H_2O$	Monoclinique	?
Calcite monohydratée (MHC)	$CaCO_3.H_2O$	Hexagonale	7,15
Carbonate de calcium hexahydraté (ikaïte)	$CaCO_3.6H_2O$	Monoclinique	6,59 - 6,62
Carbonate de calcium amorphe (ACC)	$CaCO_3.nH_2O$	x	6,25 - 6,39

La famille des carbonates de calcium est constituée de composés de même formule chimique mais avec des solubilités différentes, pouvant permettre le développement de biomatériaux au taux de résorption modulable. Il a été montré que l'anhydrase carbonique, enzyme présente dans le cytoplasme des ostéoclastes, joue un rôle dans leur résorption *in vivo* [92], en catalysant la réaction $HCO_3^- + H_3O^+ \leftrightarrow CO_2 + 2H_2O$. En dehors de la calcite, phase stable en milieu physiologique et donc non désirable pour l'élaboration de substituts résorbables [93,94], les phases de CC sont plus

solubles que celles de CaP [81,95], offrant des possibilités de dégradation après injection/implantation plus rapides et donc ne bloquant pas la cicatrisation du tissu lésé. Pourtant les carbonates sont aujourd'hui peu utilisés comme biomatériaux bioactifs et résorbables (à l'exception de l'aragonite biogénique) [93].

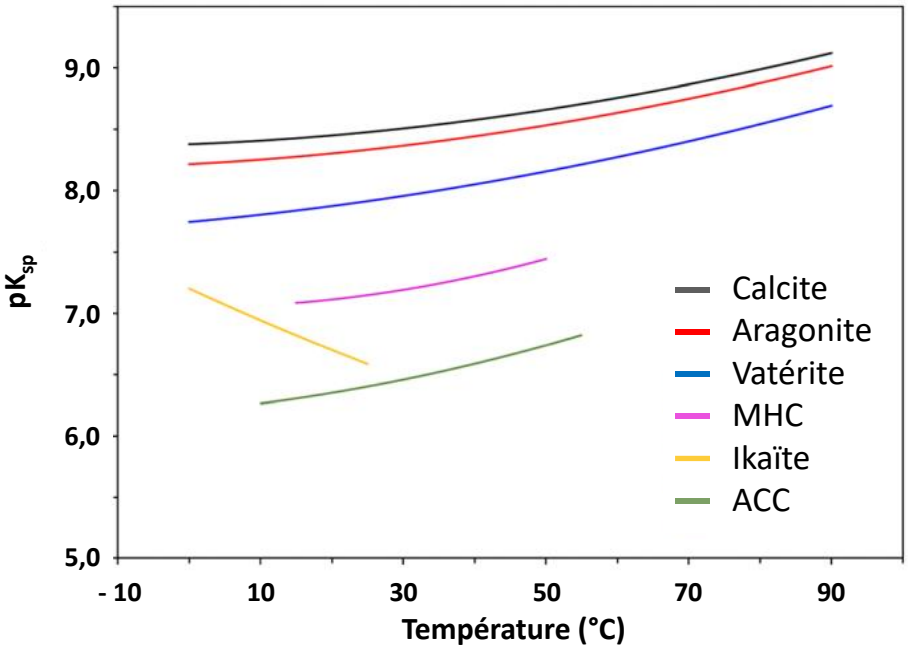


Figure 1.7 : Tracé des constantes de solubilité pK_{sp} des polymorphes de CC (à l'exception du CCHH) en fonction de la température. Issu de Niu et al. [86].

II.1.2.1 Phases cristallines anhydres

Les phases cristallines anhydres du carbonate de calcium sont les plus connues et étudiées. De fait, on retrouve une grande occurrence de ces phases dans les roches et organismes vivants, souvent associées à des macromolécules dans ce dernier cas, et les eaux de surface des océans sont sursaturées par rapport à la calcite et l'aragonite [96]. Tous ces polymorphes peuvent être synthétisés par précipitation directe à partir de solutions aqueuses (méthode biomimétique) [93,97], en faisant varier les paramètres de réaction (température, pH, durée, concentrations des sels). A concentration de carbonate, de calcium et force ionique fixées, Ogino *et al.* [98] ont montré que l'abondance des polymorphes, *i.e.* la proportion relative de chaque phase de CC obtenue, dépend de la température (Figure 1.8). Il faut noter ici que la quantification est réalisée à partir des ratios de pics de diffraction caractéristiques, et qu'elle ne prend donc pas en compte une possible proportion de phase amorphe. A basse température (jusqu'à 30 °C), la calcite est le polymorphe formé préférentiellement aux premiers instants de la cristallisation (et ce sans passer par la vatérite comme intermédiaire réactionnel [99]), à températures modérées (40 – 50 °C) c'est la vatérite et pour des températures plus élevées (60 – 80 °C) l'aragonite [98]. La température peut aussi influer sur la vitesse de germination et ainsi bloquer les transformations des phases métastables ayant lieu en solution. Par exemple, à basse température la vatérite ne recristallise pas en calcite, tout comme l'aragonite à hautes températures (> 60 °C) [97,100]. Par conséquent, les températures de co-précipitation « classiques » rencontrées dans la littérature sont de 75 – 100 °C pour l'aragonite [93,101,102], 20 – 30 °C pour la vatérite en général [93,102] mais pouvant aller jusqu'à 80 °C selon les autres conditions expérimentales [101], et usuellement température ambiante pour la calcite.

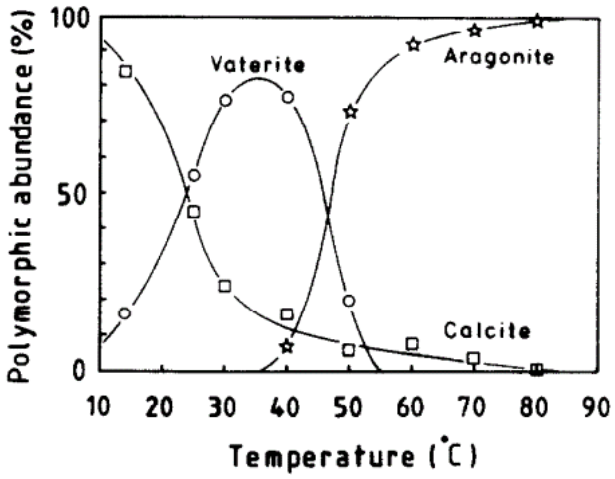


Figure 1.8 : Diagramme de la proportion des phases de CC cristallines anhydres en fonction de la température, pour les premiers instants de cristallisation, pour une concentration de carbonate de 1,9.10^{-2} M et de calcium de 9,24.10^{-3} M, et une force ionique de 0,2 M. Issu de Ogino et al. [98].

Le pH joue également un rôle important sur les proportions relatives des polymorphes de CC formés par co-précipitation. Selon Tai et Chen [103], pour une concentration donnée la vatérite est favorisée pour un pH entre 9 et 10 à température ambiante, mais elle peut être synthétisée à plus haut pH (11,7) lorsque les conditions d'ajout des solutions sont adaptées [93]. On obtient de la calcite pure à température ambiante pour un pH > 12 [103], et au-delà de 58 °C de l'aragonite pure si le pH est inférieur à 11 [93,103,104].

Il a aussi été montré que l'ordre d'ajout des réactifs affecte la précipitation : le précipité est constitué de vatérite lorsque la solution de calcium est ajoutée à celle de carbonate (dans des conditions standards de pH et température), alors que pour l'ordre inverse une plus grande proportion de calcite est obtenue [105]. La vitesse d'agitation est de plus un paramètre clé dans la sélection des polymorphes : une grande vitesse d'agitation augmente la proportion de vatérite par exemple [106].

L'introduction d'un solvant alcoolique comme l'éthanol peut modifier les sursaturations et ainsi permettre l'obtention d'une phase métastable comme la vatérite à une température élevée, pour laquelle elle n'est normalement pas favorisée [104,107]. Selon l'alcool choisi et surtout sa proportion, les polymorphes obtenus et leur morphologie sont différents : Sand *et al.* [106] ont proposé un ensemble de conditions expérimentales (pourcentage d'éthanol, de propan-1-ol ou de propan-2-ol et vitesse d'agitation) permettant d'obtenir toute une gamme de mélanges de calcite-vatérite et/ou aragonite en proportions et morphologies contrôlées.

Des méthodes de synthèses autres que la co-précipitation existent, comme l'émulsion inverse (dans laquelle les réactifs sont confinés dans des micelles de surfactant ségrégées dans l'huile, micelles ensuite mélangées pour permettre la précipitation de CC) [97] ou le bullage de CO_2 dans un bain de calcium [97]. Cette dernière méthode est utilisée industriellement avec une solution de $Ca(OH)_2$, et permet à pH constant l'obtention de calcite ou de vatérite pour un taux de bullage faible ou élevé respectivement [97,108]. Le CO_2 peut être injecté ou peut provenir de la décomposition d'un sel de carbonate, comme le carbonate d'ammonium $(NH_4)_2CO_3$, placé dans un dessiccateur contenant aussi la solution de calcium ($Ca(OH)_2$, $CaCl_2$ ou équivalents) [97].

Au-delà de la synthèse, les poudres de CC sont toutes biocompatibles [109,110], et présentent (sauf la calcite) une couche d'apatite sur leur surface après immersion dans le SBF, exacerbée pour une plus grande solubilité [93], ce qui est généralement vu comme un gage de bioactivité *in vitro*.

II.1.2.1.i Calcite

La calcite, dont le nom provient du grec *khalx* signifiant « chaux », est la phase de $CaCO_3$ la plus stable thermodynamiquement, et est présente dans de nombreuses roches et organismes vivants [80]. En particulier, on la retrouve dans les coquilles des organismes marins [96,111,112], comme les algues rouges, certaines éponges, les échinodermes (oursins, étoiles de mer) ou les planctons comme les coccolithophores, contributeurs majeurs des sédiments [96,113,114]. Elle cristallise sous forme rhomboédrique dans le groupe d'espace $R\bar{3}c$ [115,116], présenté sur la Figure 1.9, sur laquelle la maille élémentaire, contenant deux motifs $CaCO_3$, est représentée par des pointillés. Les ions calcium forment des triangles équilatéraux et les plans de calcium sont séparés à équidistance par un plan de carbonate, chaque Ca est donc entouré de 6 atomes d'oxygène. Le diffractogramme RX et le spectre d'absorption infrarouge caractéristiques de la calcite sont présentés en Annexe AI.1 et AI.2 sur la Figure AI.1a et la Figure AI.2a respectivement.

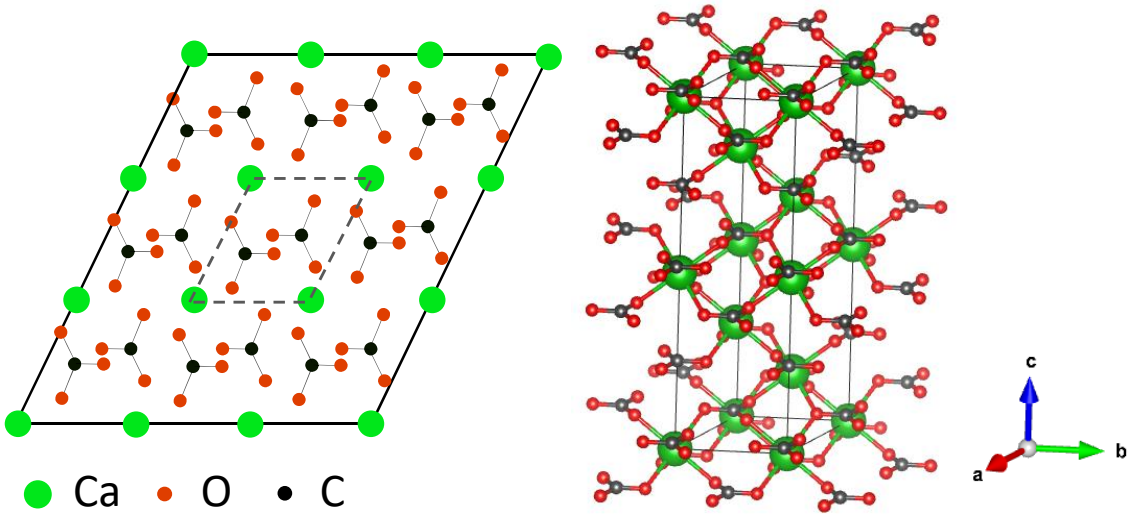


Figure 1.9 : Projection de la structure cristallographique de la calcite sur le plan (001) (la maille élémentaire est représentée en pointillés), issue de Clark et al. [117] (gauche) et représentation 3D de la structure par le logiciel Vesta (droite).

La calcite est obtenue facilement par co-précipitation [118], comme détaillé plus haut, mais aussi par dissolution-reprécipitation des phases métastables en solution. La sursaturation peut influer sur la forme des cristaux (Figure 1.10), qui sont rhomboédriques (cubiques) dans les conditions classiques (Figures 1.10a, 1.10b) [119,120], mais peuvent croître de manière sphérulitique (Figures 1.10c) [121] ou même sous forme sphérique à sursaturation et vitesse d'agitation élevées (Figures 1.10d) [97]. La calcite peut aussi être synthétisée en voie sèche en chauffant à haute température un carbonate de calcium puis en laissant le CaO formé absorber le CO_2 de l'atmosphère [122].

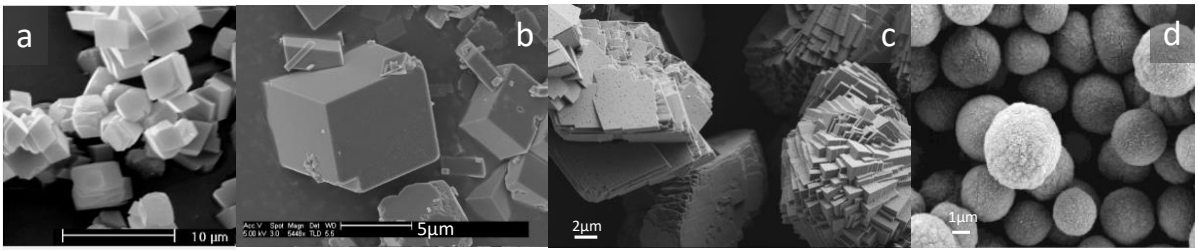


Figure 1.10 : Images MEB montrant la morphologie des cristaux de calcite synthétique : le plus généralement cubiques (a,b), ou sphérulitiques (b), ils peuvent être sphériques dans certaines conditions de précipitation (fortes saturation et vitesse d'agitation) (d). Images issues de Brečević et Kralj [119] (a), G. Nehrke [120] (b), Beck et Andreassen [121] (c) et Volodkin et al. [123] (d).

II.1.2.1.ii Aragonite

L'aragonite est également courante sous forme biogénique [80,96,112], dans les coraux, les nacres, ou d'autres coquilles de mollusques, ou coexistant avec la calcite dans les minéraux [96,124]. Son nom vient de la localité « Molina de Aragón » (Espagne) où elle a été identifiée pour la première fois [120]. Elle cristallise sous forme orthorhombique dans le groupe d'espace Pmcn [115], représenté sur la Figure 1.11. Comme pour la calcite, les ions calcium forment des triangles équilatéraux, mais les plans de calcium sont séparés à équidistance par deux plans de carbonate, donnant donc 9 ions oxygène entourant chaque ion calcium. La maille élémentaire contient quatre motifs $CaCO_3$. Les Figures AI.1a et AI.2a des Annexes AI.1 et AI.2 présentent respectivement le diffractogramme RX et le spectre d'absorption infrarouge caractéristiques de l'aragonite.

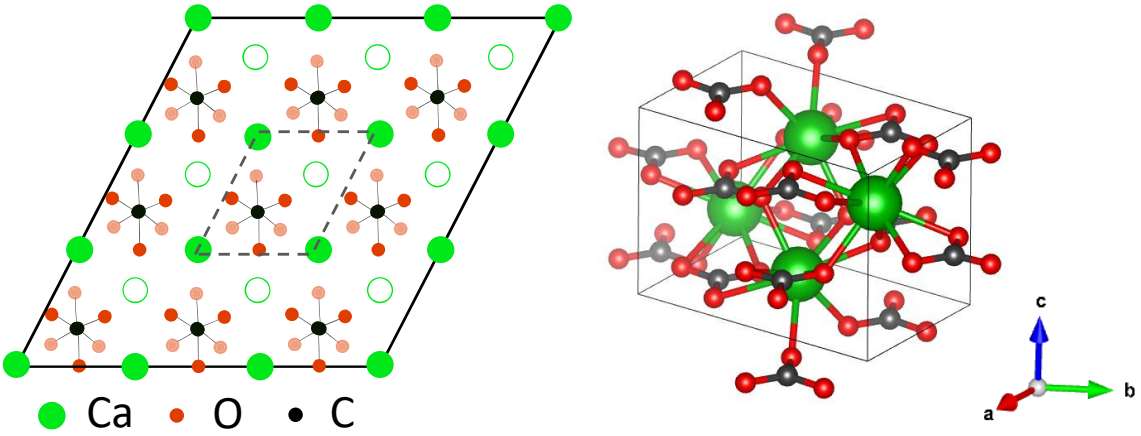


Figure 1.11 : Projection de la structure cristallographique de l'aragonite sur le plan (001) (la maille élémentaire est représentée en pointillés, les atomes de calcium hors du plan par des cercles verts vides et ceux d'oxygène hors du plan de couleur rouge atténuée), issue de Clark et al. [117] (gauche) et représentation 3D de la structure par le logiciel Vesta (droite).

L'aragonite est la phase la plus stable à haute pression (> 1,5 GPa) [125], et, comme décrit plus haut, elle est obtenue par co-précipitation majoritairement à haute température, car favorisant la formation de ses cristaux qui ont une grande énergie de surface [97]. Elle est souvent stabilisée par des additifs, comme par exemple le magnésium, très souvent associé à la forme biogénique. De fait, les variations des ratios Mg^{2+}/Ca^{2+} dans l'eau de mer ont été proposées comme explications aux inversions récurrentes calcite-aragonite dans les compositions des biominéraux marins de CC au cours de l'histoire géologique [124,126]. D'autres cations peuvent favoriser la formation d'aragonite par rapport à la calcite, en réduisant la vitesse de germination, comme le zinc ou le strontium [127] parfois utilisés pendant la synthèse. Par diffusion de CO_2 (provenant de la décomposition de carbonate d'ammonium) dans un bain de chlorure de calcium contenant de très faibles quantités de copolymère à bloc hydrophile (PDEAEMA-b-PNIPAM-b-PMAA) [k], Nassif *et al.* [128] ont obtenu des cristaux d'aragonite biomimétiques, sous forme de plaquettes et comportant à leur surface la même couche d'ACC que celle observée sur la nacre biogénique [129], rassemblés en bouquets d'aiguilles très reproductible. C'est la morphologie généralement obtenue pour ces cristaux [97,130], parfois appelée rosette [103] (Figure 1.12).

[k] poly(méthacrylate de diéthylaminoéthyle)-b-poly(N-isopropylacrylamide)-b-acide poly(méthacrylique)

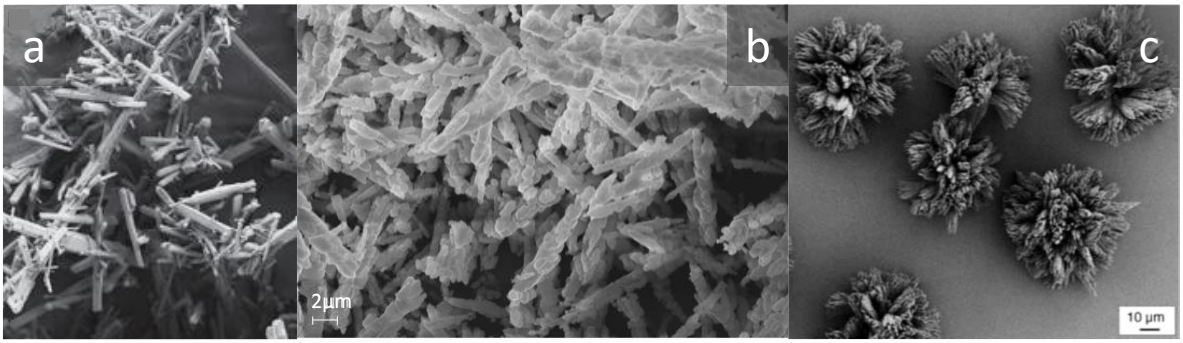


Figure 1.12 : Images MEB montrant la morphologie des cristaux d'aragonite synthétique, sous forme d'aiguilles (a,b) parfois assemblées en bouquets (c). Images issues de Al Omari et al. [105] (a), S. Tadier [130] (b) et Nassif et al. [128] (c).

II.1.2.1.iii Vatérite

La vatérite est produite par un nombre limité d'organismes, contrairement à la calcite et l'aragonite [80]. Elle est présente dans les spicules [l] des ascidies marines, dans les coquilles d'escargots d'eau douce et de terre ou dans les otolithes [m] de certains poissons [96,112]. Elle se retrouve rarement dans les systèmes géologiques minéraux, car elle est instable quand elle est exposée à l'eau et recristallise facilement en calcite [100]. D'après Friedman et Schulz [131], elle doit son nom à G. Linck qui l'aurait baptisée « *Vater's Third Modification* » en 1903 après sa découverte par H. Vater (qui l'a alors décrite comme « *third modification of calcium carbonate* »). Ce nom a été utilisé dans un article pour la première fois par W. Meigen en 1911 [132]. La phase a été identifiée distinctement de la calcite par DRX par Gibson *et al.* [132], et assimilée à la phase appelée µ-$CaCO_3$ décrite auparavant. Malgré sa découverte au début des années 1900, sa structure cristallographique est encore sujette à débats. Un des premiers modèles proposés est celui d'une structure de symétrie hexagonale [133], avec les carbonates orientés parallèlement à l'axe *c*, ensuite précisé en système de groupe d'espace $P6_3/mmc$ [134]. D'autres structures ont été proposées à partir d'analyses DRX, de spectroscopie Raman, ou de calculs *ab initio*, avec des réseaux hexagonaux, monocliniques ou orthorhombiques [135]. Burgess et Bryce [135] ont évalué la validité de ces structures par comparaison de leur modélisation par théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) avec des mesures de DRX et de RMN du ^{43}Ca. Il apparait alors que parmi les 18 structures testées, seules deux présentent une concordance entre les données calculées et expérimentales à la fois de RMN et de DRX : la structure hexagonale $P3_221$ (proposée par Demichelis *et al.* [136]) et la structure monoclinique C2 (proposée par Demichelis *et al.* [137]). Ils relèvent cependant qu'aucun des modèles ne montre de concordance parfaite entre les paramètres de RMN mesurés et calculés. Ces écarts pourraient être dus à la présence d'une superstructure avec un polytypisme [n] dans le plan *ab, i.e.* à de légères différences de structure ou composition entre les différents feuillets s'empilant selon l'axe *c* pour constituer le cristal de vatérite, variant par l'organisation des plans de carbonate d'orientation différente. Dans sa revue, Christy [139] a comparé les différents polytypes [o] issus de données expérimentales ou de modélisations *ab initio*, et ceux qui ont la meilleure concordance entre données de diffraction RX, de spectroscopie Raman et modélisations sont les polytypes 2M (avec une période égale à deux dans le réseau monoclinique, cohérent avec la structure C2) et le polytype 6H (de période 6 dans le réseau hexagonal, cohérent avec la structure $P3_221$) [138,139]. Les structures C2 [137] et

[l] Sécrétions minérales extracellulaires constituant le squelette de certains invertébrés, comme les éponges ou les ascidies.

[m] Concrétions minérales de l'oreille interne des vertébrés participant à l'équilibration.

[n] Le polytypisme peut être vu comme un polymorphisme monodimensionnel [138], voir note *o.*

[o] Structures formées par un empilement de couches ou feuillets de structure et composition presque identiques, mais différant par le mode d'empilement dans une direction, *i.e.* les polytypes ont deux paramètres de maille communs mais le dernier varie [138].

$P3_221$ [136] issues du logiciel Vesta sont représentées sur la Figure 1.13, ainsi qu'une projection de la maille sur le plan de base pour la structure C2. Le diffractogramme RX et le spectre d'absorption infrarouge caractéristiques de la vatérite sont présentés en Annexes AI.1 et AI.2 sur les Figures AI.1a et AI.2a respectivement.

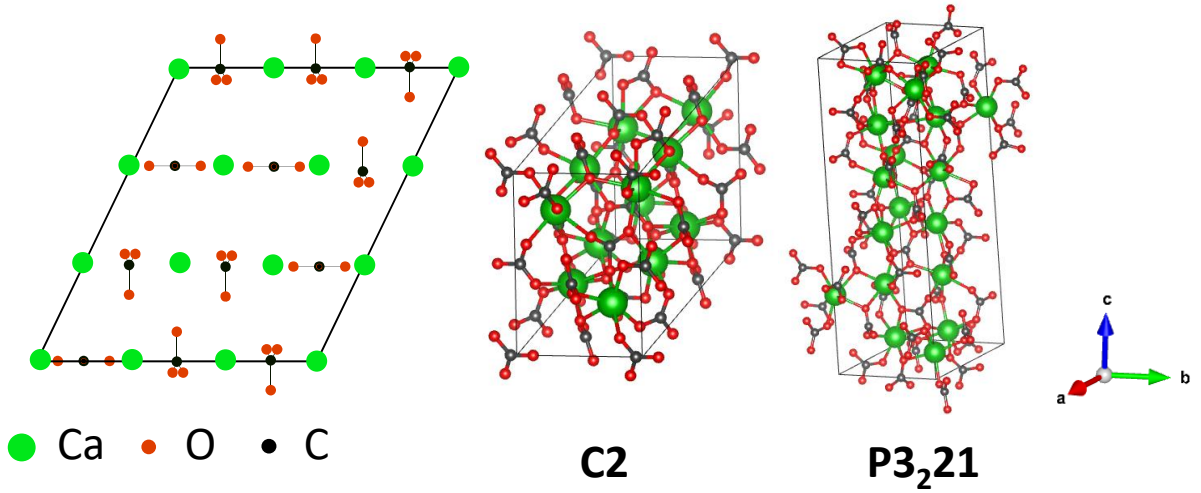


Figure 1.13 : Projection de la structure cristallographique de la vatérite C2 sur le plan (001), issue de Clark et al. [117] (gauche) et représentation 3D de la vatérite par le logiciel Vesta pour une structure C2 (milieu) et $P3_221$ (gauche) à partir des données cif de Demichelis et al. [137].

Même si la vatérite est la phase principale de CC cristallin utilisée comme biomatériau (principalement sous forme de composite) [93], il est difficile d'obtenir de la vatérite pure par co-précipitation [99,119]. Il faut pour cela ajuster les paramètres de synthèse : haute sursaturation à température ambiante [105] ; ou ajout goutte à goutte à une vitesse contrôlée sous forte agitation (aussi à température ambiante) selon le protocole développé par S. Tadier dans sa thèse [130], permettant l'obtention de vatérite pure de manière reproductible. La durée et le pH de la réaction peuvent aussi être adaptés [99]. Certains additifs favorisent l'obtention de vatérite par rapport aux autres polymorphes de CC : les ions sulfate [124], des protéines (albumine de sérum bovin (BSA) [140] ou ovalbumine [141]), ou des polymères (acide polyacrylique (PAA) [142] ou polysaccharide naturel comme la gomme arabique [143]). L'introduction d'un solvant alcoolique, en changeant les conditions de saturations, peut entraîner une précipitation préférentielle de la vatérite [144], comme avec le méthanol [145] ou l'éthanol [106]. Les particules de vatérite ont des morphologies variées selon les conditions de synthèse, dont quelques-unes sont présentées sur la Figure 1.14 : elles sont généralement de forme lenticulaire (Figure 1.14a) [34], ou sphérique (Figure 1.14b) [119], mais peuvent aussi être sphérulitiques (Figure 1.14c, 1.14d) [106,121], en aiguilles ou sous forme de chou-fleur (Figure 1.14e) [124].

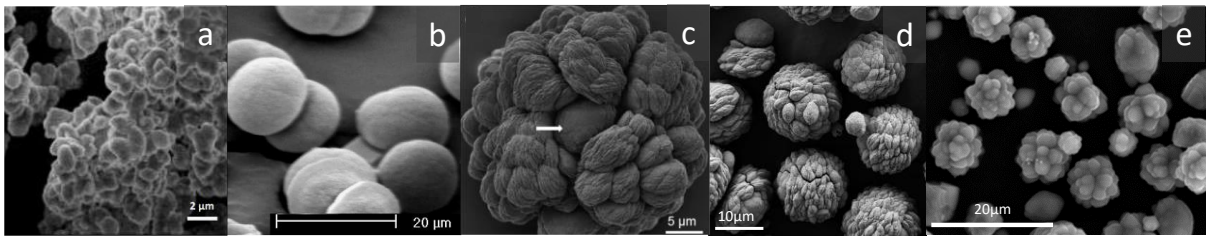


Figure 1.14 : Images MEB montrant quelques morphologies des cristaux de vatérite synthétique : sous forme lenticulaire (a), sphérique (b), sphérulitique (c,d) ou de chou-fleur (e). Images issues de S. Jacquart [34] (a), Brečević et Kralj [119] (b), Sand et al. [106] (c), Beck et Andreassen [121] (d) et Cuesta-Mayorga et al. [124] (e).

II.1.2.2 Phases cristallines hydratées

Les phases de carbonate de calcium cristallines hydratées sont moins étudiées et décrites que leurs équivalentes anhydres, en particulier la phase hémihydratée (CCHH) découverte seulement en 2019 [90]. Ces phases sont naturellement peu présentes et limitées à des environnements particuliers (aqueux, à températures proches de zéro) [124]. Elles ne peuvent être synthétisées par co-précipitation qu'à basse température (- 10 °C en général) en raison de leur instabilité à température ambiante [119], ou par le biais d'additifs, comme les ions magnésium ou phosphate [124]. Récemment, Zhou *et al.* [91] ont classé les formes hydratées par ordre de stabilité décroissante selon $CaCO_3 \cdot 6H_2O > CaCO_3 \cdot H_2O > CaCO_3 \cdot ½H_2O$, en se basant sur des calculs d'énergie de Gibbs de réaction. Les comparaisons de leur structure cristalline sont présentées sur la Figure 1.15.

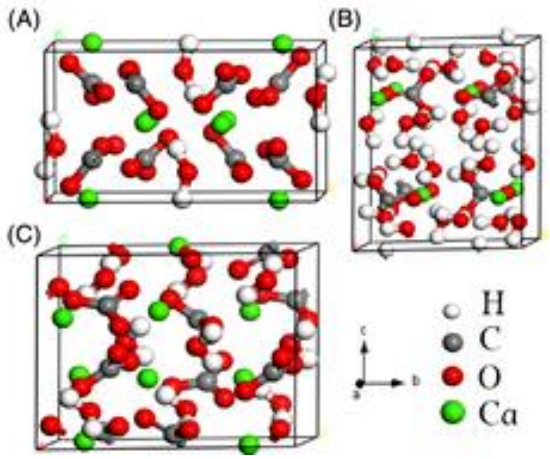


Figure 1.15 : Comparaison des structures cristallines des polymorphes de CC cristallins hydratés, avec en A) $CaCO_3 \cdot ½H_2O$, en B) $CaCO_3 \cdot 6H_2O$ et en C) $CaCO_3 \cdot H_2O$. D'après Zhou et al. [91]

II.1.2.2.i Carbonate de calcium hémi-hydraté (CCHH)

Zou *et al*. [90] ont découvert très récemment (en 2019) l'existence de cette phase, qui n'a été ensuite décrite que dans peu d'articles [91]. Le CCHH a une structure cristalline monoclinique, de groupe d'espace $P2_1/c$, avec des distorsions des groupements carbonate du fait d'une petite incorporation de molécules d'eau additionnelles dans sa structure [90], représentée sur la Figure 1.16. Sa maille contient 8 unités $CaCO_3$ [91], et 8 oxygène entourent le calcium (à la différence de la calcite par exemple avec une coordinence de 6) [90]. En Annexe AI.1, la Figure AI.1b compare le diffractogramme RX de CCHH à celui des autres phases cristallines hydratées. Ses spectres d'absorption infrarouge et Raman sont présentés en Annexe AI.2 sur les Figure AI.2b et AI.3 respectivement.

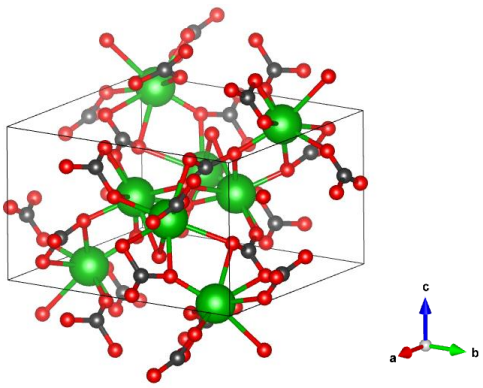


Figure 1.16 : Représentation 3D de la structure du CCHH par le logiciel Vesta, à partir des données cif de Zou et al. [90], les atomes de calcium, de carbone et d'oxygène sont tracés en vert, noir et rouge respectivement.

Le CCHH est issu de la transformation d'ACC en présence de Mg^{2+}, précipité après le mélange de solutions de $CaCl_2$ + $MgCl_2$ et de Na_2CO_3 : le Mg-ACC (contenant environ une molécule d'eau par $CaCO_3$) se déshydrate et libère du magnésium pour se transformer en solution en CCHH (en 30 min – 1 h), qui lui-même se transforme lentement en solution en calcite monohydratée (mais il peut être stable plusieurs mois sous vide). Le CCHH n'est cependant formé que pour des contenus intermédiaires de Mg^{2+} et carbonate (ratio Mg^{2+}/Ca^{2+} d'environ 5,2 dans le solide). Ses cristaux sont sous forme d'aiguilles de 1 à 5 µm de long, visibles sur l'image MEB Figure 1.17.

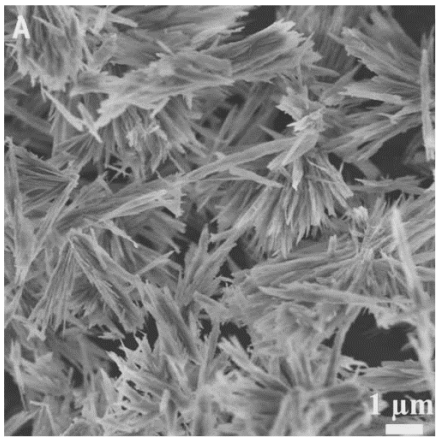


Figure 1.17 : Image MEB montrant les cristaux de CCHH sous forme d'aiguilles synthétisés par Zou et al. [90].

II.1.2.2.ii Carbonate de calcium monohydraté ou calcite monohydratée (MHC)

La calcite monohydratée (MHC) est formée dans différents environnements naturels souvent riches en magnésium, comme des eaux de source salines, des systèmes marins polaires, des galeries minières humides et froides par exemple. Elle est couramment associée à d'autres phases de CC (aragonite, calcite enrichie au magnésium …) [119,146], mais elle peut aussi être formée par certains organismes vivants (mollusques, vers, otolithes de poissons …) [96,146]. Son abondance relativement faible sur Terre est expliquée par sa métastabilité face aux phases anhydres : dans les conditions ambiantes, elle se transforme en aragonite à l'air ou en calcite en présence d'eau [146–148]. Du magnésium est très généralement intégré en quantités variables (Mg^{2+}/Ca^{2+} de 0,01 à 0,53), et sa présence est parfois considéré comme prérequis à l'obtention de cette phase [104,119,146,147]. Il a été montré que l'ion phosphate peut aussi stabiliser la MHC [149]. La calcite monohydratée cristallise dans une structure hexagonale de groupe d'espace $P3_112$ [91,147,150] (Figure 1.18) mais avec une superstructure de type $P3_1$ expliquant les différences d'orientation des carbonates [148,149]. Le calcium est entouré de 8 atomes d'oxygène (6 provenant du carbonate et 2 de l'eau) [147], la présence d'eau rendant la structure moins dense que les formes anhydres [146], et sa maille contient 9 unités $CaCO_3$ [91]. Son diffractogramme RX caractéristique est comparé à celui des autres phases cristallines hydratées en Annexe AI.1 (Figure AI.1b), et son spectre d'absorption infrarouge est présenté Figure AI.2c en Annexe AI.2.

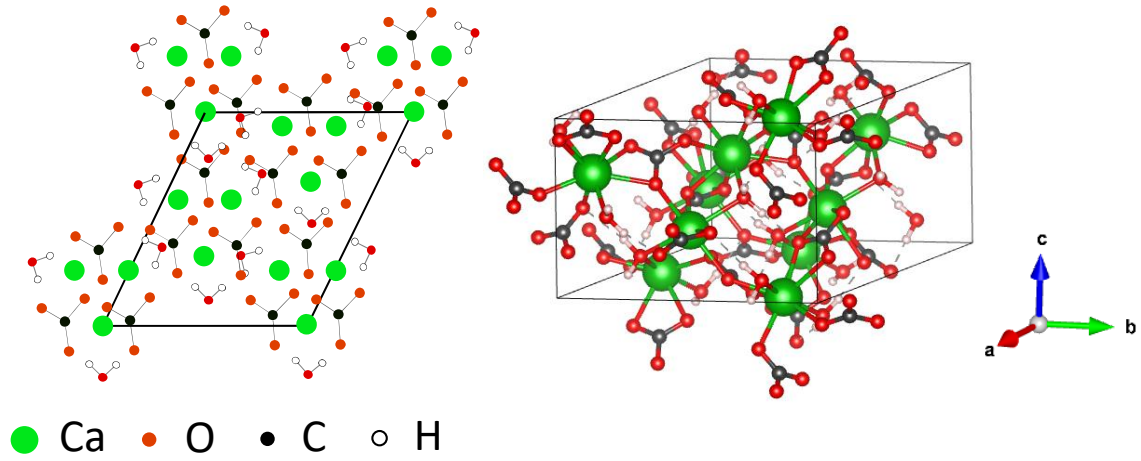


Figure 1.18 : Projection de la structure cristallographique de la calcite monohydratée sur le plan (001), issue de Clark et al. [117] (gauche) et représentation 3D de la structure par le logiciel Vesta (droite).

La calcite monohydratée peut être synthétisée à partir d'eau de mer artificielle (solution de chlorure de sodium, chlorure de magnésium, chlorure de calcium et chlorure de strontium en quantités moindres [89]), à laquelle est ajoutée à basse température (6 °C) un sel de carbonate et qui est laissée à maturer une nuit [147]. Mais elle peut aussi être obtenue par co-précipitation plus classique, en ajoutant à une solution de sels de calcium et de magnésium une solution de sel de carbonate, à basse température ou température ambiante [151]. Un ACC contenant du magnésium se forme en premier lieu et selon le taux de magnésium potentiellement un CCHH comme montré plus haut [90] qui se transforme ensuite en MHC [146,151], ayant des cristaux avec des facettes bien nettes (Figure 1.19a) [90], de morphologie sphérulitique fusiforme (Figure 1.19b) [152] ou en agrégats de plaquettes (Figure 1.19c) [147,153]. Elle peut aussi être issue de la décomposition de l'ikaïte [153].

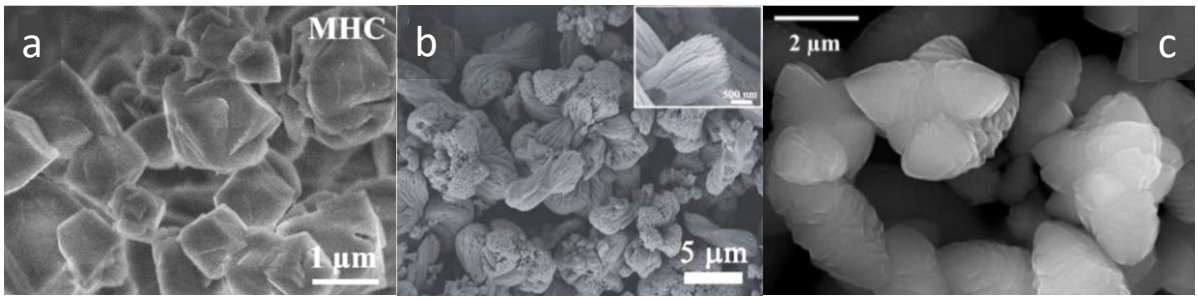


Figure 1.19 : Images MEB des cristaux de MHC avec des facettes bien définies (a), en agrégats fusiformes (b) ou des plaquettes (c). Images issues de Zou et al. [90] (a), Wang et al. [152] (b) et Neumann et Epple [147] (c).

II.1.2.2.iii Carbonate de calcium hexahydraté ou ikaïte

Le nom ikaïte a été donné par H. Pauly en 1963 [154] au carbonate de calcium hexahydraté, découvert à l'état naturel pour la première fois dans le fjord d'Ika au Groenland. On le retrouve dans des concrétions géologiques, formant par exemple dans les fjords des grandes colonnes desquelles ont été prélevées les roches permettant sa première identification [154], ou dans des sédiments ou glaces dans les zones froides [155]. L'ikaïte cristallise avec une structure monoclinique [156] dans le groupe d'espace C2/c [157], consistant en unités de $CaCO_3.6H_2O$ pour laquelle chaque ion Ca^{2+} est coordonné avec 8 atomes d'oxygène (6 provenant de l'eau et 2 des groupes carbonate) [157]. Les unités sont aussi décrites comme des paires d'ions $(Ca^{2+}CO_3^{2-})^0$ entourées par une cage de molécules d'eau liées par des liaisons hydrogène, isolant chaque paire des autres [158]. Cette représentation est illustrée et mise en évidence

sur la Figure 1.20. Sa maille élémentaire contient 4 unités $CaCO_3$ [91]. Le diffractogramme RX caractéristique de l'ikaïte est présenté sur la Figure AI.1b (Annexe AI.1), et son spectre d'absorption infrarouge Figure AI.2d (Annexe AI.2).

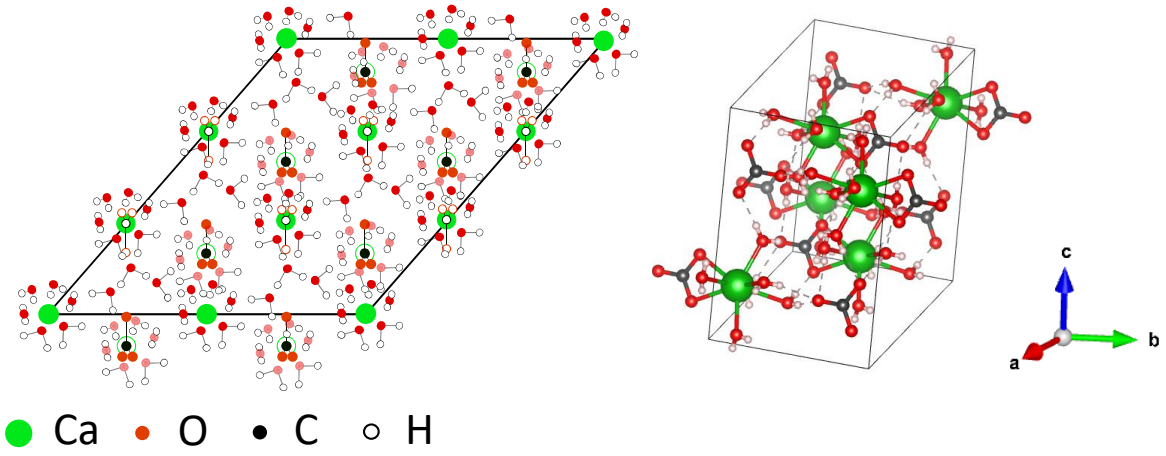


Figure 1.20 : Projection de la structure cristallographique de l'ikaïte sur le plan (001) (les atomes de calcium hors du plan sont représentés par des cercles verts vides, ceux d'oxygène hors du plan de couleur rouge atténuée, et quand deux atomes de Ca et de C sont superposés, celui en arrière-plan est représenté par un cercle vide de couleur verte ou noire respectivement), issue de Clark et al. [117] (gauche) et représentation 3D de la structure par le logiciel Vesta (droite).

L'ikaïte est métastable en contact avec l'eau aux températures au-dessus de 0 °C [151] (même si elle persiste parfois à plus hautes températures [151]), elle se formerait spontanément dans les eaux non sursaturées qui le deviennent en refroidissant [88,155]. De fait, des précipitations spontanées de ce polymorphe ont été observées dans les lacs de Californie en hiver [155]. La présence dans les eaux froides d'inhibiteurs de cristallisation de la calcite, tels que les phosphates, favorise la formation d'ikaïte [156]. Par conséquent, des polyphosphates sont souvent ajoutés lors de la co-précipitation d'ikaïte synthétique (à température ambiante ou à froid), comme l'hexamétaphosphate de sodium $(NaPO_3)_6$ [157] ou le triphosphate de sodium $Na_5P_3O_{10}.6H_2O$ [88]. Au-delà de 30 °C, l'ikaïte, de solubilité comprise entre celle de la vatérite et de l'ACC à 25 °C (Tableau 1.2), devient plus soluble que ce dernier, car sa solubilité (et donc son instabilité) augmente avec la température [156]. Les cristaux d'ikaïte se présentent sous forme de rhomboèdres, visibles sur la Figure 1.21, qui se décomposent au-delà de 6 °C en l'absence d'additifs [119], ou peuvent se transformer en ACC quand la cinétique de déshydratation est très rapide (empêchant la germination de phases plus stables) [159].

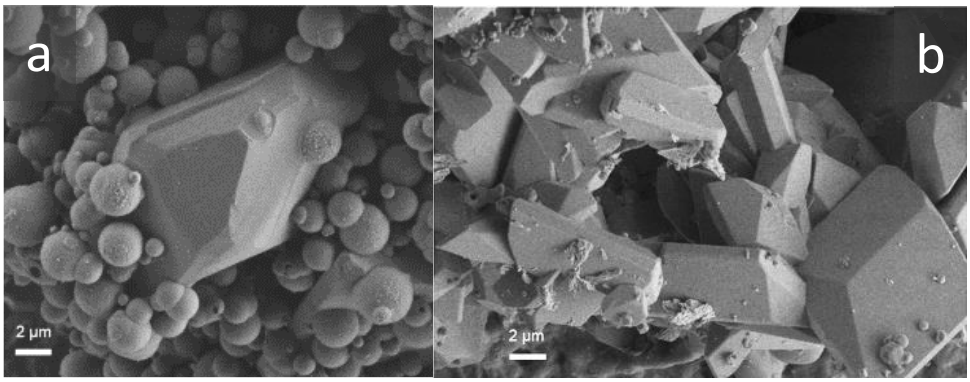


Figure 1.21 : Images MEB d'un cristal d'ikaïte entouré par des particules sphériques d'ACC (a) et d'autres cristaux rhomboédriques d'ikaïte (b). Images issues de Tollefsen et al. [160].

II.2 LES PHASES AMORPHES CALCIQUES BIO-INSPIREES

Les phases amorphes, *i.e.* sans organisation à longue distance, sont métastables, donc de plus grande réactivité que les phases cristallines associées. Par conséquent, leur utilisation peut s'avérer d'un grand intérêt pour des applications requérant une dissolution plus rapide des biomatériaux. Les phases amorphes de phosphate et carbonate de calcium présentent de nombreuses similitudes, d'abord sur les stratégies mises en œuvre pour éviter la cristallisation lors de leur synthèse, et sur l'étude des mécanismes de germination/croissance cristalline de ces phases, nécessaire pour adapter ces stratégies. De plus, leur dissolution dans les milieux (aqueux ou cellulaire) peut être modulée par le contrôle de la métastabilité. Enfin, les techniques de caractérisation avancées utilisées pour décrire l'organisation à l'échelle locale, mise en évidence dans chacune de ces phases amorphes, sont similaires. Le principe général de ces techniques ainsi que les informations associées seront brièvement présentées dans la partie suivante, II.2.1.

II.2.1 Techniques de caractérisation structurale

Comme cela sera décrit par la suite, les phosphates et carbonates de calcium amorphes présentent une structuration à une méso-échelle (de l'ordre du nanomètre) sous forme de clusters. Cette dernière a été amplement étudiée par différentes techniques de caractérisation sur des matériaux synthétiques et biogéniques, afin dans un premier temps de comprendre les mécanismes inhérents à la biominéralisation, mais aussi la cristallisation de phases de calcium au sens plus global (pour des domaines variés tels que l'inhibition de l'entartrage pour le carbonate par exemple [161]). Les techniques récurrentes ayant été utilisées avec pour objectif d'élucider la structuration des amorphes et leur formation/germination sont présentées de manière non exhaustive ci-après.

II.2.1.1 Techniques expérimentales

Les techniques de suivi de la germination *in situ* ont permis de grandes avancées dans la compréhension de la nucléation des amorphes, au-delà des méthodes plus classiques développées initialement de mesure de conductivité, de pH ou d'une concentration ionique par des électrodes [162]. De très petites espèces (< 1 nm) peuvent être visualisées par **microscopie électronique en transmission** (MET) en phase liquide, sur des intervalles de temps très courts (fractions de seconde) [163,164]. Il est même possible de réaliser le mélange des deux solutions de co-précipitation *in situ* afin d'observer les premiers instants de la germination [165]. Cependant le faisceau peut induire des transformations de l'échantillon par échauffement, d'autant plus s'il est hydraté [166]. Le cryo-MET, pour lequel l'échantillon est figé très rapidement en le refroidissant à des températures cryogéniques, s'avère utile dans ce cas et pour des réactions évoluant très vite ou des composés très réactifs [163,167]. Il peut de plus être couplé à de la cryo-tomographie électronique, créant une reconstruction 3D de l'échantillon à une résolution de 3 – 4 nm via des acquisitions à 360 °, comme dans l'étude de Pouget *et al.* [168]. La visualisation de petites entités sur une surface est aussi réalisable par **microscopie à force atomique** (AFM) [166,169,170], mais dont la vitesse de balayage et la fenêtre de visualisation réduite peuvent être des inconvénients [171]. Les avantages conférés par la très haute résolution spatiale de ces techniques (en particulier le MET) s'accompagnent de désavantages, en particulier un manque d'informations globales car la visualisation est centrée sur quelques particules dont le comportement n'est pas forcément généralisable [171].

Parmi les techniques procurant des informations locales, les spectroscopies d'absorption des rayons X, à savoir l'**EXAFS** (*Extended X-Ray Absorption Fine Structure*) et le **XANES** (*X-Ray Absorption Near Edge Structure*), sont souvent couplées. Elles permettent l'analyse à l'échelle nanométrique de l'environnement local autour d'un élément donné, le XANES pour des énergies plus basses donc pour

des échelles plus locales (informations structurales comme la coordination et électroniques comme le niveau d'oxydation, la valence, la symétrie des atomes les plus proches), et l'EXAFS pour une gamme d'énergies plus larges, donc une plus grande échelle (nombre d'atomes dans les couches de coordination, distances interatomiques, symétrie …) [80,172–174]. Elles ont de fait beaucoup été utilisées pour étudier l'organisation à petite échelle des ACC biogéniques [80,172] par exemple.

La **résonance magnétique nucléaire** (RMN) du solide permet d'analyser l'environnement chimique d'un élément, en général le ^{13}C ou le proton ^{1}H mais aussi plus rarement le ^{43}Ca [175,176]. En effet, la fréquence de résonance d'un atome (de spin non nul) soumis à un rayonnement électromagnétique dans un champ magnétique dépend de son environnement chimique, et plus précisément du nombre et de la nature des atomes voisins, de leur liaison chimique, de l'homogénéité ou hétérogénéité de l'environnement [177] … Les spectres de RMN en phase solide sont souvent acquis en rotation à l'angle magique (MAS), moyennant les interactions magnétiques (anisotropes dans les solides) et ainsi améliorant la résolution des spectres [176–179]. Pour le ^{13}C, l'excitation est généralement indirecte (*cross-polarization*, CP), réalisée par le biais des protons pour exalter l'intensité des pics, mais un enrichissement en ^{13}C des composés est quand même nécessaire [180]. Des spectres de double résonance rotationnels (*rotational-echo double resonance*, REDOR) ou 2D de corrélation hétéronucléaire (*heteronuclear correlation,* HETCOR) peuvent mettre en évidence des interactions ou couplages dipolaires entre atomes voisins et ainsi des proximités spatiales [180–183]. Il est également possible de travailler en RMN *in situ* pour le suivi de réaction [184,185].

Les **spectroscopies vibrationnelles** infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et Raman ont été utilisées avec succès pour distinguer des ACC avec une organisation différente à petite échelle (au niveau des environnements des groupements CO_3^{2-}) par exemple [80,179]. De fait, pour une durée d'acquisition assez longue et une bonne résolution lors de la mesure (pas entre deux points réduit), il est possible d'effectuer des déconvolutions des bandes larges caractéristiques des amorphes et de mettre en évidence la présence (ou l'apparition lors d'un suivi de nucléation *in situ*) de bandes associées à certaines phases cristallines, et par conséquent une structuration à petite échelle similaire à celles-ci (ou du moins avec les mêmes symétries et vibrations de liaison).

Pour les composés amorphes, la diffraction des rayons X (DRX) n'est pas adaptée et elle peut seulement attester de l'absence de pics cristallins et de structuration à grande échelle. On peut cependant se tourner vers les techniques de diffusion, entre autres les **diffusions de rayons X et de neutrons aux petits angles** (SAXS/SANS), donnant des informations moyennes sur la taille des entités en présence et les distributions de tailles (si un modèle est appliqué). Elles peuvent être réalisées *in situ* afin de suivre des réactions chimiques via les modifications des tailles caractéristiques (agrégations, précipitations …) et en mode dynamique avec la circulation d'un milieu réactionnel sous le faisceau [174,186]. Les analyses avec source de rayons X et de neutrons sont parfois couplées et effectuées sur les mêmes échantillons, car elles apportent des informations complémentaires : les neutrons sont sensibles aux isotopes et la section efficace d'interaction de l'hydrogène est grande, permettant d'envisager des analyses d'échantillons avec des enrichissements isotopiques ciblés, tandis que les rayons X sont sensibles à la différence de densité électronique (et donc plutôt des atomes avec beaucoup d'électrons) [174,178]. La **diffusion de rayons X aux grands angles** (WAXS) donne quant à elle des informations à petite échelle, sur l'organisation à l'échelle de la maille cristalline et la longueur de corrélation [p], essentielle pour définir l'ordre à courte distance des amorphes. Des données WAXS est souvent extraite la fonction de distribution de paires (PDF), *i.e.* la probabilité de trouver une paire d'atomes à une distance donnée. C'est une mesure quantitative de la distribution des séparations

[p] La longueur de corrélation est la plus grande distance pour laquelle une organisation est visible.

interatomiques, décrivant comment, en moyenne, les atomes d'un système sont organisés radialement les uns autour des autres [187,188], et elle n'est pas restreinte à un seul élément (comme pour l'EXAFS ou XANES) [178]. Ces différentes techniques de diffusion réalisées conjointement ont le grand avantage de mettre en évidence, le cas échéant, les structurations hiérarchisées sur différentes échelles (à la condition de pouvoir appliquer un modèle aux données mesurées afin de les interpréter correctement).

L'**ultracentrifugation analytique** (AUC) est une technique très précise quant aux tailles caractéristiques, donnant des informations de la taille de l'Angström par l'intermédiaire du calcul des coefficients de sédimentation [189], sur des ions seuls ou molécules [162] séparés dès les premiers instants de la réaction. Cette technique, ayant marqué un tournant pour les théories de la nucléation de l'ACC, a montré des résultats concordants avec les tailles caractéristiques des petites entités extraites des données de diffusion des rayons X (SAXS) et dynamique de la lumière (DLS) [190].

II.2.1.2 Apport de la modélisation

Les techniques de modélisation ont beaucoup apporté dans la compréhension des mécanismes de germination en particulier. Pour modéliser ces mécanismes, pour lesquels le solvant a un rôle important, des **méthodes moléculaires** sont mises en œuvre. La plupart de ces approches permettent de faire des simulations à des échelles de temps très courtes, qui sont en revanche insuffisantes pour extraire des énergies significatives pour certaines réactions des matériaux inorganiques dans l'eau [171]. De plus, le choix de la structure initiale influe sur la structure finale, de manière parfois erronée quand les postulats de départ ne sont pas bons [171]. La théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) a été utilisée, mais du fait de la difficulté de localiser les charges sur des polyanions (comme CO_3^{2-} ou PO_4^{3-}) à un instant donné [171], le choix a été reporté sur d'autres méthodes de modélisation, comme la **dynamique moléculaire**. Celle-ci permet notamment d'obtenir ce type d'information, montrant par exemple que l'eau a un rôle prépondérant [191,192] et que la formation de l'amorphe est privilégiée (par rapport à celle des phases cristallines) pendant la germination du $CaCO_3$ [193]. Il est également possible de recourir aux **simulations de Monte Carlo**, et spécifiquement aux méthodes inversées, nécessitant une moins grande puissance de calcul que la dynamique moléculaire [178] car pouvant se baser sur des données expérimentales pour construire un modèle théorique, par exemple par Monte Carlo inversée (*Reverse Monte Carlo*, RMC). Cette technique est présente dans plusieurs études, se basant sur des données d'absorption et diffraction des rayons X [125,187] ou SAXS/SANS [117,178].

II.2.2 Les phases amorphes de phosphate

Les phases amorphes de phosphate et de carbonate de calcium, constituant des intermédiaires réactionnels des phases cristallines et ayant une implication dans les minéralisations *in vivo* (dans le corps humain ou chez d'autres organismes vivants comme les crustacés), ont plusieurs similarités. En effet, malgré leur caractère amorphe elles présentent toutes deux une structuration à petite échelle, dont les mécanismes de formation ont été décrits par les mêmes théories. Bien qu'il n'y ait pas de consensus sur celles-ci et sur les mécanismes de cristallisation *in vitro* et *in vivo*, la comparaison entre les amorphes phosphate et carbonate de calcium, rarement réalisée [194], pourrait pourtant par analogie aider à la compréhension générale. C'est dans cette optique que les amorphes de phosphate de calcium sont décrits dans la partie suivante, au préalable de ceux de carbonate de calcium.

II.2.2.1 Orthophosphate amorphe (ACP)

Les ACP peuvent présenter une bonne ostéoinductivité [195], mais leur instabilité relative conduit à une dissolution rapide, libérant des ions calcium et/ou phosphates trop rapidement pour les cellules et créant un effet toxique. Connaître leur composition et organisation à l'échelle nanométrique est alors

un grand enjeu, afin d'imaginer des mécanismes de stabilisation permettant des libérations retardées et contrôlées, avec par exemple l'incorporation d'ions divalents, comme le zinc, retardant leur dissolution [196].

II.2.2.1.i Structure et composition de l'ACP

Le **phosphate tricalcique amorphe** (ACP ou parfois noté ATCP) a été beaucoup étudié, car c'est un des précurseur des phases de phosphate de calcium les plus courantes dans les organismes vivants [55]. Il est généralement décrit par la formule chimique $Ca_3(PO_4)_2.nH_2O$, avec un ratio Ca/P de 1,5. C'est la composition la plus courante en milieu basique (pH 9-11), mais à pH plus modéré l'existence d'un autre ACP (noté ACP2) a été mis en évidence par Christoffersen *et al.* [197], présentant dans sa structure des ions hydrogénophosphate et avec un ratio Ca/P plus faible, tenant ainsi compte de la spéciation des phosphates à pH plus acide. Cet amorphe ACP2 est aussi parfois appelé hydrogénophosphate de calcium amorphe (ACHP) ou « brushite amorphe » [198,199]. De plus, lors de son vieillissement les PO_4^{3-} de l'ACP1 peuvent s'hydrolyser en HPO_4^{2-} et HO^-, modifiant la stœchiométrie en $Ca_9(PO_4)_{6-x}(HPO_4)_x(OH)_x$ [200]. De fait, hormis pour les ACP synthétisés à pH supérieur ou égal à 11, des quantités non-négligeables de HPO_4^{2-} sont détectées, possiblement stabilisant les sous-entités les composant [198]. Le ratio Ca/P varie entre 1,18 et 2 [201], et des substitutions d'ions divalents, comme Mg^{2+}, Sr^{2+} ou Zn^{2+} peuvent avoir lieu [55]. L'incorporation d'ions carbonate est très peu décrite dans la littérature [198], ceux-ci jouant pourtant probablement aussi un rôle stabilisateur [202] et bénéfique pour la formation osseuse [203]. Pour la suite, seul l'ACP1 (ou ATCP) sera considéré.

Betts et Posner [204] ont démontré en 1974 par fonction de distribution radiale l'organisation à l'échelle nanométrique de l'ACP, en domaines cristallins de 9,5 Å de diamètre, ensuite appelés **clusters de Posner**, entourés par de l'eau interstitielle fortement liée. Ceux-ci sont composés d'unités $Ca_9(PO_4)_6$, avec un Ca^{2+} central entouré par 6 PO_4^{3-}, eux-mêmes au centre de 8 Ca^{2+}, comme représenté sur la Figure 1.22a [205]. L'arrangement est analogue à des portions de maille cristalline des apatites (Figure 1.22b), du phosphate octocalcique (OCP) ou du β-TCP [206]. Des unités sphériques de 20 à 300 nm [54] se forment par empilement dense des clusters grâce à l'eau structurale [206]. Cette quantité d'eau fortement liée a été évaluée à 10 – 16 % mass. (et 5 à 11 % mass. d'eau physisorbée) [202,207]. Dey *et al.* [167] ont visualisé par cryo-MET les clusters de Posner pour la première fois, lors de la précipitation d'ACP sur une monocouche d'acide arachidique dans une solution simulant le fluide corporel (solution SBF). Des observations AFM ont suivi, montrant des clusters stables sur un substrat de calcite [170], stabilité confirmée plus tard par des simulations dans le vide et en présence d'autres ions [208]. D'autres auteurs comme Habraken *et al.* [209] ont proposé une organisation différente des clusters de Posner, alors formés par des complexes solubles $[Ca(HPO_4)_3]^{4-}$ captant un Ca^{2+} de la solution pour précipiter en ACP sous forme de $[Ca_2(HPO_4)_3]^{2-}$. Dans ce cas, la structure se rapproche plutôt de celle de la brushite. Ces deux organisations à petite échelle de l'ACP s'alterneraient, en fonction du pH de la solution de précipitation [43].

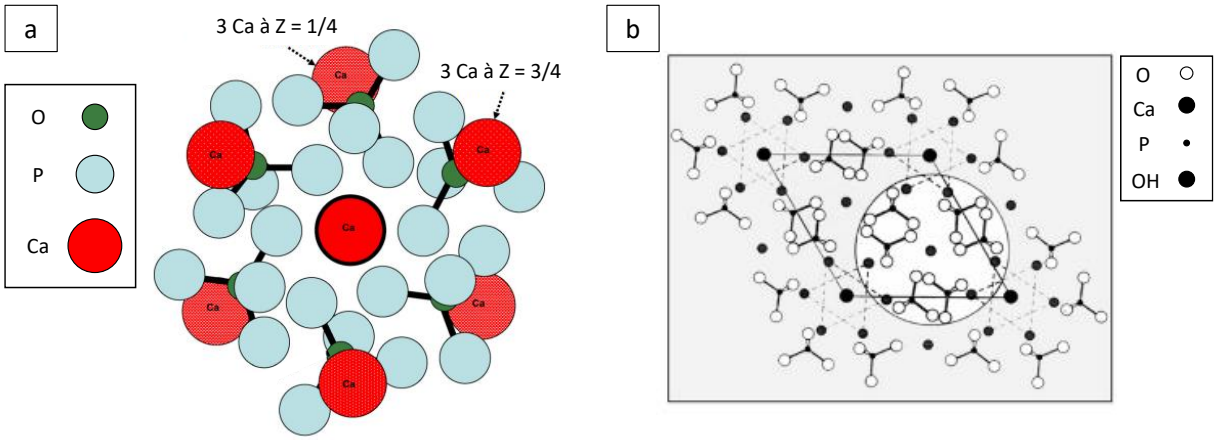


Figure 1.22 : Cluster de Posner avec une symétrie S6 (a). Pour le Ca central, 3 Ca sont superposés (en z = 0 et z = 1/2 et z = 1), et 2 groupes de 3 Ca sont positionnés en z = 1/4 et z = 3/4. Les phosphores P sont positionnés en z = 1/2. Relation du cluster avec la structure de l'apatite (b). Figures issues de Treboux et al. [205] et Combes et Rey [206].

II.2.2.1.ii Germination, cristallisation et biominéralisation

Germination et cristallisation

La formation d'HA a d'abord été décrite via une dissolution-reprécipitation de l'ACP, avec des phases intermédiaires possibles comme l'OCP [197,210,211]. Mais d'autres auteurs ont ensuite défendu une transformation à l'état solide [212–214], avec de même potentiellement des phases de CaP comme intermédiaires. La transformation pourrait s'initier par la surface, via une hydrolyse locale des ions phosphate formant des germes pour l'apatite [215]. Les deux mécanismes pourraient avoir lieu en parallèle, les conditions expérimentales favorisant l'un ou l'autre [216,217].

En ce qui concerne la germination de l'ACP (et sa cristallisation subséquente) des théories de nucléation non classique ont été proposées et développées, faisant intervenir les clusters de Posner décrits plus hauts. Dey *et al*. [167] décrivent le processus de nucléation en plusieurs étapes (illustré sur la Figure 1.23), grâce à des observations par cryo-MET d'une solution de SBF en contact avec une monocouche d'acide arachidique, mimant une surface biogénique minéralisable. Les clusters formés en solution, ici appelés clusters de prénucléation (PNC) mais sensiblement similaires aux clusters de Posner, s'agrègent en réseau peu dense stable en solution, puis s'empilent de manière compacte sur le film, formant des domaines d'environ 50 nm. Ceux-ci fusionnent alors pour former des particules d'ACP, qui croissent puis cristallisent selon la direction imposée par la surface de nucléation. Le même mécanisme est mis en évidence par AFM par Wang *et al.* [170] mais sans nécessiter de surface inductrice organique. Plusieurs auteurs s'accordent sur le rôle structural des PNC dans l'apatite, ces clusters ne se dissolvant pas (ou pas en entier) et formant les unités de base de l'apatite qui croit autour d'eux, par incorporation de Ca^{2+} et OH^- [213,218]. Il n'y a pas de consensus sur le mécanisme de transformation des particules d'ACP en HA, certains prônant la dissolution-reprécipitation [213,218,219] et d'autres la transformation à l'état solide [167,198]. Cependant, dans tous les cas les PNC sont laissés intacts (non dissouts) et se réorganisent structurellement selon le motif cristallin de l'apatite. On peut quand même noter des biais à ces études, les suivis de nucléation ayant souvent lieu dans du SBF [167], sursaturé par rapport à l'apatite et donc favorisant la formation de cette phase en particulier.

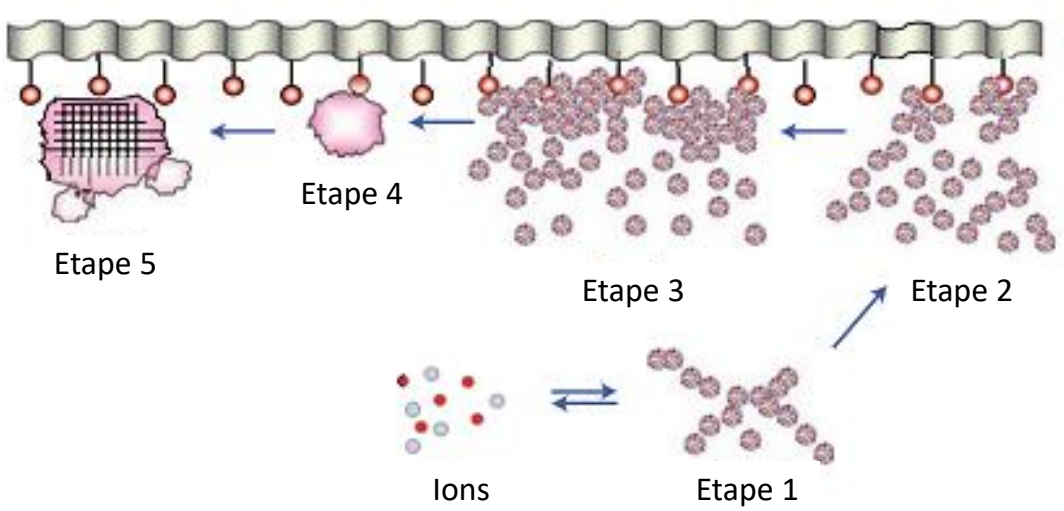


Figure 1.23 : Représentation schématique de la cristallisation de phosphate de calcium via un intermédiaire amorphe et des clusters de prénucléation, à partir d'une solution SBF et sur une monocouche. Etape 1 : faible agrégation des clusters de pré-nucléation en équilibre avec les ions de la solution. Etape 2 : Agrégation des PNC et des agrégats de PNC présents dans la solution, à proximité de la monocouche. Etape 3 : Formation d'un assemblage dense de PNC proche de la surface. Etape 4 : nucléation de particules sphériques d'ACP proches de la monocouche. Etape 5 : Développement de domaines cristallins au sein des particules d'ACP, orientés selon la surface de nucléation. Adapté d'après Dey et al. [167].

Habraken *et al.* [209] ont proposé une alternative à cette nucléation via des clusters différents de ceux de Posner (déjà évoqués plus haut). Ces complexes, de formule $[Ca(HPO_4)_3]^{4-}$, formeraient de l'HA par intégration progressive de Ca^{2+} provenant de la solution et par déprotonation concomitante des HPO_4^{2-}. De manière plus explicite, les « clusters de pré-nucléation » $[Ca(HPO_4)_3]^{4-}$ et $[Ca(HPO_4)_2(H_2PO_4)]^{3-}$ formant des entités condensées avec des liaisons hydrogène se transforment en « clusters de post-nucléation » $[Ca_2(HPO_4)_3]^{2-}$, qui s'agrègent pour précipiter des particules sphériques d'ACP. Celles-ci évoluent ensuite en OCP déficient en calcium, puis par une nouvelle intégration de Ca^{2+} forment des plaquettes d'OCP, et après une dernière intégration de calcium et une libération de proton de l'HA. Cependant, des calculs des constantes d'équilibre ont souligné la faible plausibilité de cette théorie, les complexes $[Ca(HPO_4)_3]^{4-}$ étant présents en très faibles quantités dans les conditions expérimentales utilisés [220]. Il est néanmoins intéressant d'inclure des phosphates acides dans les clusters, les paires d'ions Ca^{2+} solvaté-HPO_4^{2-} pouvant avoir un rôle dans la nucléation de particules d'ACP [209,212,221].

La présence d'une couche de solvatation autour des ions calcium et phosphate est d'ailleurs la base du concept de liquide dense proposé par Veis et Dorvee [222], phase indépendante pseudo-liquide dense (agrégat hydraté) constitué d'ions, molécules ou PNC. La formation d'un noyau cristallin peut avoir lieu au sein de cette phase [223]. Cette théorie se rapproche de celle des *polymer-induced liquid-precursor* (PILP) développée par le groupe de Gower initialement pour la précipitation des carbonates (décrite plus loin) [224], phase pseudo-liquide dense elle aussi mais formée en présence d'un polymère.

Biominéralisation

Les résultats des études *in vitro* permettent de faire des hypothèses sur le rôle de l'ACP dans la biominéralisation *in vivo*, ensuite confirmées ou infirmées expérimentalement. Là encore, aucun consensus n'est acté et les théories restent controversées [198]. Plusieurs mécanismes se confrontent concernant la minéralisation du collagène *in vivo*. Il a d'abord été supposé que l'apatite suivait une précipitation classique, par accumulation d'ions dans les espaces interstitiels entre les fibres de collagène puis germination en apatite faiblement cristallisée induite par la sursaturation de fluides par rapport à l'apatite [225,226]. Une phase amorphe a été plus tard identifiée *in vivo*, dans l'os de la nageoire nouvellement formé ou dans les vésicules intracellulaires des ostéoblastes du poisson-zèbre [227,228] ou

de souris [229], ou dans l'os trabéculaire dans des zones désordonnées de 100 à 300 nm [230], faisant reconsidérer les mécanismes de biominéralisation. Celle-ci se ferait donc par précipitation d'une phase amorphe (ACP) au sein des fibrilles de collagène, et cristalliserait ensuite en présence d'eau en plaquettes d'apatite [227]. Le confinement dans les espaces interstitiels, les groupements chargés des fibrilles de collagène et les fortes interactions entre les molécules d'eau liées fournissent des germes de cristallisation et induiraient une croissance dirigée de l'apatite [216,231–233]. Les protéines non-collagéniques (NCP) pourraient aider à l'infiltration de l'ACP dans la matrice organique en stabilisant cette phase amorphe [234,235]. Pour étayer cette théorie, certains auteurs assimilent la couche hydratée des apatites nanocristallines biogéniques (décrite dans la partie I.1.1), contenant des phosphates, du calcium et de l'eau de manière désordonnée, à une phase d'ACP enrobant un cœur apatitique en structure cœur-coquille [236]. En montrant par RMN du solide que l'apatite et l'ACP dérivent du même composé [183] ils sont en accord avec la théorie de biominéralisation via un intermédiaire amorphe.

Basé sur la théorie des PILP décrite précédemment, le groupe de Gower a fait l'hypothèse qu'*in vivo*, des NCP chargées négativement stabilisent les clusters de pré-nucléation (NCP modélisées par l'acide poly(aspartique) (pAsp) *in vitro*), formant des structures peu denses qui s'agrègent progressivement, et aux propriétés fluides d'un pseudo-liquide leur permettant d'infiltrer les fibrilles de collagène par action capillaire [237]. Cette infiltration serait facilitée par les interactions électrostatiques entre la surface négative des complexes formés et les groupements positifs du collagène. La cristallisation des agrégats par déshydratation conduirait à la formation de nanocristaux d'apatite incorporés au sein des espaces interstitiels de la matrice organique. Cette théorie est en accord avec les résultats de Mahamid *et al.* [228] ayant identifié des polyphosphates (assimilables à des NCP anioniques) à proximité des sites de néoformation osseuse *in vivo* chez le poisson-zèbre.

Une théorie alternative fait intervenir des mécanismes cellulaires initiant la biominéralisation. En effet, à l'intérieur des ostéoblastes des vésicules intracellulaires (ou granules) contenant des ions phosphate et capturant du calcium (qui est un constituant des réserves minérales) seraient transportées hors de la cellule vers la matrice extracellulaire, et disperseraient leur contenu de CaP désordonné au sein des fibrilles de collagène donnant lieu après cristallisation à une incorporation de cristaux d'apatite dans la matrice organique [229,238]. Ces granules pourraient être composées d'ACP, leur haute teneur en phosphate pouvant être liée à la présence de polyphosphates les stabilisant face à la cristallisation [229], rappelant ici les PILP décrits plus haut. Elles seraient formées dans les cellules par les mitochondries, puis transportées vers les fibrilles de collagène, la cristallisation en apatite étant extracellulaire [238]. C'est en particulier ce transport qui a été mis en évidence [229] (par quantification du calcium intra et extracellulaire). Les vésicules (« globules mitochondriales ») ont été observées par MET avec des diamètres entre 50 et 80 nm et des sous-unités plus petites (environ 10 nm) [227,229,238]. Cette théorie n'est pas incompatible avec les PILP et PNC décrits précédemment, les clusters de pré-nucléation pouvant être assimilés aux sous-unités visibles dans les globules, mais elle propose une hypothèse expliquant le rôle des cellules osseuses dans la minéralisation *in vivo*, ce qui n'est pas pris en compte dans de nombreuses études de nucléation, extrapolées à partir d'essais réalisés *in vitro* et en milieu acellulaire.

II.2.2.1.iii Synthèse des ACP

Les ACP peuvent être synthétisés par voie sèche, par trempe rapide de CaP fondus ou par bombardement d'ions à basse température [206], mais donnant des compositions variables. La synthèse en voie humide est alors la plus utilisée et privilégiée pour sa facilité de mise en œuvre. Un ACP de ratio Ca/P = 1,5 peut être formé par double décomposition de sels de calcium et de phosphate dans une solution aqueuse avec un mélange rapide des solutions suivi d'une filtration du précipité [206]. La co-

précipitation en voie aqueuse est souvent effectuée à pH proche de 10 et température ambiante, avec par exemple des solutions de nitrate de calcium et phosphate d'ammonium et des hautes sursaturations [200,217]. Avec l'addition d'éthanol dans le milieu, la constante diélectrique diminue, ce qui favorise la présence de phosphates acides [239] dans les ACP, qui ont alors une composition plus proche de l'OCP [240]. Une méthode de synthèse sol-gel d'ACP a aussi été décrite, à partir de $Ca(OEt)_2$ et de H_3PO_4 [241]. D'autres alternatives prometteuses ont récemment vu le jour, comme la synthèse « *one-pot* » d'ACP par spray-drying en une seule étape [201].

Plusieurs additifs peuvent étendre les conditions expérimentales de synthèse en stabilisant l'amorphe [206]. Parmi ceux-ci, on retrouve le magnésium [194,242–246], le carbonate [242,245], le pyrophosphate [242,245,247,248], le strontium [249] ou le citrate [250,251], ainsi que des biomolécules (ATP [243] ou autres [245]). Les mécanismes de stabilisation ne sont pas forcément clairs et sont même parfois contradictoires [198]. L'effet du magnésium est le plus décrit, il diminuerait la solubilité de l'ACP en s'incorporant dans ses particules [244], et empêcherait la germination et croissance de l'apatite en formant de fortes liaisons avec l'eau, alors non disponible pour la cristallisation [245]. Plus récemment, il a été établi que les ions Mg^{2+} adsorbés en surface des particules d'ACP bloqueraient leur cristallisation de manière plus efficace que ceux incorporés au cœur [252]. La stabilisation de l'ACP par les citrates se fait aussi via leur adsorption sur la surface [251,253]. Termine *et al.* [242] classent les propriétés stabilisatrices des ions les plus courants (en mesurant la durée de vie de l'amorphe en suspension) selon $P_2O_7^{4-}$ > Mg^{2+} > F^- >> CO_3^{2-}, pour des ratios additifs/calcium ou phosphate initiaux entre 1,0 % mol. (pour le pyrophosphate) et 60 % mol. (pour le carbonate).

II.2.2.2 Pyrophosphate amorphe (ACPP)

Le **pyrophosphate de calcium amorphe** (ACPP) a été beaucoup moins étudié et décrit que l'ACP. Il est obtenu par double décomposition d'une solution de pyrophosphate de potassium ou de sodium ($K_4P_2O_7$ ou $Na_4P_2O_7$ respectivement) et d'une solution de nitrate ou chlorure de calcium ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$ ou $CaCl_2.2H_2O$ respectivement), pour une gamme de températures large (25 – 90 °C) et un pH entre 5,8 et 7,4 [73,188]. Cet ACPP a pour formule $Ca_2P_2O_7.nH_2O$ avec *n* légèrement inférieur à 4, et il est stable à l'air à température ambiante ainsi qu'en solution à température et pH corporels (37 °C et 7,4) [73,254]. Sa grande stabilité, plus importante que celle du phosphate ou carbonate de calcium amorphes, a été attribuée par Slater *et al.* [188] à une distribution large des angles de la liaison P-O-P, empêchant la formation d'un réseau structuré nécessaire à la cristallisation. Une faible quantité d'ions pyrophosphate peut aussi s'hydrolyser avec le temps (ce qui a été observé par spectroscopie Raman [73]), formant des ions orthophosphate connus pour leurs propriétés inhibitrices de la cristallisation des pyrophosphates [188] (l'inverse étant aussi vérifié, *cf.* partie II.2.2.1.iii). Slater *et al.* ont également montré par fonction de distribution des paires (PDF) que les ACPP sont hautement désordonnés, leur ordre local n'étant que de 8 Å, n'englobant que la première sphère de coordination des ions pyrophosphate (de dimension la plus longue de 6 Å). Comme pour les ACP, des molécules d'eau sont fortement liées et stabilisent l'ACPP. Il pourrait exister des organisations cristallines à l'échelle locale au sein des amorphes, comme pour les ACP, ressemblant à des phases cristallisées. C'est ce qui a été suggéré par Gras *et al.* [176] par RMN du ^{43}Ca et ^{1}H sur deux ACPP synthétisés par co-précipitation avec des paramètres de température et pH différents, l'un ayant une structure à courte distance proche de celle du pyrophosphate de calcium tétrahydraté monoclinique (m-CPPT-β : $CaP_2O_7.4H_2O$) et l'autre de la phase monohydratée monoclinique (m-CPPM : $CaP_2O_7.H_2O$), malgré une teneur globale en eau similaire. De plus, des études récentes des groupes de M. Edén et de H. Engqvist [182,255] ont mis en évidence l'existence d'autres compositions d'ACPP dans des formulations de ciments monétite et brushite : un nouvel ACPP, anhydre (ou avec une dynamique rapide des protons, empêchant leur détection par RMN ^{1}H) s'additionne à l'ACPP hydraté déjà décrit dans la littérature, le

premier étant en proportion majeure (60 à 70 % du total d'ACPP). La question des caractérisations fines des amorphes de pyrophosphate de calcium suscite encore peu d'intérêt dans la littérature, qui manque d'informations à ce sujet. Mais au vu des études des dernières années (depuis 2019), il est possible que cela évolue prochainement.

L'ACPP est un précurseur *in vitro* des phases de pyrophosphate de calcium dihydraté (CPPD) observées *in vivo* [188]. Il est stable en solution, plus de 6 mois à température ambiante et plus de 45 minutes à 90 °C [254], mais il peut cristalliser dans des conditions de température et de pH particulières, en dimorphes dihydratés ou tétrahydratés [254,256,257]. A l'air, l'ACPP se transforme en α-$Ca_2P_2O_7$ au-delà de 500 °C [188].

II.2.2.3 Amorphes mixtes ortho et pyrophosphate de calcium

Une nouvelle famille de matériaux amorphes mixtes, constituée d'ortho et de pyrophosphate de calcium en quantités relatives variables, a été développée et brevetée au CIRIMAT en 2014 [258,259]. Ceux-ci sont synthétisés à basse température par co-précipitation en solution, à partir d'un précurseur de pyrophosphate de potassium [259] ensuite remplacé par du pyrophosphate de sodium [247], présentant moins de risques pour la santé lors de la libération des cations sodium résiduels une fois implanté. La cristallisation est inhibée par des aspects cinétiques (l'étape de lavage est cruciale) [259] mais surtout par la coexistence des espèces pyro et orthophosphate, ayant un effet inhibiteur réciproque sur la formation de leurs phases cristallines respectives [247,260]. Le solide amorphe est composé d'une agrégation de colloïdes d'ortho et pyrophosphates de calcium hydratés, dont la cohésion est assurée par l'eau interstitielle contenant des ions sodium ayant un rôle important dans sa structuration [247]. A partir de dosages chimiques quantifiant les espèces contenues, une formule générale a été proposée pour ces matériaux [247] : $[(Ca^{2+}_y\ Na^{+}_z H^{+}_{3+x-2y-z})(PO_4^{3-})_{1-x}(P_2O_7^{4-})_x].(H_2O)_u$. Le ratio ortho/(ortho+pyro) des matériaux finaux peut être ajusté à partir du ratio initial en solution, et il détermine le comportement de ceux-ci lors de leur évolution dans différents milieux (eau, solution SBF, avec PAL) [247,261,262]. Cette étude met donc en évidence le rôle d'inhibiteur de cristallisation du pyrophosphate, stabilisant efficacement l'orthophosphate de calcium dans des compositions mixtes, ce qui permettrait, en fonction du ratio ortho/(ortho+pyro) choisi, de moduler la vitesse de dégradation *in vitro* et *in vivo* du biomatériau via l'hydrolyse du pyrophosphate entre autres par la PAL.

II.2.3 Carbonate de calcium amorphe (ACC)

Les ACC revêtent un intérêt particulier pour la substitution osseuse, de par leur grande réactivité et la possibilité de contrôler leur cristallisation. Mais pour cela, la compréhension de leur structuration et de leur formation en solution aqueuse est nécessaire. Ces sujets ont émergé dans la littérature depuis une vingtaine d'années, en particulier dans l'optique de comprendre les processus de biominéralisation, dans lesquels l'ACC semble jouer un rôle important [263].

II.2.3.1 Organisation à petite échelle : ACC biogéniques et synthétiques

Malgré son absence d'ordre à longue distance, il a été montré que le **carbonate de calcium amorphe** biogénique ou synthétique peut présenter un ordre à courte distance, à l'échelle d'une dizaine de nanomètres, ne pouvant donc pas être détecté par diffraction des rayons X classique, comme l'atteste son diffractogramme caractéristique sur la Figure AI.1a (Annexe AI.1). Cette structuration est très dépendante de l'espèce (pour les ACC biogéniques) ou des conditions de synthèse (pour les ACC synthétiques).

ACC biogéniques

Le carbonate de calcium amorphe a été identifié dans de nombreux organismes vivants. On peut le retrouver entre autres sous forme hydratée stable dans des spicules d'ascidie ou de corail, des carapaces de crustacés, ou des cystolithes [q] de feuilles [80,172]. Il a généralement un rôle de renfort mécanique/composant structural, ou de stockage temporaire de $CaCO_3$, transporté à l'endroit voulu sous forme amorphe avant qu'il ne forme rapidement des cristaux de CC, et ce facilité par la grande solubilité de l'ACC [80,263]. Il contient environ une molécule d'eau par molécule de carbonate de calcium (soit 15 % mass.) [80,172,264]. Mais il existe aussi des formes transitoires anhydres (dans les larves d'oursin de mer par exemple) [80,265,266], intermédiaires de formation des phases cristallines de calcite [265,267] ou d'aragonite [268–270]. *In vivo*, les ACC sont stabilisés par des macromolécules [266,271,272], des ions magnésium [172,266,271], silicate [273] ou phosphate [172,274].

L'existence d'un ordre local dans un ACC biogénique a été mise en évidence pour la première fois dans des cystolithes de Ficus par spectroscopie EXAFS au seuil K de Ca, soulignant la distribution réduite du nombre d'atomes et de leur distance moyenne dans les deux premières sphères de coordination du calcium [275]. Une concordance des distances interatomiques dans les premières couches de coordination du Ca des coquilles d'embryons d'escargot d'eau douce a été montrée avec celles de l'aragonite par EXAFS [268,269]. Plus tard, trois ACC biogéniques provenant d'espèces différentes (spicules d'ascidie, carapace d'un homard, cystolithes extraits de l'épiderme de feuilles) ont été analysés par EXAFS et XANES, révélant des organisations différentes au niveau des sphères de coordination de l'ion calcium [172] : l'ACC provenant des spicules ou de la carapace a une organisation à courte distance ressemblant à la calcite monohydratée, tandis que celui des cystolithes est hétérogène et pourrait contenir plusieurs phases. On retrouve aussi par XANES un ordre local similaire à la calcite dans les spicules d'embryons d'oursin de mer [265]. Il faut noter que la vatérite n'a actuellement pas encore été caractérisée avec certitude dans la biominéralisation [263]. Toutes ces différences structurales ont conduit Addadi *et al.* [80] à décrire les ACC biogéniques stables ou transitoires comme une famille de phases, ayant une structuration locale à l'échelle de 8 Å [80]. Néanmoins, Fernandez-Martinez *et al.* [276] ont relevé que le rôle des impuretés ou ions présents dans les ACC biogéniques n'est pas pris en compte dans ces études, or il peut avoir une grande influence sur leur structuration, tout comme l'eau dont les quantités peuvent varier. Il peut alors être inexact de parler de « polyamorphisme » pour des phases n'ayant pas la même composition.

ACC synthétiques

Gebauer *et al*. [179] sont les premiers, en 2010, à révéler l'existence d'un polyamorphisme au sein d'ACC synthétique sans additif par RMN du ^{13}C et EXAFS au seuil K de Ca. Par une synthèse réalisée en présence d'éthanol à deux pH différents (8,75 et 9,80), deux composés distincts sont obtenus, alors appelés ACC proto-calcite (pc-ACC) et proto-vatérite (pv-ACC) respectivement. Leurs spectres RMN acquis en rotation à l'angle magique (MAS) présentent un décalage de leur maximum, et la position de ce dernier est identique à la position de la résonance de la calcite et de la vatérite respectivement, comme présenté sur la Figure 1.24a. Des différences sont aussi observées sur les spectres infrarouges, avec la présence de deux sites CO_3^{2-} pour pv-ACC et un seul pour pc-ACC, en particulier visible pour bande v_1CO_3 (Figure 1.24c), mais corrélés avec les bandes de la vatérite et de la calcite (Figure 1.24d). De surcroit, les spectres EXAFS du calcium vérifient les similarités d'environnement local entre pv-ACC et vatérite et pc-ACC et calcite (Figure 1.24b). Le même groupe a par la suite obtenu un ACC proto-aragonite (pa-ACC), coexistant avec le pv-ACC, par le même type de synthèse que celui-ci (pH de 9,80

[q] Poches de cristaux inorganiques de carbonate de calcium, formées dans des cellules spécialisées de certaines feuilles.

et en présence d'éthanol) mais pour une température de synthèse supérieure à 45 °C [277]. La structure proto-cristalline a été confirmée par RMN MAS du ^{13}C, la résonance de pa-ACC mesurée étant déconvoluée en une bande de même position que celle de l'aragonite et une autre que celle de la vatérite (de ratio respectif 2:1), et par spectroscopie FTIR par l'apparition au-delà de 45 °C d'une bande associée à la vibration ν_1CO_3, vibration possible seulement dans l'aragonite par la symétrie de ses groupements carbonate. A la différence des autres ACC proto-cristallins, l'eau semble jouer un rôle clé dans la formation de pa-ACC, comme l'atteste la présence d'une bande liée à la vibration de l'eau dans le spectre FTIR.

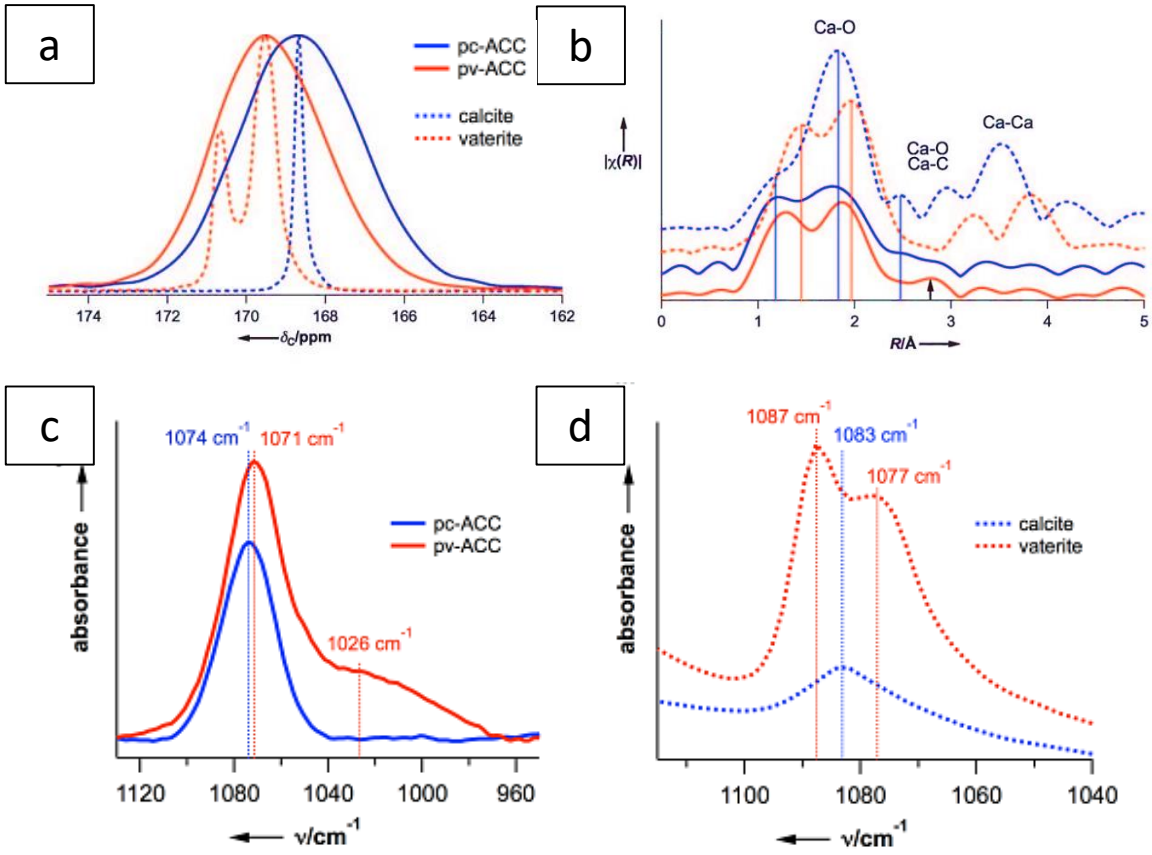


Figure 1.24 : Spectres issus de diverses techniques du pc-ACC (bleu, traits pleins), de la calcite (bleu, traits pointillés), du pv-ACC (rouge, traits pleins) et de la vatérite (rouge, traits pointillés). Spectre RMN MAS du ^{13}C (a) ; transformée de Fourier du spectre EXAFS au seuil K de Ca (b), tracé en fonction de la distance interatomique R, avec des indications des pics attendus pour les interactions de la première couche de coordination ; spectres d'absorption infrarouge centrés sur la vibration ν_1CO_3 des pv-ACC et pc-ACC (c) et des équivalents cristallins vatérite et calcite (d). Issu de Gebauer et al. [179].

Fernandez-Martinez *et al.* [125] ont également démontré la formation d'un composé proto-aragonite, suivie par modélisation Monte Carlo inversée (*Reverse Monte Carlo*, RMC) basée sur des données de diffraction des rayons X sous pression. Sous l'effet de la pression, la transition d'une phase amorphe désordonnée (ayant des similarités avec la vatérite et la calcite) vers une phase amorphe proto-aragonite est observée (autour de 10 GPa), ce qui est corrélé avec l'obtention d'une seule bande du mode de vibration ν_4CO_3 en spectroscopie Raman. L'aragonite étant le polymorphe le plus stable à hautes pressions, cette structuration n'est pas surprenante ici.

D'autres structures proto-cristallines ont été mises en évidence en présence d'additifs, proto-calcite avec du citrate (PDF) [278], proto-vatérite avec l'acide poly(aspartique) (EXAFS) [279] ou proto-aragonite avec des ions Mg^{2+} (EXFAS) [279] par exemple. Néanmoins, certaines structures proto-cristallines identifiées dans les ACC sans additif ne sont assimilables à aucune phase cristalline [173,280]. En revanche,

toutes les structures proto-cristallines sont locales, sur des échelles de l'ordre de 10 – 15 Å [173,185,280,281]. Ces résultats sont cependant à considérer avec prudence. En effet, lorsqu'une structuration à petite échelle est identifiée, elle est assimilée à son équivalent cristallin via des techniques comme la RMN du solide, la spectroscopie EXAFS ou la PDF, qui présentent des différences subtiles entre les données des différents polymorphes de CC (calcite, vatérite, aragonite, MHC), ce qui rend parfois l'assimilation hasardeuse par manque de données expérimentales [173,276,282,283]. De plus, la structure de la vatérite n'est toujours pas résolue avec certitude, induisant potentiellement des erreurs de modélisation de son organisation locale [282].

La modélisation a permis de proposer d'autres types d'organisation à l'échelle nanométrique, d'abord par Goodwin *et al.* [187] en 2010. En se basant sur une méthode RMC appliquée à des données de diffusion des rayons X sur un ACC sans additif, ils conçoivent un modèle constitué d'une structure nanoporeuse associant des régions hydratées riches en calcium et des canaux interconnectés dépourvus de calcium mais riches en eau et en carbonate. Il a ensuite été montré que ce modèle avec séparations de charges n'est pas stable [175], et que les distances caractéristiques du modèle, de l'ordre du nanomètre, ne sont pas accessibles aux techniques de diffusion des rayons X comme celles utilisées [276]. Très récemment, un autre modèle multi-échelle a été proposé par Clark *et al.* [117], aussi par le biais d'une méthode RMC mais cette fois basée sur des données de diffusion des neutrons en plus des rayons X, et associé à de la microscopie électronique en transmission. L'analyse de la PDF de l'ACC précipité à haut pH a mis en évidence la présence de nanodomaines cristallins anhydres de 2 nm, assemblés au sein d'un réseau de molécules d'eau interstitielles. C'est cohérent avec la présence de sous-entités structurales de rayon de giration de 3 nm identifiées sur le spectre diffusion des neutrons aux petits angles (SANS). Ces sous-entités sont agrégées au sein de particules de 55 nm (SANS et MET), elles-mêmes agrégées en particules plus grosses. La structuration multi-échelle est illustrée sur la Figure 1.25. Des modélisations de dynamique moléculaire ont validé la stabilité d'un tel modèle, ne se désintégrant pas lors de la mise en contact (virtuelle) avec une interface d'eau. Il n'a cependant pas été réalisé de dosage sur ces ACC, pouvant potentiellement contenir, par le fait d'un faible lavage, d'importantes traces de contre-ions comme le sodium. Or ce dernier pourrait jouer un rôle important dans une telle structuration multi-échelle, comme il l'a été montré pour des matériaux mixtes pyro/orthophosphates [247].

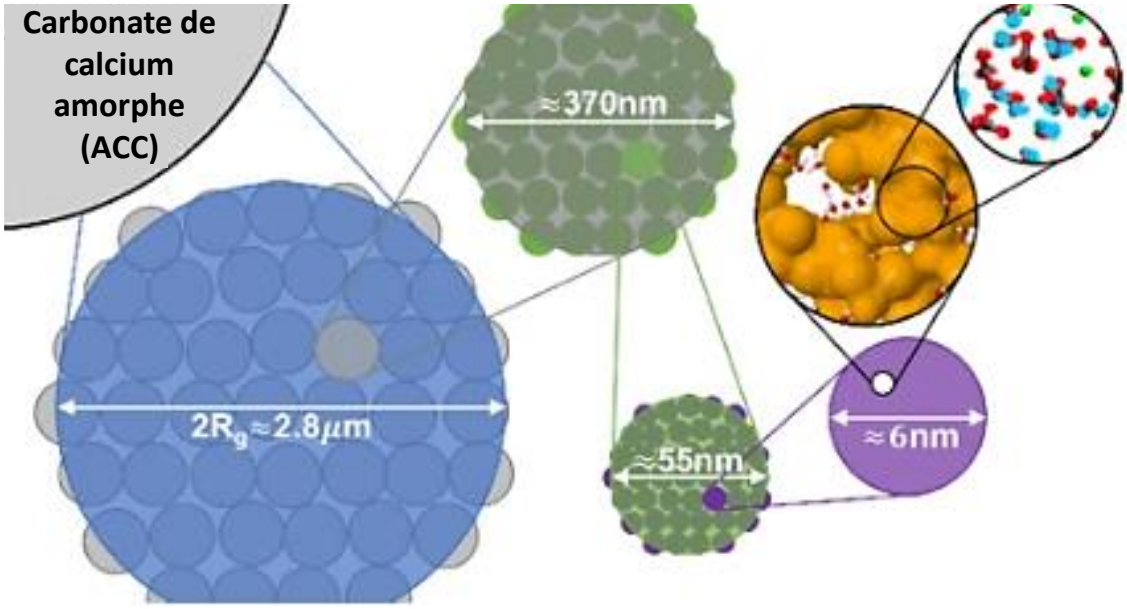


Figure 1.25 : Schéma de l'organisation hiérarchique de l'ACC précipité rapidement et à haut pH, mis en évidence par les analyses de diffusion des neutrons aux très petits, petits et grands angles. Adapté de Clark et al. [117].

II.2.3.2 Théories de la germination et croissance cristalline

Germination

Les mécanismes de formation de l'ACC sont encore débattus, ils dépendraient entre autres de ses conditions de synthèse. Deux théories majeures se confrontent : la théorie classique de la nucléation (CNT), dans laquelle la germination et croissance ont lieu par addition d'espèces monomériques aux nucléi, régie par les énergies libres de surface et de cœur et suivant les règles de thermodynamique ; et la théorie de nucléation non classique, prenant en compte une grande variété d'espèces (clusters de pré-nucléation (PNC), phases denses liquides, PILP) avant la transformation en polymorphe cristallin [171].

Le mécanisme classique de germination de l'ACC [284,285] est contrôlé soit thermodynamiquement, avec une nucléation préférentielle de l'ACC due à la plus faible énergie de surface de ses particules comparée à celles des CC cristallins [193], soit cinétiquement, avec une plus faible barrière d'énergie pour la germination de l'ACC et donc une germination plus rapide [286]. Les petites particules d'ACC s'agglomèrent et grossissent, réduisant leur ratio surface/volume en augmentant en stabilité [192] jusqu'à dépasser l'énergie de surface des polymorphes cristallins et ainsi initier la cristallisation [287,288]. La croissance des cristaux s'effectue alors par addition d'atomes, molécules ou ions à leur surface.

La première voie de nucléation non classique est apparue avec les PILP (*polymer-induced liquid precursors*) proposés par Gower et Odom [224] en 2000. Dans cette étude, un film fin de calcite est déposé sur un substrat de verre en présence d'une faible quantité d'acide aspartique via un intermédiaire amorphe. Il est alors montré que la présence du polymère induit une séparation de phase liquide-liquide de la solution de carbonate de calcium. D'autres études confirment cette décomposition, en une phase liquide peu concentrée et une phase liquide dense de $CaCO_3$ composée de gouttelettes, avec [289–291] ou sans [291–295] polymère. Une autre théorie a ensuite émergé, s'appuyant sur les clusters de pré-nucléation (PNC) stables de Gebauer *et al.* [162] d'abord mis en évidence par ultracentrifugation analytique puis observés en cryo-MET [168] et SAXS [186,296]. Ces entités de 2 nm sont composées de paires d'ions et ont une structure pseudo-liquide dynamique similaire aux polymères oxyanioniques (*dynamically ordered liquid-like oxyanions polymers*, DOLLOP), dans laquelle les ions Ca^{2+} et CO_3^{2-} alternés ainsi que les paires d'ions $CaCO_3$ s'attachent et se détachent rapidement pour former des combinaisons de chaines linéaires, des anneaux et occasionnellement des structures ramifiées [263,297,298]. Autrement dit, ce sont des clusters désordonnés avec une topologie propre qui peuvent spontanément permuter pour une autre topologie avec la même énergie libre. Les mécanismes en jeu dans cette voie de nucléation sont présentés sur la Figure 1.26 [299]. Les paires d'ions Ca^{2+}-CO_3^{2-} apparaissent spontanément grâce à la grande solvatation des ions [298] (Figure 1.26A) et ensuite en se déshydratant forment les PNC (Figure 1.26B), structurés en DOLLOP en équilibre avec des ions libres [299,300]. Quand un certain produit d'activité ionique est atteint, la dynamique des PNC chute et une décomposition liquide-liquide binodale ou spinodale [r] a lieu, conduisant à la formation d'une solution faiblement concentrée et d'une phase dense liquide (Figure 1.26C). Cette dernière est sous forme de nanogouttelettes de carbonate de calcium hautement hydratées et provient de l'agrégation des PNC [291,293,299,301]. La phase dense de $CaCO_3$ peut être stabilisée par le biais d'interactions électrostatiques avec des additifs, par exemple le magnésium [302], le citrate [282,303,304], l'ovalbumine [292] ou des polymères. Dans ce cas particulier, la phase riche en soluté peut être assimilée aux PILP décrits plus tôt [292,305], ayant des caractéristiques pseudo-liquides dues à la petite taille des clusters, leur haut contenu en eau et la répulsion entre les polymères [290,299]. Des exemples ont été

[r] La séparation de phases est binodale quand elle a une certaine barrière d'énergie et spinodale lorsqu'elle est spontanée [299].

donnés avec l'acide poly(aspartique) (pAsp) [224,290,291,299,306] ou l'acide poly(acrylique) (PAA) [299], ne modifiant pas la limite binodale liquide-liquide mais stabilisant les nanogouttelettes colloïdales ou les paires d'ions [299,306]. Par la suite, les nanogouttelettes commencent à s'agréger pour réduire leur surface interfaciale, formant ainsi un ACC proto-structuré hautement hydraté (Figure 1.26D) [263,299]. Enfin, des particules d'ACC solide, avec différents contenus en eau, sont formées par déshydratation et solidification (Figure 1.26E) [299]. Malgré quelques études expérimentales et des simulations de dynamique moléculaire contestant l'existence des PNC et leur rôle dans la formation de l'ACC [284,307], le nombre d'articles abondant dans le sens de la théorie de la nucléation non classique publiés dans les dix dernières années en fait une explication prometteuse pour décrire la formation de l'ACC dans les solutions de carbonate de calcium. On peut néanmoins relever que l'influence de mélange (vitesse, mode de mélange) sur la germination est très rarement évoqué, pouvant pourtant avoir un impact sur les espèces mises en jeu et leur formation [308].

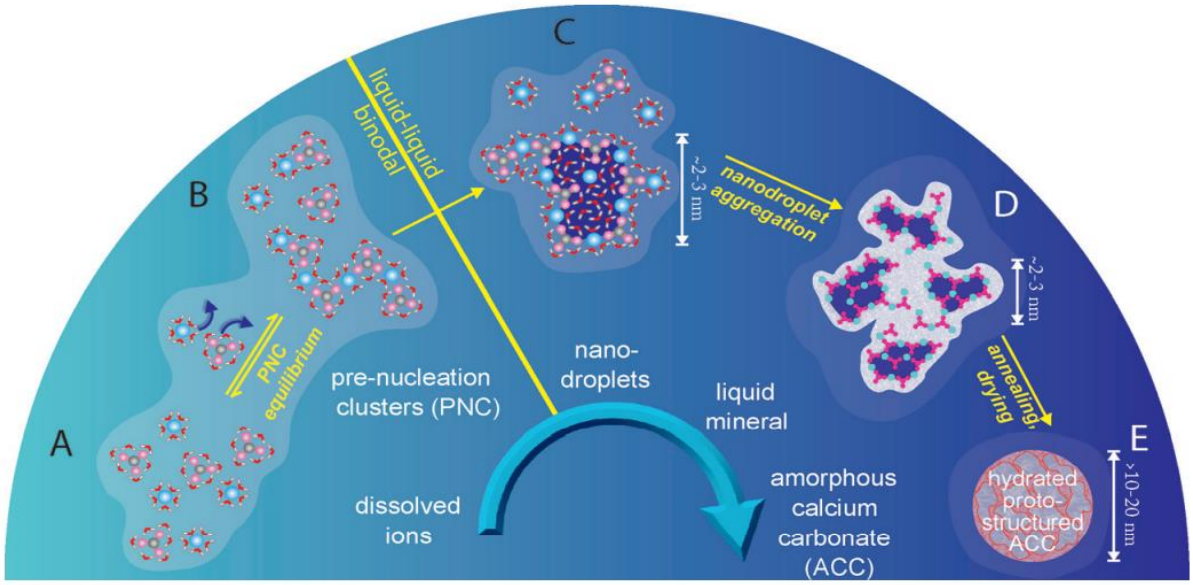


Figure 1.26 : Voie de nucléation non classique, faisant intervenir les clusters de pré-nucléation. Les ions calcium (bleu) et carbonate (rose/gris) fortement hydratés en solution (A) forment des paires d'ions puis en se déshydratant partiellement des clusters de pré-nucléation (PNC) (B). La séparation de phases liquide-liquide a lieu en franchissant la limite binodale, créant une phase dense sous forme de nanogouttelettes de $CaCO_3$ hautement hydratées (provenant des PNC, en bleu foncé) et une phase de faible densité environnante (C). Ces gouttelettes de $CaCO_3$ dense (bleu foncé) s'agrègent (D), puis, par déshydratation, les particules d'ACC hydraté et proto-structuré sont formées (E). Issu de Sebastiani et al. [299]

Cristallisation

La question du mécanisme de la cristallisation de l'ACC est également toujours discutée, celle-ci pouvant avoir lieu par transformation à l'état solide ou dissolution-reprécipitation de l'ACC. Le paramètre déterminant du choix du mécanisme est la présence d'eau dans l'environnement de cristallisation [309] : en l'absence d'eau fortement liée, la transformation à l'état solide est favorisée, et dans le cas opposé la dissolution-reprécipitation a lieu.

La transformation à l'état solide est nécessairement précédée par une déshydratation de l'ACC. Celle-ci, facile au début grâce à la mobilité des molécules d'eau, devient de plus en plus difficile au cours de sa progression du fait des liaisons hydrogène entre l'eau et les carbonates [191,310]. Il était initialement pensé que le processus de déshydratation était favorable thermodynamiquement en raison de la plus grande enthalpie des particules hydratées par rapport aux anhydres [311]. Mais il a depuis été montré que c'est en fait l'opposé, les particules déshydratées possèdent la plus haute enthalpie [280], ce qui rend le processus de déshydratation défavorable [185,191,310] et suggère la nécessité de facteurs externes pour

induire celle-ci, comme une élévation de température [280,295] ou de pression [312]. La déshydratation permet la réorganisation des unités de $CaCO_3$ [287,309,313,314], ce qui est impossible en présence de molécules d'eau limitant leur mobilité [310,313]. Récemment, la cristallisation par transformation à l'état solide d'un ACC contenant du magnésium a été confirmée par MET *in situ* en phase liquide [315] et par RMN MAS du ^{13}C *in situ* en solution aqueuse [184], mais étonnamment il a été montré dans ce dernier article que la particule amorphe se transformant reste hydratée durant le processus et qu'une couche hydratée se forme à sa surface, assurant des échanges ioniques dynamiques pendant les réorganisations des CC dus à la cristallisation. Ce mécanisme de cristallisation pourrait être favorisé par la présence d'additifs, entre autre le magnésium [315], et être le mécanisme dominant pour la transformation d'ACC biogénique en calcite ou aragonite lors de la biominéralisation [80,263].

L'autre mécanisme de cristallisation des ACC est la dissolution-reprécipitation, observée par exemple par MET *in situ* [164,315], SAXS/WAXS [316,317] ou traçage isotopique [318]. C'est le mécanisme dominant en solution [309], ce qui semble en accord avec sa haute solubilité, mais il peut aussi avoir lieu hors solution en contact avec de l'air humide, la dissolution étant dans ce cas initiée par la couche hydratée (d'environ 1 nm) formée à la surface des particules [295,319]. La dissolution induit une sursaturation par rapport aux phases cristallines et donc une reprécipitation de CC cristallisé [309]. La cinétique de dissolution influence la sursaturation en solution et ainsi le polymorphe cristallin obtenu. En particulier, la taille des particules d'ACC a une influence : les petites particules se dissolvent vite et forment plutôt de la vatérite, tandis que les grosses ont tendance à former de la calcite [320]. Mais d'autres facteurs entrent aussi en jeu, tels que le degré d'hydratation des ACC [295] ou les conditions de cristallisation (comme le pH [162,317] ou le solvant [283,321] par exemple). Enfin, si la phase cristalline obtenue est laissée à évoluer en solution, en l'absence d'additifs la phase la plus stable thermodynamiquement (*i.e.* la calcite) finit par être formée [322,323].

Il est probable que les deux mécanismes aient lieu simultanément [164,178]. Selon Ihli *et al.* [324], la germination de la première phase cristalline a une très grande barrière énergétique due à la nécessité de sa déshydratation préalable à l'air, si bien que sa formation ne peut avoir lieu que par dissolution-reprécipitation partielle, qui aurait probablement lieu en surface ou dans des domaines contenant de l'eau piégée. Une fois la cristallisation initiée, elle pourrait se poursuivre par transformation solide et réorganisation des carbonates de calcium rendue possible par la déshydratation. De plus, on retrouve parfois des similarités entre la structure à courte distance de l'ACC initial et le polymorphe cristallin formé [279], laissant penser que la dissolution ne pourrait être que partielle, et que les motifs de l'ACC seraient conservés [276].

La Figure 1.27 résume les différents mécanismes de germination et cristallisation de l'ACC détaillés dans tout ce paragraphe II.2.3.2.

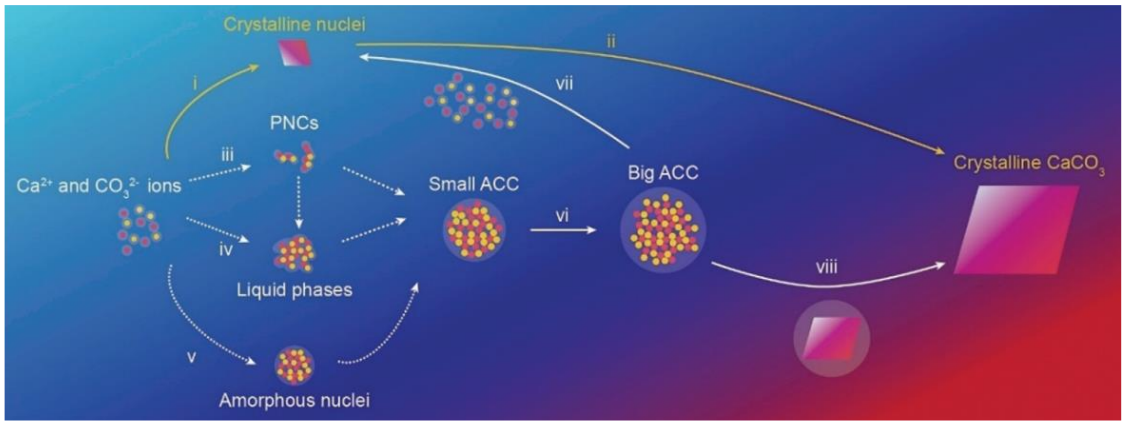


Figure 1.27 : Schéma récapitulatif des principaux mécanismes proposés pour la germination et la cristallisation de l'ACC, à partir d'une solution contenant des ions Ca^{2+} et CO_3^{2-}. Des noyaux cristallins peuvent se former (i) et croître en de gros cristaux (ii) par addition d'ions sur leur surface, en accord avec la CNT. Mais généralement l'ACC est la première phase à se former, via des mécanismes issus de la théorie non classique de la nucléation : formation de clusters de pré-nucléation (PNC) (iii), s'agrégeant en phases liquides (iv) et/ou en petites particules d'ACC ; séparation de phase liquide-liquide formant une phase riche en soluté (iv) (cf. PILP), donnant des particules d'ACC en se déshydratant. Des noyaux d'ACC peuvent être directement formés depuis la solution aqueuse (v). Les petites particules d'ACC croissent (vi) jusqu'à leur transformation en cristaux, pouvant avoir lieu par dissolution-reprécipitation (vii) ou par transformation à l'état solide (viii). Issu de Du et Amstad [309].

II.2.3.3 Rôle de l'eau

L'eau a souvent été décrite comme un des stabilisateurs pour l'ACC. L'ACC biogénique stable est hydraté et contient approximativement 15 % mass. d'eau, donc avec une composition $CaCO_3.H_2O$, qui empêche la réorganisation en une phase anhydre cristalline [80,172,264,265]. La plupart des ACC synthétiques contiennent entre 11 et 22 % mass. d'eau, *i.e.* de 0,7 à 1,6 molécule d'eau pour un motif carbonate [147,276,280,324,325]. L'eau est fortement liée aux atomes de calcium [166,173,185,324], et une modélisation de dynamique moléculaire a conclu que toutes les molécules d'eau sont liées à au moins un carbonate avec au moins une liaison hydrogène (car plus favorable qu'entre deux molécules d'eau), et que 90 % d'entre elles sont impliquées dans des liaisons de coordination H_2O-Ca^{2+} [326]. Ces liaisons hydrogène causent des distorsions des carbonates dans le plan (éloignement de C du triangle O_3), bloquant le réarrangement des ions et ainsi stabilisant l'ACC [313].

La question de la répartition spatiale des molécules d'eau dans l'ACC est encore sujette à débats, malgré les différentes études de RMN et modélisations moléculaires s'y intéressant. Par méthode RMC, Goodwin *et al.* ont d'abord proposé un modèle d'un réseau percolant d'eau, avec une distribution spatiale inhomogène [187]. La matrice riche en calcium et nanoporeuse contiendrait des molécules d'eau interagissant fortement avec les ions Ca^{2+} et avec une faible mobilité, ainsi qu'un réseau de pores remplis par les ions CO_3^{2-} et des molécules d'eau, peu liées et très mobiles. Deux types de molécules d'eau sont ainsi identifiées, que l'on peut qualifier de « structurales » et « mobiles ». C'est en accord avec les résultats issus de RMN du ^1H, montrant deux types de molécules d'eau avec des mobilités différentes [173] ou de l'ATG, pour laquelle l'eau plus mobile s'évapore à une température plus basse que l'eau plus liée [327]. L'existence de deux types de molécules d'eau avec des mobilités différentes est communément admise [166,173,191], au contraire des canaux du modèle de Goodwin dont les dimensions sont controversées [175,326]. Schmidt *et al*. [185] ont approfondi la RMN du proton pour proposer deux composantes supplémentaires : en plus des molécules d'eau à mobilité limitée et de celles mobiles « pseudo-fluides découplées des H et des C rigides », ils identifient des molécules d'eau « structurelles rigides à la translation » et des hydroxydes rigides (aussi identifiés par Michel *et al.* [173]). A celles-ci peuvent éventuellement s'ajouter une composante acide correspondant aux HCO_3^- selon le pH de la réaction [324]. Lorsque la température augmente et que la déshydratation de l'ACC se produit, les composantes d'H_2O les moins mobiles et les plus mobiles sont éliminées simultanément, mais

l'hydroxyde reste jusqu'à une haute température et la cristallisation [185]. En revanche, selon Jensen *et al.* [326], comme les molécules d'eau sont pour la plupart impliquées dans des liaisons avec le calcium et le carbonate, il est plus judicieux de parler plus globalement d'eau structurale (sans subdiviser en plusieurs catégories), dont les différents environnements des liaisons hydrogène induisent des différences de mobilité, constatées dans les études RMN citées précédemment. Leur modèle reste néanmoins issu de modélisations moléculaires et donc théorique, à la différence des RMN expérimentales [326]. Il est possible que les molécules d'eau mobiles forment un réseau percolant, si le niveau d'hydratation de l'ACC est assez élevé [191], mais c'est contredit par certaines études [117,326]. D'autres analyses RMN font état d'une distribution homogène des molécules d'eau autour des carbonates (sans que ceci soit totalement contradictoire avec le modèle de Goodwin [187]), ce qui expliquerait plus facilement la distorsion de ces derniers du fait des liaisons hydrogène [179,280,313] ; ou d'eau interstitielle fortement liée entourant des clusters anhydres [117]. On notera à propos que la répartition spatiale des molécules d'eau que l'organisation des ACC sous forme de clusters proto-cristallins anhydres implique nécessairement est très peu discutée, et le rôle de l'eau dans la cohésion inter-cluster peu décrit. Si les modèles de répartition des molécules d'eau dans l'ACC divergent, le rôle stabilisateur qu'elles jouent est en outre certain.

II.2.3.4 Synthèse et additifs

L'ACC synthétique peut être préparé en l'absence ou en présence d'additifs, et par différentes voies de synthèse. Celles-ci seront décrites succinctement (sans additif), puis les additifs usuels seront présentés.

Synthèse

De la même manière que pour les CC cristallins (paragraphe II.1.2), différentes voies de synthèse peuvent conduire à la formation d'ACC, comme du CO_2 bullant dans une solution de $Ca(OH)_2$ [79] (pouvant entre autres provenir de la décomposition du carbonate d'ammonium solide dans un dessiccateur [321,328]). La voie la plus utilisée est néanmoins la voie biomimétique par co-précipitation d'une solution de sels de chlorure ou nitrate de calcium et de carbonate de sodium [97,173,178,185,280,320,329–331]. L'ACC est la première phase à précipiter quand la sursaturation de la solution dépasse son produit de solubilité [88,279], mais il cristallise rapidement en solution. L'enjeu ici est d'assurer sa stabilisation face à la cristallisation. Pour cela, différentes stratégies ont été mises en œuvre (en parallèle de l'introduction d'additifs stabilisateurs, abordée plus tard). La première est l'augmentation du pH, les ions HO^- étant décrits dans la littérature comme stabilisateurs de l'amorphe [282,325,332]. Ceux-ci sont incorporés dans l'ACC [173,282,325], créant une diminution de sa solubilité [321] ainsi qu'une augmentation de la sursaturation, et par conséquent une diminution de la taille des particules [320]. Or des particules plus petites sont plus stables en température car elles ont un ratio surface/volume plus grand [320]. Un ACC synthétisé à pH plus élevé voit donc une augmentation de la température de cristallisation du composé sec (mesurée par ATD ou DSC) [185,282,333]. Le pH de la solution mère peut aussi influer sur la proto-structuration des ACC (pc-ACC à un pH de 8,75 et pv-ACC à un pH de 9,80) [179]. Une température de synthèse basse (0 – 4 °C) est parfois couplée au pH élevé, permettant de bloquer cinétiquement la cristallisation et d'obtenir un ACC pur [329,331,333]. L'ajout d'un solvant comme l'éthanol dans l'eau est une autre alternative, affectant la solubilité de l'ACC et la sursaturation de la solution, et permettant d'isoler l'ACC insoluble [179,321,334]. Le choix du solvant peut également influer sur la structure proto-cristalline obtenue, si l'un des polymorphes cristallins y est stabilisé (comme la vatérite dans l'isopropanol [144] par exemple). L'ACC forme des particules sphériques de taille variable selon la synthèse, regroupées en agrégats, visibles sur les Figures 1.28a et 1.28b. Le spectre d'absorption infrarouge caractéristique de l'ACC est présenté sur la Figure AI.2a (Annexe AI.2).

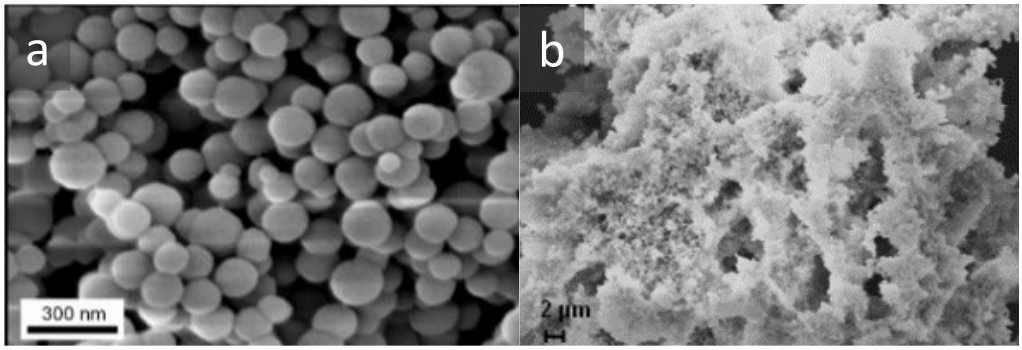


Figure 1.28 : Images MEB de la morphologie classique des particules d'ACC, de forme sphérique et regroupées dans des agrégats. Images issues de Rodriguez-Blanco et al. [331] (a) et de S. Tadier [130] (b).

D'autres voies de synthèses moins courantes ont permis l'obtention d'ACC, comme le spray-drying [166,335], dans lequel le séchage très rapide permet de freiner ou stopper l'évolution vers une phase cristalline ; ou une co-précipitation très rapide, liée au mélange des solutions de Ca^{2+} et CO_3^{2-} par rupture d'un film de polyéthylène les séparant initialement, rupture produite par une bille d'acier lors de la centrifugation de l'ensemble [117,336].

Additifs

De nombreux additifs sont présents naturellement dans les ACC biogéniques, autant dans les roches géologiques que dans les organismes marins. Les macromolécules jouent un rôle clé sur la sélection du polymorphe cristallin mais aussi pour la stabilisation de la forme amorphe, et certains ions ont également montré une influence sur la biominéralisation.

En premier lieu, les macromolécules, qui sont riches en acide glutamique et glutamine [80,266,271], induisent *in vitro* et en association avec des ions Mg^{2+} la formation d'ACC [266,271], laissant supposer qu'elles peuvent contrôler le polymorphe obtenu *in vivo* dans les spicules d'oursins [266] ou le squelette des ascidies [271]. Le magnésium est un élément clé de la biominéralisation : présent dans de nombreuses calcites biogéniques mais aussi en proportions variables dans l'ACC biogénique (ratio $Mg^{2+}/(Mg^{2+}+Ca^{2+})$ entre 0 et 26 % mol. selon les espèces [337]), il stabilise cette dernière phase face à la cristallisation par une distorsion de la structure atomique locale du $CaCO_3$ [338]. Les ACC biogéniques contiennent aussi des quantités variables de phosphates (ratio $PO_4^{3-}/(Mg^{2+}+Ca^{2+})$ de 5 à 55 % mol. [337]) agissant probablement de pair avec les ions magnésium dans la stabilisation de l'amorphe [338]. Il a été montré par RMN que les ions phosphate sont répartis de manière homogène dans la matrice d'ACC dans des cuticules de homard [274] ou des gastrolithes d'écrevisse [339], la stabilisant potentiellement par gêne stérique [274]. Dans une étude récente, Ajili *et al.* [340] ont découvert la présence d'une phase mixte de phosphate et carbonate de calcium amorphe aux premiers stades de développement de la coquille larvaire d'ormeau, suggérant un précurseur commun, évoluant ensuite vers une phase de $CaCO_3$ ou CaP en fonction des macromolécules. Les ions silicate ont aussi été identifiés dans des organismes vivants (cystolithes de feuilles [273]), déstabilisant la calcite (et les phases cristallines en général) par gêne stérique dans le réseau cristallin, du fait de leur géométrie tétraédrique et portant quatre charges négatives [273]. Les ions citrate ont également été mentionnés comme stabilisateurs de l'ACC biogénique des gastrolithes d'écrevisse, et sont positionnés à proximité directe des phosphates [339]. Les additifs, ions comme biomolécules, semblent de surcroit avoir une influence sur la structuration à petite échelle (proto-cristallinité) des ACC résultants [172,266].

Les mêmes additifs ont été utilisés lors de la synthèse d'ACC dans le but de stabiliser la phase amorphe, en modifiant l'équilibre thermodynamique ou la cinétique de cristallisation (en inhibant la croissance d'une phase pour favoriser la formation d'une autre) [276]. Le magnésium est l'additif cationique le plus

utilisé et étudié, il permet une sélection des polymorphes cristallins (en particulier l'aragonite) en inhibant la formation de la calcite mais peut aussi stabiliser l'ACC [276,341]. Le mécanisme de stabilisation a été largement décrit : les petits cations de magnésium s'incorporent dans le réseau de l'ACC et se lient aux molécules d'eau plus fortement que les Ca^{2+}, du fait de leur plus haute énergie d'hydratation [342], augmentant la fraction d'eau rigide non mobile et ainsi l'énergie d'activation nécessaire à la déshydratation et donc la température de cristallisation (en voie solide) [178,309,313,343]. De même, la solubilité est réduite et la dissolution limitée [317]. Avant même la nucléation, il est suggéré que les fortes liaisons du magnésium avec l'eau augmentent la sursaturation du milieu et privilégient ainsi la germination de l'amorphe [344]. Les auteurs ne s'accordent pas à propos de l'influence des Mg^{2+} sur la symétrie des carbonates, certains défendent que la proximité du magnésium (plus petit que le calcium) des ions carbonate induit des distorsions (stabilisant donc l'ACC) [338], d'autres disent que ce n'est pas le cas [313]. Des récentes expériences de diffusion inélastique des neutrons ont montré l'augmentation de la raideur des liaisons hydrogène intermoléculaires des Mg-ACC, limitant la cristallisation [345]. En parallèle, cette dernière peut également être inhibée par l'adsorption du magnésium sur les sites actifs de croissance de la calcite (adsorption facilitée par sa forte hydratation), qui retarde la cristallisation en ajoutant une barrière énergétique de déshydratation [79,127,279,341]. Les ions magnésium inhibent ainsi la cristallisation en solution et à l'état solide [346]. Beaucoup de synthèses de Mg-ACC sont décrites dans la littérature, avec des ratios Ca:Mg très variés [79,130,317,341,344,347]. Pour une certaine gamme de Ca:Mg, il a été montré par RMN que les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} sont distribués de manière homogène dans le réseau de l'ACC [348].

Les ions phosphate, moins étudiés que les cations magnésium, sont pourtant des inhibiteurs efficaces de la cristallisation de la calcite [349]. Utilisés dans les synthèses par co-précipitation, ils conduisent à une augmentation de la stabilisation de l'ACC se traduisant par une température de cristallisation plus élevée [325]. Plusieurs mécanismes de stabilisation ont été proposés. Dans une voie de nucléation non classique, les ions PO_4^{3-} pourraient exacerber la formation d'une phase liquide riche en soluté lors de la décomposition binodale en se liant fortement aux ions calcium dans des structures pseudo-polymériques et ainsi la stabiliser [350]. Les particules formées en présence de phosphate sont plus petites [325,350,351], augmentant la stabilité cinétique de l'ACC [320]. Les ions phosphate pourraient aussi s'adsorber sur la surface des particules et ainsi bloquer leur croissance [349,352,353]. Il a été montré qu'ils sont dispersés de manière homogène dans l'ACC synthétique par spectroscopie FTIR [350] et confirmé par RMN REDOR [314] et par PDF [280] (de la même manière que pour les ACC biogéniques) et qu'ils interagissent fortement avec l'eau, limitant la mobilité des ions et donc la déshydratation de l'ACC, ce qui bloque sa cristallisation [314,325]. Celle-ci peut aussi être inhibée par gêne stérique [280] car les ions phosphate ne sont pas intégrés au réseau de la calcite. En plus des monomères, différents phosphates condensés avec des longueurs de chaines variables ont été étudiés comme agents stabilisateurs de l'ACC. Le triphosphate de sodium (STP) favorise la formation de PILP [303] ou stabilise les PNC [304] lors de la germination de l'ACC, formant des particules plus stables et inhibant la cristallisation par adsorption sur les sites actifs de croissance cristalline [88,354]. Un ACC dopé avec du polyphosphate (environ 20 unités phosphate) a aussi été synthétisé et stabilisé avec succès ; ses propriétés bioactives évaluées *in vitro* et *in vivo* montrent de plus une bonne biodégradabilité, une activité ostéogénique et la libération d'ions bioactifs (CO_3^{2-}, PO_4^{3-}, Ca^{2+}) [110]. Cependant, l'utilisation du dimère pyrophosphate $P_2O_7^{4-}$ comme stabilisateur est très peu mentionnée. Il pourrait stabiliser l'ACC en réduisant la taille de ses particules [350] ou en s'adsorbant sur les germes [354]. Il ne s'hydrolyse pas et reste sous forme de dimère lors de son incorporation dans les particules d'ACC [350]. Un brevet [355] déposé en 2018 fait état d'une stabilisation exacerbée à l'air lorsque du pyrophosphate, triphosphate ou hexamétaphosphate de sodium sont ajoutés à la solution de calcium pendant la co-précipitation, mais les ACC ainsi dopés sont très peu caractérisés (uniquement par DRX et spectroscopie FTIR).

Parmi les autres ions utilisés pour stabiliser l'ACC, on peut citer le citrate [278], qui stabilise les PNC pendant la nucléation [303,304] et s'adsorbe sur les sites actifs de croissance de la calcite [161] ou le sulfate [322,356].

Le potentiel de stabilisation des polymères a été mis en évidence avec la théorie des PILP développée par Gower et Odom en 2000 [224], induisant grâce à l'acide poly(aspartique) (pAsp) une séparation de phase liquide-liquide favorisant la germination de l'ACC. Le pAsp a été utilisé dans des études postérieures [279,287,291,325], confirmant son rôle stabilisateur des phases liquides précurseurs [303] et son adsorption à la surface des particules déjà formées, retardant la cristallisation [325]. Les mêmes mécanismes d'inhibition ont été mis en évidence pour l'acide poly(acrylique) (PAA) [304,357], qui peut aussi, tout comme le pAsp [279] influencer la structure proto-cristalline obtenue [304]. Les ACC sont parfois synthétisés en présence d'autres polymères et dans d'autres proportions, formant des particules hybrides et/ou des composites, visant entre autres à modéliser les phénomènes ayant lieu lors de la biominéralisation de matrices organiques (chitine par exemple) *in vivo.*

II.3 ELABORATION ET MISE EN FORME DES CARBONATES DE CALCIUM POUR LA SUBSTITUTION OSSEUSE

Il peut être intéressant de mettre en forme les poudres de CC avant leur utilisation comme substitut osseux. Les procédés utilisés doivent être adaptés aux propriétés physico-chimiques et surtout à la (méta)stabilité de chaque composé, afin de ne pas altérer sa structure/composition lors du processus de mise en forme. On trouve relativement peu d'articles faisant état de l'utilisation de $CaCO_3$ pour la substitution osseuse (à la différence des CaP), hormis pour les phases biogéniques (corail).

II.3.1 Mise en forme de matériaux inorganiques

Utilisation de phases biogéniques

Le corail, composé essentiellement d'aragonite, peut être utilisé après un nettoyage (visant à éliminer les contaminants et la matière organique) mais sans traitement supplémentaire, grâce à sa porosité intrinsèque [92]. Un substitut provenant d'exosquelette de coraux purifiés (avec < 1% d'acides aminés) a par ailleurs été commercialisé sous le nom de Biocoral® (Inoteb, France) [81,358]. L'intérêt de ce type de scaffolds corallien réside dans leur biocompatibilité et composition, mais aussi dans leur structure poreuse, avec des pores mesurant en général 100 à 500 µm [359,360]. Ils ont été utilisés avec succès en chirurgie maxillo-faciale [361,362], chirurgie dentaire [363] ou d'autres applications orthopédiques [84,364]. Des tests *in vivo* ont en effet montré la réparation de défauts critiques et non critiques de l'os cortical et trabéculaire après implantation de différentes variétés de coraux [92], et une reconstruction osseuse avec des scaffolds coralliens associés à des cellules souches mésenchymateuses [365] ou des facteurs de croissance [82,358] similaire à celle obtenue avec une autogreffe. Dans d'autres cas, le corail est transformé partiellement ou totalement en hydroxyapatite via un processus hydrothermal appelé *replamineform* [358,366] (pour « *replicated life forms* » [367]). La nacre, composée de plaquettes d'aragonite dans une matrice organique [96,129], a également été utilisée comme substitut osseux, et ses propriétés bioactives démontrées *in vivo* : implantée sous forme de granules [368], de poudre [369,370] ou de matériaux massifs [371], elle peut stimuler la reconstruction de l'os et intensifier le recrutement des cellules osseuses [368–371], les molécules de sa matrice organique jouant probablement un grand rôle dans ces processus [372]. Des coquilles d'œufs de poule sous forme de poudre ont donné lieu, dans des essais *in vitro*, à une expression élevée des gènes associés à la minéralisation osseuse [373]. Ces phases biogéniques peuvent néanmoins présenter des variabilités biologiques, contenir des contaminants et avoir une faible disponibilité.

Frittage

Le frittage des poudres, technique de choix basée sur leur chauffage permettant une consolidation (sans fusion) et très utilisée pour mettre en forme les CaP, est plus difficile à mettre en œuvre pour les CC, car ils peuvent se décomposer en CaO et CO_2 dès 600 °C [374]. Cependant, des techniques ont été mises en œuvre pour s'affranchir de cette limitation, comme le frittage sous atmosphère de CO_2 [375–377], ou l'introduction d'additifs de frittage [376,378,379]. Souvent précédé de pressage isostatique à froid [378,380], des scaffolds de calcite [375,377,378,381] ou d'aragonite [380] peuvent ainsi être obtenus après un frittage à 510 - 890 °C. Par un procédé de frittage à froid (*cold sintering*), la vatérite peut être densifiée (à 80 °C et sous 270 MPa) sans transition de phase [382]. Les scaffolds ainsi créés montrent des propriétés ostéogéniques *in vitro* ou *in vivo* [377,379,381,383]. Cette technique, très énergétique, n'est néanmoins pas adaptée aux phases métastables et/ou hydratées telles que l'ACC, car elle modifierait leur structure et composition.

Revêtements

Pour les phosphates de calcium, les revêtements les plus utilisés sont réalisés par des techniques très énergétiques (projection plasma [25,55] entres autres), mais n'étant pas adaptées pour des phases moins stables en température. Les alternatives développées pour les carbonates de calcium consistent par exemple en la co-précipitation de calcite sur un substrat de titane (par immersion dans un bain de $CaCl_2$ placé dans un dessiccateur avec du carbonate d'ammonium se décomposant) [384], par traitement hydrothermal (solution de citrate et de soude à chaud) [385] ou par carbonatation d'un dépôt de nitrate de calcium à chaud sous circulation de CO_2 [386]. Ces revêtements peuvent conférer des propriétés bioactives à des implants, favorisant l'attachement cellulaire et la différenciation ostéoblastique [384]. On peut aussi mentionner un procédé de revêtement biogénique intéressant mais long et discutable du point de vue éthique, consistant à implanter dans l'épithélium du manteau d'un mollusque bivalve l'implant de titane à revêtir à la place de la perle, qui est recouvert en 45 jours d'un dépôt de nacre [387].

Ciments hydrauliques

Un ciment hydraulique se caractérise par le passage d'une pâte à un matériau cohésif par une réaction chimique de prise, après un mélange d'une phase solide et d'une phase liquide. L'enchevêtrement des cristaux de la phase obtenue confère résistance mécanique et porosité au ciment pris. Les ciments $CaCO_3$ ont été peu étudiés, à la différence des ciments phosphocalciques, malgré une résorption potentiellement plus rapide que ces derniers. Les ciments composés uniquement de carbonate ont été développés pour la première fois et brevetés au CIRIMAT en 2001 [388], et leur faisabilité et cytocompatibilité démontrées plus tard [102]. Ils sont préparés à partir d'ACC très réactif et de vatérite, phase cristalline métastable servant de germes et orientant la cristallisation, et forment après prise de l'aragonite qui, par sa cristallisation sous forme d'aiguilles enchevêtrées, assure la cohésion du ciment. Celui-ci présente une bonne cytocompatibilité, potentiellement liée à la stabilité du pH pendant la prise, et un comportement rhéofluidifiant [389]. Cette propriété permet d'envisager son utilisation par injection *in vivo*, ce qui assurerait un comblement adéquat des défauts avec des techniques mini-invasives. La préparation aisée et à basse température de ces matériaux offre l'opportunité d'association avec des ions bioactifs (comme l'argent [34] ou le strontium [390] dans les ciments CaP) ou des (bio)molécules [391]. Il est cependant possible que la pâte manque de cohésion, entraînant un *wash-out* ou une désagrégation de la pâte du ciment en présence de fluides biologiques, ce qui peut être évité avec l'ajout d'un agent gélifiant, comme l'alginate de sodium, efficace dans les compositions des ciments phosphocalciques [392,393].

Scaffolds macroporeux

La porosité est une caractéristique clé pour un substitut osseux, car permettant la bioactivité, l'angiogenèse et la colonisation cellulaire après implantation. Plusieurs types de mise en forme permettent la formation d'une macroporosité dans le matériau. En premier lieu, il est courant que des agents porogènes (comme NaCl [394]) soient ajoutés pendant le frittage afin d'obtenir une macroporosité et un volume poreux élevé, celui-ci allant jusqu'à 75 % [375,377] ou 90 % [394]. La calcite synthétique ainsi élaborée est cytocompatible et supporte la prolifération cellulaire [375], elle induit même la formation osseuse après un ensemencement de cellules dérivées du tissu osseux [381]. De plus, l'incorporation d'antibiotiques dans des scaffolds poreux d'aragonite frittés avec des agents porogènes assure la délivrance de principes actifs *in vitro* [380]. De manière alternative, un scaffold de calcite, présentant une porosité interconnectée et contrôlée, a pu être obtenu sur un substrat de silice par CO_2 supercritique sans requérir de matrice sacrificielle [395]. Néanmoins, les CC étant pour la plupart plus solubles que les CaP, il est nécessaire d'adapter le volume poreux pour ne pas engendrer des vitesses de résorption trop rapides des scaffolds [377].

Limitations

Les techniques de mise en forme présentées ci-dessus sont bien adaptées pour des phases céramiques stables et anhydres, mais présentent des limitations, en particulier pour leur application à des sites non porteurs. En effet, les matériaux obtenus sont souvent fragiles, leur découpe (souvent nécessaire à l'ajustement à la forme du défaut à réparer) est impossible, et surtout le caractère métastable, hydraté et réactif des composés (le cas échéant) est très généralement perdu. Il est alors difficile de mettre en forme des matériaux amorphes, pourtant les plus réactifs une fois implantés. Une des solutions est leur association avec un/des polymère(s) dans une formulation composite, permettant d'une part d'obtenir des matériaux massifs sans avoir recours à des techniques très énergétiques dégradant les propriétés de la poudre initiale, et d'autre part l'amélioration des propriétés mécaniques et en particulier l'élasticité, réduisant la fragilité de celles-ci.

II.3.2 Mise en forme de matériaux composites

Pour pallier aux limitations évoquées précédemment, des matériaux composites associant carbonate de calcium et polymère ont été élaborés.

Particules hybrides

Des particules hybrides, présentant une proximité directe des chaînes de polymère et des particules de CC, sont utilisés sans mise en forme postérieure pour des applications biomédicales. Par exemple, des particules d'ACC stabilisé par des polyphosphates sont intégrées dans des microsphères de poly(acide lactique-*co*-glycolique) (PLGA) et constituent un support d'attachement et/ou de colonisation cellulaire [110,396] ; et des nanoparticules d'ACC recouvertes d'une couche phospholipidique modifiée par un antibiotique promeuvent *in vitro* et *in vivo* la formation osseuse en vue d'un traitement potentiel de l'ostéoporose [397]. La grande solubilité de l'ACC en milieu aqueux lui permet une meilleure libération de calcium *in vivo* et ainsi une meilleure intégration dans le tissu osseux à réparer que les polymorphes cristallins [398].

Films/hydrogels composites

Des composites sous forme de films texturés d'une centaine de micromètres, composés d'ACC avec un copolymère à bloc (PHEMA-PMPS-PHEMA [s]) sont synthétisés par immersion du copolymère dans une solution de $CaCl_2$ avec PAA dans laquelle du CO_2 provenant de la décomposition de carbonate d'ammonium diffuse [399]. Les films ainsi formés servent de support pour l'attachement de cellules stromales de la moelle osseuse de rats et leur différenciation en cellules osseuses. L'inclusion de particules de vatérite dispersées dans des hydrogels dégradables de PEG-DMA [t] a également montré *in vitro* [400] et *in vivo* [401] une augmentation de l'adhésion d'ostéoblastes (ceux-ci n'adhérant pas aux gels sans particules) et de leur prolifération, et celles-ci induisent de plus la formation d'une porosité nécessaire aux applications de substitution osseuse.

Scaffolds macroporeux

Les scaffolds macroporeux contenant des CC sont dans la littérature souvent limités à des matrices polymériques obtenues par électrofilage (*electrospinning*), par exemple de fibres de PCL contenant des nanoparticules de $CaCO_3$ (la phase n'étant pas précisée) [402] ou de collagène réticulé *in situ* – $CaCO_3$ (probablement amorphe) [403]. Les scaffolds composites obtenus de cette manière permettent l'attachement, la colonisation et la prolifération d'ostéoblastes à la surface des fibres. D'autres scaffolds, composés de mélanges de particules de CC et de polymère ont été développés en vue d'applications osseuses, comme par exemple des composites de PLA-vatérite pressés à chaud [404] ou PCL-aragonite [405].

Une des techniques très prometteuses car couplant mise en forme de matériaux composites et création de porosité est la séparation de phase induite thermiquement (TIPS), pourtant très peu développée pour les carbonates de calcium. Celle-ci est basée sur la solidification d'une solution contenant des particules ou des polymères solubilisés, entraînant leur ségrégation de part et d'autres des cristaux de solvant, puis, lorsque les cristaux sont sublimés (en général par lyophilisation), la formation de pores de taille et de volume contrôlés. La solidification peut être aléatoire ou orientée, la technique étant appelée freeze-casting dans ce deuxième cas. Le contrôle des paramètres procédés (vitesse et température de congélation) et formulation de la suspension (solvant, concentration, additifs) assure une définition précise et maîtrisée de la porosité. De surcroît, c'est une technique de mise en forme douce qu'il est envisageable d'utiliser pour des composés métastables et/ou hydratés, associés de plus avec des polymères. Parmi les rares études mentionnant l'ajout de CC dans des suspensions pour freeze-casting, on peut citer Mao *et al.* [406] ou Zhang *et al.* [407] qui ont par le biais de cette technique élaboré des matrices de chitosane (avec ou sans gélatine) contenant des particules d'aragonite, dans le but d'imiter la structure et composition de la nacre et ses propriétés mécaniques singulières. Ces matériaux pourraient être utilisés comme substituts osseux de par leur similarité à cette phase biogénique [408,409], mais n'ont cependant pas été testés *in vitro* ou *in vivo*.

[s] Poly (méthacrylate d'hydroxyéthyle - méthylphénylsilane - méthacrylate d'hydroxyéthyle)
[t] Poly(éthylène glycol) – diméthacrylate d'acétal

III OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

L'ostéoradionécrose mandibulaire (ORM), complication principale apparaissant après le traitement par radiothérapie de cancers des voies aérodigestives supérieures, est une des pathologies suscitant un grand intérêt dans l'équipe Phosphate, Pharmacotechnie et Biomatériaux (PPB) du CIRIMAT, de par la présence en son sein d'une chirurgienne ORL de l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse - Oncopole et spécialiste de la prise en charge de ce type de complications chez des patients. L'ORM est caractérisée par des signes radiologiques d'une nécrose osseuse dans une zone irradiée alors que la tumeur a été éliminée [410], et s'accompagne souvent d'une infection bactérienne secondaire [411]. Les traitements actuels de l'ORM sont médicaux et/ou chirurgicaux [412], ces derniers pouvant conduire à des mandibulectomies [u] créant des défauts de taille critique ne pouvant pas être autoréparés par les cellules osseuses. De ce fait, une des techniques chirurgicales les plus prometteuses pour traiter cette pathologie est l'implantation de substituts osseux, pourtant peu développée actuellement [413]. Un substitut osseux idéal pour ce type d'application répondrait au cahier des charges suivant, en étant :

- bioactif et en particulier en induisant l'ostéogénèse par stimulation des cellules osseuses, qui serait de surcroît couplée à une angiogenèse ;
- antibactérien, afin de combattre l'infection très souvent associée à l'ORM ;
- avec des pores interconnectés de volume et taille adaptés (pour permettre une colonisation des cellules et des vaisseaux sanguins) ;
- et enfin avec propriétés mécaniques assurant une manipulation sans collapse de la porosité.

Ainsi, pour le traitement de l'ORM mais pouvant s'étendre dans un cadre plus large aux applications de substitution osseuse pour des sites non porteurs, l'intérêt de développer des biomatériaux résorbables et bioactifs a été mis en exergue à travers cette revue bibliographique. Les phases de phosphate de calcium, de même composition que le minéral osseux, sont pour la plupart stables en milieu physiologique, d'où l'intérêt d'utiliser des carbonates de calcium, dont les phases sont majoritairement plus solubles et donc résorbées plus rapidement une fois implantées. De plus, les similarités entre ces deux familles de phases calciques (mécanismes de formation, phases amorphes, stabilisation en solution) permettent des analogies pouvant étayer la compréhension de phénomènes parfois peu décrits pour les CC. Parmi les CC, la phase amorphe a une grande réactivité en milieu aqueux, conférée par sa structure désordonnée à grande échelle et son contenu en eau, elle peut de plus libérer des ions Ca^{2+} et CO_3^{2-} ayant un rôle dans la reconstruction osseuse. La stabilisation de l'ACC par des ions pyrophosphate est très peu documentée mais digne d'intérêt, car ceux-ci sont des inhibiteurs de la cristallisation de la calcite, et peuvent de plus être clivés en milieu cellulaire par la PAL, apportant ainsi lors de la dissolution des unités phosphate essentielles à la minéralisation osseuse.

L'objectif de cette thèse est donc de **synthétiser des carbonates de calcium amorphes stabilisés par du pyrophosphate** (PyACC) par co-précipitation, avec différents ratios pyrophosphate/carbonate **et de les caractériser de façon approfondie**, afin de mettre en évidence l'influence du taux de pyrophosphate sur la structuration et la composition des précipités obtenus. De fait, la littérature regorge d'articles utilisant des techniques de caractérisation avancées et parfois *in situ* pour décrire la germination de l'ACC ou sa cristallisation, mais assez peu d'auteurs ont décrit de manière précise l'ACC stabilisé et sa structuration multi-échelle. Nous nous attacherons à caractériser de façon exhaustive et fine l'ACC stabilisé avec du pyrophosphate (PyACC), par le biais des techniques complémentaires telles que le MEB, le MET, le SAXS, le WAXS-PDF et la RMN en phase solide en vue de **proposer un modèle**

[u] Ablation d'une partie ou de la totalité de la mandibule.

expérimental permettant d'expliquer l'organisation des ACC et le rôle du pyrophosphate dans cette dernière.

Afin d'exacerber les potentielles propriétés bioactives des poudres, la composition du PyACC le plus stable sera sélectionnée et la faisabilité du **dopage** de PyACC par co-précipitation en présence de Zn^{2+}, Cu^{2+} ou Sr^{2+}, cations divalents pouvant lui conférer des propriétés additionnelles ostéogéniques, pro-angiogéniques et/ou antibactériennes, sera étudiée. Leur composition et structure seront examinées, ainsi que leur **dégradation** dans deux milieux aqueux, permettant d'appréhender la libération des espèces actives et d'anticiper leur comportement *in vitro*. Des tests cellulaires seront également conduits afin d'évaluer la cytocompatibilité et la capacité de biominéralisation de ces différentes poudres de PyACC dopés.

Enfin, la mise en forme des poudres de PyACC avec conservation de leur structure et composition intactes peut s'avérer délicate, en raison de leur métastabilité et leur teneur en eau élevée excluant de fait les procédés très énergétiques tels que le frittage. Parmi les procédés plus « doux », le **freeze-casting**, basé sur la congélation d'une suspension de poudres/solution de polymères dans un solvant suivie de la sublimation de ce dernier, permet d'élaborer des scaffolds avec un grand volume poreux et des tailles de pores adaptables aux colonisations des cellules et vaisseaux sanguins. C'est donc vers cette technique que nous nous sommes tournés pour élaborer des **scaffolds macroporeux**, à partir d'une poudre composite PyACC-alginate, dont la fraction organique devrait assurer une bonne cohésion mécanique, et dans un solvant biocompatible, l'eau.

La Figure 1.29 liste les noms et les compositions initiales des différents échantillons synthétisés à chaque étape de la thèse, structurés sur la base des trois chapitres expérimentaux dans lesquels ils sont présentés, étudiés et discutés.

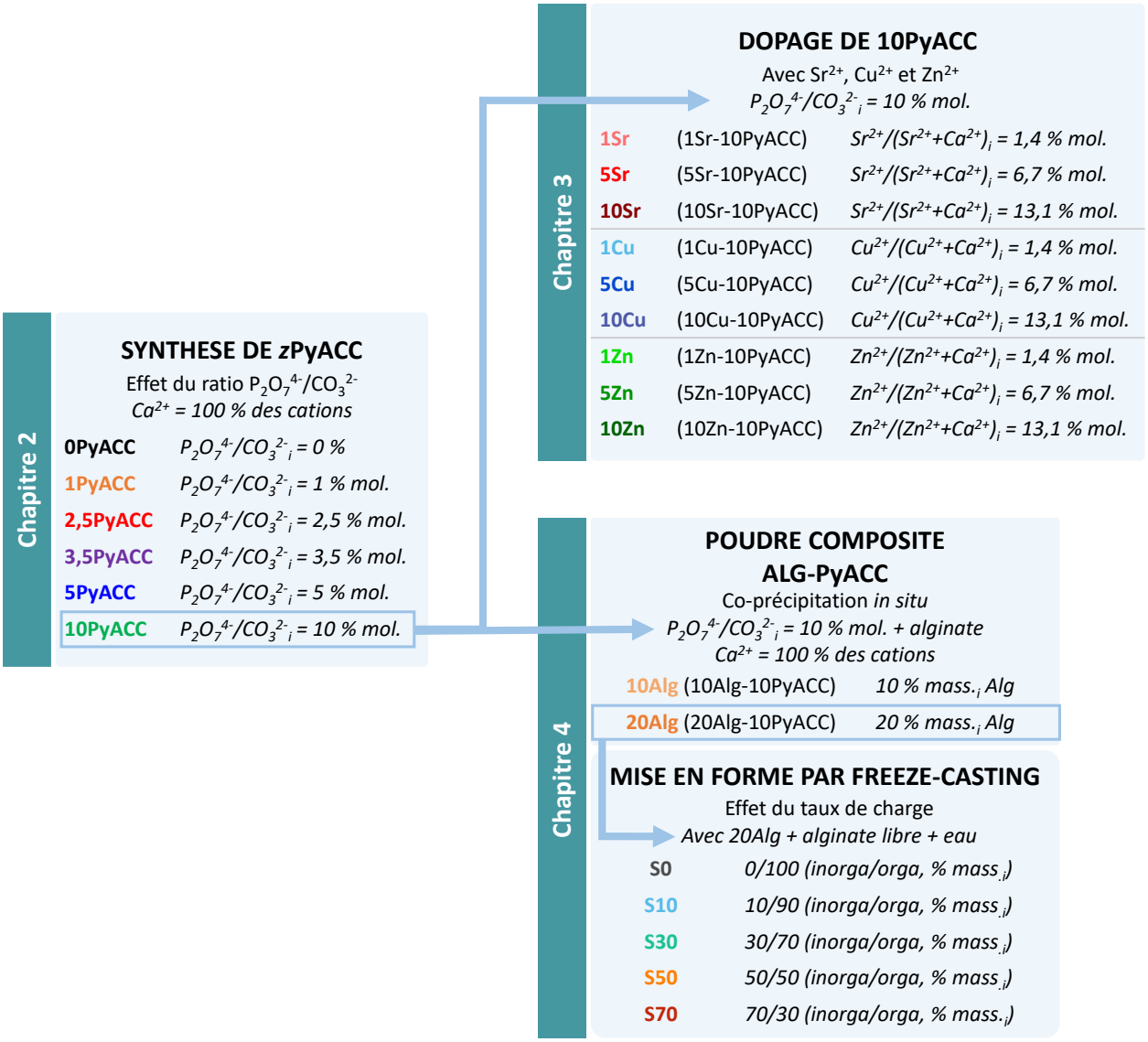


Figure 1.29 : Liste des noms et compositions initiales des différents échantillons synthétisés et présentés dans ce travail de thèse, regroupés par chapitre.

CHAPITRE 2. SYNTHESE ET CARACTERISATION DES PYACC : INFLUENCE DU TAUX DE PYROPHOSPHATE SUR LEUR COMPOSITION ET LEUR STRUCTURE MULTI-ECHELLE

Dans le chapitre précédent, nous avons montré l'intérêt d'utiliser l'ACC dans des compositions de substituts osseux, de par sa grande réactivité et la libération potentielle d'ions bioactifs Ca^{2+} et CO_3^{2-} *in vivo*. Pour stabiliser l'ACC vis-à-vis de la cristallisation lors de sa synthèse par co-précipitation, la technique la plus utilisée est l'ajout d'additifs stabilisateurs. Parmi ceux-ci, le pyrophosphate est prometteur, inhibiteur de la cristallisation de la calcite mais aussi pouvant être clivé *in vivo* par des enzymes comme la PAL, libérant ainsi des ions phosphates nécessaires à la minéralisation osseuse. A la différence des ions orthophosphate (PO_4^{3-} et HPO_4^{2-}), l'utilisation de ce dimère ($P_2O_7^{4-}$) pour la stabilisation de l'ACC a été très peu décrite dans la littérature, et le cas échéant les composés résultants peu caractérisés. C'est ce qui motive notre étude, ayant pour but de comprendre l'influence du taux de pyrophosphate sur les caractéristiques (structure, composition) des carbonates de calcium amorphes, alors appelés PyACC, et de caractériser ces composés avec des techniques complémentaires. Dans ce chapitre, la synthèse des PyACC avec six différents ratios pyrophosphate/carbonate est décrite, puis leur structure et composition chimique sont caractérisées afin de mettre en évidence l'influence du ratio sur leur (non) cristallinité. En faisant appel à d'autres techniques de caractérisation plus avancées et donnant des informations sur plusieurs échelles, nous montrerons qu'il y a une organisation hiérarchique des PyACC. Enfin, en mettant en relation toutes les données expérimentales, un modèle d'organisation des PyACC sera construit, permettant à terme et dans l'idéal de donner des éléments de prédiction de leur réactivité et de leur comportement *in vitro* et *in vivo*.

I SYNTHESE DES POUDRES DE PYACC

La synthèse des carbonates de calcium amorphes stabilisés avec du pyrophosphate (PyACC) est réalisée par co-précipitation, comme illustré sur la Figure 2.1. Pour synthétiser le composé *z*PyACC, avec *z* le ratio molaire pyrophosphate/carbonate, une solution anionique est préparée en dissolvant dans 250 mL d'eau déionisée 50,0 mmol d'hydrogénocarbonate de sodium ($NaHCO_3$) et 0,5**z* mmol de pyrophosphate de sodium ($Na_4P_2O_7$), formé au préalable par condensation d'hydrogénophosphate de sodium (voir Annexe AII.1), puis son pH est ajusté à 12,1 – 12,2. La solution cationique contient 50,0 mmol de nitrate de calcium dans 250 mL d'eau déionisée (1). La solution anionique est versée rapidement dans la solution cationique et le précipité (2) formé instantanément est directement filtré sous vide (3), puis lavé avec 1 L de solution ammoniacale (0,1 % mass. de NH_4OH). Le gâteau de filtration est alors séché par lyophilisation (4), puis la poudre collectée est caractérisée (5) par plusieurs techniques complémentaires, dont les données sont exploitées dans les paragraphes §II, §III et §IV, comme indiqué sur la Figure 2.1. Afin d'étudier l'influence du taux de pyrophosphate, six synthèses ont été réalisées avec un ratio *z* (pyrophosphate/carbonate) égal à 0,0 ; 1,0 ; 2,5 ; 3,5 ; 5,0 ou 10,0 % mol. dans la solution anionique, les poudres résultantes étant nommées 0PyACC ; 1PyACC ; 2,5PyACC ; 3,5PyACC ; 5PyACC et 10PyACC respectivement. Pour plus de précisions sur la synthèse, se référer aux Annexes : V.2.1.

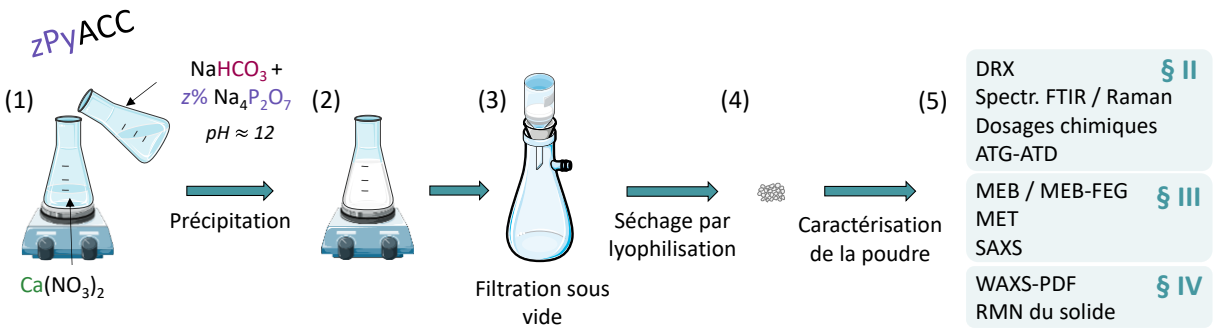


Figure 2.1 : Schéma récapitulatif des étapes de la synthèse des poudres de zPyACC, et des techniques de caractérisation mises en œuvre, dont les résultats sont exploités dans les paragraphes §2, §3 et §4 selon l'attribution faite sur la figure. Schéma réalisé en utilisant des éléments de « Servier Medical Art » (https://smart.servier.com) sous licence Creative Commons.

La solution anionique est ajustée à un pH très basique (12,1 à 12,2) afin d'assurer la prédominance des ions carbonate CO_3^{2-} par rapport aux ions hydrogénocarbonate HCO_3^-. En effet, en accord avec le diagramme de spéciation sur la Figure 2.2, à pH 12 presque 100 % des ions carbonate sont sous la forme CO_3^{2-}. Il a de plus été montré qu'un pH élevé stabilise l'amorphe (*cf.* Chapitre 1, II.2.3.4), grâce à l'intégration des ions HO^- dans son réseau [282]. Lors du mélange des deux solutions, le pH diminue peu (à ~ 11,5), ce qui a donc peu d'impact sur la spéciation des ions carbonate. La stabilisation de la poudre est aussi assurée par la rapidité de la synthèse : moins de 10 minutes s'écoulent entre le mélange des deux solutions et le début de lyophilisation, limitant ainsi les possibilités de cristallisation du précipité en solution.

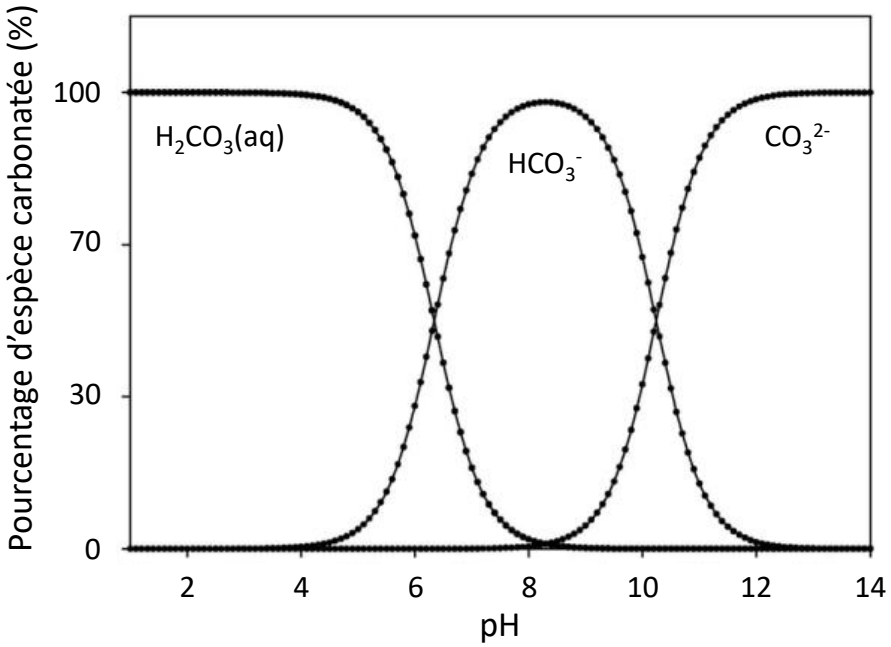


Figure 2.2 : Diagramme de spéciation des espèces carbonatées en fonction du pH, pour une concentration totale de 0,003 mol.L^{-1} et une température de 20 °C, dans un circuit fermé. Adapté de G. Nehrke [120].

II INFLUENCE DU TAUX DE PYROPHOSPHATE SUR LA (NON) CRISTALLINITE DES PYACC

Six poudres de *z*PyACC ont été synthétisées, avec un taux *z* de pyrophosphate (dans la solution anionique) variant entre 0 et 10 % mol. La comparaison de ces poudres permet de mettre en exergue l'influence de la quantité de pyrophosphate sur leur cristallinité.

II.1 OBTENTION D'UNE PHASE AMORPHE

Les six poudres de *z*PyACC ont été analysées par diffraction des rayons X, et les diffractogrammes sont présentés sur la Figure 2.3. La poudre précipitée en l'absence de pyrophosphate (0PyACC, tracée en noir) présente dans son diffractogramme RX les pics caractéristiques de la calcite (identifiés grâce au logiciel EVA, Bruker AXS), dont en particulier le pic de plus haute intensité à 29,4 ° (correspondant au plan (104)). Dès lors que du pyrophosphate est ajouté dans la solution anionique, les pics de diffraction de la poudre précipitée sont moins intenses et un halo apparaît, centré autour de 30 °, caractéristique de la phase amorphe [331]. Aucun pic n'est visible sur le diffractogramme de 3,5PyACC et pour les poudres synthétisées en présence d'encore plus d'ions pyrophosphate, on peut alors supposer qu'elles sont totalement amorphes. Il y a donc en DRX une démarcation nette entre les ratios pyrophosphate/carbonate de 2,5 % et 3,5 %, ce dernier permettant l'obtention d'une phase sans ordre à longue distance.

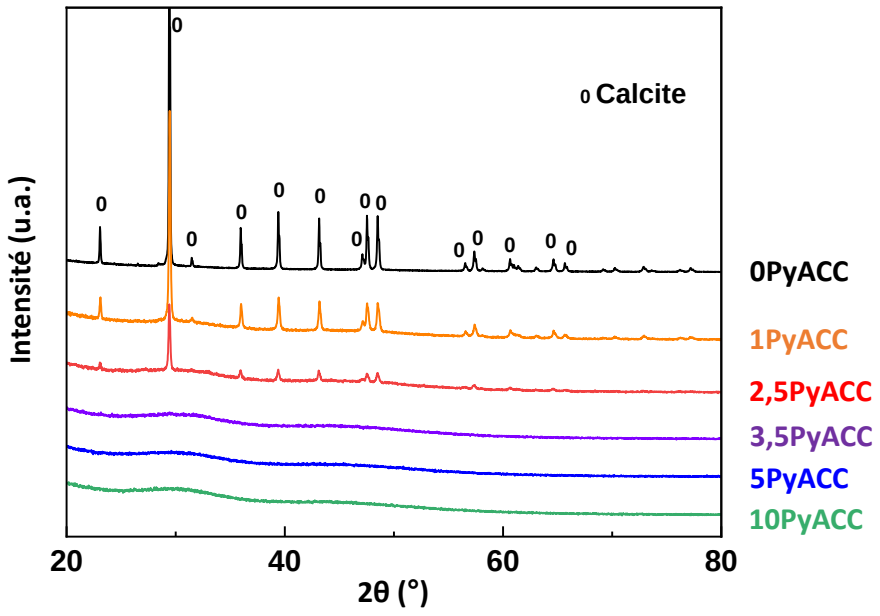


Figure 2.3 : Diffractogrammes RX des six poudres zPyACC synthétisées, les pics associés à la calcite sont identifiés par le symbole 0.

Pour les poudres 0PyACC, 1PyACC et 2,5PyACC, les deux dernières contenant à la fois des pics de diffraction et un halo diffus, le pourcentage de cristallinité, correspondant à la proportion de phase cristalline par rapport à la phase amorphe, peut être estimé à l'aide du logiciel EVA. Pour cela la ligne de base est ajustée manuellement au fond continu, puis l'aire sous cette ligne de base est comparée à celle sous les pics, ce qui donne finalement le pourcentage de cristallinité. La méthode n'est pas très précise car dépendant de la sensibilité de l'opérateur pour l'ajustement manuel, mais elle permet, en suivant scrupuleusement la même méthode, une comparaison relative entre les différentes poudres.

La taille apparente des cristallites peut également être calculée, et ce en utilisant la formule de Debye-Scherrer suivante :

$t = \frac{k \times \lambda}{\cos\theta \times \sqrt{FWMH^2 - FWMH_0^2}}$, avec t la taille apparente des cristallites, *k* le facteur de forme, *FWHM* la largeur à mi-hauteur et $FWMH_0$ la largeur instrumentale, liée entre autres à la fente primaire utilisée et déterminée grâce à un étalonnage de la machine. Le facteur *k* dépend de la forme des cristaux, du calcul de la moyenne de la taille des cristallites et de la définition de la largeur des pics (si on considère l'intégrale ou la largeur à mi-hauteur) [414,415]. Pour des cristaux cubiques et en utilisant la largeur à mi-hauteur, la valeur est généralement fixée à 0,94. Pour les carbonates de calcium spécifiquement, dans la littérature les valeurs diffèrent, entre 0,89 [117] (mais en prenant en compte l'intégrale pour définir la largeur des pics) et 1,4 [416]. La valeur de 0,94 a été choisie dans notre cas, et le calcul fait pour les trois diffractogrammes RX de 0PyACC, 1PyACC et 2,5PyACC sur tous les pics assez intenses pour être exploitables, à savoir le pic centré à 29,4 ° du plan (104), à 36,0 ° du plan (110), à 39,4 ° du plan (113) et à 43,1 ° du plan (202), présentant tous au moins deux contributions en x, y ou z. De manière similaire au pourcentage de cristallinité, le calcul de la taille apparente des cristallites via la formule de Scherrer est avant tout une méthode permettant une comparaison relative entre échantillons plutôt qu'une méthode absolue. Les pourcentages de cristallinité et tailles apparentes des cristallites sont présentés dans le Tableau 2.1 pour 0PyACC, 1PyACC et 2,5PyACC. En accord avec ce qui est visible sur les diffractogrammes RX et décrit précédemment, la proportion de phase cristalline (uniquement calcite ici) diminue de 87 % à 51 % quand *z* passe de 0 à 2,5 %. La taille des cristallites suit la même tendance, passant de 105 – 128 nm (0PyACC) à 53,4 – 70,9 nm (2,5PyACC). Les différents plans considérés sont représentés dans la maille rhomboédrique de la calcite sur la Figure 2.4. Quels que soient les plans considérés, les évolutions relatives et les tendances sont similaires entre les tailles des cristallites des poudres 0PyACC, 1PyACC et 2,5PyACC. Il y a de petits écarts pour certaines valeurs de 2,5PyACC, mais non interprétables car les pics sont peu intenses et les largeurs à mi-hauteur sont donc peu précises. Il n'apparaît donc pas de direction préférentielle de croissance des cristaux.

Tableau 2.1 : Pourcentage de cristallinité estimé à l'aide du logiciel EVA et taille apparente des cristallites (calculée avec la formule de Debye-Scherrer) dans les plans (104), (110), (113) et (202) des poudres 0PyACC, 1PyACC et 2,5PyACC.

***z*PyACC**	**% CRISTALLINITE**	**TAILLE APPARENTE DES CRISTALLITES (nm)**			
		Plan (104)	Plan (110)	Plan (113)	Plan (202)
0PyACC	87	128 ± 2	112 ± 1	105 ± 1	117 ± 1
1PyACC	77	$72{,}2 \pm 0{,}6$	$70{,}0 \pm 0{,}5$	$60{,}7 \pm 0{,}4$	$64{,}6 \pm 0{,}5$
2,5PyACC	51	$70{,}9 \pm 0{,}6$	$57{,}4 \pm 0{,}4$*	$53{,}4 \pm 0{,}3$	$62{,}2 \pm 0{,}4$*

* Pic peu intense, incertitudes plus élevées.

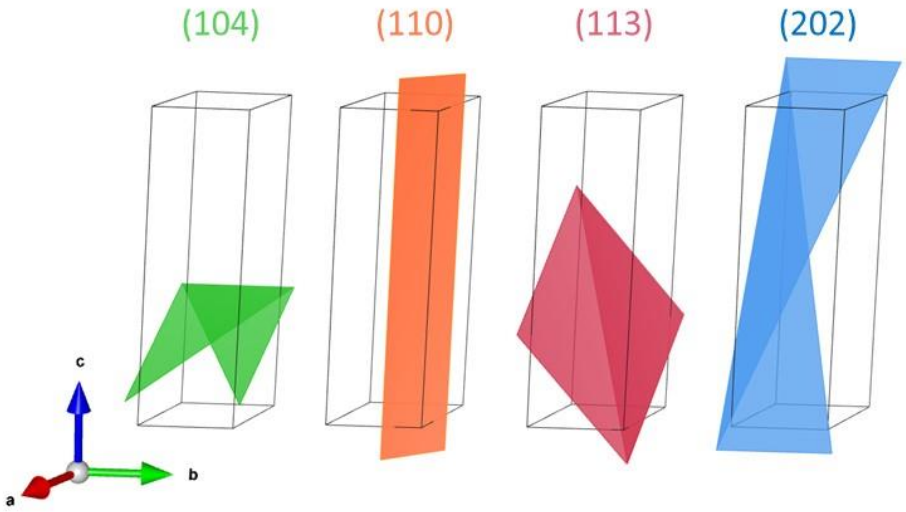


Figure 2.4 : Représentation des quatre plans cristallins considérés dans la maille rhomboédrique : (104), (110), (113) et (202), à partir du logiciel Vesta. Pour les plans (104), (113) et (202), le logiciel affiche deux demi-plans triangulaires superposés, d'où l'impression de voir un plan replié, mais qui n'est qu'un effet de la visualisation.

Les spectres d'absorption infrarouge, sur les Figures 2.5a, 2.5b, renseignent sur les groupements caractéristiques présents dans les différents *z*PyACC synthétisés. Plusieurs domaines peuvent être détectés, et attribué aux phases de $CaCO_3$ en accord avec valeurs de nombre d'onde des vibrations pour chaque phase listées dans le Tableau AI.1 (Annexe AI.2) [73,104,130,254] :

- L'élongation asymétrique ν_3CO_3 (Figure 2.5a), bande carbonate de plus grande intensité, est centrée à 1390 cm^{-1} pour la calcite (comme pour 0PyACC) mais elle est dédoublée en deux pics à 1415 – 1490 cm^{-1} pour l'ACC, comme c'est le cas dès z = 1 (pour 1PyACC), confirmant la présence d'un carbonate de calcium amorphe dans la poudre.
- Les autres bandes carbonate (Figure 2.5b) attestent également de la présence d'une phase amorphe dès lors que du pyrophosphate est introduit dans la solution anionique initiale : la vibration de déformation hors du plan ν_2CO_3, à 875 cm^{-1} pour la calcite, est déplacée à 865 cm^{-1} pour l'ACC ; et la déformation dans le plan ν_4CO_3 à 712 cm^{-1} pour la calcite est très élargie et par conséquent non discernable pour l'ACC. La vibration d'élongation symétrique ν_1CO_3 n'est pas accessible dans la calcite à cause de la symétrie de ses ions carbonate, elle n'est pas présente dans le spectre de 0PyACC mais elle apparait dans celui de 1PyACC à 1074 cm^{-1}, valeur de cette vibration pour l'ACC. Elle est aussi visible dans les spectres des autres *z*PyACC contenant du pyrophosphate mais progressivement masquée par les bandes phosphate.
- Les bandes associées au pyrophosphate sont également identifiées sur la Figure 2.5b : le domaine de vibration entre 410 et 650 cm^{-1} correspond aux vibrations δPO_3 et ρPO_3 des ions pyrophosphate, l'élongation asymétrique de la liaison POP ($\nu^{as}POP$) crée une bande à 925 cm^{-1}, et les élongations symétrique et asymétrique des groupements phosphate du pyrophosphate ($\nu^{s}PO_3$ et $\nu^{as}PO_3$ respectivement) donnent une bande peu intense à 1035 cm^{-1} et une plus intense entre 1070 et 1200 cm^{-1} (avec un maximum à 1150 cm^{-1}), respectivement. L'intensité de toutes ces bandes augmente avec le ratio initial introduit z, témoignant d'une intégration quantitative de pyrophosphate dans les *z*PyACC.
- Enfin, la bande large autour de 3400 cm^{-1} et l'épaulement à 1650 cm^{-1} (Figure 2.5a) sont attribués aux molécules d'eau structurales ou adsorbées.

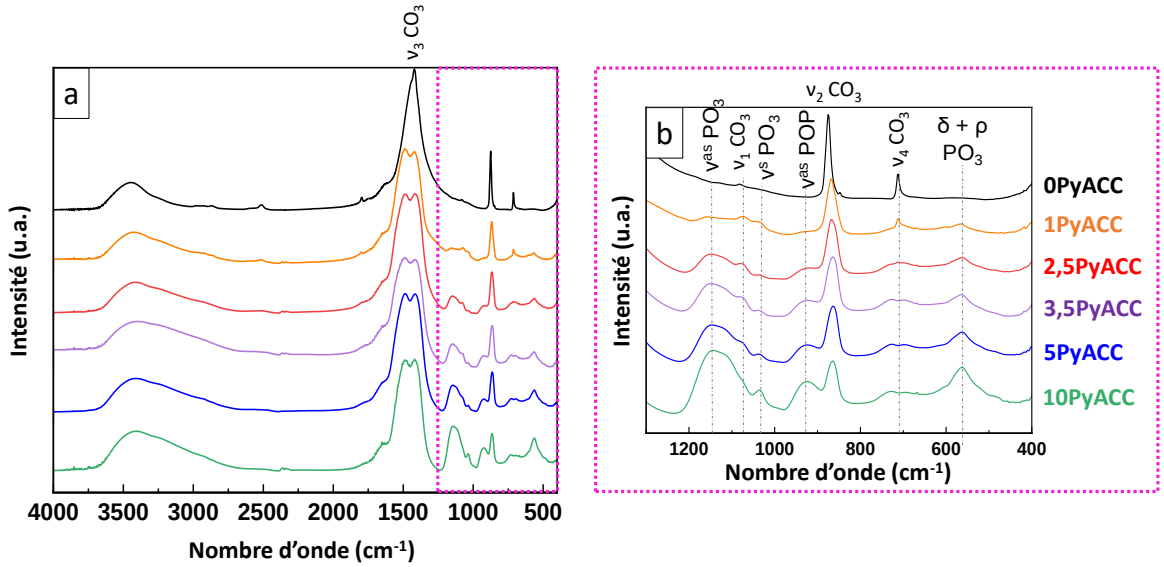


Figure 2.5 : Spectres d'absorption infrarouge des zPyACC synthétisés, en entier entre 400 et 4000 cm^{-1} (a) et avec un agrandissement entre 400 et 1300 cm^{-1} (b), les vibrations du carbonate et pyrophosphate sont identifiées sur les spectres.

Les spectres Raman (Figure 2.6) présentent de la même manière les bandes associées aux groupements carbonate et pyrophosphate [115,247]. En effet, la bande carbonate la plus intense, correspondant à l'élongation symétrique ν_1CO_3 et positionnée à 1085 cm^{-1} pour la calcite (0PyACC) est déplacée à 1081 cm^{-1} dans l'ACC. Les autres vibrations, associées à ν_3CO_3 à 1437 cm^{-1} et ν_4CO_3 à 712 cm^{-1} dans la calcite sont bien moins intenses et non détectables dans l'ACC. C'est également le cas pour les bandes réseau sous 400 cm^{-1}, masquées de façon très nette dans les composés totalement amorphes (3,5PyACC, 5PyACC, 10PyACC), en accord avec les diffractogrammes RX de la Figure 2.3 ne montrant aucun pic de diffraction pour ces composés. Concernant le pyrophosphate, la bande principale, attribuée à ν^sPO_3 et positionnée à 1040 cm^{-1} est caractéristique du pyrophosphate de calcium amorphe (ACPP) [73], de même pour la vibration ν^sPOP à 732 cm^{-1}.

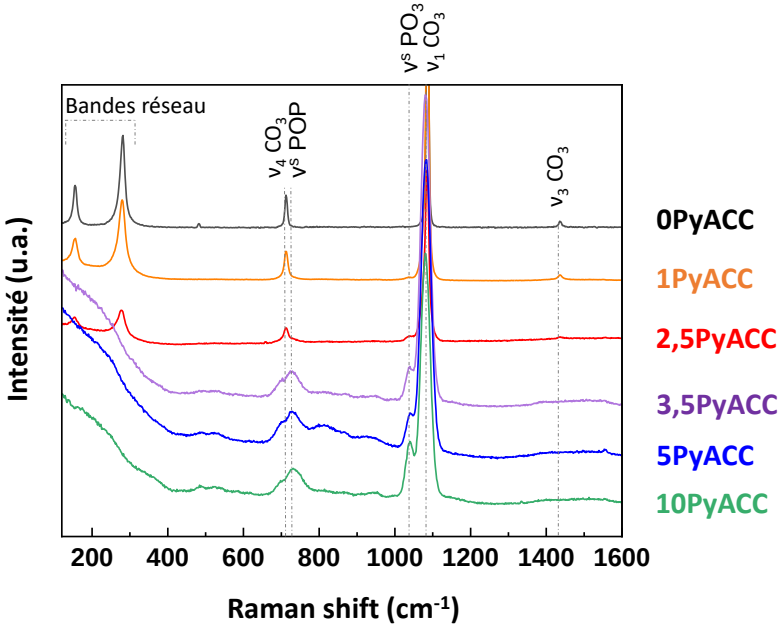


Figure 2.6 : Spectre Raman des poudres zPyACC synthétisées, avec les vibrations carbonate et pyrophosphate associées identifiées.

Ces analyses mettent en évidence un taux initial de pyrophosphate seuil, compris entre 2,5 % et 3,5 %, au-delà duquel une phase totalement amorphe est obtenue. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles utilisées dans le brevet de Ben *et al*. [355], proposant un ACC stabilisé par 3,3 % mol. ou 5,5 % mol. (ratio P_2O_7/CO_3) restant amorphe à 86 % ou 96 % respectivement après 98 jours à l'air. De plus, l'augmentation d'intensité des bandes associées au pyrophosphate dans les spectres FTIR et Raman suggère une intégration quantitative du pyrophosphate dans le *z*PyACC, et ce sous forme amorphe.

II.2 COMPOSITION CHIMIQUE

La composition chimique des *z*PyACC a été déterminée en associant plusieurs techniques. Le calcium a été dosé par colorimétrie après complexation par l'EDTA, le phosphore par spectroscopie visible (après formation d'un complexe), le carbonate par coulométrie et le sodium par spectroscopie d'émission de plasma à couplage inductif (ICP-OES). La quantité d'eau a été estimée à partir des analyses thermogravimétriques (ATG) (Figure 2.8). Tous les dosages sont détaillés en Annexe V.6.4, et les valeurs des quantités (moles) des éléments sont présentées dans le Tableau 2.2.

La quantité de calcium diminue avec l'ajout de pyrophosphate, de 0,96 mmol pour 0PyACC à 0,83 mmol pour 10PyACC. Le carbonate suit la même tendance mais de manière plus prononcée, passant de 0,96 mmol à 0,64 mmol de 0PyACC à 10PyACC. Au contraire, la quantité de pyrophosphate dosée dans la poudre augmente avec la quantité initiale introduite, ce qui est en accord avec les observations issues de la spectroscopie infrarouge. On peut noter que les ratios pyrophosphate/carbonate dosés augmentent en même temps que les ratios étant calculés à partir des ions introduits initialement dans la solution anionique, mais que ces ratios expérimentaux sont systématiquement supérieurs aux théoriques : par exemple pour 10PyACC le ratio Py/CO_3 vaut 13,8 %, à comparer aux 10 % théoriques. Le calcium étant initialement en défaut dans la synthèse, cet écart peut s'expliquer par une compétition entre les anions carbonate et pyrophosphate, favorable à ces derniers du fait de leur charge formelle et de leur nombre potentiel de liaisons plus élevées [354]. En prenant le cas particulier de 10PyACC, si on considère que tout le pyrophosphate initial précipite (5 mmol), 10 mmol de calcium sont alors consommées, tandis que les 40 mmol restantes de calcium sont associées aux ions carbonate, conduisant à un taux Py/CO_3 théorique égal à 5/40 soit 12,5 % mol., proche de la valeur expérimentale de 13,8 %. L'écart de la valeur expérimentale à cette valeur-ci pourrait provenir de la présence d'orthophosphate PO_4^{3-}, liée à la condensation incomplète du précurseur ou de son hydrolyse lors de son vieillissement [73], selon la réaction $P_2O_7{}^{4-} + H_2O \leftrightarrow HPO_4{}^{2-}$. Pour aller encore plus loin, en raisonnant maintenant uniquement sur les valeurs expérimentales des dosages des poudres, et en supposant que tous les ions carbonate sont précipités sous forme $CaCO_3$, d'après les valeurs de dosages il y a pour 10PyACC une quantité de Ca^{2+} liée aux ions phosphate (ortho et pyro) de 0,19 mmol, ce qui représente un ratio Ca/P de 1,08 (en divisant la précédente valeur de Ca par 2 fois la quantité de P_2O_7, car un ion pyrophosphate s'associe à deux ions Ca^{2+}). Une valeur supérieure à 1 signifie qu'il y a une fraction des ions calcium dosés qui n'est pas associée aux ions pyrophosphate (plus de Ca que de P provenant des $P_2O_7^{4-}$ dans le Ca/P). En supposant que cette fraction, notée *y*, provient en totalité des ions orthophosphate (précipités par exemple sous forme de phosphate tricalcique $Ca_3(PO_4)_2$, donc avec 2 P et 3 Ca associés) et avec (1-*y*) la fraction d'ions pyrophosphate (associés sous forme $Ca_2P_2O_7$ donc avec 2 Ca et 2 P), le ratio Ca/P calculé précédemment (qui vaut 1,08 pour 10PyACC) est alors égal à la somme des Ca/P des pyro et des orthophosphates, à savoir $2(1-y)/2 + 3y/2$. Toujours pour 10PyACC, la valeur de *y* est ainsi calculée à 16 % mol. de $Ca_3(PO_4)_2$ (par rapport à la quantité totale de P). Le même calcul donne 17 % mol. de $Ca_3(PO_4)_2$ pour 5PyACC.

La quantité de sodium est très faible et relativement stable entre les différentes poudres synthétisées (entre 0,00567 mmol et 0,00795 mmol), ce qui montre que les lavages après filtration ont été efficaces en enlevant la majorité des contre-ions. Le sodium, comportant une couche de solvatation très importante, peut catalyser la réaction d'hydrolyse du pyrophosphate même s'il est peu intégré au solide, en apportant des molécules d'eau proches [417].

Tableau 2.2 : Composition chimique des poudres zPyACC synthétisées, exprimées en mmol pour 100 mg de poudre, hormis pour les pourcentages massiques (% mass.) et molaires (% mol.) précisés dans la légende.

***z*PyACC**	**n pour 100 mg**						**Ratio $P_2O_7^{4-}$/ CO_3^{2-} (% mol.)**	
	Ca^{2+} (mmol)	CO_3^{2-} (mmol)	$P_2O_7^{4-}$ (mmol)	Na^+ (mmol)	H_2O (mmol)	H_2O (% mass.)	Initial	Dosé
0PyACC	0,96 ± 0,09	0,96 ± 0,02	0	0,00795 ± 0,00005	0,08 ± 0,08	1,5 ± 1,5	0,0	0
1PyACC	0,92 ± 0,07	0,88 ± 0,02	0,0098 ± 0,0005	0,00600 ± 0,00005	0,36 ± 0,05	6,4 ± 0,9	1,0	1,11 ± 0,03
2,5PyACC	0,88 ± 0,06	0,83 ± 0,02	0,024 ± 0,001	0,00634 ± 0,00006	0,54 ± 0,03	9,7 ± 0,5	2,5	2,86 ± 0,08
3,5PyACC	0,87 ± 0,06	0,80 ± 0,02	0,033 ± 0,002	0,00654 ± 0,00005	0,60 ± 0,01	10,8 ± 0,3	3,5	4,1 ± 0,1
5PyACC	0,87 ± 0,06	0,77 ± 0,02	0,046 ± 0,003	0,00567 ± 0,00006	0,56 ± 0,03	10,0 ± 0,6	5,0	6,0 ± 0,2
10PyACC	0,83 ± 0,06	0,64 ± 0,02	0,088 ± 0,004	0,00681 ± 0,00008	0,78 ± 0,11	14,0 ± 2,0	10,0	13,8 ± 0,5

Pour respecter l'électroneutralité, les matériaux *z*PyACC doivent contenir la même quantité d'ions chargés positivement et négativement. Sur la Figure 2.7 sont tracés les nombres de mmoles des ions Ca^{2+}, Na^+, CO_3^{2-} et $P_2O_7^{4-}$ multipliés par leur charge formelle respective, ainsi que la somme de ces valeurs. La somme est inférieure à 0,04 mmol pour toutes les poudres, traduisant des charges pratiquement à l'équilibre. L'excès de charges positives peut provenir de la non prise en compte des orthophosphates, dont la présence a été discutée précédemment. En effet, en reprenant les calculs ci-dessus et en considérant les taux d'orthophosphate extraits de ceux-ci, pour 5PyACC et 10PyACC la somme diminue et devient égale à 0,006 mmol et 0,007 mmol respectivement (contre 0,022 mmol et 0,035 mmol tracés sur la Figure 2.7 bas). Cela signifie qu'il n'y a pas d'autres ions intégrés en quantité significative dans les *z*PyACC. C'est assez étonnant au regard du pH de synthèse élevé, et de la présence d'hydroxydes qui, comme il a déjà été dit, stabilisent l'ACC en s'incorporant à son réseau. Mais c'est en accord avec l'absence de bande OH dans le spectre FTIR de la Figure 2.5. La présence d'ions pyrophosphate explique probablement la non-intégration des d'hydroxydes par répulsions électrostatiques. Le pH de synthèse élevé, pour lequel moins de 10 % de carbonates sont sous la forme HCO_3^- (Figure 2.2), limite l'intégration de ces derniers dans les *z*PyACC.

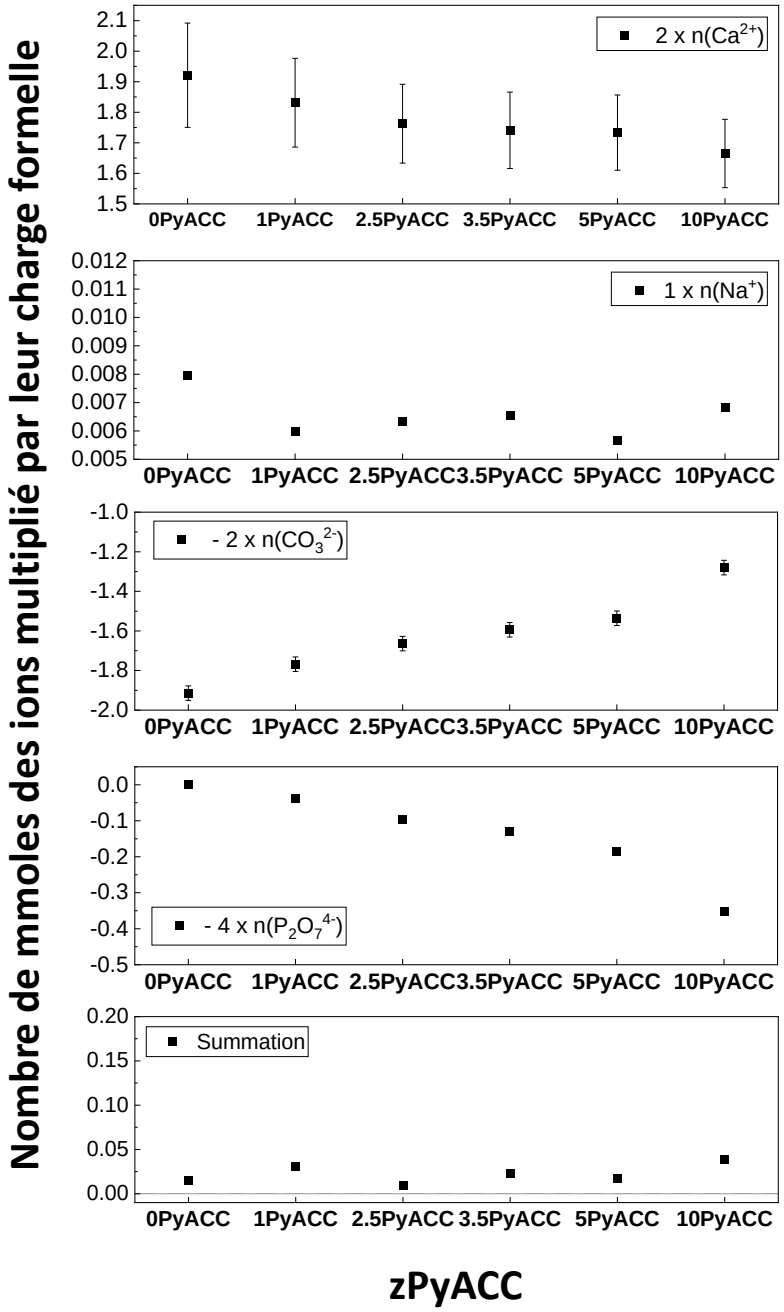


Figure 2.7 : Tracé du nombre de mmoles (pour 100 mg de poudre de zPyACC) d'ions calcium, sodium, carbonate et pyrophosphate multiplié par leur charge respective, pour chacune des poudres zPyACC synthétisées. Le dernier graphique est la somme des quatre premiers.

La valeur de la quantité d'eau présentée dans le Tableau 2.2 est extraite de la perte de masse jusqu'au premier palier (vers 400 °C) dans les courbes thermogravimétriques sur la Figure 2.8a. Elle vaut environ 1,5 % mass. pour 0PyACC, ce qui semble incohérent avec les DRX montrant que cette poudre est composée de calcite (donc anhydre). Mais elle contient aussi une petite fraction non cristalline (13 %, *cf*. Tableau 2.1) pouvant expliquer la présence d'eau, et il y a également une grande incertitude sur cette valeur. La quantité d'eau augmente ensuite rapidement avec le taux de pyrophosphate et vaut 14,0 % mass. pour 10PyACC. Ces valeurs sont en accord avec la littérature, la plupart des ACC synthétiques contiennent entre 11 et 22 % mass. d'eau [276,325], et les ACC biogéniques environ 15 % mass. [80,172]. Sur les thermogrammes, la valeur de la perte de masse finale varie pour les différents

*z*PyACC : elle vaut - 36,7 % pour 10PyACC, - 40,9 % pour 5PyACC, - 44,4 % pour 3,5PyACC puis entre - 45,0 % et - 45,7 % pour les trois autres composés. Elle correspond à la décomposition de $CaCO_3$ en $CaO + CO_2$, par conséquent il est logique d'avoir une perte de masse moins élevée (en valeur absolue) pour les poudres contenant moins de carbonate, *i.e.* celles avec le plus de pyrophosphate, car les composés de pyrophosphate de calcium formés à de telles températures sont stables [76].

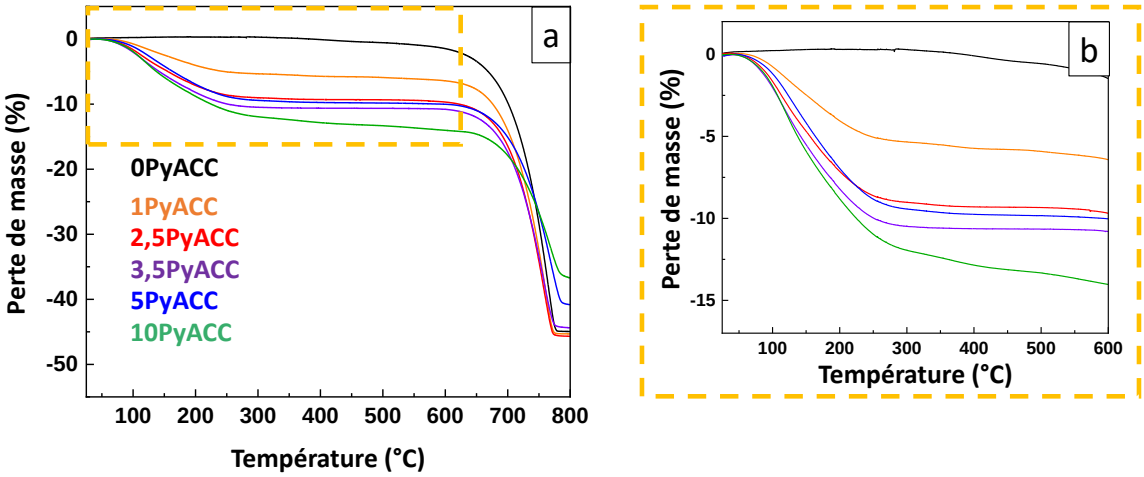


Figure 2.8 : Courbes ATG des six différents zPyACC synthétisés, entre 25 et 800 °C (a) et agrandie sur le premier palier entre 25 °C et 600 °C (b), pour des analyses réalisées avec une rampe de 7 °C/min sous flux d'air.

Sur les courbes d'ATD, sur la Figure 2.9a, un premier pic endothermique est visible, centré vers 110 °C, correspondant à la déshydratation des poudres. Ce pic est très peu intense pour 0PyACC, en accord avec son faible contenu en eau. Cependant pour les autres *z*PyACC, ce pic s'étend jusqu'à presque 300 °C, témoignant de la présence d'eau structurale liée de manière plus forte aux carbonates (en addition à de l'eau plus mobile probablement adsorbée en surface des particules). Ensuite, un ou plusieurs pics exothermiques apparaissent pour les composés contenant du pyrophosphate (Figure 2.9b) : il y a un pic à 338 °C et 370 °C pour 1PyACC et 2,5PyACC respectivement, l'échantillon 2,5PyACC présentant en addition un épaulement à 411 °C. Pour 3,5PyACC, un pic intense à 326 °C est accompagné d'un pic très peu intense à 419 °C. Enfin, pour 5PyACC trois pics exothermiques sont visibles (intense à 362 °C et plus faibles à 421 °C et 473 °C), et pour 10PyACC seulement deux pics sont détectables à 432 °C et 481 °C mais d'intensité équivalente. Afin de pouvoir les identifier, des DRX (Figure 2.10) ont été réalisées après traitements thermiques des poudres, en les calcinant dans un four à 600 °C et 800 °C pendant 4 h, et les proportions respectives des phases sont extraites grâce au logiciel EVA. Après une calcination à 600 °C (Figure 2.10a), les poudres sont composées de calcite, hydroxyapatite et CaO, dans des proportions variables : 60 % de calcite, 15 % d'HA et 25 % de CaO pour $2,5PyACC_{calc\text{-}600}$ et 30 % de calcite, 60 % d'HA et 10 % de CaO pour $10PyACC_{calc\text{-}600}$. A 800 °C, la calcite est décomposée en totalité (formant du CaO et du CO_2), elle n'est donc plus visible dans les diffractogrammes RX. L'HA est par contre stable à cette température, et on retrouve pour $2,5PyACC_{calc\text{-}800}$ 20 % d'HA et 80 % de CaO, tandis que $10PyACC_{calc\text{-}800}$ est composée de 70 % d'HA et 30 % de CaO (Figure 2.10b). La proportion d'HA formée augmente donc avec la quantité de pyrophosphate initiale introduite, mettant en évidence une transformation de celui-ci. Il a été reporté dans la littérature que le pyrophosphate peut, par hydrolyse interne impliquant de l'eau structurale, former des orthophosphates [73,188,274], cristallisant ensuite en HA entre 450 et 500 °C. C'est probablement le mécanisme à l'œuvre pendant l'ATG, donnant un deuxième pic exothermique sur la courbe d'ATD, le premier pic étant associé à la cristallisation de l'ACC en calcite après sa déshydratation [309,333] (ce qui explique pourquoi il n'est pas présent sur la courbe de 0PyACC déjà

cristallin). On pourra noter que les températures de cristallisation des *z*PyACC (premier pic exothermique, Figure 2.9b) n'évoluent pas de manière intuitive : elles sont plus élevées pour 1PyACC et 2,5PyACC que pour 3,5PyACC et 5PyACC contenant pourtant une plus grande proportion de pyrophosphate stabilisateur, et une température de cristallisation plus haute est en général synonyme de stabilité thermodynamique exacerbée [185]. Cependant, le fait d'avoir dans ces poudres initiales (1PyACC, 2,5PyACC) un mélange de phase amorphe et de cristaux de calcite peut ralentir la diffusion thermique des espèces ioniques et ainsi décaler le pic de cristallisation vers des températures plus hautes. Entre 3,5PyACC et 10PyACC l'augmentation de la température de cristallisation est en accord avec la stabilisation croissante par le pyrophosphate, qui lui s'hydrolyse et cristallise en HA comme décrit précédemment. Il y a également plus d'eau dans les composés avec plus de pyrophosphate, et les molécules d'eau sont des facteurs additionnels de stabilisation de la phase amorphe. Des hétérogénéités de taille de particules peuvent également expliquer la présence de plusieurs évènement thermiques distincts [282]. Enfin, autour de 770 °C un intense pic endothermique est visible sur les courbes ATD (Figure 2.9c), correspondant à la décomposition de la calcite en CaO + CO_2 (en accord avec les DRX de la Figure 2.10). Ici encore, la température du pic est reliée à la stabilisation de la poudre, et on peut noter deux comportements différents : la poudre composée principalement de calcite, 0PyACC, a son pic centré à 767 °C, température qui diminue pour 1PyACC (765 °C) et 2,5PyACC (758 °C). Ce phénomène pourrait être lié à une différence de taille des cristaux de calcite initiaux. Lors de la décomposition de cette phase, la diffusion du CO_2 serait alors ralentie pour les cristallites les plus grands induisant un décalage de la température du pic endothermique vers les plus hautes températures (pour 0PyACC par rapport à 1PyACC et 2,5PyACC). A contrario, les pics de 5PyACC et 10PyACC apparaissent à une température plus élevée (à 772 °C tous les deux), ce qui peut être dû à la présence de cristaux d'HA issus de la décomposition puis de la cristallisation du pyrophosphate. Ces nanocristaux pourraient alors de la même manière défavoriser la diffusion du CO_2.

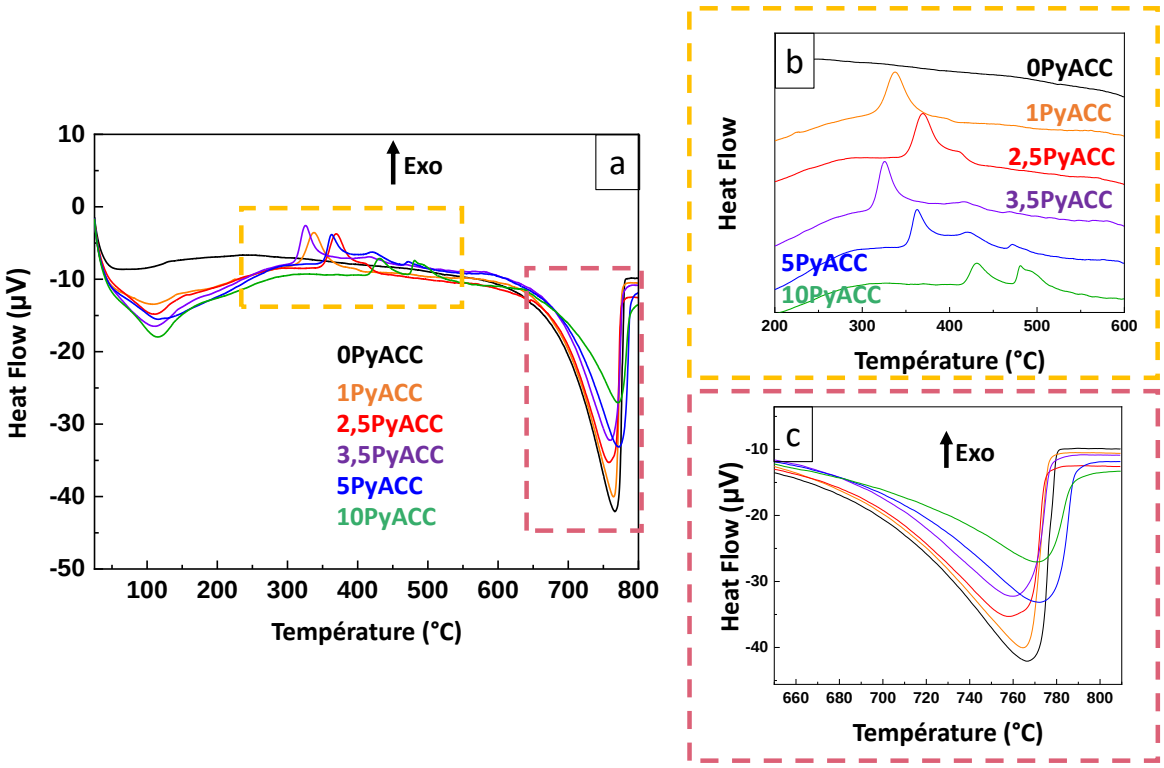


Figure 2.9 : Courbes ATD (b) des six différents zPyACC synthétisés, entre 25 et 800 °C (a), agrandie entre 200 °C et 600 °C (rectangle jaune, b) et entre 650 °C et 810 °C (rectangle rose, c), pour des analyses réalisées avec une rampe de 7 °C/min sous flux d'air. Sur (b), les courbes sont décalées verticalement pour plus de clarté.

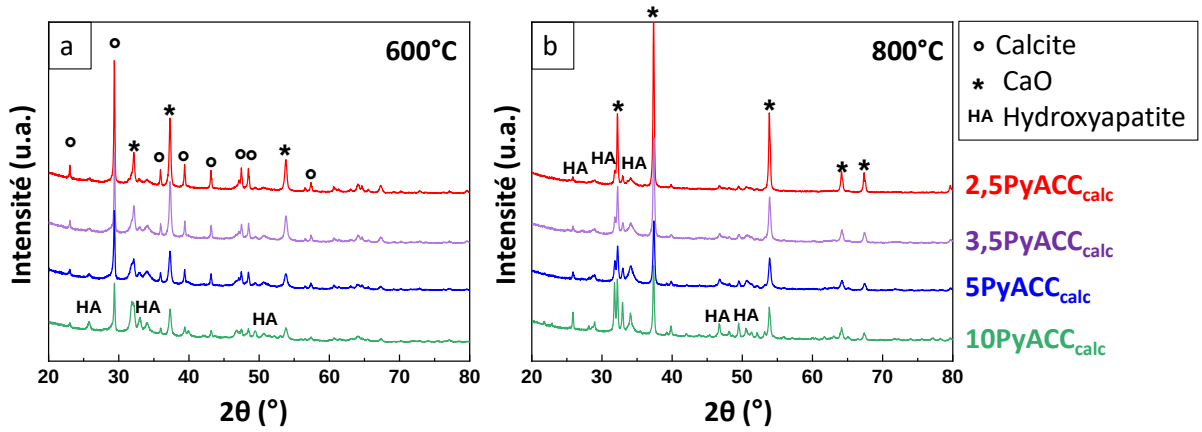


Figure 2.10 : Diffractogrammes RX de 2,5PyACC, 3,5PyACC, 5PyACC et 10PyACC après des traitements thermiques à 600 °C (a) et 800 °C (b) à l'air pendant 4 h.

Pour conclure sur ces analyses thermiques, le pyrophosphate permet bien une stabilisation de l'amorphe, comme l'atteste le déplacement du pic associé à sa cristallisation (ATD), qui va de pair avec une plus grande quantité d'eau. L'eau structurale pourrait stabiliser de manière additionnelle l'ACC via des liaisons hydrogène avec les carbonates, empêchant sa déshydratation et par conséquent sa cristallisation [309,313] (comme décrit dans le Chapitre 1). De surcroit, il a déjà été montré que les ions (ortho)phosphate peuvent stabiliser l'ACC, ce qui se traduit de la même manière qu'ici par un déplacement de son pic de cristallisation à plus haute température [280,325].

Une fois montrée l'influence du pyrophosphate sur les ACC à l'échelle macroscopique et au niveau de sa composition, nous avons voulu caractériser les différentes échelles d'organisation ces *z*PyACC.

III MISE EN EVIDENCE D'UNE ORGANISATION MULTI-ECHELLE DES PYACC

III.1 A L'ECHELLE DES AGREGATS DE PARTICULES

Les micrographies de MEB à canon à émission de champ (MEB-FEG) des *z*PyACC, sur la Figure 2.11, montrent que la morphologie des particules varie en fonction de la quantité de pyrophosphate. Pour 0PyACC (Figure 2.11a), des agrégats de cristaux de forme cubique ou en parallélépipèdes, forme classique des cristaux de calcite [97], sont obtenus. Des défauts (marches, coins, …) sont visibles à la surface de certains cristaux, en lien avec le mécanisme de croissance cristalline par germination bidimensionnelle ou en spirale, ou encore potentiellement dus à la rapidité de la co-précipitation limitant le temps de réaction nécessaire à une (ré)organisation parfaite du cristal. On peut aussi observer des agglomérats globulaires (flèche rouge sur la Figure 2.11a et dans l'agrandissement Figure 2.11b) identifiés comme étant composés d'ACC en accord avec les pourcentages de cristallinité du Tableau 2.1, témoignant de la coexistence d'une phase amorphe avec les cristaux de calcite (cubiques, décrits plus haut). Cette dernière pourrait être un intermédiaire de formation de la calcite, comme décrit dans la littérature [162,418], et qui ici n'aurait pas eu le temps de cristalliser du fait des précipitation, lavage et filtration rapides et du stockage à basse température limitant cinétiquement les évolutions. Dès l'ajout de pyrophosphate, la morphologie des cristaux est modifiée : on ne retrouve plus de surfaces lisses comme pour 0PyACC mais des petits cristaux qui s'assemblent pour 1PyACC et 2,5PyACC (Figure 2.11c, 2.11e), et coexistent avec des particules arrondies caractéristiques de l'ACC [179,325] (Figure 2.11d, 2.11f). Cette observation concorde avec la DRX montrant l'affaiblissement de l'intensité relative et l'élargissement des pics de diffraction ainsi qu'une diminution du pourcentage de cristallinité de

0PyACC à 2,5PyACC. Pour les poudres caractérisées comme étant amorphes par DRX (3,5PyACC, 5PyACC, 10PyACC), des agglomérats de particules d'ACC relativement sphériques sont visibles (Figure 2.11g, 2.11h, 2.11i), dont les mesures par le biais d'ImageJ ont montré un diamètre entre 40 et 50 nm relativement homogène.

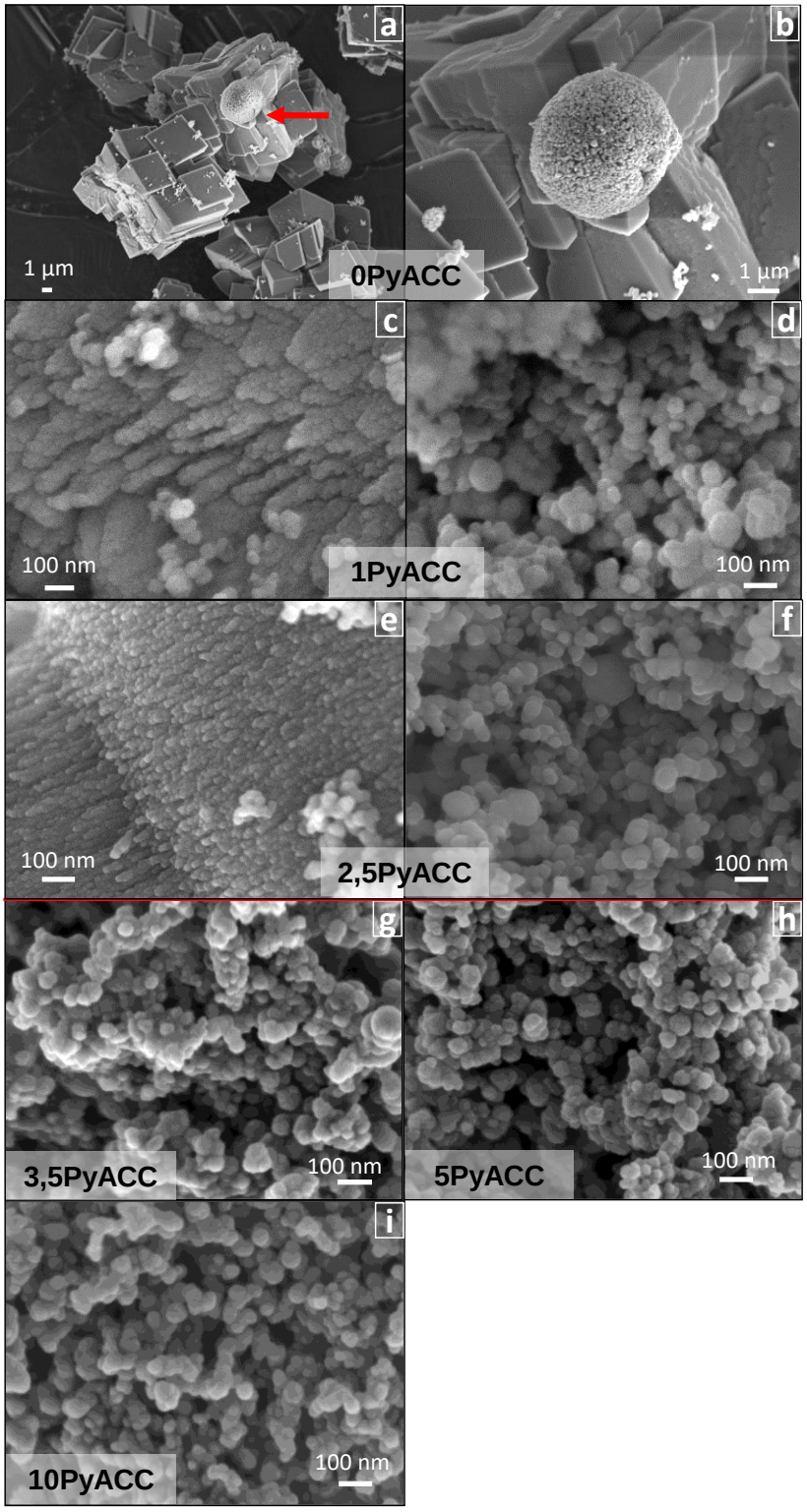


Figure 2.11 : Images MEB-FEG des poudres zPyACC synthétisées : 0PyACC (a,b), 1PyACC (c,d), 2,5PyACC (e,f), 3,5PyACC (g), 5PyACC (h), 10PyACC (i). La flèche rouge en (a) indique la zone dans laquelle le zoom (b) a été réalisé.

Le MEB-FEG permet de visualiser la morphologie des particules et par conséquent d'identifier l'influence d'un paramètre (ici l'introduction de pyrophosphate) sur celle-ci. Toutefois la microscopie (électronique, mais aussi optique) est une technique d'observation locale, ne permettant pas de déterminer des tailles moyennes. Pour pallier à cela, des mesures de surface spécifique par adsorption d'azote ont été effectuées en utilisant la méthode Brunauer, Emmett et Teller (BET) sur un appareil multipoints. Cette méthode est basée sur la théorie d'adsorption de gaz en multicouches en fonction de la pression appliquée, elle permet de mesurer la surface de la poudre pouvant être en contact avec un milieu et ainsi d'appréhender son potentiel de réactivité. Au préalable des mesures, il est important de réaliser une étape de dégazage, qui élimine l'eau adsorbée en surface des particules, celle-ci pouvant fausser la mesure. Mais, comme il a été montré par ATG (Figure 2.8), ici une fraction d'eau est adsorbée mais une autre est structurale. Déshydrater totalement les poudres reviendrait à modifier leur structure et par conséquent les mesures n'apporteraient que peu d'information sur la réactivité des poudres en solution par exemple. Plusieurs essais ont alors été réalisés, afin de trouver un compromis entre dégazage optimal et durée de mesure acceptable. Il a finalement été choisi un dégazage de 2 h à 50 °C. Les surfaces spécifiques mesurées sont alors présentées sur la Figure 2.12, les isothermes étant tracés en Annexe AII.2. Elle est très faible (< 1m²/g) dans le cas de 0PyACC, composé essentiellement de gros cristaux de calcite de surface lisse, mais elle augmente nettement dès l'introduction de pyrophosphate (24,3 ± 0,1 m²/g pour 1PyACC et 39,3 ± 0,2 m²/g pour 2,5PyACC), avec l'apparition de particules amorphes sphériques de petite taille et la diminution de taille des cristaux. La surface spécifique des poudres totalement amorphes 3,5PyACC, 5PyACC et 10PyACC est du même ordre de grandeur, entre 47,9 ± 0,2 m²/g et 56,6 ± 0,3 m²/g. C'est cohérent avec les micrographies de MEB-FEG et la surface granulaire des particules (Figure 2.11). Néanmoins la légère augmentation des valeurs entre 3,5PyACC et 10PyACC suggère la diminution de la taille des particules quand le taux de pyrophosphate augmente (non observé en MEB-FEG par manque de résolution). Cela en accord avec l'ATD (Figure 2.9) montrant des températures de cristallisation (premier pic exothermique) augmentant avec *z*, car des particules d'ACC plus petites sont selon Zou *et al.* [320] plus stables face à la cristallisation en température. Dans la littérature, des ACC avec des surfaces spécifiques largement supérieures (300 à 600 m²/g) sont obtenues, comme par le groupe de Cheung [419,420] mais les conditions de dégazage qu'ils ont mis en œuvre sont aussi nettement différentes, avec un chauffage de 6 h à 100 °C. Les valeurs mesurées ici sont en revanche comparables à la surface spécifique de 42 m²/g d'un ACC de 50 nm de diamètre dégazé 18 h à température ambiante [311] ou la même mais pour un ACC de 90 nm sans dégazage [319]. De même, la surface spécifique de 0PyACC est similaire à celle de la calcite de 0,99 m²/g (après 18 h à température ambiante) [311].

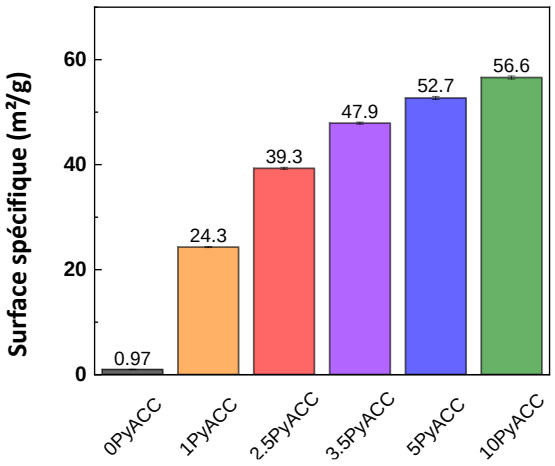


Figure 2.12 : Surface spécifique des poudres zPyACC synthétisées, mesurée par la méthode BET.

Il apparaît alors avec ces résultats que le pyrophosphate semble avoir un rôle que l'on pourrait qualifier de « tensioactif », stabilisant les particules en diminuant leur taille, sans que le mécanisme ne soit encore élucidé.

III.2 A L'ECHELLE DES PARTICULES

Devant le manque de résolution du MEB-FEG et dans le but de visualiser les particules individuellement, des analyses de microscopie électronique de transmission (MET) en balayage à haute résolution (HR) ont été effectuées sur les deux compositions les plus stables, à savoir 5PyACC et 10PyACC. Au préalable, pour permettre l'observation en limitant les évolutions de la particule observée, les poudres sont inclues dans une résine polymère, puis découpées par ultramicrotomie en couche fines de 80 à 100 nm et déposées sur une grille d'observation MET. Les observations sont faites avec une faible tension d'accélération (80 kV) pour limiter la dégradation des échantillons, et en champ sombre (*High Angle Anular Dark Field,* HAADF), pour lequel les éléments les plus lourds apparaissent en ton plus clair. Une analyse dispersive en énergie (EDS) est couplée au MET afin d'analyser la répartition des principaux éléments à l'échelle de la particule.

Les particules observées sont relativement sphériques, mais parfois avec des formes plus variées du fait de la superposition de deux ou plusieurs particules dans la coupe. Leur diamètre, mesuré via ImageJ (sur 5 à 10 images MET), vaut entre 10 et 60 nm pour 10PyACC et entre 70 et 100 nm pour 5PyACC. Même si le nombre faible de mesures ne permet pas une réelle quantification, il montre la présence de plus petites particules quand précipitées avec une quantité plus élevée de pyrophosphate, en accord avec les mesures de surface spécifique précédentes. De surcroit, moins de particules sont présentes sur les coupes de 5PyACC comparées à celles de 10PyACC. Or lors de la microtomie les plus grosses particules peuvent être arrachées par la lame diamant. Cela se traduit par la présence de nombreux trous dans la résine, et est exacerbé dans le cas de 5PyACC. Les particules analysées sont amorphes mais cristallisent rapidement sous le faisceau électronique, comme l'attestent les transformées de Fourier rapides des images, en Annexe AII.3. La Figure 2.13 présente les micrographies MET HR d'une particule de 5PyACC (sélectionnée dans ce cas car individualisée), acquises juste après focalisation (Figure 2.13a), un peu plus tard au début de l'analyse EDS (Figure 2.13b) et après l'analyse EDS, environ 7 min plus tard (Figure 2.13c). La particule, de 81 nm de diamètre en moyenne, apparaît relativement homogène en termes de composition mais est modifiée au cours du temps sous le faisceau. En effet, on voit apparaître une zone plus sombre (donc moins dense électroniquement) à l'intérieur, qui se déplace pendant l'acquisition et grossit, mais sans pour autant modifier la forme de la particule et son enveloppe externe. Ce phénomène a également été observé par Du *et al.* [166] dans des particules d'ACC synthétisées par atomisation-séchage (*spray-drying*). Ils suggèrent que ces zones moins denses sont créées par la radiolyse de l'eau : de l'eau structurale est transformée en vapeur d'eau par l'énergie apportée par le faisceau d'électrons, puis ce gaz piégé dans la particule forme une bulle (zone moins dense électroniquement visible en MET) à l'intérieur de celle-ci. Ces « poches » de vapeur d'eau paraissent être corrélées au degré d'hydratation : dans l'article, des particules moins hydratées (laissées dans un dessiccateur pendant deux mois) présentent des zones moins denses bien moins étendues que pour les particules observées juste après synthèse (avec des contenus en eau plus élevés) [166]. Ici les deux compositions 5PyACC et 10PyACC contiennent des quantités d'eau élevées (10 – 14 % mass., Tableau 2.1), similaires à celles de l'ACC synthétisé par atomisation-séchage (de formule $CaCO_3.1,2H_2O$ donc avec 18 % mass. d'eau), on peut donc supposer que le même phénomène a lieu et que la zone moins dense observée sur les Figures 2.13b et 2.13c est composée de vapeur d'eau formant une bulle. Celle-ci est bloquée à l'intérieur de la particule, et ce d'autant plus par la présence de la résine polymérique, qui empêche la déformation de l'enveloppe de la particule.

Les analyses EDS (Figures 2.13d, 2.13e , 2.13f) présentent la répartition d'oxygène, de phosphore et de calcium respectivement dans le volume. Il faut noter que de l'oxygène est aussi détecté en dehors de la particule (dans la résine polymérique). La répartition d'oxygène et de calcium peut à première vue paraître inhomogène, avec une zone moins concentrée (moins colorée) sur la partie basse droite de la particule. Cependant, l'EDS est une technique sensible au volume : pour O et Ca, les atomes de la surface supérieure de la particule sphérique sont détectés, ainsi que ceux de la surface inférieure après avoir traversé le volume interne de la particule, excepté pour la partie droite basse masquée par la bulle de vapeur d'eau. Dans cette dernière zone, on ne détecte que les atomes de la surface supérieure, ce qui explique la coloration moins importante. En ce qui concerne le phosphore, de concentration plus faible, la faible durée de l'acquisition (nécessaire pour éviter une dégradation trop importante de la particule) permet uniquement de détecter les atomes de P provenant de la surface supérieure de la particule (et non de la partie inférieure), ce qui explique la distribution paraissant homogène malgré la présence de la bulle de gaz. Le même type de distribution a été observé pour les autres particules des deux échantillons 5PyACC et 10PyACC, suggérant une coexistence à l'échelle nanométrique des ions carbonate, pyrophosphate et calcium.

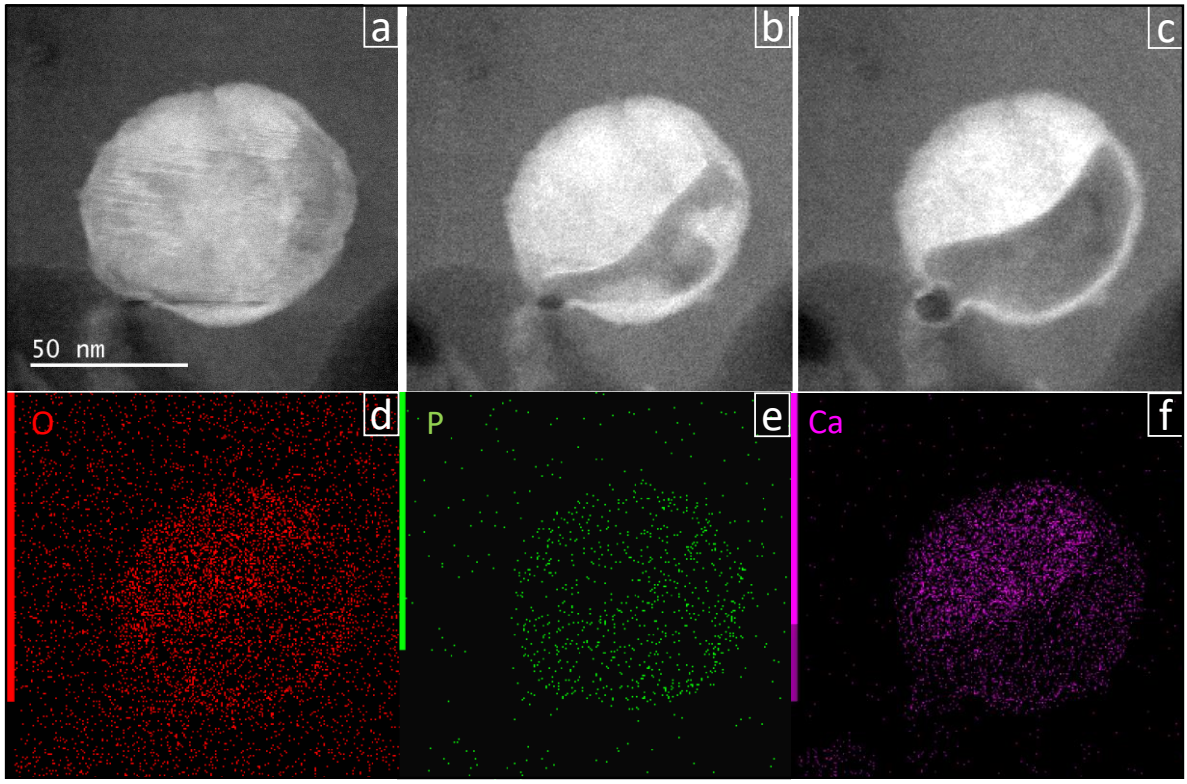


Figure 2.13 : Images MET HR des particules de 5PyACC après inclusion en résine et ultramicrotomie. Les images en champ sombre (les éléments les plus denses électroniquement apparaissant plus clair, et inversement) sont prises juste après la focalisation (a), et avant (b) et après (c) les analyses EDS. Les distributions des éléments oxygène (d), phosphore (e) et calcium (f) sont évaluées après 60 balayages (6min34s). L'oxygène apparaît aussi à l'extérieur de la particule en tant que constituant de la résine polymérique.

III.3 A L'ECHELLE SUB-PARTICULAIRE

Dans la littérature, plusieurs articles font état de l'existence de sous-entités de taille nanométrique, clusters proto-cristallins avec une organisation à courte distance similaire à celle d'une des phases cristallines de $CaCO_3$ [125,179]. Les techniques que nous avons mises en œuvre dans les parties précédentes (MEB-FEG, MET, ...) sont à plus grande échelle, ne donnant aucune information de l'ordre

du nanomètre. La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) est au contraire bien adaptée, permettant d'obtenir au cours d'une même analyse des informations sur différentes échelles de taille. C'est pourquoi des analyses SAXS ont été menées sur les *z*PyACC, afin de recueillir les informations complémentaires apportées par cette technique. Il faut cependant noter que c'est une technique moyennée sur tout le volume, qui ne permet d'avoir des informations sur la structure des objets que par l'application d'un modèle sur les courbes obtenues.

Le SAXS une technique de caractérisation non destructive basée sur la diffusion élastique des rayons X aux faibles angles par des objets nanométriques. Dans le cas particulier de centres diffuseurs éloignés (1 à 100 nm), les rayons diffusés produisent des interférences de petite période, et par conséquent les angles associés sont également petits, d'où l'utilisation de SAXS. Au contraire, pour des centres diffuseurs proches comme des atomes, la diffusion aux grands angles (WAXS) permet de mesurer les interférences de grande période formées. Afin d'avoir de petits angles de diffusion et donc d'accéder à des plus grandes tailles d'objets, il est alors nécessaire d'éloigner l'objet du détecteur. Sur les appareils de laboratoire, cette distance mesure 1 à 3 m, mais elle peut augmenter jusqu'à 30 m sur une ligne de synchrotron, avec une brillance spectrale très élevée (intensités sur plus de 6 décades). La contrainte majeure est de maintenir le tube sous vide (pour éviter les absorptions ou re-diffusion des rayons X par les atomes de l'air), limitant les distances accessibles aux dispositifs de laboratoire. Pour ceux-ci, une alternative consiste à remplir le tube avec de l'hélium, ce qui limite aussi les problèmes de pression exercée sur les fenêtres du tube (dont le matériau constitutif doit résister à la différence de pression spécialement dans le cas d'un tube sous vide mais être transparents aux rayons X).

Le principe du SAXS est résumé sur la Figure 2.14 : des rayons X incidents sont émis par une source de rayons X (source au molybdène ou au cuivre en général), puis traversent l'échantillon mis en capillaire ou sur un porte-échantillon entre deux couches de Kapton (matériau peu absorbant des rayons X). Les rayons X sont alors diffusés par les « objets » constituant l'échantillon (agrégats de particules, particules ou entités sub-particulaires) selon un vecteur $\overrightarrow{k_s}$, formant par différence avec le vecteur initial $\overrightarrow{k_i}$ un vecteur $\vec{q}$ appelé **vecteur de diffusion**. Le rayon direct non dévié est stoppé par un *beam stop* (pièce cylindrique souvent en plomb) afin d'éviter l'endommagement du détecteur et une trop grande intensité au centre qui masquerait les différences d'intensité radiales. Le vecteur $\vec{q}$ est relié à l'angle 2θ (angle de diffraction en DRX) par la relation $q = 2k_i \sin\theta = \frac{4\pi \sin\theta}{\lambda}$.

$$\vec{q} = \overrightarrow{k_i} - \overrightarrow{k_s}$$

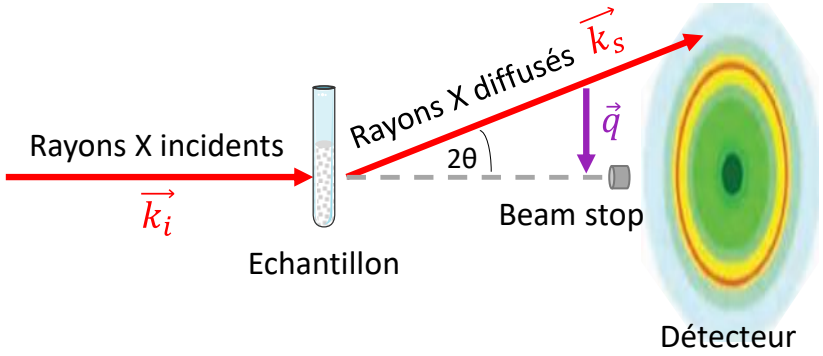


Figure 2.14 : Schéma du principe du SAXS : des rayons X incidents traversent l'échantillon et sont diffusés par les objets le composant puis collectés par le détecteur selon un angle 2ϑ, formant un vecteur de diffusion $\vec{q}$. Le beam stop bloque le faisceau direct non dévié.

Le détecteur collecte la direction et l'intensité des rayons diffusés, qui forment une figure 2D. Celle-ci est intégrée radialement pour donner une courbe de l'intensité collectée en fonction de q. Pour un système d'objets identiques diffusant en SAXS, l'intensité est définie par l'équation 2.1 [421] :

$$I(\vec{q}) = \varphi.\Delta\rho^2 .{V_{obj}}^2.P(\vec{q}).S(\vec{q}) \qquad \textit{(Equation 2.1)}$$

avec $\varphi = \frac{N}{V_{sondé}}$ la fraction volumique d'objets dans le volume sondé, $\Delta\rho$ le contraste de densité de longueur de diffusion entre l'objet diffusant et le milieu, V_{obj} le volume d'un diffusant, $P(\vec{q})$ le facteur de forme des objets dépendant de leur forme et structure interne, et $S(\vec{q})$ le facteur de structure, dépendant des interactions entre les objets diffusants. La densité de longueur de diffusion électronique ρ (*scattering length density*, SLD) est homogène à une densité surfacique, et est égale à $\rho_{RX} = \frac{\sum_i Z_i}{V_{mol}} r_e$, avec Z_i le nombre d'électrons par atome, V_{mol} le volume moléculaire (proportionnel à la densité volumique d'électrons), et r_e le rayon classique de l'électron tel que $r_e = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0 m_e c^2} = 2{,}82.10^{-13} cm$.

Il est à noter que le SAXS est sensible à un contraste de SLD : il est donc important d'avoir des particules denses électroniquement dans un milieu continu peu dense ou inversement pour pouvoir distinguer ces objets. L'intensité étant proportionnelle à la différence de SLD au carré, les différences positives (particules denses) ou négatives (trous, pores) contribuent de la même manière. Pour des objets isolés ou à très faible concentration, le facteur de structure S(q) vaut 1. Mais dès lors que des interactions entre les particules entrent en jeu, le facteur de structure devient une intégrale de la fonction de distribution des paires des centres de particules G(r), traduisant la probabilité de trouver une particule à une distance r.

Les six poudres *z*PyACC synthétisées ont été placées dans un support entre deux couches de Kapton, puis la mesure réalisée pour trois distances échantillon-récepteur. Après une combinaison des données d'acquisition provenant des différentes mesures, les courbes tracées en fonction du vecteur de diffusion q sont obtenues (Figure 2.15). Un écart d'intensité est notable entre les courbes des poudres cristallines (0PyACC et 1PyACC) et les autres. Or, l'intensité dépend de plusieurs paramètres, en accord avec l'équation 2.1. Tous les *z*PyACC ayant des compositions proches, les contrastes de densités sont sensiblement égaux. En supposant que le facteur de structure est le même (hypothèse discutable car les interactions entre petites particules sont différentes de celles inter-cristaux, mais utilisée comme approximation), l'augmentation de l'intensité collectée entre 0PyACC et 1PyACC et les autres poudres peut provenir d'une augmentation de la fraction volumique d'objets, du volume de ces objets ou du facteur de forme. Ce dernier est très différent entre les « gros » cristaux cubiques microniques de 0PyACC (visibles en MEB-FEG sur la Figure 2.11a) et les « petites » particules nanométriques sphériques d'amorphe (Figures 2.11g, 2.11h, 2.11i), ce qui rend la comparaison plus complexe. Par contre pour 1PyACC, les cristaux sont de taille nanoscopique et coexistent avec des particules d'amorphe, on peut donc négliger la contribution du facteur de forme dans la comparaison avec 2,5PyACC et les poudres amorphes. Or il a été montré précédemment que la surface spécifique augmente avec l'introduction de pyrophosphate, donc que la taille des particules diminue (Figure 2.12). Par conséquent le volume des objets diffusants (les particules) diminue aussi. L'augmentation de l'intensité entre 1PyACC et 2,5PyACC pourrait alors ne provenir que de l'augmentation de la fraction volumique d'objets, et donc d'une densification de la poudre. C'est cohérent avec la diminution du pourcentage de cristallinité, les cristaux formant nécessairement des espaces vides autour d'eux à la différence des petites particules amorphes.

Au-delà de cette tendance générale, les courbes SAXS peuvent être divisées en quatre domaines [422], comme illustré sur la Figure 2.14 et schématisé sur la Figure AV.1 (Annexe V.5.2) :

- Les faibles vecteurs de diffusion q (domaine I ou domaine de Guinier), donnant des informations sur les plus grandes distances et ainsi une première dimension D_1 caractéristique de la taille des nanoparticules ;
- La pente de la courbe, associée à la surface des nanoparticules (domaine II ou domaine de Fourier) ;
- Le domaine III ou domaine de Porod des q intermédiaires, représentatif de la taille R_2 des sous-entités particulaires et des interactions entre elles ;
- Finalement, le domaine IV à grand q correspond à la diffusion/diffraction induite par le réseau atomique ou cristallin le cas échéant, souvent appelé WAXS2D.

Chacun de ces quatre domaines est décrit plus en détail par la suite.

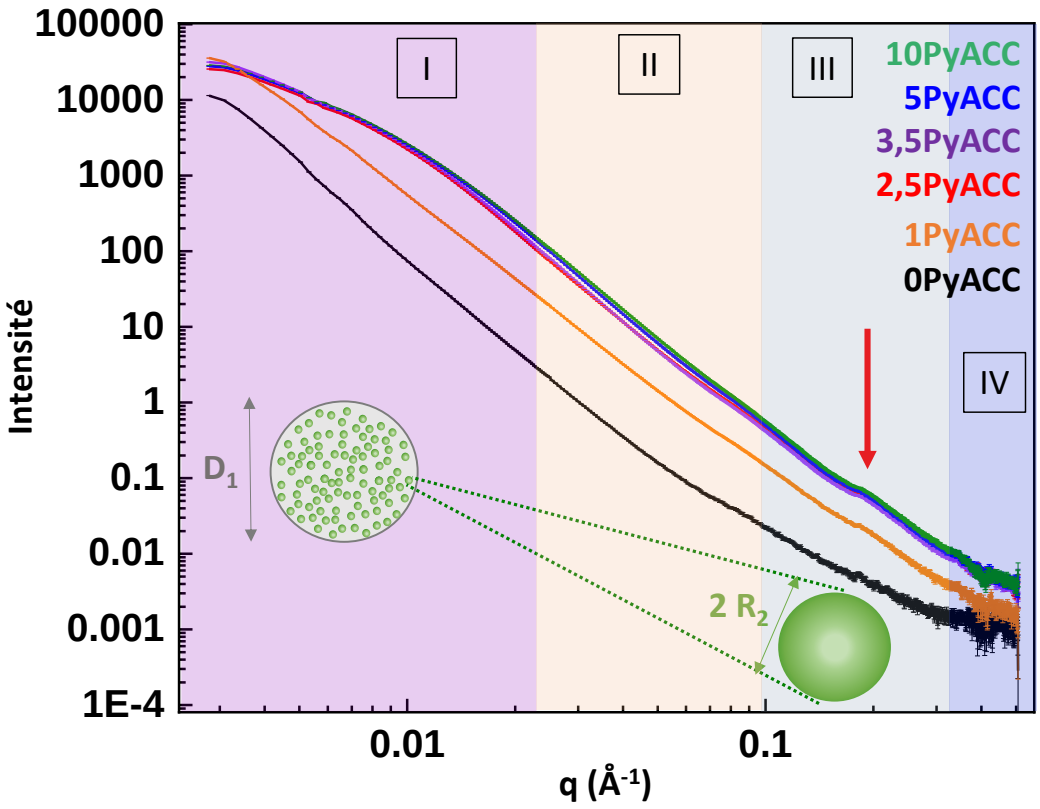


Figure 2.15 : Courbe des données SAXS expérimentales des zPyACC, tracée en log(I(q))=log(q), avec I l'intensité et q le vecteur de diffusion. Quatre domaines peuvent être identifiés, détaillés dans le texte. La flèche rouge indique un maximum d'intensité dans le domaine III.

Domaine I

Pour le domaine de Guinier, si qR << 1 (avec R le rayon de particules) et pour des particules sans interaction la loi de Guinier s'applique, selon $I(\vec{q}) = \varphi . \Delta\rho^2 . {V_{obj}}^2 . \exp(-\frac{(qR_G)^2}{3})$ avec R_G le rayon de giration (moyenne quadratique des distances au centre de l'objet), permettant de calculer plus aisément le rayon des nanoparticules. Dans notre cas, les particules les plus petites sont celles de 10PyACC (par mesure de la surface spécifique, Figure 2.12), et leur diamètre a été mesuré approximativement entre 10 et 60 nm (mesures sur les images MET), ce qui donne, pour le premier point de la courbe à q = 0,003 Å^{-1} un qR > 0,15 (pour d = 10 nm) ou 0,9 (pour d = 60 nm). La condition

n'est alors pas respectée. Nous avons donc fait le choix d'utiliser une autre méthode pour approximer la taille des particules, moins précise mais permettant au moins une comparaison relative entre les différents *z*PyACC. Pour cela, les tangentes avant la rupture de pente de la courbe (sur les 6 premiers points) et après (dans le domaine II) ont été tracées en utilisant une loi de puissance, de forme $I(q) = k.q^{-p}$. Celles-ci ont été ajustées à la courbe et les coefficients *k* et *p* déterminés grâce au logiciel SASView (http://www.sasview.org/). Le point d'intersection de ces deux droites donne une valeur q_1 et via l'équation $q_1 = \frac{2\pi}{D_1}$ la dimension caractéristique D_1 correspondant au diamètre des particules. Plus de détails sur cette méthode et ses valeurs expérimentales sont donnés en Annexe V.5.2. Les valeurs de D_1 pour les poudres 1PyACC à 10PyACC sont présentées dans le Tableau 2.3 (pour la poudre 0PyACC, cette dimension D_1 est trop élevée pour pouvoir être approximée par cette méthode). Comme attendu d'après les résultats précédents (MEB-FEG, surface spécifique par BET, MET), le diamètre des nanoparticules D_1 diminue de 1PyACC à 10PyACC quand la quantité de pyrophosphate augmente. Il passe en effet de 104,0 $\pm$ 1,0 nm pour 1PyACC à 51,9 $\pm$ 0,2 nm pour 10PyACC, avec peu de variation entre les tailles des particules des poudres totalement amorphes (entre 59,3 $\pm$ 0,4 nm pour 3,5PyACC et 51,9 $\pm$ 0,2 nm pour 10PyACC). Ces résultats abondent dans le sens du rôle de « tensioactif » du pyrophosphate explicité précédemment.

Il est difficile de comparer ces résultats avec les tailles des particules données dans la littérature, car selon les techniques de caractérisation utilisées les diamètres peuvent correspondre à des agrégats (et pas forcément des particules individualisées) [179]. De surcroit, la distinction entre clusters de pré-nucléation agglomérés lors des différentes étapes de la nucléation et particules d'ACC peut être ténue, et les valeurs des tailles correspondantes ainsi faussées. Sans additifs, des particules d'ACC de 47 à 150 nm de diamètre ont été visualisées par MEB [166,295,317,325], en accord avec les mesures sur des images MET donnant des diamètres de 20 à 60 nm [168,179,290,336]. Des modélisations sur des données de SANS ont mis en évidence de manière plus précise des particules d'ACC pur de 55 nm [117] ou 35 nm se transformant ensuite en particules de 60 nm [178] pour de l'ACC stabilisé avec du magnésium. En présence de pAsp, Nudelman *et al.* [287] ont estimé que la taille maximale des particules d'ACC avant qu'elles ne cristallisent est de 100 nm, mais cette valeur est dépendante des conditions de précipitation et de l'additif. Les diamètres des particules amorphes des *z*PyACC extraites ici des données SAXS sont donc cohérents avec la littérature.

Pour 1PyACC et 2,5PyACC, les diamètres issus des mesures SAXS (104,0 $\pm$ 1,0 nm et 66,3 $\pm$ 0,4 nm respectivement) sont supérieurs aux tailles apparentes des cristallites calculées avec la formule de Scherrer via les données DRX (60,7 – 72,2 nm et 53,4 – 70,9 nm respectivement, Tableau 2.1), spécialement pour 1PyACC. Ces écarts sont probablement dus à la présence de deux types d'objets différents dans les poudres, à savoir des cristaux et des particules sphériques, qui sont moyennés par le SAXS (technique de caractérisation globale) alors que la valeur de DRX tient uniquement compte de la taille apparente des cristallites.

La valeur de la première pente (modélisée par la première loi de puissance) donne des informations sur l'organisation des particules : plus la pente tend vers 3, plus l'assemblage est compact tandis qu'une pente tendant vers 1 met en évidence une organisation fractale. La valeur intermédiaire de 2 (entre 2,0 et 2,1 pour 2,5PyACC à 10PyACC, *cf.* Annexe V.5.2) indique une organisation des nanoparticules de PyACC en agrégats moyennement compacts.

Domaine II

Dans le domaine II, la valeur de la pente de la courbe *p* est extraite de la deuxième loi de puissance de formule $I(q) = k.q^{-p}$ (utilisée comme tangente pour déterminer le point d'inflexion dans le domaine

I). *p* est aussi appelée exposant de Porod, et renseigne sur la surface des nanoparticules. En effet, un exposant *p* de 2 à 3 est associé à des fractales de masse, ou particules avec des surfaces très rugueuses (ou chaînes de polymères par exemple) tandis que les fractales de surface ont un *p* proche de 3, et des surfaces lisses (avec peu de fluctuations de densité à l'interface) ont des exposants de Porod égaux à 4 [322,423–425]. Sur la Figure 2.15 l'exposant de Porod du domaine II vaut entre 3,9 et 4 pour tous les *z*PyACC (à l'exception de 0PyACC) (valeurs en Annexe V.5.2), ce qui est synonyme d'une surface définie et lisse, en accord avec le MEB-FEG (Figure 2.11).

Domaine III

Dans ce domaine, un maximum d'intensité très léger (indiqué par la flèche rouge sur la Figure 2.15) est observé aux alentours de 0,17 $Å^{-1}$ dans toutes les courbes hormis celle de 0PyACC. Un calcul rapide montre que cette valeur de q correspond à une distance d'environ 4 nm, de l'ordre des tailles caractéristiques des clusters proto-cristallins composant les ACC décrits dans la littérature (*cf*. Chapitre 1 : II.2.3.1). Nous avons donc basé la modélisation SASView de cette partie de la courbe en accord avec cela, et avec les hypothèses suivantes : les sous-entités ont une forme sphérique, elles sont constituées de calcite (phase cristalline la plus favorable thermodynamiquement, de SLD égale à $2{,}57.10^{-5}$ $Å^{-2}$) dans un environnement aqueux (SLD de $9{,}48.10^{-6}$ $Å^{-2}$). La SLD de la calcite étant proche de celle de la vatérite ($2{,}41.10^{-5}$ $Å^{-2}$), on peut supposer que même s'il s'avère que les clusters obtenus dans les *z*PyACC sont de structure proto-vatérite et non proto-calcite, les variations au niveau du modèle seront minimes. Un modèle de sphère est ensuite appliqué avec un facteur de structure prenant en compte les interactions entre des sphères dures mises à proximité (*hard sphere*), suivant l'équation 2.2 :

$$I(q) = \frac{\varphi}{V_{obj}} \Delta\rho^2 . \left[3V_{obj} \frac{\sin(qr) - qr\cos(qr)}{(qr)^3}\right]^2 . S(q) \qquad \textit{(Equation 2.2)}$$

avec *r* le rayon de la sphère et *S(q)* le facteur de structure. Une polydispersité (suivant une loi gaussienne) est aussi appliquée sur le rayon. Toute la méthodologie d'analyse est détaillée en Annexe V.5.2. Les valeurs du rayon, alors noté R_2, résultats de la modélisation par le logiciel SASView, sont présentées dans le Tableau 2.3. Celles-ci varient très peu entre les différents échantillons : R_2 est compris entre 2,46 nm et 2,49 nm, soit en moyenne 2,5 nm. Il apparaît alors que quelle que soit la quantité de pyrophosphate contenue dans le *z*PyACC, le rayon des sous-entités est le même. Celles-ci seraient donc caractéristiques du PyACC. Cette taille est très similaire au rayon de giration de 3 nm obtenu par SANS par Clark *et al.* [117] pour un ACC sans additif, en appliquant un modèle multi-échelle de Beaucage pour traiter simultanément les différents niveaux hiérarchiques d'organisation. Les sous-entités peuvent être assimilées à des clusters de pré-nucléation de 2 nm, décrits dans le Chapitre 1 : II.2.3, qui seraient conservés lors de la nucléation et formeraient les particules d'ACC. Les tailles concordent avec celles mises en évidence pendant la nucléation par ultracentrifugation analytique [162], cryo-MET [168] et SAXS [186,296]. Dans les théories non classiques de la nucléation, les auteurs mentionnent souvent une étape d'agrégation des PNC préalable à la formation des particules d'ACC. Au regard des tailles mises en jeu ici, soit l'agrégation est limitée dans notre cas soit les 2 nm donnés dans les articles correspondent déjà à des agglomérats de PNC.

Tableau 2.3 : Diamètre des nanoparticules D_1 et rayon des sous-entités R_2 pour les poudres de zPyACC (excepté 0PyACC).

*z*PyACC	D_1 (nm)	R_2 (nm)
1PyACC	$104{,}0 \pm 1{,}0$	$2{,}48 \pm 0{,}02$
2,5PyACC	$66{,}3 \pm 0{,}4$	$2{,}48 \pm 0{,}01$
3,5PyACC	$59{,}3 \pm 0{,}4$	$2{,}48 \pm 0{,}01$
5PyACC	$54{,}4 \pm 0{,}3$	$2{,}46 \pm 0{,}01$
10PyACC	$51{,}9 \pm 0{,}2$	$2{,}49 \pm 0{,}01$

Domaine IV

Pour les vecteurs de diffusion plus élevés et donc des distances échantillon-détecteur très courtes (188 mm), dans le domaine IV de la courbe (Figure 2.15), les courbes de WAXS2D sont obtenues et tracées sur la Figure 2.16. La Figure 2.16a montre la présence de pics de diffraction. Pour pouvoir les différencier, un agrandissement de cette partie de la courbe est présenté en Figure 2.16b avec ajout d'un décalage vertical artificiel des courbes pour améliorer la lecture. Les pics de diffraction sont intenses pour 0PyACC et 1PyACC, peu intenses pour 2,5PyACC, et à peine visibles pour 3,5PyACC. Pour les trois premiers, les diffractogrammes RX conventionnels (Figure 2.3) montraient déjà la présence de cristaux de calcite, mais pour le dernier (3,5PyACC) ils ne sont observés qu'avec cette technique aux grands angles, probablement en raison d'un temps de comptage plus long pour chaque angle. Cela suggère qu'il n'y a pas une valeur seuil stricte de la quantité de pyrophosphate permettant une inhibition totale de la cristallisation, mais plutôt que le pyrophosphate induit une réduction graduelle de la taille des cristallites, devenant d'abord trop petits et non détectables par diffraction RX puis ne se formant plus. Pour identifier les pics sur la Figure 2.16b les positions en 2θ des pics de diffraction de plusieurs phases cristallines (issues des fiches de la base de données JCPDS de DRX) ont été converties en termes de vecteur de diffusion q (avec la relation $q = \frac{4\pi \sin\theta}{\lambda}$) et les pics des phases d'intérêt (calcite et vatérite dans le cas présenté) ajoutés au graphique avec leur intensité respective (en gris et rose respectivement). Comme attendu d'après l'analyse DRX, les pics d'intensité majeure correspondent à la calcite. Néanmoins, les courbes présentent aussi des pics associés à la vatérite. Ils sont mineurs pour 0PyACC précipité sans additif, car la calcite est la phase la plus stable thermodynamiquement et donc celle formée en majorité, mais la rapidité de la synthèse a pu partiellement bloquer cinétiquement la dissolution-reprécipitation de la vatérite (intermédiaire de cristallisation de la calcite [99]), ce qui fait qu'il reste de faibles quantités de cette dernière. Cependant dès l'ajout de pyrophosphate, la vatérite devient la phase majoritaire : c'est le cas pour 1PyACC, 2,5PyACC et 3,5PyACC. Sa présence pourrait alors être due au rôle d'inhibiteur de cristallisation de la calcite du pyrophosphate, dont la quantité est trop faible pour inhiber totalement la cristallisation mais bloque partiellement celle de la calcite, laissant alors des possibilités au précurseur de type vatérite de se former. Les pics de diffraction associés à la vatérite pourrait également être issus d'une structuration à petite échelle des clusters d'ACC, comme décrit dans la littérature sous le nom de proto-vatérite.

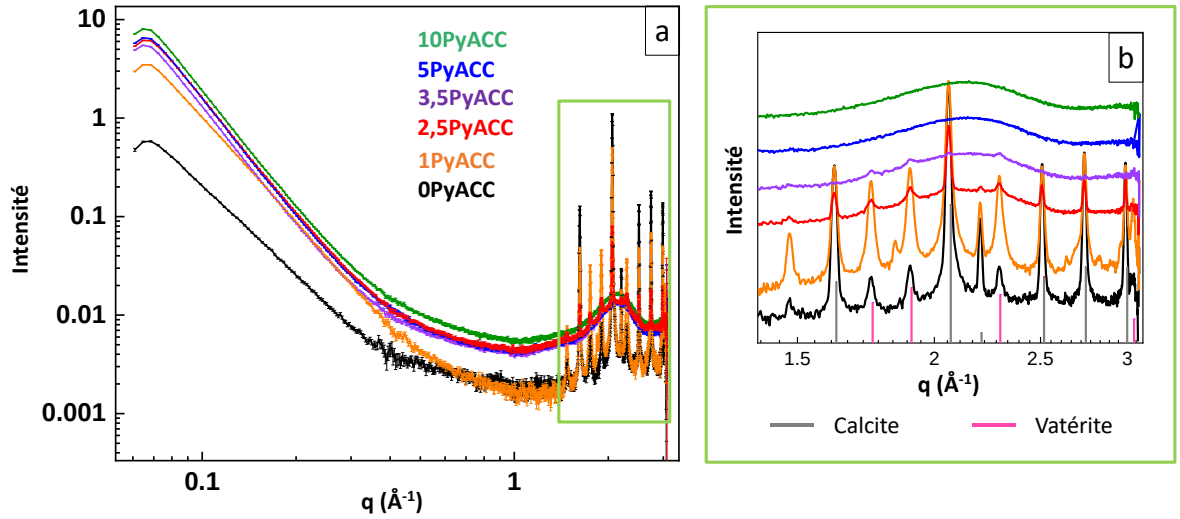


Figure 2.16 : Courbes WAXS2D totales des zPyACC (a), avec un agrandissement et un décalage vertical des courbes pour plus de clarté dans la zone mise en évidence par le rectangle vert (b). Les traits gris et roses en (b) correspondent aux positions des pics de diffraction de la calcite et de la vatérite respectivement, exprimés en fonction du vecteur de diffusion q.

IV Construction d'un modele experimental de l'organisation des PyACC

Après avoir mis en évidence l'existence d'entités structurales sub-particulaires de taille définie et constante entre les échantillons, nous avons cherché à définir quelle est l'organisation des ions et molécules au sein de ces entités, et où est positionné le pyrophosphate stabilisateur.

IV.1 Structure proto-cristalline ?

Dans un premier temps, des mesures de diffusion totale de rayons X aux grands angles (WAXS) ont été réalisées en collaboration avec Capucine Sassoye au Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP UMR7574) sur les cinq poudres contenant du pyrophosphate (1PyACC à 10PyACC). Puis la fonction de distribution des paires (PDF) réduite, G(r), a été calculée. Elle donne la probabilité de trouver une paire d'atomes à une distance r selon $G(r) = 4\pi[\rho(r) - \rho_0]$ pour un modèle structural, avec $\rho(r)$ la densité atomique de la paire et ρ_0 la densité moyenne de nombre atomique. $G(r)$ peut aussi être extraite à partir des données WAXS, elle est la transformée de Fourier de la fonction de structure réduite F(Q) :

$$F(Q) = Q(S(Q) - 1)$$

$$G(r) = \frac{2}{\pi}\int_0^{qmax} Q[S(Q) - 1]\, sin(Qr)\, dQ$$

Où Q est l'amplitude du vecteur de diffusion $\vec{q}$ défini plus haut, et S(Q) est la fonction de structure, correspondant à l'intensité expérimentale mesurée normalisée et corrigée [426–428]. On utilise G(r) plutôt que l'intensité diffusée (contenant pourtant les mêmes informations), car la représentation dans l'espace direct en fonction de la distance r est plus intuitive et permet de mieux se représenter les objets. En comparant le G(r) expérimental avec celui calculé grâce à un modèle, il est possible d'affirmer ou infirmer ce dernier.

Sur la Figure 2.17 sont tracées les courbes PDF expérimentales ($G_{exp}(r)$) des poudres de 1PyACC à 10PyACC. Chacune des deux poudres cristallines (1PyACC et 2,5PyACC) a une longueur de cohérence (distance maximale pour laquelle on distingue encore des pics) au-delà de 50 nm, se traduisant par la présence de pics sur les courbes aux grands r. Pour les poudres amorphes (3,5PyACC, 5PyACC et 10PyACC) des pics apparaissent aux faibles r, traduisant la présence de plusieurs paires d'atomes à des distances similaires et répétables (et donc non organisées aléatoirement), et ainsi la présence d'une structuration à petite échelle. La longueur de cohérence est estimée ici à environ 10 Å. La présence d'un cœur dont l'organisation est similaire à une phase cristalline (ou proto-cristallin) dans un ACC synthétique a déjà été mise en évidence, tout d'abord par Gebauer *et al*. [179] puis entre autres par Fernandez-Martinez *et al.* [125], comme discuté dans le Chapitre 1 : II.2.3.1. Ces structures s'étendent sur des échelles de 10 – 15 Å [173,185,280,281], donc tout à fait similaires à celle obtenue ici. Dans une autre étude plus récente, les domaines cristallins anhydres font 2 nm [117].

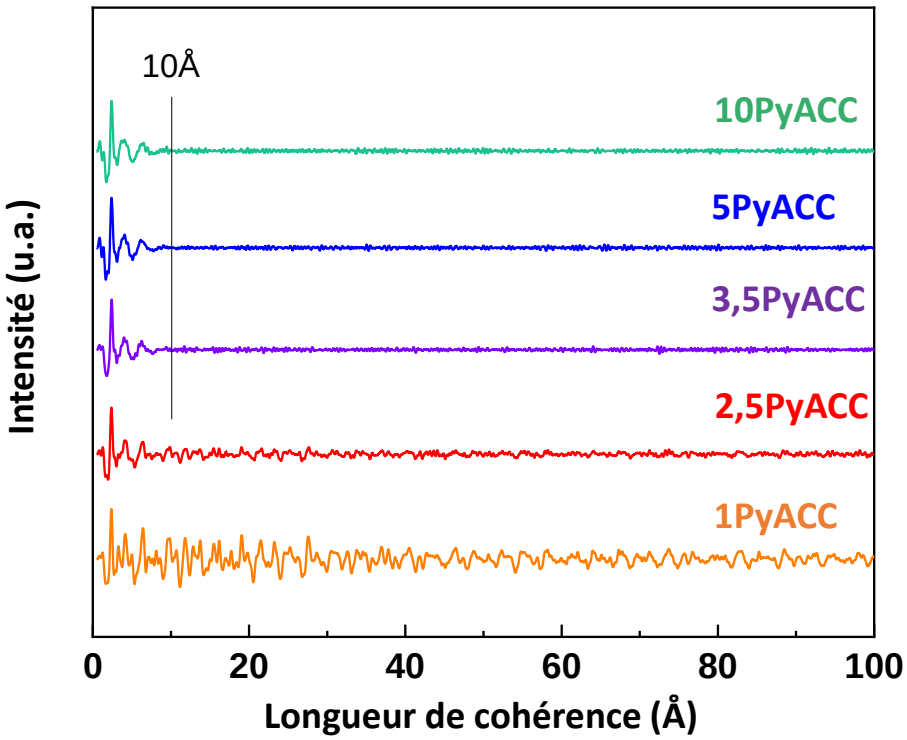


Figure 2.17 : Courbes PDF expérimentales ($G_{exp}(r)$) des zPyACC, la longueur à 10 Å étant mise en évidence.

En ce qui concerne les phases cristallines 1PyACC et 2,5PyACC, la longueur de cohérence est plus élevée, du fait de la présence des cristaux de calcite. Comme illustré sur la Figure 2.18, il semble qu'elle soit plus petite pour 2,5PyACC, entre 50 et 55 nm, que pour 1PyACC (entre 55 et 60 nm), mais la distinction entre signal expérimental de la PDF et bruit est très ténue. Cela serait cohérent avec les calculs de taille des cristallites par la formule de Scherrer appliquée sur les données de DRX (Tableau 2.1), montrant une réduction de celle-ci quand la quantité de pyrophosphate augmente.

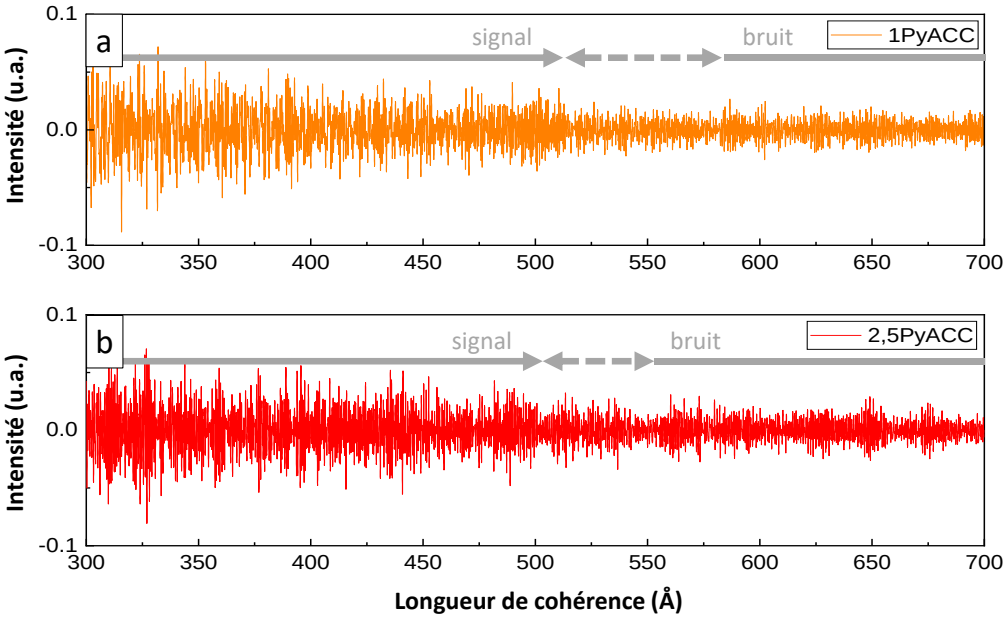


Figure 2.18 : Courbes PDF expérimentales ($G_{exp}(r)$) à plus grands r, pour 1PyACC (a) et 2,5PyACC (b), montrant une longueur de cohérence entre 50 et 60 nm, au-delà de laquelle le signal ne peut pas être distingué du bruit.

Pour corréler la PDF avec les phases identifiées en DRX, les courbes expérimentales de 2,5PyACC et 1PyACC sont comparées à celle d'une calcite de référence (expérimentale aussi, voir Annexe V.5.3) sur la Figure 2.19a. Pour rendre la comparaison plus aisée, les courbes ont toutes été normalisées. Nous avons choisi comme base de normalisation le pic à 27,6 Å (flèche bleue), bien défini pour les trois. Les courbes normalisées sont représentées sur la Figure 2.19b. Au-delà de 9 Å, les pics des trois courbes coïncident, validant la structuration similaire au réseau de la calcite, et donc la présence des cristaux, aussi identifiés par DRX et par MEB-FEG. Par contre, à plus courte distance (< 9 Å), les pics ne coïncident pas. Les soustractions de la courbe $G_{exp}(r)$ de la calcite à celles de 2,5PyACC et 1PyACC sont présentées sur la Figure 2.19c : en plus des cristaux de calcite, une autre phase de structuration différente de la calcite est présente avec une organisation à petite échelle (< 9 Å), et en plus grande quantité pour 2,5PyACC que 1PyACC (pics d'intensité plus faible pour ce dernier). Comme précédemment, ces deux courbes sont normalisées (par le premier pic cette fois-ci, aussi indiqué par une flèche bleue) afin de pouvoir comparer les positions des pics, et les courbes normalisées sont tracées sur la Figure 2.19d. Les positions et intensités relatives des différents pics les composant se superposent parfaitement, on peut donc affirmer qu'il s'agit de la même phase dans les deux poudres 1PyACC et 2,5PyACC.

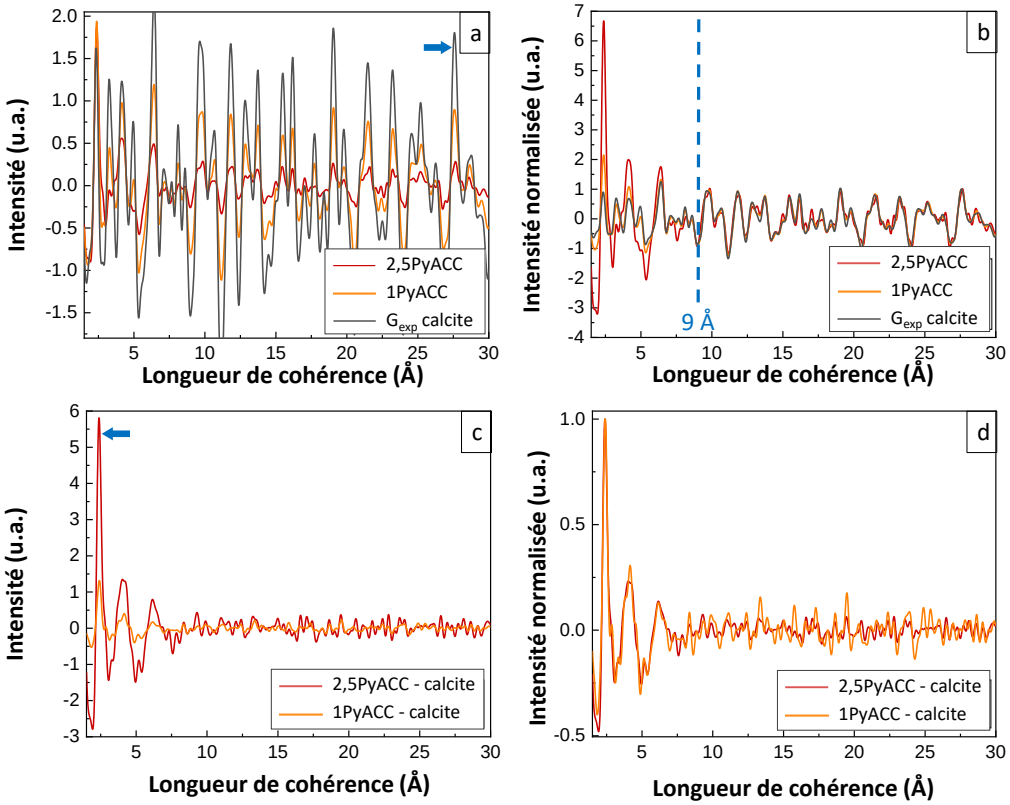


Figure 2.19 : Comparaison des courbes PDF expérimentales $G_{exp}(r)$ de 2,5PyACC, 1PyACC et de la calcite sans normalisation (a) et avec une normalisation par le pic à 27,6 Å (b), et comparaison des courbes PDF expérimentales $G_{exp}(r)$ de 2,5PyACC - $G_{exp}(r)$ de la calcite et $G_{exp}(r)$ de 1PyACC - $G_{exp}(r)$ de la calcite sans normalisation supplémentaire (c) et avec une nouvelle normalisation par le premier pic (d). Les flèches bleues indiquent les pics par lesquels les courbes ont été normalisées.

Ces phases supplémentaires, amorphes et de structuration similaires, sont appelées a1PyACC et a2,5PyACC respectivement. Par comparaison avec les PDF des *z*PyACC complètement amorphes en DRX (à savoir 3,5PyACC, 5PyACC et 10PyACC) sur la Figure 2.20, il apparaît que les positions des pics sont semblables pour tous, ce qui atteste de la présence d'une même phase amorphe dès l'ajout de pyrophosphate, quelle que soit sa quantité.

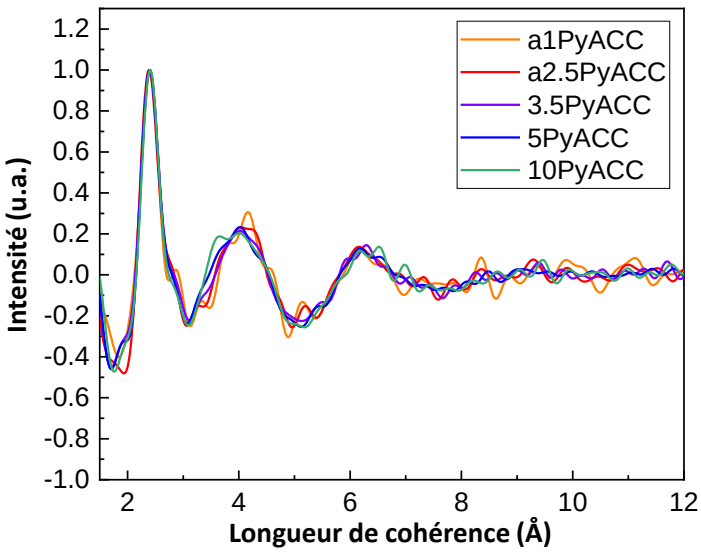


Figure 2.20 : Comparaison des courbes PDF de a1PyACC et a2,5PyACC avec les $G_{exp}(r)$ de 3,5PyACC, 5PyACC et 10PyACC.

Comme dit précédemment, la présence de pics en deçà de 9 Å témoigne d'une organisation à petite échelle au sein de la phase amorphe, ce qui est décrit dans la littérature comme phase proto-cristalline. Pour l'identifier, la PDF d'une vatérite « amorphe » (*i.e.* sans ordre à longue distance, nommée aVatérite) a été calculée, en imposant artificiellement à la $G_{calc}(r)$ une atténuation du signal à 8 Å (voir Annexe V.5.3 et Figure AV.4), puis elle est comparée à celle des $G_{exp}(r)$ des *z*PyACC amorphes (uniquement 3,5PyACC, 5PyACC et 10PyACC sur la Figure 2.21a pour ne pas surcharger). Les courbes sont très proches, avec les pics principaux aux mêmes positions. On peut noter quelques différences, mais cela peut provenir d'une PDF biaisée de la vatérite (car calculée avec une structure monoclinique C2, sujette à débats, et sans prendre en compte les polytypismes évoqués dans le Chapitre 1 : II.1.2.1.iii). Les mêmes PDF expérimentales des *z*PyACC sont également comparées à $G_{calc}(r)$ de la calcite « amorphe » (aCalcite) calculée similairement. La comparaison (Figure 2.21b) montre des décalages importants, mis en évidence par les flèches : les courbes de 3,5PyACC, 5PyACC et 10PyACC présentent un large pic à 3,8 Å (flèche bleue), non reproduit sur la courbe de aCalcite, et de manière similaire le pic intense à 3,3 Å de aCalcite (flèche grise) ne coïncide pas avec les $G_{exp}(r)$ des *z*PyACC amorphes. La phase proto-cristalline des *z*PyACC présente donc une structuration locale proche de la vatérite, et différente de la calcite. C'est cohérent avec le rôle d'inhibiteur de cristallisation de la calcite du pyrophosphate [354]. Mais c'est aussi en accord, au vu du pH de synthèse des zPyACC proche de 12, avec l'étude de Gebauer *et al.* [179] ayant obtenu de l'ACC proto-vatérite à un pH plus élevé (9,80) tandis que le proto-calcite est obtenu à pH plus faible (8,75).

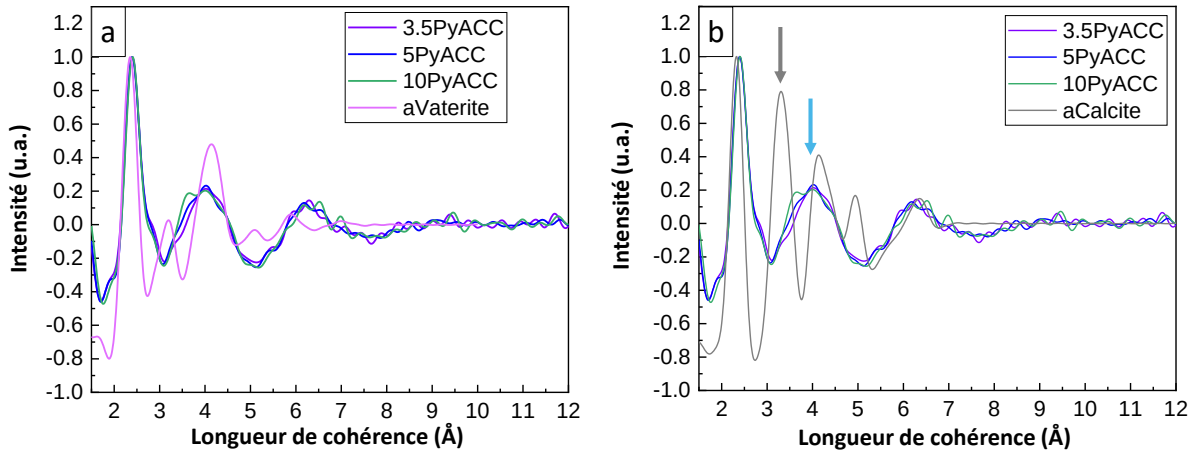


Figure 2.21 : Comparaison des courbes PDF expérimentales $G_{exp}(r)$ des zPyACC totalement amorphes (3,5PyACC, 5PyACC et 10PyACC) et de la courbe PDF calculée $G_{calc}(r)$ de la vatérite « amorphe » (aVatérite) (a) et de la calcite « amorphe » (aCalcite) (b). Les flèches mettent en évidence les décalages des pics.

IV.2 Repartition des pyrophosphates

Une fois la structuration du cœur proto-cristallin du cluster caractérisée, nous avons voulu comprendre où était localisé chaque ion et en particulier les ions pyrophosphate afin d'appréhender les mécanismes de stabilisation et de proposer un modèle d'organisation pour les clusters de PyACC. Dans ce but, la RMN en phase solide a été utilisée, et nous nous sommes focalisés sur les deux PyACC incluant le plus de pyrophosphate (5PyACC et 10PyACC). Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec Christian Bonhomme du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP UMR7574).

Dans le but d'obtenir un rapport signal sur bruit suffisant lors des mesures de RMN du ^{13}C, des poudres de 5PyACC et 10PyACC enrichies en ^{13}C ont été synthétisées (5PyACC13 et 10PyACC13

respectivement). Pour cela, le protocole standard de la synthèse de *z*PyACC décrit dans ce chapitre partie I a été suivi, mais en remplaçant l'hydrogénocarbonate de sodium par du carbonate de sodium enrichi en ^{13}C ($Na^{13}CO_3$, Cambridge IsotopeLab, 99 %). Une plus petite quantité d'hydroxyde de sodium (quelques gouttes de solution à 6 M) est alors nécessaire pour ajuster à 12,1 le pH de la solution anionique obtenue. Pendant la filtration sous vide, le précipité est protégé par un parafilm posé sur le dessus de l'entonnoir Büchner, afin de limiter les échanges d'ions carbonate avec le dioxyde de carbone de l'air. Après lyophilisation, la poudre collectée est stockée dans un pilulier recouvert par du parafilm et placé dans le congélateur, pour les mêmes raisons. Une fraction des poudres est stockée dans un conteneur séparé, qui est utilisé pour effectuer les caractérisations de routine sans affecter le reste des poudres qui, lui, sera réservé pour les analyses par RMN en phase solide.

Les analyses DRX (Figure 2.22a) montrent que les modifications mineures du protocole de synthèse n'ont pas affecté le caractère amorphe des poudres. Sur les spectres d'absorption infrarouge de la Figure 2.22b, les décalages des pics associés aux groupements carbonate témoignent de l'enrichissement presque total en ^{13}C. En effet, la vibration ν_2CO_3 à 865 cm^{-1} de 10PyACC et 5PyACC est totalement décalée à 838 cm^{-1} pour 10PyACC13 et 5PyACC13. Ce décalage, de ratio expérimental $\nu_2{}^{13}CO_3/\nu_2CO_3$ de 0,969, est en accord avec Rey *et al*. [429], qui montrent que pour cette vibration précise le ratio lié à un enrichissement total vaut 0,9686. C'est aussi en accord avec le décalage expérimental obtenu par Xu *et al.* [430] pour la vibration ν_2CO_3 d'un échantillon de calcite enrichie à 100 % en ^{13}C ($\nu_2{}^{12}CO_3$ à 877 cm^{-1} et $\nu_2{}^{13}CO_3$ à 850 cm^{-1}). Il est difficile de réaliser des déconvolutions sur cette bande afin de déterminer le pourcentage exact d'enrichissement, à cause de la présence de la bande adjacente large de $\nu^{as}POP$. Toutefois on peut raisonnablement conclure que l'enrichissement est quantitatif.

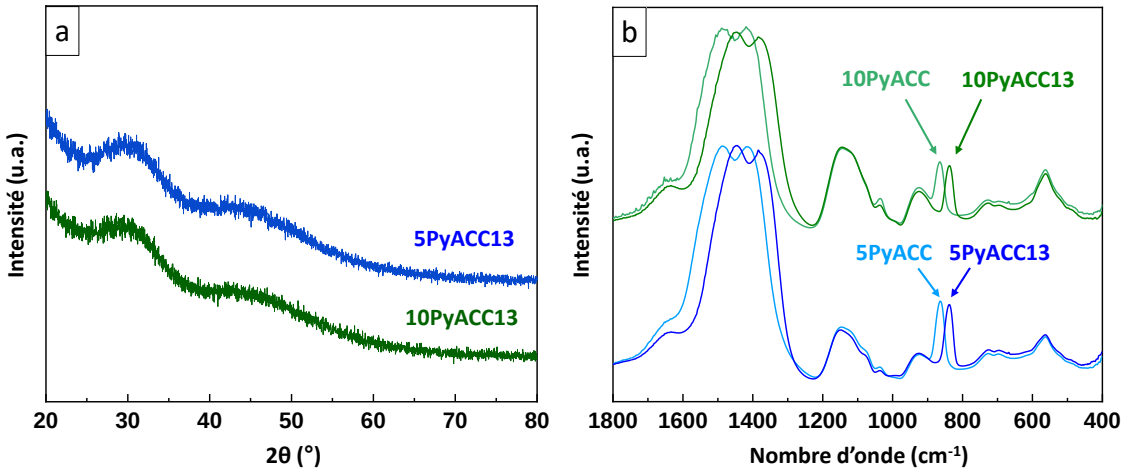


Figure 2.22 : Diffractogrammes RX (a) et spectres d'absorption infrarouge (b) des PyACC enrichis en ^{13}C (5PyACC13 et 10PyACC13), comparés aux spectres de 5PyACC et 10PyACC non-enrichis dans (b).

Les spectres RMN MAS du proton ^1H de 5PyACC13 et 10PyACC13 sont présentés sur la Figure 2.23. Trois régions peuvent être identifiées : une à $\delta_{iso}(^1H) \sim 5{,}0$ ppm, une sous forme d'épaulement à $\delta_{iso}(^1H) \sim 7{,}0$ ppm, et une dernière de très faible intensité entre 10 ppm et 17 ppm. En accord avec Yasar *et al*. [202] pour des pyrophosphates de calcium dopés avec des carbonates ainsi que Gras *et al.* [176] pour des pyrophosphates de calcium amorphes, la première résonance vers 5 ppm est attribuée aux molécules d'eau faiblement liées (physisorbées) et celle à environ 7 ppm aux molécules d'eau fortement liées (eau structurale). Il n'y a pas de modification claire des spectres RMN ^1H entre les deux échantillons, indiquant que l'eau faiblement liée est peu sensible à l'augmentation de la quantité de pyrophosphate, au moins à ces pourcentages-ci. La présence d'un épaulement à ~ 7,0 ppm pour les

deux échantillons supporte l'idée d'eau « pseudo-structurale », mise en évidence par l'ATG sur la Figure 2.8 avec une perte de masse associée à la déshydratation ayant lieu jusqu'à environ 300 °C. Cependant cette quantité d'eau est très faible comparée à celle d'eau adsorbée, l'épaulement étant peu prononcé. Devant la résolution spectrale limitée, il est ainsi difficile de dire si les 4 % mass. d'écart des proportions en eau entre les deux échantillons (ATG, Tableau 2.2) sont attribués à de l'eau structurale ou adsorbée. Enfin, les résonances dans la région [10 ppm – 17 ppm] pourraient provenir des espèces HPO_4^{2-} ou HCO_3^- mais en très faibles proportions.

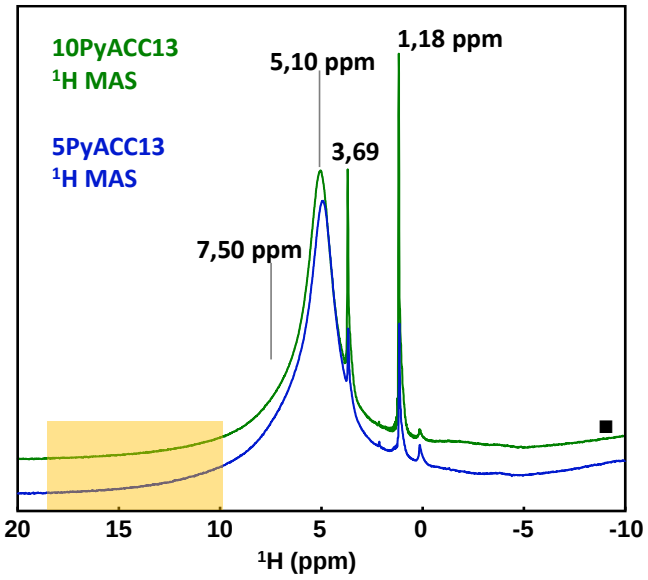


Figure 2.23 : Spectres RMN MAS ^{1}H (14 kHz) de 5PyACC13 (trait bleu) et de 10PyACC13 (trait vert). Les pics très fins à 3,69 et 1,18 ppm correspondent à des impuretés mineures d'éthanol, le carré ■ indique le signal de fond résiduel et la zone orangée les résonances des groupes phosphates et/ou carbonates acides (le cas échéant) selon Yasar et al. [202].

De plus, pour chacun des échantillons, les spectres RMN ^{13}C CP MAS ont été acquis et sont présentés sur la Figure 2.24. La polarisation croisée (CP) implique l'interaction dipolaire (spatiale) entre ^{1}H et ^{13}C conduisant à un transfert de polarisation entre ces deux noyaux. Cette interaction est d'autant plus forte que la distance internucléaire est faible. Elle permet d'effectuer de l'édition spectrale, c'est-à-dire de détecter préférentiellement les espèces protonées ou proches de sources de protons (comme les molécules d'eau). Les spectres complets mettent en évidence la contribution majeure des CO_3^{2-} et celle très mineure des HCO_3^-, cette dernière mise en évidence par les flèches bleues [202].

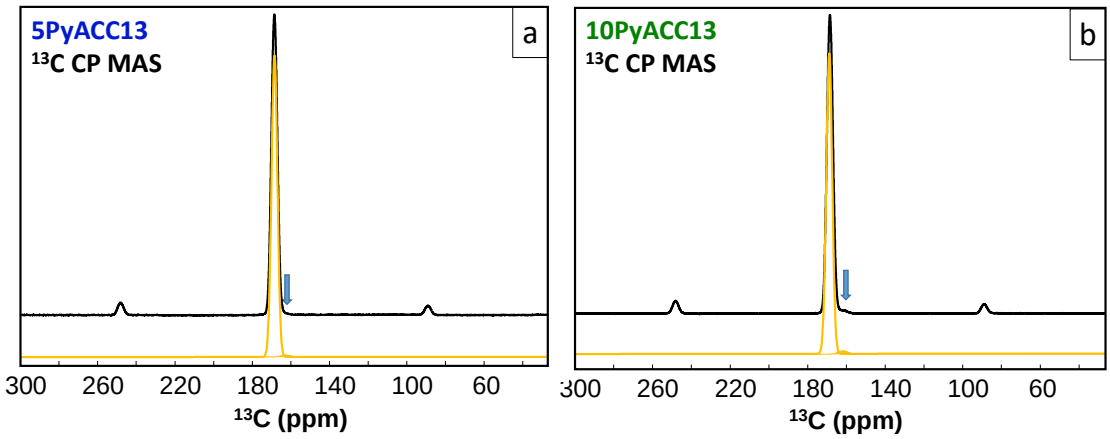


Figure 2.24 : Spectres RMN CP MAS du ^{13}C de 5PyACC13 (a) et 10PyACC13(b). Les simulations via le logiciel DMFit sont données en orange. Le composant majeur correspond aux espèces CO_3^{2-} alors que les contributions mineures (surface pleine, en orange, et flèches bleues vers 160 ppm) sont associées à HCO_3^- et mises en évidence par les flèches bleues.

Les spectres RMN ^{13}C MAS (quantitatifs, prenant en compte les temps de relaxation $T_1(^{13}C)$) et ^{13}C CP MAS centrés sur la résonance majeure des carbonates sont tracés (en rouge et en noir respectivement) sur les Figures 2.25a pour 5PyACC13 et 2.25b pour 10PyACC13. Pour les deux échantillons, les spectres ^{13}C MAS et ^{13}C CP MAS ne sont pas totalement superposés mais la différence ne dépasse pas $\pm$ 0,04 ppm, probablement liée à des dérives expérimentales. Cela montre que la distribution globale des molécules d'eau peut être considérée comme homogène par rapport au carbonate, ou autrement dit qu'il n'existe pas de région « anhydre » de grande taille dans les poudres (comme il pourrait y avoir dans le cas de cristaux micrométriques anhydres par exemple). Les HCO_3^- détectés dans les spectres ^{13}C CP MAS des Figures 2.24a et 2.24b ne sont pas détectables dans les spectres MAS correspondants.

Des simulations à partir du logiciel DMFit [431] sont réalisées, en prenant en compte deux contributions dont une en très faibles proportions (HCO_3^-). Les paramètres issus de la simulation sont listés dans le Tableau 2.4 [431]. La largeur de raie (LW) de CO_3^{2-}, élevée du fait du caractère amorphe des poudres, qui vaut 3,56 ppm pour les deux composés, est en accord avec celles mesurées par Gebauer *et al.* [179] ou Michel *et al.* [173] valant 3,34 à 3,62 ppm pour des ACC ou de Yasar *et al.* [202] de 3,55 à 3,82 ppm pour des ACP dopés par des carbonates. Celle de HCO_3^-, en très faible quantité, est encore plus élevée (5,72 ppm). Le déplacement chimique isotrope de CO_3^{2-} est mesuré à $\delta_{iso}(^{13}C)$ = 168,47 ppm (5PyACC13) et 168,42 ppm (10PyACC13), proches de ceux de l'ACC proto-calcite (pc-ACC) et proto-vatérite (pv-ACC) de Gebauer *et al*. [179], égaux à 168,7 et 169,5 ppm respectivement. On pourrait alors penser en se basant sur les valeurs de Gebauer *et al.* [179] que l'environnement des carbonates dans les PyACC13 s'apparente à celui de la proto-calcite, de déplacement chimique plus proche, ce qui est en contradiction avec la PDF discutée en IV.1. Mais il est intéressant de noter qu'ici les spectres RMN ^{13}C MAS et ^{13}C CP MAS (14 kHz) n'ont été sujets à aucune modification pendant toute la durée de l'acquisition, contrairement à l'étude de Gebauer montrant une évolution claire des spectres des ACC en phases cristallines (calcite ou vatérite) à 8 kHz [179] (due aux forces centrifuges dans le rotor et/ou aux échauffements locaux liés à la friction de l'air). Un net effet stabilisateur (vis-à-vis de ces forces et de l'élévation de la température) des ions pyrophosphate est donc mis en évidence pour les échantillons 5PyACC13 et 10PyACC13. Ces ions peuvent stabiliser les carbonates des clusters proto-cristallins, avec une proximité spatiale telle qu'ils peuvent influencer le déplacement chimique de $\delta_{iso}(^{13}C)$ (en effet, le nombre de molécules dans le cluster est faible et estimé à 17 CO_3^{2-} / cluster, voir Annexes AII.4). Cela explique le décalage avec les déplacements des clusters pc-ACC et pv-ACC reportés par Gebauer [179] pour des échantillons synthétisés en l'absence d'additifs. Par conséquent, les déplacements chimiques du ^{13}C ne sont pas adéquats pour identifier directement les phases proto-cristallines, données alors uniquement par les analyses PDF (*cf.* Figure 2.21a). Le ratio surface/volume élevé des clusters implique aussi une largeur de raie élevée : les effets de surface sont importants dans ce cas, conduisant à une distribution des déplacements chimiques isotropes ^{13}C (plus grandes différences d'environnement chimique des ions carbonate). Néanmoins, la RMN confirme la proximité entre les ions pyrophosphate et carbonate.

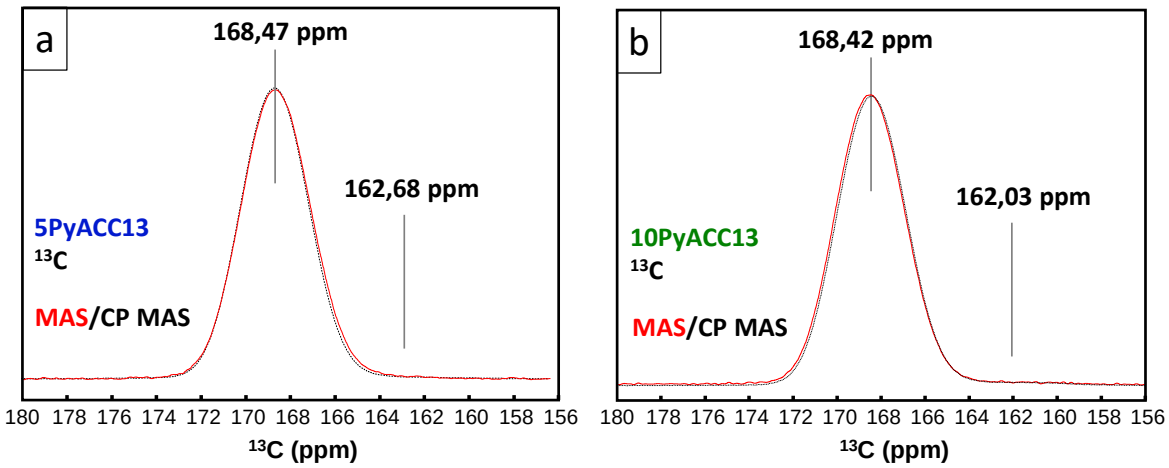


Figure 2.25 : Spectres RMN ^{13}C CP MAS (14 kHz) (en pointillés noirs) et ^{13}C MAS (14 kHz) (en rouge) des échantillons 5PyACC13 (a) et 10PyACC13 (b), les lignes verticales indiquant les résonances de CO_3^{2-} et HCO_3^-.

Les spectres RMN CP MAS du ^{31}P des échantillons 5PyACC13 et 10PyACC13 sont présentés sur les Figures 2.26a et 2.26b respectivement, et les données quantitatives issues de la simulation par le logiciel DMFit dans le Tableau 2.4. Chaque spectre montre une composante majeure vers - 6,7 ppm, attribuée aux espèces pyrophosphate avec plusieurs bandes latérales de rotation [176], ce qui confirme l'intégration du pyrophosphate dans les *z*PyACC, déjà montrée par spectroscopie FTIR et dosages chimiques. La position de cette résonance est peu différente entre les deux échantillons ($\delta_{iso}(^{31}P)$ = - 6,6 ppm et - 6,8 ppm pour 5PyACC13 et 10PyACC13 respectivement), mais leur largeur à mi-hauteur varie entre 6,9 ppm et 7,2 ppm respectivement. Cela peut être la conséquence d'environnements chimiques différents pour les ions pyrophosphate : ceux-ci stabilisent probablement la structure proto-vatérite du cœur de $CaCO_3$, mais lorsque tous les clusters sont stabilisés à un plus haut taux de pyrophosphate, les ions $P_2O_7^{4-}$ non consommés pourraient être localisés à proximité de la surface des nanoparticules plus grosses. Ils agiraient ainsi comme des tensioactifs, réduisant leur taille (comme illustré par SAXS et analyses BET). Par conséquent, la résonance de ^{31}P serait élargie par la multiplicité des environnements. Une composante mineure déblindée est aussi observée, vers 2,9 ppm. Gras *et al.* [176] et Slater *et al.* [188] ont attribué cette contribution à des traces d'orthophosphate, ici avec des proportions de 8,6 % et 8,8 % pour 5PyACC13 et 10PyACC13 respectivement. Ils peuvent provenir d'une hydrolyse partielle des ions pyrophosphate pendant le vieillissement ou d'une réaction initiale d'hydrolyse incomplète, comme expliqué précédemment. Par calculs à partir de la composition chimique des poudres, il a été estimé dans la partie II.2 qu'il y a entre 16 et 17 % mol. de $Ca_3(PO_4)_2$ (par rapport au P total) dans les poudres 5PyACC et 10PyACC, soit 8 – 9 % mol. d'ions orthophosphate, ce qui est cohérent avec les pourcentages issus des simulations. Les résonances caractéristiques des entités orthophosphate (Tableau 2.4) à 2,9 ppm (et LW = 6,1 - 6,2 ppm) sont en accord avec celles observées pour des ACP dopés avec des ions carbonate, mesurées à 2,54 et à 2,98 ppm [202], et pour des largeurs à mi-hauteur également similaires (5,97 à 6,37 ppm).

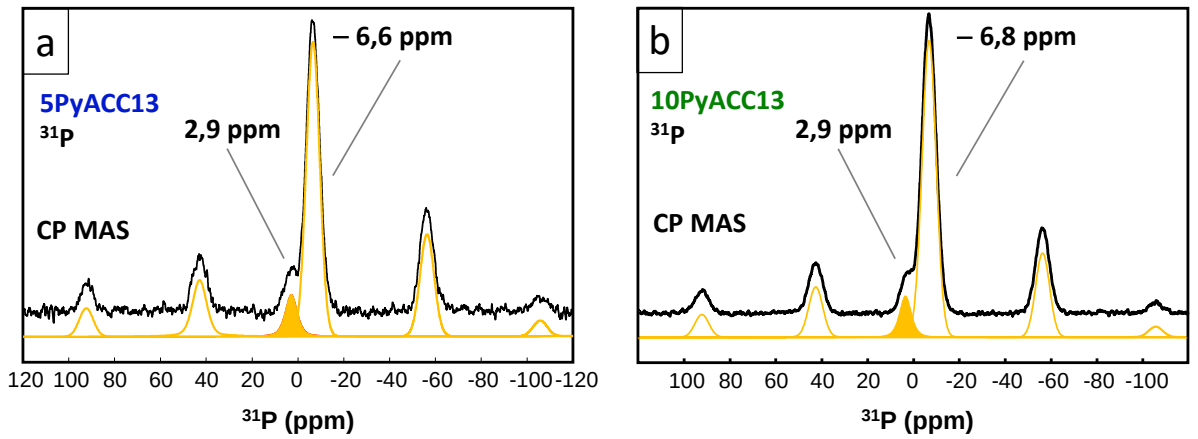


Figure 2.26 : Spectres RMN CP MAS du ^{31}P des échantillons 5PyACC13 (a) et 10PyACC13 (b), le tracé orange correspondant aux simulations avec le logiciel DMFit [431], la surface pleine orange est associée aux espèces PO_4^{3-} et l'autre bande identifiée à $P_2O_7^{4-}$, les bandes restantes étant des bandes latérales de rotation (majoritairement associées à $P_2O_7^{4-}$).

Tableau 2.4 : Paramètres des spectres RMN ^{13}C CP MAS et ^{31}P CP MAS de 5PyACC13 et 10PyACC13, prenant en compte les résonances majeures de CO_3^{2-} et $P_2O_7^{4-}$ mais aussi les mineures (HCO_3^- et PO_4^{3-} et/ou HPO_4^{2-}) : déplacement chimique isotrope δ, largeur à mi-hauteur LW, proportions relatives de pic gaussien/lorentzien (xG/(1-x)L) et proportions des phases mineures par rapport aux majeures. Le logiciel DMFit a été utilisé [431].

	ECHANTILLON	δ (ppm)	LW (ppm)	xG/(1-x)L	%
CO_3^{2-}	5PyACC13	168,47	3,56	1,00	
	10PyACC13	168,42	3,56	1,00	
HCO_3^-	5PyACC13	162,68	5,72	0,98	< 1,0 %
	10PyACC13	162,03	5,72	0,98	< 1,5 %
$P_2O_7^{4-}$	5PyACC13	- 6,6	6,9	1,00	
	10PyACC13	- 6,8	7,2	1,00	
PO_4^{3-} et/ou HPO_4^{2-}	5PyACC13	2,9	6,2	0,50	8,6 %
	10PyACC13	2,9	6,1	0,47	8,8 %

Grâce aux résultats issus de l'ensemble de ces caractérisations avancées et multi-échelle, nous avons pu construire un modèle expérimental des clusters de PyACC à l'échelle nanométrique, présenté sur la Figure 2.27. Les analyses PDF ont mis en évidence l'existence d'un cluster proto-vatérite d'environ 1 nm (en gris sur la Figure 2.27), qui est composé exclusivement d'entités Ca^{2+} et CO_3^{2-} organisées de manière similaire au réseau cristallin de la vatérite. C'est cohérent avec l'article récent de Clark *et al.* [117] ayant montré par PDF l'existence de domaines cristallins anhydres de 2 nm. Dans notre cas, les anions pyrophosphate pourraient être liés aux clusters proto-vatérite grâce à un réseau d'eau dense l'entourant comme déduit des analyses par RMN en phase solide, les stabilisant probablement depuis leur formation pendant la précipitation (*cf.* théorie des clusters de pré-nucléation développée dans le Chapitre 1 : II.2.3.2), en accord avec leur rôle inhibiteur de la calcite décrit dans la littérature [354]. Quand la quantité d'ions pyrophosphate est trop faible, ils ne permettent pas de stabiliser tous les PNC et par conséquent certains d'entre eux peuvent conduire à la germination de cristaux (par agrégation des PNC et déshydratation ou dissolution-reprécipitation) et à leur croissance ultérieure. Autour de 3,5 % de P_2O_7/CO_3, tous les PNC sont potentiellement stabilisés par les anions pyrophosphate qui les entourent, et les anions restants commencent alors à stabiliser également les nanoparticules d'ACC (en bleu clair sur la Figure 2.27), ce qui explique l'augmentation de leur surface spécifique (Figure 2.12), la diminution de la taille des particules (Tableau 2.3) et l'élargissement des pics de résonance RMN de $P_2O_7^{4-}$ (Figures 2.26a, 2.26b). C'est en contradiction apparente avec l'étude de Kababya *et al.* [314], décrivant par RMN en phase solide une phase amorphe de carbonate-phosphate de calcium (ACCP),

consistant en une dispersion homogène de phosphates dans une matrice d'ACC, mais à une échelle nanométrique (chaque carbonate aurait un phosphate à une distance de 9 Å au maximum). Néanmoins, à cette échelle de 1 nm dans notre modèle, chaque phosphate est à proximité d'un carbonate, apparaissant donc dispersé de manière homogène également. Le modèle présenté ici peut également être cohérent avec les résultats d'autres articles sur les ACC stabilisés avec des phosphates, présentant aussi une homogénéité de répartition des phosphates mais regardée à plus grande échelle [274,350]. Une fine couche d'eau « pseudo-structurale » dense, similaire à l'eau interstitielle du modèle de Clark *et al.* [117], mise en évidence par ATG-ATD et RMN du ^{1}H, serait à proximité du cluster proto-vatérite et fortement liée aux unités pyrophosphate, évitant la déshydratation de l'ACC et donc sa réorganisation et cristallisation, comme avec les phosphates [314]. Les ions pyrophosphate pourraient aussi éviter la cristallisation via de fortes interactions électrostatiques avec le calcium des clusters proto-vatérite. La couche plus externe de 2 nm entourant les clusters serait composée d'eau mobile et le reste des ions calcium (*cf.* dosages chimiques du Tableau 2.2).

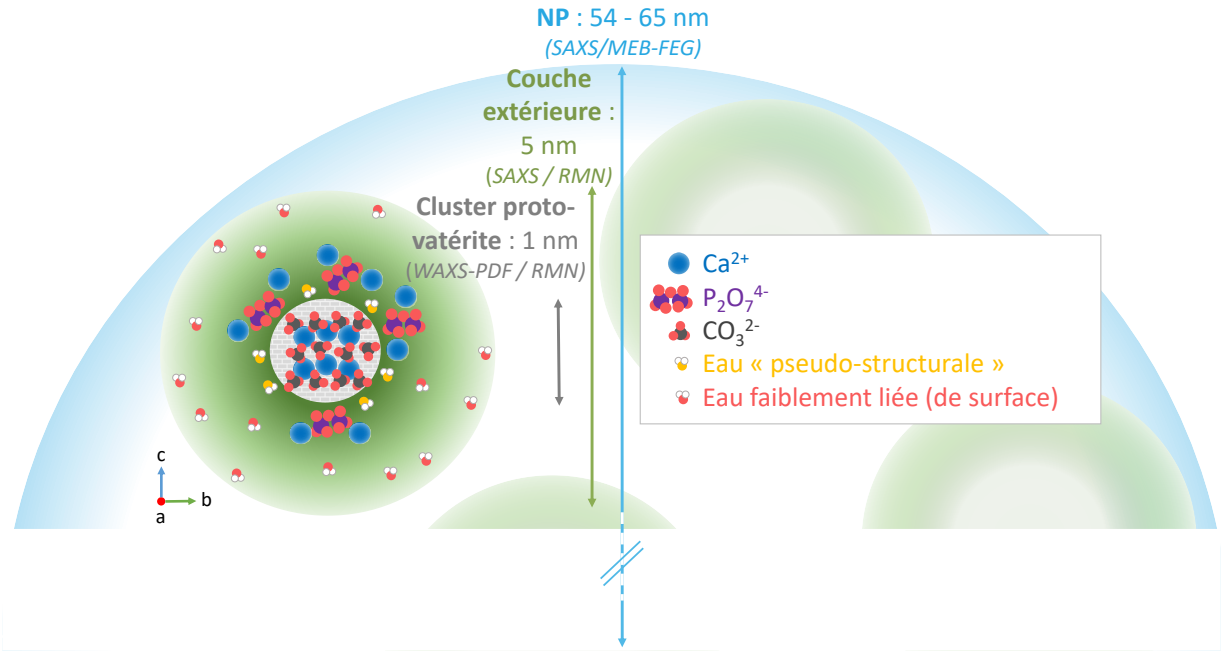


Figure 2.27 : Représentation schématique des clusters de PyACC basée sur les données issues des techniques complémentaires mises en œuvre.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Des poudres de carbonate de calcium amorphe stabilisé par du pyrophosphate ont été synthétisées avec succès avec différents taux de pyrophosphate. Pour un ratio P_2O_7/CO_3 inférieur à 3,5 % mol., les ions pyrophosphate n'inhibent que partiellement la cristallisation en calcite, mais réduisent la taille des cristallites et permettent l'obtention d'une phase amorphe additionnelle. Les dosages chimiques ont montré leur intégration quantitative, avec une petite quantité d'ions orthophosphate issus d'une hydrolyse initiale incomplète ou de leur vieillissement, confirmée par RMN du solide. Aucun autre ion n'est intégré de manière significative.

Une organisation multi-échelle des *z*PyACC a été mise en évidence par différentes techniques complémentaires. A plus grande échelle, les nanoparticules sphériques voient leur diamètre réduit

avec l'augmentation de *z* (méthode BET, SAXS, MEB-FEG, MET), suggérant un rôle de tensioactif du pyrophosphate. Celles-ci sont composées de sous-entités de 5 nm de diamètre (SAXS), dont la taille est indépendante de la quantité de pyrophosphate et donc inhérente à cet amorphe. Elles-mêmes contiennent un cœur organisé à petite échelle (~ 1 nm) (WAXS-PDF), dont la structuration est similaire à celle de la vatérite (WAXS-PDF), ce qui est cohérent avec le rôle d'inhibiteur de la calcite du pyrophosphate décrit dans la littérature. A partir des résultats de toutes les caractérisations et de la RMN du ^{1}H, ^{13}C et ^{31}P, un modèle expérimental de la structuration des *z*PyACC est proposé : le cœur proto-vatérite est entouré par des anions pyrophosphate le stabilisant, et par une couche d'eau « pseudo-structurale » fortement liée (ATG-ATD, dosages) ayant aussi un rôle stabilisateur non négligeable, la proportion d'eau augmentant avec celle de pyrophosphate. Autour du cœur, de l'eau plus mobile compose le reste des sous-entités, qui elles-mêmes sont les constituants des nanoparticules de PyACC, dont la taille varie avec le ratio P_2O_7/CO_3. En effet, il est supposé que lors de la formation de ces particules, les ions pyrophosphate stabilisent en priorité les clusters proto-vatérite, et que lorsque toutes ces unités sont stabilisées qu'ils se localisent en surface des nanoparticules et agissent comme tensioactif, réduisant ainsi leur diamètre. Un ratio trop faible laisse libre cours à l'agrégation des PNC, ce qui conduit à leur cristallisation et la croissance de cristaux de calcite. Les résultats principaux présentés dans ce chapitre ont fait l'objet de l'article suivant : M. Merle, J. Soulié, C. Sassoye, P. Roblin, C. Rey, C. Bonhomme, C. Combes « Pyrophosphate-stabilised amorphous calcium carbonate for bone substitution: toward a doping-dependent cluster-based model » (2022), *CrystEngComm*, 24, 8011-8026, doi : 10.1039/D2CE00936F.

Le modèle proposé ici est en accord avec la littérature, bien qu'elle ne contienne que peu d'articles décrivant avec précision la structuration multi-échelle et la répartition des différents éléments constitutifs de l'ACC à l'échelle nanométrique, que ce soit pour de l'ACC pur ou stabilisé par des additifs. Il constitue un élément clé pour la compréhension de la réactivité de la poudre et son évolution, de la libération d'espèces actives et par conséquent des propriétés biologiques. Mais il ne reste qu'hypothétique et pourrait être confirmé (ou infirmé) et affiné par plusieurs voies complémentaires d'étude. Il serait intéressant de synthétiser ces poudres avec des proportions beaucoup plus élevées de pyrophosphate, ce qui pourrait exacerber les mécanismes de stabilisation et également mettre en évidence les limites de son incorporation. La synthèse pourrait également être modifiée en inversant l'ordre d'ajout des solutions anionique et cationique afin d'exacerber les compétitions entre ions et modifier les équilibres en solution. En ce qui concerne les techniques de caractérisation, les données SAXS pourraient être traitées avec un modèle plus précis, en particulier pour l'extraction de la première dimension D_1 caractéristique du diamètre des nanoparticules. A plus grande échelle, il existe des lignes synchrotron dédiées au suivi *in situ* de la nucléation des particules ; ce type d'études a beaucoup été réalisé pour les ACC purs ou avec des additifs divers (souvent polymériques) mais pas pour le pyrophosphate, et pourrait permettre grâce aux hautes résolution et brillance spectrale de mettre en lumière les étapes de germination des PyACC et ainsi l'influence du pyrophosphate sur leur structuration. Pour la RMN, il existe des modes 2D de double résonance, en particulier ^{13}C-^{31}P, analyses qui pourraient renforcer et préciser nos hypothèses sur la proximité entre ions pyrophosphate et carbonate. Des méthodes de modélisation moléculaire appliquées à ce modèle expérimental apporteraient des informations essentielles sur sa validité. Enfin, on pourrait envisager d'étudier l'influence de la modification de l'additif sur le modèle expérimental, dans un premier temps en modifiant la longueur de chaîne (avec un triphosphate ou des polyphosphates plus grands), puis dans un deuxième temps en appliquant toute la méthodologie développée ici à un autre anion ayant montré des propriétés inhibitrices de la cristallisation de la calcite (par exemple le citrate, sulfate, silicate …).

CHAPITRE 3. DOPAGE DE PyACC PAR DES IONS BIOACTIFS : SYNTHESE, CARACTERISATION, EVOLUTION EN MILIEUX AQUEUX ET EVALUATION DES PROPRIETES BIOLOGIQUES *IN VITRO*

Les poudres de *z*PyACC ont été finement caractérisées dans le chapitre précédent, donnant lieu à la proposition d'un modèle d'organisation à l'échelle nanométrique. La structure amorphe de ces poudres en fait des composés de choix pour le dopage, permettant d'inclure des ions bioactifs potentiellement en plus grande quantité que dans un réseau cristallin par exemple. Ces ions peuvent conférer aux poudres des propriétés additionnelles bioactives, afin d'accélérer la régénération osseuse après implantation ou encore pour prévenir le développement d'infections post-opératoires. Ils peuvent aussi moduler leur stabilité en milieu aqueux et leur dissolution. Pour prévoir leur comportement potentiel *in vivo*, il est alors nécessaire de réaliser des études d'évolution dans différents milieux. Les caractérisations des solides et/ou des milieux après évolution *in vitro* mettent en lumière des mécanismes potentiels de dégradation physico-chimiques des poudres et la vitesse associée de libération des ions et ainsi donnent des informations sur le comportement bioactif attendu pour celles-ci *in vivo*. Dans ce chapitre, l'ACC stabilisé avec 10 % de pyrophosphate (10PyACC) est dopé à différents pourcentages molaires avec trois ions, Sr^{2+}, Zn^{2+} ou Cu^{2+}, pouvant apporter des propriétés ostéogéniques, angiogéniques et/ou antibactériennes. Après caractérisation des poudres dopées, des essais d'évolution sont menés dans deux milieux aqueux, l'eau ultra-pure et le *simulated body fluid* (SBF) mimant la composition ionique du plasma humain. Pour finir, des essais cellulaires *in vitro* sont conduits, afin d'évaluer la cytocompatibilité des poudres dopées en contact avec des cellules et leur capacité de biominéralisation.

I ETAT DE L'ART : IONS DOPANTS BIOACTIFS ET ETUDES D'EVOLUTION

Certains ions peuvent apporter des propriétés bioactives additionnelles aux céramiques, et de nombreux articles en font état, en particulier pour les bioverres pour lesquels l'impact de la présence d'espèces ioniques supplémentaires a beaucoup été étudiée. Pour les phosphates de calcium la littérature est aussi très riche. Cependant, moins d'articles portent sur le dopage de carbonates de calcium et en particulier des amorphes, malgré leur forte capacité d'intégration d'ions et leur dissolution rapide, libérant rapidement les espèces actives en milieu physiologique. Pour appréhender cette cinétique de dissolution et la libération d'ions, et ainsi anticiper le potentiel comportement *in vitro* puis *in vivo* des poudres, des études d'évolution dans différents types de milieux peuvent être réalisées.

I.1 PRINCIPAUX IONS DOPANTS D'INTERET BIOLOGIQUE

I.1.1 Bioactivité des ions

Les ions constituants des phosphates ou carbonates de calcium ont montré des propriétés particulières voire essentielles pour la régénération osseuse. Le calcium, en plus d'être nécessaire à la minéralisation car composant important de l'apatite osseuse (36,6 % mass. [18]), favorise la prolifération et la différenciation des ostéoblastes, augmente l'expression de facteurs de croissance et favorise la minéralisation de la matrice extracellulaire [19,432]. Les phosphates (≈ 18 % mass. [433]) régulent plusieurs processus de la formation osseuse et forment l'apatite osseuse en se liant au calcium, dans laquelle

les ions carbonate (6 – 7 % mass. [433]) sont substitués en quantité variable et évoluant dans le temps [17,19,432]. Il est possible de conférer des propriétés additionnelles aux biocéramiques de CaP ou CC avec le dopage par des ions aux propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires, pro-angiogéniques et/ou ostéogéniques. En particulier, il a été montré que le cuivre et le zinc ont des propriétés antibactériennes marquées. En effet, comme illustré par les données du Tableau 3.1, les ions Cu^{2+} et Zn^{2+} ont une concentration minimale inhibitrice (CMI) faible, *i.e.* la concentration la plus basse pour laquelle la croissance des micro-organismes est inhibée de manière significative [434], pour les principales souches bactériennes responsables de la plupart des infections nosocomiales chez l'homme. On peut remarquer à titre de comparaison que l'ion mercurique Hg^{2+} a une CMI bien inférieure, mais son utilisation n'est pas envisageable en raison de sa toxicité.

Tableau 3.1 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) pour quatre ions métalliques, sur des bactéries cultivées en milieu nutritif. Adapté de Hassen et al. [434].

BACTERIES	CMI (mM)			
	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Co^{2+}	Hg^{2+}
Escherichia coli	0,5	0,2	0,2	0,05
Staphylococcus aureus	0,2	0,2	0,2	0,005
Pseudomonas aeruginosa	1,2	1,5	0,4	0,08

En addition à ces propriétés antibactériennes, le zinc, présent à l'état de traces dans les os (39 ppm [18]), a des propriétés anti-inflammatoires et ostéogéniques [19,432] : il stimule la formation osseuse *in vitro* en activant la synthèse de protéines dans les ostéoblastes, inhibe la formation d'ostéoclastes et ainsi la résorption osseuse, et augmente l'activité de la phosphatase alcaline (marqueur précoce de la minéralisation osseuse) pour une gamme de concentrations donnée (1 à 10 µM dans le milieu cellulaire pendant l'essai *in vitro*) [28,435].

Le cuivre est un meilleur agent antibactérien que le zinc, mais il est plus cytotoxique [14]. Il permet de stimuler l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins) et a aussi des propriétés ostéogéniques, en augmentant la différenciation des cellules mésenchymateuses vers la lignée ostéogénique et en inhibant l'activité des ostéoclastes [19,432]. Son efficacité a été reportée pour des concentrations inférieures à 50 ppm [28].

Le strontium, de rayon ionique (118 pm) proche de celui du calcium (100 pm) [436,437], peut s'incorporer dans le réseau cristallin de l'hydroxyapatite. Il est d'ailleurs présent dans le minéral osseux humain, mais en très faible quantité (0,05 % mass. [18]). Il a un effet bénéfique *in vivo* sur les cellules osseuses et la formation de tissu osseux ; il était utilisé pour traiter l'ostéoporose sous forme de ranélate de strontium (dont l'utilisation est actuellement controversée) et sert à augmenter la densité osseuse [19,432,438]. Il a montré *in vitro* et *in vivo* une double action, augmentant l'activité des ostéoblastes et diminuant celle des ostéoclastes, accroissant la densité du minéral osseux et ses propriétés mécaniques [439], pour des concentrations inférieures à 1 mM [28].

Les apports journaliers recommandés (RDA) et limites maximales tolérables des ions cités précédemment sont comparés sur le Tableau 3.2. Les limites ne sont pas définies avec les mêmes indicateurs pour tous les ions, mais les informations qui en sont extraites sont comparables du point de vue relatif : de manière non surprenante, le calcium est très bien toléré par le corps, le cuivre est moins toléré que le zinc, et le strontium est très peu cytotoxique pour les cellules osseuses [14], comme l'atteste la valeur élevée du risque minimal d'exposition.

*Tableau 3.2 : Quantités seuil (en mg/jour pour un homme adulte) de différents ions [438,440–442]. Les différents indicateurs (notés entre parenthèses) sont les suivants : l'apport adapté (AI, adequate intake), la quantité sans effet néfaste observé (NOAEL, no observed adverse effect level), l'apport nutritionnel recommandé (RDA, recommandary dietary allowance), le seuil maximal tolérable (UL, upper limit) et le risque minimal d'exposition (MRE, minimal risk exposure). Le symbole * correspond au taux de strontium recommandé pour le traitement de l'ostéoporose.*

IONS	QUANTITES SEUIL (mg/jour)
Ca^{2+}	1000 (AI) – 4000 (NOAEL)
Zn^{2+}	11 (RDA) – 40 (UL)
Cu^{2+}	0,9 (RDA) – 10 (UL)
Sr^{2+}	2 (*) – 140 (MRE)

Parmi les autres ions dopants, on peut citer l'argent, l'agent antibactérien de type non antibiotique le plus utilisé, ou le magnésium et silicium, pour leurs propriétés ostéogéniques.

Le zinc, cuivre et strontium ont été choisis comme ions dopants dans notre étude, du fait des propriétés bioactives citées plus haut, et aussi de la bivalence de ces ions Zn^{2+}, Cu^{2+} et Sr^{2+}, permettant potentiellement une substitution relativement aisée du calcium lors de la synthèse des poudres amorphes PyACC (à la différence de l'argent par exemple (Ag^{+}), qui avait dans un premier temps été considéré). Leurs différences de configuration électronique, de nature chimique (métaux de transition ou éléments d (Cu, Zn) *vs.* alcalino-terreux ou élément s (Sr)) et de rayons ioniques (73 ppm, 74 ppm et 118 ppm pour Cu^{2+}, Zn^{2+} et Sr^{2+} respectivement) peuvent également modifier les mécanismes physico-chimiques en jeu lors de la précipitation et induire des compositions/structurations différentes des PyACC dopés résultants.

I.1.2 Dopage ionique des phosphates de calcium

Les phosphates de calcium ont été historiquement plus étudiés et développés pour le comblement et la réparation osseuse que les carbonates de calcium. Cela explique que l'on retrouve beaucoup plus d'articles concernant le dopage de phases de CaP que de CC. Cette littérature riche met en exergue l'impact de la nature des dopants sur la structure des solides inorganiques de CaP, iono-covalents et contenant du calcium comme les CC, afin de pouvoir par la suite raisonner par analogie. Au-delà des phases cristallines, dopées avec des ions comme le cuivre, le zinc, le strontium ou encore l'argent, telles que l'hydroxyapatite [14,443–449], le β-TCP [445–447,449], la brushite [450] ou encore la monétite [451], l'amorphe CaP (ACP) a été dopé avec les mêmes ions, mais dans des concentrations plus élevées. Le strontium [249,452,453] comme le zinc [454–456] permettent l'obtention de la phase amorphe et inhibent la cristallisation de l'HA . L'impact de la substitution partielle par des ions de différents rayons ioniques (du plus petit au plus gros Mg^{2+}, Zn^{2+}, Sr^{2+} et Ba^{2+}) sur la cristallisation des ACP en température a été étudié expérimentalement par Sinusaite *et al.* [436], se basant sur une étude théorique de Matsunaga *et al* .[457]. Ils ont mis en évidence des comportements différenciés selon la taille des ions : les ions de plus petit rayon ionique que Ca^{2+} (*i.e.* Mg^{2+} et Zn^{2+}) sont facilement substitués sur des sites de Ca dans la phase β-TCP, qui est donc dans ce cas obtenue en majorité, tandis que les ions de plus gros rayon (Sr^{2+} et Ba^{2+}) ont plutôt tendance à stabiliser la phase d'α-TCP (voire à inhiber la cristallisation). Cette tendance est aussi confirmée pour des ions plus petits [458] comme Fe^{3+}. Il a de plus été montré que selon les températures de frittage les ions dopants ne s'intègrent pas dans les mêmes phases [449]. L'intégration préférentielle du dopant selon sa nature (et donc son rayon ionique) et/ou la température de frittage peut permettre un contrôle voire une modulation de la phase obtenue et ainsi, comme les phases ont des solubilités différentes, une libération contrôlée de l'ion dopant *in vitro* ou *in vivo*. Par exemple, le β-TCP plus soluble peut libérer plus rapidement le cuivre intégré, tandis que l'HA moins soluble peut assurer une libération lente et continue du strontium.

I.1.3 Dopage ionique du carbonate de calcium amorphe

Dans la littérature, on retrouve de nombreuses occurrences d'additifs ajoutés aux ACC, mais il s'agit essentiellement de stabilisateurs empêchant leur cristallisation, comme le magnésium (décrit dans le Chapitre 1). Au-delà du magnésium, peu d'étude font état du dopage par des ions apportant des propriétés bioactives additionnelles pour la reconstruction osseuse. Pourtant l'incorporation d'ions simples est facilitée et non sélective dans l'ACC, du fait de son réseau faiblement ordonné, pouvant intégrer des éléments avec des rayons ioniques plus grands que le calcium, et de sa grande surface spécifique (pour des incorporations *a posteriori* après synthèse, par exemple pour des applications de dépollution) [459]. Le strontium pourrait de fait être extrait d'eaux polluées avec une efficacité 70 fois supérieure pour un ACC qu'une phase de CC cristalline [460]. Sa grande solubilité permet de plus une libération rapide des ions actifs. Parmi les ions dopants précédemment cités, le cuivre est connu comme inhibiteur de la cristallisation de la calcite [461–463], en formant un amorphe mixte $(Cu,Ca)CO_3$ [464]. Souvent, la phase amorphe formée est plutôt du carbonate de cuivre basique (ou georgite) de formule $CuCO_3.Cu(OH)_2$ quand le cuivre est en quantité importante [465–469]. Plus globalement, les ACC dopés sont utilisés comme précurseurs aux phases cristallines de carbonate de calcium, intermédiaires pour intégrer des ions métalliques, parfois incompatibles, dans leur réseau. L'utilisation d'un tel intermédiaire est particulièrement intéressante car le taux de dopant est en général conservé quand l'ACC cristallise en calcite, et ce malgré les réactions probables de dissolution-reprécipitation [459]. Des ions Cu^{2+} et Zn^{2+} ont ainsi été intégrés dans le réseau de la calcite par substitution des Ca^{2+} [470,471]. Concernant l'ion strontium, son rayon ionique plus élevé que celui du calcium (118 pm et 100 pm respectivement) induit une plus grande coordinence (de 9 par rapport aux atomes d'oxygène pour Sr^{2+} dans la strontianite $SrCO_3$), il a par conséquent longtemps été pensé qu'il ne pouvait pas être intégré dans le réseau de la calcite (où les Ca ont une coordinence de 6) mais uniquement dans celui de l'aragonite (coordinence de 9) [459,460]. Il inhiberait ainsi la cristallisation de l'ACC, entre autres via son faible coefficient de diffusion à température ambiante, le contraignant à rester dans le cœur et bloquant la germination [472]. Cependant, des études récentes ont montré que la synthèse avec un ACC dopé comme intermédiaire engendre la substitution de Sr^{2+} aux Ca^{2+} de coordination 6 de la calcite [459,473], avec des taux de dopage allant jusqu'à 30 % mol. (pour Sr/(Sr+Ca)). La structure de la calcite se modifierait un peu, passant d'une phase ordonnée à une phase plus désordonnée, avec des changements d'orientation des unités carbonate, ce qui avait déjà été observé à haute température. Enfin, Zou *et al.* [350] ont mis en évidence l'importance de la concentration d'ions carbonate lors de la précipitation avec des ions dopants alcalino-terreux : il y a une meilleure intégration à plus faible concentration de CO_3^{2-} (10 mM) exacerbée pour les ions les plus gros (Sr^{2+} et Ba^{2+} par rapport à Mg^{2+} et Ca^{2+}), mais elle est limitée à une concentration plus élevée (100 mM).

I.2 ETUDES D'EVOLUTION EN MILIEUX AQUEUX

Les études de dégradation des matériaux et de libération des espèces ioniques sont des étapes préliminaires indispensables pour appréhender la bioactivité du matériau en milieu physiologique [474]. Le milieu le plus simple est l'eau ultrapure, de résistivité fixée à 18 MΩ.cm, solvant et composé majoritaire du sang. De nombreuses études portent sur l'évolution de l'ACC en milieu aqueux, principalement du suivi *in situ* de la cristallisation dans le but de comprendre les mécanismes en jeu [320,322], mais quelques articles s'intéressent plutôt à la dégradation des poudres séchées puis ensuite remises en solution [93,346,475]. Les études dans l'eau permettent une première compréhension des mécanismes de dégradation, mais ne reproduisent pas l'effet tampon présent *in vivo* dans les fluides humains [476] ni les possibles interactions avec les ions et/ou les molécules (protéines, ...) le composant.

Le pH du milieu peut être ajusté pour mimer certaines situations biologiques, comme lors d'une inflammation post-opératoire pour lesquelles le pH diminue aux alentours de 4 – 5 [477]. De plus, l'acidité du milieu peut catalyser les réactions et ainsi accélérer les essais de dégradation, qu'il est parfois impossible de réaliser sur des temps trop longs. Il est aussi possible de réaliser des essais dans un milieu tamponné, comme une solution de tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS) [474].

Afin de mimer l'évolution du matériau en tenant compte des interactions avec les ions contenus dans le plasma, des essais sont réalisés dans un fluide le simulant, appelé *simulated body fluid* (SBF) [93,478,479]. Il est communément admis que la bioactivité d'un matériau se définit par sa capacité à former de l'apatite à sa surface pendant son immersion dans du SBF [480], c'est même sur ce principe qu'est basée la méthodologie de la norme ISO/FDIS 23317 : 2007 « *Implants for surgery – In vitro evaluation for apatite-forming ability for implant materials* » et la norme française en découlant ISO 23317 : 2014. Ce milieu est couramment employé comme substitut *in vitro* aux tests *in vivo*, limitant ainsi les sacrifices d'animaux. Kokubo *et al.* [481] ont proposé une solution modèle de SBF après plusieurs adaptations des concentrations ioniques pour s'approcher au plus près des concentrations dans le plasma humain. Cependant, cette norme et la méthodologie proposée sont controversées [482,483]. En effet, il est souvent reproché au SBF d'être sursaturé par rapport à l'apatite, sa métastabilité entraînant dans tous les cas une précipitation d'apatite après un temps suffisamment long. Le taux de carbonate dans le SBF de Kokubo *et al.* n'est pas fixe et peut varier durant l'étude, les carbonates ayant pourtant un rôle clé *in vivo* car agissant comme tampon du plasma sanguin [476] et inhibiteurs de la cristallisation de l'apatite [433]. De plus, certaines concentrations ioniques sont trop élevées, ne prenant pas en compte le fait que les ions ne sont pas tous disponibles car pouvant être complexés ou liés à des protéines. La quantité de TRIS tamponnant la solution est également très élevée, alors que c'est un composé absent du plasma humain. Enfin, aucune protéine n'est introduite dans la solution, malgré leur rôle majeur dans la formation de l'apatite osseuse [484]. Cela peut ainsi entraîner un certain biais sur les résultats : la calcite, le β-TCP ou certains bioverres ne forment pas de couche d'apatite sur leur surface quand ils sont immergés dans le SBF (pas de « bioactivité » *in vitro*), mais ont la capacité d'être intégrés dans le tissu osseux *in vivo* [482,485–488]. Au contraire, le sulfate de calcium hémihydraté, la brushite ou la coquille d'ormeau forment une couche d'apatite dans le SBF mais ne se lient pas à l'os *in vivo* [482,486,489,490]. Malgré les controverses, une étude bibliographique menée par Zadpoor *et al.* [491] a montré que pour 3/4 des cas étudiés (33 au total), le comportement *in vivo* est en accord avec celui obtenu *in vitro* dans du SBF. Les matériaux étudiés sont relativement variés : implants métalliques, polymères synthétiques ou naturels, α-TCP, gel de silice, composites céramique-polymère … Pour le quart restant, l'essai dans le SBF n'a pas montré de formation de couche d'apatite *in vitro* malgré une intégration osseuse *in vivo*.

Des solutions alternatives au SBF ont été développées. Lee *et al.* [492] ont réalisé un SBF sans TRIS, tamponné avec du lactate de sodium. M. Desbord [261] a développé dans sa thèse un nouveau protocole de synthèse du SBF inspiré des recommandations de Bohner et Lemaitre [482], préparant les solutions anionique et cationique à part, le mélange des deux et l'introduction des ions carbonate étant effectués juste avant le lancement des essais d'évolution pour limiter les échanges gazeux avec l'atmosphère. La métastabilité est ainsi limitée et la concentration en carbonate contrôlée et donc connue au début de l'essai. Un autre avantage est la plus faible quantité de TRIS nécessaire pour tamponner la solution SBF. Finalement, les essais d'évolution dans le SBF ne peuvent pas être considérés comme équivalent *in vitro* des tests *in vivo* et ils ne permettent en aucun cas de mimer le comportement *in vivo* des matériaux étudiés. Ils ne sont de plus pas adaptés pour des applications sur des tissus mous par exemple [486]. Cependant, l'étude de la libération d'ions et les mécanismes de dégradation et/ou de cristallisation dans un milieu ionique complexe constitue un prérequis intéressant aux études *in vitro* cellulaires et *in vivo*.

Des essais acellulaires dans des milieux contenant des enzymes ont aussi été développés, avec par exemple la phosphatase alcaline (PAL) clivant les ions pyrophosphate en ions orthophosphate [261], sans laquelle les ions pyrophosphate sont relativement stables. L'utilisation de milieux de culture comme le DMEM (*Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium*) n'a pas montré de résultats probants, à cause de sa sursaturation par rapport aux carbonates de calcium favorisant leur précipitation et la nécessité de maintenir un environnement stérile [493].

Toutes ces études d'évolution peuvent être réalisées avec une méthode statique (les poudres étant laissées dans le même milieu avec ou sans agitation tout au long de l'essai) ou dynamique (avec changement de milieu régulier, après chaque prélèvement ou en continu pour se rapprocher d'un modèle de circulation biologique) [261,486]. Cette dernière méthode est la plus biomimétique et permet une meilleure homogénéité de la couche d'apatite formée (dans le cas du SBF) [486,494], mais sa difficulté de mise en œuvre, en particulier pour des milieux plus complexes, font souvent pencher la balance vers la méthode statique. Il a été montré qu'au-delà des aspects cités, le paramètre crucial pour les essais d'évolution est le rapport massique solution / poudre, tenant compte de la masse du solide mise en contact avec la solution [495]. Maçon *et al*. [495] recommandent un ratio massique de 1,5 mg/mL, pouvant être réduit pour un matériau poreux ou avec une surface spécifique très élevée.

I.3 EVALUATION BIOLOGIQUE *IN VITRO* EN PRESENCE DE CELLULES

Pour étudier la cytotoxicité des matériaux et l'impact de leur libération potentielle d'ions bioactifs, des tests *in vitro* cellulaires sont requis, avec mise en contact direct ou indirect des matériaux avec des cellules. Leur viabilité est ensuite évaluée, en fonction de la durée d'incubation ou de la concentration de particules mises en contact (le cas échéant). Pour cela, divers tests peuvent être utilisés [39] : les test MTT mesurent l'intégrité de l'enzyme mitochondriale ; les cellules synthétisant l'ADN peuvent être identifiées et comptées ; ou l'intégrité de la membrane cellulaire peut être évaluée par le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) libéré dans le milieu cellulaire (enzyme stable du cytoplasme libérée rapidement des cellules quand la membrane est endommagée) [400]. La biofonctionnalité comme l'adhésion, colonisation ou prolifération cellulaires peuvent aussi être mesurées [39], par exemple par coloration par le cristal violet (attachement cellulaire) [400] ou par la calcéine-acétoxyméthyle (calcéine-AM) fluorescente, initialement perméable aux membranes cellulaires puis convertie par les cellules vivantes uniquement en composé imperméable et colorant leur cytoplasme [400] (viabilité, prolifération, morphologie des cellules). Les propriétés ostéogéniques des matériaux peuvent être évaluées en quantifiant l'expression de la PAL (marqueur précoce de la minéralisation et de la différenciation ostéogénique [400]) et/ou des gènes ostéogéniques comme ceux de l'ostéopontine ou de la protéine RUNX2 [496]. Il est également possible de mesurer la formation de dépôts d'HA dans le milieu cellulaire via des kits de minéralisation [99]. Les propriétés pro-angiogéniques sont généralement estimées par le biais d'un des paramètres suivants : formation de vaisseaux sanguins, prolifération de cellules endothéliales, expression des facteurs angiogéniques comme les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) ou les gènes caractéristiques de l'angiogenèse [496].

Malheureusement très souvent l'évolution du matériau n'est pas considérée lors des tests biologiques, et très peu de caractérisations de la poudre et/ou du milieu sont conduites au terme de l'incubation. Cela peut cependant s'expliquer par les très faibles quantités de poudres mises en jeu dans les essais, qu'il est difficile de recueillir en suffisamment grande quantité pour les caractériser par plusieurs techniques et de manière reproductible.

II SYNTHESE ET CARACTERISATION DES ACC DOPES

La synthèse de la poudre de 10PyACC a été adaptée pour réaliser des dopages avec trois taux différents de strontium, cuivre et zinc. Ce taux particulier de pyrophosphate (10 %) a été choisi pour cette étude de l'effet de dopages cationiques en raison de la grande stabilité conférée à la poudre amorphe de 10PyACC non dopée obtenue (*cf.* Chapitre 2), limitant ainsi potentiellement l'impact de ce paramètre. Les différentes compositions de poudres dopées synthétisées ont été caractérisées du point de vue de leur structure et de leur composition chimique, pour vérifier leur caractère amorphe et quantifier l'intégration des dopants. Les différents dopants (Cu^{2+}, Sr^{2+} et Zn^{2+}) ont été choisis pour leurs propriétés bioactives détaillées plus haut. Leur rayon ionique et électropositivité [436,437,497], pouvant influer sur la structuration et la composition des poudres résultantes ainsi que sur leur capacité d'évolution et libération d'ions en milieux aqueux, sont comparés aux valeurs pour l'ion Ca^{2+} sur la Figure 3.1.

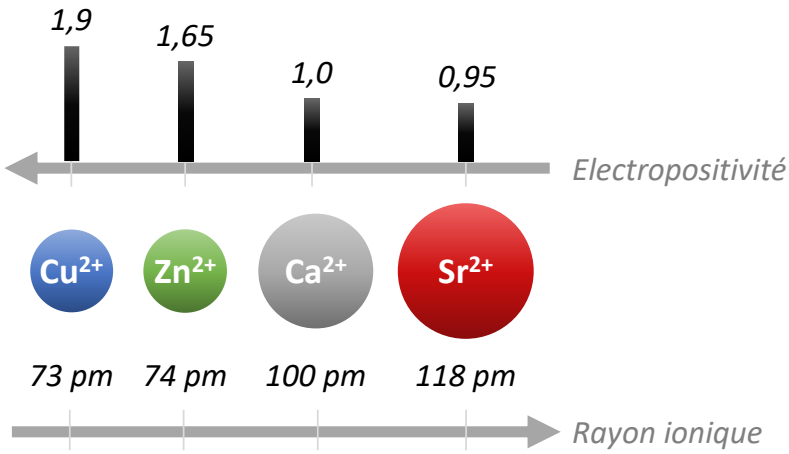


Figure 3.1 : Rayons ioniques (en coordinence 6) [436,437] et valeurs d'électropositivité [497,498] des différents ions dopants utilisés dans la synthèse des poudres 10PyACC dopées, comparés à ceux du calcium Ca^2.

II.1 SYNTHESES DE POUDRES DE 10PYACC DOPEES AVEC DES CATIONS D'INTERET

Les synthèses des poudres de 10PyACC dopées par des cations métalliques sont réalisées par co-précipitation, en ajoutant *a* % de Sr^{2+}, de Cu^{2+} ou de Zn^{2+} à la solution cationique contenant (100 – *a*) % de Ca^{2+}, *a* étant égal au pourcentage molaire du cation dopant par rapport à la somme du nombre de moles total de cations (calcium + cation dopant) dans la solution cationique. La solution anionique contenant les ions carbonate et pyrophosphate est préparée comme pour la synthèse classique de la poudre 10PyACC et ajoutée rapidement à la solution cationique. Après filtration rapide sous vide, lavage à l'eau et séchage par lyophilisation, les poudres dopées sont obtenues et nommées *a*Cu-10PyACC, *a*Sr-10PyACC et *a*Zn-10PyACC respectivement, qui seront en général abrégées en *a*Cu, *a*Sr et *a*Zn. Les valeurs de *a* sont choisies égales à 1,35 ; 6,67 ou 13,10, mais seront arrondies dans les notations à 1 ; 5 et 10 pour faciliter la lecture. Les quantités réelles introduites dans chaque solution sont présentées dans les Tableaux AV.2, AV.3 et AV.4 de l'Annexe V.2.4. Dans la littérature, des dopages d'ACP ont été réalisés avec 1 % mol. [455] ou 10 % mol. [454] de Zn^{2+} et montrent des propriétés antibactériennes, un dopage de phosphate de calcium biphasique (BCP) à 3 % mol. de zinc diminue cependant la prolifération cellulaire [446]. Des BCP dopés avec 3 % mol. de Cu^{2+} ou 7 à 10 % mol. de Sr^{2+} au contraire augmentent cette dernière [446]. Les valeurs que nous avons choisies sont donc adaptées à la littérature pour *a* = 1 ou 5. La valeur *a* = 10 a été choisie pour exacerber le dopage, afin de mieux comprendre les phénomènes physico-chimiques en jeu, même si la quantité d'ion métallique est probablement trop élevée pour une application biologique.

II.2 CARACTERISATION DES POUDRES 10PYACC DOPEES SYNTHETISEES

Les diffractogrammes RX des poudres de 10PyACC dopées par différents pourcentages molaires de Sr^{2+}, Cu^{2+} et Zn^{2+} sont présentés sur les Figures 3.2a, 3.2b, 3.2c. Tous présentent le halo diffus caractéristique des amorphes de carbonate de calcium, comme la référence 10PyACC, et n'ont pas de pics attestant de la présence d'une phase cristallisée. La présence d'ions dopants dans la solution cationique pendant la co-précipitation n'a donc pas affecté le caractère amorphe des poudres résultantes.

Dans les spectres d'absorption infrarouge Figures 3.2d, 3.2e, 3.2f et leurs agrandissements Figures 3.2g, 3.2h, 3.2i on retrouve les bandes caractéristiques de 10PyACC décrites précédemment (Chapitre 2 : II.1). Les attributions des bandes observées sont indiquées seulement sur les Figures 3.2d, 3.2g pour moins surcharger les autres. Pour réaliser une analyse comparative fine et quantitative des spectres, il faudrait réaliser des déconvolutions de ceux-ci, ce qui n'a pas été fait ici par manque de temps. Une analyse qualitative donne cependant quelques informations. La bande large et mal définie vers 3400 cm^{-1} correspond aux vibrations des groupements OH de l'eau, son intensité relative est similaire pour tous les spectres et donc toutes les poudres synthétisées. La bande principale des carbonates, constituée d'une bande dédoublée à 1415 – 1490 cm^{-1} et caractéristique de la vibration d'élongation asymétrique ν_3CO_3 [281] est superposable à celle de 10PyACC dans tous les spectres (Figures 3.2d, 3.2e, 3.2f et Figures AIII.1a, AIII.1b, AIII.1c de l'Annexe AIII.1). De la même manière, la bande à 865 cm^{-1}, visible sur les agrandissements entre 400 et 1300 cm^{-1} (Figures 3.2g, 3.2h, 3.2i et Figures AIII.1c, AIII.1d, AIII.1e de l'Annexe AIII.1) et associée à la vibration ν_2CO_3 du carbonate (déformation hors du plan) [281] est à la même position dans tous les spectres. En superposant les spectres dans la zone 400 – 1300 cm^{-1} (Figures AIII.1f, AIII.1g, AIII.1h de l'Annexe AIII.1), il apparaît des différences d'intensités relatives entre les spectres des poudres dopées et celle du 10PyACC de référence, en particulier pour les bandes associées aux vibrations du pyrophosphate [499], identifiées sur la Figure 3.2g. Cela peut s'expliquer par des quantités relatives de carbonate et/ou de pyrophosphate modifiées par le dopage. En effet, les spectres infrarouges sont normalisés en les divisant par l'intensité de la bande maximale, *i.e.* ν_3CO_3 dans ce cas. Or si la quantité de carbonate diminue lorsque les dopants sont introduits, les bandes du pyrophosphate sont exacerbées par cette normalisation. On peut conclure que les poudres *a*Sr, *a*Cu et *a*Zn sont bien amorphes et présentent les mêmes groupements caractéristiques que ceux identifiés pour la poudre de 10PyACC de référence, à savoir du pyrophosphate et du carbonate amorphe, mais il est difficile de conclure avec plus de détails sur ces analyses.

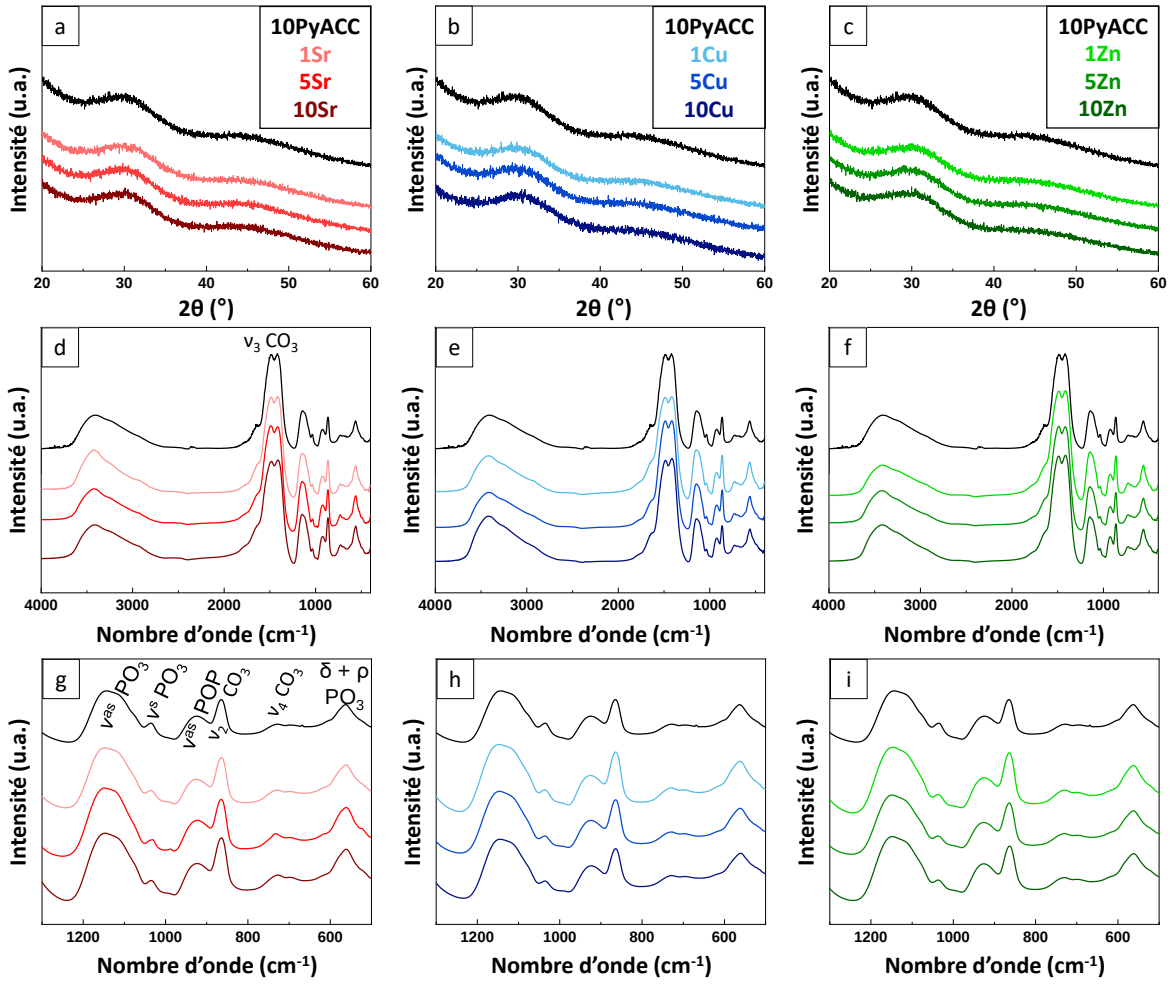


Figure 3.2 : Diffractogrammes RX (a, b, c), spectres FTIR complets (d, e, f) et agrandis entre 400 cm^{-1} et 1300 cm^{-1}(g, h, i) des poudres de 10PyACC dopées avec 1, 5 ou 10 % de strontium (a, d, g), de cuivre (b, e, h) ou de zinc (c, f, i). Les attributions des bandes visibles sont indiquées uniquement sur les spectres du strontium (d) et (g) par soucis de lisibilité, pour ne pas surcharger toutes les figures.

Pour aller plus loin, nous avons déterminé par des dosages la composition chimique des poudres de 10PyACC dopées au cuivre, zinc ou strontium. La quantité de calcium est issue des analyses ICP après dissolution de la poudre par de l'acide nitrique, car le dosage colorimétrique par complexation par l'EDTA, qui avait été utilisé pour les poudres *z*PyACC non dopées (Chapitre 2), ne permettait pas une quantification fiable à cause de complexes cuivre-ammoniaque formés perturbant la mesure. De plus, cette analyse basée sur la complexation de cations par l'EDTA donne la quantité totale de cations divalents, donc dans ce cas Ca^{2+} + M^{2+} (M = Sr, Cu ou Zn) et ne permet donc pas de discriminer la concentration relative de chaque type de cations constituants d'une même poudre. Le taux de dopants M est aussi issu de la mesure d'ICP, comme la quantité de sodium. Pour le dosage du pyrophosphate, du carbonate et de l'eau, les techniques sont les mêmes que celles utilisées pour les poudres *z*PyACC (dosage par complexométrie, coulométrie et ATG respectivement). Les valeurs des quantités de matière des éléments normalisées pour 100 mg de poudre sont présentées en détail dans le Tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Composition chimique des poudres aSr, aCu et aZn, comparée à celle de la référence 10PyACC, M étant respectivement Sr, Cu ou Zn.

Poudres dopées	n pour 100 mg						Ratio M^{2+}/cations (% mol.)	
	Ca^{2+} (mmol)	M^{2+} (mmol)	CO_3^{2-} (mmol)	$P_2O_7^{4-}$ (mmol)	Na^+ (mmol)	H_2O (mmol)	Théorique	Dosé
10PyACC	0,83 ± 0,06	X	0,64 ± 0,02	0,088 ± 0,004	0,0068 ± 0,00008	0,78 ± 0,11	100	99,1
1Sr	0,84 ± 0,06	0,0109 ± 0,0004	0,67 ± 0,02	0,0880 ± 0,0005	0,0219 ± 0,0001	0,72 ± 0,11	1,35	1,3 ± 0,2
5Sr	0,8 ± 0,2	0,0529 ± 0,0005	0,66 ± 0,02	0,0866 ± 0,0007	0,0126 ± 0,0001	0,69 ± 0,11	6,67	6,4 ± 1,2
10Sr	0,71 ± 0,06	0,0985 ± 0,0008	0,64 ± 0,02	0,0841 ± 0,0007	0,0207 ± 0,0002	0,65 ± 0,11	13,10	12,3 ± 1,5
1Cu	0,85 ± 0,06	0,0107 ± 0,0002	0,67 ± 0,02	0,0889 ± 0,0009	0,0179 ± 0,000	0,72 ± 0,11	1,35	1,2 ± 0,2
5Cu	0,80 ± 0,08	0,0587 ± 0,0004	0,64 ± 0,02	0,0871 ± 0,0009	0,0242 ± 0,0002	0,84 ± 0,11	6,67	6,9 ± 0,6
10Cu	0,77 ± 0,08	0,1066 ± 0,0008	0,61 ± 0,02	0,0789 ± 0,0008	0,0195 ± 0,0001	1,00 ± 0,11	13,10	12,2 ± 0,6
1Zn	0,83 ± 0,07	0,0098 ± 0,00007	0,66 ± 0,02	0,0891 ± 0,0009	0,0197 ± 0,0001	0,71 ± 0,11	1,35	1,2 ± 0,1
5Zn	0,78 ± 0,11	0,059 ± 0,001	0,63 ± 0,02	0,0874 ± 0,0009	X	0,82 ± 0,11	6,67	7,0 ± 0,2
10Zn	0,73 ± 0,10	0,1188 ± 0,0007	0,60 ± 0,02	0,0843 ± 0,0008	0,0236 ± 0,0002	0,91 ± 0,11	13,10	13,9 ± 2,3

On peut d'abord remarquer que la quantité de pyrophosphate varie très peu selon le type de dopant et le pourcentage molaire (entre 0,0841 ± 0,0007 et 0,0891 ± 0,0009 mmol / 100 mg de poudre), à l'exception de 10Cu pour lequel ce nombre est plus faible (0,0789 ± 0,0008 mmol / 100 mg). C'est donc bien le cation dopant et de son pourcentage le paramètre discriminant entre les poudres et dont l'impact sera évalué par la suite. Les principales informations extraites des dosages sont présentées sur les Figures 3.3, 3.4, 3.5. Sur la Figure 3.3, les nombres de moles d'eau (ronds, axe de gauche) et le ratio d'ions métalliques sur le total de cations (*i.e.* $M^{2+}/(M^{2+}+ Ca^{2+})$ en pourcentage molaire, croix, axe de droite) sont tracés en fonction du ratio M^{2+}/cations initialement introduit dans la solution cationique, pour chaque dopant Sr, Cu et Zn en Figures 3.3a, 3.3b et 3.3c respectivement. Les ratios dosés dans les poudres synthétisées sont pour tous les dopants très proches de ceux introduits initialement, comme l'atteste la proximité à la fonction linéaire tracée en pointillés sur le graphe. Seul le dernier point, pour les plus hauts ratios, s'en éloigne un peu : il est inférieur au ratio introduit initialement (13,10 %) pour 10Sr (12,3 ± 1,5 %) et 10Cu (12,2 ± 0,6 %) mais supérieur pour 10Zn (13,9 ± 2,3 %). Ces écarts sont cependant non significatifs au vu des incertitudes. C'est en accord avec la littérature, où il est souvent mentionné la bonne intégration des dopants dans les réseaux amorphes d'ACP [249,453,454]. La quantité d'eau varie différemment en fonction des dopants. En effet, avec Sr (Figure 3.3a) elle diminue légèrement de 0,72 ± 0,11 mmol à 0,65 ± 0,11 mmol quand la quantité de strontium augmente de 1Sr à 10Sr. Pour Cu (Figure 3.3b) et Zn (Figure 3.3c), c'est l'opposé, la quantité d'eau augmente de 0,72 ± 0,11 mmol à 1,00 ± 0,11 mmol de 1Cu à 10Cu et de 0,71 ± 0,11 mmol à 0,91 ± 0,11 mmol de 1Zn à 10Zn. L'absence de corrélation entre le pourcentage d'eau et de dopant a été relevée pour un ACC dopé avec du baryum [500], surprenant les auteurs car la force de liaison eau-

métal n'est pas la même entre le calcium de l'ACC et le baryum. On peut supposer que le strontium, de la même famille que Ba, se comporte de la même manière. L'augmentation de la quantité d'eau avec l'introduction d'ions Cu^{2+} et Zn^{2+} peut s'expliquer par leur cosmotropie ou haute coordinence avec les molécules d'eau [501] ainsi que leur électropositivité (1,9 et 1,65 respectivement, *cf.* Figure 3.1) supérieure à celle de Ca^{2+} (1,0), créant des liaisons plus fortes avec l'eau.

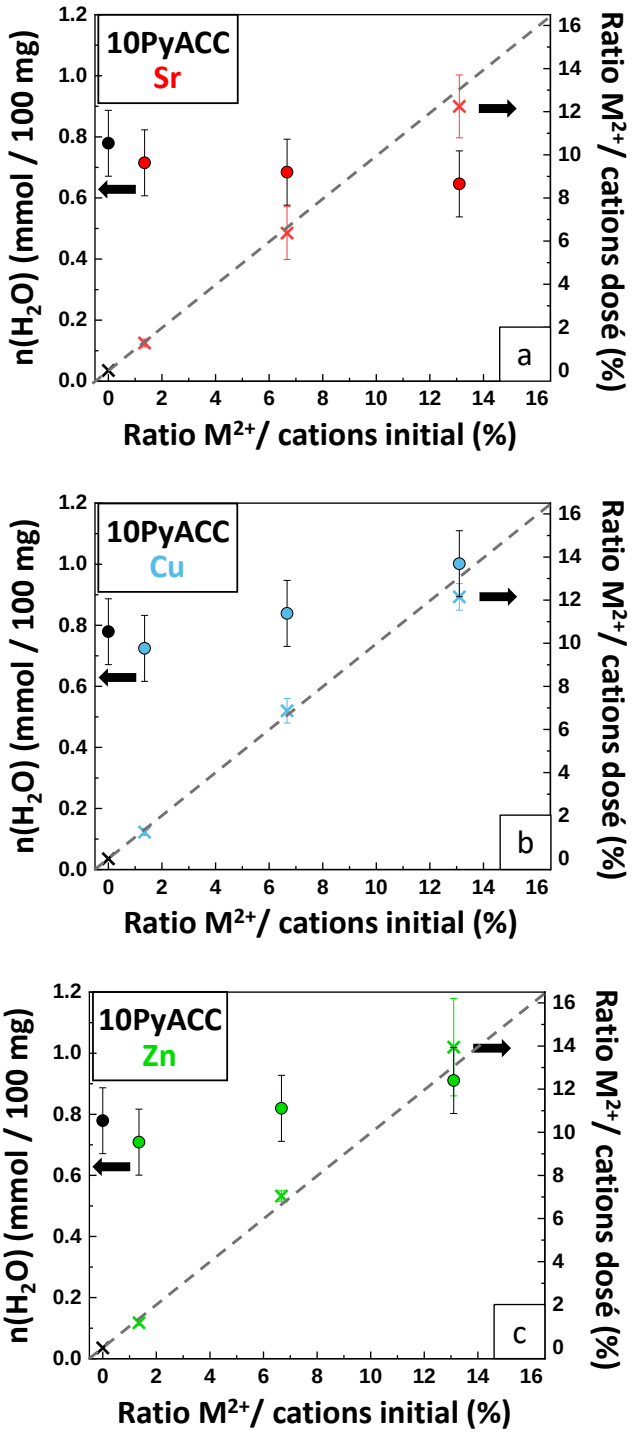


Figure 3.3 : Nombre de moles d'eau (ronds, axe de gauche) et ratio molaire de dopant M^{2+}sur le total des cations (Ca^{2+}+ M^{2+}) dosé dans la poudre synthétisée (croix, axe de droite) en fonction du ratio M^{2+}/cations introduit initialement dans la solution cationique, pour la poudre de 10PyACC de référence (en noir) dopée avec différentes proportions de strontium (a), cuivre (b) ou zinc (c). La linéarité entre les ratios initiaux en solution et dosés dans la poudre est mise en évidence par la ligne grise en pointillés.

Afin de comprendre les différences observées sur les spectres infrarouges (Figures 3.2d - 3.2i) et discutées plus haut, les nombres de moles du total des cations (Ca^{2+}+M^{2+}+Na^{+}) (□, axe de gauche) et des carbonates (Δ, axe de droite) ont été tracées sur la Figure 3.4. La quantité totale de cations est relativement stable quel que soit le ratio dopant/cations pour Cu et Zn (0,87 ± 0,04 mmol pour 1Cu à 0,85 ± 0,02 mmol pour 10Cu et 0,86 ± 0,02 mmol pour 1Zn à 0,88 ± 0,02 mmol pour 10Zn). Il y a une légère diminution pour 10Sr (0,83 ± 0,02 mmol pour 10Sr comparé à 0,87 ± 0,02 mmol pour 1Sr) mais qui n'est pas significative car dans la marge des barres d'erreur. La quantité de carbonate quant à elle diminue, et passe de 0,67 ± 0,02 mmol pour 1Sr et 1Cu et 0,66 ± 0,02 mmol pour 1Zn à 0,64 ± 0,02 mmol ; 0,61 ± 0,02 mmol et 0,60 ± 0,02 mmol pour 10Sr, 10Cu et 10Zn respectivement. C'est en accord avec ce qui avait été observé pour les spectres infrarouges et cela explique l'augmentation relative des bandes associées à l'ion pyrophosphate après normalisation par l'intensité de celles de l'ion carbonate (Figure 3.2).

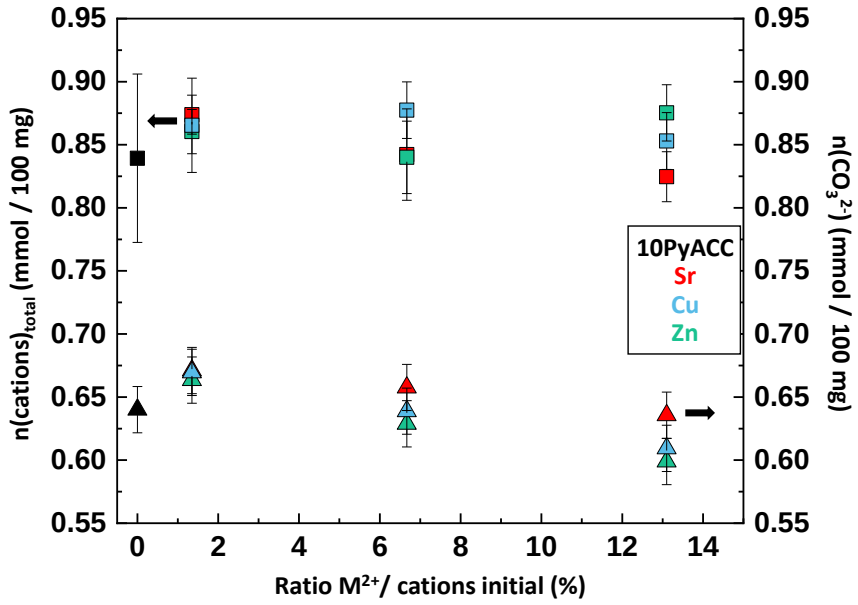


Figure 3.4 : Nombre de moles du total des cations (Ca^{2+}+M^{2+}+Na^{+}) (□, axe de gauche) et des carbonates (Δ, axe de droite) en fonction du ratio M^{2+}/cations introduit initialement dans la solution cationique, pour la référence 10PyACC et les dopants Sr (en rouge), Cu (en bleu) et Zn (en vert).

Les sommes des nombres de mmoles des différents ions composant les poudres de 10PyACC dopées multipliées par leur charge formelle relative, soit $2n(Ca^{2+}) + 2n(M^{2+}) + n(Na^{+}) - 2n(CO_3{}^{2-}) - 4n(P_2O_7{}^{4-})$ avec M = Sr, Cu ou Zn, sont tracées sur la Figure 3.5.

La somme est proche de 0 pour les *a*Sr (0,011 - 0,032 ± 0,001 mmol). Ce n'est pas le cas pour les autres dopants, pour laquelle elle est multipliée par près de 10 en augmentant le ratio dopant/cations initial : elle passe de 0,018 ± 0,001 mmol pour 1Cu à 0,152 ± 0,009 mmol pour 10Cu, et de 0,018 ± 0,001 mmol pour 1Zn à 0,192 ± 0,012 mmol pour 10Zn. Ces augmentations ne sont pas explicables par des variations des quantités de sodium et pyrophosphate, celles-ci étant faibles et relativement stables entre dopants et pour les différents ratios (voir valeurs sur le Tableau 3.3). La positivité de la somme suggère la présence d'un anion, non dosé ici. Cela ne peut pas provenir des contre-ions nitrate des cations dopants, car leur intégration serait marquée par un pic fin sur les spectres infrarouges. La solution de précipitation étant très basique, la formation d'hydroxydes métalliques est probable. Du point de vue atomique, le cuivre et le zinc sont beaucoup plus électropositifs que le calcium (1,9 ; 1,65 contre 1,0 respectivement), ce qui pourrait expliquer la

formation d'hydroxydes qui n'était pas observée pour les *z*PyACC. Cela se traduit macroscopiquement par des constantes de solubilité des hydroxydes de cuivre et de zinc très faibles, présentées dans le Tableau 3.4. Celles-ci sont presque 10^{10} fois inférieures aux K_{sp} des carbonates de cuivre et zinc. La formation de $Cu(OH)_2$ et $Zn(OH)_2$ est donc très favorisée par rapport à celle des carbonates et ils se forment probablement dès le début de l'ajout des dopants dans la solution anionique, expliquant alors la diminution de la quantité de carbonate observée dans la Figure 3.4. Au contraire, pour le strontium les constantes sont inversées, et la formation de carbonate de strontium est favorisée, comme c'est le cas pour le calcium, ce qui explique la somme restant proche de 0 dans la Figure 3.5.

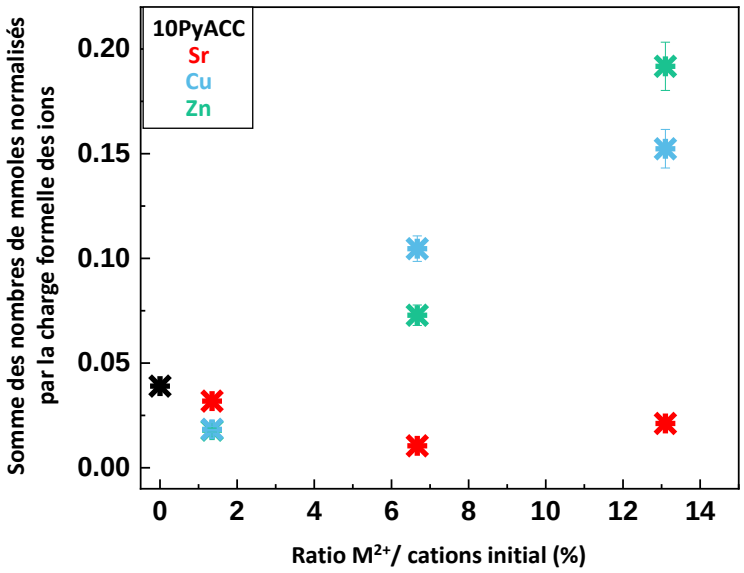


Figure 3.5 : Somme des nombres de mmoles de Ca^{2+}, M^{2+}, Na^{+}, CO_3^{2-} et $P_2O_7^{4-}$ multipliés par leur charge respective, en fonction du ratio M^{2+}/cations initialement introduit dans la solution cationique, avec M = Sr (en rouge), Cu (en bleu) ou Zn (en vert).

Tableau 3.4 : Constantes de solubilité des carbonates et hydroxydes de calcium, cuivre, zinc et strontium à 25 °C [85,502–505].

	K_{sp} à 25 °C		K_{sp} à 25 °C
$CaCO_3$ ACC	3,8 - 8,7.10^{-9} 4,1.10^{-7}	$Ca(OH)_2$	4,7 - 7,9.10^{-6}
$CuCO_3$	1,3 - 2,5.10^{-10}	$Cu(OH)_2$	1,6 - 2.10^{-19}
$ZnCO_3$	1,0.10^{-7} - 1,5.10^{-11}	$Zn(OH)_2$	4,1 - 5.10^{-17}
$SrCO_3$	1,3.10^{-9} - 5,6.10^{-10}	$Sr(OH)_2$	3,2.10^{-4} - 6,3.10^{-3}

Les analyses ATG et ATD des poudres de 10PyACC dopées sont tracées sur la Figure 3.6.

Pour le strontium (Figures 3.6a, 3.6d) les pertes de masse sont similaires à la référence 10PyACC. On peut quand même noter quelques différences : la perte d'eau (premier palier d'ATG) est moins importante quand du strontium est introduit (*cf.* quantité d'eau discutée plus haut), du fait de la plus faible électropositivité de ce dernier, générant une intégration plus faible d'eau structurale. La perte de masse finale est égale à celle de 10PyACC qui vaut - 37 % pour 1Sr mais plus faible pour 10Sr (- 34 %), ce qui signifie qu'il reste une masse plus importante après décomposition. Cela vient de la présence du strontium restant dans les produits de décomposition, probablement toujours sous forme de $SrCO_3$ (stable en température jusqu'à 1100 °C – 1200 °C avant décomposition en SrO + CO_2 [506]) en plus du CaO. Les ATD (Figure 3.6d) ressemblent à celles de 10PyACC, avec un premier pic endothermique correspondant à la perte d'eau, puis deux pics exothermiques associés à la cristallisation du 10PyACC

en calcite et la formation d'hydroxyapatite par hydrolyse des ions pyrophosphate, comme décrit dans le Chapitre 2 : II.2. Le dernier pic endothermique correspondant à la perte de masse finale est moins important, en accord avec la présence de $SrCO_3$ non décomposé, et décalé vers les plus hautes températures quand la quantité de strontium augmente, probablement du fait d'une stabilisation par le strontium.

Les poudres 10PyACC dopées au cuivre montrent une deuxième perte de masse quand la température augmente (après la première liée à la perte d'eau), entre 300 et 500 °C (Figure 3.6b). Or le $Cu(OH)_2$ se décompose en CuO + H_2O entre 140 et 190 °C [507,508], tandis que la malachite $CuCO_3.Cu(OH)_2$ donne 2CuO + CO_2 + H_2O à 350 °C [509]. Il y a donc probablement un composé mixte de carbonate et hydroxyde de cuivre ($CuCO_3.Cu(OH)_2$) dans les poudres *a*Cu plutôt que de l'hydroxyde de cuivre seul (ce dernier étant de plus métastable [507]). Cette hypothèse est renforcée par le pic endothermique entre 200 et 225 °C (Figure 3.6e), probablement associé au début de la décomposition. A la différence du strontium, la perte de masse finale est similaire pour 10PyACC et les *a*Cu (entre - 36 % et - 38 %). Les pics exothermiques du 10PyACC sont conservés dans 1Cu, mais s'aplatissent quand la quantité de cuivre augmente, ce qui est lié à la quantité de carbonate plus faible dans ces composés, montrée sur la Figure 3.4. Le pic endothermique associé à la perte de masse finale est décalé vers les plus basses températures quand du cuivre est ajouté, conséquence d'une quantité plus faible de carbonates donc se décomposant plus rapidement.

Enfin, pour le zinc le comportement en température ressemble à celui décrit pour le cuivre. Le deuxième palier de perte de masse (Figure 3.6c) a lieu à plus haute température, entre 300 et 470 °C. L'ATD (Figure 3.6e) laisse deviner un pic additionnel vers 220 – 250 °C, mais il est difficile de savoir s'il est exo ou endothermique. La décomposition de l'hydroxyde de zinc $Zn(OH)_2$ en ZnO + H_2O a lieu entre 125 °C et 145 °C, associée à un pic endothermique vers 155 – 195 °C [510,511]. Mais il existe aussi des formes mixtes d'hydroxyde de carbonate de zinc, comme l'hydrozinguite $Zn_5(CO_3)_2(OH)_6$, courante à haute pression partielle de CO_2 ou avec des grandes concentrations de carbonate [512,513]. Cette phase se décompose entre 156 et 440 °C avec la perte de masse la plus importante à 220 °C [513,514]. Pour la smithsonite $ZnCO_3$, la décomposition s'accompagnant de libération de CO_2 a lieu selon les articles entre 300 et 452 °C [515] ou 175 et 293 °C (avec des pics endothermiques à 235 °C et 265 °C) [513]. Les dosages ayant montré une intégration d'hydroxyde dans les poudres de *a*Zn et en accord avec les températures de leurs évènements thermiques, il est plus probable que la perte de masse supplémentaire d'ATG et les pics additionnels de la courbe ATD proviennent de la décomposition de l'hydrozinguite plutôt que du carbonate de zinc (smithsonite) ou de l'hydroxyde de zinc. Comme pour le cuivre, les pics exothermiques de la courbe ATD vers 430 °C et 485 °C s'aplatissent progressivement avec l'ajout de zinc, du fait de la plus faible quantité de carbonate présente dans la poudre et associée à 10PyACC (une partie étant probablement consommée dans l'hydrozinguite). Les pertes de masse finales sont similaires à 10PyACC (- 35 % à - 37 %) et ont lieu à plus basses températures, comme pour le cuivre.

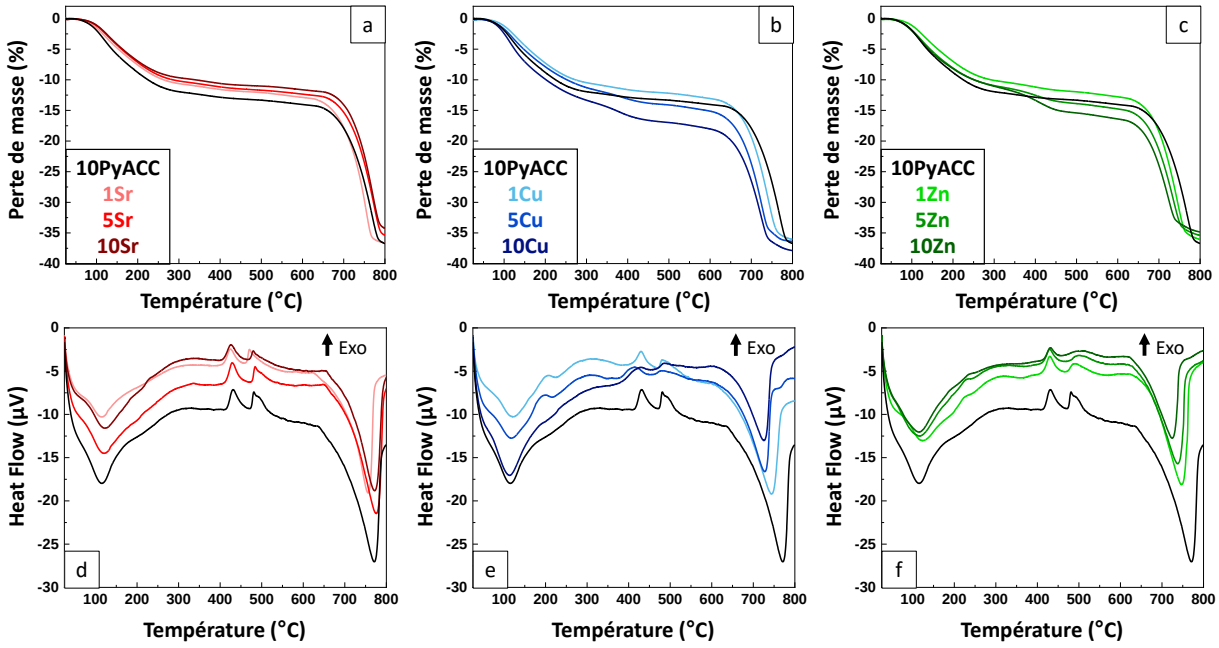


Figure 3.3.6 : Courbes ATG (a, b, c) et ATD (d, e, f) des poudres de 10PyACC dopées avec du strontium (a, d), du cuivre (b, e) et du zinc (c, f).

Les images MEB (Figure 3.7) des poudres dopées avec les différents cations métalliques ne montrent pas de différences notables avec la poudre de référence 10PyACC. Elles sont toutes composées d'agglomérats de taille et forme variables, avec un aspect granulaire en surface lié à la présence de petites particules non discernables à cette échelle d'observation. Aucun autre type de particules ou d'agglomérats n'était visible dans les poudres.

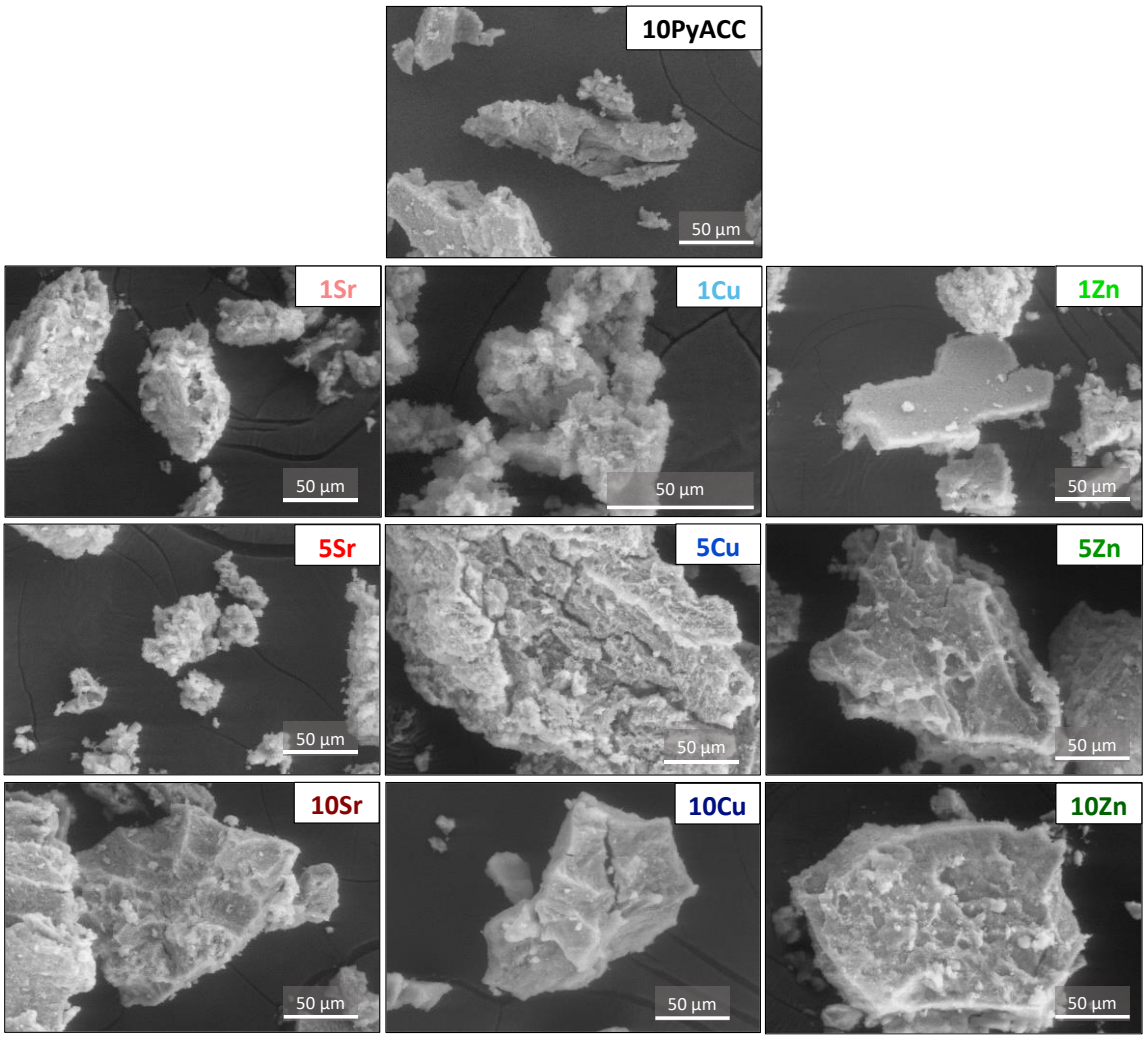


Figure 3.3.7 : Images MEB des poudres de 10PyACC dopées au Sr, Cu ou Zn (aSr, aCu et aZn), comparées avec le 10PyACC de référence (non dopé, en haut).

Les surfaces spécifiques des poudres dopées synthétisées sont présentées dans le Tableau 3.4 ; elles montrent peu de différences entre la poudre de référence 10PyACC et les différentes poudres dopées, et aucune tendance claire n'est relevée.

Tableau 3.5 : Surfaces spécifiques BET de la poudre de référence 10PyACC et des poudres dopées aSr, aCu et aZn

POUDRES DOPEES	SURFACE SPECIFIQUE (m^2/g) $\pm$ 1 %
10PyACC	56
1Sr	64
5Sr	55
10Sr	62
1Cu	63
5Cu	59
10Cu	68
1Zn	59
5Zn	59
10Zn	65

Les autres caractérisations effectuées sur les *z*PyACC non dopés et ayant permis de révéler une structuration à petite échelle sous forme de clusters au sein de la phase amorphe n'ont ici pas pu être effectuées par manque de temps. Néanmoins, à partir des résultats détaillés dans toute cette partie 2, il est possible d'émettre des hypothèses quant à la répartition des ions dopants dans le 10PyACC, en se basant sur le modèle expérimental proposé sur la Figure 2.27. Le strontium, intégré quantitativement dans le 10PyACC, est principalement sous forme de strontianite $SrCO_3$. Il pourrait substituer le calcium dans le cœur proto-vatérite (les carbonates étant dans notre modèle essentiellement localisés au cœur), cela induirait une déformation de celui-ci du fait de son gros rayon ionique, et de sa coordinence plus élevée (de 9 dans la strontianite). Mais devant sa quantité relativement faible, la substitution pourrait être possible malgré l'augmentation des contraintes sur quelques mailles au sein de chaque cluster, elle a d'ailleurs déjà été décrite dans la littérature pour la calcite et la vatérite [516]. La coordinence potentiellement plus élevée pourrait aussi renforcer les liaisons avec la couche d'eau structurale autour du cluster et le stabiliser d'autant plus. Le cuivre et le zinc ont un comportement différent : ils sont associés à des hydroxydes et des carbonates dans des composés mixtes (probablement du type $CuCO_3.Cu(OH)_2$ et $Zn_5(CO_3)_2(OH)_6$ respectivement). Ceux-ci pourraient alors plutôt être localisés en périphérie des clusters, autour du cœur proto-vatérite, potentiellement au sein d'une couche d'eau plus dense (plus grande coordinence avec les molécules d'eau et liaisons plus énergétiques du fait de la grande électropositivité des ions). Les interactions avec les pyrophosphates n'ont pas été discutées ici, avec l'hypothèse implicite (basée sur des quantités d'anions dosés similaires) que le rôle de ceux-ci dans le modèle proposé restait inchangé lors du dopage, ce qui n'est pas forcément le cas. Afin d'obtenir des données expérimentales confirmant/infirmant ces suppositions, il serait intéressant d'utiliser les mêmes caractérisations avancées que pour 10PyACC : les analyses SAXS permettraient d'accéder à la taille des sous-entités et ainsi dans l'idéal fourniraient des informations sur l'épaisseur de la couche d'eau/hydroxydes-carbonates de zinc ou de cuivre ; les données de WAXS-PDF vérifieraient (ou non) la conservation de la structure proto-vatérite du cluster et la déformation potentielle de l'organisation au sein de celui-ci ; et par analyses par RMN en phase solide il serait possible de distinguer des différences dans les environnements chimiques des ions carbonate et pyrophosphate le cas échéant, traduisant une réorganisation. Il faudrait ajouter à ces techniques d'autres adaptées aux ions dopants, analysant l'environnement local et/ou le degré d'oxydation des éléments proches, telles que l'EXAFS par exemple [517]. D'autre part, l'étude de l'évolution de ces poudres (et notamment la libération des ions Ca^{2+} et Sr^{2+}, Cu^{2+} ou Zn^{2+}) pourrait apporter également un éclairage sur ces hypothèses de distribution des dopants dans la poudre. C'est ce qui est présenté dans la partie suivante.

III Evolution des poudres de PyACC dopees et non dopees en milieux aqueux

Dans une étude préliminaire, les poudres 5PyACC, 10PyACC, 1Sr-10PyACC, 5Sr-10PyACC, 1Cu-10PyACC, 5Cu-10PyACC, 1Zn-10PyACC et 5Zn-10PyACC ont été laissées sous forme solide à température ambiante dans des piluliers fermés pour étudier leur stabilité. Après 10 mois, seule la poudre 5PyACC présente les pics caractéristiques de la vatérite, montrant une cristallisation partielle. Toutes les autres poudres sont stabilisées par la présence du pyrophosphate et/ou des dopants. Après cette première expérience, pour décrire la stabilité en milieux aqueux, appréhender le rôle stabilisateur des additifs et/ou dopants, et quantifier la libération d'ions bioactifs, ces mêmes poudres sont immergées dans de l'eau ultra-pure ou du SBF pendant des durées différentes. Les poudres contenant 10 % de dopant (a = 10) sont exclues de l'étude, car avec des taux d'ions métalliques trop élevés pour des applications biologiques. Un ratio de poudre / liquide de 150 mg / 100 mL est choisi,

en accord avec la littérature [93,261,495]. Les évolutions sont réalisées en triplicat à 37 °C dans une étuve, et les milieux sont agités manuellement tous les 2 jours, essentiellement pour assurer une surface de contact entre la totalité de la poudre et la solution (ce qui n'est pas le cas quand la poudre se dépose au fond du pilulier). Après des temps d'évolution de 6 h, 1 jour, 3 jours, 7 jours, 14 jours, 21 jours ou 28 jours, les milieux sont filtrés sous vide sur une tulipe, avec un filtre en cellulose de 0,45 µm. Le filtrat est récupéré et son pH est mesuré. La poudre est ensuite lavée avec 100 mL d'eau ultra-pure puis séchée avec 50 mL d'éthanol, le séchage étant achevé à l'étuve à 37 °C pendant une nuit. La poudre est pesée puis caractérisée par DRX, spectroscopie infrarouge et MEB. Les dosages du calcium et de l'ion dopant le cas échéant sont réalisés par spectrométrie d'absorption atomique soit sur la poudre (après dissolution par de l'acide nitrique) pour les évolutions dans le SBF (le SBF étant déjà très chargé en ions, des effets matrice lors de l'analyse auraient pu limiter sa sensibilité et sa fiabilité) soit sur le filtrat pour les évolutions dans l'eau. Les différentes caractérisations sont résumées sur le schéma de la Figure 3.8.

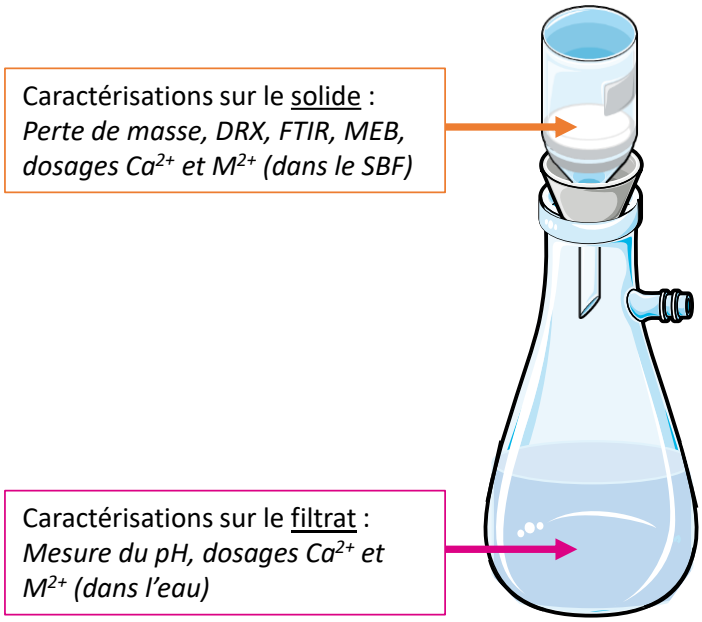


Figure 3.8 : Schéma de la filtration sur tulipe après évolution des poudres dans l'eau ultra-pure ou dans le SBF et mention des différentes caractérisations réalisées sur le solide et sur le filtrat. Schéma réalisé en utilisant les éléments de « Servier Medical Art » (https://smart.servier.com) sous licence Creative Commons.

III.1 METHODOLOGIE

Après les différentes durées d'évolution, les poudres ont été collectées par filtration puis séchées et caractérisées, entre autres par DRX. Les diffractogrammes RX obtenus ont été analysés avec le logiciel EVA. Le pourcentage de cristallinité de chaque poudre peut en être extrait après ajustement manuel de la ligne de base, le logiciel estimant l'aire occupée par les pics sortant au-dessus de cette ligne de base. Lorsque des pics sont présents, il est aussi possible d'estimer les proportions de phases cristallines. Pour cela, ces phases sont identifiées grâce à la base de données du logiciel, puis une fois que les fiches JCPDS associées aux phases en présence sont sélectionnées, la hauteur relative des pics correspondant à chaque phase de référence est ajustée manuellement à celle du diffractogramme RX mesuré. Une quantification est alors réalisée par le logiciel, donnant le pourcentage massique respectif de chaque phase, estimé à partir des hauteurs relatives de leurs pics. Les spectres infrarouges sont comparés qualitativement entre les différentes durées d'évolution.

Les dosages du calcium et des cations dopants ont été réalisés en triplicat par spectrométrie d'absorption atomique directement sur les filtrats dans le cas des évolutions dans l'eau, ou sur les solides dans le cas des évolutions dans le SBF, en raison de la présence de nombreux ions dans la matrice de la solution SBF qui auraient pu perturber l'analyse. Des tampons d'ionisation ont été ajoutés (CsCl et $La(NO_3)_3$) afin de corriger les effets de matrice liés à la présence des ions phosphate dans le milieu et au faible potentiel d'ionisation du calcium [518]. Le détail des dosages est donné en Annexe V.6.4. Pour les poudres ayant évolué dans l'eau, à l'issue du dosage on accède donc à la concentration d'élément (Ca ou M) libéré dans le milieu, et il est possible de calculer la quantité de matière associée (normalisée pour 100 mg de poudre) et ainsi le pourcentage (molaire) d'élément libéré par rapport à sa quantité initialement présente dans la poudre (mesurée au préalable par spectrométrie ICP ou d'absorption atomique). Ces deux dernières valeurs sont utiles, pour la première en vue d'une implantation future pour quantifier la quantité totale libérée en termes de bioactivité ou cytotoxicité potentielles ; et pour la deuxième pour quantifier la cinétique de libération, devant être adaptée aux applications biologiques visées dans le cadre d'une implantation. Pour les poudres ayant évolué dans le SBF, la valeur issue du dosage correspond à la quantité d'élément restant dans la poudre après évolution et donc permet d'en déduire indirectement celle libérée. Cette méthodologie implique de soustraire des quantités issues de deux techniques d'analyse différentes, ce qui peut induire des incertitudes élevées. Pour s'assurer de la validité de la méthode, pour deux échantillons ayant évolué dans le SBF (10PyACC et 5Zn), les quantités de calcium ont été dosées par spectrométrie d'absorption atomique à la fois dans la poudre ($n_{restante}$) et dans le filtrat ($n_{libérée}$), après soustraction pour cette dernière de la quantité (connue) de calcium présente initialement dans le SBF. Ces deux quantités ont été tracées pour toutes les durées d'évolution sur la Figure 3.9 (représentées par des hexagones et des carrés respectivement), ainsi que leur somme (représentée par des croix) et la quantité initialement présente dans chacune des poudres (ligne pointillée). Pour le premier point (6 h d'évolution), la somme des quantités de matière de calcium dosées ($n_{libérée} + n_{restante}$) est un peu sous-estimée par rapport à la quantité initiale dans les deux compositions de poudre (10PyACC et 5Zn). Mais pour toutes les autres durées d'évolution, la somme est similaire à la quantité initiale, dans les marges des barres d'erreur (à une exception près). Cela valide la méthodologie développée, et il est raisonnable d'estimer la quantité de calcium libérée dans la solution de SBF par soustraction de la quantité initiale et de celle restante dosée dans la poudre.

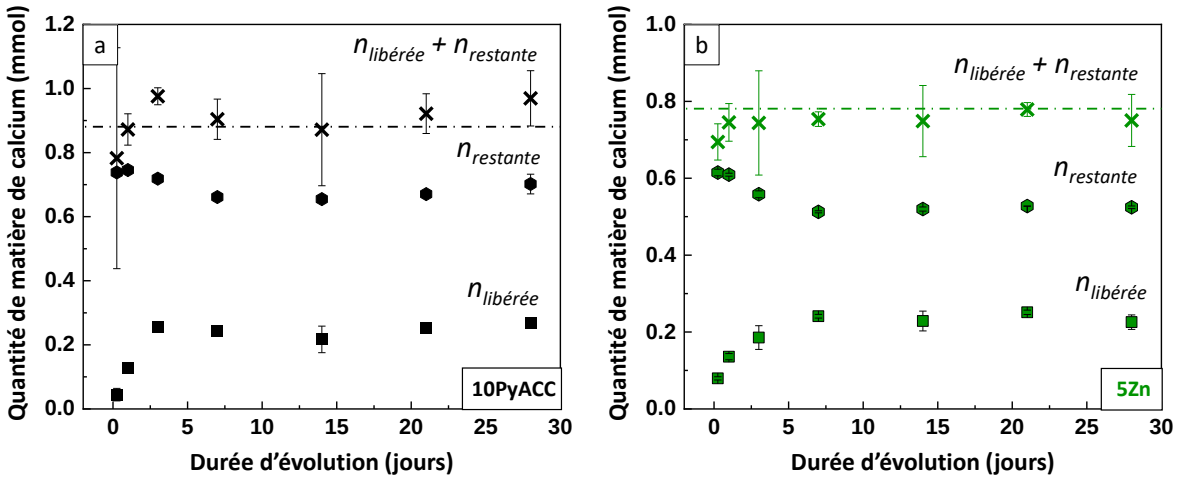


Figure 3.9 : Nombre de moles de calcium libérées dans la solution de SBF (carrés) et restant dans la poudre (hexagones), la somme des deux (croix) est comparée à la quantité initiale de calcium (ligne pointillée) dans la poudre de 10PyACC (a) ou 5Zn (b), en fonction de la durée d'évolution dans le SBF.

III.2 EVOLUTION DES POUDRES DANS L'EAU

Dans un premier temps, les essais d'évolution ont été conduits dans le milieu le plus simple possible : de l'eau ultra-pure. Cela permet d'appréhender les transformations de phase, pour permettre de comprendre les mécanismes ayant lieu dans des milieux plus complexes, contenant les ions présents dans le plasma humain.

III.2.1 Poudres de référence 5PyACC et 10PyACC

Les poudres d'ACC stabilisées avec 5 ou 10 % mol. de pyrophosphate, caractérisées finement dans le Chapitre 2, ont été immergées dans l'eau à 37 °C pendant différentes durées, de 6 h à 28 jours. Les diffractogrammes RX et la quantification des phases cristallisées présentes dans les poudres selon la durée d'évolution sont présentés sur la Figure 3.10. Les diffractogrammes RX (Figure 3.10a) montrent des pics associés à la vatérite (identifiés par Δ) et à la calcite monohydratée (MHC) (identifiés par ¤). Ces pics apparaissent à partir de 6 h pour 5PyACC mais seulement à partir de 3 jours pour 10PyACC. Pour 5PyACC, la première phase cristalline formée est la vatérite, dont la proportion augmente en continu (Figure 3.10b), rapidement jusqu'au 1er jour puis de manière moins importante quand la calcite monohydratée commence à se former. Pour 10PyACC les cristaux de vatérite ne sont pas détectés avant le 3ème jour, pour lequel il y a presque autant de calcite monohydratée formée (Figure 3.10c). Puis l'évolution est la même que pour 5PyACC, les proportions de ces deux phases cristallines augmentant avec la durée de l'évolution. Il apparait ici que l'amorphe 10PyACC est plus stable que 5PyACC, car il commence à se transformer plus tardivement en solution. De plus, la calcite, qui est la phase la plus stable thermodynamiquement, n'est pas obtenue ici. Cela est lié au rôle inhibiteur du pyrophosphate qui empêche sa formation, et laisse donc la possibilité à d'autres phases, moins stables, de se former : la vatérite en premier puis la calcite monohydratée, qui précipite lentement [519]. On note également un effet dose du pyrophosphate, qui outre le retard à la cristallisation semble stabiliser la MHC aux dépens de la vatérite et réduire la quantité totale de phases cristallines obtenues.

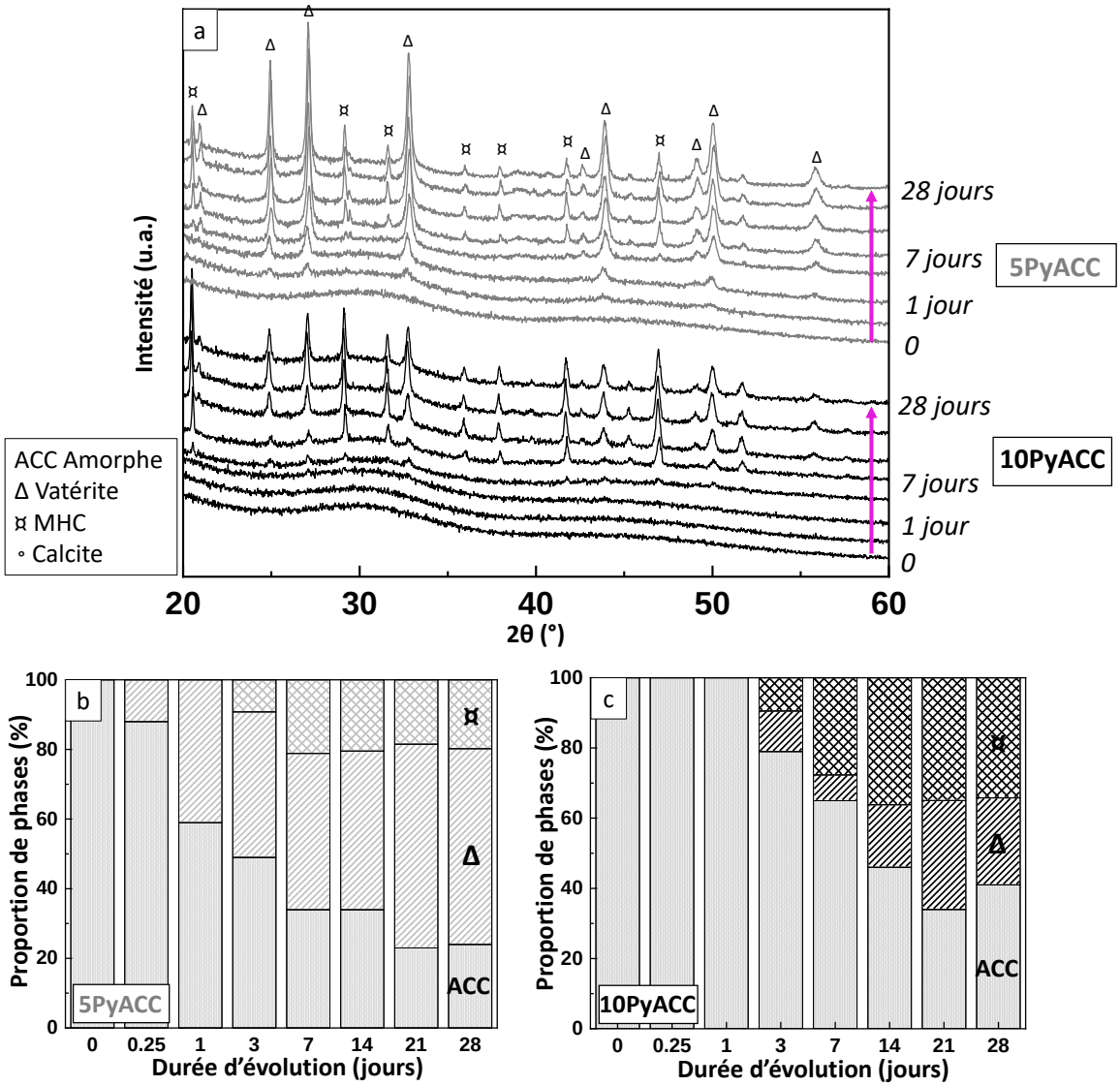


Figure 3.10 : Diffractogrammes RX (a) des poudres de référence 5PyACC et 10PyACC ayant évolué entre 6 h et 28 jours dans l'eau ultra-pure. Quantification des phases en présence dans les poudres 5PyACC (b) ou 10PyACC (c) selon la durée d'évolution et sur la base des résultats DRX, avec ACC la phase amorphe, Δ la vatérite et ¤ la calcite monohydratée (MHC).

Sur les spectres d'absorption infrarouge en Figure 3.11, on peut identifier les bandes associées au carbonate [105,130,520] dont l'intensité varie avec la durée d'évolution. En effet, vers 1063 – 1092 cm^{-1} une bande apparaît et son intensité augmente avec la formation des phases cristallines. Elle est associée à v_1CO_3, présente dans le spectre de la vatérite (1074 – 1090 cm^{-1}) et de la MHC (1063 – 1068 cm^{-1}) mais absente du spectre de l'amorphe de référence (5PyACC et 10PyACC). La v_2CO_3 à 864 cm^{-1} dans l'ACC se décale à 872 cm^{-1} quand la durée d'évolution augmente, position associée à la MHC (872 – 875 cm^{-1}) ou la vatérite (875 cm^{-1}). La bande dédoublée entre 1300 et 1600 cm^{-1} a deux pics de plus en plus définis, à 1427 et 1485 cm^{-1}, associés à la vibration v_3CO_3 de la vatérite (1440 et 1490 cm^{-1}). Sur les spectres infrarouges complets entre 400 et 4000 cm^{-1} sur la Figure AIII.2a en Annexe AIII.2, on observe aussi une augmentation de l'intensité de la bande d'eau, ce qui est en accord avec les proportions de calcite monohydratée croissantes. Les bandes associées au pyrophosphate [499] sont également présentes (δPO_3 et ρPO_3 vers 550 cm^{-1}, $v^{as}POP$ à 920 cm^{-1}, $v^{s}PO_3$ à 1030 cm^{-1}, $v^{as}PO_3$ à 1130 cm^{-1} et δHOH à 1660 cm^{-1}). L'intensité de la $v^{as}POP$ augmente avec la durée d'évolution ainsi que celle de δHOH. Cela peut s'expliquer par une diminution de la quantité relative de carbonate (par

rapport à celle de pyrophosphate). Malgré une reprécipitation en phases cristallisées, il est possible qu'une fraction des anions CO_3^{2-} reste en solution, tandis que les ions pyrophosphate formeraient des complexes avec les ions calcium contribuant ainsi à la phase solide, ce qui expliquerait après normalisation des spectres par la ν_3CO_3 une augmentation relative des bandes associées au groupement pyrophosphate.

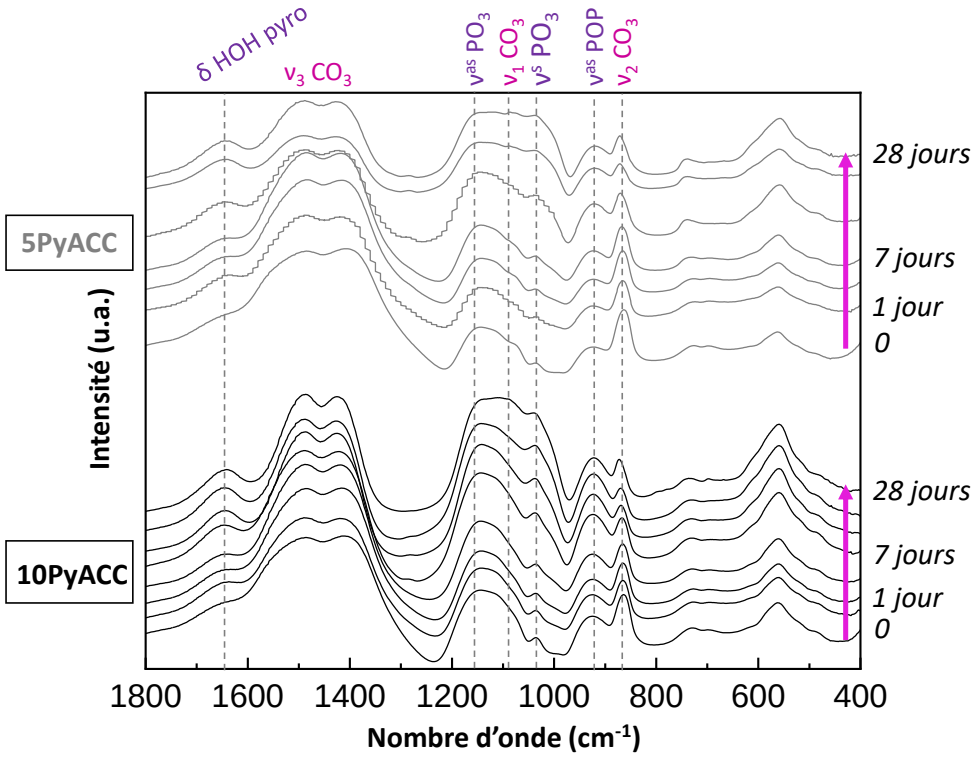


Figure 3.11 : Spectres d'absorption infrarouge des poudres de référence 5PyACC et 10PyACC ayant évolué entre 6 h et 28 jours dans l'eau ultra-pure, avec attribution des bandes de vibration (en violet celles de l'ion pyrophosphate et en rose de l'ion carbonate).

Les images MEB des poudres 5PyACC et 10PyACC sont présentées sur la Figure 3.12, sans évolution, après 7 jours ou après 28 jours d'évolution dans l'eau (les images aux autres durées d'évolution et autres grossissements ne sont pas présentées pour alléger la discussion). A t0, les poudres initiales sont constituées d'agglomérats avec surface rugueuse, contenant des nanoparticules sphériques non visibles à cette échelle. Après 7 jours d'évolution, il y a encore le même type d'agglomérats pour 10PyACC. En revanche, la poudre 5PyACC à 7 jours contient des plus gros agglomérats, de taille allant jusqu'à la centaine de microns et de forme plus arrondie. Il s'agit d'une phase cristalline, probablement de la vatérite, dont les cristaux lenticulaire (de quelques microns) [521] peuvent former des agglomérats (de la dizaine à la centaine de microns) organisés en « chou-fleur » [124]. Il est difficile de l'affirmer avec certitude en considérant la morphologie que peut avoir la calcite monohydratée [147,153] (cristaux sphérulitiques), ces morphologies pouvant de plus varier en présence d'additifs comme le pyrophosphate [522]. On peut noter la présence de petits cristaux cubiques (flèche rouge) composants les grands agrégats arrondis dans la poudre 10PyACC à 28 jours. Sur toutes ces images, l'amorphe PyACC formant des petits agrégats granulaires est présent (dont certains sont identifiés par des astérisques jaunes sur les micrographies pour les évolutions à 7 jours et 28 jours), signe d'une transformation non totale.

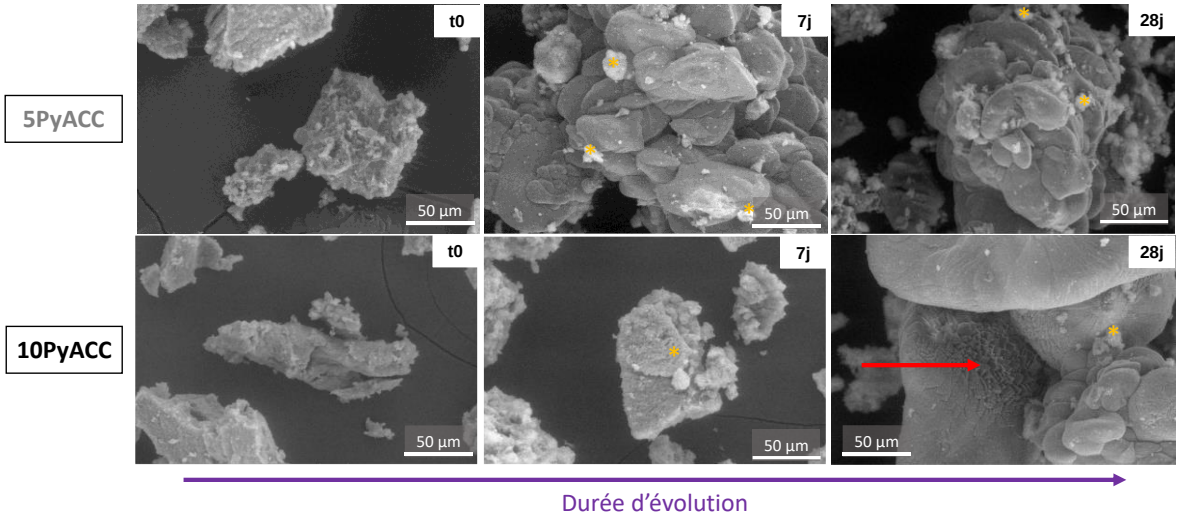


Figure 3.12 : Images MEB des poudres de 5PyACC et 10PyACC initiales (gauche) et après 7 jours (milieu) et 28 jours (droite) d'évolution dans l'eau, au grossissement x 500. La flèche rouge met en évidence les petits cristaux cubiques pour 10PyACC après 28 jours d'évolution, et les astérisques jaunes certains agrégats granulaires associés à l'amorphe PyACC.

Pour confirmer/infirmer ces mécanismes de transformation de phase(s), l'évolution des pertes de masse (Figure 3.13a), de la quantité de calcium libéré (Figure 3.13b) et du pH des filtrats (Figure 3.13c) est analysée. Au-delà des variabilités importantes, il est possible de dégager des tendances pour les masses des poudres après filtration (Figure 3.13a) : celles-ci diminuent jusqu'à 3 jours pour 5PyACC et 7 jours pour 10PyACC, passant de - 19 % (5PyACC) et - 11 % (10PyACC) à 1 jour à - 39 % à 3 jours (5PyACC) et - 33 % (10PyACC) à 7 jours. Ces diminutions continues sur les premiers temps d'évolution sont associées à une dissolution de l'amorphe. A 14 jours la masse de 10PyACC ré-augmente à - 25 % (celle de 5PyACC a trop d'incertitudes pour être interprétée), puis il y a une stabilisation à - 27 % pour 5PyACC et - 21 % pour 10PyACC à partir du 21ème jour d'évolution. Le gain de masse est synonyme de la reprécipitation d'une phase, très probablement cristalline au vu des DRX présentées plus haut. Pour toutes les durées d'évolution, les pertes de masse de 5PyACC sont plus élevées que celles de 10PyACC : en accord avec ce qui était décrit dans le Chapitre 2 et les DRX présentés plus haut, l'augmentation de la quantité de pyrophosphate (de 5 % mol. à 10 % mol.) stabilise l'amorphe face à sa dissolution et sa cristallisation. La taille des particules pourrait aussi jouer un rôle sur la cinétique de dissolution, des particules d'ACC plus petites étant moins stables en solution d'après Zou *et al.* [320], mais ce n'est pas le cas ici, celles de 5PyACC et 10PyACC étant sensiblement similaires (54,4 nm et 51,9 nm respectivement *cf.* Chapitre 2).

Les proportions de calcium libérées dans le milieu ont été calculées (par rapport à la proportion dans la poudre initiale) et sont tracées sur la Figure 3.13b (pour les valeurs brutes de libération (en terme de nombre de moles), se référer à l'Annexe AIII.3). La proportion de calcium libéré (Figure 3.13b) atteint un pic à 3 jours pour 5PyACC à 10,9 $\pm$ 0,4 % (soit (9,4 $\pm$ 0,3).10^{-5} mol pour 100 mg de poudre), puis diminue et se stabilise à 7 jours vers sa valeur finale de 8,3 $\pm$ 0,5 % à 28 jours, ce qui représente une quantité de Ca^{2+} libérés de (7,2 $\pm$ 0,4).10^{-5} mol pour 100 mg de poudre. La quantité de calcium maximale à 3 jours est corrélée à la valeur de perte de masse la plus élevée, et associée à la dissolution d'une grande quantité d'amorphe (préalable à la re-précipitation en une phase cristalline). Pour 10PyACC le comportement est différent : la libération maximale a lieu dans les premières heures de manière importante et la proportion maximale d'ions calcium libérés est celle à 6 h, égale à 5,3 $\pm$ 0,6 % soit (4,4 $\pm$ 0,5).10^{-5} mol / 100 mg. Puis elle diminue jusqu'à 14 jours (2,54 $\pm$ 0,04 %), l'amorphe 10PyACC étant très stabilisé donc peu dissout et/ou les phases cristallines re-précipitant au fur et à

mesure de sa dissolution, ce qui expliquerait l'augmentation de la masse collectée. Enfin, la proportion d'ions calcium libérés augmente de nouveau vers sa valeur finale, 3,4 $\pm$ 1,3 % (à 28 jours), qui représente une quantité de Ca^{2+} libérés de (3 $\pm$ 1).10^{-5} mol pour 100 mg de poudre, soit pratiquement la moitié de celle libérée par 5PyACC, allant de pair avec une phase amorphe 10PyACC plus stable que 5PyACC. Les quantités de calcium à 21 et 28 jours sont proches, tout comme les pertes de masse, supposant que le système est à l'équilibre et qu'il n'y a plus de transformation. En comparant aux valeurs de concentration de calcium libéré dans du TRIS-HCl pour des ACC stabilisés avec des polyphosphates, égales à 0,20 mM après 192 h d'incubation (mais pour un ratio de 0,1 mg/mL de poudre/solution) [110], celles à 7 jours de 5PyACC et 10PyACC sont supérieures, car elles valent respectivement 0,78 mM et 0,26 mM. Un autre ACC, cette fois stabilisé par de l'acide poly(acrylique) (PAA), a montré une libération dans l'eau de 1,2 ± 0,3 mM après 10 min de centrifugation et 10 min d'incubation pour un ratio de 1,2 mg/mL [109]. Cette valeur est supérieure mais du même ordre de grandeur que les concentrations libérées à 6 h par 5PyACC (0,58 mM) et 10PyACC (0,44 mM), pour des ratios de 1,0 mg/mL (car normalisation des concentrations pour 100 mg de poudre).

L'étude de l'évolution du pH dans les filtrats (Figure 3.13c) peut aider à l'interprétation des phénomènes ayant lieu pendant l'évolution. Celui-ci, assez basique à 6 h (10,4 et 10,2 pour 5PyACC et 10PyACC respectivement) diminue linéairement jusqu'à 14 jours et une valeur de 8,8 pour 5PyACC, puis augmente ensuite et se stabilise à 9,3 à 28 jours. Pour 10PyACC, la diminution continue jusqu'à 28 jours atteignant un pH de 8,6. L'amorphe de PyACC en se dissolvant libère dans le milieu des ions Ca^{2+} et CO_3^{2-} en majorité ainsi que des $P_2O_7^{4-}$ (et en quantités minimes Na^+, PO_4^{3-}/HPO_4^{2-}, HCO_3^-, *cf.* Chapitre 2). Or le carbonate CO_3^{2-} est la base du diacide carbonique, dont les réactions de dissociation en solution aqueuse et les pKa associés sont les suivants [523] :

$$H_2CO_3 + H_2O \leftrightarrow {HCO_3}^- + H_3O^+ \quad \text{pKa}_1 = 6{,}37 \quad \textit{(Equation 3.1)}$$

$${HCO_3}^- + H_2O \leftrightarrow {CO_3}^{2-} + H_3O^+ \quad \text{pKa}_2 = 10{,}32 \quad \textit{(Equation 3.2)}$$

L'ion pyrophosphate est de même la base associée d'un polyacide, se dissociant selon les équations suivantes et leur pKa associé à 25 °C [524] :

$${H_3P_2O_7}^- + H_2O \leftrightarrow {H_2P_2O_7}^{2-} + H_3O^+ \quad \text{pKa}_2 = 2{,}0 \quad \textit{(Equation 3.3)}$$

$${H_2P_2O_7}^{2-} + H_2O \leftrightarrow {HP_2O_7}^{3-} + H_3O^+ \quad \text{pKa}_3 = 6{,}1 \quad \textit{(Equation 3.4)}$$

$${HP_2O_7}^{3-} + H_2O \leftrightarrow {P_2O_7}^{4-} + H_3O^+ \quad \text{pKa}_4 = 9{,}0 \quad \textit{(Equation 3.5)}$$

La libération de carbonate et pyrophosphate issue de la dissolution du PyACC peut donc entraîner une augmentation de pH [479]. On peut alors supposer qu'il y a une forte libération de CO_3^{2-} à 6 h (qui pourrait être concomitante à une libération de pyrophosphate, mais de manière minoritaire).

Quand la durée d'évolution augmente, la diminution de pH pourrait provenir d'une consommation des ions CO_3^{2-}, décalant l'équilibre de la réaction 3.2 vers la gauche [261], probablement due à la précipitation d'une phase cristalline pour 10PyACC, car elle va de pair avec la diminution de la quantité de Ca^{2+} libérés. Cependant pour 5PyACC, la quantité de Ca^{2+} maximale est mesurée pour trois jours d'évolution, alors que le pH du filtrat pour cette durée continue de diminuer. Il doit donc y avoir un autre phénomène expliquant la chute du pH aux temps d'évolution les plus courts. On peut penser à un équilibrage avec le CO_2 de l'air, selon les réactions [120] $CO_2(g) + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3$ et $CO_2(aq) + HO^- \leftrightarrow {HCO_3}^-$. Mais il faut garder à l'esprit que ce processus est limité car les milieux évoluent dans des piluliers hermétiquement fermés et avec un volume d'air limité car le pilulier est aux ¾ rempli d'eau. Il a été décrit dans la littérature que lors de la cristallisation de carbonate de

calcium en solution, selon le polymorphe formé, l'évolution du pH est différente [521] : pour la calcite et la vatérite, le pH subit une chute brutale puis augmente de manière constante, alors que pour la calcite monohydratée le pH reste stable. Cela pourrait expliquer les tendances observées pour 5PyACC (pour 10PyACC, la dissolution de l'amorphe est plus tardive et donc concomitante à la reprécipitation, modifiant les évolutions de pH). De plus, pour les plus longs temps d'évolution le pH du filtrat de 10PyACC diminue toujours ; on peut alors supposer que contrairement à ce qui été dit précédemment, pour cette poudre l'équilibre n'est pas atteint, et qu'il y a toujours évolution, soit par dissolution de l'amorphe et reprécipitation(s) de phases cristallines soit par dissolution-reprécipitation d'une phase cristalline en une autre. Entre 21 jours et 28 jours la quantité de vatérite semble par ailleurs avoir diminué pour 10PyACC (Figure 3.10c).

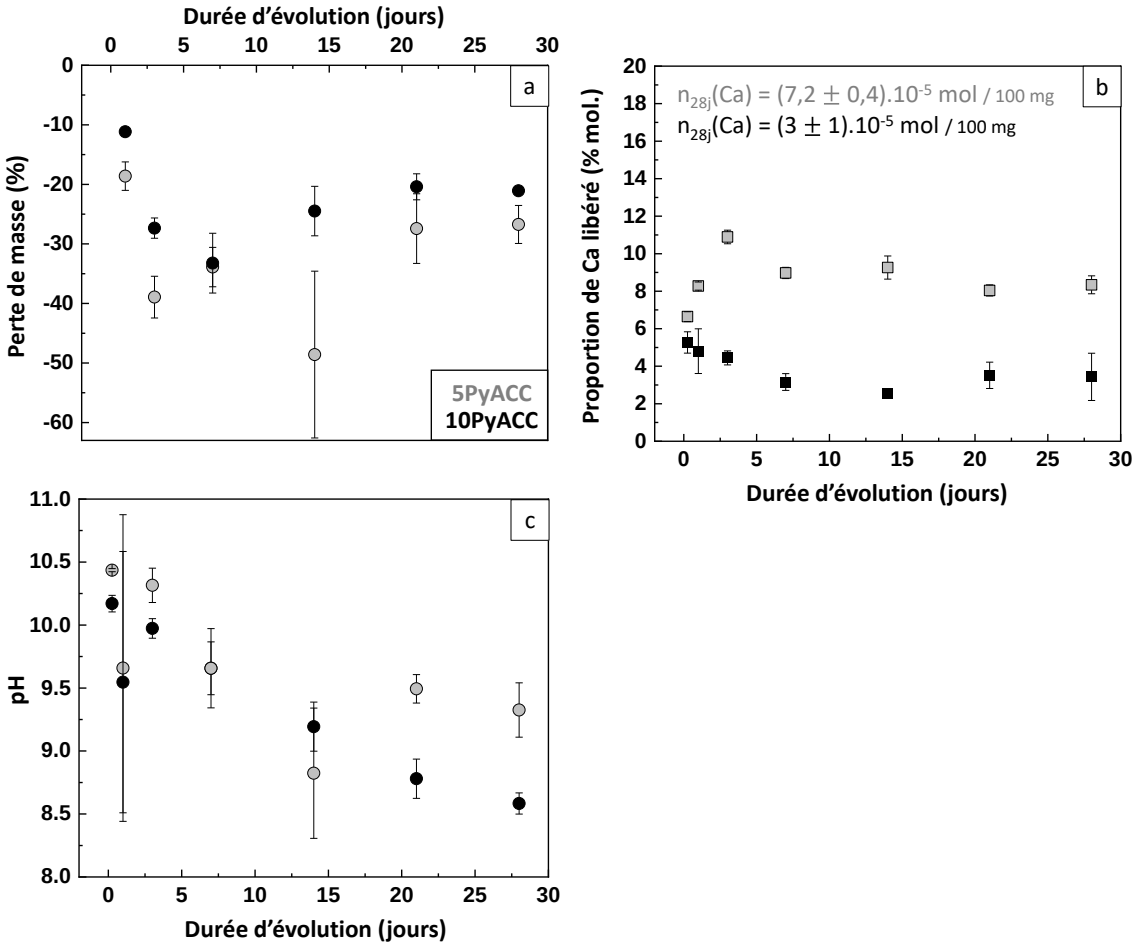


Figure 3.13 : Pertes de masse (a), proportions de calcium libérés (% mol. par rapport à la quantité initiale) (b), et évolution du pH des filtrats (c), en fonction de la durée d'évolution des poudres de référence 5PyACC et 10PyACC dans l'eau. Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondant aux écarts-types.

En mettant en regard les données issues de toutes les caractérisations effectuées sur le solide et le filtrat des poudres 5PyACC et 10PyACC après différentes durées d'évolution dans l'eau, plusieurs conclusions se dégagent :

- Les amorphes stabilisés avec du pyrophosphate sont stables en milieu aqueux, car sans additif il est connu qu'il y a rapidement une cristallisation (en moins d'une minute selon Konrad *et al.* [479]). L'amorphe 10PyACC, précipité en présence du double de pyrophosphate que pour 5PyACC, est plus stable dans l'eau, se dissout moins et plus tardivement ;
- La formation de la calcite est inhibée par la présence du pyrophosphate ;

- La formation des phases cristallines a lieu par dissolution-reprécipitation, en accord avec Sawada *et al.* [100], ce qui explique les pertes de masse élevées en début d'évolution suivies d'une augmentation de la masse collectée ainsi que l'évolution de la quantité de calcium libéré ;
- La vatérite est probablement la première phase formée. On peut penser que l'organisation proto-vatérite du cœur des PyACC est conservée, et ce malgré la dissolution, comme il l'a été décrit dans la littérature [276]. En réalité, la présence du pyrophosphate explique très probablement l'inhibition de la cristallisation de la calcite, comme à une autre échelle dans les clusters de PyACC, ce qui ne laisse comme alternative que la vatérite comme phase cristalline anhydre. La calcite monohydratée est formée après, du fait de sa précipitation lente, ou peut-être par dissolution-reprécipitation de la vatérite. Il a par ailleurs été montré que l'ion phosphate stabilise la MHC [149], on peut imaginer le même effet pour $P_2O_7^{4-}$ dans notre cas. Cependant les essais d'évolution réalisés sont trop courts et la quantification des phases issue des résultats de DRX pas assez précise pour vérifier ces hypothèses.

III.2.2 Poudres dopées avec du strontium *a*Sr

Les mêmes essais d'évolution ont été conduits sur les poudres 1Sr et 5Sr, dopées avec 1 et 5 % de Sr^{2+} respectivement. Dans cette partie, les poudres dopées ayant évolué pendant différentes durées dans l'eau seront comparées à la poudre de référence 10PyACC présentée plus haut, contenant la même quantité de pyrophosphate que 1Sr et 5Sr mais sans dopant.

Les diffractogrammes RX (Figure 3.14a) montrent un début de cristallisation après 1 jour d'évolution pour 1Sr mais après 3 jours pour 5Sr, comme la poudre de référence 10PyACC. Les pics associés à la vatérite et à la calcite monohydratée sont indexés aux mêmes angles que dans le cas du 10PyACC non dopé. On aurait pu penser que le strontium présent dans l'amorphe serait ensuite intégré dans le réseau cristallin de l'une des deux ou des deux phase(s) cristalline(s) formée(s), comme il l'a été décrit pour la calcite [459,473,525]. La substitution des atomes de calcium de la vatérite par du strontium a d'ailleurs déjà été mentionnée [516], mais aucune occurrence dans le cas de la MHC n'a été relevée. Dans le cas d'une substitution (non totale), selon la nature de la maille et de l'ion dopant les paramètres de maille peuvent varier de façon différenciée (un seul peut être augmenté/réduit par exemple). Le strontium ayant un rayon plus grand que le calcium, la distance inter-réticulaire devrait augmenter lors de la substitution, *a minima* selon une direction, ce qui se traduirait par un déplacement du/des pic(s) de diffraction correspondant(s) vers les plus petits angles, en accord avec la loi de Bragg $n\lambda = 2d \sin\theta$. Or cela n'a pas été observé dans les diffractogrammes RX de la Figure 3.14a. Plusieurs raisons peuvent expliquer le fait que les pics soient aux mêmes positions : il reste beaucoup d'amorphe dans les poudres 1Sr et 5Sr même après 28 jours d'évolution (Figures 3.14b, 3.14c), le strontium pourrait y être préférentiellement intégré, car ceci est plus facile du fait de la non-organisation du réseau, ou il pourrait rester en solution sans reprécipiter. Dans le cas d'une substitution dans le cristal, une faible substitution impacterait les distances inter-réticulaires d'une minorité de plans et de fait, créerait un faible décalage des pics. Ce dernier serait probablement non discernable du fait de sa faible intensité avec nos conditions d'acquisition des diffractogrammes RX. La quantification des phases en présence (Figures 3.14b, 3.14c) montre pour 1Sr une plus grande proportion de vatérite aux durées les plus courtes, qui s'équilibre avec la MHC au cours de l'évolution. Pour 5Sr, il y a une plus grande proportion d'amorphe restant dans la poudre collectée après 28 jours d'évolution. Un effet dose du strontium apparaît alors : la quantité totale de phases cristallines formées et la proportion de vatérite diminuent quand du strontium est introduit et quand sa proportion augmente. Cet effet peut s'expliquer par la taille de Sr^{2+}, plus élevée que Ca^2 et donc diffusant moins [472], limitant la transformation de la poudre. Le même effet a été mis en évidence par Tovani *et al.* [249] pour des ACP dopés au strontium, dont la

cristallisation en HA est inhibée en totalité pour un ratio $Sr^{2+}/(Sr^{2+}+Ca^{2+})$ dans la gamme 50 – 75 % mol. On pourrait aussi envisager l'existence d'une phase amorphe de carbonate de strontium, décrite dans la littérature par Leukel *et al.* [281], formée pour les plus hauts pourcentages de Sr^{2+}.

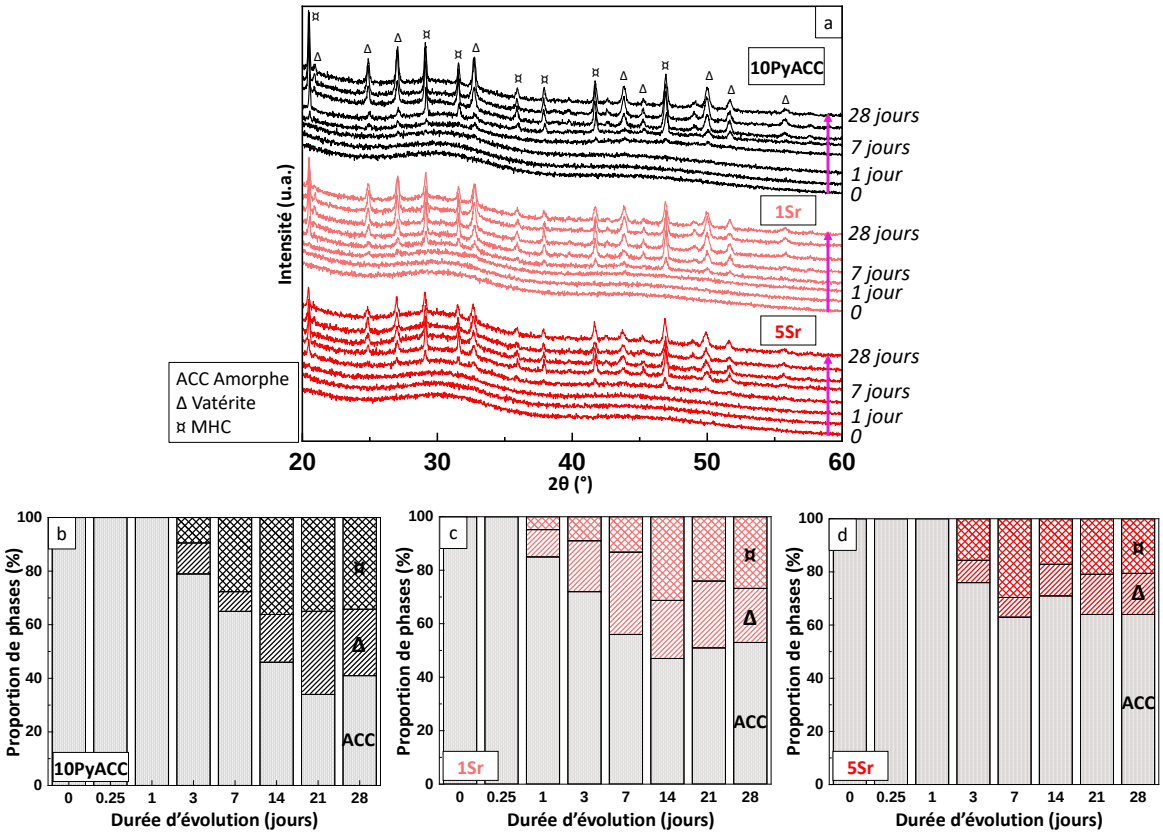


Figure 3.14 : Diffractogrammes RX (a) de la poudre de référence 10PyACC et des poudres dopées avec du strontium 1Sr et 5Sr ayant évolué entre 6 h et 28 jours dans l'eau ultra-pure. Quantification des phases en présence dans les poudres 10PyACC (b), 1Sr (c) ou 5Sr (d) selon la durée d'évolution et sur la base des résultats DRX, avec ACC la phase amorphe, Δ la vatérite et ¤ la calcite monohydratée (MHC).

Les spectres infrarouges (Figure 3.15) ont les mêmes tendances d'évolution que celles décrites pour 5PyACC et 10PyACC, avec un déplacement des bandes carbonate de l'amorphe ACC vers celles des phases cristallines (ν_2CO_3, ν_3CO_3) et l'apparition de la ν_1CO_3, ainsi que l'affaiblissement relatif des bandes carbonate, probablement signe d'une diminution de la quantité de CO_3^{2-}.

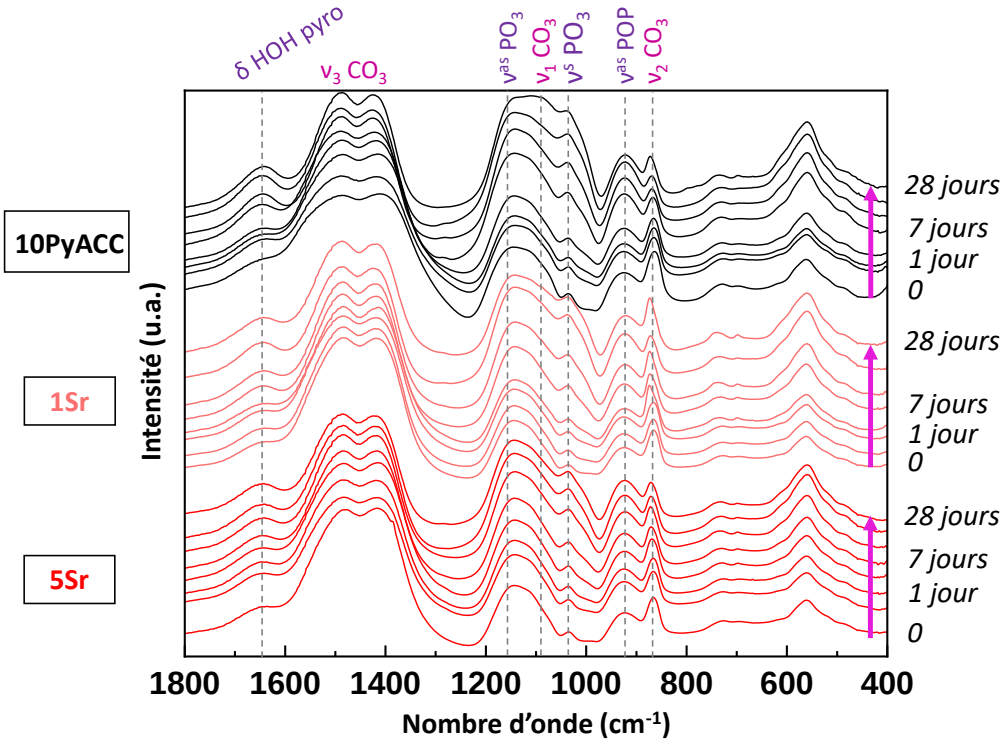


Figure 3.15 : Spectres d'absorption infrarouge de la poudre de référence 10PyACC et des poudres dopées avec du strontium 1Sr et 5Sr ayant évolué entre 6 h et 28 jours dans l'eau ultra-pure, avec attribution des bandes de vibration (en violet celles de l'ion pyrophosphate et en rose de l'ion carbonate).

Les agrégats présents dans la poudre de 5Sr, visibles sur les images MEB Figure 3.16, ont après 7 jours d'évolution dans l'eau une morphologie similaire à celle qui a pu être observée dans la poudre de référence 10PyACC (Figure 3.12). Ceux-ci ont une grande taille et une forme arrondie, et on peut apercevoir après 28 jours d'évolution un feuillet plan (flèche rouge) en surface d'un agrégat arrondi, qui pourrait être associé à la calcite monohydratée. Les agrégats amorphes sont toujours visibles (dont quelques-uns sont identifiés par des astérisques jaunes), en grande quantité, et coexistent avec les cristallites.

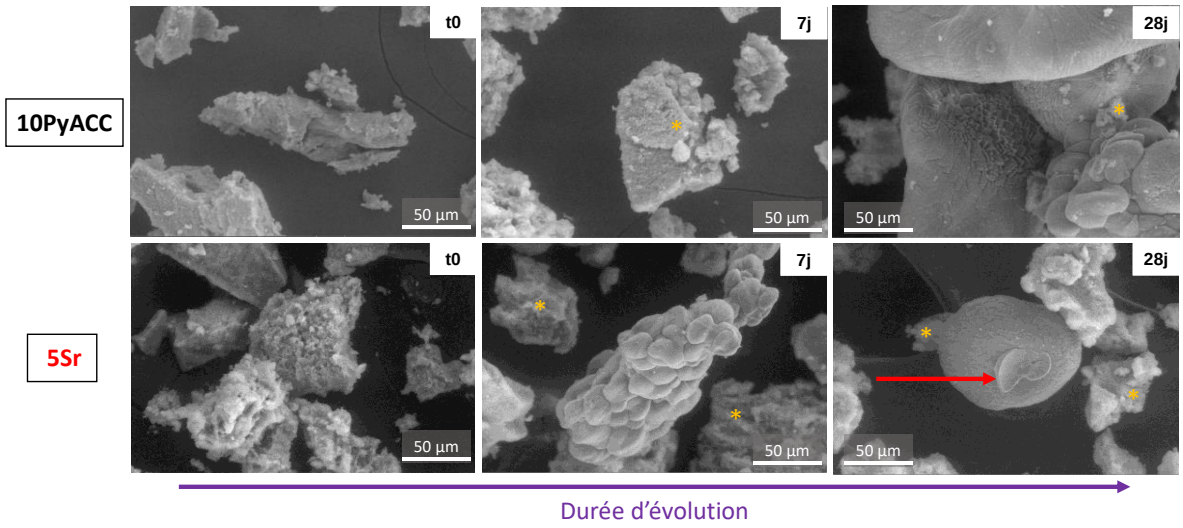


Figure 3.16 : Images MEB des poudres de 10PyACC et 5Sr initiales (gauche) et après 7 jours (milieu) et 28 jours (droite) d'évolution dans l'eau, au grossissement x 500. Les images MEB n'ont pas été acquises pour 1Sr. La flèche rouge met en évidence le feuillet plan pour 5Sr après 28 jours d'évolution, et les astérisques jaunes certains agrégats granulaires associés à l'amorphe PyACC.

Les pertes de masse en Figure 3.17a sont moins élevées pour les deux poudres dopées au strontium que pour 10PyACC jusqu'à 7 jours d'évolution, durée pour laquelle elles valent - 30 % pour 1Sr et - 26 % pour 5Sr. La masse récupérée après 14 jours d'évolution ré-augmente pour 1Sr (perte de - 22 %), suivant la tendance de 10PyACC, mais elle diminue de nouveau pour atteindre - 30 % à 28 jours. Pour 5Sr, la valeur minimale de la masse est atteinte à 14 jours avec une perte de - 35 %, puis elle augmente jusqu'à - 28 % à 28 jours. Les tendances aux premières durées d'évolution peuvent s'expliquer par une dissolution de l'amorphe, avec des pertes de masse moins marquées que 10PyACC, potentiellement liées à la présence du strontium avec une faible diffusion ralentissant la dissolution initiale. L'augmentation de la masse récupérée est un signe de reprécipitation de phases cristallines, qui a lieu plus tardivement pour 5Sr contenant plus de strontium que 1Sr, Sr^{2+} inhibant potentiellement cette formation. La deuxième diminution de la masse résiduelle pour 1Sr (ayant lieu après 14 jours d'évolution) n'était pas attendue, elle peut être le signe d'une nouvelle dissolution d'une phase intermédiaire (peut être une phase amorphe de carbonate de strontium), avant reprécipitation en une phase plus stable thermodynamiquement. Les proportions de phases Figure 3.14c semblent indiquer une plus grande proportion de MHC à 14 jours diminuant par la suite, ce qui serait cohérent avec les observations. Il pourrait aussi y avoir une dissolution de la vatérite (formée après dissolution de l'amorphe) pour former de la calcite monohydratée, mise en évidence uniquement pour ce pourcentage de strontium (effet dose). Cette variation peut également s'expliquer par une potentielle erreur expérimentale dans la mesure de la masse (s'il y avait eu perte de poudre entre la filtration et la pesée l'écart aurait été dans le sens opposé, avec une perte de masse trop importante).

La libération du calcium (Figure 3.17b) augmente fortement entre 6 h et 7 jours pour les deux poudres dopées 1Sr et 5Sr puis se stabilise pour atteindre sa valeur maximale à 28 jours, de 14,3 $\pm$ 0,7 % (1Sr) et à 21 jours, de 17 $\pm$ 4 % (5Sr) (mais proche de la valeur finale à 28 jours de 15,4 $\pm$ 1 %), ce qui représente une quantité de Ca^{2+} libérée de (1,11 $\pm$ 0,06).10^{-4} mol et (1,04 $\pm$ 0,08).10^{-4} mol pour 100 mg de poudre pour 1Sr et 5Sr respectivement (Figure AIII.3b), plus de trois fois supérieure à celle de 10PyACC. La dissolution de l'amorphe commence rapidement et libère des Ca^{2+} en solution. Lorsque les phases cristallines commencent à se former (entre 3 et 7 jours, en accord avec l'augmentation de la masse récupérée), la quantité libérée se stabilise et un équilibre est atteint, ces ions restant en solution jusqu'à la fin des essais d'évolution. Cela est en accord avec des pertes de masses se stabilisant (en regardant seulement les tendances globales) et les proportions de phases relativement stables après 7 jours. Pour les deux poudres dopées et pour toutes les durées d'évolution, la quantité de calcium libéré est plus grande que pour 10PyACC. Cet écart ne peut s'expliquer que par une dissolution exacerbée de l'amorphe contenant du strontium. Cela semble en désaccord avec les quantifications de phases des Figures 3.14c et 3.14d montrant une quantité d'ACC restante après évolution plus élevée que dans le cas de 10PyACC. Cependant cette quantité est relative par rapport aux phases cristallines, et si la quantité totale de phases cristallines diminue (résultant d'une inhibition de leur formation) les mêmes variations peuvent être observées. Les ions libérés par 1Sr et 5Sr en se dissolvant resteraient alors en solution, les cations Sr^{2+} empêchant potentiellement une nouvelle précipitation.

L'évolution du pH (Figure 3.17c), de 10,4 initialement puis qui diminue et se stabilise autour de 9,8 – 9,9 après 14 jours, montre que les ions carbonate sont à l'équilibre et qu'ils ne sont plus consommés, conformément à l'inhibition de (re)précipitation des ions en solution (après dissolution de l'amorphe).

La quantité de strontium libérée (Figure 3.17d) suit les mêmes tendances que le calcium, avec une augmentation rapide de la libération entre 6 h et 7 jours puis une stabilisation à 19 $\pm$ 1 % pour 1Sr, représentant (1,7 $\pm$ 0,1).10^{-6} mol / 100 mg et 18,5 $\pm$ 0,9 % pour 5Sr, *i.e.* (10,1 $\pm$ 0,5).10^{-6} mol / 100 mg (valeurs brutes sur la Figure AIII.4a) soit plus de 10 fois plus. Verberckmoes *et al.* [526] ont montré que dans des cultures d'ostéoblastes, une concentration entre 2 et 5 µg/mL d'ions strontium ajoutés

conserve les propriétés de minéralisation des cellules à la différence des concentrations plus hautes (20 – 100 µg/mL). Ici à 28 jours les concentrations de Sr^{2+} libérées valent 1,5 µg/mL (1Sr) et 8,9 µg/mL (5Sr), on est donc théoriquement dans la gamme de non-cytotoxicité des poudres.

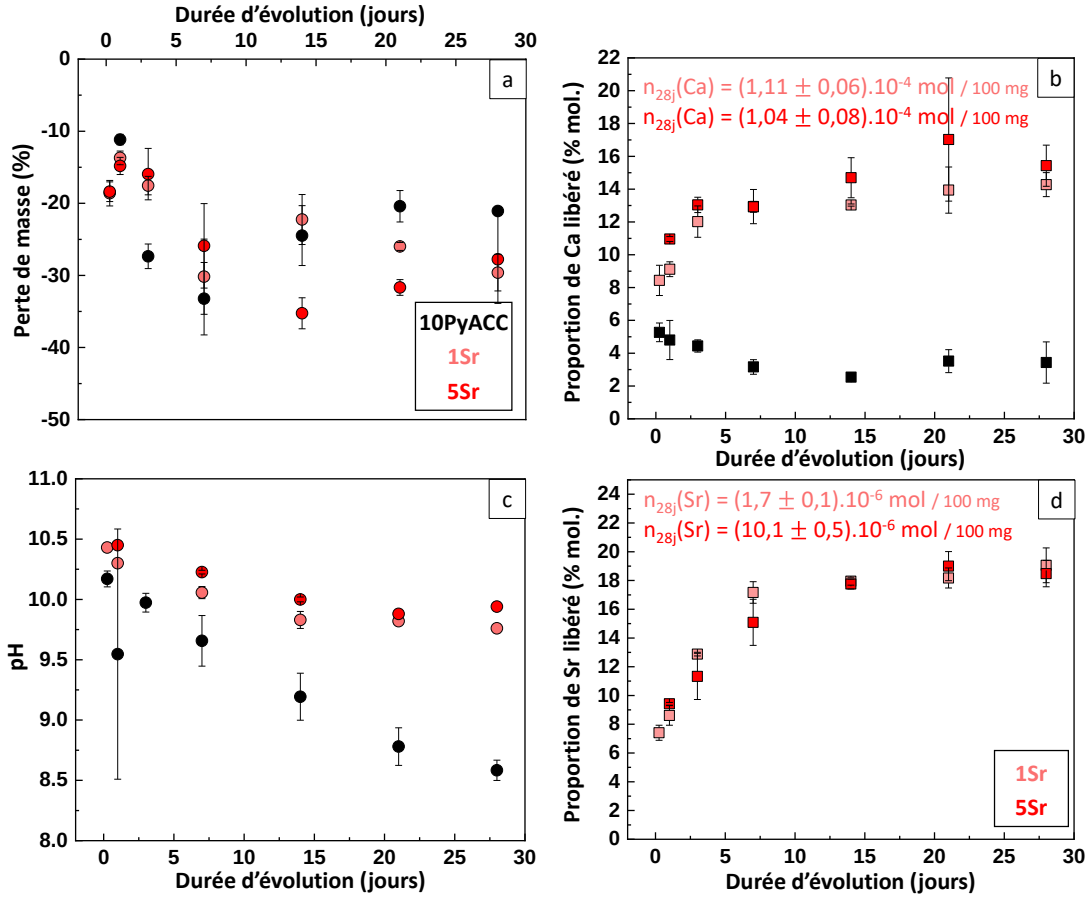


Figure 3.17 : Pertes de masse (a), évolution du pH des filtrats (c), et proportions de calcium (b) et de strontium (d) libérés (en % mol. par rapport à la quantité initiale) en fonction de la durée d'évolution des poudres 10PyACC et dopées 1Sr et 5Sr dans l'eau. Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondant aux écarts-types.

Le rapport molaire Sr/Ca des quantités libérées de strontium par rapport à celles de calcium est calculé pour les deux poudres dopées 1Sr et 5Sr puis tracé sur la Figure 3.18. Ce rapport est faible et augmente très légèrement jusqu'à 7 jours pour 1Sr (de 0,010 ± 0,001 pour 6 h à 0,016 ± 0,002 à 7 jours) puis se stabilise. Pour 5Sr, il est 7 fois plus élevé à 1 jour (0,0700 ± 0,0007) et 3 jours, puis augmente à 7 jours à 0,095 ± 0,01 et se stabilise (avec quelques oscillations dans les marges des barres d'erreur). Le rapport Sr/Ca de 5Sr plus élevé que celui de 1Sr témoigne d'une libération de strontium quantitative, en accord avec les proportions tracées sur la Figure 3.17d. Ce calcul nous donne aussi des informations sur l'intégration du dopant dans les phases précipitées : si le rapport augmente, c'est le signe d'une plus grande libération de dopant ou d'une diminution de la quantité de calcium, *i.e.* que la phase formée n'intègre pas l'ion dopant. Par contre s'il est stable durant l'essai, soit les ions dans la solution sont à l'équilibre avec les solides en présence et il n'y a plus d'évolution, comme ici après 7 jours dans le cas du strontium, soit l'ion dopant est intégré dans la phase solide précipitée avec le calcium. L'augmentation du rapport Sr/Ca entre 6 h et 7 jours pourrait donc avoir deux causes (pouvant être simultanées) : i) la libération de Sr^{2+} lors de la dissolution de l'amorphe, ayant lieu plus rapidement que celle de Ca^{2+} ; ou ii) la « consommation » de Ca^{2+} lors de la précipitation de nouvelles phases cristallines n'intégrant pas de strontium dans leur réseau. D'après les hypothèses énoncées en fin de partie II.2 concernant la répartition des dopants dans les clusters de PyACC, le strontium serait substitué dans le

cœur proto-vatérite de ceux-ci. Il serait alors peu probable qu'il soit libéré avec une cinétique plus rapide que le calcium, ce qui ferait opter pour la deuxième explication ii), en accord avec les diffractogrammes RX de la Figure 3.14a dont les pics associés aux phases cristallines ne sont pas décalés vers les plus petits angles (comme ce serait le cas pour une substitution par un ion plus gros).

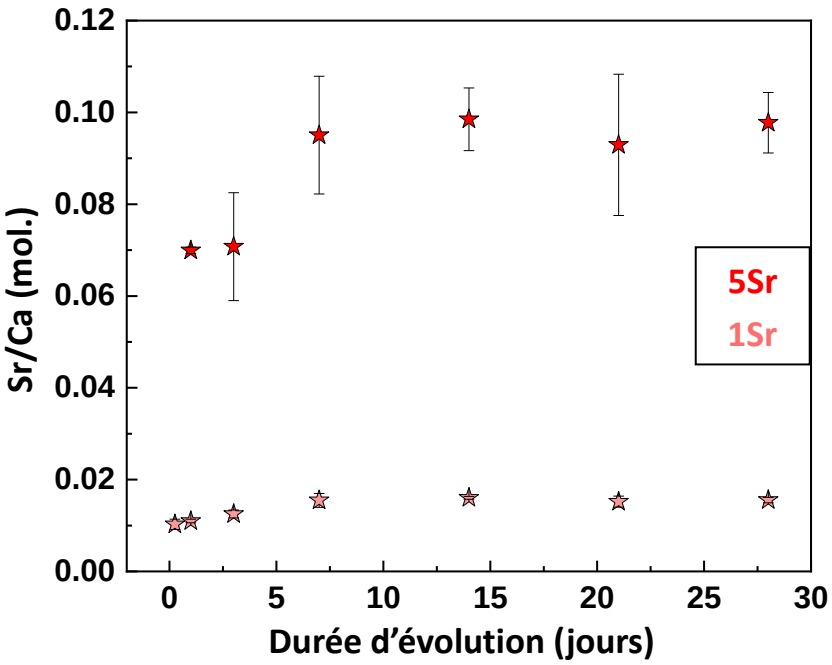


Figure 3.18 : Rapport molaire Sr/Ca libéré dans la solution en fonction de la durée d'évolution pour les poudres dopées 1Sr et 5Sr. Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondant aux écarts-types.

Les deux poudres dopées avec 1 % et 5 % de strontium ont montré pendant l'évolution dans l'eau une dissolution exacerbée de l'amorphe (avec une libération prononcée d'ions Ca^{2+}). Le strontium en solution inhibe en partie la formation de phases cristallines. Lorsqu'elles se forment, la MHC semble favorisée aux dépens de la vatérite quand il y a plus strontium, et le ce dopant n'est *a priori* pas substitué au sein de ces phases. Très peu d'informations sont disponibles à partir des caractérisations présentées ici sur la libération des ions pyrophosphate. Au vu des spectres infrarouges Figure 3.15 dans lesquels les bandes qui leur sont associées gardent la même intensité relative (alors que celle des ions carbonate diminue), on peut supposer que le pyrophosphate reste sous forme solide, potentiellement sous forme de précipités liés au calcium, ou se réassocie rapidement aux ions Ca^{2+} après dissolution du PyACC pour former du solide. Ces poudres dopées 1Sr et 5Sr sont le siège d'une libération quantitative et prolongée d'ions Sr^{2+}, sans « burst effect » et sur plusieurs semaines (libération stabilisée à partir de 14 jours). Les doses de strontium libérées sont *a priori* non cytotoxiques, et concomitantes avec une libération continue de calcium.

III.2.3 Poudres dopées avec du cuivre *a*Cu

Les mêmes essais d'évolution dans l'eau ont été réalisés sur les poudres dopées avec 1 et 5 % de cuivre (1Cu et 5Cu respectivement). Les diffractogrammes RX présentés sur la Figure 3.19a montrent un début de cristallisation dès 6 h d'évolution pour 1Cu, qui est moins stable que 10PyACC, alors que 5Cu cristallise après 3 jours comme la poudre de référence. Dans les proportions de phases en présence (Figures 3.19c, 3.19d), la calcite monohydratée est formée en majorité quand le cuivre est ajouté, aux dépens de la vatérite. On note aussi la présence de pics de calcite, qui est présente à 28 jours dans 1Cu et de manière très minoritaire pour 5Cu à 21 jours. Les pics caractéristiques des différentes phases sur

les diffractogrammes RX ne sont pas déplacés par rapport aux positions de référence. Il a été montré par Noethig-Laslo et Brečević [516] que les ions Cu^{2+}, avec des couches de valence de configuration électronique 3d, s'incorporent difficilement dans la structure de la vatérite et s'adsorbent plutôt sur sa surface, ne modifiant pas les DRX ou spectres FTIR de la vatérite formée. Cette surface riche en cuivre contient des OH, et pourrait être sous forme de complexes de carbonate de cuivre-calcium hydratés, *i.e.* $Cu_xCa_{1-x}CO_3.(H_2O)_y$ [527], de structure proche de la calcite monohydratée formée majoritairement ici. Seules de faibles quantités de Cu^{2+} peuvent être intégrées dans la vatérite, dans des sites interstitiels [527,528], et leur configuration électronique induit une symétrie de champ différente, favorisant la formation de calcite au sein du réseau de vatérite [516]. Cela pourrait expliquer la présence de calcite que nous avons détectée pour les plus longues durées d'évolution.

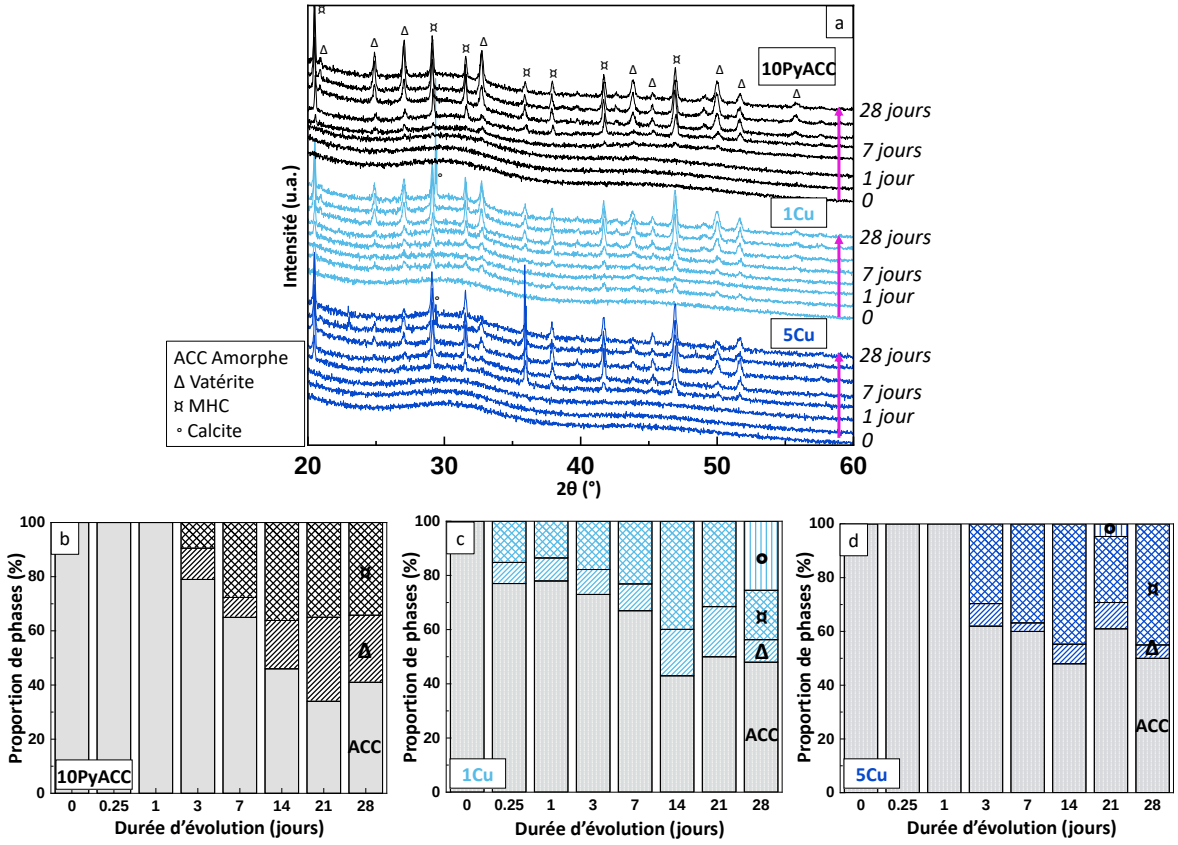


Figure 3.19 : Diffractogrammes RX (a) de la poudre de référence 10PyACC et des poudres dopées avec du cuivre 1Cu et 5Cu ayant évolué entre 6 h et 28 jours dans l'eau ultra-pure. Quantification des phases en présence dans les poudres 10PyACC (b), 1Cu (c) ou 5Cu (d) selon la durée d'évolution et sur la base des analyses DRX, avec ACC la phase amorphe, Δ la vatérite, ¤ la calcite monohydratée (MHC) et ° la calcite.

Les spectres d'absorption infrarouge Figure 3.20 ont la même évolution temporelle que la référence 10PyACC pour 1Cu, avec une apparition des bandes liées aux phases cristallines de CC. Pour 5Cu, l'évolution est un peu différente, la bande v_2CO_3 paraît après 28 jours plus importante que la bande adjacente de $v^{as}POP$, et la bande qui apparaît au fur et à mesure de l'évolution, associée à v_1CO_3, semble aussi relativement plus importante que pour les autres poudres. Cela pourrait signifier que contrairement à 10PyACC, dans cette poudre la quantité de CO_3^{2-} ne diminue pas dans la fraction solide.

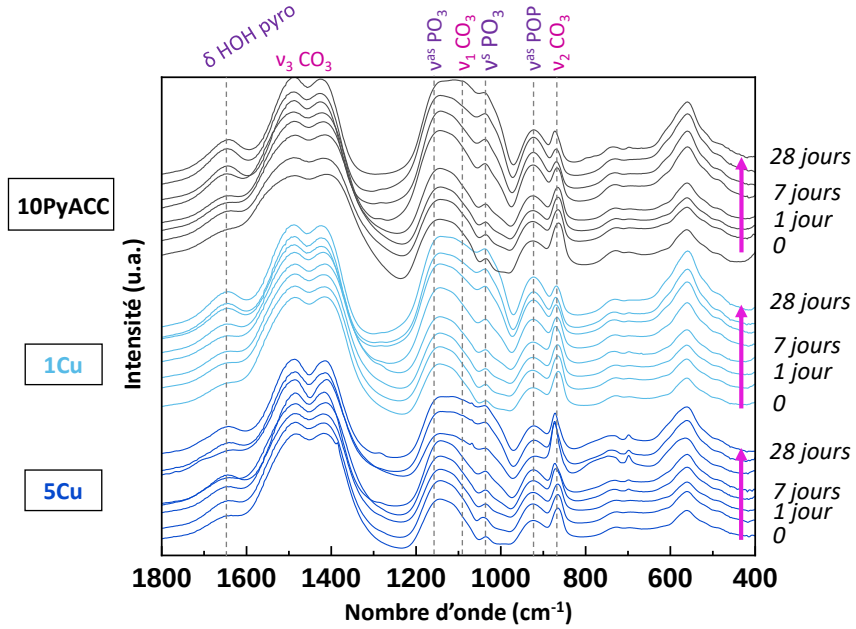


Figure 3.20 : Spectres d'absorption infrarouge de la poudre de référence 10PyACC et des poudres dopées avec du cuivre 1Cu et 5Cu ayant évolué entre 6 h et 28 jours dans l'eau ultra-pure, avec attribution des bandes de vibration (en violet celles de l'ion pyrophosphate et en rose de l'ion carbonate).

La morphologie des poudres de 1Cu et 5Cu à t0 ou après 7 et 28 jours d'évolution est présentée sur la Figure 3.21. Les mêmes évolutions sont notées que pour 10PyACC, avec la formation de gros agglomérats sphériques. On peut aussi noter la présence de cristallites cubiques, en particulier à 28 jours pour 1Cu (flèche bleue), pouvant être identifiés à des cristaux de calcite. Ils semblent croître de manière sphérulitique sur les agrégats de vatérite, en accord avec ce qui a été décrit plus haut.

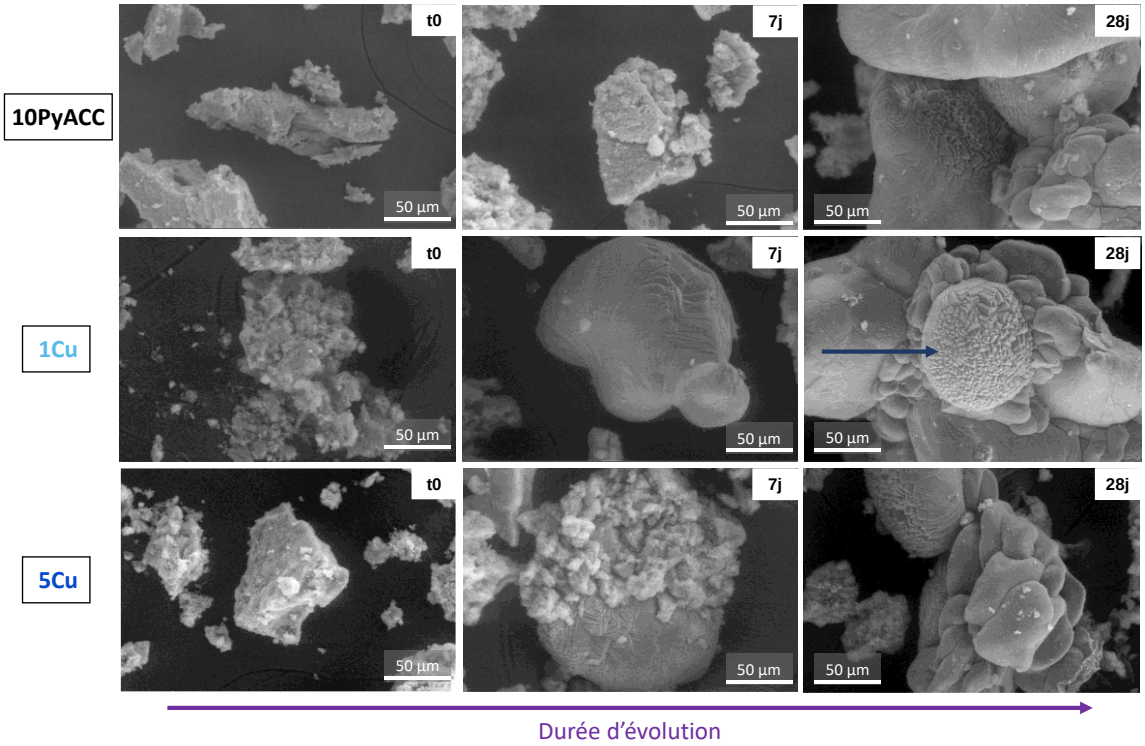


Figure 3.21 : Images MEB des poudres de 10PyACC, 1Cu et 5Cu initiales (gauche) et après 7 jours (milieu) et 28 jours (droite) d'évolution dans l'eau, au grossissement x 500. La flèche bleue indique des cristaux cubiques identifiés à des cristaux de calcite.

Les pertes de masse Figure 3.22a montrent les mêmes tendances que pour le dopage au strontium : la masse récupérée diminue jusqu'à 7 jours (- 30 %) et 14 jours (- 30 %) pour 1Cu et 5Cu respectivement. Pour 1Cu, elle augmente à - 23 % à 14 jours puis diminue de nouveau jusqu'à sa valeur finale, - 27 % à 28 jours. Celle de 5Cu se stabilise après 14 jours et sa perte de masse finale vaut - 28 %. Comme précédemment, la diminution de la masse collectée correspond à une dissolution de l'amorphe, plus tardive quand la proportion de cuivre est plus élevée. Les diminutions de masse ayant lieu ensuite sont associées aux reprécipitations des phases cristallines. La reprise de masse à 14 jours pour 1Cu, aussi notée pour 1Sr, n'est toujours pas expliquée.

La libération de calcium (Figure 3.22b) est aussi similaire au cas du strontium, avec une augmentation rapide jusqu'à 3 jours puis une stabilisation, jusqu'à la valeur finale de 12,8 $\pm$ 2 % (1Cu) et 14,2 $\pm$ 0,7 % (5Cu), ce qui représente une quantité de Ca^{2+} libérée de (1,0 $\pm$ 0,1).10^{-4} mol et (1,0 $\pm$ 0,5).10^{-4} mol pour 100 mg de poudre respectivement (valeurs brutes sur la Figure AIII.3c). Comme dans le cas du strontium, la libération de Ca^{2+} par 1Cu et 5Cu nettement supérieure à celle de la référence 10PyACC suggère une dissolution de l'amorphe en plus grande quantité quand il est dopé.

Le pH (Figure 3.22c) évolue également de la même manière, sa valeur initiale de 10,4 diminuant puis se stabilisant à 9,5 – 9,7 après 14 jours d'évolution. Cette valeur est légèrement plus basse que celle obtenue pour le strontium (9,8 – 9,9), ce qui pourrait provenir de la formation d'hydroxydes de cuivre, très favorables thermodynamiquement, consommant des ions HO^-. Ceux-ci seraient surement sous forme amorphe, peut-être associés à des carbonates dans des composés comme la georgite (ou carbonate de cuivre basique amorphe), car ils ne sont pas détectés par DRX.

Enfin, les cinétiques de libération des Cu^{2+} sont très différentes de celles des Sr^{2+} décrites précédemment. En effet, la proportion d'ions cuivre libérés est très faible à 6 h en particulier pour 5Cu, puis elle augmente lentement jusqu'à 28 jours, durée pour laquelle elle vaut 1,1 $\pm$ 0,1 % pour 1Cu et 0,44 $\pm$ 0,03 % pour 5Cu, représentant respectivement (1,2 $\pm$ 0,1).10^{-7} mol et (2,5 $\pm$ 0,2).10^{-7} mol / 100 mg de poudre (Figure AIII.4b). Ces quantités libérées sont respectivement 14 et 40 fois plus faibles que pour le dopage au strontium. Le cuivre se libère un peu plus tardivement que le calcium (pic à 3 jours pour 5Cu) puis la proportion libérée diminue, ce qui est en accord avec la précipitation d'une phase de cuivre basique amorphe, très stable. A 28 jours, les concentrations libérées valent 0,0012 mM et 0,0025 mM pour respectivement 1Cu et 5Cu, ce qui est largement inférieur à la concentration seuil de cytotoxicité de 10 mg/L ou 0,16 mM sur des fibroblastes [529]. Pour des scaffolds de verres bioactifs contenant 1 ou 5 % mol. de Cu^{2+}, des concentrations libérées de cuivre de 60,4 à 152,7 ppm soit 0,95 à 2,40 mM ne montrent pas de cytotoxicité sur des cellules stromales de la moelle osseuse humaine (hBMSC), améliorent les propriétés pro-angiogéniques du scaffold, et augmentent l'expression des gènes marqueurs de la minéralisation (dont la PAL), conduisant de fait à une différenciation ostéogénique plus importante [530]. Dans un autre cas (silicates de calcium dopés au cuivre) [531], une concentration optimale de 0,7 ppm *i.e.* 0,011 mM de cuivre est bénéfique à l'angiogenèse (stimulation de l'expression des facteurs de croissance pro-angiogéniques). Des ions Cu^{2+} libérés du revêtement à la surface d'un alliage de titane à une concentration de 0,1 mM stimulent la prolifération des cellules souches mésenchymateuses, augmente l'activité de la PAL et l'expression des marqueurs de la minéralisation osseuse, mais une concentration de 0,5 mM est cytotoxique pour ces cellules [532]. En résumé, les concentrations de cuivre libérées par des biomatériaux et démontrant des propriétés bioactives sont variées, et elles peuvent dépendre d'autres facteurs, comme le type de cellules utilisées ou le type de test effectué [496]. Comparés à toutes ces valeurs, les quantités de Cu^{2+} libérés par 1Cu et 5Cu sont très faibles, en-deçà de toutes les concentrations ayant démontré un effet bioactif *in vitro* ou *in vivo*, mais elles offrent une libération prolongée ou à long terme intéressante.

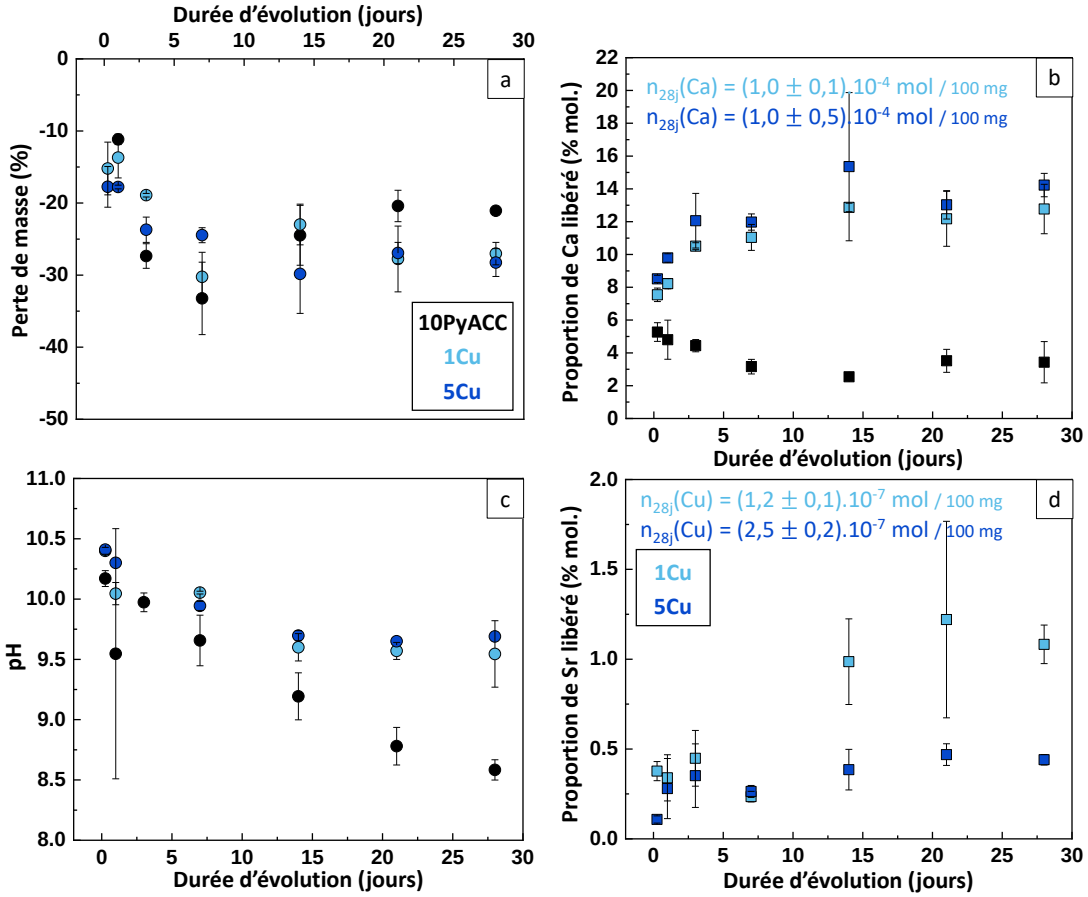


Figure 3.22 : Pertes de masse (a), évolution du pH des filtrats (c), et proportions de calcium (b) et de cuivre (d) libérés (en % mol. par rapport à la quantité initiale) en fonction de la durée d'évolution des poudres 10PyACC et dopées 1Cu et 5Cu dans l'eau. Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondant aux écarts-types.

De la même manière que dans le cas du strontium, le rapport Cu/Ca a été calculé pour 1Cu et 5Cu puis tracé sur la Figure 3.23. On notera que l'échelle des ordonnées n'est pas la même, ayant été nettement agrandie ici du fait des faibles valeurs des rapports (comparé au cas de Sr Figure 3.18), liées à la faible libération de Cu^{2+} en solution. Le rapport, très faible au début (0,0007 ± 0,0001 pour 1Cu et 0,0010 ± 0,0002 pour 5Cu), diminue jusqu'à 0,00029 ± 0,00005 à 7 jours pour 1Cu tandis qu'il augmente à 0,002 ± 0,001 à 1 jour et 3 jours pour 5Cu puis diminue à 0,0018 ± 0,0002 à 7 jours. Dans les deux cas, la valeur minimale est atteinte à 7 jours, comme pour la masse récupérée (Figure 3.22a). Le rapport Cu/Ca augmente ensuite de nouveau pour les deux composés dopés puis se stabilise à 28 jours autour de 0,00117 ± 0,00004 et 0,0025 ± 0,0002 pour 1Cu et 5Cu respectivement. Les deux points de rapport Cu/Ca plus élevé à 1 jour et 3 jours pour 5Cu pourraient être la conséquence d'une libération exacerbée de Cu^{2+} (par rapport à Ca^{2+}), en accord avec la Figure 3.22d montrant aussi un léger maximum pour ces durées d'évolution. Cela suppose que dans le composé initial 5Cu une phase riche en cuivre assez stable est présente, car ne se dissolvant pas aux premiers instants de l'essai. Cet effet, non observé pour 1Cu, serait dose-dépendant. La diminution à 7 jours est associée à la dissolution de l'amorphe, composé en majorité de calcium donc le libérant en plus grande quantité que les ions cuivre (d'où un rapport Cu/Ca diminuant). L'augmentation subséquente est le signe de la précipitation de nouvelles phases (vatérite, MHC et calcite en moindre mesure, *cf.* Figures 3.19c, 3.19d), dans lesquelles le cuivre n'est *a priori* pas intégré. La légère diminution finale peut suggérer la précipitation d'une phase de cuivre en faible quantité. Il est important de garder en tête qu'au vu des faibles valeurs du rapport Cu/Ca ici, environ 10 fois inférieures à celles des poudres initiales 1Cu (0,013) et 5Cu (0,073), les

considérations précédentes concernent une très faible fraction des ions Cu^{2+}, la majorité étant probablement associée à des hydroxydes et potentiellement des carbonates, de manière très stable car ne se dissolvant pas pendant l'essai.

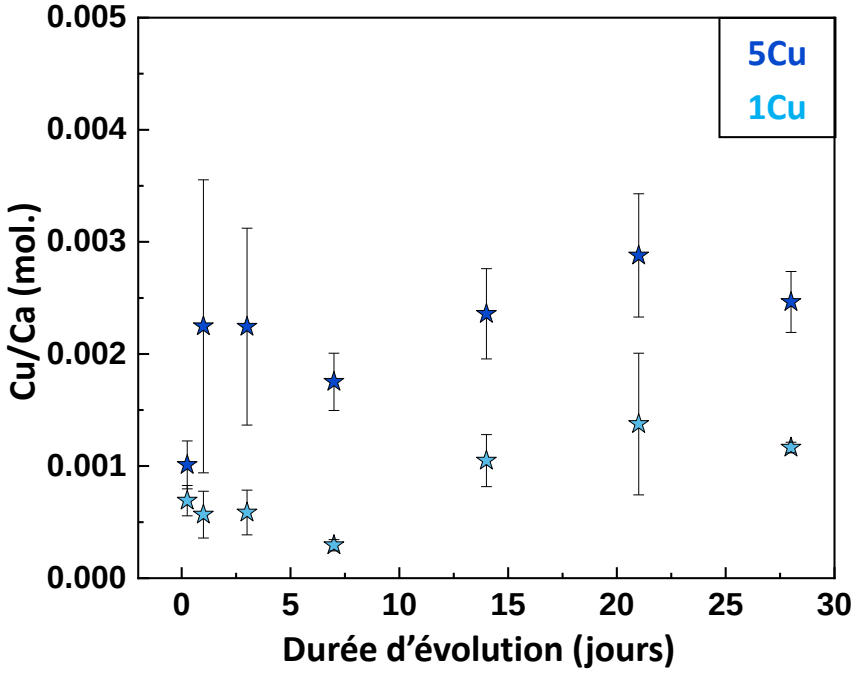


Figure 3.23 : Rapport molaire Cu/Ca libéré dans la solution en fonction de la durée d'évolution pour les poudres dopées 1Cu et 5Cu. Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondant aux écarts-types.

Ces caractérisations ont montré qu'en solution les amorphes 10PyACC dopés avec du cuivre se dissolvent d'abord dans les premiers temps d'évolution, en plus grande quantité que dans le cas de 10PyACC, et libérant des ions Ca^{2+}. Les ions Cu^{2+} se libèrent en faibles quantités, probablement toujours majoritairement associés avec des hydroxydes et potentiellement des carbonates (détaillé dans la partie II) dans des composés plus stables. La précipitation de la vatérite est limitée par les ions cuivre, une petite quantité s'intégrant dans son réseau et induisant la germination de calcite par déstabilisation de la vatérite. Les Cu^{2+} non intégrés sont très peu à rester sous forme ionique dans le milieu, ils précipitent très probablement en une phase d'hydroxyde de cuivre amorphe, peut être associée à des carbonates, et potentiellement sur la surface des cristaux de vatérite. La quantité élevée de HO^- qui était inclus dans les amorphes initiaux 1Cu et 5Cu ne cause pas d'augmentation de pH, donc ces hydroxydes sont potentiellement consommés de nouveau après dissolution ou restent sous forme de complexes sans transformation pendant toute la durée des essais d'évolution. Les poudres dopées 1Cu et 5Cu sont le siège d'une libération faible mais prolongée sur plusieurs semaines et sans « burst effect » marqué, en particulier pour 5Cu. Les doses libérées dans le milieu sont de plus *a priori* non cytotoxiques.

III.2.4 Poudres dopées avec du zinc *a*Zn

Les poudres de 10PyACC dopées avec 1 ou 5 % de zinc ont évolué dans l'eau pendant 6 h à 28 jours. Elles restent amorphes pendant 3 jours (Figure 3.24a) puis commencent à cristalliser en calcite monohydratée majoritairement, avec un peu de vatérite et même pour 5Zn aux plus longues durées d'évolution de la calcite et de l'hydroxyde de cuivre $Zn(OH)_2$ (Figures 3.24c, 3.24d). L'apparition de cet hydroxyde n'est pas surprenant, au vu des constantes de solubilité (dans la partie II) montrant que cette phase est très peu soluble et se forme rapidement, et de sa présence probable sous forme

amorphe dans la poudre initiale. Sa détection par diffraction des rayons X montre qu'il y a eu une cristallisation pendant la durée de l'évolution. La littérature fait état de propriétés du zinc inhibitrices de cristallisation, entre autres pour de la calcite [462,464] ou de la brushite [450]. Or les proportions de phases cristallines obtenues ici ne sont pas significativement plus faibles, ce qui est aussi en faveur de la formation de précipités d'hydroxydes de zinc cristallisés, les Zn^{2+} n'étant pas libres dans le milieu et pas disponibles pour avoir un impact sur la cristallisation des phases de CC.

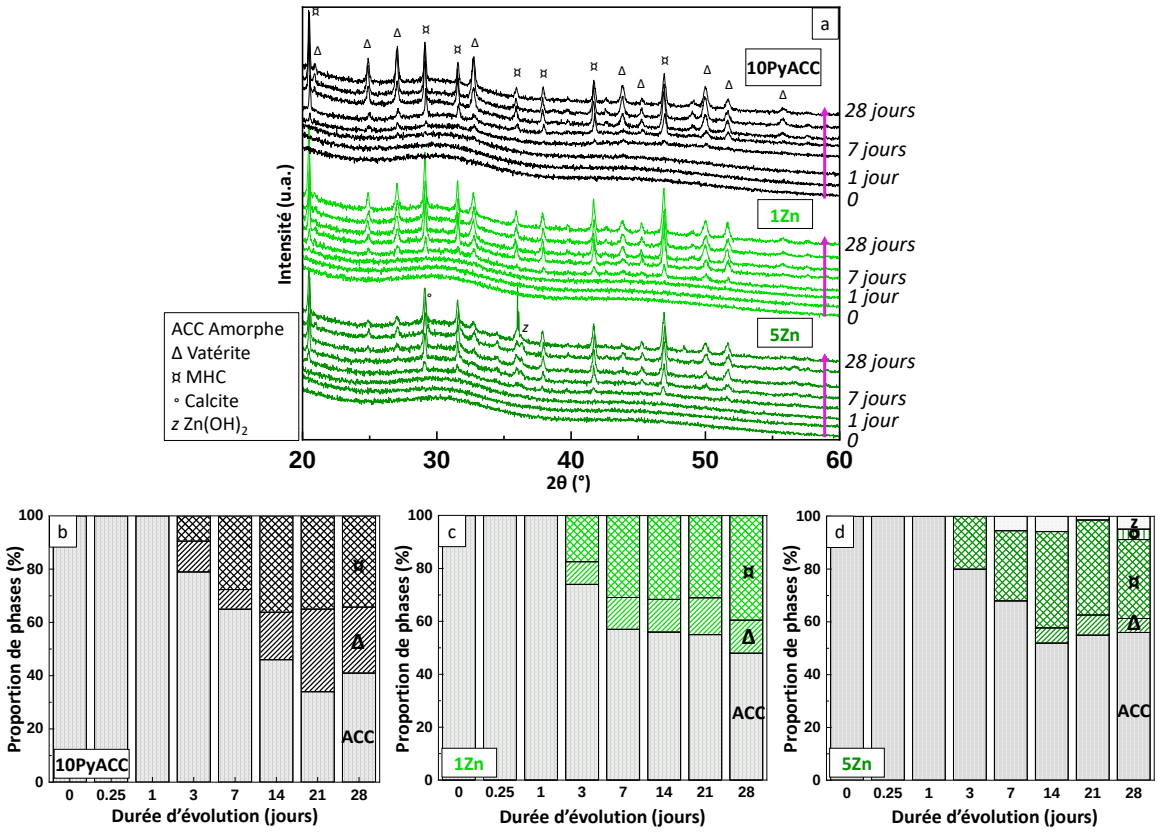


Figure 3.24 : Diffractogrammes RX (a) de la poudre de référence 10PyACC et des poudres dopées avec du zinc 1Zn et 5Zn ayant évolué entre 6 h et 28 jours dans l'eau ultra-pure. Quantification des phases en présence dans les poudres 10PyACC (b), 1Zn (c) ou 5Zn (d) selon la durée d'évolution et sur la base des analyses DRX, avec ACC la phase amorphe, Δ la vatérite, ¤ la calcite monohydratée (MHC), ° la calcite et z l'hydroxyde de zinc $Zn(OH)_2$.

Les spectres d'absorption infrarouge en Figure 3.25 présentent la même évolution que la référence 10PyACC, avec un décalage des bandes carbonate de l'amorphe vers les positions des polymorphes cristallins, et une diminution relative de celles-ci, probablement causée par une diminution de la quantité de carbonate.

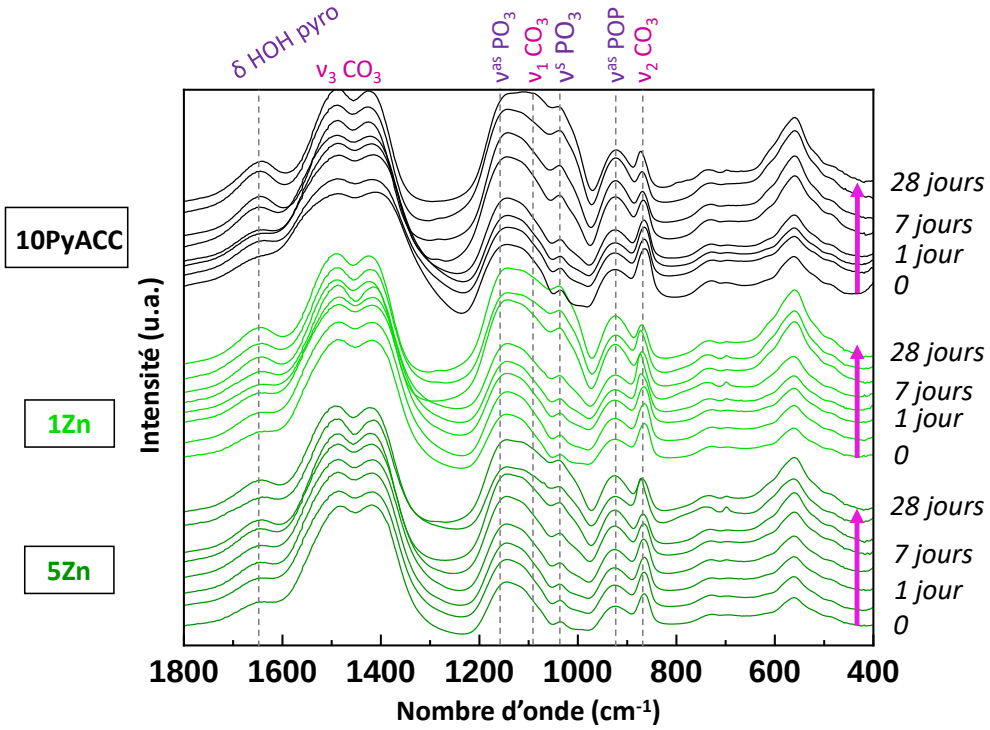


Figure 3.25 : Spectres d'absorption infrarouge de la poudre de référence 10PyACC et des poudres dopées avec du zinc 1Zn et 5Zn ayant évolué entre 6 h et 28 jours dans l'eau ultra-pure, avec attribution des bandes de vibration (en violet celles de l'ion pyrophosphate et en rose de l'ion carbonate).

Les images MEB (Figure 3.26) ne montrent pas de différences de morphologie par rapport à la référence 10PyACC. On obtient aussi pour 5Zn les gros agglomérats de forme arrondie, associés à la calcite monohydratée probablement dans ce cas, au vu des proportions de phases en présence (Figure 24d), coexistant avec les agrégats granulaires de l'amorphe.

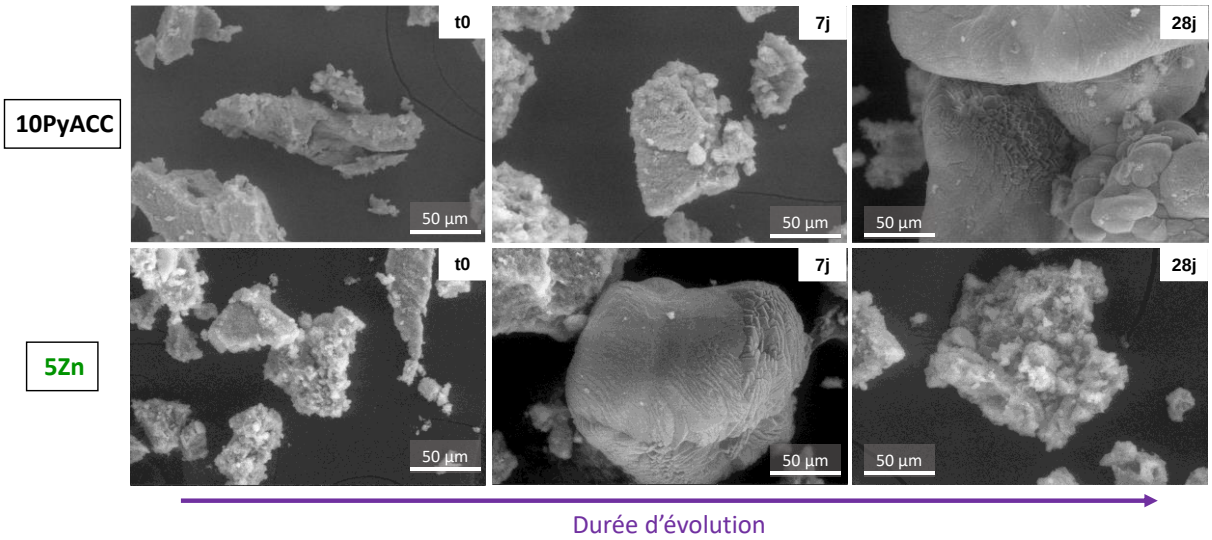


Figure 3.26 : Images MEB des poudres de 10PyACC et 5Zn initiales (gauche) et après 7 jours (milieu) et 28 jours (droite) d'évolution dans l'eau, au grossissement x 500 (les images MEB n'ont pas été acquises pour 1Cu).

Les pertes de masse (Figure 3.27a) montrent les mêmes tendances que celles décrites précédemment pour les autres cations dopants. La masse collectée diminue jusqu'à 7 – 14 jours et - 23 % et - 24 % pour 1Zn, et jusqu'à - 32 % à 14 jours pour 5Zn. Pour 1Zn, elle augmente à - 21 % à 21 jours puis

diminue de nouveau jusqu'à sa valeur finale de - 27 %. Pour 5Zn, à 14 jours la masse collectée commence à ré-augmenter et vaut - 24 % après 28 jours d'évolution. Les diminutions initiales sont liées à la dissolution de l'amorphe, et les gains de masses aux reprécipitations des phases cristallines. L'augmentation de la perte de masse à 28 jours pour 1Zn peut être le signe d'une deuxième phase de dissolution, mais pas vraiment expliquée ici.

La libération de Ca^{2+} (Figure 3.27b) est rapide et augmente de manière importante pour les premiers temps d'évolution, en accord avec une dissolution de l'amorphe. A partir de 3 jours, la quantité de calcium libéré augmente toujours mais de manière moins marquée, signe d'une reprécipitation de phases (cristallines) consommant des Ca^{2+}, concomitante avec la dissolution de l'amorphe. La proportion de calcium libérés atteint 16,8 $\pm$ 3 % (1Zn) et 15,1 $\pm$ 6 % (5Zn), ce qui représente une quantité de Ca^{2+} de (1,3 $\pm$ 0,3).10^{-4} mol et (1,1 $\pm$ 0,4).10^{-4} mol pour 100 mg de poudre respectivement (Figure AIII.3d), un peu supérieure mais du même ordre de grandeur que les valeurs pour les autres dopants.

Le pH, sur la Figure 3.27c, basique à 10,4 à 6 h du fait de la libération de CO_3^{2-} dans le milieu, diminue jusqu'à 9,7 – 9,8 à 21 jours puis augmente légèrement à 9,9 à 28 jours. Il est pareil à celui obtenu dans les filtrats pour le dopage au strontium mais un peu supérieur à celui du cuivre, probablement à cause d'une formation plus importante d'hydroxydes de cuivre.

Il y a par contre un contraste marqué avec les autres dopants en ce qui concerne la libération de Zn^{2+} (Figure 3.27d, valeurs brutes sur la Figure AIII.4c). En effet, celle-ci est bien moins importante pour toutes les durées d'évolution. Pour 5Zn, la proportion maximale est libérée à 3 jours d'évolution et vaut 0,29 $\pm$ 0,09 % (soit (1,6 $\pm$ 0,5).10^{-7} mol), elle est de 0,09 $\pm$ 0,01 % à 28 jours soit (4,7 $\pm$ 0,8).10^{-8} mol, ce qui est 250 fois moins que les Sr^{2+} libérés par 5Sr et 6 fois moins que les Cu^{2+} libérés par 5Cu. La libération de Zn^{2+} à 6 h est supérieure aux autres durées d'évolution, valant 2,2 $\pm$ 0,6 % ((2,1 $\pm$ 0,5).10^{-7} mol). Il peut s'agir d'une libération incontrôlée dans les premières heures d'évolution, mais dose-dépendante car rien de tel n'est observé pour 5Zn (avec cependant la probabilité que pour cet échantillon le « burst » ait lieu dès les premiers instants de l'essai, donc avant 6 h). Après ce point, la quantité de zinc dosée diminue puis ré-augmente à 28 jours pour 1Zn, à 0,9 $\pm$ 0,5 % soit (8 $\pm$ 4).10^{-8} mol pour 100 mg de poudre, 21 fois et 1,5 fois moins que la libération de Sr^{2+} ou Cu^{2+} par 1Sr ou 1Cu, respectivement. La diminution peut être synonyme de la formation d'une phase de zinc, probablement contenant des hydroxydes et des carbonates mais pas de calcium (*cf.* Figure 3.27b). De l'hydroxyde de zinc $Zn(OH)_2$ cristallin a par ailleurs été détecté par DRX pour 5Zn, et cela n'exclut pas la possibilité de la coexistence avec d'autres phases (mixtes) de zinc, amorphes donc non détectées. Les faibles quantités libérées sont aussi synonymes de la non-dissolution de la phase initiale de zinc (potentiellement de l'hydrozinguite $Zn_5(CO_3)_2(OH)_6$) décrite dans la partie II.2). Il est intéressant de noter qu'une plus grande quantité initiale de zinc dans les 10PyACC dopés n'implique pas une plus grande libération de Zn^{2+} en solution, c'est même le contraire qui se produit, confirmant le fait qu'une phase très stable contenant du zinc est formée quantitativement. Une faible libération des Zn^{2+} a également été observée par Degli Esposti *et al*. [454] pour des ACP stabilisés avec du citrate, pour lesquels seulement 1 % des Zn^{2+} intégrés ont été libérés dans l'eau contre 5 à 7 % des Sr^{2+}. Aucune explication n'a cependant été donnée par les auteurs pour justifier ces différences. Le seuil de cytotoxicité pour Zn^{2+} varie selon les articles, il serait compris entre 0,050 mM et 0,090 mM [533–535], ce qui est supérieur à la concentration en ions zinc à 28 jours dans cette étude (0,0005 - 0,0008 mM). Mais il a été montré qu'*in vivo*, les cations zinc forment des complexes avec les phosphates biogéniques, ce qui augmente les seuils de toxicité [533].

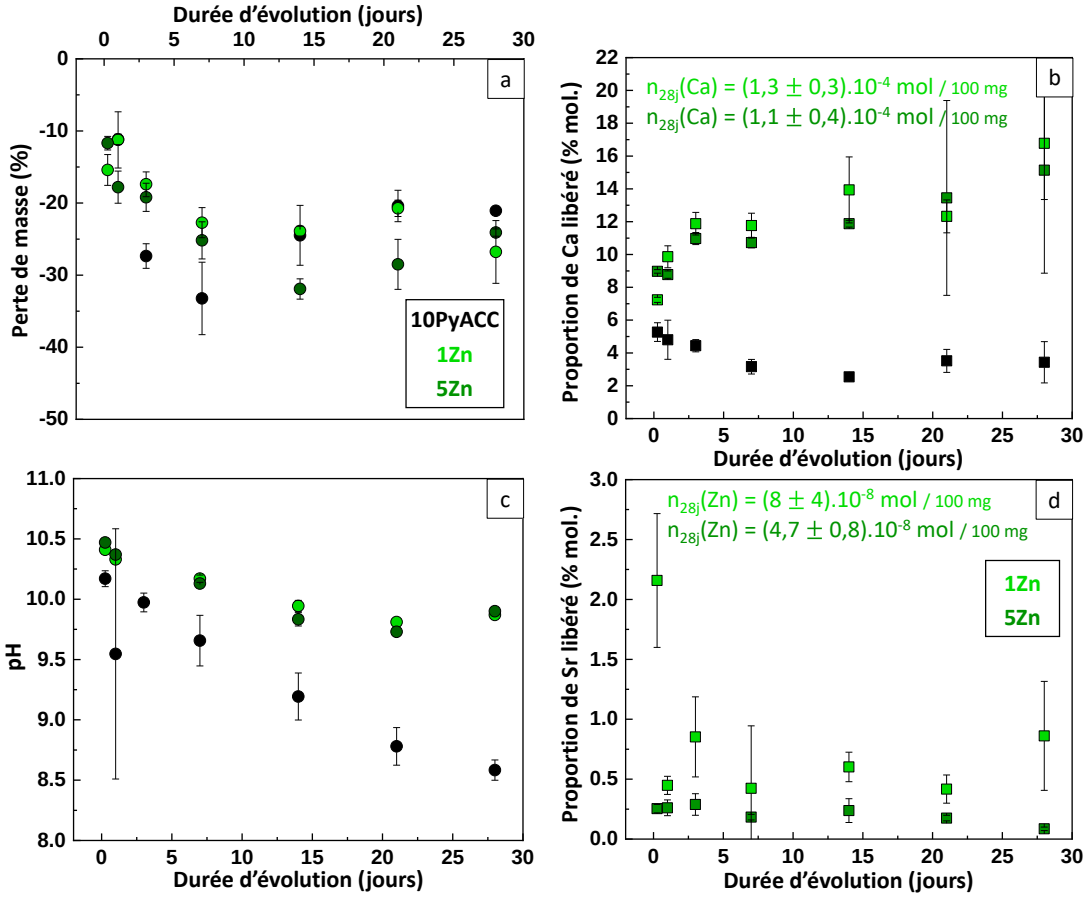


Figure 3.27 : Pertes de masse (a), évolution du pH des filtrats (c), et proportions de calcium (b) et de zinc (d) libérés (en % mol. par rapport à la quantité initiale) en fonction de la durée d'évolution des poudres 10PyACC et dopées 1Zn et 5Zn dans l'eau. Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondant aux écarts-types.

Le rapport molaire Zn/Ca a été tracé sur la Figure 3.28 pour les deux poudres dopées 1Zn et 5Zn. Comme dans le cas du cuivre, l'axe des ordonnées a été réduit car le rapport est beaucoup plus faible que pour le strontium. Les tendances sont par contre ici différentes : après le « burst » à 6 h pour 1Zn (rapport de 0,004 ± 0,001, face à 0,0022 ± 0,0003 pour 5Zn), le rapport Zn/Ca diminue jusqu'à 7 jours et 0,0004 ± 0,0005 et 0,0013 ± 0,0004 pour 1Zn et 5Zn respectivement, puis se stabilise ou diminue légèrement vers les valeurs de 0,0006 ± 0,0001 (1Zn) et 0,0005 ± 0,0002 (5Zn) à 28 jours. La baisse initiale est en accord avec une dissolution de l'amorphe, libérant des Ca^{2+} dans le milieu mais pas/peu de Zn^{2+} associés dans des phases stables. Les quantités libérées sont ensuite stabilisées et le rapport augmente très peu (pour la formation des phases cristallines de $CaCO_3$).

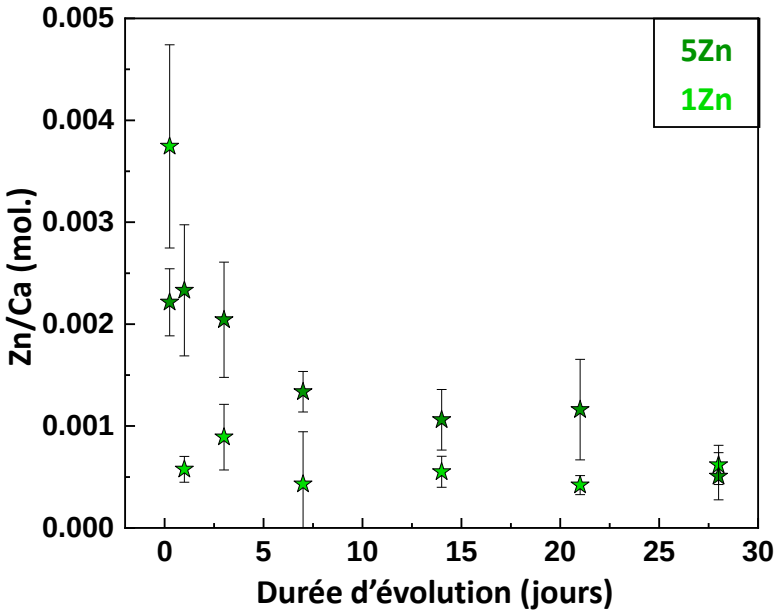


Figure 3.28 : Rapport molaire Zn/Ca libéré dans la solution en fonction de la durée d'évolution pour les poudres dopées 1Zn et 5Zn. Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondant aux écarts-types.

Les caractérisations des poudres dopées 1Zn et 5Zn montrent une cristallisation en MHC, favorisée par rapport à la vatérite, ainsi que la présence de calcite minoritaire et d'hydroxyde de zinc $Zn(OH)_2$ pour la poudre contenant le plus de zinc. Cet hydroxyde peut se former à partir des ions libérés par des hydroxydes déjà présents dans la poudre initiale, probablement sous forme d'un composé mixte zinc/hydroxyde/carbonate très stable, pouvant se dissoudre minoritairement puis reprécipiter (les cations de zinc ne semblent pas rester en solution). L'incorporation de Zn^{2+} dans les réseaux cristallins des polymorphes de $CaCO_3$ a très peu été décrite dans la littérature (en particulier elle est presque inexistante pour la MHC) et la formation d'aragonite est privilégiée à celle de la calcite en présence de zinc [536]. La formation d'hydroxydes ou de composés mixtes hydroxydes-carbonates comme l'hydrozinguite est alors la plus probable. Il apparait au terme de cette étude et de manière contre-intuitive que la libération des Zn^{2+} est favorisée avec une plus faible quantité de zinc dans la poudre initiale, mais avec une libération initiale incontrôlée. Au contraire, avec 5Zn la libération bien que très faible est continue et relativement stable sur 4 semaines.

III.2.5 Récapitulatif des tendances principales des évolutions dans l'eau des poudres de PyACC non dopées ou dopées

En résumé de cette partie III.2, les différentes poudres non dopées 5PyACC, 10PyACC et de la poudre 10PyACC dopée avec 1 ou 5 % mol. de strontium, cuivre ou zinc ont été caractérisées après évolution dans l'eau pendant des durées variées, ainsi que les milieux associés. Nous avons démontré que le pyrophosphate confère une plus grande stabilité à l'ACC et de manière quantitative, la quantité totale de phases cristallines formées étant amoindrie. Il influe également sur la sélection des polymorphes : la formation de la calcite est inhibée en faveur de la vatérite et de la calcite monohydratée. Quand le 10PyACC est dopé avec du strontium, sa dissolution est exacerbée entraînant une libération prolongée et continue d'ions Sr^{2+}, sans « burst effect ». Ces cations en solution réduisent la formation des phases cristallines, et semblent favoriser la MHC quand il y a cristallisation malgré tout. Les tendances sont différentes dans le cas du dopage au cuivre : il y a également une plus grande dissolution de l'amorphe *a*Cu mais avec peu de libération d'ions Cu^{2+}, ceux-ci étant probablement associés à des hydroxydes et des carbonates dans des formes solides stables en solution. La faible quantité d'ions cuivre libérés peut

s'intégrer minoritairement dans le réseau de la vatérite et induire la formation de calcite, l'autre fraction de ces ions reprécipitant probablement à partir de la solution. Pour le zinc le comportement est proche (du fait des similarités d'environnement électroniques et de rayon ionique des deux cations), l'amorphe *a*Zn est dissout en quantité plus élevée mais avec une faible libération de Zn^{2+}, eux-aussi associés aux hydroxydes et carbonates de manière stable (mais probablement au sein d'une phase différente). Les Zn^{2+} libérés en solution (de façon minoritaire) reprécipitent, entre autres sous forme de $Zn(OH)_2$. Il y a cependant une spécificité pour ce dopant, par la présence d'un libération incontrôlée initiale de Zn^{2+} pour 1Zn, et un effet-dose (la proportion de zinc libéré est plus élevée quand moins de zinc est introduit dans la poudre initiale).

Pour les trois dopages la libération d'ions bioactifs (calcium et strontium, cuivre ou zinc) dans l'eau est continue et prolongée sur 4 semaines, à des doses *a priori* non cytotoxiques, constituant de potentiels matériaux de choix pour des applications de substitution osseuse. Mais l'eau est un milieu très simplifié, ne mettant pas en jeu les potentielles interactions et compétitions avec les ions présents dans les fluides biologiques.

III.3 EVOLUTION DES POUDRES DANS LE SBF

Après avoir décrit les mécanismes de transformation et dégradation des matériaux de référence et dopés dans l'eau ultra-pure, le milieu a été complexifié en introduisant les ions constitutifs du plasma humain, dans une composition de type *simulated body fluid* (SBF). Celle-ci a été préparée selon le protocole développé par M. Desbord [261], adapté de celui de la norme ISO 23317 : 2014 pour éviter les biais introduits (comme décrit dans la partie I.2). Brièvement, les solutions anionique et cationique sont mélangées juste avant l'utilisation de la solution, pour limiter les risques de précipitation antérieure à l'étude ; la quantité de tampon TRIS est limitée tout en s'assurant d'avoir un mélange tamponné à pH de 7,4 ; et le sel de carbonate est introduit juste avant le début des essais d'évolution, pour garantir que la concentration initiale en ions carbonate soit celle attendue dans le SBF. Il est décrit en détail en Annexe V.3, mais les concentrations des ions présents dans chacune des solutions anionique et cationique sont rappelées dans le Tableau 3.7. Les essais d'évolution des poudres 5PyACC, 10PyACC, 1Sr, 5Sr, 1Cu, 5Cu, 1Zn et 5Zn sont ensuite conduits de la même manière que dans l'eau, décrits dans la partie précédente. La seule différence vient des dosages des quantités de calcium et de dopant libérées, ceux-ci étant effectués sur les solides et non les filtrats. La validité de cette méthodologie a été montrée dans la partie III.1. Pour récapituler, les caractérisations faites sur le solide après filtration et séchage sont les pesées, DRX, FTIR, MEB et dosages de Ca et du dopant, tandis que pour les filtrats seul le pH est mesuré.

Tableau 3.6 : Composition chimique des solutions anionique, cationique et de la solution finale de SBF préparée.

SOLUTIONS	REACTIF	CONCENTRATION (mM)
1.CATIONIQUE	NaCl	137
	KCl	6
	$MgCl_2.6H_2O$	3
	$CaCl_2.2H_2O$	5
	HCl (1M)	x
2.ANIONIQUE	NaCl	137
	$K_2HPO_4.3H_2O$	2
	Na_2SO_4	1
	HCl (1M)	x
MELANGE EQUIVOLUMIQUE 1+2	$NaHCO_3$	4,2

III.3.1 Poudres de référence 5PyACC et 10PyACC

Les diffractogrammes RX des deux poudres de référence 5PyACC et 10PyACC après plusieurs durées d'évolution dans le SBF sont présentés sur la Figure 3.29a, et comparés à ceux après les évolutions dans l'eau Figure 3.29b. Dans le SBF, la poudre 5PyACC présente les pics caractéristiques de la vatérite dès 6 h d'évolution. D'autres pics apparaissent dès 1 jour d'évolution et sont associés à la calcite. Certains sont très intenses, probablement associés à des directions préférentielles de croissance des cristaux. Mais celles-ci paraissent aléatoires et il n'y a pas de tendance entre les différentes poudres analysées, laissant penser qu'il s'agit d'une erreur d'acquisition ou de phénomènes annexes. Pour 10PyACC il n'y a pas d'évolution et la poudre reste amorphe jusqu'à 28 jours (contrairement à l'évolution dans l'eau).

Les spectres d'absorption infrarouge Figure 3.22c montrent pour 5PyACC la formation des phases cristallines. En effet, la bande associée à la ν_2CO_3 de l'ACC à 864 cm^{-1} se décale à 872 cm^{-1} (ν_2CO_3 vatérite et calcite à 875 cm^{-1} [105]), la bande ν_1CO_3 de la vatérite ou la calcite [537] apparait entre 1069 et 1092 cm^{-1}, et le doublet de la ν_2CO_3 est mieux défini, à 1426 et 1493 cm^{-1}, en accord avec la ν_2CO_3 de la vatérite (doublet à 1440 et 1490 cm^{-1}) et de la calcite (1420 cm^{-1} [105]). Comme pour les évolutions dans l'eau (retracées sur la Figure 3.22d), les bandes associées au pyrophosphate semblent augmenter, ce qui vient probablement de la diminution relative de la quantité de carbonate, dont certains ions restent en solution. Pour 10PyACC cependant l'évolution est différente. La ν_2CO_3 se déplace seulement de 864 à 869 cm^{-1}, son intensité diminue et il n'y a pas d'apparition de ν_1CO_3, ce qui est en accord avec la conservation d'un carbonate amorphe observée par l'absence de pics de diffraction en DRX. Les bandes carbonate semblent aussi diminuer d'intensité, comme pour 5PyACC. La solution de SBF contenant des ions orthophosphate, il est aussi possible que certains soient intégrés à l'amorphe de PyACC ou se déposent en surface, ce qui augmenterait l'intensité des bandes phosphate des spectres infrarouges (δPO_3 et ρPO_3 vers 550 cm^{-1} ou ν^sPO_3 à 1030 cm^{-1}).

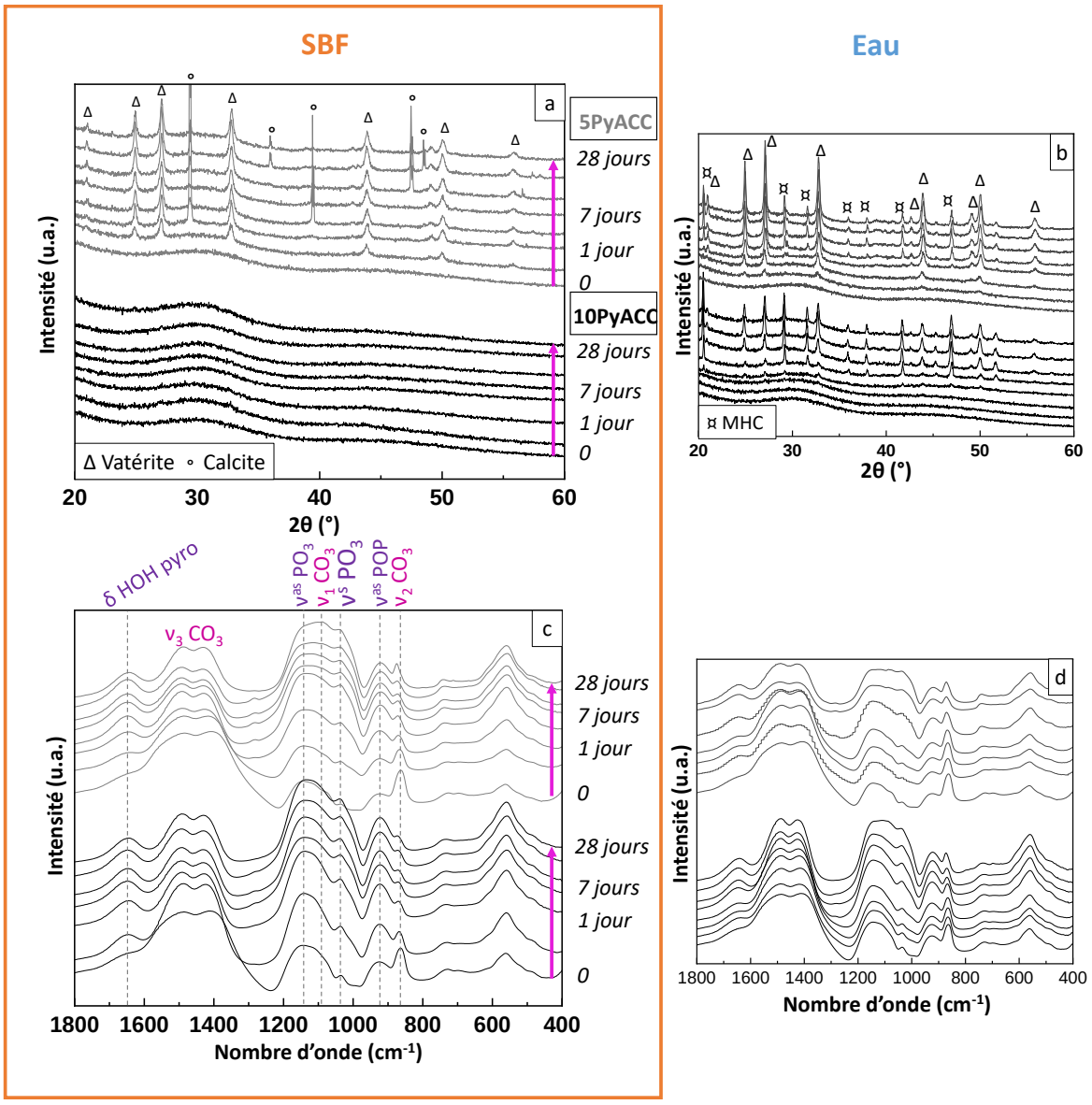


Figure 3.29 : Diffractogrammes RX (a,b) et spectres d'absorption infrarouge (c,d) des poudres de référence 5PyACC et 10PyACC ayant évolué entre 6 h et 28 jours dans le SBF (a,c) par comparaison avec ceux dans l'eau (b,d). Les symboles Δ, ° et ¤ sur les diffractogrammes RX représentent respectivement la vatérite, la calcite et la MHC.

Sur les images MEB Figure 3.30, les gros agglomérats de forme arrondis identifiés comme étant de la vatérite sont visibles pour 5PyACC, et ce dès 7 jours d'évolution. Ils coexistent avec des agrégats d'amorphe granulaire. Pour 10PyACC cependant les agrégats d'amorphe sont les seuls visibles.

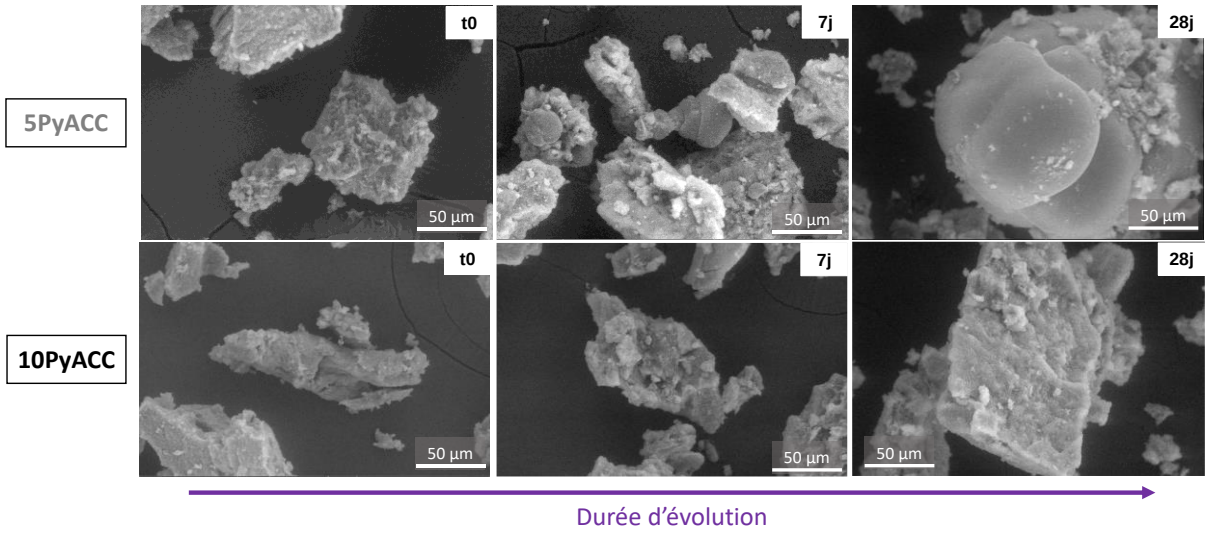


Figure 3.30 : Images MEB des poudres de 5PyACC et 10PyACC initiales (gauche) et après 7 jours (milieu) et 28 jours (droite) d'évolution dans le SBF, au grossissement x 500.

Les pertes de masse de 5PyACC et 10PyACC sont présentées sur la Figure 3.31a. A cause d'un problème expérimental, les poudres récupérées après 6 h d'évolution n'ont pas pu être pesées. Néanmoins, toutes les pertes de masse aux autres durées d'évolution sont plus élevées que pour les poudres de même composition ayant évolué dans l'eau (dont les valeurs sont reportées avec des cercles en transparence sur le graphique). Après 1 jour d'évolution les pertes de masse valent - 56 % et - 40 % pour 5PyACC et 10PyACC respectivement. Les masses collectées après filtration diminuent jusqu'à - 66 % (5PyACC) et - 57 % (10PyACC) à 7 jours puis augmentent et se stabilisent à - 55 % à partir du 14ème jour pour les deux compositions. Les pertes de masse sont associées à la dissolution de l'amorphe, en quantité moindre pour 10PyACC plus stable. Pour ce dernier, la masse collectée augmente peu (à la différence de l'évolution dans l'eau), car aucune phase cristalline n'est formée, les ions restant en solution sont en équilibre avec l'ACC. Pour 5PyACC, le gain de masse à partir du 7ème jour est lié à la précipitation des phases cristallines.

La proportion de Ca^{2+} libérés dans le milieu (Figure 3.31b, valeurs brutes sur la Figure AIII.5a) est plus élevée pour 10PyACC que pour 5PyACC. Elle augmente aux durées courtes puis se stabilise : pour 5PyACC, elle passe de 4 $\pm$ 2 % à 6 h à 11,73 $\pm$ 0,08 % à 3 jours, son maximum, ce qui représente une quantité de Ca^{2+} libérés de (1,016 $\pm$ 0,007).10^{-4} mol / 100 mg de poudre, puis elle se stabilise et diminue légèrement vers sa valeur finale de 8 $\pm$ 1 %, soit (7 $\pm$ 1).10^{-5} mol de Ca^{2+}. Pour 10PyACC, l'augmentation est plus marquée, la proportion de calcium libérés augmente de 11,4 $\pm$ 0,5 % à 6 h à 21,3 $\pm$ 0,8 % à son maximum à 14 jours, représentant (1,78 $\pm$ 0,06).10^{-4} mol, puis diminue jusqu'à 16 $\pm$ 4 % à 28 jours, soit (1,3 $\pm$ 0,3).10^{-4} mol pour 100 mg de poudre.

Les mesures de pH n'ont pas été effectuées pour ces poudres de référence.

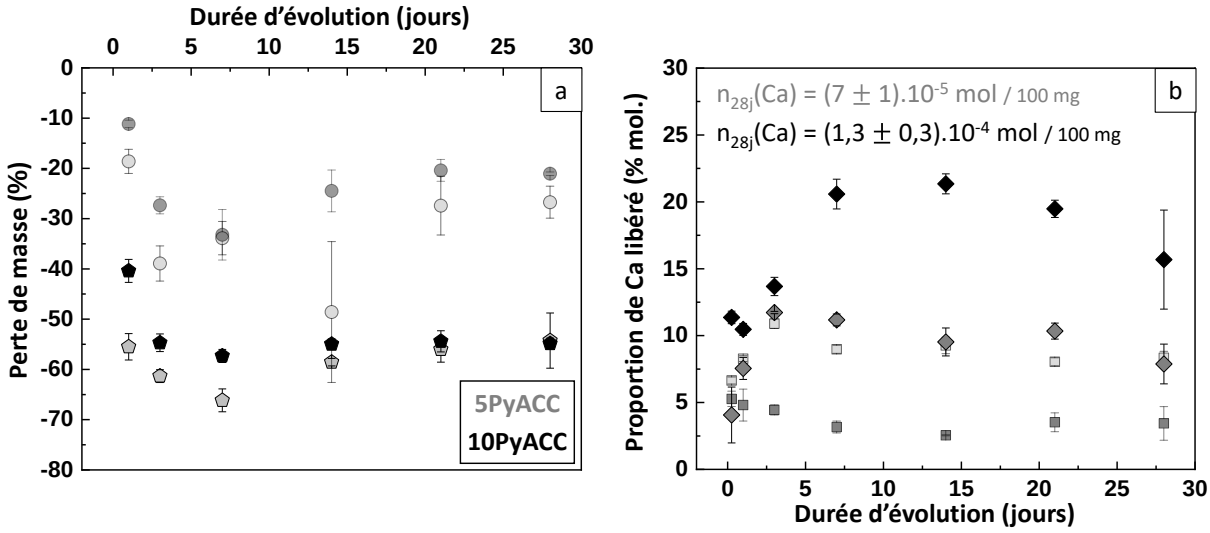


Figure 3.31 : Pertes de masse (a) et proportions d'ions calcium libérés (% mol. par rapport à la quantité initiale) (b) en fonction de la durée d'évolution des poudres de référence 5PyACC et 10PyACC dans le SBF (pentagones (a) et losanges (b)) et dans l'eau (cercles (a) et carrés (b), en transparence). Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondant aux écarts-types.

Pour les deux compositions 5PyACC et 10PyACC, les pertes de masses finales dans le SBF (Figure 3.31a, pentagones) sont égales à 2 à 3 fois celles relevées dans l'eau (Figure 3.31a, cercles en transparence). Une dissolution plus importante de l'amorphe PyACC dans le SBF peut expliquer une partie des variations mais ce n'est pas le seul paramètre à prendre en compte. De plus, la quantité de calcium libéré dans l'eau ou le SBF (Figure 3.31b) est similaire pour 5PyACC mais elle est multipliée par 4 pour 10PyACC dans le SBF. Ces phénomènes peuvent s'expliquer par des échanges ioniques entre les ions du SBF et ceux de 10PyACC. Les Ca^{2+} peuvent être substitués par des ions Mg^{2+}, pouvant être intégrés en grande quantité dans le réseau amorphe ; ils sont en effet connus pour être des ions stabilisant de cette phase [313,317,341,345]. Le magnésium étant plus petit que le calcium, sa substitution conduit à une perte de masse plus élevée. Il a de plus été décrit que la présence de magnésium en solution a un fort impact sur la solubilité de l'ACC [479] : des complexes aqueux Mg-CO_3 se forment, engendrant la dissolution de l'ACC pour maintenir les niveaux de saturation. D'autres ions présents dans le milieu SBF (comme les orthophosphates) peuvent de même chélater les Ca^{2+} de l'ACC et accélérer sa dissolution [109]. Pour 5PyACC, la dissolution de l'amorphe s'accompagne d'un début de précipitation de la vatérite, phase stabilisée par la présence d'ions pyrophosphate et d'autres ions présents dans le SBF comme les sulfates [124,356,538]. Cette précipitation consomme des Ca^{2+} et entraîne la diminution de leur quantité dans la solution, ainsi qu'une augmentation progressive de la masse collectée après filtration. La diminution de la quantité de calcium pour 10PyACC après 14 jours d'évolution peut provenir d'une reprécipitation en un composé amorphe. Il est peu probable que l'ACC une fois dissout reprécipite plus tardivement, mais il y a dans le SBF de nombreux ions pouvant former des sels amorphes de calcium, à commencer par les phosphates. L'essai d'évolution dans le SBF comme preuve de bioactivité a d'ailleurs été critiqué pour sa sursaturation par rapport à l'apatite ; il est donc raisonnable d'envisager la formation d'une couche de CaP sur les PyACC non dissouts, couche non cristalline ou très mal cristallisée (et en trop petite quantité pour être détectée par DRX). L'augmentation relative de l'intensité des bandes FTIR associées aux vibrations des ions phosphate remarquée sur la Figure 3.29c serait cohérente avec cette hypothèse. En outre, l'adsorption de phosphates à la surface des particules d'ACC bloque leur cristallisation et stabilise la vatérite le cas échéant [100].

III.3.2 Poudres dopées avec du strontium *a*Sr

Les poudres 1Sr et 5Sr ayant évolué dans le SBF restent majoritairement amorphes, comme l'attestent les diffractogrammes RX sur la Figure 3.32a, à la différence des évolutions dans l'eau reportées sur la Figure 3.32b. Pour 1Sr, à partir du 1er jour dans le SBF les pics caractéristiques de la vatérite sont visibles, mais d'intensité minime. Cette intensité n'augmente pas ou peu, signe de la formation d'une très faible quantité de vatérite et/ou peu cristallisée. Pour 5Sr, de très faibles pics sont visibles à 1 jour et 3 jours mais ils dépassent très peu du bruit de fond, donc ne sont pas interprétables. A 7 jours, les pics sont plus intenses et un pic associé à la calcite apparaît, mais cela ne semble pas être une tendance de l'évolution de la cristallinité de 10Py, peut-être juste un échantillon sortant du lot (comme un seul des trois échantillons du triplicat est analysé en DRX, il est possible qu'il ne reflète pas l'évolution des deux autres). Pour les durées d'évolution plus longues, la formation de vatérite est minime. L'analyse quantitative des proportions de phases n'a pas été réalisée ici au regard de ces faibles contributions de phases cristallisées et de l'incertitude de la quantification par cette méthode.

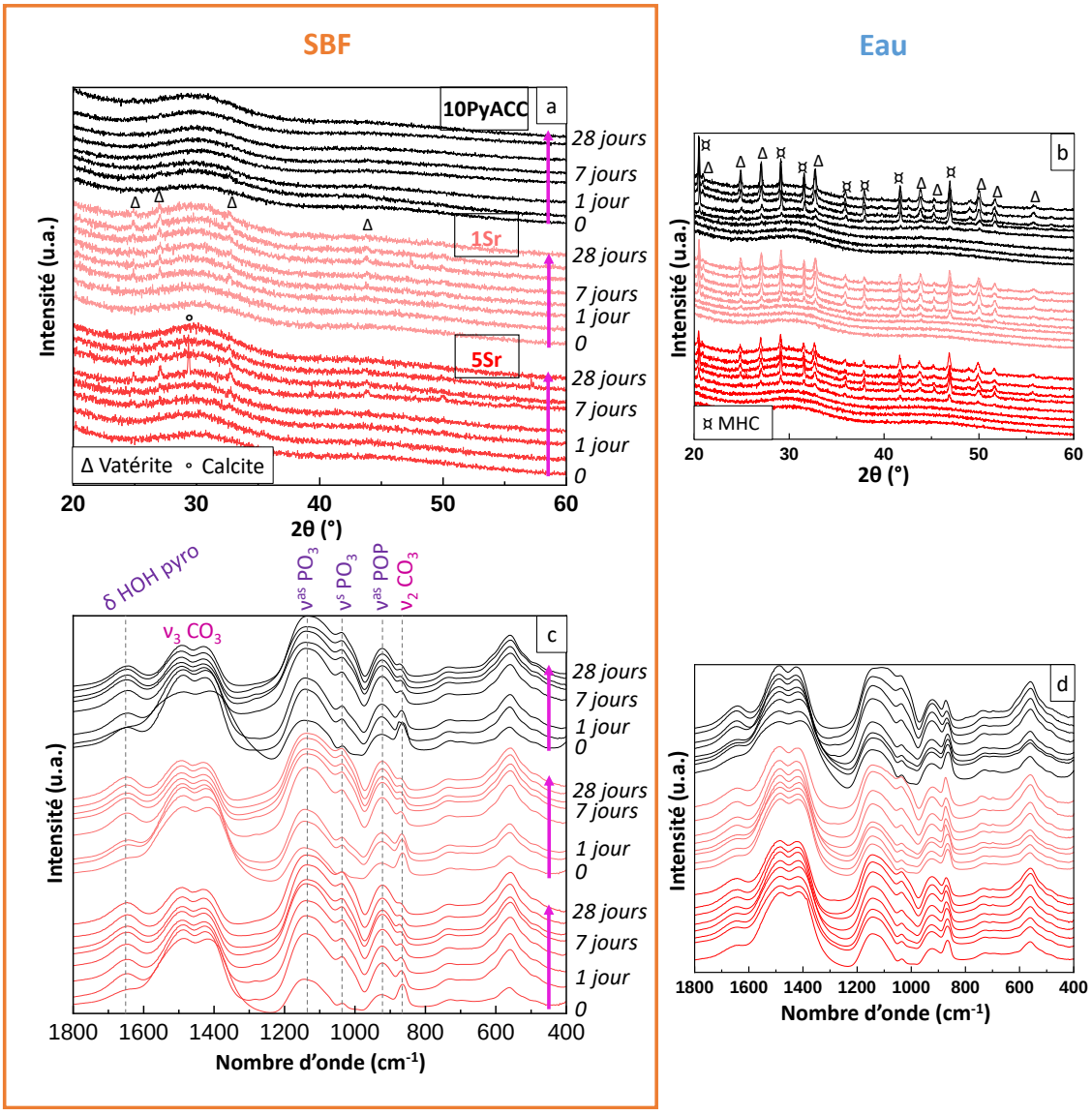


Figure 3.32 : Diffractogrammes RX (a,b) et spectres d'absorption infrarouge (c,d) de la poudre de référence 10PyACC et poudres dopées avec du strontium 1Sr et 5Sr ayant évolué entre 6 h et 28 jours dans le SBF (a,c) par comparaison avec ceux dans l'eau (b,d). Les symboles Δ, ° et ¤ sur les diffractogrammes RX représentent respectivement la vatérite, la calcite et la MHC.

Les spectres infrarouges Figure 3.32c montrent la même évolution que 10PyACC : les bandes carbonate restent aux mêmes positions mais s'affaiblissent tandis que les bandes PO_3 du pyrophosphate se renforcent au fur et à mesure de l'évolution, probablement en lien avec la précipitation d'une phase de phosphate amorphe sur les particules de PyACC.

Les images MEB sur la Figure 3.33 ne montrent pas d'évolution entre les poudres initiales et les poudres après 7 ou 28 jours d'évolution. Elles sont toutes composées des agrégats granulaires caractéristiques de l'amorphe 10PyACC.

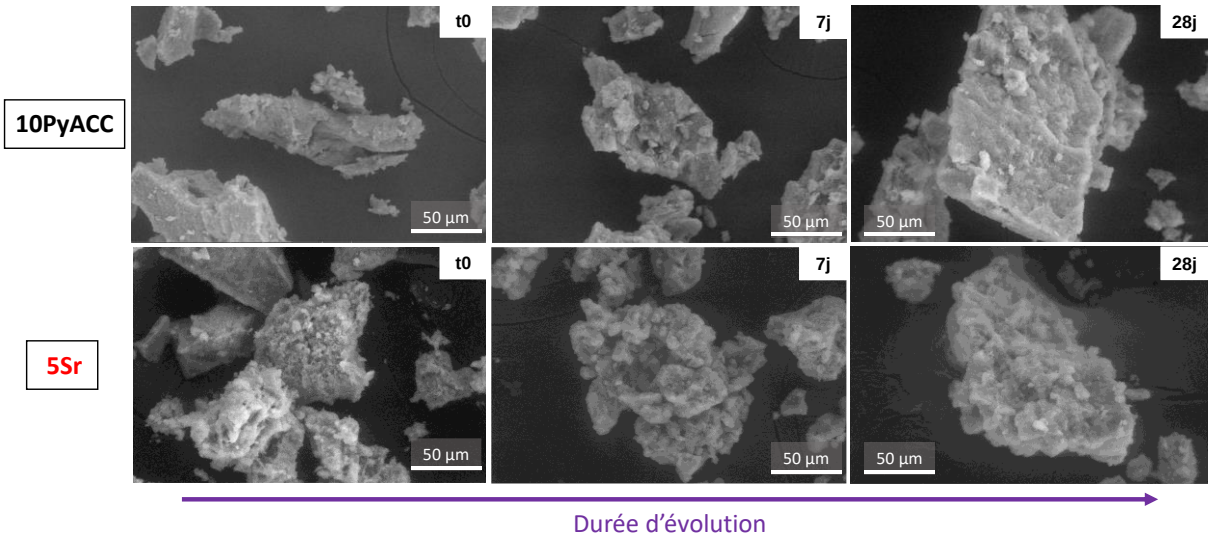


Figure 3.33 : Images MEB des poudres de 10PyACC et 5Sr initiales (gauche) et après 7 jours (milieu) et 28 jours (droite) d'évolution dans le SBF, au grossissement x 500.

Les pertes de masses (Figure 3.34a) sont très proches de celles de la référence 10PyACC, et il n'y a pas non plus de différences entre 1Sr et 5Sr, mais sont presque multipliées par 2 par rapport aux évolutions dans l'eau (en transparence sur la figure). La masse récupérée diminue lentement de - 42 % (1Sr) et - 39 % (5Sr) à 6 h à - 53 % et - 54 % pour 1Sr et 5Sr respectivement après 7 jours, puis se stabilise jusqu'à sa valeur finale de - 52 % pour 1Sr et - 55 % pour 5Sr (hormis un point aberrant pour 5Sr à 14 jours, provenant surement d'une perte de poudre au moment de la pesée).

Le pH (Figure 3.34c), tamponné et initialement fixé à 7,39, augmente légèrement jusqu'à 7 jours (pH de 7,9), puis se stabilise à sa valeur finale de 8,0.

La proportion d'ions Ca^{2+} libérés dans le milieu par 1Sr et 5Sr (Figure 3.34b, valeurs brutes sur la Figure AIII.5b) suit aussi les mêmes tendances que 10PyACC mais seulement aux durées les plus courtes, avec une lente augmentation jusqu'à 7 jours puis une stabilisation vers la valeur finale ou même une très légère augmentation dès 14 jours pour 5Sr (et non une diminution comme pour 10PyACC), égale à 19,0 $\pm$ 0,5 % soit (1,53 $\pm$ 0,04).10^{-4} mol libérés / 100 mg de poudre pour 1Sr et à 17,2 $\pm$ 0,4 % soit (1,24 $\pm$ 0,03).10^{-4} mol libérés / 100 mg de poudre pour 5Sr. Elle est globalement supérieure à la proportion libérée dans l'eau (reportée en transparence sur la figure).

Enfin, la quantité d'ions strontium libérés, présentée sur les Figure 3.34d et Figure AIII.6a, a la même évolution que pour le calcium : elle augmente rapidement jusqu'à 7 jours puis elle se stabilise. Pour 1Sr, elle reste stable jusqu'à 28 jours et sa valeur finale, de 38,9 $\pm$ 0,3 % soit (3,72 $\pm$ 0,03).10^{-6} mol libérés / 100 mg de poudre. Pour 5Sr cependant la proportion maximale est atteinte pour 14 jours et vaut 36,9 $\pm$ 0,2 % ((20,3 $\pm$ 0,1).10^{-6} mol) puis elle diminue légèrement jusqu'à 28 jours, durée pour laquelle elle est égale à 31,8 $\pm$ 0,3 % représentant (17,5 $\pm$ 0,1).10^{-6} mol pour 100 mg de poudre. Les

quantités de Sr^{2+} libérés sont 2 fois plus élevées dans le SBF que dans l'eau (carrés en transparence sur la figure) pour 1Sr et 1,7 fois pour 5Sr.

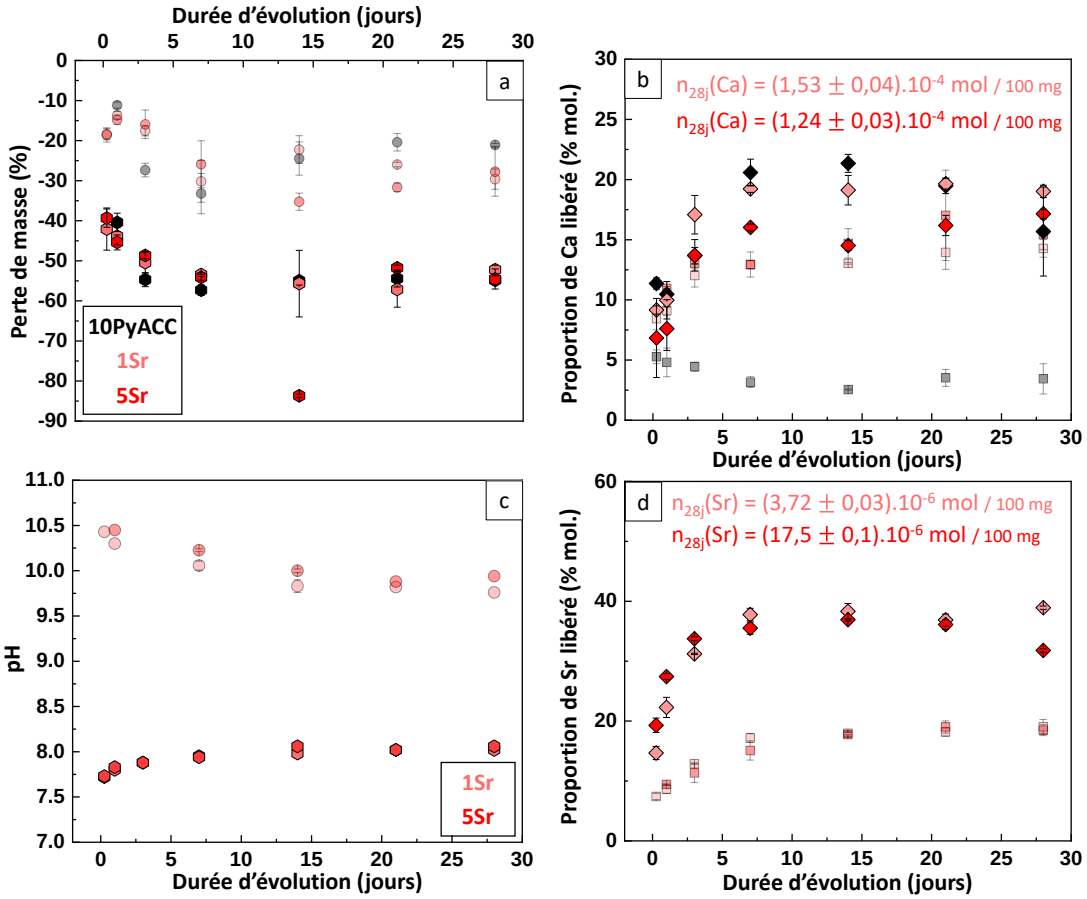


Figure 3.34 : Pertes de masse (a), évolution du pH des filtrats (c), et proportions de calcium (b) et de strontium (d) libérés (en % mol. par rapport à la quantité initiale) en fonction de la durée d'évolution des poudres 10PyACC et dopées 1Sr et 5Sr dans le SBF (pentagones et losanges) et dans l'eau (cercles et carrés en transparence). Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondant aux écarts-types.

Le rapport Sr/Ca d'ions libérés pendant l'évolution dans le SBF par les poudres 1Sr et 5Sr est tracé sur la Figure 3.35, et comparé à celui issu de l'évolution dans l'eau, reporté en transparence sur la figure. Il est intéressant de noter que malgré les proportions libérées plus élevées dans le SBF, le rapport Sr/Ca est similaire à celui dans l'eau pour 1Sr, dans la gamme 0,019 - 0,024 ± 0,002 pour 1Sr, avec un maximum à 1 jour à 0,026 ± 0,006 dans le SBF (face à 0,010 - 0,016 ± 0,002 dans l'eau). Pour 5Sr, le ratio dans le SBF est supérieur à celui dans l'eau : il est compris entre 0,141 ± 0,004 et 0,21 ± 0,1 dans le SBF, également avec un maximum à 1 jour à 0,27 ± 0,07, face à 0,07 - 0,095 ± 0,01 dans l'eau. La dissolution plus prononcée de l'amorphe dans le SBF libère plus d'ions Ca^{2+} et Sr^{2+} (*cf.* Figures 3.34b, 3.34d) mais pour 1Sr cette libération semble globalement simultanée pour les deux éléments, suggérant de nouveau une substitution du strontium dans le cœur proto-cristallin du cluster de PyACC (en accord avec les hypothèses proposées dans la partie II.2). Pour 5Sr cependant, le fait que le ratio dans le SBF soit plus élevé que dans l'eau pourrait être la conséquence d'une libération plus prononcée de strontium, probablement liée à un échange ionique avec un autre ion du SBF, de rayon ionique plus petit et donc induisant moins de contraintes dans la maille proto-cristalline par exemple.

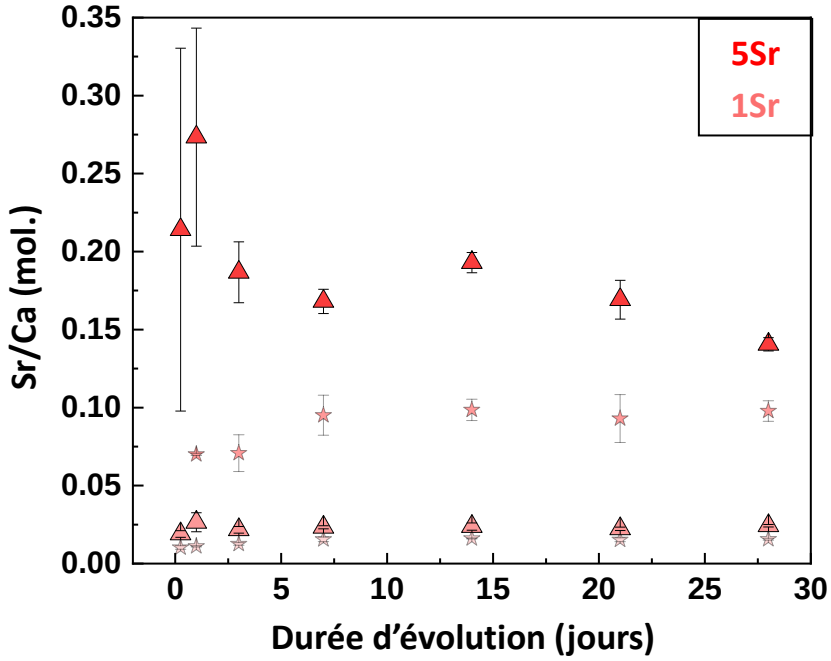


Figure 3.35 : Rapport molaire Sr/Ca libéré dans le SBF (triangles) et dans l'eau (étoiles en transparence) en fonction de la durée d'évolution pour les poudres dopées 1Sr et 5Sr. Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondant aux écarts-types.

En conclusion, les pertes de masse et quantités libérées de calcium et strontium élevées, entre autres aux plus courtes durées d'évolution, peuvent s'expliquer par une dissolution exacerbée de l'amorphe (par rapport à l'évolution dans l'eau), amorphe dans lequel les ions Sr^{2+} sont probablement substitués. Cela se traduit aussi par une augmentation de pH, potentiellement en raison d'une protonation des anions libérés (CO_3^{2-} et $P_2O_7^{4-}$) par les protons du milieu [261]. Les ions Sr^{2+} libérés restent majoritairement en solution dans le milieu. Une petite fraction de ceux-ci reprécipitent peut être avec des ions présents dans le SBF (CO_3^{2-} par exemple) après 21 jours, expliquant la diminution de la proportion libérée pour 5Sr. Comme pour les poudres de référence, il est probable que les pertes de masse soient exacerbées par la substitution de Ca^{2+} par les cations du SBF dans l'amorphe restant, *a priori* plutôt Mg^{2+} en accord avec la littérature, de rayon ionique plus petit que le calcium. La libération d'ions bioactifs (calcium et strontium) en milieu mimant les concentrations ioniques des fluides humains est prononcée, en augmentation continue pendant une semaine sans « burst effect » puis prolongée sur 4 semaines, ce qui peut constituer un intérêt particulier pour des applications de substitution osseuse, d'autant plus que ces concentrations sont a priori dans la gamme de non-cytotoxicité [526].

III.3.3 Poudres dopées avec du cuivre *α*Cu

Les poudres 1Cu et 5Cu ayant évolué dans le SBF montrent des diffractogrammes RX caractéristiques des amorphes carbonate (Figure 3.36a), ne présentant pas de pics de diffraction, à l'exception de quelques très faibles pics associés à la vatérite détectés pour 1Cu à partir de 1 jour d'évolution, contrairement aux évolutions dans l'eau (Figure 3.36b).

Les spectres d'absorption infrarouge Figure 3.36c sont très similaires à ceux du strontium détaillés précédemment, avec une diminution des bandes relatives aux groupements carbonate et une augmentation des bandes phosphates, ce qui pourrait être un signe d'une précipitation d'une phase de phosphate au cours de l'évolution dans le SBF.

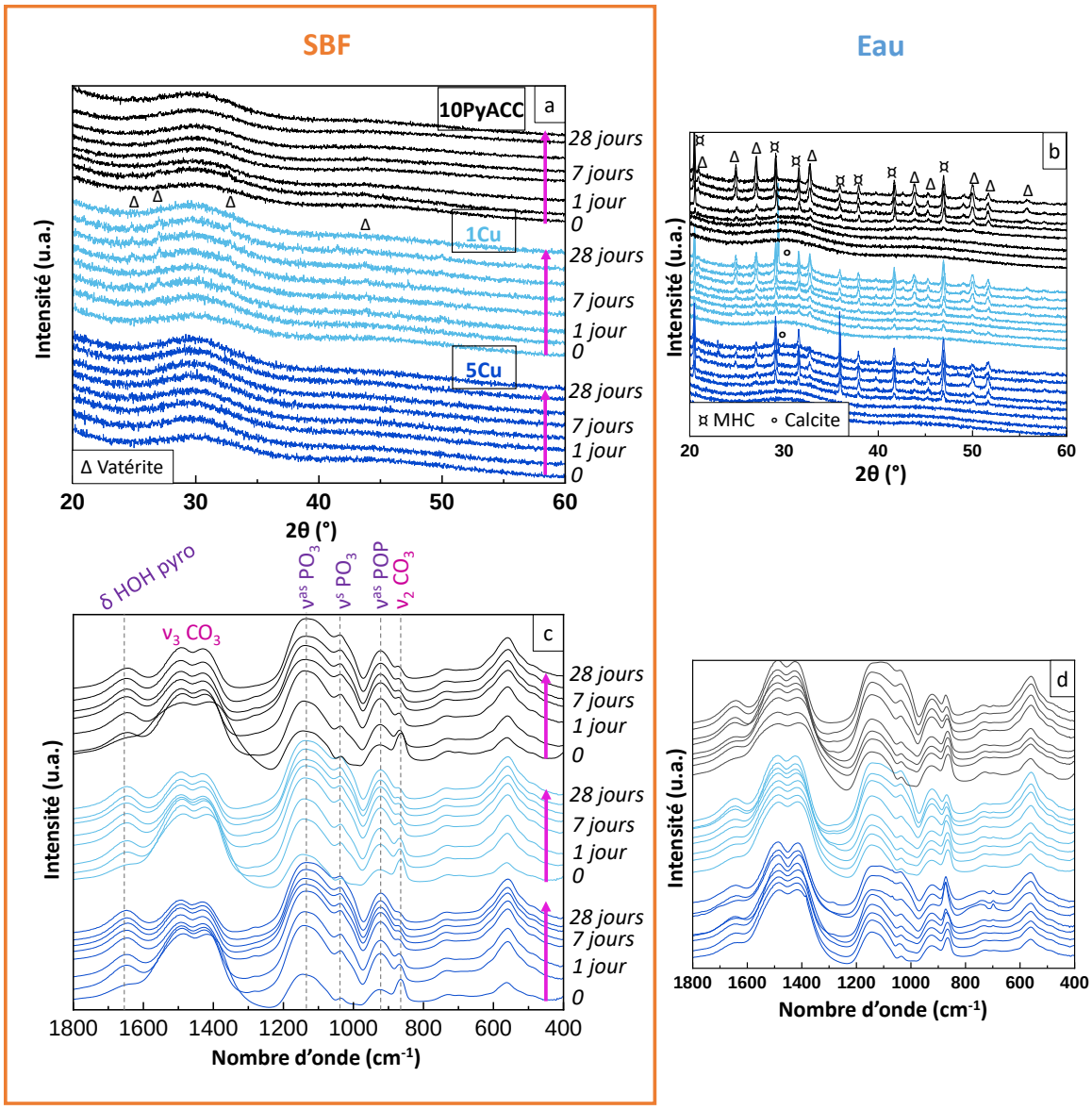


Figure 3.36 : Diffractogrammes RX (a,b) et spectres d'absorption infrarouge (c,d) de la poudre de référence 10PyACC et des poudres dopées avec du cuivre 1Cu et 5Cu ayant évolué entre 6 h et 28 jours dans le SBF (a,c) en comparaison avec ceux dans l'eau (b,d). Les symboles Δ, ◦ et ¤ sur les diffractogrammes représentent respectivement la vatérite, la calcite et la MHC.

Les images MEB (Figure 3.37) ne présentent pas non plus de différences avec la poudre de référence 10PyACC, montrant toujours les mêmes agrégats granulaires typiques des amorphes de PyACC.

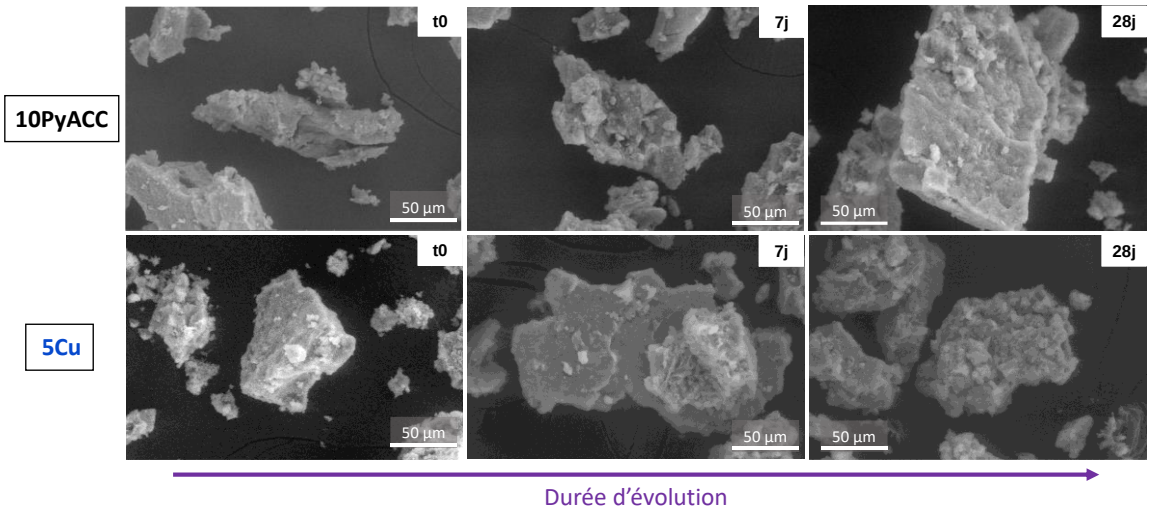


Figure 3.37 : Images MEB des poudres de 10PyACC et 5Cu initiales (gauche) et après 7 jours (milieu) et 28 jours (droite) d'évolution dans le SBF, au grossissement x 500.

Les pertes de masse sur la Figure 3.38a ont les mêmes tendances initiales que la poudre de référence 10PyACC, avec une diminution de la masse collectée rapide jusqu'à 3 jours puis plus lente jusqu'à 14 jours, pour lequel elle est maximale (- 64 % pour 1Cu et - 66 % pour 5Cu). Puis elle augmente à sa valeur finale à 28 jours, de - 60 % pour 1Cu et - 62 % pour 5Cu. Les valeurs des pertes de masse sont 2,2 à 2,4 fois plus élevées que dans l'eau (valeurs reportées en transparence sur la figure), montrant que la composition de la solution a un rôle clé sur les cinétiques de dissolution. Elles sont aussi légèrement plus élevées que dans le cas du strontium, pour lequel l'amorphe dopé doit être un peu plus stable en solution.

Comme dans le cas du strontium, le pH des filtrats (Figure 3.38c) augmente légèrement jusqu'à 8,0 pour les deux compositions 1Cu et 5Cu, ce qui est lié à la protonation des anions libérés par la dissolution du PyACC, comme décrit précédemment.

Les proportions d'ions calcium libérés sont plus élevées que pour 10PyACC (Figure 3.38b, valeurs brutes sur la Figure AIII.5c), mais elles augmentent de manière similaire jusqu'à 3 jours. Leur valeur maximale est atteinte à 14 jours, elle vaut 20,0 $\pm$ 0,7 % pour 1Cu soit (1,52 $\pm$ 0,05).10^{-4} mol libérés et 26 $\pm$ 1 % pour 5Cu soit (1,85 $\pm$ 0,08).10^{-4} mol / 100 mg. La proportion libérée par 1Cu se stabilise ensuite, sa valeur finale à 28 jours étant pratiquement égale à celle à 14 jours, alors que pour 5Cu la quantité de Ca^{2+} libérés diminue rapidement après 14 jours, et vaut à 28 jours 16 $\pm$ 1 % soit (1,1 $\pm$ 0,1).10^{-4} mol. Les écarts de libération de Ca^{2+} dans le SBF et dans l'eau (reportés en transparence sur la figure) reposent sur des différences de dissolution de l'amorphe.

La libération du cuivre (Figure 3.38d, Figure AIII.6b) est par contre très différente de celle du calcium et du strontium des poudres précédentes. Malgré des incertitudes élevées, des tendances se dégagent : la proportion libérée est déjà très élevée après 6 h d'évolution, elle vaut 67 $\pm$ 4 % et 76 $\pm$ 2 % pour 1Cu et 5Cu respectivement, montrant une vitesse de dégradation des composés intégrant le cuivre très rapide. Cette proportion augmente avec la durée d'évolution (et d'autant plus pour 1Cu) puis se stabilise à des valeurs similaires pour les deux compositions 1Cu et 5Cu après 28 jours, *i.e.* 86 $\pm$ 41 % et 86 $\pm$ 3 % pour 1Cu et 5Cu respectivement, ce qui représente des quantités de Cu^{2+} de (9 $\pm$ 4).10^{-6} mol et (50 $\pm$ 1).10^{-6} mol pour 100 mg de poudre. L'incertitude est grande sur la valeur de 1Cu à 28 jours, mais la valeur précédente (à 21 jours) ayant une incertitude faible et les poudres 1Cu et 5Cu ayant les mêmes évolutions, elle reste interprétable. Ces valeurs sont nettement

supérieures à celles dans l'eau, 75 fois pour 1Cu et 200 fois pour 5Cu. Il est également intéressant de relever que la majorité du cuivre libéré semble rester en solution dans le SBF et ne reprécipite pas.

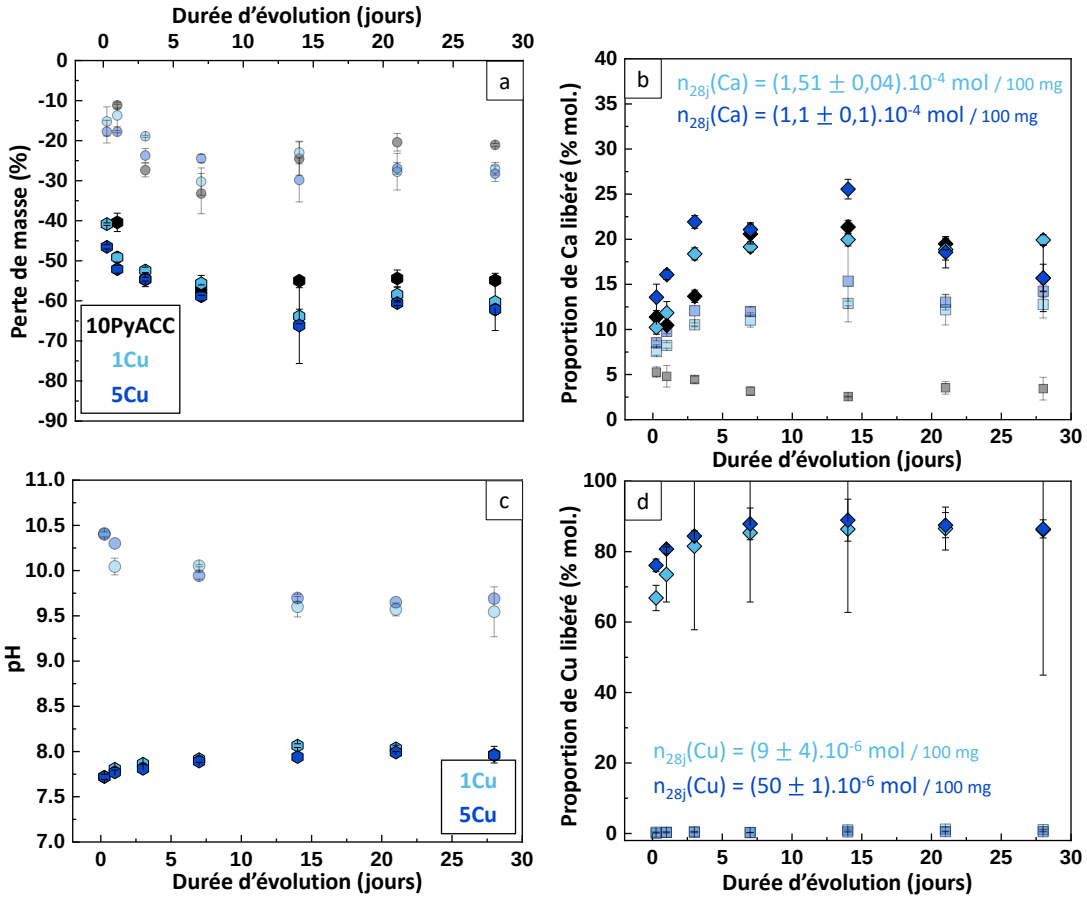


Figure 3.38 : Pertes de masse (a), évolution du pH des filtrats (c), et proportions de calcium (b) et de cuivre (d) libérés (% mol. par rapport à la quantité initiale) en fonction de la durée d'évolution des poudres 10PyACC et dopées 1Cu et 5Cu dans le SBF (pentagones et losanges) et dans l'eau (cercles et carrés en transparence). Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondant aux écarts-types.

Le rapport Cu/Ca libérés pendant l'évolution dans le SBF est tracé pour 1Cu et 5Cu sur la Figure 3.39 (avec les valeurs pour l'évolution dans l'eau reportées par des étoiles en transparence). Sans surprise, le comportement est très différent des *a*Cu dans l'eau et des *a*Sr dans le SBF (Figure 3.35) : le rapport vaut 0,09 ± 0,01 à 6 h pour 1Cu et diminue lentement jusqu'à sa valeur finale de 0,06 ± 0,03 à 28 jours, tandis que pour 5Cu, des variations marquées sont observées. En effet, la valeur initiale (0,44 ± 0,06 à 6 h) diminue et atteint un minimum à 0,28 ± 0,03 à 14 jours puis augmente jusqu'à 0,44 ± 0,06 à 28 jours. Ces valeurs finales sont nettement supérieures à celles pour les évolutions des *a*Cu dans l'eau, (50 fois et 175 fois plus élevées pour 1Cu et 5Cu respectivement). Cela peut être expliqué par une libération de Cu^{2+} très élevée (*cf*. Figure 3.38d), qui de plus est quantitative et fonction de la proportion initiale de cuivre dans les poudres 1Cu et 5Cu (la valeur du rapport Cu/Ca de 5Cu à 28 jours étant égale à 7 fois celle de 1Cu). En accord avec les hypothèses développées dans la partie II.2, le cuivre est associé à des hydroxydes et des carbonates dans les composés *a*Cu mais pas substitué au sein des clusters proto-cristallins. Il est probable que ces composés de cuivre soient dissouts très rapidement dans un milieu comme le SBF, par la présence de nombreux ions et un pH tamponné. Comme la libération élevée d'ions cuivre ne se traduit pas par une augmentation de pH, les hydroxydes libérés reprécipitent probablement rapidement pour former un complexe plus stable avec les ions présents dans le milieu. C'est peut-être même cette précipitation qui déclenche la dissolution initiale des composés de cuivre,

car plus favorable d'un point de vue thermodynamique. Les variations du rapport Cu/Ca observées essentiellement pour 5Cu sont corrélées aux pertes de masse (Figure 3.38a) : au début de l'essai, le rapport Cu/Ca diminue du fait de l'augmentation de la quantité de calcium, résultant de la dissolution de l'amorphe (les ions cuivre seraient déjà majoritairement libérés dans le milieu, au vu de la Figure 3.38d et donc n'influeraient pas sur l'évolution de ce rapport). A 14 jours, la quantité de calcium semble diminuer (car le rapport augmente alors que la quantité de Cu^{2+} semble stable), potentiellement du fait de la précipitation de nouvelles phases, non cristallines d'après les DRX (Figure 3.36a), peut-être une phase de phosphate de calcium (en accord avec les spectres infrarouges Figure 3.36b), mais dans laquelle le cuivre n'est pas intégré.

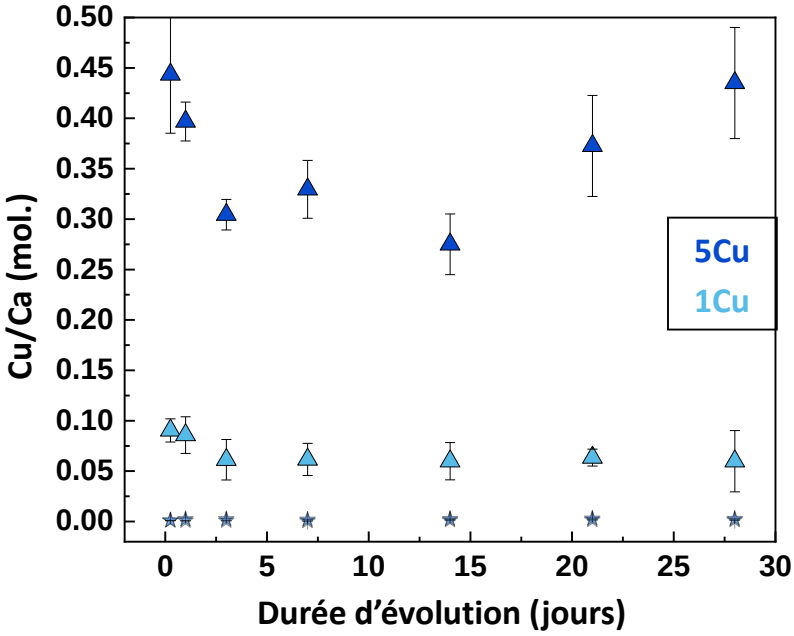


Figure 3.39 : Rapport molaire Cu/Ca libéré dans le SBF (triangles) et dans l'eau (étoiles en transparence) en fonction de la durée d'évolution pour les poudres dopées 1Cu et 5Cu. Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondant aux écarts-types.

Des pertes de masse élevées dès les premiers temps d'évolution montrent une dissolution partielle rapide de la poudre dans le milieu, ce qui s'accompagne d'une forte libération de calcium, exacerbée par rapport à la référence 10PyACC et par rapport à ces mêmes poudres ayant évolué dans l'eau. La forte libération d'ions cuivre a été associée à une dissolution favorisée des composés cuivre-hydroxyde-carbonate dans lesquels ils seraient présents initialement, potentiellement induite par les autres ions présents dans la solution de SBF et non par des considérations thermodynamiques. Pour vérifier ces hypothèses il faudrait réaliser le dosage des autres éléments potentiellement constitutifs de la phase solide collectée, en particulier des phosphates. La concentration de cuivre libérée par 1Cu à 28 jours (9.10^{-5} mol/L) reste inférieure à la limite théorique de cytotoxicité de $1,6.10^{-4}$ mol/L pour des fibroblastes [529], mais pas celle libérée par 5Cu qui vaut 5.10^{-4} mol/L, engendrant une probable diminution de la viabilité cellulaire dans des essais *in vitro*. L'augmentation importante de la concentration de Cu^{2+} aux premiers temps d'évolution (durant le 1er jour) peut également créer un environnement hostile pour les cellules. De surcroit, une étude *in vitro* sur des ciments phospho-calciques dopés avec du cuivre a montré qu'une libération cumulée de Cu^{2+} de 0,20 mg/L soit $3,2.10^{-6}$ mol/L dans un milieu de tampon TRIS-HCl réduisait déjà de manière importante la viabilité cellulaire après 7 jours d'incubation [539]. Il est donc probable que les *a*Cu ne soient pas cytocompatibles, en particulier 5Cu qui libère en milieu plus complexe des quantités trop élevées de cuivre.

III.3.4 Poudres dopées avec du zinc *a*Zn

Les poudres 1Zn et 5Zn ne montrent sur leur diffractogramme DRX (Figure 3.40a) aucun pic de diffraction, les composés sont donc restés amorphes en milieu SBF pendant 4 semaines (à la différence des composés ayant évolué dans l'eau, Figure 3.40b).

Les spectres d'absorption infrarouge (Figure 3.31b) ont la même évolution que celle décrite pour les poudres précédentes : les bandes relatives aux groupements carbonate diminuent en intensité tandis que celles des ions phosphate augmentent, témoignant potentiellement d'une précipitation d'une phase CaP amorphe.

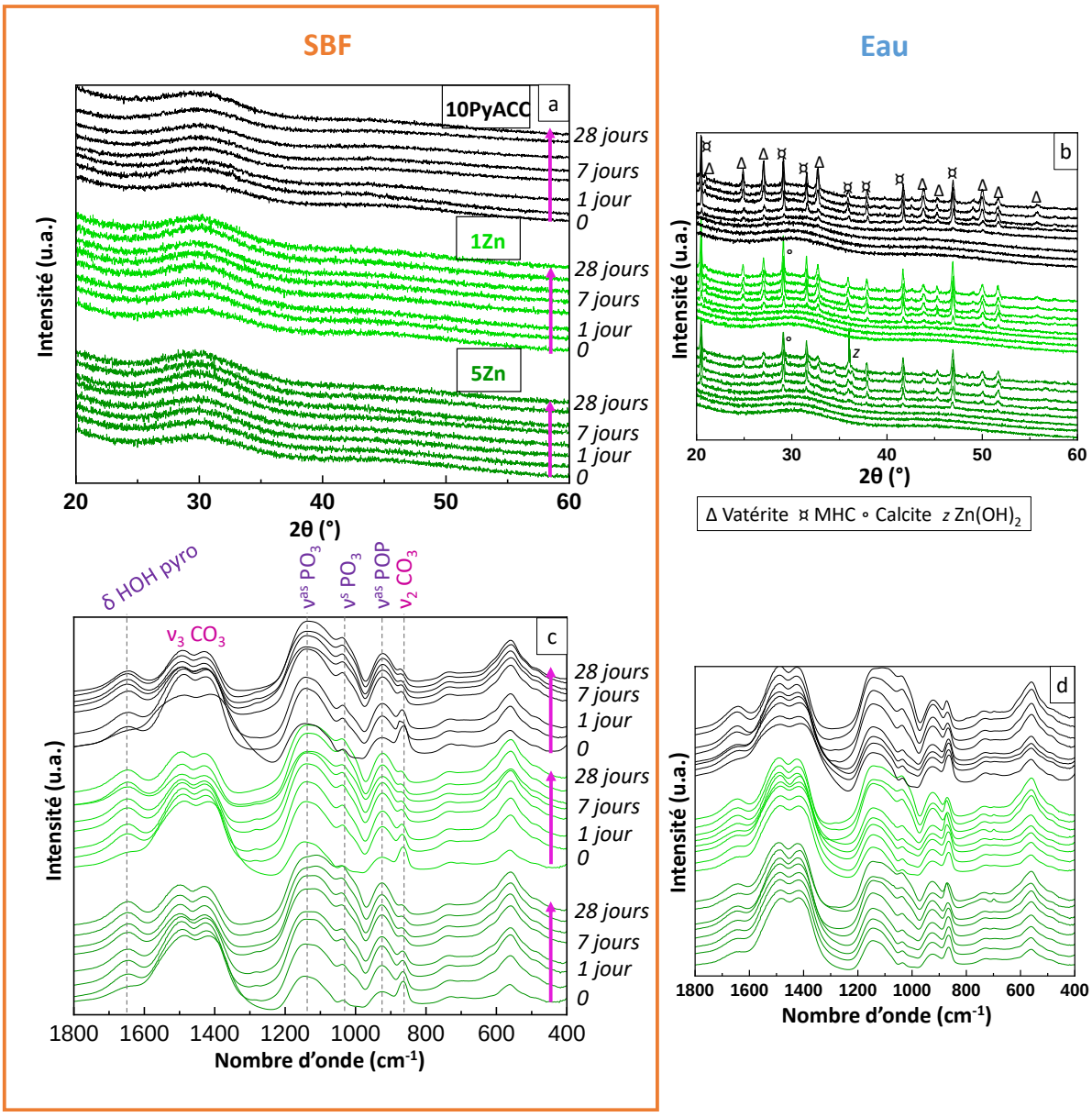


Figure 3.40 :. Diffractogrammes RX (a,b) et spectres d'absorption infrarouge (c,d) de la poudre de référence 10PyACC et des poudres dopées avec du zinc 1Zn et 5Zn ayant évolué entre 6 h et 28 jours dans le SBF (a,c) en comparaison avec ceux dans l'eau (b,d). Les symboles Δ , ◦, ¤ et z sur les diffractogrammes représentent respectivement la vatérite, la calcite, la MHC et l'hydroxyde de zinc $Zn(OH)_2$.

Les images MEB sur la Figure 3.41 ne montrent pas non plus de différences par rapport à ce qui a déjà été décrit, la morphologie des agrégats granulaires de l'amorphe étant conservée dans la poudre dopée 5Zn pendant l'évolution dans le SBF.

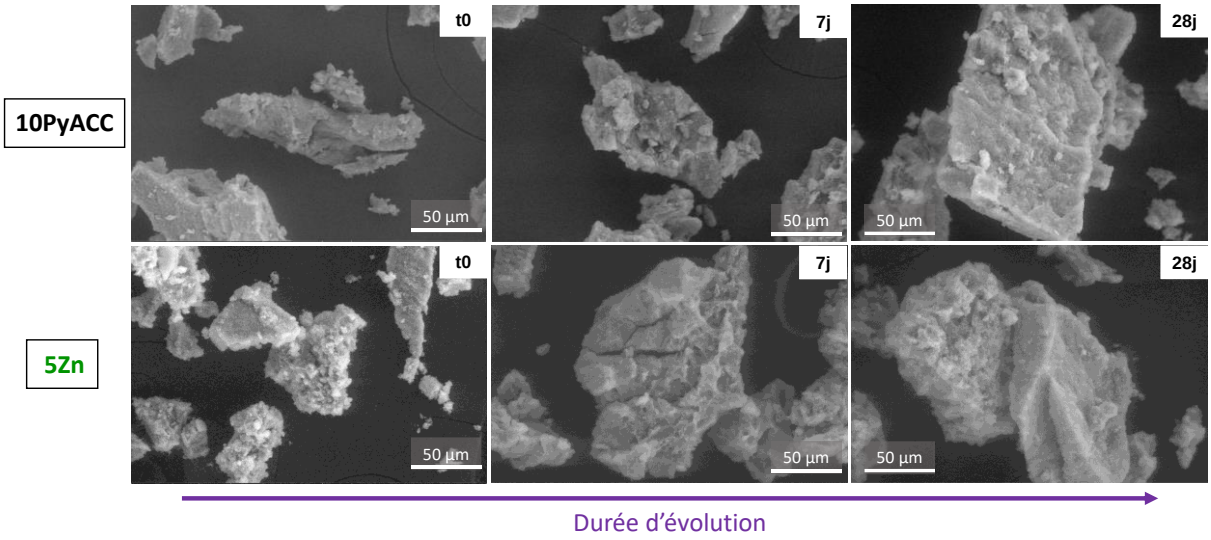


Figure 3.41 : Images MEB des poudres de 10PyACC et 5Zn initiales (gauche) et après 7 jours (milieu) et 28 jours (droite) d'évolution dans le SBF, au grossissement x 500.

Sur la Figure 3.42a, la perte de masse initiale associée à la dissolution de l'amorphe est plus marquée pour 1Zn que pour 5Zn (et pour la référence 10PyACC) : la masse collectée diminue très rapidement de 6 h à 1 jour et commence à se stabiliser à partir du 3ème jour à - 56 % jusqu'au 21ème jour, après lequel la masse augmente de nouveau à - 53 %. Pour 5Zn, l'augmentation initiale de la perte de masse est plus progressive et a lieu jusqu'au 7ème jour, elle se stabilise jusqu'au 21ème jour (le pic à 14 jours est très probablement lié à une perte de poudre avant la pesée donc non significatif), puis la masse collectée diminue de nouveau légèrement à 28 jours à sa valeur finale de - 60 %. Du fait des incertitudes, les fluctuations entre les deux derniers points ne sont probablement pas significatives. Comme dans le cas du cuivre, les pertes de masse dans le SBF sont 2 à 2,5 fois plus élevées que celles dans l'eau (tracées en transparence sur la Figure 3.42a).

Le pH des filtrats présenté sur la Figure 3.42c augmente légèrement avec l'évolution et vaut 8,0 pour 28 jours d'évolution, comme avec les autres dopants Sr et Cu.

La proportion de calcium libéré (Figure 3.42b, valeurs brutes sur la Figure AIII.5d) augmente rapidement pour les durées les plus courtes puis se stabilise à partir de 3 jours pour 1Zn et 7 jours pour 5Zn, valeur maximale de libération pour ce dernier, égale à 30,6 $\pm$ 0,4 % soit (2,26 $\pm$ 0,03).10^{-4} mol pour 100 mg de poudre. La proportion libérée par 1Zn continue d'augmenter légèrement vers sa valeur finale, de 18,4 $\pm$ 0,2 % soit (1,37 $\pm$ 0,01).10^{-4} mol, alors que celle de 5Zn diminue légèrement jusqu'à 29,0 $\pm$ 0,5 % soit (2,14 $\pm$ 0,03).10^{-4} mol / 100 mg à 28 jours. Ces quantités sont proches de celles libérées dans l'eau par 1Zn mais 2 fois plus élevées pour 5Zn (ces dernières étant tracées en transparence sur la Figure 3.42b).

L'évolution de la proportion de zinc (Figure 3.42d) est plus problématique à examiner. En effet, ces pourcentages sont négatifs, ce qui signifie que plus de zinc a été dosé dans les poudres 1Zn et 5Zn après évolution dans le SBF qu'elles n'en contenaient initialement. Cela pourrait être envisageable s'il y avait une incorporation progressive d'un ion de la solution dans l'amorphe. Mais ici le SBF préparé ne contient pas de zinc, donc cette explication n'est pas valable. Une des pistes d'explication est la

mauvaise quantification par spectroscopie d'absorption atomique de la concentration de zinc dans les poudres du fait de l'incorporation d'un autre ion (Mg^{2+} par exemple) dans celles-ci, dont la raie d'émission se superposerait à celle du zinc et exacerberait la réponse, surestimant l'absorbance. Nous n'avons pour l'instant pas eu le temps de résoudre ce problème (voir Annexe AIII.5).

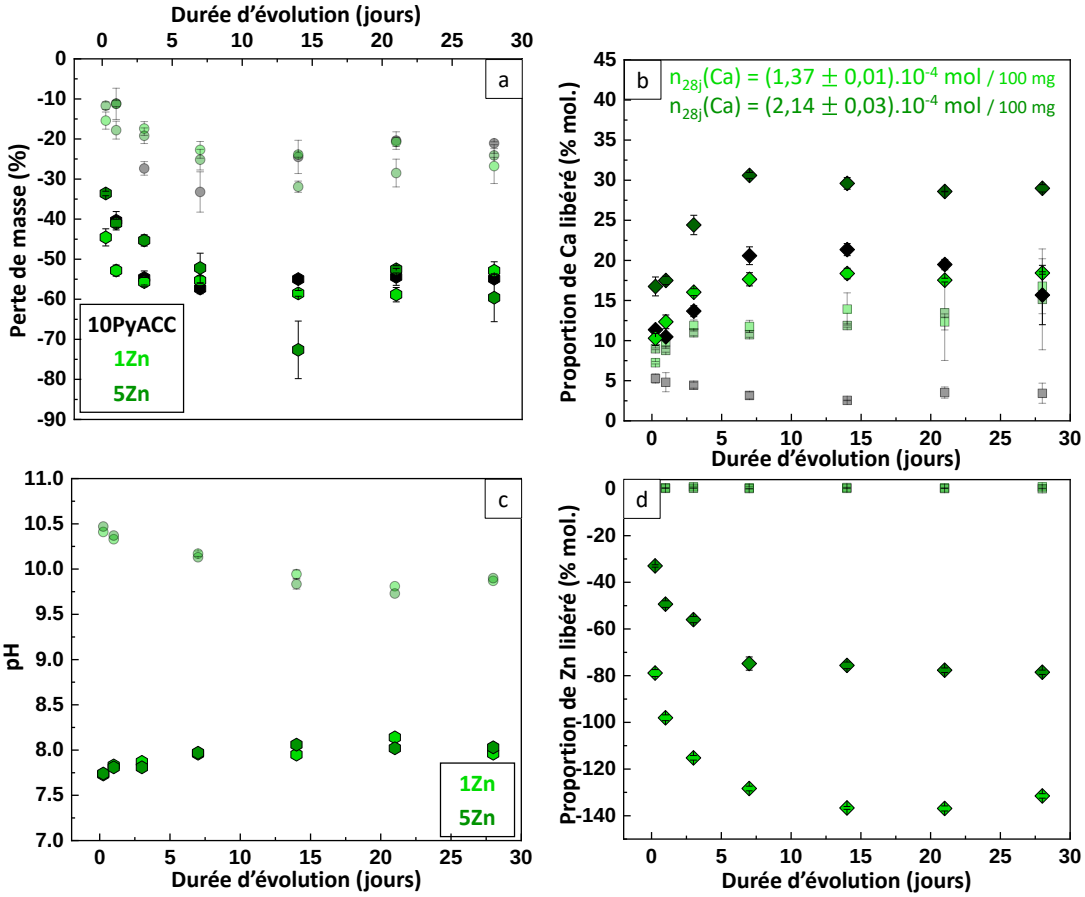


Figure 3.42 : Pertes de masse (a), évolution du pH des filtrats (c), et proportions de calcium (b) et de zinc (d) libérés (% mol. par rapport à la quantité initiale) en fonction de la durée d'évolution des poudres 10PyACC et dopées 1Zn et 5Zn dans le SBF (pentagones et losanges) et dans l'eau (cercles et carrés en transparence). Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondant aux écarts-types.

Les pertes de masse montrent une dissolution rapide de l'amorphe, exacerbée dans le SBF et encore plus rapide pour 1Zn. Ces pertes plus élevées sont corrélées avec une plus grande libération de Ca^{2+} dans la solution, un peu plus élevée que pour les autres dopants, et une augmentation légère du pH liée à la protonation des anions issus de la dissolution de l'amorphe. Il est difficile de comprendre les phénomènes en jeu pour les cations Zn^{2+} avec des valeurs des dosages faussées par des erreurs de quantification. Néanmoins, on peut suggérer en se basant sur les évolutions dans l'eau un comportement similaire à celui des poudres *a*Cu. La phase solide contenant du zinc, probablement associé à des hydroxydes et des ions carbonate dans la poudre initiale, serait dissoute rapidement dans les premiers temps de l'essai, libérant des ions Zn^{2+} en grande quantité, qui resteraient en solution ou précipiteraient avec un ou plusieurs des ions contenus dans la solution SBF. La perte de masse initiale plus élevée pour 1Zn semble témoigner d'une dissolution plus rapide, mais pourtant non associée à une libération plus importante d'ions Ca^{2+} : il pourrait donc y avoir un « burst effect » dose-dépendant pour la libération des ions Zn^{2+}, comme ce qui avait été observé dans l'eau.

III.3.5 Récapitulatif des tendances principales des évolutions dans le SBF des poudres de PyACC non dopées ou dopées

Pour récapituler cette partie III.3, les essais d'évolution ont été conduits dans un milieu plus complexe, mimant les concentrations ioniques présentes dans le plasma sanguin (solution SBF). La dissolution de l'amorphe PyACC dopé ou non y est exacerbée, entre autres par le biais d'échanges ioniques entre les ions contenus dans la solution SBF et ceux de PyACC. La formation de phases cristallines est en grande partie ou totalement empêchée, du fait de la présence de forts inhibiteurs de cristallisation ioniques. En ce qui concerne les poudres de 10PyACC dopées avec du strontium, ces ions sont libérés de manière continue et prononcée pendant une semaine, ce qui est corrélé à la dissolution de la poudre initiale et la libération de Ca^{2+}, le tout sans « burst effect » et avec des concentrations *a priori* non cytotoxiques. Les ions cuivre eux sont libérés très rapidement et en quantité très importante, probablement du fait de la grande solubilité dans le SBF des composés mixtes $Cu/OH/CO_3$ dans lesquels ils sont intégrés initialement. Le « burst effect » ainsi créé et les quantités élevées de Cu^{2+} libérés pourraient engendrer une réponse cytotoxique au contact avec des cellules. Quant au zinc, les problèmes expérimentaux de quantification ne permettent de faire que des hypothèses sur l'évolution des *a*Zn dans le SBF : les poudres libéreraient de manière importante (et accrue pour 1Zn) des ions Zn^{2+} aux premiers temps de l'essai, en raison de la structuration de ces ions dans des composés $Zn/OH/CO_3$ dans les poudres initiales qui auraient une grande solubilité dans le SBF. Comme dans le cas du dopage au cuivre, le « burst effect » pourrait avoir un effet néfaste *in vitro*, mais probablement moins marqué que pour Cu car ce dernier a un seuil de toxicité plus bas (*cf.* Tableau 3.2).

Il est important de relever que la formation d'apatite n'a pas été observée ici, et ce malgré la sursaturation de la solution de SBF vis-à-vis de l'apatite, connue pour promouvoir sa formation (en particulier sur des échelles de temps si longues). En effet, il est possible qu'une phase amorphe de CaP ait précipité durant l'évolution mais de manière minoritaire et surtout sans cristallisation subséquente, qui aurait été visible sur les différents diffractogrammes RX. La présence d'ions pyrophosphate (même en faibles quantités) associés à des ions carbonates, tous deux étant de forts inhibiteurs de la formation d'apatite [242,245], pourrait en être l'origine.

III.4 Conclusion sur les essais d'évolution dans l'eau et le SBF des poudres 10PyACC dopées et non dopées

Durant cette partie III nous avons cherché à comprendre et à quantifier les mécanismes de dégradation et reprécipitation/cristallisation en jeu en étudiant l'évolution dans l'eau ou le SBF des matériaux de référence 5PyACC et 10PyACC et de ces matériaux dopés avec 1 ou 5 % de strontium, cuivre ou zinc. Dans l'eau, le pyrophosphate stabilise l'ACC qui reste amorphe plus longtemps. Il cristallise ensuite préférentiellement en vatérite ou en calcite monohydratée par dissolution-reprécipitation, la formation de la calcite étant inhibée par le pyrophosphate. Nous avons montré que la libération des cations d'intérêt, calcium et strontium, cuivre ou zinc n'est pas similaire selon les ions, en raison de leur différence de répartition au sein du 10PyACC et de la potentielle structuration des poudres dopées. Dans l'eau le strontium est libéré en plus grande quantité que les autres dopants (cuivre et zinc), qui eux forment des composés stables d'hydroxydes et carbonates. Dans le SBF, la formation d'apatite est inhibée par les deux composants clés des PyACC : les ions carbonate et pyrophosphate. Les évolutions sont distinctes de celles dans l'eau. En effet, la présence d'autres ions dans le milieu SBF catalyse la dissolution de l'ACC, avec probablement une substitution des Ca^{2+} du PyACC par d'autres cations comme Mg^{2+}. Les ions Sr^{2+} sont libérés dans le milieu et restent sous forme ionique, tout

comme les Cu^{2+} qui sont libérés en quantité très élevée, probablement en raison de la solubilité dans le SBF de la phase dans laquelle ils sont intégrés. Pour le zinc, l'interprétation des résultats de libération n'a pas pu être effectuée, mais le comportement est probablement similaire à celui du cuivre.

Le dosage de la concentration d'ions calcium libérés a donné des valeurs similaires pour les échantillons 10PyACC et les dopés *a*Sr, *a*Cu et *a*Zn, entre 1,0 et 1,3 mM dans l'eau et 1,1 et 2,3 mM dans le SBF. Selon Lauth *et al.* [109] et Maeno *et al.* [540], une concentration de Ca^{2+} entre 2 et 4 mM est adaptée à la prolifération des ostéoblastes. Une concentration plus grande, entre 6 et 8 mM, pourrait même favoriser leur différenciation et la minéralisation dans des cultures cellulaires, mais une concentration supérieure à 10 mM est cytotoxique. Les libérations de calcium obtenues ici sont donc adaptées à des applications *in vitro* et *in vivo*, avec une marge de sécurité dans le cas où les libérations *in vivo* seraient supérieures à celles observées dans le SBF. Pour les dopants, leur libération se fait de manière prolongée sur 4 semaines, à des doses *a priori* adéquates pour conférer et/ou contrôler une activité biologique, à l'exception de 5Cu dans le SBF (supérieur au seuil de cytotoxicité). Pour tester les propriétés de libération de ces poudres dans un milieu encore plus proche du milieu physiologique, l'étude dans un milieu cellulaire est nécessaire.

Ces études d'évolution ne sont pas totalement exhaustives, et présentent quelques limitations liées principalement au manque de temps et au nombre conséquent d'échantillons à caractériser. Tout d'abord, la quantification des phases cristallines issues des diffractogrammes RX n'est pas précise car plusieurs paramètres sont ajustés manuellement (et donc avec potentiellement des erreurs d'appréciation). Il aurait été plus judicieux d'utiliser une analyse semi-quantitative comme la méthode PONKCS par exemple, quantifiant la proportion de phase amorphe à partir de l'aire du fond continu après un étalonnage par un mélange mécanique en proportions connues d'amorphe et de phases cristallines [541] couplée à un affinement Rietveld lorsque des phases cristallines étaient présentes. La méthode appliquée dans notre étude permet néanmoins une comparaison qualitative entre échantillons. De surcroît, la compréhension des mécanismes mis en jeu lors des évolutions fait appel à de nombreuses hypothèses, en particulier dans le cas des évolutions dans le SBF. Il aurait été intéressant de réaliser des dosages des autres éléments présents dans les solides, en particulier des ions orthophosphate et pyrophosphate, pour expliciter leur rôle dans les dissolutions-reprécipitations. La répartition des différentes espèces chimiques aurait également pu être clarifiée en réalisant de manière systématique des dosages sur les solides et sur les filtrats conjointement pour chaque échantillon (ce qui n'a pas été effectué ici devant le nombre conséquent d'échantillons), ou avec des techniques plus avancées comme la RMN en phase solide pour analyser la/les phase(s) amorphe(s) en présence.

IV EVALUATION *IN VITRO* DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES DIFFERENTES POUDRES PYACC SYNTHETISEES

L'étude de l'évolution dans deux milieux aqueux des poudres PyACC dopées ou non a mis en lumière des mécanismes de dissolution des poudres et de libération des ions actifs. Cependant, même si le SBF mime les concentrations ioniques contenues dans le plasma humain, les comportements *in vitro* peuvent différer de par la présence de protéines, pouvant par exemple cliver les ions pyrophosphate et ainsi modifier les compositions ioniques. De plus, les libérations d'ions peuvent être exacerbées ou au contraire limitées dans certains milieux de culture, créant des conditions néfastes à la viabilité et/ou à la prolifération cellulaire. Pour appréhender cela, des essais *in vitro* de cytocompatibilité et d'évaluation des capacités de biominéralisation ont été effectués sur les poudres de référence 5PyACC et 10PyACC ainsi que sur les poudres dopées 1Sr, 5Sr, 1Cu, 5Cu, 1Zn et 5Zn. Ces essais ont été réalisé à l'Institute of Physiological Chemistry de l'University Medical Center de la Johannes Gutenberg University Mainz (Allemagne), en collaboration avec l'équipe du Pr. W. Müller et lors d'un séjour de 6 semaines que j'ai réalisé en février 2022 dans le cadre d'un mobilité internationale soutenue par l'EUR NanoX.

IV.1 ETAT DE L'ART SUR LES ESSAIS *IN VITRO*

Parmi les études démontrant la cytocompatibilité des ACC, certaines revêtent un intérêt particulier car se rapprochant de notre cadre d'étude. Par exemple, le groupe du Pr. Müller a montré la viabilité de cellules ostéogéniques humaines d'ostéosarcome (SaOS-2) et de cellules humaines mésenchymateuses en contact avec un ACC stabilisé par un polyphosphate (polyP) d'environ 20 unités phosphate (et contenant de la vatérite en petites proportions), ainsi que l'expression du gène de la phosphatase alcaline (PAL), marqueur de la formation osseuse [110]. En plus de la cytocompatibilité des cellules, ils ont mis en évidence dans des essais *in vivo* une amélioration de la régénération cellulaire de zones lésées liée à la libération de Ca^{2+} associée à celle de CO_3^{2-} (issues de la dissolution de l'ACC) et de PO_4^{3-} (par clivage du polyP) [110,396]. La cytocompatibilité d'autres polymorphes de $CaCO_3$ a été attestée, pour des particules de vatérite de 0,5 – 1 µm de diamètre sur des ostéoblastes humains (MG-63) et des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) [400]. Des mélanges de calcite et vatérite synthétisés à différentes températures sont aussi cytocompatibles pour des cellules pré-ostéoblastiques (MC3T3-E1), les particules de vatérite de plus petite taille augmentant jusqu'à 7 fois la production d'hydroxyapatite par les cellules [99]. Différentes morphologies de variétés polymorphes de $CaCO_3$ ont également montré une non-cytotoxicité sur des cellules d'ostéoblastes humains (HOB) : des nanoparticules de calcite, et des particules submicroniques ou micrométriques de vatérite [109]. Cependant dans cette étude l'ACC étudié diminuait la viabilité cellulaire à cause de la libération du PAA le stabilisant, toxique pour les cellules. Aucune étude *in vitro* n'a été trouvée sur des ACC dopés avec des ions bioactifs comme le strontium, le cuivre ou le zinc. Néanmoins, de nombreux articles font état d'essais cellulaires sur des phosphates de calcium dopés, montrant une cytocompatibilité pour des ciments de CaP dopés avec du strontium [390,542], une prolifération et différenciation des ostéoblastes sur des revêtements d'hydroxyapatite dopée au zinc [444], ou des propriétés pro-angiogéniques pour des hydroxyapatites ou ciments CaP dopés au cuivre [539,543]. Le taux de dopage est un paramètre important pour les essais *in vitro*, car une quantité trop importante d'ions métalliques libérée ou une libération incontrôlée peut induire une toxicité du matériau [450], mais la morphologie des matériaux ainsi que le type de cellules utilisées et le type de tests peuvent aussi influer sur la viabilité cellulaire [496].

IV.2 IMPACT DE LA STERILISATION SUR LES POUDRES D'ACC DOPEES

Avant toute implantation et essais *in vitro* ou *in vivo*, il est nécessaire de stériliser les matériaux utilisés. En effet, ceux-ci ne sont pas synthétisés dans des conditions stériles, et peuvent donc contenir des micro-organismes, entraînant une diminution de la viabilité cellulaire ou pouvant induire une infection associée à l'implant. Au niveau des dispositifs médicaux, la stérilisation par rayonnement gamma est la plus utilisée (entre autres car elle est celle qui chauffe le moins les échantillons) et elle se réalise avec un équipement spécifique et en milieu industriel. Elle consiste en l'irradiation des matériaux par une source de rayons gamma (désintégration d'une source radioactive de cobalt 60), particulièrement pénétrants et donc traversant la totalité de l'échantillon et de son conditionnement. Ces rayons altèrent les fonctions vitales des micro-organismes et induisent donc leur mort. En accord avec la norme ISO 11137-3 : 2017 pour la stérilisation du matériel médical, les poudres ont été irradiées à une dose de 25 kGy. Pour chaque type d'échantillons, 5 lots d'environ 100 mg ont été stérilisés, et l'un des 5 a été caractérisé *a posteriori* par DRX et spectroscopie FTIR, afin de s'assurer que cette étape ne modifie pas la structure des poudres.

Les diffractogrammes RX et spectres d'absorption infrarouge résultants (identifiés après stérilisation par un indice *s*) sont comparés aux échantillons initiaux sur la Figure 3.43. Les diffractogrammes RX montrent que la structure amorphe a été conservée pour toutes les compositions de poudres stérilisées par rayons gamma. On peut cependant noter un léger décalage du halo amorphe, dont le maximum est à environ 30 ° avant et environ 31 ° après stérilisation. Ce léger décalage vient très probablement de l'utilisation de porte-échantillons moins profonds pour les poudres après stérilisation (en raison de la faible quantité de poudre disponible), surélevant un peu la poudre et créant ainsi un décalage vers les plus petits angles. Ce déplacement avait déjà été obtenu après irradiation par M. Desbord lors de ses travaux de thèse sur des composés phosphocalciques amorphes [261]. Les spectres infrarouges quant à eux sont identiques avant et après stérilisation, confirmant le fait que les différences notées par DRX proviennent de la technique de caractérisation et du porte-échantillon (indépendamment de la nature de la poudre) et non de l'irradiation gamma.

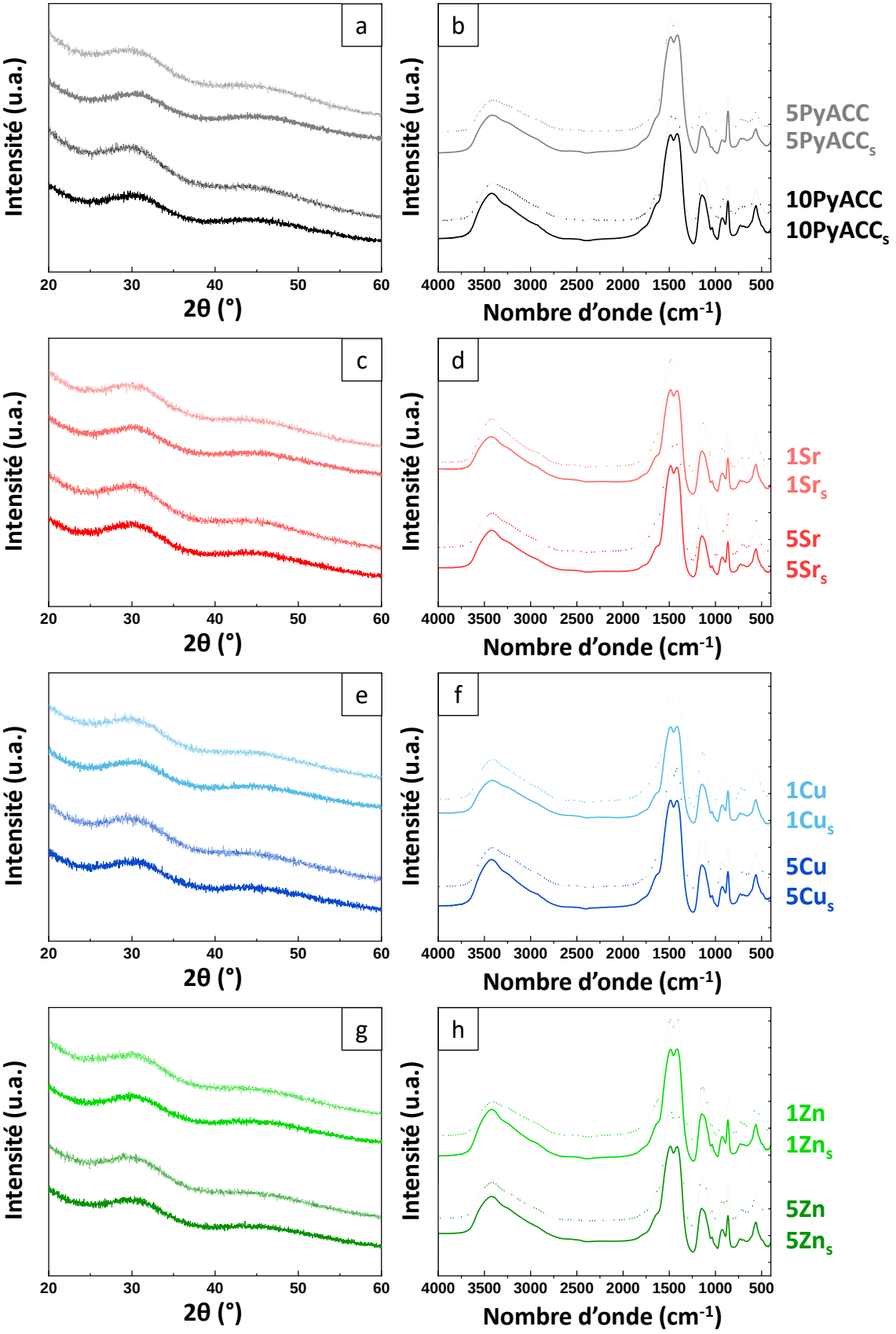
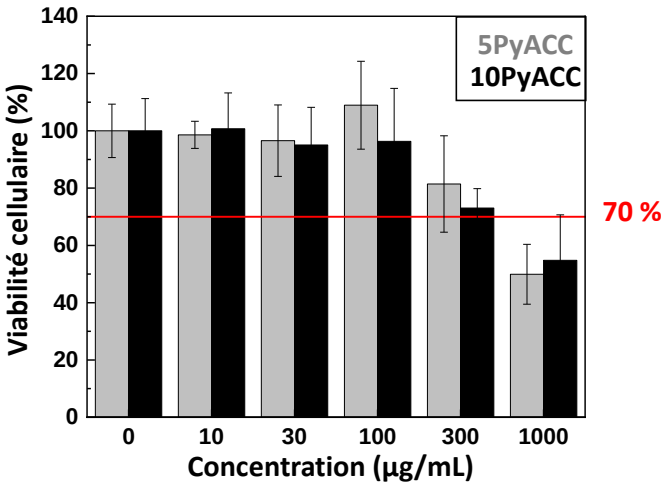


Figure 3.43 : Comparaison des diffractogrammes RX (a, c, e, g) et des spectres infrarouges (b, d, f, h) avant (tracé en ton plus clair) et après (tracé en ton plus foncé) la stérilisation par rayonnement gamma (25 kGy), pour les poudres de référence 5PyACC et 10PyACC (a, b) et les poudres 10PyACC dopées avec 1 % ou 5 % de strontium (c, d), cuivre (e, f) ou zinc (g, h).

IV.3 Evaluation de la cytocompatibilite des differentes poudres amorphes synthetisees

La cytocompatibilité des poudres de référence 5PyACC et 10PyACC et des poudres 10PyACC dopées 1Sr, 5Sr, 1Cu, 5Cu, 1Zn et 5Zn est évaluée en mesurant la viabilité de cellules de fibroblastes d'embryons de souris (lignée 3T3) [v] en contact avec des suspensions contenant différentes concentrations de poudre. Pour cela, pour chaque type de poudre (stérilisée au préalable comme expliqué ci-dessus) une suspension à 10 mg/mL est préparée en conditions stériles dans le milieu de culture des cellules (RPMI + 10 % de sérum fœtal de veau (FCS)). La dispersion des particules est améliorée par ultrasons. Puis cette suspension est diluée successivement avec le même milieu de culture pour former des suspensions à 3 mg/mL, 1 mg/mL, 0,3 mg/mL et 0,1 mg/mL. En parallèle de cela, une suspension de cellules 3T3 dans le milieu RPMI + 10 % de FCS, à laquelle est ajoutée 2,5 µg/mL de gentamycine comme antibiotique, est mise en culture, avec une densité cellulaire de 10 000 cellules par mL. La plaque d'essais cellulaires est ensuite préparée, en ajoutant 180 µL de la suspension de cellules dans chacun des 96 puits de culture, puis 20 µL de la suspension de poudre à tester (à 10 ; 3 ; 1 ; 0,3 ou 0,1 µg/mL) dans les puits, avec un total de 9 puits pour chaque concentration à tester. Pour le groupe contrôle, 20 µL du milieu de culture RPMI + 10 % FCS sont ajoutés. Après trois jours d'incubation à 37 °C et sous 5 % de CO_2, la viabilité cellulaire est évaluée en mesurant la fluorescence à 590 nm après ajout du réactif PrestoBlue dans les puits. Ce réactif est constitué d'une solution de réazurine, molécule de couleur bleu nuit qui après avoir pénétré dans une cellule vivante est réduite de manière irréversible en résorufine, de couleur rose et fortement fluorescente. Il a l'avantage de ne pas nécessiter d'incubation longue, par rapport par exemple au test classique MTT à base de sels de tétrazolium, tout en conservant une meilleure efficacité selon Xu *et al.* [544]. Le pourcentage de viabilité cellulaire est ensuite calculé en divisant l'absorbance mesurée par celle du puits de contrôle (sans cellule). Une poudre est définie dans la norme ISO 10993-5 comme non cytotoxique quand la viabilité cellulaire est supérieure à 70 % [545], c'est pourquoi cette valeur a été mise en évidence par une ligne rouge sur les graphiques présentant les résultats.

La Figure 3.44 montre les résultats des essais de cytocompatibilité des poudres de référence 5PyACC et 10PyACC. Jusqu'à une concentration de 100 µg/mL, la viabilité cellulaire est très bonne, autour de 100 % pour les deux compositions. Elle commence à diminuer à 300 µg/mL à 81 ± 16 % et 73 ± 7 % pour 5PyACC et 10PyACC respectivement, puis chute sous la limite de viabilité à 1000 µg/mL, à 50 ± 10 % (5PyACC) et 55 ± 16 % (10PyACC).



[v] Cellules choisies en accord avec la norme ISO 10993-5 sur l'évaluation biologique des dispositifs médicaux.

Figure 3.44 : Viabilité cellulaire après 3 jours d'incubation de cellules 3T3 en contact avec les poudres de référence 5PyACC et 10PyACC à des concentrations entre 10 et 1000 µg/mL.

Les Figures 3.45a, 3.45b, 3.45c présentent les résultats pour les poudres dopées avec du strontium, du cuivre et du zinc respectivement. Le dopage au strontium améliore la viabilité des cellules en contact avec les poudres *α*Sr, en particulier pour les concentrations plus élevées, à 300 µg/mL (79 $\pm$ 9 % pour 1Sr et 86 $\pm$ 5 % pour 5Sr) et 1000 µg/mL (70 $\pm$ 15 % pour 1Sr et 73 $\pm$ 12 % pour 5Sr). Pour le cuivre c'est l'opposé, la viabilité est fortement diminuée par l'introduction de cuivre dans les poudres, elle diminue sous le seuil de cytocompatibilité dès 100 µg/mL pour 5Cu (38 $\pm$ 7 %), et à 300 µg/mL pour 1Cu (54 $\pm$ 10 %), et elle est très faible à 100 µg/mL, égale à 8 $\pm$ 9 % et 6 $\pm$ 3 % pour 1Cu et 5Cu respectivement. La cytocompatibilité des poudres est exacerbée par le dopage au zinc, qui conserve une très bonne viabilité cellulaire même pour les concentrations de poudres les plus élevées (94 $\pm$ 20 % pour 1Zn et 101 $\pm$ 9 % pour 5Zn à 1000 µg/mL).

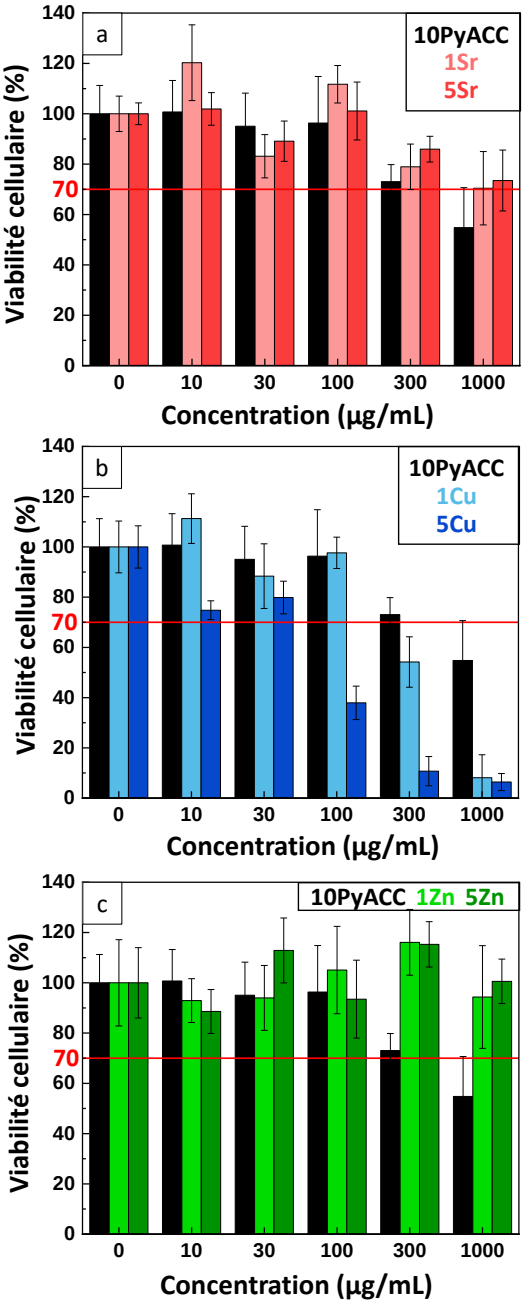


Figure 3.45 : Viabilité cellulaire après 3 jours d'incubation de cellules 3T3 en contact avec les poudres 10PyACC dopées 1Sr, 5Sr (a), 1Cu, 5Cu (b) et 1Zn, 5Zn (c), comparées à la poudre de référence 10PyACC (tracée en noir), à des concentrations entre 10 et 1000 µg/mL.

Pour conclure, les poudres de référence 5PyACC et 10PyACC présentent une bonne cytocompatibilité pour des concentrations inférieures à 300 µg/mL. Celle-ci est améliorée par l'introduction d'ions zinc et d'ions strontium dans une moindre mesure, ce qui déjà été montré pour des échantillons de brushite dopées [450]. Pour le cuivre, à une concentration supérieure à 100 µg/mL les poudres dopées sont cytotoxiques. Cela peut être lié à la présence du complexe basique de carbonate de cuivre, toxique pour les cellules [546], ou à la forte libération d'ions cuivre dans le milieu par 5Cu entre autres, ce qui avait été mis en évidence lors de son évolution dans le SBF dans la partie III.3.3.

IV.4 EVALUATION DES PROPRIETES DE BIOMINERALISATION DES POUDRES SYNTHETISEES

Afin de qualifier les propriétés de biominéralisation (ou propriétés ostéogéniques) des cellules en présence des poudres dopées, l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) a été mesurée, cette enzyme étant un indicateur de la formation osseuse et un marqueur des ostéoblastes [547,548]. Pour cela, une lignée de cellules humaines d'ostéosarcome (SaOS-2) a été utilisée, celles-ci étant caractéristiques de l'activité ostéogénique et vasculogénique *in vitro* [549]. De plus, cette lignée est bien caractérisée, elle est disponible en grande quantité et les cellules se différencient de la même manière que les ostéoblastes, en faisant un modèle approprié pour cette étude [550,551]. Après des essais préliminaires et pour permettre une meilleure homogénéisation des poudres dans les suspensions, celles-ci sont broyées manuellement au mortier, puis suspendues dans un milieu de culture McCoy's 5A + 10 % de FCS à une concentration de 10 mg/mL. Les poudres sont dispersées dans un bain à ultra-sons pendant 10 minutes, puis les solutions sont diluées dans le même milieu à une concentration de 100 µg/mL. Celle-ci a été choisie d'après les tests de cytotoxicité précédents, car c'est la plus haute concentration n'impactant pas ou peu la viabilité cellulaire pour toutes les compositions (hormis 5Cu). A chaque suspension fille (de concentration de 100 µg/mL) un cocktail d'activation de minéralisation (CAM) est ajouté, contenant du dexaméthasone, de l'acide ascorbique et du β-glycérophosphate, permettant d'induire la biominéralisation [110]. Une suspension de cellules SaOS-2 est préparée dans le milieu McCoy's 5A + 10 % FCS et avec 2,5 µg/mL de gentamycine (antibiotique) à une densité de 30 000 à 60 000 cellules par mL, puis 500 µL de cette suspension sont ajoutés dans chacun des puits d'une plaque de 48 puits de culture qui sont incubés pendant 1 jour à 37 °C et 5 % de CO_2. Ensuite le milieu de culture est remplacé par 500 µL de suspension de poudre préalablement préparée, à raison de 4 puits par composition de poudre testée et avec 8 puits de contrôle, contenant chacun 500 µL de milieu McCoy's + 10 % FCS + CAM. Les milieux cellulaires sont extraits et remplacés avec la même composition de solution (et donc une nouvelle suspension de poudre) après 2 jours d'incubation. Puis après 5 jours supplémentaires d'incubation, la protéine PAL est extraite à froid. Afin de quantifier son activité, un réactif de p-nitrophényl phosphate (pNPP) est ajouté aux extraits cellulaires, réactif clivé par la PAL en p-nitrophénol (pNP), de couleur jaune et pouvant être dosé à 405 nm. Le contenu total en protéines est aussi dosé grâce au réactif de Bradford à 595 nm. Le calcul de l'activité de la PAL est effectué en divisant la quantité de pNP dosée par la quantité totale de protéines.

Sur la Figure 3.46 sont comparées les activités de la PAL pour le contrôle (cellules sans poudre) et les échantillons 5PyACC et 10PyACC. Malgré des incertitudes élevées, liées au fait que ces essais n'ont pu être réalisés que sur deux plaques cellulaires par manque de temps, il est possible de noter que dans les puits contenant les poudres de *z*PyACC, l'activité de la PAL est plus grande que sans *z*PyACC. Il n'y a par contre que peu de différences entre les deux poudres de référence 5PyACC et 10PyACC, la seconde contenant pourtant le double de pyrophosphate par rapport à la première. L'ion pyrophosphate étant clivé par la PAL *in vitro* et *in vivo*, on aurait attendu une activité plus élevée pour 10PyACC, associée de plus à une dissolution exacerbée de l'amorphe carbonate alors moins stabilisé. Cependant les quantités de pyrophosphate relativement faibles dans les deux compositions 5PyACC et 10PyACC et les écarts-types très élevés sur les mesures pourraient expliquer que ce ne soit pas le cas. De plus, le comportement de cet ion pendant l'évolution en milieu aqueux et/ou cellulaire du PyACC n'a pas été caractérisé et est donc méconnu, il est alors difficile d'anticiper l'évolution de la poudre *in vitro* en contact avec la PAL. L'effet positif du pyrophosphate pourrait enfin n'être visible que pour des échelles de temps plus longues (supérieures à une semaine), l'incubation n'ayant eu lieu que pendant 7 jours ici.

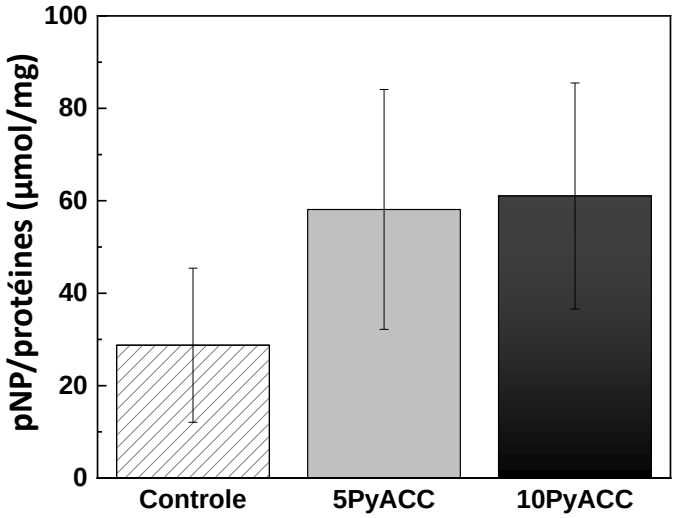


Figure 3.46 : Activité de la PAL (mesurée par la quantité de pNP par rapport à la quantité totale de protéines) pour les poudres de référence 5PyACC et 10PyACC, comparée au contrôle sans poudre.

Les essais de biominéralisation pour les poudres dopées sont présentés sur la Figure 3.47, avec les comparaisons au contrôle et à la poudre non dopée 10PyACC. Pour le strontium (Figure 3.47a), les poudres dopées 1Sr et 5Sr augmentent l'activité de la PAL par rapport au contrôle mais elle reste inférieure à celle de la poudre non dopée 10PyACC. Dans le cas du cuivre (Figure 3.47b), même si la concentration choisie (en accord avec les essais de cytocompatibilité) ne diminue pas la viabilité des cellules sous le seuil des 70 % pour 1Cu, l'activité de la PAL est nettement inférieure à celle de 10PyACC et même plus basse que le contrôle, et c'est aussi le cas pour 5Cu. Enfin, pour les poudres dopées au zinc (Figure 3.47c), l'activité de la PAL est supérieure à la référence 10PyACC pour les deux compositions 1Zn et 5Zn.

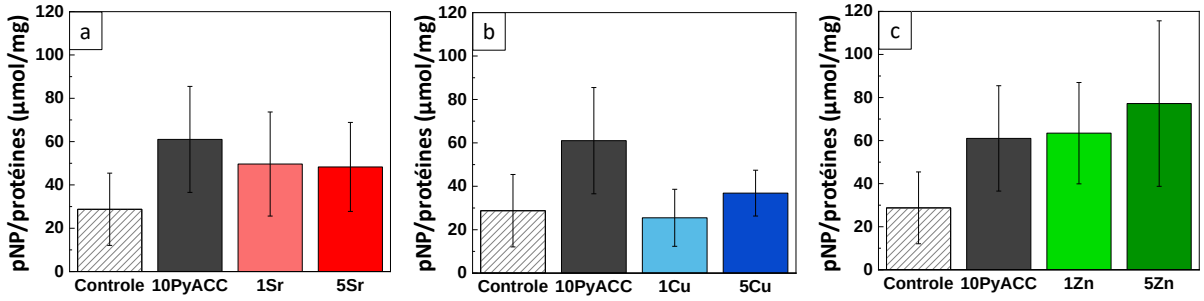


Figure 3.47 : Activité de la PAL pour les poudres dopées au strontium (a), au cuivre (b) et au zinc (c) comparée au contrôle sans poudre et à la poudre de référence 10PyACC.

A partir des résultats de ces essais de biominéralisation, il apparaît que les poudres dopées au zinc ont le meilleur potentiel d'induction de la minéralisation osseuse pour des cellules de type ostéoblastes, et ce malgré les potentielles libérations rapides aux premiers temps d'évolution suggérées par les essais dans le SBF (partie III.3.4). L'augmentation de l'activité de la PAL par le zinc a été confirmée par Lakhkar *et al.* [19] pour le même type de cellules ainsi que sur des cellules pré-ostéoblastiques (MC3T3-E1). Même s'il est difficile de conclure à partir de ces résultats préliminaires, on peut supposer sans trop de risques que les quantités d'ions bioactifs libérées jouent un rôle sur les propriétés bioactives des poudres : les ions strontium, possédant comme les ions zinc des propriétés ostéogéniques, auraient un impact moindre sur la biominéralisation *in vitro* dans les poudres dopées *a*Sr du fait de leur plus faible libération dans des milieux complexes comme le SBF. Ces résultats seraient à confirmer

par d'autres essais, car les tests préliminaires effectués ici comportent plusieurs biais. En effet, les poudres sont dispersées dans le milieu de culture par ultrasons, sur des durées relativement longues (10 min). Bien qu'ici la puissance soit modérée, cet apport d'énergie couplé au broyage manuel préalable de la poudre libère très probablement dans le milieu une fraction des ions constitutifs des poudres (Ca^{2+}, CO_3^{2-}, $P_2O_7^{4-}$, dopants M^{2+}), augmentant de manière importante les concentrations initiales dans le milieu, qui peuvent alors dépasser les niveaux d'efficacité ou seuils de cytotoxicité pour les cellules. D'autre part, le protocole de mesure de la quantité de protéines ici n'a pas pu être optimisé par manque de temps, et l'écart des durées d'incubation entre les premiers puits auxquels est ajouté le réactif et les derniers est significatif et peut avoir un impact sur la coloration et ainsi l'absorbance mesurée. Enfin, pour changer le milieu de culture après deux jours d'incubation (nécessaire pour permettre aux cellules de poursuivre leur prolifération), la suspension de poudre a été retirée pour être remplacée par une nouvelle. Des variabilités peuvent provenir de cette étape, car toute la poudre n'est pas forcément retirée, et la suspension prélevée n'est pas stable car les particules ont tendance à sédimenter. Les concentrations peuvent donc être hétérogènes entre les puits pour la même composition. En addition à ces optimisations de la méthodologie, il serait également intéressant d'analyser l'activité de la PAL pour des plus longues durées d'incubation, afin de corréler le comportement *in vitro* et les libérations suivies en milieux aqueux, et ainsi mieux anticiper le comportement des poudres en milieu physiologique, *i.e. in vivo.*

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

De nouvelles poudres amorphes de 10PyACC dopées avec différentes proportions de strontium, cuivre ou zinc ont été synthétisées avec succès de la même manière que les zPyACC. Les caractérisations montrent une conservation de la structure amorphe dans tous les cas, avec de surcroît une stabilisation supplémentaire en température pour les poudres dopées avec du strontium, ainsi qu'une intégration quantitative des dopants. Les poudres dopées avec du cuivre et du zinc ont une plus grande proportion d'eau, du fait de l'électropositivité de ces ions. En se basant sur le modèle d'organisation du 10PyACC décrit dans le chapitre précédent et à partir de l'ensemble des caractérisations effectuées, nous avons suggéré une organisation des dopants : les ions Sr^{2+} seraient substitués dans le cluster proto-vatérite et associés aux ions carbonate ; tandis que les ions Cu^{2+} et Zn^{2+} seraient plutôt localisés en périphérie, autour des clusters au sein d'une couche d'eau structurale dense, probablement sous forme $CuCO_3.Cu(OH)_2$ et $Zn_5(CO_3)_2(OH)_6$ respectivement.

Les essais d'évolution dans l'eau ont confirmé la stabilisation des amorphes liée à la présence du pyrophosphate et qu'elle est corrélée à la quantité d'ions pyrophosphate associés à la poudre : 10PyACC est plus stable en solution aqueuse que 5PyACC. La variété polymorphe issue de la dissolution-reprécipitation du 10PyACC dépend des dopants et de la composition de la solution d'évolution. Les vitesses de libération des cations diffèrent également, en accord avec les différences de répartition de ceux-ci au sein des clusters : le strontium est libéré en plus grande quantité dans l'eau que le cuivre ou le zinc, qui sont sous forme stable associés aux hydroxydes et carbonates. La libération des ions bioactifs (Ca^{2+} et ions dopants) est prolongée pendant 4 semaines, avec peu ou pas de « burst effect » observé dans les premiers jours et *a priori* une non-cytotoxicité. La présence d'ions dans la solution de SBF modifie les évolutions des 10PyACC dopés, et exacerbe leur dissolution, se traduisant par des pertes de masses supérieures et des ions dopants libérés en proportion plus élevée que dans l'eau pure. Il est probable qu'une phase amorphe phosphocalcique précipite dans un deuxième temps, sans avoir pu plus précisément l'identifier.

Les études *in vitro* ont montré la cytocompatibilité de toutes les poudres synthétisées sur une lignée de fibroblastes de souris pour des concentrations modérées. Quand la concentration augmente, le zinc confère une meilleure viabilité cellulaire aux poudres de PyACC, le strontium améliore peu par rapport à celle de la poudre de référence 10PyACC tandis que les poudres dopées au cuivre sont cytotoxiques à plus hautes concentrations. L'activité de la phosphatase alcaline (PAL), enzyme marqueur de la formation osseuse, est accrue en présence des poudres dopées au zinc, signe d'un potentiel ostéogénique marqué.

Les caractérisations et tests d'évolution dans deux milieux aqueux ainsi que les essais *in vitro* sur les PyACC dopés mettent en évidence le potentiel de ces poudres comme substituts osseux, avec une dissolution rapide et une libération ionique pouvant être modulée par la quantité de pyrophosphate et d'ions dopants et sur des durées prolongées (plusieurs semaines). La proportion de dopant est à ajuster pour certaines compositions (entre autres à diminuer pour le cuivre, cytotoxique pour les plus fortes concentrations). De plus, aucun dosage n'a été effectué pour connaître la quantité de pyro- et/ou orthophosphates dans les solides ou en solution, ce qui est un enjeu à la fois pour comprendre les évolutions se déroulant dans les milieux aqueux mais aussi d'un point de vue biologique, le pyrophosphate étant clivé par le PAL. En ce qui concerne les matériaux, il serait intéressant de caractériser plus finement leur structure, d'une part pour connaître la composition des complexes formés entre les dopants et les hydroxydes lors de la synthèse, et d'autre part pour comprendre si l'incorporation des dopants dans les 10PyACC (le cas échéant) modifie le modèle de cluster proposé au chapitre précédent. Pour cela, des dosages plus exhaustifs pourraient être réalisés et le même type de stratégie de caractérisation multi-technique et multi-échelle que celle présentée dans le chapitre 2 pourrait être mise en œuvre, à savoir avec SAXS, WAXS, et RMN du solide, associées à d'autres techniques adaptées pour analyser l'environnement local des ions dopants, comme par exemple l'EXAFS.

Les propriétés ostéogéniques ont été peu caractérisées, pour une seule concentration et une seule durée d'incubation. En plus de faire varier ces paramètres, il serait nécessaire d'étudier en supplément l'expression des gènes associés à la néoformation osseuse et à la différenciation ostéoblastique des cellules en contact avec les poudres dopées, en particulier pour les poudres dopées au zinc, ayant les propriétés les plus prometteuses. Les propriétés pro-angiogéniques pouvant être conférées par le cuivre n'ont pas non plus été évaluées ici, tout comme les propriétés antibactériennes potentielles (Cu^{2+}, Zn^{2+}).

CHAPITRE 4. VERS LA MISE EN FORME DE SCAFFOLDS MACROPOREUX PAR FREEZE-CASTING A PARTIR DE POUDRES COMPOSITES DE PYACC

Comme décrit dans le Chapitre 1, l'os est un matériau composite constitué de collagène et d'apatite, et présentant une porosité anisotrope. Créer des matériaux composites avec des charges inorganiques renforçant une matrice polymérique et une porosité orientée est un enjeu essentiel du développement de substituts osseux. Pour cela, plusieurs types de polymères peuvent être utilisés, bio-sourcés ou synthétiques. Parmi eux, l'alginate est un polymère de choix, biocompatible et facile à solubiliser dans l'eau. D'autre part, les poudres de PyACC, caractérisées précédemment et biocompatibles, peuvent apporter le renfort nécessaire à une augmentation des propriétés mécaniques, tout en libérant lors de leur dissolution ou évolution des ions constitutifs de l'apatite osseuse et ainsi conférer des propriétés ostéogéniques aux matériaux. De plus, la porosité anisotrope de l'os est fondamentale pour permettre la colonisation cellulaire et l'angiogenèse : le substitut osseux doit donc avoir une porosité mimétique et définie. Les caractéristiques de porosité visées sont une taille de pores entre 150 µm et 500 µm [53] avec des pores orientés et interconnectés, ainsi que des propriétés mécaniques permettant la manipulation par la chirurgienne ou le chirurgien sans destruction de la porosité (avec pour visée des sites osseux non porteurs).

Afin de répondre à ce cahier des charges, nous avons eu pour objectif dans cette étude de synthétiser par co-précipitation *in situ* des poudres composites d'alginate-PyACC, afin d'assurer un enchevêtrement à l'échelle nanométrique des chaînes de polymère et des particules minérales, et ainsi de conférer une cohésion mécanique aux matériaux ensuite élaborés à partir de ces poudres. Plusieurs techniques permettent l'obtention de matériaux poreux, comme la lixiviation de particules (*solvent casting/particle leaching*), basée sur l'utilisation d'agents porogènes [552], ou la fabrication additive [553]. Cependant celles-ci ne permettent pas l'obtention d'une porosité anisotrope (pour la première) et les propriétés des scaffolds élaborés peuvent être limitées par les propriétés physiques des composants ou des paramètres techniques (comme la largeur de la buse, pour la seconde) [49]. De plus, elles ne sont pas forcément adaptées à des phases métastables hydratées. Le freeze-casting, qui consiste en la congélation d'un solvant contenant des particules et/ou des polymères solubilisés suivie de sa sublimation, laissant place à des pores de morphologie et dimensions similaires à celles des cristaux de solvant, est une des techniques les plus prometteuses pour la substitution osseuse. En effet, elle permet de contrôler la taille, le volume et la forme des pores (par le biais du choix du solvant et du gradient de température imposé), avec des solvants totalement biocompatibles comme l'eau. Elle a été choisie ici pour l'élaboration des poudres composites sous forme de scaffolds alginate/PyACC de porosité orientée.

Dans ce chapitre, seront d'abord détaillées la synthèse de la poudre composite Alg-PyACC, sa caractérisation, son évolution en milieu aqueux et en milieu cellulaire. Elles seront suivies d'un état de l'art sur les paramètres influant sur la porosité formée par le procédé de freeze-casting et les techniques de caractérisation de celle-ci, puis d'une présentation du dispositif de freeze-casting mis en place ainsi que la formulation des suspensions utilisées. Les scaffolds obtenus avec différents taux de charge seront ensuite caractérisés, via leur composition en premier lieu, puis leur porosité sera quantifiée par plusieurs techniques complémentaires, et enfin le lien sera fait entre le taux de charge et les propriétés mécaniques.

I SYNTHESE ET CARACTERISATION D'UN MATERIAU COMPOSITE ALGINATE-PYACC

Les poudres de PyACC peuvent être mises en forme pour élaborer des matériaux massifs pour la reconstruction osseuse. Mais pour donner de la cohésion entre ces particules de céramique et mimer la structure mixte organique-inorganique du tissu osseux, l'ajout d'un polymère est un élément clé. La précipitation *in situ* peut permettre d'assurer une proximité à l'échelle nanométrique entre les chaînes du polymère, ici l'alginate, et les particules, ici de PyACC.

I.1 L'ALGINATE POUR LA SUBSTITUTION OSSEUSE

L'alginate est un polysaccharide naturel issu d'algues brunes. Le polyanion, base conjuguée de l'acide alginique, est composé d'une séquence linéaire représentée sur la Figure 4.1a de deux blocs de monomères, l'α-L-guluronate (G) et le β-L-mannuronate (M), différant stéréochimiquement au niveau du carbone C5 [554] (* rouge sur la Figure 4.1a) et reliés par la liaison 1-4. Les blocs homopolymériques MM sont liés de manière équatoriale, créant une portion relativement linéaire, tandis que les blocs GG sont liés par les groupes axiaux et forment une chaîne en boucle [554]. Les deux sont alternés avec des blocs MG [555], le ratio M/G n'étant pas fixe. L'alginate peut être chélaté avec des ions multivalents, causant la précipitation du complexe alginate-cation et par conséquent la formation de gels réticulés ioniquement (aussi appelés gels chimiques bien que réversibles [556]). Les cations divalents (Ca^{2+}, Ba^{2+}, Sr^{2+}) se lient essentiellement aux blocs GG, et leur affinité dépend entre autres de leur rayon ionique et coordinence, tandis que les trivalents, comme La^{3+}, interagissent avec les blocs GG et MM [557,558]. Cela conduit à la formation d'une structure en « cage d'œufs » (*egg-box*), illustrée sur la Figure 4.1b, formant une cavité hydrophile dans laquelle le cation est lié aux atomes d'oxygène des groupes carboxyliques de charge négative des chaînes d'alginate l'entourant. Les réseaux tridimensionnels ainsi créés sont fortement hydratés, avec des contenus en eau supérieurs à 95 % [557]. Ils présentent de plus le grand avantage de pouvoir réticuler dans des plages de températures très larges.

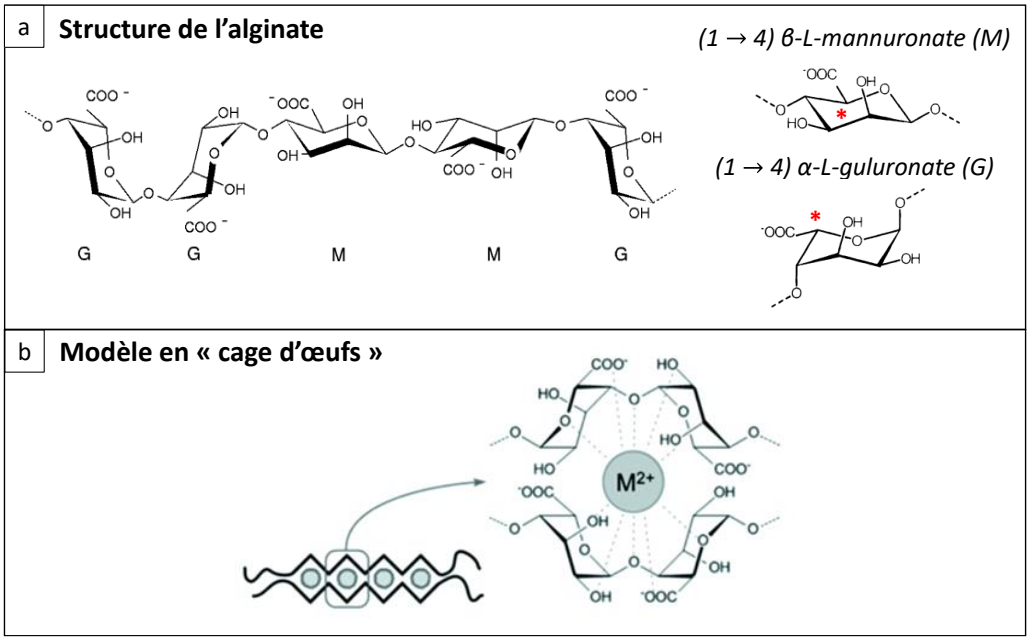


Figure 4.1 : Structure chimique de l'alginate, composé de blocs d'α-L-guluronate (G) et de β-L-mannuronate (M), différant stéréochimiquement au niveau du carbone C5 repéré par l'astérisque rouge (a) et représentation schématique de l'association en « cage d'œufs » lors de sa gélification ayant lieu entre les blocs G des molécules d'alginate après chélation par des ions métalliques divalents (M^{2+}) (b). Adapté de Y. Qin [554], Sergeeva et al. [557], et Sikorski et al. [559].

Les gels d'alginate de calcium en particulier sont cytocompatibles à la différence de ceux formés avec d'autres cations pouvant induire une toxicité pour les cellules [557]. Le calcium se lie préférentiellement avec les unités G, les propriétés structurales et la formation du gel sont donc fortement influencées par le ratio de blocs G, même s'il a été montré que les blocs MG participent aussi aux liaisons [557,560], et confèrent avec les blocs M de la flexibilité au réseau résultant [561].

La gélification peut être externe, en mettant en contact direct l'alginate et l'agent réticulant, qui diffuse dans la phase liquide d'alginate et le réticule au fur et à mesure, formant des particules de gel [557,558]. Cette méthode présente l'inconvénient d'hétérogénéités dans la réticulation, causées par un gradient de concentration des Ca^{2+} et donc un gradient de réticulation. Pour pallier à cela, des alginates à masses moléculaires élevées ou l'utilisation de solutions tamponnées, avec par exemple des phosphates entrant en compétition avec l'alginate pour la complexation par le calcium, peuvent être utilisés [557]. Au contraire, la gélification *in situ* (ou interne) s'affranchit de ces problèmes d'inhomogénéités, avec une source de Ca^{2+} répartie dans la solution d'alginate et qui se dissout lentement dans le milieu, laissant diffuser de manière plus continue et homogène les cations chélatés par les chaînes d'alginate environnantes [557].

Les propriétés de l'alginate sont modifiées selon la conformation du polymère. Néanmoins, il est souvent utilisé pour sa très bonne biocompatibilité et sa facilité de solubilisation dans l'eau, dépendante du pH. Les constantes de dissociation (pKa) des groupes carboxylique valent 3,65 et 3,38 pour les blocs G et M respectivement [557], le pH doit donc être supérieur à ces valeurs pour que l'alginate se dissolve. Un pH très faible cause la précipitation des chaînes d'alginate, mais un gel peut être formé à pH neutre et basique (qui sera cependant plus visqueux pour un pH supérieur à 8) [558]. La vitesse de dégradation des gels d'alginate peut être modulée par la présence d'ions extérieurs s'échangeant avec l'ion chélatant [558].

Les propriétés viscoélastiques des alginates sont similaires à celles de la matrice extracellulaire et procurent une protection aux cellules incorporées. Cependant, ils manquent de résistance mécanique et de propriétés d'ostéoinduction ou de bioactivité. Par conséquent, associer l'alginate dans une structure composite est une voie intéressante pour moduler les propriétés des matériaux, comme leur porosité, biodégradabilité, activité biologique ou résistance mécanique [562].

I.2 SYNTHESE DU MATERIAU COMPOSITE ALGINATE-PYACC ET CARACTERISATION

Afin d'assurer une cohésion et une proximité à l'échelle nanométrique entre les particules de PyACC et l'alginate, la synthèse est réalisée par co-précipitation *in situ.* Cela a déjà été décrit dans la littérature, en particulier avec des carbonates et phosphates de calcium [555,563].

I.2.1 Etat de l'art des composites alginate-particules inorganiques synthétisés *in situ*

Les synthèses de composites alginate-CaP ou alginate-CC avec une précipitation *in situ* ont été décrites et utilisées dans la littérature, en général pour étudier l'influence du polymère sur la cristallisation des composés et/ou la forme des cristaux obtenus. Des exemples de gélification externe de l'alginate, avec solubilisation de l'alginate dans la solution contenant les sels de carbonate ou phosphate de calcium et précipitation/gélification par mélange avec une solution de calcium sont cités. C'est le cas pour des particules d'hydroxyapatite, dont la taille est réduite quand elles sont précipitées dans un réseau d'alginate, par l'accumulation de Ca^{2+} à proximité des groupes carboxylate dans la structure en cage d'œufs, augmentant localement la sursaturation et formant de nombreux sites de nucléation pour les particules inorganiques et ainsi de plus petites particules [555,564]. Les analyses par spectroscopie FTIR ont confirmé cela, avec la mise en évidence de liaisons entre le calcium et les groupements carboxylate

de l'alginate et entre les groupes hydroxyde de l'alginate et les particules minérales [565,566]. Pour les carbonates de calcium, le principe est le même, et la structuration de l'alginate favorise une nucléation sur des sites confinés [555]. Les cristaux obtenus sont dispersés dans le gel [567] ou des agrégats fibreux granulaires sont obtenus [555], selon la concentration en alginate. Il a été montré que l'alginate agit comme stabilisateur des clusters de pré-nucléation des carbonates de calcium, et stabilise des ACC proto-cristallins (différents selon le pH) [555]. Pour une concentration élevée d'alginate, le polymère s'adsorbe sur les sites actifs de croissance et bloque la cristallisation [560].

D'autres exemples font état d'une gélification interne de l'alginate, induite par une lente diffusion, soit de Ca^{2+} libérés par des microparticules de $CaCO_3$ dissoutes progressivement par la diminution de pH provenant de la lente hydrolyse de la D-glucono-δ-lactone (GDL) [563] ; soit par la diffusion de CO_2 dans une solution d'alginate réticulé par Ca^{2+}, le calcium précipitant avec des ions carbonate formés et libérant petit à petit les chaînes d'alginate [568].

I.2.2 Protocole de synthèse *in situ*

Le protocole de synthèse a été adapté à partir de celui développé pour les poudres de PyACC (Chapitre 2 : I). 0,500 g ou 1,000 g d'alginate sont solubilisés à chaud dans la solution anionique, qui est ensuite refroidie et dont le pH est ajusté à environ 12, puis elle est versée rapidement dans la solution cationique. Le précipité formé est récupéré par centrifugation, à la différence des synthèses de PyACC pour lesquelles la filtration sous vide était utilisée (car l'alginate bouche les pores des filtres et rend l'étape de filtration beaucoup trop longue). Après lavage, les gels sont collectés et lyophilisés 48 h. Les poudres récupérées sont nommées 10Alg-10PyACC et 20Alg-10PyACC respectivement, en raison des deux masses initiales d'alginate environ égales à 10 % et 20 % mass. de la poudre finale (en estimant qu'au total environ 5 g de poudre composite sont récupérés). Les abréviations 10Alg et 20Alg (pour 10Alg-10PyACC et 20Alg-10PyACC respectivement) seront souvent utilisées dans la suite du chapitre.

Les poudres sont ensuite caractérisées par DRX, BET, MEB, spectroscopie FTIR, ATG et dosages chimiques, caractérisations présentées dans la partie suivante.

I.2.3 Caractérisation

L'alginate commercial (Sigma-Aldrich, W201502) utilisé lors de la synthèse a d'abord été caractérisé par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) à l'Institut de Chimie de Toulouse. Les résultats issus de cette analyse sont présentés dans le Tableau 4.1. La masse molaire M_n est relativement élevée, tout comme la dispersité Đ (égale au ratio M_w / M_n), ce qui signifie que la taille des chaînes de polymère est assez variée.

Tableau 4.1 : Masse molaire moyenne en nombre (Mn), en poids (Mw) et dispersité Đ de l'alginate commercial utilisé dans la synthèse des poudres composites Alg-PyACC, issues des analyses SEC.

ECHANTILLON	$\mathbf{M_n}$ (g.mol^{-1})	$\mathbf{M_w}$ (g.mol^{-1})	**Đ**
ALGINATE	34 620	105 000	3,03

Ensuite, les poudres 10Alg et 20Alg ont été caractérisées par plusieurs techniques, dont la DRX et la spectroscopie infrarouge. Leurs diffractogrammes RX (Figure 4.2a) montrent seulement le halo caractéristique des poudres amorphes, attestant que les adaptations de la synthèse et la présence d'alginate n'ont pas impacté l'absence d'ordre global des composés synthétisés. Les spectres d'absorption infrarouge de 10Alg et 20Alg, sur la Figure 4.2b, sont très similaires à celui de la poudre de référence 10PyACC. On peut quand même noter un décalage de la bande à 1650 cm^{-1} de 10PyACC

vers les plus petits nombres d'ondes (1620 cm^{-1}) pour les poudres composites (10Alg et 20Alg). Cet épaulement est attribué aux vibrations OH du pyrophosphate pour 10PyACC. Mais les groupements COO^- de l'alginate, présents dans les composites 10Alg et 20Alg, vibrent de manière asymétrique et créent une bande entre 1610 et 1618 cm^{-1} [566]. Celle-ci est déplacée vers les plus faibles nombres d'onde lors des interactions avec le calcium des particules de 10PyACC, expliquant le déplacement de l'épaulement (en précisant que la bande visible pour 10Alg et 20Alg est une combinaison des deux bandes OH et COO^- citées au-dessus). De plus, la bande large de maximum à 3420 cm^{-1}, attribuée aux OH, est mieux définie et plus intense lorsque l'alginate est introduit dans la synthèse, signe de la formation de liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyde de l'alginate et les particules de 10PyACC [566].

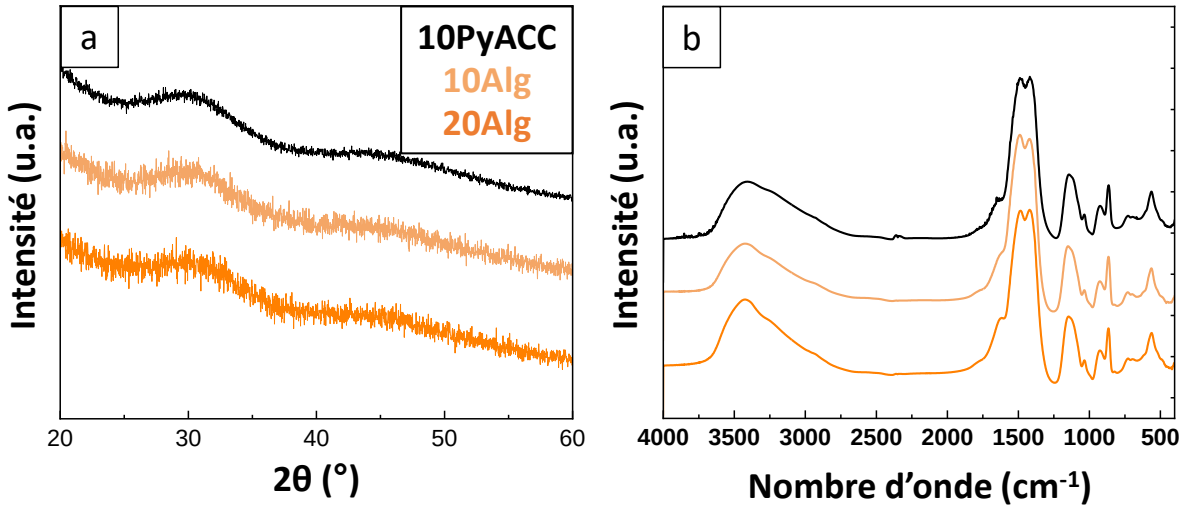


Figure 4.2 : Diffractogrammes RX (a) et spectres d'absorption infrarouge (b) de la poudre de référence 10PyACC et des poudres composites 10Alg et 20Alg.

Les courbes ATG-ATD, présentées sur la Figure 4.3, renseignent sur les quantités d'eau et d'alginate ainsi que les principaux évènements thermiques. En effet, sur les thermogrammes Figure 4.3a, la première perte de masse entre 25 °C et 220 °C correspond à la perte d'eau adsorbée en surface et à l'eau fortement liée (eau pseudo-structurale), et la proportion massique d'eau contenue peut en être extraite. Un pic endothermique, entre 50 et 160 °C, y est associé (Figure 4.3b). Une deuxième perte de masse a lieu pour 10Alg et 20Alg, entre 220 °C et 410 °C, qui peut être reliée à la décomposition de l'alginate, ayant lieu entre 200 et 280 °C pour l'alginate de sodium et de calcium, et formant des résidus organiques déshydroxylés et décarboxylés ainsi que Na_2CO_3 ou $CaCO_3$ [569–571]. Ceci est en accord avec les pics exothermiques intenses visibles en ATD, à 244 °C pour 10Alg et 260 °C pour 20Alg. Le deuxième pic exothermique, à 370 °C et 382 °C pour 10Alg et 20Alg respectivement peut être lié à la cristallisation de l'ACC en calcite, qui se retrouve aussi pour 10PyACC mais à une température plus haute (432 °C), car la chélation du calcium par l'alginate peut déstabiliser les particules d'ACC. Enfin, la perte de masse finale provient de la formation de CaO, de Na_2O et de résidus carbonés, elle vaut à 800 °C - 40,2 % et - 43,6 % pour 10Alg et 20Alg respectivement (et - 36,7 % pour 10PyACC), le composite contenant le plus d'alginate perdant plus de masse lors de la calcination de la phase organique. Un pic endothermique est associé à cette perte de masse. Aucun pic exothermique n'est observé aux alentours de 600 °C, comme c'est le cas lors de la calcination du carbonate de sodium Na_2CO_3 formé par la décomposition des chaînes d'alginate de sodium [572–574]. Cela pourrait indiquer que le lavage effectué lors de la synthèse a été efficace et a retiré la grande majorité des ions sodium introduits avec

l'alginate, ou alors que les ions Na^+ présents dans le composite ne sont pas liés à l'alginate et sont stables jusqu'à 800 °C.

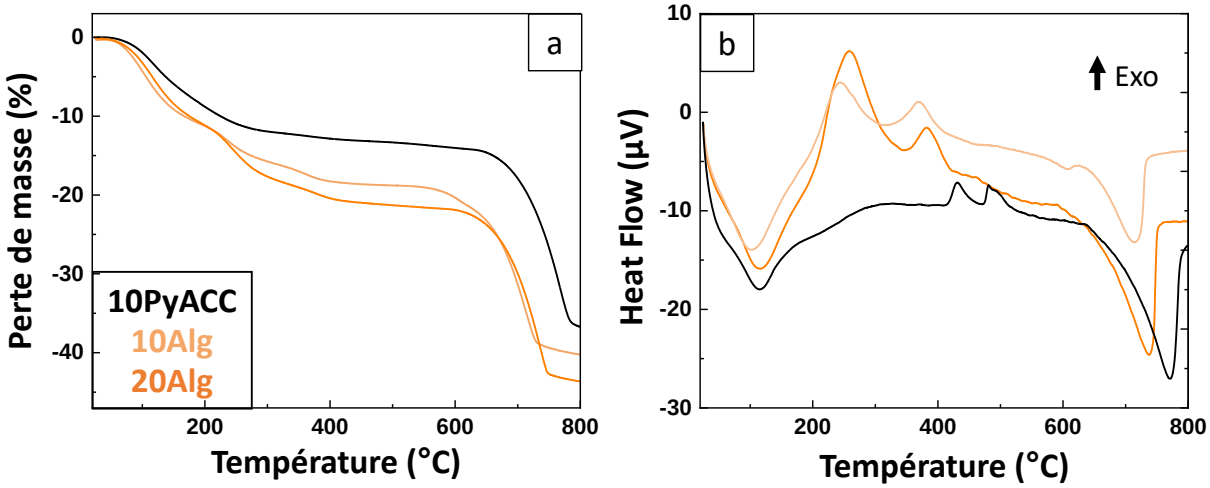


Figure 4.3 : Courbes ATG (a) et ATD (b) de la poudre de référence 10PyACC et des poudres composites 10Alg et 20Alg. Analyses réalisées avec une rampe de 7 °C/min et sous circulation d'air.

Les proportions massiques d'eau et d'alginate estimées par ATG sont reportées dans le Tableau 4.2, contenant aussi les valeurs des nombres de moles de calcium, carbonate et pyrophosphate issues des dosages par spectrométrie d'absorption atomique, coulométrie à CO_2 et spectroscopie dans le visible d'un complexe coloré, respectivement. Celles-ci ont été normalisées et sont exprimées pour 100 mg de poudre, et le ratio pyrophosphate/carbonate a été calculé. La proportion d'alginate contenue dans les poudres composites n'est pas proportionnelle à la quantité introduite : elle vaut 7,7 ± 1 % pour 10Alg et 10,3 ± 2 % pour 20Alg. La co-précipitation s'effectuant en défaut de calcium, il est possible que des chaînes d'alginate non réticulées, ne gélifient pas, ne forment pas de liaisons avec le précipité de PyACC, et restent solubilisées dans le surnageant évacué après la centrifugation. Une autre explication possible vient de la méthode de quantification de cette proportion, qui se base sur l'hypothèse que deux pertes de masses d'eau et d'alginate sont bien distinctes en ATG. Or ce n'est pas forcément le cas, du fait des liaisons hydrogène entre les chaînes d'alginate et l'eau ainsi que de l'eau interne aux particules de PyACC, évaporée à plus hautes températures. Les proportions d'eau sont légèrement inférieures pour les composites (11 ± 2 %) que pour 10PyACC (14 ± 2 %) mais dans la marge des barres d'erreur. Les quantités de calcium, carbonate et pyrophosphate diminuent quand la quantité d'alginate augmente : ceci est lié à la normalisation pour 100 mg de poudre, l'alginate de masse molaire élevée influant beaucoup sur la masse finale des composites. C'est concordant avec des rapports molaires pyrophosphate/carbonate assez similaires, entre 13,8 ± 0,4 % pour 10PyACC et 12,8 ± 0,4 % et 12,6 ± 0,4 % pour 10Alg et 20Alg respectivement. La légère diminution notée ici vient potentiellement de la gêne stérique induite par l'alginate, limitant l'accès aux Ca^{2+} pour les anions CO_3^{2-} et $P_2O_7^{4-}$ et donc la précipitation. La similarité des rapports molaires suggère aussi que la compétition entre anions est d'abord favorable aux ions pyrophosphate (comme décrit dans le Chapitre 2 : II.2 pour 10PyACC) puis aux ions carbonate, la chélation du calcium par l'alginate étant défavorisée du fait de sa taille importante et de la gêne stérique occasionnée. La quasi-totalité du calcium s'associe alors aux $P_2O_7^{4-}$ et CO_3^{2-}, ce qui n'est donc pas opposé au modèle expérimental proposé pour les clusters de PyACC dans le Chapitre 2 : IV.2, d'autant plus qu'il a été montré que l'alginate agit comme stabilisateur des clusters de pré-nucléation et permettrait donc l'obtention d'ACC proto-cristallin [555].

Tableau 4.2 : Composition chimique de la poudre de référence 10PyACC et des poudres composites 10Alg et 20Alg : pourcentages massiques d'alginate et d'eau, nombres de moles de calcium, carbonate, pyrophosphate normalisées pour 100 mg de poudre, et ratio molaire pyrophosphate/carbonate.

ECHANTILLON	**% mass. Alginate**	**% mass. H_2O**	**n(Ca^{2+}) (mmol / 100 mg)**	**n(CO_3^{2-}) (mmol / 100 mg)**	**n($P_2O_7^{4-}$) (mmol / 100 mg)**	**$P_2O_7^{4-}$ / CO_3^{2-} (% mol.)**
10PyACC	x	14 ± 2	0,83 ± 0,04	0,64 ± 0,02	0,088 ± 0,003	13,8 ± 0,4
10Alg	7,7 ± 1	11 ± 2	0,66 ± 0,01	0,63 ± 0,02	0,080 ± 0,003	12,8 ± 0,4
20Alg	10,3 ± 2	11 ± 2	0,59 ± 0,01	0,58 ± 0,02	0,073 ± 0,003	12,6 ± 0,4

Les solides devant respecter des règles d'électroneutralité, il est intéressant de comparer les quantités respectives de cations et d'anions dans les composites préparés ici. La valeur de la somme des quantités d'ions calcium, carbonate et pyrophosphate multipliées par leur charge respective est présentée dans le Tableau 4.3. Pour la poudre de référence 10PyACC, celle-ci est légèrement positive (égale à + 0,039 ± 0,004 mmol), ce qui avait été justifié dans le Chapitre 2 par une hydrolyse d'une petite proportion d'ions pyro- en ions orthophosphate. Pour les deux composites au contraire, les sommes sont négatives, et valent - 0,26 ± 0,01 mmol et - 0,27 ± 0,02 mmol pour 10Alg et 20Alg respectivement, alors même que les chaines d'alginate, chargées négativement, n'ont pas été prises en compte dans le calcul. Cela suggère la présence de cations Na^+. En outre, les pics exothermiques marqués en ATD associés à l'alginate de sodium n'ont pas été observés dans la Figure 4.3, ce qui laisse supposer que les ions sodium sont co-précipités avec les PyACC et intégrés dans ces particules. Leur intégration et rôle stabilisateur a d'ailleurs déjà été mis en évidence pour des matériaux amorphes mixtes d'ortho- et pyrophosphates [247,261]. Les ions pyrophosphate et carbonate pourraient aussi être protonés, expliquant le fait que la somme soit négative, mais en considérant le pH initial de synthèse aux alentours de 11 cela n'expliquerait pas un écart à zéro si élevé.

Tableau 4.3 : Calcul de la somme des quantités d'ions composant les poudres 10PyACC, 10Alg et 20Alg multipliées par leur charge respective.

ECHANTILLON	**Sommes des n_i x $charge_i$ (mmol)**
10PyACC	+ 0,039 ± 0,004
10Alg	- 0,26 ± 0,01
20Alg	- 0,27 ± 0,02

Dans le but d'examiner la répartition des chaînes d'alginate et la morphologie des composites formés, une observation MEB est faite, et les images sont présentées sur la Figure 4.4. Des agrégats de plusieurs centaines de microns sont visibles sur toutes les images, mais leur taille semble plus grande en présence d'alginate. En surface de ceux-ci, les fibres d'alginate sont observables à fort grossissement (Figures 4.4d, 4.4e), formant des agrégats fibreux granulaires comme décrit dans la littérature [555]. A cette échelle, aucune différence n'est perceptible entre les deux composites 10Alg et 20Alg.

La mesure de la surface spécifique par BET monopoint confirme l'augmentation de la rugosité de surface avec la présence de fibres polymériques d'alginate. En effet, la surface spécifique augmente de 56 ± 1 m²/g pour 10PyACC à 66 ± 1 m²/g pour 20Alg après 2 h de dégazage à 50 °C (la mesure n'a pas été faite pour 10Alg). De plus, cette augmentation pourrait traduire une réduction de la taille des particules [575], probablement du fait de l'augmentation de la sursaturation dans la structure en cage d'œufs de l'alginate, comme pour le cas de l'HA [555,564].

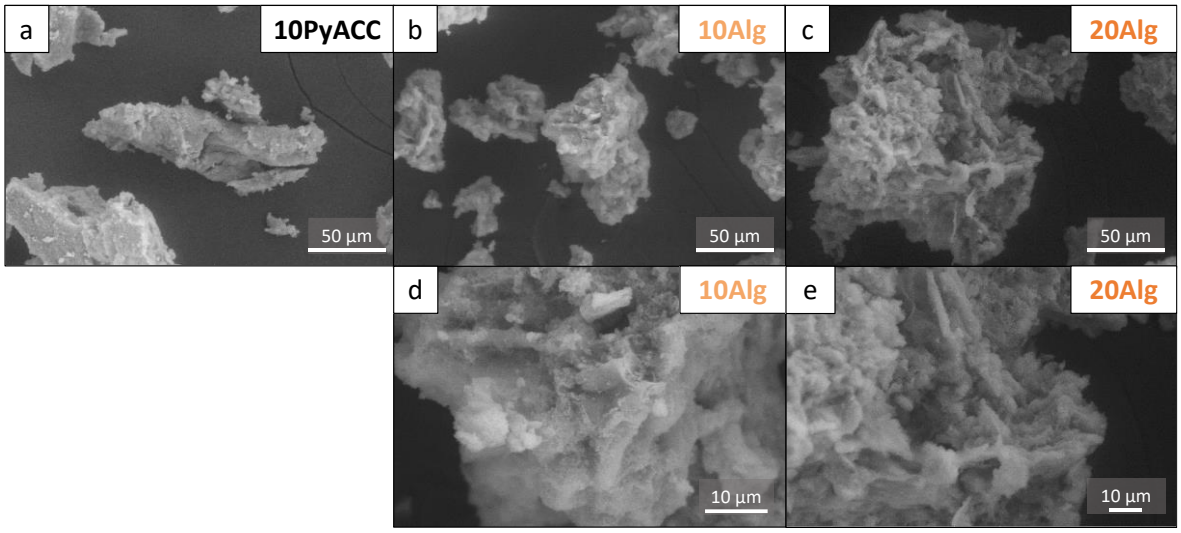


Figure 4.4 : Images MEB de la poudre de référence 10PyACC (a) et des poudres composites 10Alg (b, d) et 20Alg (c, e) à grossissement x 500 (a, b, c), x 2000 (d) et x 1000 (e).

En conclusion, la précipitation *in situ* de l'alginate et des particules de PyACC n'a pas impacté le caractère amorphe de ces dernières, et a montré une incorporation, non quantitative, de l'alginate dans les poudres composites. Les agrégats granulaires obtenus présentent des fibres d'alginate notamment visibles sur leur surface. Les poudres composites sont constituées de carbonate de calcium stabilisé par du pyrophosphate, mais les dosages et le calcul de la somme des charges met en évidence la probable intégration de sodium dans la composition chimique (élément non dosé pour ces poudres composites), stabilisant potentiellement d'autant plus les clusters amorphes. Il est possible que les groupements carboxylate de l'alginate favorisent une accumulation des ions calcium à proximité et ainsi augmentent la sursaturation et la précipitation de PyACC en espace confiné au sein de la structure en cage d'œufs, ce qui serait en accord avec les spectres FTIR montrant des liaisons entre l'alginate et les particules de 10PyACC et la littérature [555,565,566]. Les particules seraient donc dispersées de manière homogène dans le réseau d'alginate réticulé. Avec nos données de caractérisation, il n'est pas possible de vérifier cette hypothèse, mais des observations par MEB-FEG (dans un premier temps) ou des analyses SAXS (de manière plus approfondie) pourraient être envisagées pour comprendre comment sont réparties les particules inorganiques et les chaînes de polymère et à quelle échelle l'enchevêtrement a lieu (matériau composite ou hybride).

I.3 ETUDE DE L'EVOLUTION EN MILIEUX AQUEUX

Après ces caractérisations physico-chimiques des matériaux composites alginate-PyACC, leur évolution dans deux milieux aqueux a été étudiée pendant 28 jours à 37°C, afin de quantifier la libération d'ions et les transformations de phase potentielles en vue de leur intégration par la suite dans des compositions de substituts osseux de type scaffold poreux. Seul le composite 20Alg a été sélectionné, car contenant le plus d'alginate et donc le plus prometteur en terme d'amélioration de cohésion et propriétés mécaniques lors d'une future mise en forme. La même méthodologie a été appliquée que

pour les essais d'évolution des poudres dopées présentées dans le Chapitre 3, et ne sera donc pas détaillée de nouveau ici.

I.3.1 Evolution dans l'eau

La poudre composite 20Alg ayant évolué dans l'eau ultra-pure montre un début de cristallisation à partir de 1 jour (Figure 4.5a) avec l'apparition des pics caractéristiques de la vatérite sur son diffractogramme RX. Néanmoins cette cristallisation n'évolue plus après le 1er jour et la proportion d'amorphe reste stable jusqu'à la fin du test (28 jours) (Figure 4.5c), laissant supposer qu'il n'y a plus d'évolution et que le système est à l'équilibre. La formation de calcite monohydratée, présente pour la référence 10PyACC (Figure 4.5b), est inhibée ici, très probablement par la présence de l'alginate qui stabilise la vatérite [555], entre autres via la stabilisation des clusters de pré-nucléation. De plus, ce polymère est décrit comme ayant une haute affinité pour la vatérite [555], et des solutions de carbonate de calcium précipitent spontanément en vatérite en présence d'alginate [560]. Des faibles pics de calcite apparaissent au 14ème et 28ème jour, mais leur intensité dépasse très peu du bruit de fond.

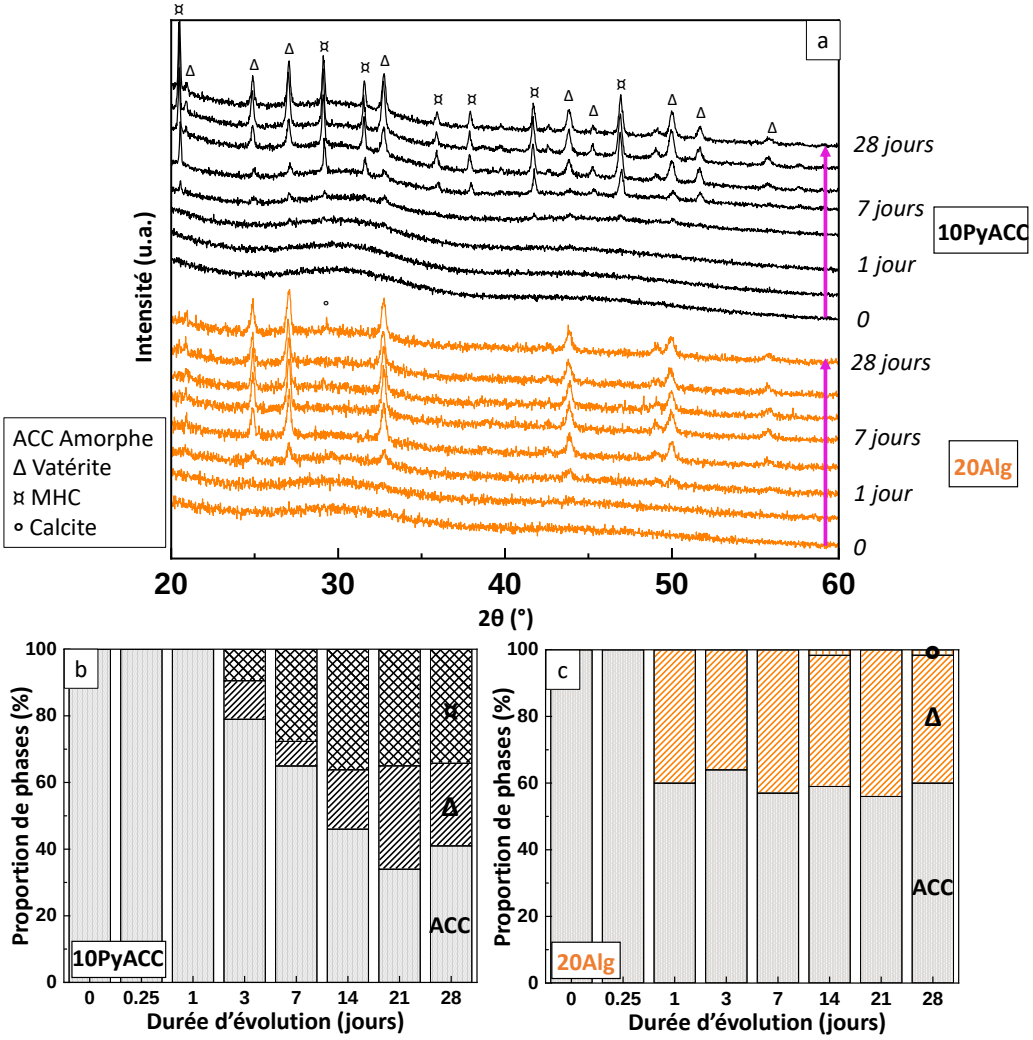


Figure 4.5 : Diffractogrammes RX (a) de la poudre de référence 10PyACC et composite 20Alg ayant évolué entre 6 h et 28 jours dans l'eau ultra-pure. Quantification des phases en présence dans les poudres 10PyACC (b) et 20Alg (c) selon la durée d'évolution, avec ACC la phase amorphe, Δ la vatérite, ¤ la calcite monohydratée (MHC) et ° la calcite.

Les spectres d'absorption infrarouge sur la Figure 4.6 présentent les mêmes tendances que 10PyACC, décrites dans le Chapitre 3. Les bandes associées aux vibrations de l'ACC se décalent en fonction de la

durée d'évolution vers celles de la vatérite, comme la ν_2CO_3 qui passe de 864 cm^{-1} dans l'ACC à 872 cm^{-1} (celle de la vatérite est à 875 cm^{-1} [105]) ou la ν_1CO_3 qui apparait à 1085 cm^{-1} (à 1074 – 1090 cm^{-1} pour la vatérite). Le doublet à 1426 et 1493 cm^{-1} associé à la ν_3CO_3 est mieux défini au cours de l'évolution dans l'eau, signe de l'obtention d'un polymorphe cristallin (doublet de la vatérite à 1440 et 1490 cm^{-1}). On retrouve aussi les bandes associées au pyrophosphate dans les spectres de 20Alg, et ce tout au long de l'évolution. Les seules différences avec 10PyACC viennent des bandes dans l'intervalle 1600 – 1700 cm^{-1} : pour 20Alg, on peut noter une bande à 1620 – 1628 cm^{-1} associée au groupement COO^- de l'alginate, tandis que pour 10PyACC c'est celle associée aux vibrations δHOH à 1660 cm^{-1} qui est visible.

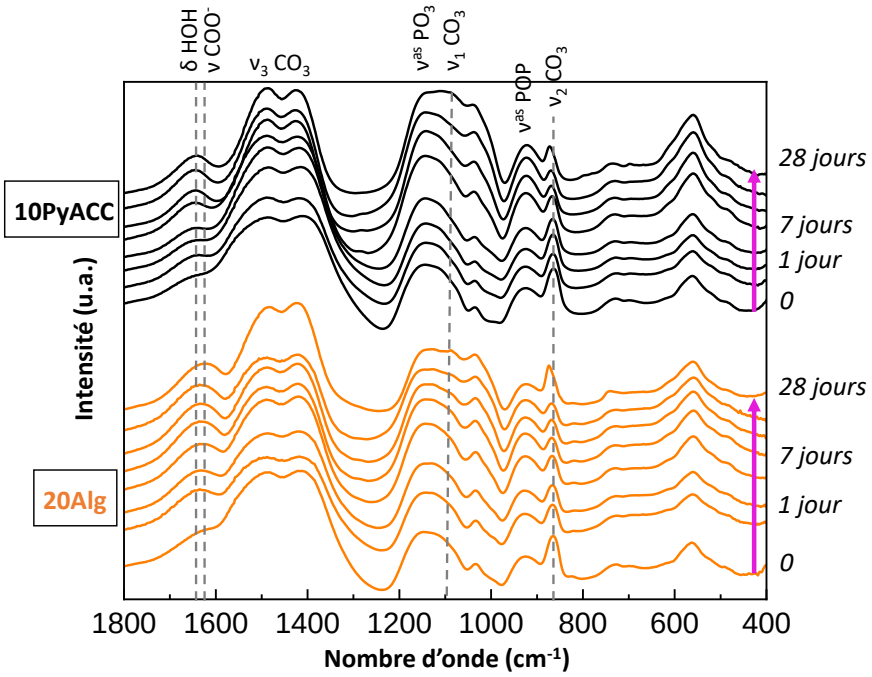


Figure 4.6 : Spectres d'absorption infrarouge de la poudre de référence 10PyACC et composite 20Alg ayant évolué entre 6 h et 28 jours dans l'eau ultra-pure. Les bandes principales carbonates, pyrophosphates et de l'alginate sont indiquées sur la figure.

Sur les images MEB (Figure 4.7), les agrégats granulaires fibreux du composite 20Alg sont toujours visibles après 7 jours et 28 jours d'évolution. Des agglomérats de particules de vatérite, de forme lenticulaire, sont aussi visibles à 7 jours et 28 jours, mais les fibres de polymère ne semblent pas être présentes sur leur surface ni incorporées.

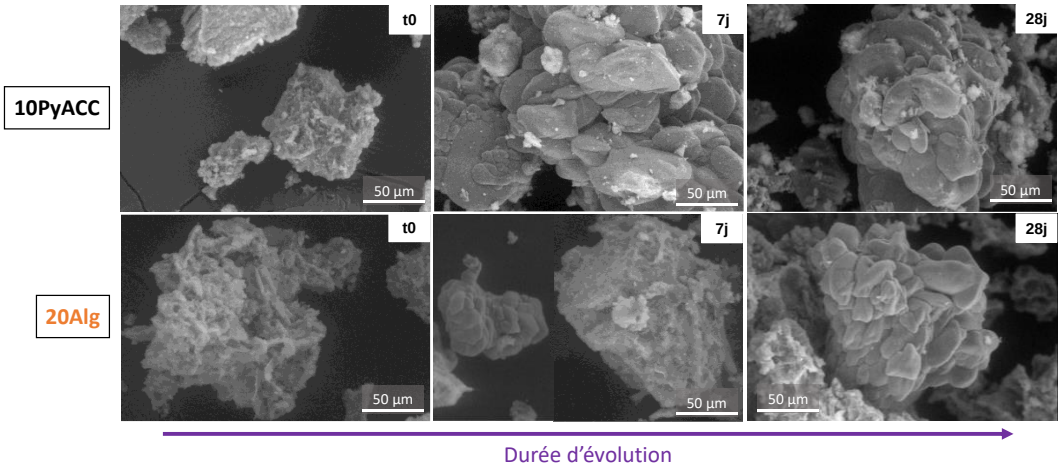


Figure 4.7 : Images MEB des poudres 10PyACC et 20Alg initiales (gauche) et après 7 jours (milieu) et 28 jours (droite) d'évolution dans l'eau, au grossissement x 500.

Les pertes de masse, sur la Figure 4.8a, sont relativement stables pour 20Alg tout au long de l'évolution : la perte de masse à 6 h est plus élevée que pour 10PyACC (- 22 % et - 11 % respectivement), mais elle se stabilise ensuite. Un minimum est atteint pour 21 jours avec - 26 % (probablement provenant d'une perte de poudre avant la pesée), et la valeur finale à 28 jours est plus élevée, valant - 21 %. La perte de masse initiale importante montre une dissolution rapide de l'amorphe, les ions reprécipitant ensuite lentement en vatérite après l'établissement d'un équilibre de dissolution-reprécipitation (car aucun gain de masse n'est observé). C'est en accord avec les DRX montrant une évolution limitée avec pas ou peu de transformation de phases après 3 jours.

La libération de calcium (Figure 4.8b, valeurs brutes sur la Figure AIV.1) est corrélée aux pertes de masse : il y a une forte augmentation avant 6 h, se traduisant par une proportion initiale d'ions calcium libérés importante (11,3 $\pm$ 0,5 %), puis celle-ci se stabilise, atteignant un maximum à 3 jours de 12,52 $\pm$ 0,02 % (soit (7,34 $\pm$ 0,01).10^{-5} mol pour 100 mg de poudre) mais proche de la valeur finale à 28 jours, qui vaut 11,7 $\pm$ 1 % ou (6,9 $\pm$ 0,6).10^{-5} mol / 100 mg de poudre. La formation de la vatérite après 1 jour est donc concomitante à la dissolution de l'amorphe, s'équilibrant pendant les premiers jours d'évolution. La quantité d'ions calcium libérés est cependant plus élevée que pour la référence 10PyACC, mais très similaire à celle libérée par 5PyACC présenté dans le chapitre précédent ((7,2 $\pm$ 0,4).10^{-5} mol pour 100 mg de poudre), pourtant avec des différences au niveau de l'évolution des phases (la dissolution de l'ACC étant exacerbée pour 5PyACC, formant principalement de la vatérite). Cela peut être dû à une chélation des Ca^{2+} par l'alginate lors de la co-précipitation initiale de 20Alg, qui sont libérés rapidement une fois la poudre mise en solution.

Les mesures du pH (Figure 4.8c) ont de grandes incertitudes pour plusieurs des temps d'évolution, potentiellement à cause des difficultés de mesure du pH en présence du polymère solubilisé, ralentissant la diffusion des ions et en particulier des protons. Pour la première mesure à 6 h, le pH élevé (10,7) est lié à la dissolution de l'amorphe libérant des CO_3^{2-} (comme expliqué dans le Chapitre 3). Le pH diminue dès 1 jour, ce qui peut être expliqué par la formation de vatérite consommant des ions carbonate et ainsi acidifiant le milieu, jusqu'à 14 jours et un pH de 8,4 (mais avec de très grandes incertitudes). Après 14 jours un équilibre chimique au niveau de la composition du solide est atteint, ce qui se traduit par une stabilisation du pH à 9,9 pour 28 jours d'évolution. Globalement, à l'exception du point très bas à 14 jours (écarté car probablement dû à des erreurs expérimentales), les variations de pH semblent moins marquées pour 20Alg que pour 10PyACC, ce qui est corrélé à la stabilisation plus rapide de la composition chimique et des phases en présence (*cf.* Figures 4.5b, 4.5c).

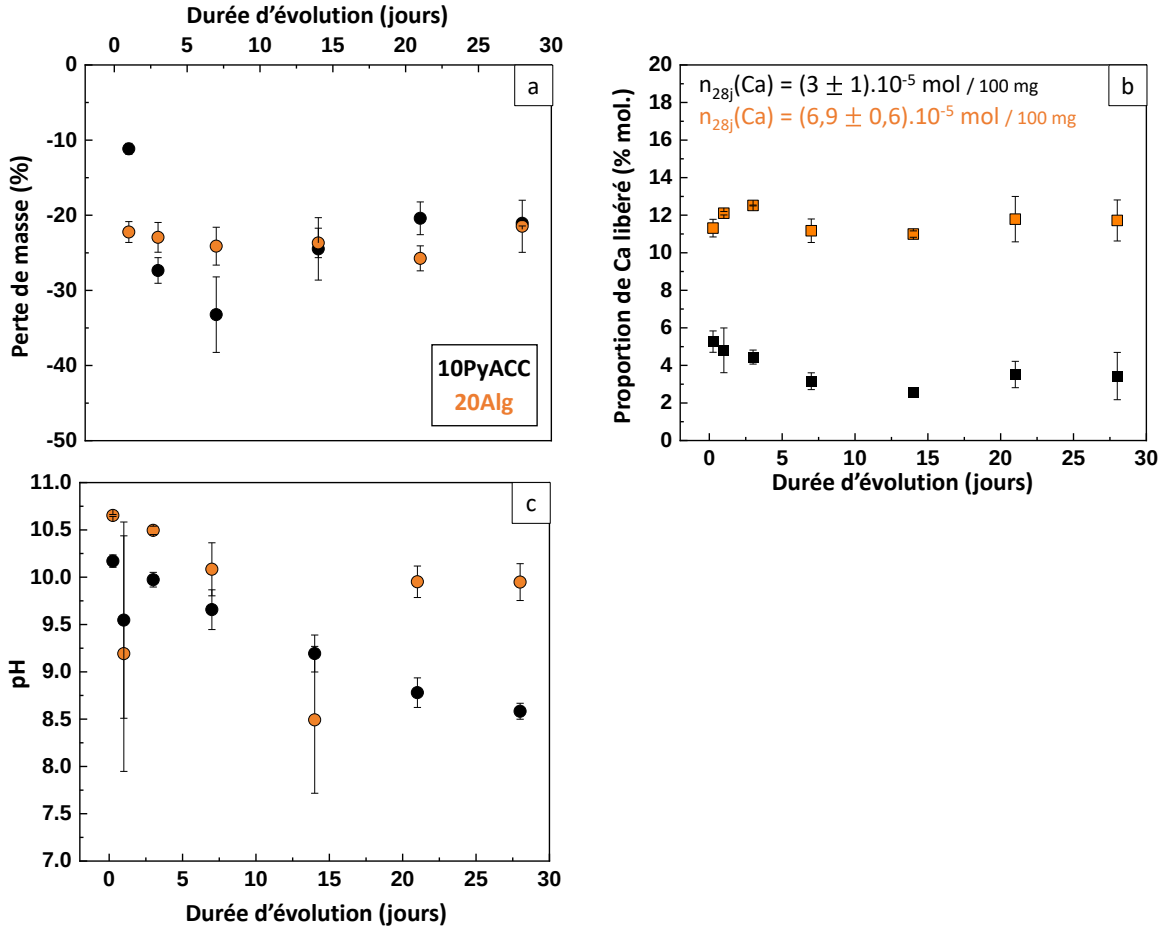


Figure 4.8 : Pertes de masse (a), évolution du pH des filtrats (c), et proportions de calcium (b) libérés (% par rapport à la quantité initiale) en fonction de la durée d'évolution des poudres 10PyACC et 20Alg dans l'eau. Les valeurs tracées sont les moyennes des trois triplicats, les barres d'erreur correspondant aux écarts-types.

I.3.2 Evolution dans le SBF

Après l'eau ultra-pure, l'évolution de poudre composite 20Alg est étudiée dans un milieu plus complexe simulant les concentrations ioniques du plasma humain, le SBF.

Les diffractogrammes RX (Figure 4.9) montrent l'apparition de petites quantités de vatérite à partir de 3 jours d'évolution, mais de manière marginale par rapport à ce qui avait été observé dans l'eau. La présence d'autres ions dans la solution de SBF environnante peut, en formant des complexes par exemple, stabiliser les ions dissouts en solution en empêcher la reprécipitation (et cristallisation).

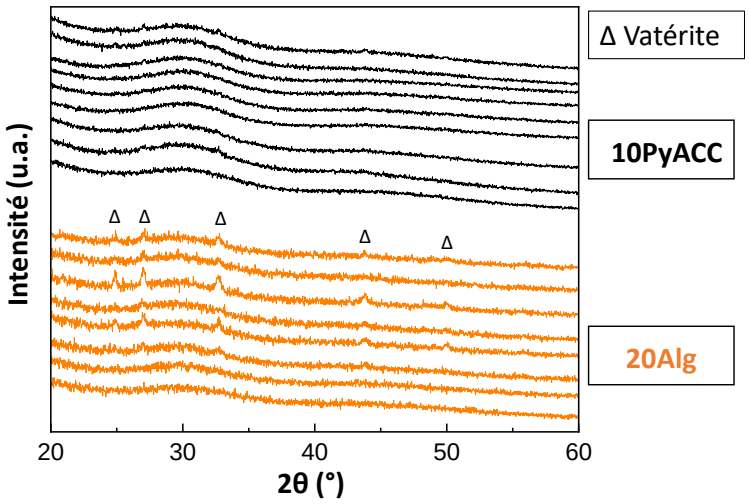


Figure 4.9 : Diffractogrammes RX de la poudre de référence 10PyACC et composite 20Alg ayant évolué entre 6 h et 28 jours dans le SBF. Le symbole Δ représente la vatérite.

Sur les spectres d'absorption infrarouge (Figure 4.10), les bandes carbonate sont de moins en moins intenses au fur et à mesure de l'évolution, et en particulier la v_2CO_3 à 864 cm^{-1} et la bande dédoublée v_3CO_3 à 1426 et 1493 cm^{-1}. Les bandes pyrophosphate au contraire voient leur intensité augmenter, comme la $v^{as}PO_3$ à 1130 cm^{-1} ou la $v^{as}POP$ à 920 cm^{-1}, probablement signe de la formation d'une nouvelle phase amorphe de CaP (en accord avec les DRX). En comparaison au spectre de 10PyACC, une bande supplémentaire semble apparaître vers 1080 - 1100 cm^{-1} pour 20Alg. Il paraîtrait étonnant qu'elle soit associée à la v_1CO_3, car les diffractogrammes RX montrent une cristallisation minime. Il peut alors s'agir de l'élongation de la liaison CO de l'alginate (à 1085 – 1092 cm^{-1} [566,569]), potentiellement détectée de plus en plus au cours de l'évolution du fait de la diminution relative des bandes environnantes, l'alginate restant gélifié et donc majoritaire dans la phase solide récupérée après filtration. La bande associée aux vibrations asymétriques des groupements COO^- de l'alginate, vers 1620 – 1630 cm^{-1}, augmente aussi et se déplace vers des plus petits nombres d'onde, en accord avec une augmentation relative de la quantité d'alginate dans les précipités.

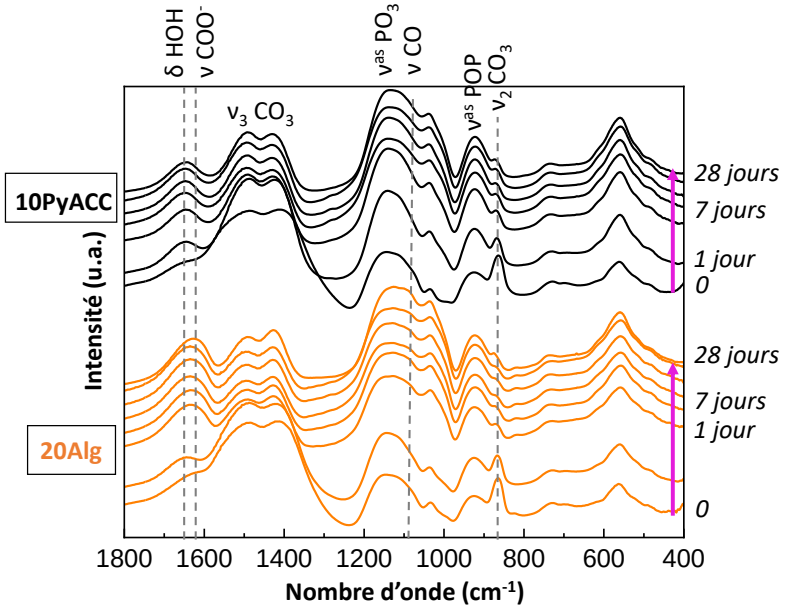


Figure 4.10 : Spectres d'absorption infrarouge de la poudre de référence 10PyACC et composite 20Alg ayant évolué entre 6 h et 28 jours dans le SBF.

Les images MEB de 20Alg sur la Figure 4.11 montrent le même type d'agrégats fibreux en surface pour t0 et les deux durées d'évolution. Les chaînes enchevêtrées sont toujours liées aux particules d'amorphe.

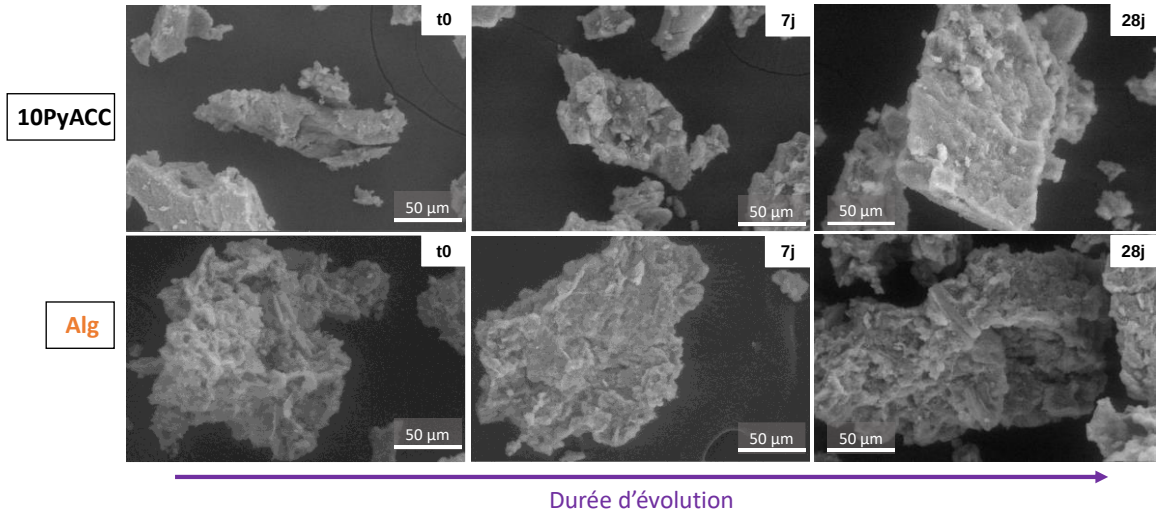


Figure 4.11 : Images MEB des poudres 10PyACC et 20Alg initiales (gauche) et après 7 jours (milieu) et 28 jours (droite) d'évolution dans le SBF, au grossissement x 500.

La perte de masse (Figure 4.12) est très proche de celle pour 10yACC pour toute la durée de l'essai : à 6 h elle vaut - 46 % et est 2 fois supérieure à celle du composite dans l'eau (- 22 %). La masse récupérée après filtration diminue ensuite jusqu'à 7 jours, durée pour laquelle elle atteint sa valeur minimale (- 56 %) puis elle augmente et se stabilise à - 48 %, sa valeur finale. Les pertes de masse exacerbées par rapport à l'évolution dans l'eau (cercles en transparence sur le graphique) peuvent être liées à une dissolution plus importante de l'amorphe, engendrée par les ions environnants. Le gain de masse à 14 jours est potentiellement issu de la précipitation d'autres phases, par exemple de CaP, mais étant amorphes car non détectées par DRX. Des échanges ioniques entre le composite amorphe et les ions du SBF peuvent aussi avoir lieu, influant sur la masse collectée de solide. Enfin, il est possible que les chaînes d'alginate commencent à se dégrader, malgré le pH probablement plutôt neutre du milieu (car tamponné). Les échanges ioniques entre le calcium chélaté et d'autres cations divalents du SBF peuvent accélérer ce processus [558]. Cependant les spectres d'absorption infrarouge et l'augmentation relative de l'intensité des bandes de l'alginate ne sont pas en accord avec cette hypothèse.

Les mesures de pH n'ont, par ailleurs, pas été effectuées pour ce composite. Le dosage du calcium libéré non plus, car la présence d'ions perturbateurs pour le dosage dans le SBF nous aurait amené à doser le solide, contenant de l'alginate pouvant aussi perturber la mesure par spectrométrie d'absorption atomique, et les poudres étaient collectées en quantités trop faibles pour pouvoir réaliser des calcinations préalables au dosage (pour éliminer la partie organique).

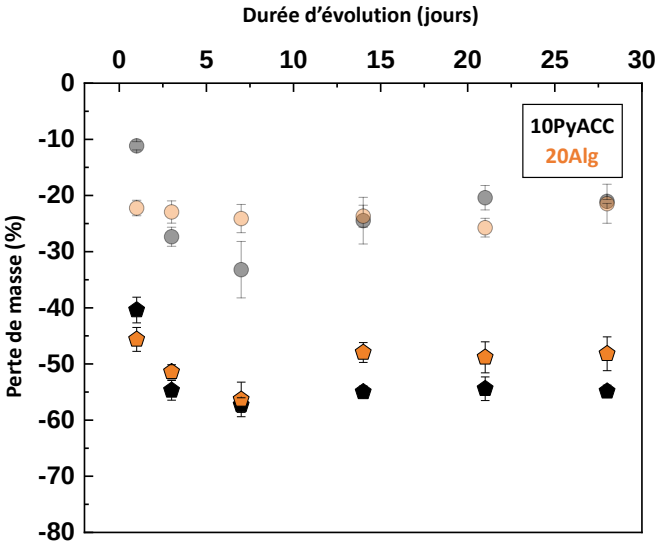


Figure 4.12 : Pertes de masse des poudres 10PyACC et 20Alg en fonction de leur durée d'évolution dans le SBF (pentagones), comparées à celles pour l'évolution dans l'eau (cercles avec transparence). Les valeurs tracées sont les moyennes des trois triplicats, les barres d'erreur correspondant aux écarts-types.

I.4 EVALUATION DES PROPRIETES BIOLOGIQUES *IN VITRO*

Après avoir étudié les mécanismes de libération et de transformation de phases dans un milieu simplifié (l'eau ultra-pure) et un milieu plus complexe avec des concentrations ioniques plus élevées (le SBF), une étude en milieu de culture cellulaire a été réalisée, dans le but de se rapprocher des conditions physiologiques.

Mais préalablement à cela, les poudres 10Alg et 20Alg doivent être stérilisées afin d'éliminer les micro-organismes pouvant être présents. La stérilisation a été réalisée par rayonnement gamma, à une dose de 25 kGy choisie en accord avec la norme ISO 11137-3 : 2017. Un des 5 échantillons stérilisés par composition a été caractérisé par DRX et spectroscopie FTIR après l'irradiation, et les diffractogrammes RX et spectres FTIR résultants sont présentés sur la Figure 4.13. Les halos caractéristiques sont présents aux mêmes positions dans les diffractogrammes RX, et aucun pic de cristallisation n'est détecté : les poudres composites sont restées amorphes. De plus, les spectres d'absorption infrarouge sont totalement superposables à ceux des poudres avant irradiation, ce qui montre que les groupements caractéristiques n'ont pas été altérés par ce traitement physique.

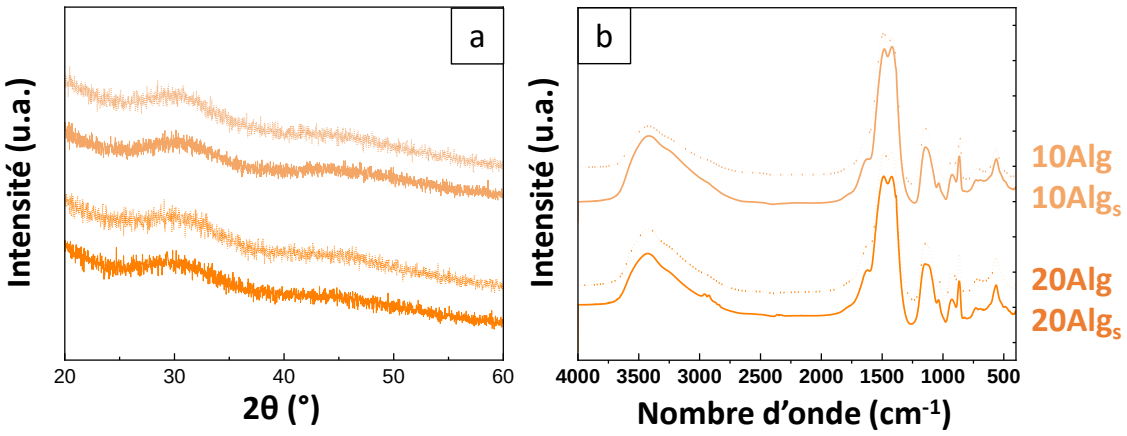


Figure 4.13 : Comparaison des diffractogrammes RX (a) et des spectres d'absorption infrarouge (b) avant (tracé en pointillés, couleur plus pâle) et après (tracé avec les traits pleins) la stérilisation γ, pour les poudres composites 10Alg et 20Alg.

Après stérilisation des poudres composites, des essais de cytocompatibilité ont été réalisés à l'Institute of Physiological Chemistry de l'University Medical Center de la Johannes Gutenberg University Mainz (Allemagne) en mettant en contact direct ces poudres composites à différentes concentrations avec des cellules fibroblastes d'embryons de souris (lignée 3T3) puis en évaluant leur viabilité après 3 jours d'incubation. Le protocole est le même que celui suivi pour les poudres dopées dans le Chapitre 3.IV et donc ne sera pas détaillé de nouveau ici.

La Figure 4.14a montre les pourcentages de viabilité cellulaire à l'issue de ces essais, pour la poudre de référence 10PyACC et les poudres composites 10Alg et 20Alg. La viabilité est très bonne pour toutes les poudres jusqu'à une concentration de 300 µg/mL, pour laquelle elle vaut 73 $\pm$ 7 % pour 10PyACC et 88 $\pm$ 5 % et 76 $\pm$ 8 % pour 10Alg et 20Alg respectivement. A 1000 µg/mL, la viabilité passe sous le seuil de cytotoxicité de 70 % pour 10PyACC (55 $\pm$ 16 %) et pour 10Alg (33 $\pm$ 20 %), mais elle reste supérieure pour 20Alg (80 $\pm$ 10 %). Il est intéressant de noter que même avec une concentration multipliée par 3,3 (entre les deux dernières concentrations), la poudre composite 20Alg engendre la même proportion de viabilité cellulaire. L'alginate confère donc une bonne cytocompatibilité aux poudres composites mais au-delà d'un certain ratio massique, se situant entre celui dans la poudre 10Alg et celui de 20Alg. Ce résultat est néanmoins à considérer avec prudence, devant la difficulté d'assurer l'homogénéité de la répartition de poudre dans la suspension (celle-ci sédimentant très rapidement) engendrant ainsi des potentielles sous-estimations de la concentration en poudre composite.

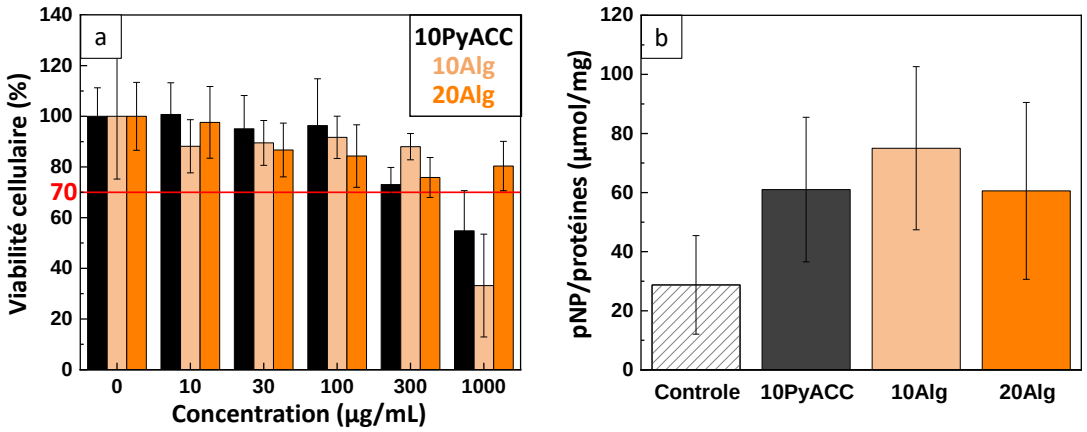


Figure 4.14 : Viabilité cellulaire après 3 jours d'incubation de cellules 3T3 (a) et activité de la PAL (mesurée par la quantité de pNP par rapport à la quantité totale de protéines) après 7 jours d'incubation avec des cellules SaOS-2 (b) pour la poudre de référence 10PyACC et les poudres composites 10Alg et 20Alg.

L'activité de la phosphatase alcaline (PAL), marqueur de minéralisation osseuse, a été quantifiée par des essais de minéralisation sur des cellules humaines d'ostéosarcome SaOS-2. Le protocole n'est pas non plus détaillé de nouveau ici, car présenté dans le Chapitre 3 : IV.4. Le ratio pNP/protéines, témoin de l'activité de la PAL, est tracé sur la Figure 4.14b qui compare celui du contrôle (puits avec cellules mais sans poudre), de la référence 10PyACC et des poudres composites 10Alg et 20Alg après 7 jours d'incubation. L'activité de la PAL des composites est supérieure au contrôle, et de l'ordre de grandeur de celle de 10PyACC. On peut noter une activité légèrement supérieure pour 10Alg, mais qui est dans les marges des barres d'erreur.

La présence d'alginate co-précipité *in situ* semble donc améliorer la cytocompatibilité des poudres composites synthétisées, mais uniquement au-delà d'un certain ratio pour les plus hautes concentrations. La biominéralisation est similaire à celle de la poudre de référence, la présence d'alginate ne semblant pas impacter ces propriétés biologiques. L'ajout d'alginate à un hydrogel de

collagène contenant des nanoparticules d'hydroxyapatite a par ailleurs démontré une augmentation de la viabilité cellulaire et de la prolifération cellulaire dans une étude de Zheng *et al.* [576], en accord avec les résultats préliminaires ici.

I.5 CONCLUSION SUR LES POUDRES COMPOSITES ALGINATE-PYACC CO-PRECIPITEES *IN SITU*

La co-précipitation *in situ* de l'alginate et des particules de 10PyACC a permis d'obtenir des composites 10Alg-10PyACC et 20Alg-10PyACC, qui ont conservé la caractéristique de l'organisation amorphe de la poudre 10PyACC de référence et ont montré une bonne incorporation de l'alginate dans les poudres composites (bien que non quantitative). Les dosages et calculs d'électroneutralité mettent en évidence l'intégration dans les composites d'ions chargés positivement, *a priori* les cations Na^+, ceux-ci stabilisant probablement les clusters amorphes. Il est possible que les particules de 10PyACC soient dispersées de manière homogène dans le réseau d'alginate, bien qu'il soit difficile d'affirmer cela par manque de caractérisations plus avancées.

Lors des essais d'évolution de 20Alg dans l'eau, il apparaît que l'alginate stabilise la vatérite, qui est la seule phase à cristalliser par dissolution de l'amorphe et reprécipitation. Un équilibre se crée après 3 jours d'évolution et il ne semble plus y avoir d'évolution après. Dans le SBF cependant, le composite est dissout en plus grandes quantités et plus rapidement, du fait de la présence d'autres ions dans le milieu, mais aucune phase cristalline ne précipite (hormis la vatérite en très faibles quantités). Il y a probablement reprécipitation d'une phase amorphe, peut-être de CaP, liée à l'alginate qui reste dans la phase solide et n'est pas ou peu dégradée.

Les essais cellulaires ont souligné la cytocompatibilité des poudres composites alginate-PyACC, améliorée par l'introduction d'alginate pour les plus hautes concentrations de poudre. Une induction de biominéralisation a été montrée sur des cellules SaOS-2, mais de manière similaire à la référence sans alginate 10PyACC.

Les composites alginate-PyACC synthétisés ici sont donc des poudres prometteuses pour la substitution osseuse, par leurs propriétés biologiques et la libération d'ions bioactifs lors de leur dissolution, ainsi que la composition mixte organique-inorganique mimant celle de l'os. Elles constituent alors des éléments de choix pour l'élaboration de scaffolds macroporeux, dont la porosité peut être orientée *via* le procédé de freeze-casting.

II FREEZE-CASTING : JUSTIFICATION DU CHOIX DU PROCEDE ET ETAT DE L'ART

II.1 CAHIER DES CHARGES POUR DES APPLICATIONS DE SUBSTITUTION OSSEUSE

Comme décrit dans le Chapitre 1 : I.3, un biomatériau pour la substitution osseuse doit être biocompatible, bioactif, avec des propriétés mécaniques adaptées à celles du site d'implantation et permettant sa manipulation ou son implantation sans dégrader ses propriétés intrinsèques. Une composition composite organique/inorganique permet de mimer au mieux celle de l'os et d'apporter des propriétés biologiques par la libération d'ions bioactifs et des propriétés mécaniques. Les biomatériaux doivent par ailleurs être résorbables et posséder une porosité tridimensionnelle avec un réseau de pores interconnectés [577–579]. Ce réseau poreux comporte idéalement des macropores [580] afin de permettre la migration et colonisation cellulaires et l'angiogenèse. La gamme de tailles communément admise est 100 – 500 µm [53], bien que d'autres études pointent des tailles optimales de porosité inférieures, liées à la taille des cellules (20 – 50 µm pour les ostéoblastes [581]) et à celle des vaisseaux sanguins (artérioles, veinules et capillaires entre 8 µm et 30 µm [582,583]). La présence d'une petite porosité (< 5 µm) augmente la surface spécifique et donc la possibilité d'interaction et d'attachement des cellules [584]. Cette surface peut être optimisée pour accroitre la prolifération et la différenciation des cellules. La tenue mécanique du scaffold (liée entre autres à son architecture 3D) doit être adaptée à la manipulation par le chirurgien ou la chirurgienne, à la technique d'implantation utilisée et au site osseux à combler ou réparer. Un gradient de porosité et/ou une orientation préférentielle des pores peuvent améliorer ces propriétés [585].

II.2 GENERATION DE POROSITE : CHOIX DU PROCEDE

Différents procédés permettent de générer de la porosité dans les scaffolds polymériques et/ou composites. La lixiviation de particules (*solvent casting - particle leaching*), consiste en l'ajout d'agents porogènes dans une solution de polymères solubilisés dans un solvant (avec ou sans particules inorganiques additionnelles). Après évaporation du solvant, les agents sont dissouts lors des étapes de lavage et laissent place à de la porosité de taille définie, mais avec des risques de présence d'éléments porogènes résiduels [552]. D'autres méthodes sont basées sur l'utilisation d'émulsions huile-dans-eau ou eau-dans-huile qui forment, après polymérisation de la phase continue et élimination des gouttelettes de la phase dispersée, des matrices polymériques cellulaires (*i.e.* avec des pores sous forme de cellules de morphologie définie) [586]. Sur le même principe, des aérogels peuvent être élaborés par synthèse sol-gel suivie de l'extraction du solvant, en général avec un fluide supercritique (CO_2) [587], les propriétés structurales étant ici ajustées par le précurseur, sa concentration et les paramètres de séchage. La fabrication additive est une alternative intéressante, pouvant conférer une macroporosité aux scaffolds composites, par la fabrication couche par couche par extrusion d'une encre composée d'une suspension de céramique et de liant polymérique [44]. Elle permet un bon contrôle de la porosité, issu du modèle créé par conception assistée par ordinateur, uniquement limité par les propriétés physiques de la poudre et la résolution de l'impression [49]. Un autre procédé utilisé est la séparation de phase induite thermiquement (TIPS), reposant sur la démixtion induite par le biais d'un transfert de chaleur (généralement un refroidissement) d'une solution homogène de polymère ou d'une suspension de particules en une phase riche et une phase pauvre en polymère/particules, alors constituée essentiellement de solvant qui solidifie/cristallise. Les cristaux de solvant ainsi formés repoussent les polymères/particules dans les espaces interstitiels, puis sont sublimés pour laisser place à des pores, répliques des cristaux. Parmi les techniques rassemblées sous le nom de TIPS, on peut citer l'*ice-templating* (utilisant l'eau comme solvant), la lyophilisation (ou *freeze-drying*) ou le freeze-casting, qui

présente la particularité de mettre en place une solidification dirigée afin d'obtenir des scaffolds de porosité orientée [588,589]. C'est cette dernière technique, par ses possibilités de contrôle de la morphologie, taille et volume des pores qui a été retenue, l'anisotropie qu'elle confère aux scaffolds permet de plus un mimétisme de la structure de l'os.

II.3 PROCEDE DE FREEZE-CASTING

II.3.1 Principe du procédé

Le freeze-casting (à solidification directionnelle) présente l'avantage de pouvoir contrôler la direction du front de congélation, permettant ainsi d'obtenir des cristaux de solvant puis une porosité orientés. Le principe est représenté sur la Figure 4.15 [590–592] : (a) des particules sont mises en suspension dans un solvant et/ou un polymère y est dissout, puis l'ensemble est mis en contact avec une source froide afin d'initier la solidification du solvant. (b) Il y a alors germination des cristaux de solvant puis propagation dirigée du front de solidification selon le gradient thermique. Du fait de la vitesse initiale élevée du front, les particules en suspension y sont piégées et une couche plus dense se forme à la base de l'échantillon. Puis la vitesse diminue, permettant aux particules, repoussées par le front de congélation, de s'organiser de part et d'autre des cristaux de solvant. Lorsque tout l'échantillon est congelé, les particules sont ségrégées avec une forte concentration dans l'espace inter-cristallin. (c) La sublimation permet ensuite d'éliminer le solvant et d'obtenir des pores de forme et taille proches de celles des cristaux, dont les murs sont constitués par les particules ségrégées. Dans le cas de céramiques ou métaux, le scaffold résultant est ensuite fritté pour densifier les murs.

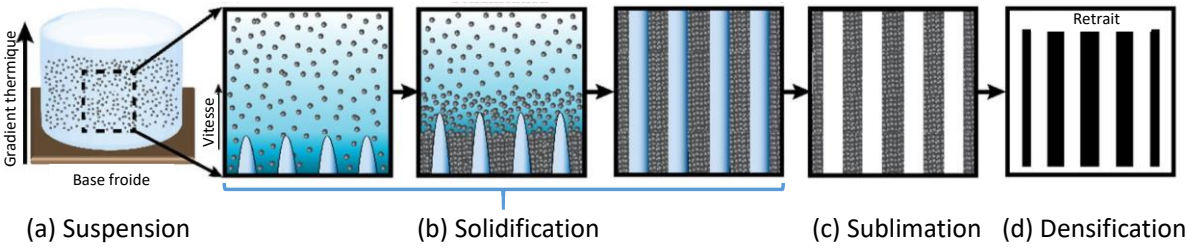


Figure 4.15 : Illustration schématique du processus de freeze-casting : (a) une suspension/solution polymérique est mise en contact avec une base froide. (b) La solidification du solvant est initiée, des cristaux nucléent puis croissent et se propagent selon la direction du gradient de température. Les particules/polymères sont alors ségrégés de part et d'autre des cristaux de solvant, qui (c) sont ensuite sublimés pour laisser place à des pores anisotropes. (d) Une densification par frittage est parfois nécessaire pour donner une cohésion mécanique au scaffold obtenu. Adaptée de Scotti et Dunand [590].

Les dispositifs de freeze-casting utilisés sont généralement développés au sein même des laboratoires, et sont composés de plusieurs éléments [407,588,593]. La suspension/solution est contenue dans un moule cylindrique en polymère à faible conduction thermique, pour conserver le gradient de température et assurer la solidification unidirectionnelle. Il s'agit principalement de polytétrafluoroéthylène (PTFE). La base froide (culot) ferme le moule et assure le contact thermique avec le doigt froid. Les deux doivent avoir une grande conductivité thermique et sont généralement constitués en cuivre. Le doigt froid est en contact avec la source froide, souvent de l'azote liquide, permettant la solidification du solvant (dirigée *via* le doigt froid puis le culot). Un contrôleur thermique sous forme de ruban permet de contrôler la température du doigt et ainsi la solidification. Enfin, un thermocouple mesure la température réelle au niveau de la base froide. Il est par ailleurs possible de chauffer la partie supérieure du moule via un ruban chauffant pour exacerber le gradient thermique entre le haut et le bas du moule.

II.3.2 Influence des paramètres liés au procédé

Le processus de freeze-casting permet le contrôle de la forme, la taille, le volume et la direction des pores des scaffolds. Mais pour cela, la solidification et plus précisément les phénomènes de germination et croissance des cristaux de solvant doivent être maîtrisés. Pour y parvenir, il est possible de s'appuyer sur plusieurs paramètres du procédé dont la température du culot, la vitesse et la durée de solidification.

Température de solidification

Pour qu'il y ait une solidification de la suspension avec un solvant aqueux, il est nécessaire d'avoir un sur-refroidissement. Deux phénomènes sont alors en compétition : la germination et la croissance des cristaux de solvant. Avec un fort sur-refroidissement (température imposée très basse, gradient thermique élevé), la germination est favorisée par rapport à la croissance des cristaux, permettant donc la formation d'un grand nombre de petits cristaux, qui donneront après lyophilisation des petits pores uniformes [594]. Au contraire, avec un faible sur-refroidissement (température proche de celle de fusion, faible gradient thermique), la croissance des cristaux est favorisée vis-à-vis de la germination et les particules ont le temps de s'organiser dans l'espace inter-cristallin, formant après sublimation du solvant un réseau de larges pores [594], avec des murs épais [595].

Vitesse de solidification

Le freeze-casting directionnel s'appuie sur le fait qu'en imposant un gradient thermique à une suspension, il est possible d'imposer des morphologies aux cristaux de solvant (et donc aux pores). Le gradient thermique et donc la vitesse de solidification peuvent être modifiés en imposant une température plus froide en bas du moule (culot) ou en chauffant sa partie supérieure (en général laissée à température ambiante). La formation des cristaux provient d'une déstabilisation du front de congélation, qui passe d'une interface plane à une interface déstabilisée irrégulière [407]. Cette déstabilisation provient du sur-refroidissement de la phase liquide devant le front de congélation, avec une température de congélation plus basse localement dans cette zone que la température d'équilibre [407]. Le mécanisme de Mullins-Sekerka permet dans certains cas de décrire la longueur d'onde de l'instabilité (assimilée à une perturbation sinusoïdale de l'amplitude de l'onde plane), *i.e.* l'espacement entre la base des cristaux, généralement inversement proportionnelle à la vitesse de congélation [407]. Selon ce mécanisme, le front de congélation évoluerait d'une interface plane à une cellulaire puis lamellaire au fur et à mesure de la congélation [594]. Cependant, ce modèle n'est pas vérifiable dans tous les cas, et il a été démontré par Deville *et al.* [596] par tomographie X *in situ* qu'il existait à l'état initial deux types de cristaux : des cristaux lamellaires orientés selon la direction de congélation coexistant avec d'autres orientés dans la direction radiale. En présence de particules, l'instabilité du front de solidification est due à l'inversion du gradient thermique dans le liquide devant l'interface et derrière la particule [597].

Plus globalement, à l'état initial il n'y a pas d'équilibre thermique, les pores créés sont organisés de manière aléatoire et la vitesse de solidification est assez élevée pour piéger toutes les particules dans une microstructure dense [591,593]. Ensuite, si la vitesse de solidification est élevée (gradient thermique élevé), la germination est cinétiquement favorisée par rapport à la croissance, donc des petits pores sont formés [592,594]. De plus, la dispersion est maintenue dans la suspension, empêchant la sédimentation des particules [594]. A plus faible vitesse de solidification cependant, la croissance des cristaux est favorisée, et les particules en suspension ont le temps de se réorganiser dans l'espace inter-cristallin, formant des murs plus larges et plus denses [594]. Si la vitesse de solidification est trop faible, le front de congélation reste plan, repoussant vers le haut du moule la suspension et les particules qui ne peuvent pas s'organiser, et la structure résultante n'est pas poreuse. De même, avec une vitesse trop élevée aucune structure poreuse n'est obtenue, car les cristaux se forment trop

rapidement pour rejeter les particules, qui sont donc piégées à l'intérieur. De manière générale, la longueur d'onde des pores lamellaires est proportionnelle à v^{-n}, où v est la vitesse de solidification et n dépend du type de particules et de leur taille [591,593].

La morphologie des cristaux de solvant et donc des pores est ainsi en partie déterminée par le gradient de température [598]. Il est alors possible de produire des scaffolds avec des gradients de porosité selon l'axe de solidification [407].

Durée de solidification

Une grande durée de solidification peut permettre aux petits cristaux formés de coalescer pour en former des plus grands, favorisant des microstructures colonnaires et lamellaires [594]. Il faut cependant réussir à maintenir l'homogénéité du champ de température et de la vitesse sur des temps longs, ce qui peut parfois être un paramètre limitant, en particulier pour de grandes pièces [591].

Pour conclure, une température de solidification très basse et de grandes vitesses de congélation favorisent la formation de nombreux petits pores. Une faible durée de solidification apporte de l'homogénéité à la structure. A l'inverse, un faible gradient de température et une longue durée de solidification permettent d'obtenir des pores de grande taille. Il est aussi possible de faire varier des paramètres liés à la suspension pour changer la morphologie de la porosité obtenue.

II.3.3 Influence des paramètres liés à la suspension

Parmi ces paramètres, on peut s'intéresser d'abord au choix du solvant, dont les cristaux vont servir d'empreinte aux pores. La composition de la suspension (concentration, taille des particules, présence d'additifs) peut aussi influer sur la porosité obtenue.

Nature du solvant

Le freeze-casting a originellement été développé pour des suspensions aqueuses, mais d'autres solvants, organiques par exemple, ont ensuite été utilisés. Le solvant définit la morphologie des cristaux obtenus et donc celle des pores : par exemple, ils sont lamellaires avec l'eau, dendritiques/cellulaires avec le camphène ou prismatiques avec l'alcool butylique tertiaire [591,599]. Les autres paramètres à prendre en compte pour le choix d'un solvant sont sa température de solidification et sa pression de vapeur à l'état solide (paramètres techniques liés au procédé), ainsi que la viscosité de la solution obtenue, un changement de volume à la solidification relativement limité, et enfin des considérations environnementales et économiques [591]. Un critère de cytocompatibilité s'ajoute dans le cas de scaffolds poreux pour des applications biomédicales. Dans le cas de matrices polymériques, il faut aussi s'assurer que le polymère soit soluble dans le solvant choisi. Parmi les solvants les plus courants, on retrouve l'eau, et certains solvants organiques tels que le dichloroéthane, le dioxane, le diméthylsulfoxyde (DMSO), le carbonate de diméthyle (DMC), l'alcool butylique tertiaire ou le camphène [407].

Concentration de la suspension et/ou de polymère

Un taux de charge (en particules ou polymères) plus élevé augmente la densité des scaffolds, qui contiennent moins de solvant dans la suspension (donc moins de cristaux), des murs plus épais et une porosité moindre [591,594,595]. Il a été démontré en comparant une vingtaine d'études que pour la majorité des cas, le pourcentage de porosité diminue avec l'augmentation de la concentration de particules [591]. Cependant, la diminution de la concentration va de pair avec des murs plus fins, diminuant les propriétés mécaniques des scaffolds résultants. Il existe une concentration maximale accessible au procédé de freeze-casting et dépendant du solvant, au-delà de laquelle les particules sont piégées dans

les cristaux car l'espace inter-cristallin est déjà trop peuplé, et donc aucune porosité n'est obtenue [594]. En parallèle de la concentration, la viscosité est aussi un paramètre clé du freeze-casting. En effet, quand elle augmente les particules/polymères ont plus de risques de se retrouver piégés pendant la croissance des cristaux et ainsi le nombre de ponts et dendrites augmente. Elle diminue la sédimentation pendant le procédé et augmente ainsi la germination, la suspension ayant plus de particules constituants des germes pour les cristaux [594].

Taille des particules solides

Les particules solides constituant des sites de germination, à masse égale, la diminution de la taille des particules (et donc l'augmentation de leur surface spécifique) entraîne une augmentation du nombre de sites de germination et donc de plus petits pores. De plus, il y a une bonne réplication de la morphologie des cristaux seulement dans le cas de particules plus petites que l'espace inter-cristallin, conduisant à une finesse dans la structure poreuse obtenue [407,594,598]. Quand les particules sont de la même taille que les cristaux, leur mobilité est réduite, ce qui entraîne un emprisonnement dans les cristaux et une perte de l'homogénéité structurale. Des particules de taille très supérieure à celle des cristaux permettent l'obtention de pores plus grands mais peuvent sédimenter et rendre la suspension instable au-delà d'une taille critique. Celle-ci dépend des différentes forces s'appliquant (forces de Van der Waals, mouvement brownien, écart de densités avec le solvant, viscosité de la suspension …) [594].

Présence d'additifs

Les additifs ajoutés à la suspension peuvent avoir divers effets. Certains influent sur la morphologie des pores, en précipitant une nouvelle phase morphologiquement différente lors de la solidification (comme pour NaCl, ayant un diagramme de phase eutectique avec l'eau) [600]. Les énergies interfaciales peuvent être modifiées, les pores initialement lamellaires devenant cellulaires (avec la gélatine ou le glycérol par exemple) [600]. Les additifs peuvent être des dispersants (acide citrique, polyméthacrylate d'ammonium) améliorant la stabilité de la suspension et ainsi l'homogénéité des pores obtenus [407]. Au contraire, ils peuvent comme le glycérol interagir avec les molécules d'eau, limitant leur diffusion et augmentant la viscosité de la solution, créant une porosité aléatoire déstructurée [594]. D'autres additifs comme la gélatine gélifient pendant la congélation. Les particules gélifiées ne sont plus rejetées par le front de solvant, la croissance anisotrope des cristaux est donc bloquée et un réseau 3D homogène de pores plus petits est formé [594,600].

En résumé, il est important de choisir une taille de particules inférieure à celle des cristaux du solvant utilisé, afin de pouvoir reproduire avec fiabilité la morphologie de ceux-ci et ainsi contrôler avec précision la porosité (en jouant sur les paramètres procédés développés en 1.1.2). Une concentration plus faible limite la germination des cristaux et permet l'obtention de pores plus gros. Divers types d'additifs influent aussi sur la taille et morphologie des pores obtenus.

II.4 TECHNIQUES DE CARACTERISATION DES SCAFFOLDS OBTENUS PAR FREEZE-CASTING

Les scaffolds obtenus par freeze-casting unidirectionnel comportent une porosité orientée, avec des pores et des murs de plus ou moins grande taille. Afin de comprendre leurs propriétés macroscopiques (mécaniques par exemple) ou le lien entre les paramètres procédés/de la suspension et la micro- et macrostructure observées, l'enjeu est de réussir à caractériser finement la taille et le volume de la porosité, la connectivité des pores et la répartition des charges, le tout sans destruction ou déformation des scaffolds. Des méthodes de suivi *in situ* pendant la solidification permettent d'observer l'évolution morphologique du front de congélation afin de comprendre les phénomènes en jeu et l'influence des différents paramètres [601]. Mais ces techniques restent peu développées, et

généralement ce sont les scaffolds poreux, secs et souvent frittés, qui sont caractérisés, par imagerie optique et/ou électronique (MEB). Cela pose deux problèmes : la structure peut être modifiée pendant la sublimation (et le frittage), masquant l'effet des paramètres étudiés ; et l'analyse en 2 dimensions ne se prête pas toujours à une extrapolation en 3D sur le volume total du scaffold. Pour remédier à cela, des analyses 3D sont mises en œuvre et permettent d'accéder à des paramètres importants selon les applications comme l'interconnectivité, la percolation, la tortuosité, mais peuvent aussi présenter certains désavantages comme une faible résolution spatiale [590]. Les différentes techniques utilisées sont présentées dans les paragraphes suivants de manière non exhaustive.

II.4.1 Techniques de caractérisation de la composition chimique et structurale

Tout d'abord, pour caractériser la composition du scaffold obtenu, les techniques classiques sont la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), la diffraction des rayons X (DRX) pour les phases cristallines, la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et/ou l'analyse thermogravimétrique (ATG) particulièrement utilisées en présence de polymères, ou la RMN du solide [407]. La spectrométrie photoélectronique X (XPS) a aussi été mentionnée pour caractériser la composition de la surface des composés obtenus [602]. On ne s'attardera pas sur ces techniques par la suite.

II.4.2 Techniques de caractérisation 2D

Pour caractériser la porosité des scaffolds obtenus (taille, morphologie des pores et volume poreux), des techniques de caractérisation en 2 dimensions peuvent être utilisées. Les techniques *in situ* permettent un suivi du front de solidification et de ses instabilités, dirigeant la formation des cristaux et par conséquent des pores. Que ce soit des techniques *in situ* ou non, la caractérisation 2D est généralement facile à mettre en œuvre, sur des appareils couramment présents en laboratoire, et permet d'avoir des informations précises avec une grande résolution.

Techniques d'imagerie optique

Les cristaux de solvant ayant des tailles microniques, la microscopie optique peut servir à les observer. Elle a par ailleurs été utilisée *in situ* avec un dispositif refroidissant pour suivre le front de congélation et étudier entre autres l'impact du gradient de température sur la morphologie et la taille des pores obtenus [603,604]. Expérimentalement, la suspension est placée entre deux plaques avec une faible épaisseur, en contact à chaque extrémité avec une plaque froide et une plaque chaude, créant un gradient de température contrôlé numériquement. L'épaisseur de la suspension entre les plaques est faible, donnant la possibilité de visualiser les cristaux de solvant. Un suivi optique dynamique de l'organisation des particules micrométriques autour des cristaux de solvant pendant la congélation a aussi été réalisé, uniquement à partir d'images acquises par un appareil photo en continu (time-lapse) [605], mettant en évidence une organisation à l'échelle locale sous forme de clusters séparés par des défauts amorphes. Même si un très bon contrôle du gradient de température est possible, les contraintes liées à l'utilisation d'un rayonnement visible (diffusion de la lumière par la suspension, réduisant la résolution spatiale) et la faible profondeur de champ limitent son utilisation [606].

Interférométrie optique

A partir d'un système similaire à celui décrit ci-dessus mais équipé d'un interféromètre, des suivis du front de congélation et de la croissance des cristaux ont été réalisés *in situ* [607,608]. En effet, les différences d'indices de réfraction (entre la solution et les cristaux) donnent des franges d'interférence. A partir de leur courbure et de leur position relative, il est possible de déterminer avec une grande précision les variations de concentration de solution autour du front de congélation ainsi que l'épaisseur des cristaux de solvant. Ces paramètres peuvent être reliés à la vitesse de croissance

des cristaux afin de comprendre les phénomènes d'instabilités du front. Cependant, aucune information n'est donnée ici sur la morphologie des cristaux, et il est nécessaire de travailler sur des faibles épaisseurs et des faibles concentrations pour avoir une transmission de la lumière [606,609].

Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est une des techniques les plus courantes utilisées pour caractériser les scaffolds obtenus après lyophilisation. De nombreux articles se basent sur celle-ci pour déterminer les tailles et morphologie des pores sur des coupes transversales et/ou longitudinales [593], souvent grâce à l'outil ImageJ [610–613]. Le MEB-FEG peut être couplé à cette analyse pour observer la répartition et taille des agrégats de charges le cas échéant [610,614]. Cependant, cette technique est destructive et implique de réaliser une coupe du scaffold, ce qui, selon sa composition et sa résistance mécanique, peut écraser la porosité et ainsi déformer le réseau poreux. Il peut de plus être difficile de réaliser des coupes fines rapprochées pour quantifier une évolution de porosité dans le matériau. Le suivi *in situ* de la congélation par MEB est laborieux. Néanmoins, en congelant l'échantillon *ex situ* puis en observant la sublimation des cristaux de glace induite par le vide dans la chambre, plusieurs groupes ont montré l'organisation de colloïdes [615] ou de polymères [616] autour des pores laissés par les cristaux.

Microscopie électronique en transmission (MET)

La microscopie électronique en transmission est peu utilisée pour caractériser les scaffolds après lyophilisation, car elle implique de réaliser des coupes très fines, ce qui peut s'avérer délicat selon la composition et la tenue mécanique des échantillons. Cependant, des essais de suivi du front de congélation *in situ* ont été réalisés par Tai *et al.* [617], dans lesquels ils ont visualisé le rejet des nanoparticules d'or par le front de congélation et la cristallisation préférentielle de certaines phases de glace selon le gradient de température. Kobayashi *et al.* [618] ont montré les transitions dynamiques entre deux phases cristallines de glace ayant lieu pendant la congélation. Néanmoins, cette technique est difficile à mettre en œuvre du fait de la faible épaisseur requise et de l'énergie importante apportée par le faisceau, pouvant faire fondre la glace formée [407].

Microscopie confocale

Cette technique, peu courante [619], offre pourtant la possibilité d'un suivi qualitatif et quantitatif *in situ* du front de congélation et de la croissance des cristaux, observés avec un faisceau visible apportant peu d'énergie et donc ne modifiant pas les comportements de solidification [609,620,621]. Pour cela, il est par contre nécessaire de solubiliser des fluorophores dans la suspension, qui sont, comme les particules, rejetées par le front de congélation du solvant. Les cristaux de glace apparaissent ainsi sombres au milieu des murs et de la suspension au-dessus du front, qui sont eux fluorescents. Elle a aussi été utilisée pour suivre l'organisation spatiale de colloïdes sous forme de clusters pendant la croissance des cristaux [622] ou sur des scaffolds lyophilisés pour mettre en évidence la répartition spatiale de leurs composants [623]. Un autre avantage de cette technique par rapport à la microscopie optique est la possibilité de sélectionner le signal provenant du plan focal. En focalisant sur différentes zones de l'échantillon il est possible d'obtenir une profondeur de champ très importante et des observations en 3 dimensions, avec une résolution submicronique [606].

II.4.3 Techniques de caractérisation 3D

Les techniques de caractérisation en 2D détaillées précédemment permettent de quantifier, généralement avec une bonne résolution, les tailles caractéristiques et morphologies de la porosité formée par le procédé de freeze-casting. Cependant, elles ne donnent pas des informations sur tout le volume du scaffold, car il n'est parfois pas possible d'extrapoler en 3D ce qui a été mesuré en 2D (comme pour certaines morphologies comme les pores lamellaires par exemple). De même, il est difficile de connaître l'homogénéité spatiale avec des techniques 2D. Cela justifie la nécessité de compléter les caractérisations surfaciques 2D avec celles volumiques en 3D. De surcroit, ces dernières ne sont généralement pas destructives, et il est parfois possible de réaliser des coupes fines numériquement, pour permettre *a posteriori* des analyses 2D systématiques sans risque d'effondrement de la porosité à la découpe.

Porosimétrie par intrusion de mercure

Après une première estimation du volume poreux souvent faite par principe d'Archimède (comparaison entre le volume réel et le volume déplacé) [624] mais ne prenant pas en compte la petite porosité, la mesure du pourcentage de porosité peut être effectuée par intrusion de gaz. On utilise souvent le mercure, liquide non mouillant pénétrant spontanément dans les pores par capillarité, auquel on applique une pression pour qu'il pénètre dans tous les pores. La taille des pores est inversement proportionnelle à la pression appliquée. L'analyse donne directement la distribution de taille des pores sans post-traitement requis, avec une bonne précision [625]. Cependant, la pression appliquée peut déformer le scaffold et ses pores, engendrant un biais dans leur quantification [626].

Tomographie à rayons X

La tomographie à rayons X se base sur une reconstruction numérique 3D d'un volume à partir de radiographies X (mesurant l'absorption d'un faisceau de rayons X par un échantillon) prises successivement pendant la rotation de l'échantillon sur 360 ° [627]. Non-destructive, elle permet d'obtenir des pourcentages de porosité, une visualisation de la morphologie des pores, l'homogénéité et la connectivité de la porosité, ainsi que d'extraire des coupes longitudinales et/ou transversales (images 2D) sur lesquelles il est possible de mesurer des tailles de pores. La résolution de cette technique est élevée ; de quelques micromètres pour un appareil de laboratoire, elle est même de l'ordre de 10 nm sur une ligne de synchrotron [606]. Il est de plus possible d'accéder à la porosité fermée, ce qui n'est pas le cas avec les techniques d'intrusion de gaz. Les matériaux opaques au rayonnement visible ne posent pas de problème pour cette méthode, à la différence de la microscopie optique. Il faut cependant noter que la visualisation de la porosité se base sur une différence de densité entre le matériau constitutif de l'échantillon et celui remplissant la porosité (l'air). Quand les scaffolds sont composés de matériaux peu denses, il est parfois difficile d'obtenir des images permettant une quantification. La tomographie X a été utilisée *in situ* avec un rayonnement synchrotron par Deville *et al.* [596,598] pour caractériser les instabilités du front de congélation selon le gradient de température et l'impact de celui-ci sur la morphologie des cristaux obtenus. Ils ont ainsi mis en évidence la formation de cristaux lamellaires alignés selon le front de congélation (axe z) coexistant avec des cristaux orientés radialement (plan xy) au début de la congélation, ces derniers disparaissant au fur et à mesure de la congélation au profit des cristaux lamellaires. D'autres articles font état de l'utilisation de la tomographie X sur le scaffold final [610,614,628,629], entre autres pour quantifier la connectivité et tortuosité des pores [630]. Néanmoins, il a été remarqué que la forte énergie du rayonnement X reçue par l'échantillon (entre autres sur une ligne de synchrotron) pendant sa congélation pouvait créer des échauffements locaux et modifier les morphologies résultantes [601].

SAXS

Le SAXS n'est pas une technique d'imagerie 3D comme celles présentées précédemment mais elle permet d'obtenir des informations globales (et non locales) sur les scaffolds obtenus. En effet, il peut dans ce contexte être utilisé *in situ* afin d'analyser la compaction dans les murs des particules rejetées par le front de solvant [631], ce qui n'est pas possible avec d'autres techniques comme le cryo-MET à cause de l'empilement créant des surépaisseurs opaques [407]. Il peut aussi permettre de caractériser l'orientation/alignement de méso-domaines cristallins (ou de domaines cristallins à plus grands angles en WAXS) *in situ* pendant la congélation [588,632,633]. Enfin, le calcul de l'invariant de Porod, intégrale de $I(q)q^4$ qui est égal dans le cas d'une interface nette entre deux phases de différence de densité de longueur de diffusion $\Delta\rho$ à $2\pi(\Delta\rho)^2\Sigma$, avec q le vecteur de diffusion, I(q) l'intensité diffusée et Σ la surface spécifique, peut permettre d'accéder à un pourcentage de porosité tenant compte de la porosité interne [422].

Autres techniques

D'autres techniques sont moins courantes mais peuvent donner des informations intéressantes et pallier à certains problèmes rencontrés pour les techniques décrites plus haut. Parmi celles-ci, on peut citer la microscopie proche infrarouge, pour laquelle un système *in situ* a été développé par Do *et al.* [634] avec une caméra 3D proche IR pour imager la croissance des cristaux, à partir du décalage du pic de l'eau vers des plus hauts nombres d'onde lorsqu'elle cristallise. La connectivité des pores des scaffolds a été caractérisée par spectroscopie d'impédance [635]. La microporosité des murs des scaffolds a été quantifiée par mesure de la vitesse de l'onde acoustique après étalonnage, en supposant que les lamelles agissent comme des guides d'onde [636].

II.5 MATERIAUX POREUX ISSUS DU FREEZE-CASTING POUR LA SUBSTITUTION OSSEUSE

Les scaffolds mis en forme par freeze-casting peuvent être utilisés dans de nombreux domaines d'applications, aussi divers que pour l'isolation thermique, l'absorption de polluants, le stockage d'électricité (électrodes de supercapaciteurs) ou la reconstruction tissulaire [588,637]. Pour ce dernier, les scaffolds doivent répondre à certaines contraintes liées à leur interaction avec les milieux biologiques et les propriétés de reconstruction recherchées, telles que définies en II.1. Des scaffolds composites sont alors couramment utilisés, généralement composés d'une matrice polymérique apportant cohésion mécanique au scaffold et de charges inorganiques lui conférant des propriétés bioactives ainsi qu'un renfort mécanique [407].

Les matrices peuvent être constituées de polymères synthétiques, majoritairement des polyesters tels que le poly(acide lactique) (ou polylactide, PLA), le poly(acide glycolique) (PGA), leur copolymère poly(lactide-*co*-glycolique) (PLGA) ou le poly(ε-caprolactone) (PCL), dégradables par hydrolyse de la liaison ester [49,407,638]. Ces polymères sont solubilisés dans un solvant non aqueux, en général le carbonate de diméthyle (DMC), ce qui peut compliquer la mise en œuvre des processus de mise en forme, et induire des risques de toxicité selon le solvant. L'utilisation des polymères bio-sourcés est très répandue, avec d'une part, les polysaccharides (alginate, agarose, chitosane, acide hyaluronique) et, d'autre part, les protéines (collagène, gels de fibrine) ou la cellulose [407,637,639,640]. On retrouve souvent des matrices mixtes avec deux polymères pour tirer profit des propriétés mécaniques de chacun, comme gélatine/chitosane [641], alginate/chitosane [642] ou cellulose/acide poly(vinylique) (PVA)/alginate [611]. S'ils sont très souvent solubilisés dans l'eau, il est parfois nécessaire d'adapter la solubilisation, en diminuant le pH de la solution avec de l'acide acétique pour le chitosane par exemple [643]. L'alginate, décrit précédemment (I.1), présente un intérêt particulier de par sa très bonne biocompatibilité et facilité de solubilisation dans l'eau. Sa composition en fait un microenvironnement adapté à la différenciation des cellules ; il a également été utilisé pour du freeze-casting couplé à de la

cryopréservation cellulaire, autrement dit pour élaborer un scaffold d'alginate contenant des cellules [644,645]. Dans des procédés de freeze-casting, l'alginate est mis sous forme de scaffold sans réticulation (en association ou non avec des charges inorganiques) [643,645,646] ; après une gélification non contrôlée par ajout de chlorure de calcium avant congélation [571,647] ou avec une gélification *a posteriori* (en le réhydratant dans une solution de calcium avant de le lyophiliser de nouveau) [648,649]. Quelques articles font état d'une gélification ayant lieu *in situ* pendant la congélation [650], entre autres induite par une libération lente d'ions Ca^{2+} provenant de particules de carbonate de calcium ou d'hydroxyapatite en suspension, lentement dissoutes via l'acidification du milieu provenant de l'hydrolyse de la GDL [651,652].

Des charges inorganiques sont souvent ajoutées à la matrice polymérique, dans des proportions variables dépendant de l'application et de la porosité voulues [407]. Parmi les plus courantes, on retrouve les phosphates de calcium ou les bioverres. En effet, les premiers sont largement utilisés dans le domaine de la substitution osseuse pour leur similarité avec le tissu osseux humain. L'hydroxyapatite en particulier, apportant une bioactivité au scaffold final, a été ajoutée à des matrices de collagène [653], PLGA [614], ou alginate [651] par exemple. D'autres phosphates de calcium, comme le β-TCP, sont aussi utilisés [49]. Les bioverres sont aussi souvent choisis comme charges inorganiques, car améliorant les propriétés bioactives des scaffolds [41,640,646,654] : des scaffolds Bioglass®/PDLLA [655] entre autres peuvent servir *in vitro* de support à la migration et l'attachement cellulaire. Les carbonates de calcium sont quant à eux très peu mis en œuvre dans l'élaboration de scaffolds par freeze-casting pour la reconstruction osseuse. On en retrouve dans des compositions biomimétiques visant à imiter la structure de la nacre, composée de plaquettes d'aragonite (95 %) liées entre elles par des polymères (protéines et chitine), lui donnant une résistance mécanique très élevée. Celles-ci sont élaborées par freeze-casting avec des matrices de chitosane et gélatine contenant des particules d'aragonite [407] ou des matrices de chitosane acétylées *a posteriori* puis minéralisées avec de l'aragonite [406], permettant un mimétisme par une structuration en feuillets unidirectionnels. Ces composés de structuration similaire à celle de la nacre pourraient être utilisés comme substituts osseux [408,409]. De manière générale, le freeze-casting ou ice templating est utilisé pour créer des composés et des structures biomimétiques variés, et ainsi copier l'architecture, les propriétés bioactives et/ou mécaniques de biocomposites naturels [599,656,657]. Au-delà de ces considérations biomimétiques, à notre connaissance, aucune étude ne mentionne l'incorporation de particules de carbonate de calcium dans des suspensions pour le freeze-casting. La seule étude s'y rapprochant [658] fait état d'une minéralisation de cryogels de chitosane *a posteriori* par différents sels de carbonate, pour lesquels les particules se déposent sur la surface du scaffolds mais sans être incluses dans les murs.

C'est dans ce contexte que se positionne notre étude, ayant pour but d'élaborer des scaffolds composites alginate-PyACC présentant une porosité adaptée à des applications de substitution osseuse, avec une bonne dispersion des particules (ou agrégats de particules) dans les scaffolds. La porosité large et interconnectée est le principal paramètre recherché, pour permettre la colonisation par les cellules et l'angiogenèse. Les propriétés mécaniques de ce type de composites sont en général peu élevées par rapport à celles de l'os. En conséquence : i) leur application vise la substitution en site non-porteur et ii) les propriétés mécaniques attendues doivent permettre un maintien de la forme et la prévention de la collapse de la porosité lors de la manipulation. Les charges inorganiques ont pour but de libérer en se dissolvant des ions qui contribueront à reconstruire le minéral osseux. Les ions calcium en particulier sont décrits comme favorisant la différenciation ostéogénique [644].

III ELABORATION DE SCAFFOLDS MACROPOREUX COMPOSITES AVEC DIFFERENTS TAUX DE CHARGE PAR FREEZE-CASTING

III.1 DESCRIPTION DU DISPOSITIF MIS EN ŒUVRE

Le développement du procédé de freeze-casting s'appuie ici majoritairement sur les travaux de P. Lagarrigue [638] au CIRIMAT. Le dispositif utilisé est le même que celui décrit dans sa thèse : un dispositif de refroidissement contient un fluide cryoporteur dans lequel plonge un doigt en cuivre, matériau d'une grande conductivité thermique (401 $W.m^{-1}.K^{-1}$ à 298 K), selon le principe décrit sur la Figure 4.16 gauche. Un contrôleur numérique permet d'imposer la température du bain refroidissant et ainsi la température de congélation à la base de la suspension, comme il l'a été démontré par étalonnage à partir des mesures des températures du bain et de la base du doigt en cuivre (partie en contact avec les moules) après stabilisation. Le moule en lui-même (Figure 4.16 droite), contenant la suspension, est composé d'une base en cuivre, polie miroir au préalable afin d'éviter la présence de rayures ou défauts pouvant constituer des points préférentiels d'ancrage pour la germination des cristaux de solvant et les orienter, ainsi que d'un moule et d'un culot supérieur en cuivre. Les moules ont été usinés dans du FEP (éthylène propylène fluoré) qui possède une faible conductivité thermique (0,20 à 0,24 $W.m^{-1}.K^{-1}$ à 298 K), avec un diamètre intérieur de 2,1 cm et une hauteur de 4 cm. La température au niveau de la base froide (culot de cuivre inférieur) peut être mesurée à l'aide d'un thermocouple grâce à un trou usiné. Lorsque la suspension est coulée dans le moule et qu'il est mis en contact avec le doigt de cuivre plongeant dans le fluide cryoporteur, une mousse polyuréthane isolante est disposée autour du moule, afin de limiter les condensations solides pouvant impacter le gradient de température. Avant toute élaboration de scaffold par freeze-casting, le refroidissement est initié pour permettre l'équilibrage en température du doigt en cuivre (environ 45 minutes). La partie supérieure du doigt (base en contact avec le culot inférieur du moule) est recouverte de parafilm pendant cette étape pour éviter la formation d'une couche de glace qui empêcherait un bon contact thermique. Une fois que l'échantillon est totalement solidifié (durée dépendante de la température du doigt en cuivre), le moule est retiré du dispositif et placé dans un flacon de lyophilisation sans le culot supérieur de cuivre, à – 80 °C et 0,120 mbar pendant au moins 24 h (lyophilisateur Bioclock Scientific, Alpha 2-4 LD) pour permettre la sublimation du solvant. Lorsque la lyophilisation est terminée, le scaffold est extrait délicatement du moule et conservé à température ambiante.

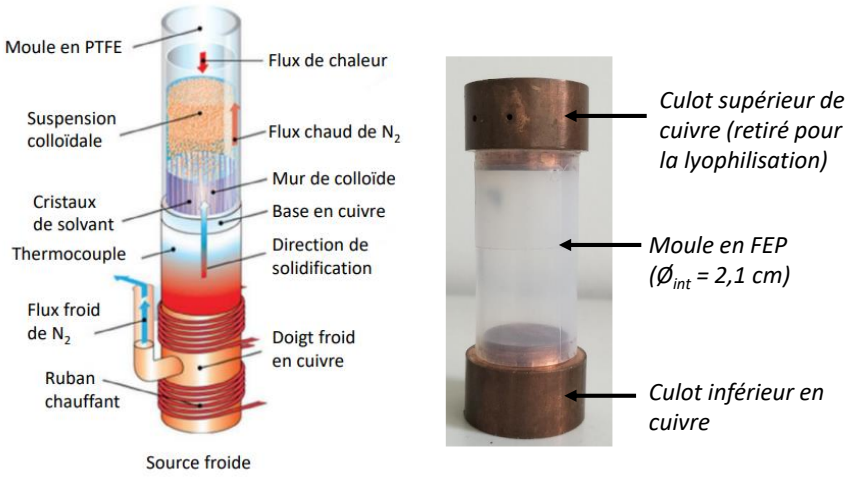


Figure 4.16 : Schéma simplifié d'un dispositif de freeze-casting unidirectionnel, adapté de Shahbazi et al. [588] *et photographie légendée (droite) d'un moule de freeze-casting.*

Le solvant choisi ici est l'eau. Il permet : a) la solubilisation de l'alginate ; b) la formation de cristaux avec le dispositif détaillé précédemment sans nécessité d'utiliser d'azote liquide (température de fusion de l'eau à 0 °C) ; et c) l'absence de risque qu'il subsiste des traces de solvant non biocompatible après sublimation. Afin d'obtenir une porosité de taille élevée (supérieure à 150 µm pour permettre la colonisation cellulaire), la température de solidification doit être proche de celle de fusion du solvant, ici 0 °C. Nous avons choisi de travailler à - 10 °C, car il a été montré qu'à cette température il fallait 5 h pour congeler entièrement la suspension d'environ 1 cm de haut, alors qu'à température supérieure (- 5 °C), la solidification n'était pas totale après 12 h [638].

III.2 PROTOCOLE D'ELABORATION DES SCAFFOLDS COMPOSITES

Des scaffolds composites à matrice polymérique contenant des charges inorganiques ont été développés, et l'impact du taux de charges sur la porosité et les propriétés mécaniques des scaffolds a été analysé. Pour cela, la poudre 20Alg-10PyACC a été utilisée (simplement notée Alg-PyACC par la suite de ce chapitre), dans le but d'améliorer la cohésion mécanique du scaffold par un enchevêtrement des chaînes de polymère et des particules minérales. De l'alginate de sodium libre a en plus été ajouté à la suspension. La concentration totale en alginate a été fixée à 1 % mass. (par rapport à l'eau) et le volume d'eau à 6 mL. Les proportions des composants inorganiques (PyACC) et organiques (comprenant alginate provenant de l'alginate libre et de l'alginate précipité *in situ* de Alg-PyACC) varient entre 0/100 ; 10/90 ; 30/70 ; 50/50 et 70/30, et les scaffolds résultants sont respectivement appelés S0 ; S10 ; S30 ; S50 et S70. Les proportions respectives de 20Alg-PyACC et d'alginate libre ajustées afin d'obtenir les proportions ci-dessus sont listées dans le Tableau 4.4. Il est à noter que ces calculs de proportions avaient été effectués en supposant (à partir des calculs théoriques) que la poudre de 20Alg-10PyACC contenait 13,2 % mass. d'alginate. Il s'avère qu'elle en contient 10 % (Tableau 4.2), d'où des petits écarts aux proportions idéales. Par soucis de simplifier, les noms des scaffolds ont été conservés à l'identique (*cf*. Annexe V.4 pour le détail des compositions des suspensions). Un diagramme ternaire contenant les proportions relatives de PyACC, d'alginate (*in situ* et libre) et d'eau (à partir des valeurs calculées dans le Tableau AV.8 en annexe V.4) est présenté Figure 4.17. Même si la quantité totale d'alginate diminue entre les scaffolds (passant de 0,99 % pour S0 à 0,88 % pour S70), l'évolution est presque linéaire (linéarité matérialisée par la ligne horizontale sur le diagramme ternaire), et on peut supposer que la diminution d'alginate est négligeable par rapport à l'augmentation du taux de charge minérale (proportion de PyACC).

Tableau 4.4 : Proportions (massiques) des poudres pesées pour élaborer les différents scaffolds.

SCAFFOLD	PROPORTIONS INORGA./ORGA. INITIALES	PROPORTIONS INORGA./ORGA. RECALCULEES	MASSE DE 20Alg-10PyACC	MASSE D'ALGINATE LIBRE	VOLUME D'EAU
S0	0/100	0/100	0	0,0600 g	6,00 mL
S10	10/90	10/90	0,0077 g	0,0590 g	
S30	30/70	31/69	0,0296 g	0,0561 g	
S50	50/50	52/48	0,0691 g	0,0509 g	
S70	70/30	73/27	0,1613 g	0,0387 g	

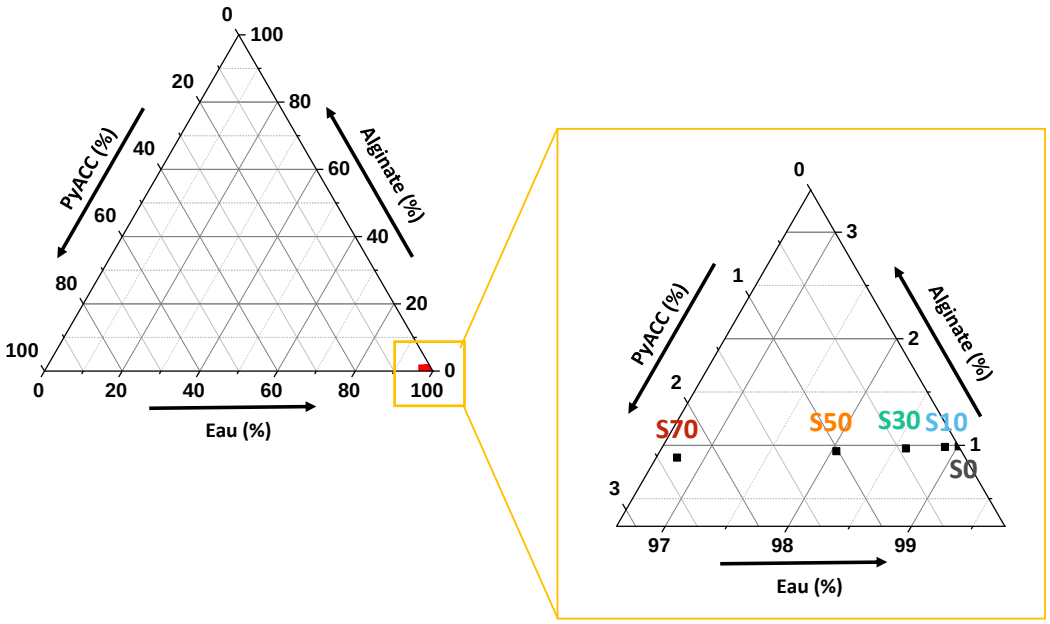


Figure 4.17 : Diagramme ternaire entier (gauche) et agrandi dans la zone d'intérêt (droite) des proportions relatives (pourcentages massiques) en PyACC, alginate et eau pour élaborer les scaffolds S0, S10, S30 , S50 et S70.

Après sa pesée, l'alginate libre est solubilisé dans 6 mL d'eau en utilisant une sonde plongeante à ultrasons (Bioblock Scientific, Vibracell, 75115), à 60 % d'amplitude pendant 2 min dans un bain de glace. La poudre Alg-PyACC est ensuite ajoutée, mélangée à l'aide d'un agitateur vortex puis dispersée avec la sonde à ultrasons à 80 % d'amplitude pendant 30 s avec des impulsions de 2 s, dans un bain de glace. Ces paramètres ont été choisis après des essais préliminaires. L'alginate est solubilisé en premier pour éviter un échauffement lors du traitement par ultrasons de la poudre de PyACC, ce qui pourrait favoriser sa cristallisation. Ensuite, les impulsions permettent une bonne dispersion tout en réduisant au maximum cet échauffement. La suspension après ultrasonication est homogène macroscopiquement et perd en transparence pour devenir de plus en plus blanche à mesure que le taux de charges inorganiques (Alg-PyACC) augmente. Dans le cas d'hétérogénéités visibles, le processus d'ultrasons est répété. Suite à cette étape, 4 mL de la suspension sont immédiatement prélevés avec une pipette à large embout, puis coulés dans le moule de freeze-casting, ce dernier étant ensuite mis en contact avec un doigt de cuivre à – 10 °C pendant au moins 5 h. Le processus de congélation puis sublimation du solvant est celui décrit précédemment. Le culot supérieur de cuivre, étant soumis à la température ambiante d'environ 20 °C, on impose une vitesse de congélation d'environ 0,1 °C/min. Pour une durée de solidification de 5 h et une hauteur d'échantillon de 10 mm la vitesse de congélation est d'environ 0,55 µm/s (ou 0,033 mm/min).

IV INFLUENCE DU TAUX DE CHARGE SUR LA POROSITE DES SCAFFOLDS

IV.1 CARACTERISATIONS MACROSCOPIQUES

Lors de la préparation des suspensions, nous avons observé que les 2 mL de suspension restants non coulés dans le moule de freeze-casting gélifient. Cette gélification est plus ou moins marquée selon la formulation de la suspension. Afin de quantifier ce phénomène, pour chaque composition de suspension, la durée nécessaire à la gélification totale, *i.e.* le maintien du gel au fond du pilulier sans couler lorsque le pilulier est retourné (Figure 4.18), a été mesurée. Le Tableau 4.5 présente les résultats.

Tableau 4.5 : Pour chaque composition de suspension, durée entre l'ultrasonication des suspensions et leur gélification totale.

COMPOSITION DE LA SUSPENSION	TEMPS NECESSAIRE A UNE GELIFICATION TOTALE
S0	Pas de gélification
S10	~ 24 h
S30	~ 1 h
S50	10 – 15 min
S70	5 – 10 min



Figure 4.18 : Gélification totale de la suspension eau/Alg-PyACC/alginate libre de type S50.

Cette gélification peut être attribuée à une réticulation de l'alginate via les ions calcium libérés par les particules d'Alg-PyACC durant l'ultrasonication. Pour valider cette hypothèse, 0,1613 g de 20Alg-PyACC, soit la composition avec le plus haut taux de charges inorganiques (S70), ont été mis en suspension sans alginate libre dans 6 mL d'eau par vortex puis ultrasons (à 80 % d'amplitude pendant 30 s avec des impulsions de 2 s, même programme que pour le freeze-casting). La suspension homogène obtenue a été centrifugée, et le surnageant récupéré puis dosé en spectrométrie d'absorption atomique. La concentration de calcium contenue a été mesurée comme étant égale à $2,6 \pm 0,5$ mmol.L^{-1}, *i.e.* $0,010 \pm 0,002$ mmol de Ca^{2+} libéré (normalisé pour 100 mg de poudre), ce qui représente 1,7 % mol. de la quantité de calcium contenue initialement dans la poudre 20Alg-10PyACC. Ainsi, en libérant moins de 2 % mol. des ions calcium contenus dans les particules d'Alg-PyACC la rhéologie de la suspension est modifiée et par conséquent les propriétés finales du matériau telles que le gradient de porosité également. Cette stratégie de réticulation *in situ* d'alginate par libération d'ions calcium provenant de carbonate de calcium est intéressante car elle propose une alternative à la réticulation du polymère préalable au freeze-casting, qui créerait une compétition avec la séparation de phase induite thermiquement, inhibant la formation de la macroporosité. Elle est par ailleurs utilisée pour former des hydrogels pour diverses applications, comme de la libération de principes actifs encapsulés dans les particules de carbonate de calcium creuses [563].

Les clichés macroscopiques des 5 types de scaffolds obtenus sont présentées Figure 4.19. Ils présentent tous une macroporosité visible à l'œil nu, et une relative élasticité perceptible par test sensoriel entre les doigts. Tous présentent une structure cohésive. Seul l'échantillon S70, contenant le plus de charges inorganiques, s'effrite légèrement lors de la manipulation ou de la découpe, produisant de la poudre, également visible sur la photo de la Figure 4.19. Leurs dimensions sont listées dans le Tableau 4.6, et leur densité est calculée à partir de ces mesures et de leur masse.



Figure 4.19 : Photos des cinq types de scaffolds élaborés (vus de haut et de côté)

Tableau 4.6 : Diamètres et hauteurs moyennes mesurées pour les scaffolds S0 à S70 élaborés, ainsi que leur densité, calculée à partir de la masse pesée.

SCAFFOLD	DIAMETRE MOYEN (mm)	HAUTEUR MOYENNE (mm)	DENSITE ($g.cm^{-3}$)
S0	$20,8 \pm 0,2$	$10,7 \pm 0,1$	$0,0110 \pm 0,0003$
S10	$20,6 \pm 0,5$	$11,0 \pm 0,4$	$0,0124 \pm 0,0007$
S30	$19,5 \pm 0,4$	$11,0 \pm 0,4$	$0,0178 \pm 0,0007$
S50	$19,4 \pm 0,1$	$10,3 \pm 0,7$	$0,0257 \pm 0,0008$
S70	$19,4 \pm 1,4$	$10,8 \pm 0,2$	0,0374*

** Un seul échantillon pesé*

Le diamètre moyen diminue avec l'augmentation du taux de charge d'Alg-PyACC. Cela peut être liée à la réticulation croissante avec le taux de charge, rapprochant les chaînes de polymère et donc entraînant une rétractation macroscopique du scaffold. Les densités quant à elles augmentent de façon notable, ce qui est dû à la proportion croissante de charges inorganiques, plus denses que l'alginate.

Des analyses thermogravimétriques et thermiques différentielles ont été réalisées sur les scaffolds, avec une rampe de 7 °C/min et sous un flux d'air, afin de quantifier leur contenu en eau et comparer les différences de stabilité thermique. Elles sont présentées Figures 4.20a, 4.20b, et les proportions respectives d'eau sont reportées dans le Tableau 4.7. Comme pour la poudre Alg-PyACC, ces dernières ont été estimées par la perte de masse au niveau du premier plateau (entre 150 °C et 200 °C), en accord avec le pic endothermique visible en ATD associé à l'évaporation de l'eau [569,659,660]. La proportion d'eau diminue quand la quantité de charge inorganique augmente *i.e.* quand la proportion d'alginate diminue. De par ses chaînes carbonées, l'alginate peut créer des liaisons faibles (de type Van de Waals, hydrogène) avec l'eau, alors assimilable à de l'eau « structurale », non éliminée par le processus de lyophilisation. De plus, lorsque l'alginate est réticulé par un cation divalent (Ca^{2+} ici), il peut former un hydrogel capable d'une importante rétention d'eau, expliquant la proportion d'eau plus élevée dans le scaffold S10 (contenant 10 % de charges inorganiques avec du calcium) que le S0 (sans charge minérale), qui a pourtant plus d'alginate. On peut remarquer que le pic endothermique sur les courbes ATD (insert de la Figure 4.20b) de la poudre composite Alg-PyACC est décalé à plus haute température, probablement du fait de liaisons plus fortes entre l'eau, l'alginate et les particules PyACC liées au procédé de synthèse *in situ* et à l'enchevêtrement des composants. Les mécanismes de décomposition en température de l'alginate de sodium et alginate de calcium ont été décrits dans la littérature [569–571,574,659–661]. En dessous de 160 °C – 200 °C, il y a perte de l'eau contenue dans le réseau polymérique. Entre 200 °C et 280 °C, l'alginate de sodium commence à se décomposer, et forme un alginate déshydroxylé et/ou décarboxylé ainsi que Na_2CO_3 et CO_2, ce qui est associé en ATD à un pic exothermique. Pour l'alginate de calcium, la décomposition est un peu plus tardive (mais toujours autour de 250 °C) et produit du carbonate de calcium $CaCO_3$ à la place de carbonate de sodium. Entre 280 °C et 558 – 562 °C, l'alginate déshydroxylé et/ou décarboxylé se décompose en fragments plus petits et plus stables (cyclopentanones entre autres, parfois des esters), libérant du CO_2 et de l'eau. Au-delà de cette température, les fragments organiques se décomposent en résidus carbonés stables. Le carbonate de calcium formé par décomposition des chaînes d'alginate de calcium ainsi que celui contenu initialement dans la poudre Alg-PyACC se décomposent en CO_2 et CaO selon l'équation : $CaCO_3 \rightarrow CO_2 + CaO$ aux environs de 700 °C. Le carbonate de sodium quant à lui, se décompose en Na_2O et CO_2 au-delà de 850 °C quand il est pur mais cette température peut être abaissée sous 800 °C quand il est en présence d'autres composés, comme CaO [572,573]. Cela pourrait expliquer les pertes de masses visibles après 750 °C pour les scaffolds S10 à S70. Dans la zone 200 – 700 °C, les ATD montrent plusieurs pics exothermiques, visibles dans l'insert de la Figure 4.20b. La décomposition des chaînes

carbonées libres et réticulées de l'alginate forment deux pics exothermiques. Pour le scaffold S0, ces pics sont présents à 244 °C et 340 °C, ce qui est en accord avec les valeurs de la littérature pour l'alginate de sodium (237 °C et 350 °C) [574]. Pour le scaffold S10, le premier pic à 248 °C est encore très marqué, attestant d'une quantité importante de sodium, mais le deuxième pic est décalé à 321 °C. Or quand l'alginate est chélaté par le calcium, les pics exothermiques d'ATD sont décalés vers des plus hautes températures (327 °C et 450 °C) [574]. Le pic à 321 °C de S10 pourrait donc correspondre à la décomposition des chaines de l'alginate liées à Ca^{2+}, formant du carbonate de calcium. Pour les scaffolds S30 et S50, le premier pic, à 251 °C, est nettement moins marqué montrant une quantité plus faible de sodium, introduit avec l'alginate libre et donc en moins grande quantité quand le taux de charge augmente. Les deuxièmes pics à 329 °C (S30) et 326 °C (S50) sont très marqués, en raison de la réticulation par le calcium discutée précédemment. On notera un pic supplémentaire pour S50 à 350 °C, potentiellement associé à la cristallisation de l'ACC des particules d'Alg-PyACC en calcite. Les pics de S70 (251 °C, 301 °C) sont peu marqués du fait de la faible quantité d'alginate. La décomposition du Na_2CO_3 formé a lieu à 577 °C (S0), 616 °C (S10) ou 644 – 655 °C (S30, mal défini), selon la réaction suivante : $Na_2CO_3 \rightarrow CO_2 + Na_2O$ [574] ; elle est décalée vers des plus hautes températures en présence de calcium. Enfin, entre 663 °C et 712 °C le pic endothermique dans les thermogrammes de S30, S50 et S70 traduit la décomposition du carbonate de calcium, provenant à la fois de la décomposition des chaînes carbonées de l'alginate réticulé par le calcium et des charges minérales de Alg-PyACC, selon l'équation : $CaCO_3 \rightarrow CO_2 + CaO$.

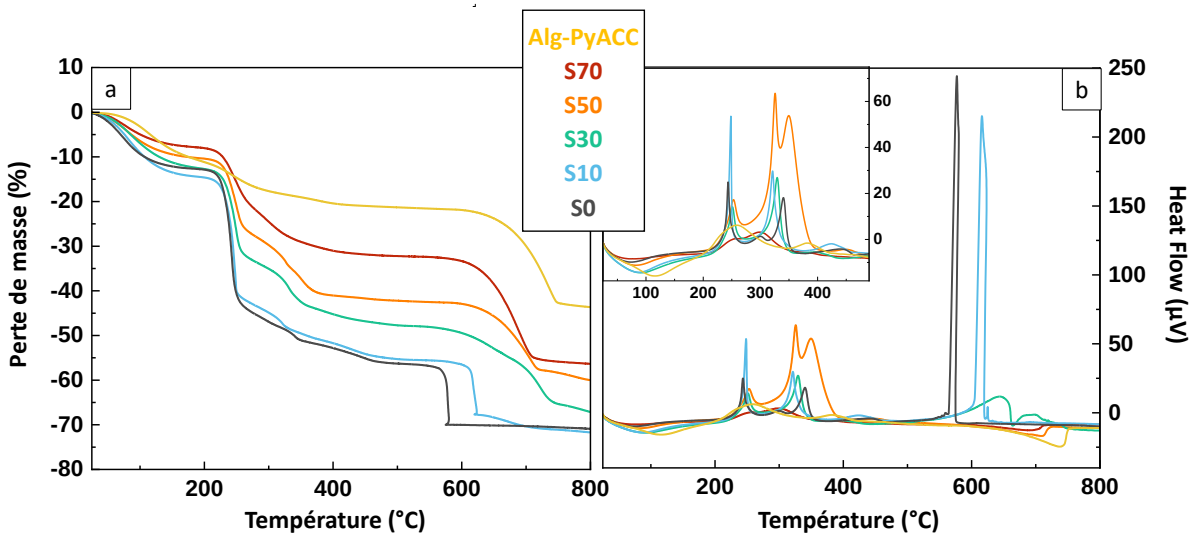


Figure 4.20 : Courbes ATG (a) et ATD (b) des scaffolds S0 à S70, réalisées sous flux d'air et à 7 °C/min.

Tableau 4.7 : Proportion massique d'eau dans les scaffolds, estimée d'après les analyses ATG.

ECHANTILLON	POURCENTAGE MASSIQUE D'EAU (%)
SCAFFOLD S0	$12,6 \pm 0,4$
SCAFFOLD S10	$14,3 \pm 0,4$
SCAFFOLD S30	$12,4 \pm 0,4$
SCAFFOLD S50	$9,9 \pm 0,8$
SCAFFOLD S70	$7,6 \pm 0,6$
POUDRE COMPOSITE ALG-PyACC	11 ± 2

IV.2 CARACTERISATIONS DE LA STRUCTURE POREUSE

Les scaffolds obtenus sont macroporeux, avec une porosité totale élevée et visible à l'échelle macroscopique. Celle-ci dépend des paramètres liés au procédé de freeze-casting, comme décrit en II.3, mais aussi de paramètres de formulation des suspensions. C'est ce que nous avons cherché à caractériser dans la partie suivante. Pour cela, comme schématisé sur la Figure 4.21, des coupes transversales (par rapport à la direction de solidification) dans la partie basse, médiane et haute ainsi que des coupes longitudinales sont réalisées sur les scaffolds soit physiquement avec un scalpel puis analysées par MEB (analyse 2D) soit numériquement grâce à la tomographie à rayons X (analyse 3D). A partir des analyses de ces données et de leur quantification, l'existence de différentes zones de porosité sera mise en évidence (études des coupes longitudinales de MEB et tomographie X), l'évolution de la porosité au sein de ces zones sera décrite via l'analyse quantitative des tailles des pores et de leur distribution sur des coupes transversales de tomographie X et des mesures de tailles de pores sur des images MEB et leur comparaison aux mesures de porosimétrie mercure. Enfin l'effet des charges inorganiques sur la porosité (comparaisons des tailles des pores issues des images MEB) sera discuté.

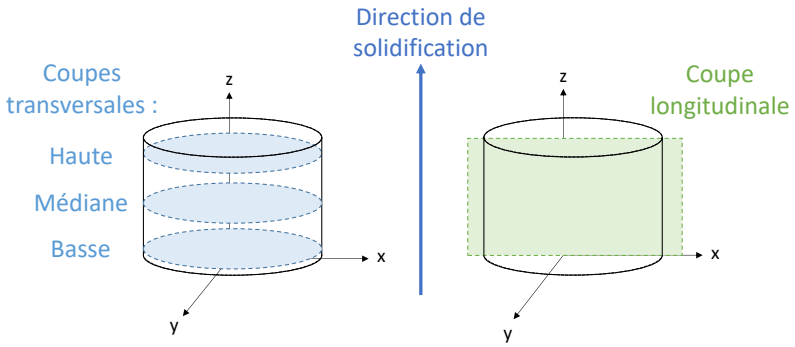


Figure 4.21 : Représentation schématique des coupes réalisées sur les scaffolds (physiquement ou numériquement) pour être observées au MEB (2D) et en tomographie X (3D).

Les reconstructions en 3D des volumes obtenues en tomographie X sont présentées Figure 4.22. Elles montrent, en particulier avec la vue de côté, que les scaffolds ont une porosité anisotrope, orientée selon l'axe de congélation. Les pores paraissent lamellaires, mais une organisation différente est observable entre le haut et le bas des scaffolds, en particulier sur la vue de côté.

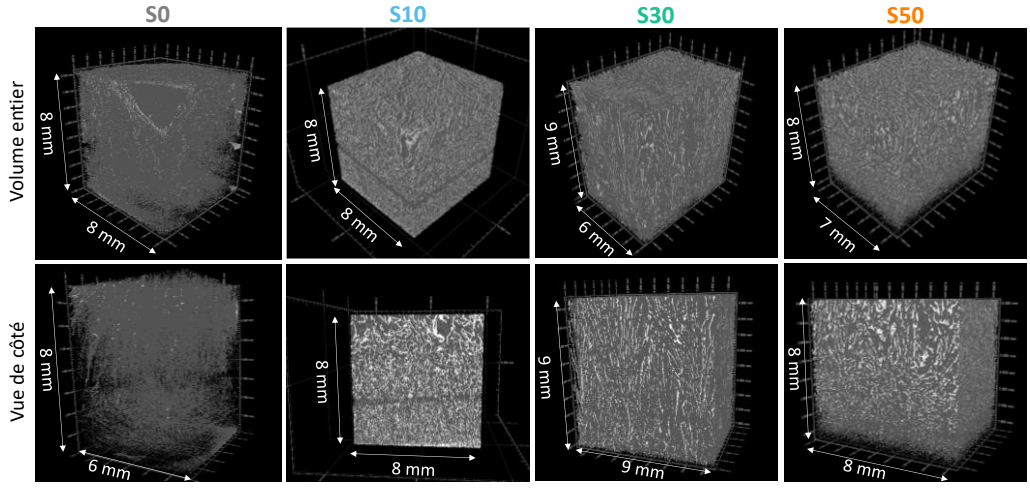


Figure 4.22 : Images 3D des scaffolds S0 à S50 obtenues par tomographie X, avec vues sur le haut des échantillons (images du haut) et de côté (images du bas). Les lignes blanches constituent les murs et les zones sombres la porosité.

Les pourcentages de porosité volumique des scaffolds ont été calculés à partir des volumes reconstruits après la tomographie X sur le logiciel VG Studio Max, et sont présentés dans le Tableau 4.8. Pour réaliser ce calcul, un seuillage manuel est requis, ce qui induit des incertitudes sur la mesure, assez élevées dans notre cas à cause du faible contraste électronique entre les murs du scaffold et l'air remplissant la porosité. Les pourcentages de porosité sont tous similaires, entre 71 ± 5 % et 75 ± 5 %. Ils ont été comparés au pourcentage de volume poreux mesuré par porosimétrie à intrusion de mercure, qui sont plus élevés pour tous les scaffolds, entre 84 ± 2 % et 89 ± 2 % . La porosimétrie mercure donne une bonne quantification du volume poreux accessible à l'intrusion du mercure, donc la porosité ouverte, à la différence de la tomographie qui estime numériquement le volume poreux total (porosités ouverte et fermée). Le volume poreux estimé par tomographie X est donc généralement supérieur à celui mesuré par intrusion de mercure. Dans le cas présent, c'est l'opposé. Plusieurs raisons peuvent expliquer cela : d'une part, en tomographie X, la faible résolution (liée à un faible contraste de phases) ne permet pas de prendre en compte la petite porosité, sous-estimant le volume poreux ; d'autre part, les scaffolds sont composés d'une matrice polymérique d'alginate très élastique, l'intrusion de mercure réalisée en appliquant une pression peut déformer les pores voire même rompre des murs séparant des pores adjacents, ce qui surestime le volume poreux. On peut cependant relever que l'écart entre les valeurs de porosité volumique données par ces deux méthodes est plus élevé pour S50 (écart de 17 %) que pour les autres scaffolds (11 – 13 %), ce qui pourrait témoigner de l'augmentation de la petite porosité quand plus de charges d'Alg-PyACC sont introduites. A partir de ces deux techniques, on peut supposer que les pourcentages volumiques de porosité sont presque similaires entre les scaffolds, en moyenne entre 75 et 85 %.

Tableau 4.8 : Pourcentages de porosité volumique des scaffolds élaborés S0 à S50, estimés à partir des volumes reconstitués en tomographie X et des valeurs de porosimétrie à intrusion de mercure. Valeurs surestimées car prise en compte des pixels morts du détecteur (lignes noires visibles sur les volumes 3D sur la Figure 4.22) comme faisant partie du volume poreux.*

SCAFFOLD	POROSITE VOLUMIQUE TOMOGRAPHIE X (%)	POROSITE VOLUMIQUE INTRUSION MERCURE (%)
S0	75 ± 5	86 ± 2
S10	75 ± 5*	88 ± 2
S30	71 ± 5	84 ± 2
S50	72 ± 5*	89 ± 2

IV.2.1 Mise en évidence de l'existence de différentes zones de porosité

Les clichés MEB des coupes longitudinales sont présentés sur la Figure 4.23. Afin de comparer plus facilement les différents types de scaffolds élaborés, l'axe z correspondant au gradient de température est représenté horizontalement et la direction de congélation correspond à un sens droite-gauche comme indiqué sur l'image. On peut d'abord confirmer l'anisotropie de la structure poreuse (observée en tomographie X précédemment), avec des pores orientés selon la direction de congélation. Les pores ne sont pas parallèles et paraissent interconnectés. Il y a de plus un gradient structural au niveau de la porosité, toujours selon le sens de la congélation. En effet, à la base des scaffolds (partie droite, flèches rouges), une zone plus dense est formée, avec des pores plus petits. Cette zone est présente pour tous les scaffolds, de manière encore plus marquée pour S10 et S30. Une zone médiane (flèches jaunes), dont la taille dépend des échantillons, a une porosité intermédiaire, qui paraît désorganisée, en particulier pour S10 et S50. Enfin, la partie haute du scaffold (flèches bleues) est constituée de pores lamellaires orientés dans la direction de la solidification. Ces pores sont plus ou moins alignés et discernables selon les échantillons.

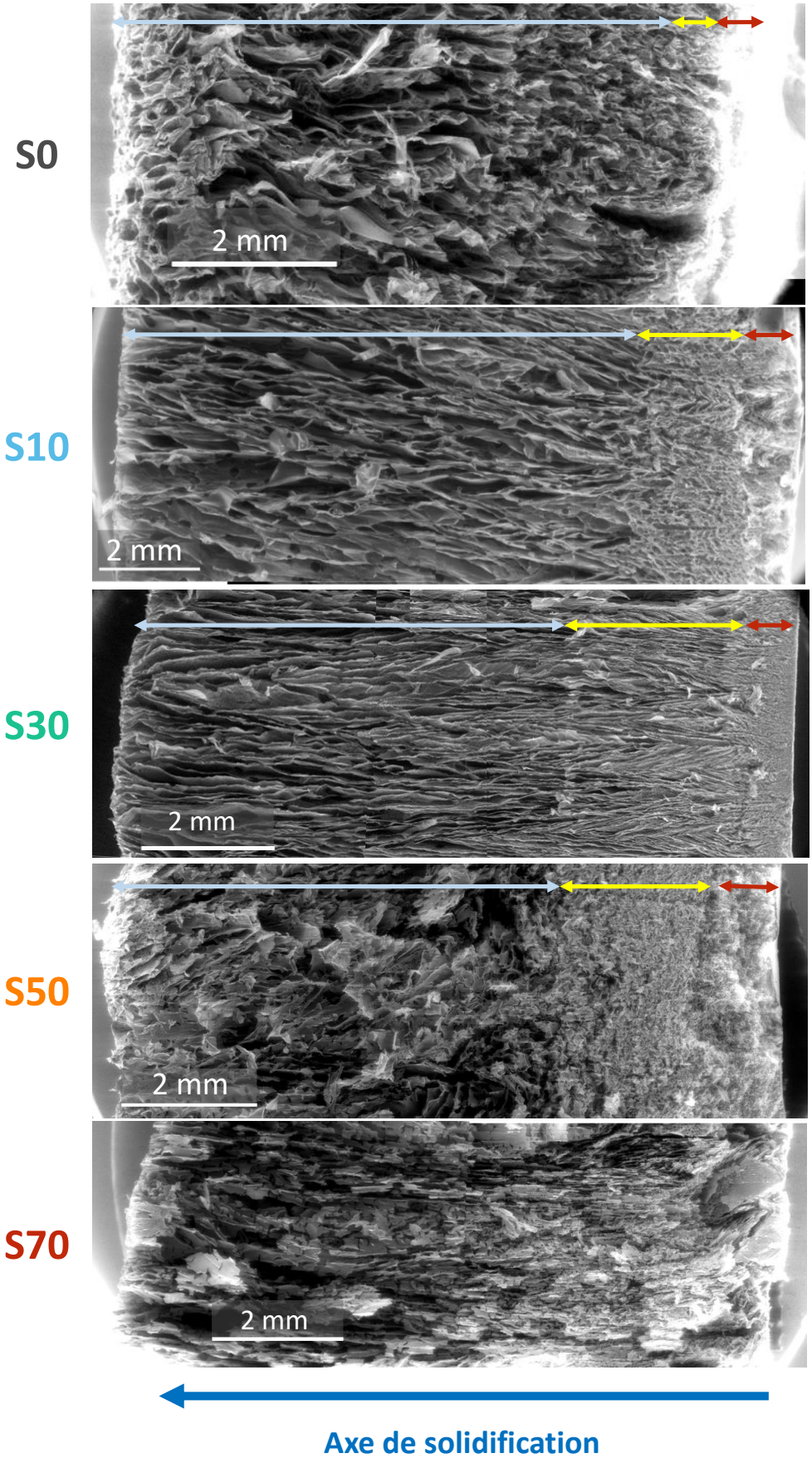


Figure 4.23 : Reconstitution des coupes longitudinales des scaffolds à partir des clichés MEB, pour chaque échantillon. Les flèches bleues, jaunes et rouges mettent en évidence des zones ayant des porosités différentes le long du front de solidification.

Les hauteurs moyennes et relatives (hauteur de la zone par rapport à la hauteur totale de la coupe) de chaque zone ont été mesurées avec le logiciel ImageJ (5 à 7 mesures par zone sur deux images par scaffold), et les résultats sont présentés dans le Tableau 4.9. Pour le scaffold S70, il n'était pas possible d'identifier différentes zones, du fait de sa délamination lors de la manipulation détruisant la porosité. La zone dense en bas de l'échantillon a une hauteur moyenne relativement constante pour l'ensemble des échantillons, entre 0,5 $\pm$ 0,1 mm et 0,9 $\pm$ 0,1 mm, représentant 6 à 10 % de la hauteur de la coupe. Ce phénomène est souvent observé et décrit dans la littérature [593,662] et provient du procédé utilisé : la vitesse initiale très rapide déplace rapidement le front de congélation, qui piège les particules au sein des cristaux de glace, formant une zone dense sans ou avec peu de porosité. Cette hauteur a été estimée par Deville *et al.* [593] à 10 µm (sur 250 µm de hauteur d'échantillon, soit 4 %), pour des suspensions d'alumine dans un mélange eau-PVA. C'est du même ordre de grandeur que la valeur que nous avons mesurée, mais l'écart peut provenir d'une viscosité plus élevée de la suspension eau/alginate/Alg-PyACC que de celle de l'étude de Deville et collaborateurs, contenant de l'eau, du PVA, un dispersant et des particules d'alumine. La viscosité limite les mouvements des molécules, dont ceux de l'eau cherchant à se réorganiser en cristaux et des particules étant piégées par le front de congélation. C'est aussi en accord avec Zmora *et al.* [650], montrant une zone dense de 1 mm pour une solution d'alginate réticulée par du calcium congelée par freeze-casting à – 35 °C. Cette zone est plus étendue quand la température de congélation diminue (2 – 3 mm avec de l'azote liquide à – 176 °C).

Après cette zone très dense, la vitesse de congélation ralentit, les particules commencent à être rejetées du front de solidification par les cristaux qui se forment. La germination des cristaux est favorisée (face à leur croissance), il y a donc de petits pores plus nombreux, bien visibles dans la zone indiquée par la flèche jaune de S50. S'il y a présence de cristaux, ceux-ci ne sont pas encore ordonnés, d'où une structure poreuse désordonnée de cette zone, parfois qualifiée d'amorphe [629]. Il a été montré par tomographie X *in situ* que deux types de cristaux y sont en présence, les uns orientés selon l'axe de congélation z (qui sont majoritaires dans la partie haute du scaffold), les autres radialement dans le plan xy, créant une désorganisation. En accord avec l'article de Deville *et al.* [593], cette zone associée à un front de solidification colonnaire et mixte colonnaire/lamellaire mesure 30 à 50 µm, soit 12 à 20 % de la hauteur totale de la coupe. C'est équivalent aux hauteurs mesurées sur les scaffolds S10 à S50, représentant 14 à 23 % de la hauteur totale de la coupe. Cette deuxième zone a une hauteur légèrement plus faible pour S0 (7 %), mais il est difficile de réellement qualifier la porosité sur la coupe car lors de la découpe, le scalpel arrache les fibres de polymère et déforme les murs. Il est possible que les hauteurs respectives de cette zone et de la suivante soient faussées à cause d'une mauvaise appréciation.

Une fois que la vitesse de solidification s'est stabilisée, les cristaux lamellaires commencent à s'organiser, le front de glace rejette les particules et chaînes de polymère dans les espaces inter-cristallins. La vitesse plus faible favorise la croissance par rapport à la germination des cristaux, formant donc après sublimation des pores de taille plus importante. Cet effet est exacerbé par la création des cristaux dans la zone inférieure (zone médiane), créant une couche isolante thermiquement et diminuant d'autant plus la vitesse du front de congélation. La longue durée de congélation peut aussi créer de la surfusion de cristaux, qui coalescent et augmentent ainsi en taille. Il est possible de voir pour S30 un léger évasement des pores vers le haut, qui ne sont plus tout à fait parallèles, provenant de la croissance des gros cristaux. Cette zone occupe tout l'espace restant des coupes, représentant 67 à 79 % de la hauteur relative de la coupe (hormis pour le S0, *cf.* l'explication précédente). C'est aussi en accord avec l'article de Deville *et al.* [593], dans lequel cette structure lamellaire organisée et homogène occupe 76 % de la hauteur de la coupe.

Tableau 4.9 : Hauteurs moyennes et relatives (par rapport à la hauteur totale de la coupe) de chaque zone de porosité identifiée par MEB (Figure 4.23), pour les scaffolds S0 à S70.

SCAFFOLD	ZONE HAUTE (BLEUE)		ZONE MEDIANE (JAUNE)		ZONE BASSE (ROUGE)	
	Hauteur moyenne (mm)	Hauteur relative (%)	Hauteur moyenne (mm)	Hauteur relative (%)	Hauteur moyenne (mm)	Hauteur relative (%)
S0	$10,9 \pm 0,2$	87	$0,6 \pm 0,2$	7	$0,5 \pm 0,1$	6
S10	9 ± 1	79	$1,5 \pm 0,3$	14	$0,8 \pm 0,3$	7
S30	$6,4 \pm 0,8$	69	$2,1 \pm 0,3$	23	$0,8 \pm 0,1$	8
S50	$6,3 \pm 0,3$	67	$2,2 \pm 0,2$	23	$0,9 \pm 0,1$	10
S70	*Zones non discernables*					

Les coupes transversales réalisées sur les parties hautes, médianes et basses des scaffolds et observées au MEB (Figure 4.24) illustrent ces différences de morphologies de pores. Le scaffold S70 n'est pas présenté ici, car il était trop friable pour pouvoir adhérer au scotch carbone et résister au vide partiel de la chambre d'observation du MEB. Une seule image du bas (vue de dessous) des scaffolds est présentée, les autres étant très similaires et non interprétables. Pour tous les scaffolds, la zone médiane est très désorganisée, et présente une porosité peu définie, qui ne semble pas orientée. Les pores sont petits, témoins d'une croissance défavorisée par rapport à la germination (du fait d'une vitesse de congélation plus élevée). Sur la coupe haute, les pores sont lamellaires et très allongés, leur morphologie est orientée selon l'axe de solidification. On repère certains ponts entre les feuillets, signes d'une germination secondaire ayant lieu entre les plus gros cristaux, reliant les pores respectifs après sublimation. Sur le haut du scaffold S50, les murs semblent présenter une sous-porosité très irrégulière et présentent de nombreux trous en surface. Cela peut être dû à un manque de polymère (liant entre les particules), ou à la réticulation importante pour cet échantillon, créant une structure fibreuse du réseau 3D d'alginate.

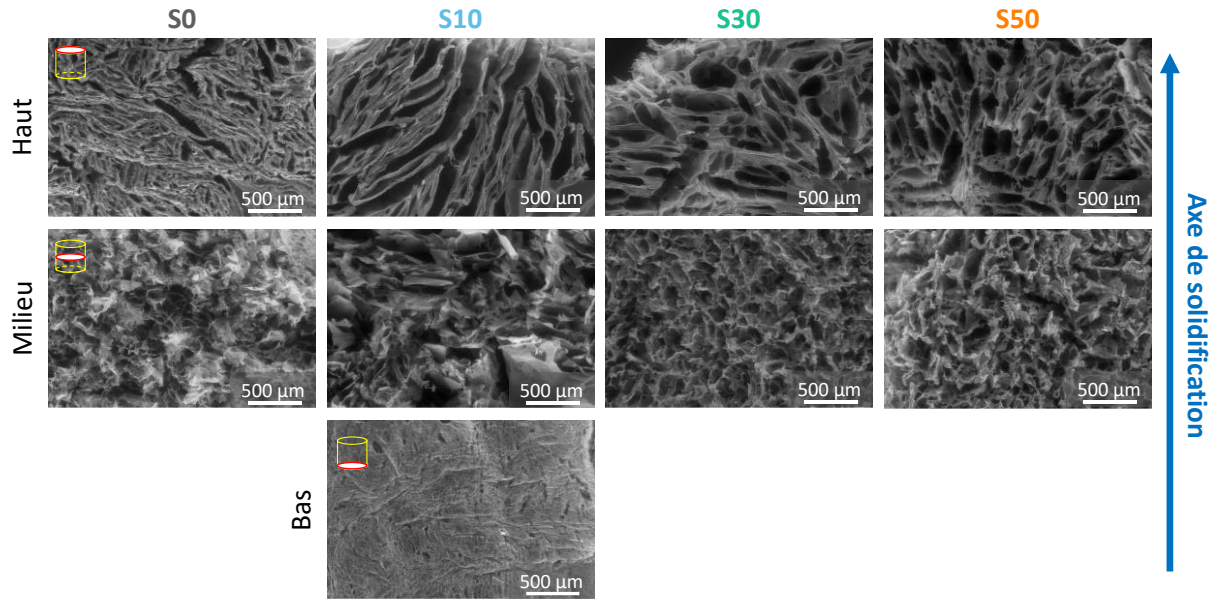


Figure 4.24 : Images MEB des coupes transversales médianes et hautes des scaffolds S0 à S50, et de la coupe basse de S10, observées à faible grossissement.

Des coupes longitudinales ont été réalisées numériquement au centre des scaffolds S10, S30 et S50 sur les images de tomographie X, et sont présentées Figure 4.25. Les hauteurs relatives exactes des différentes zones de porosité sont ici plus difficiles à déterminer et le manque de résolution empêche la comparaison directe avec les images MEB ; on retrouve néanmoins la structure poreuse graduelle orientée dans le sens de la congélation. La partie basse comporte une zone plus dense, constituée de petits pores, tandis que la zone supérieure comporte des pores lamellaires de plus grande taille. La partie plus organisée comportant des pores lamellaires larges est coupée de la zone d'intérêt choisie et n'est pas montrée ici.

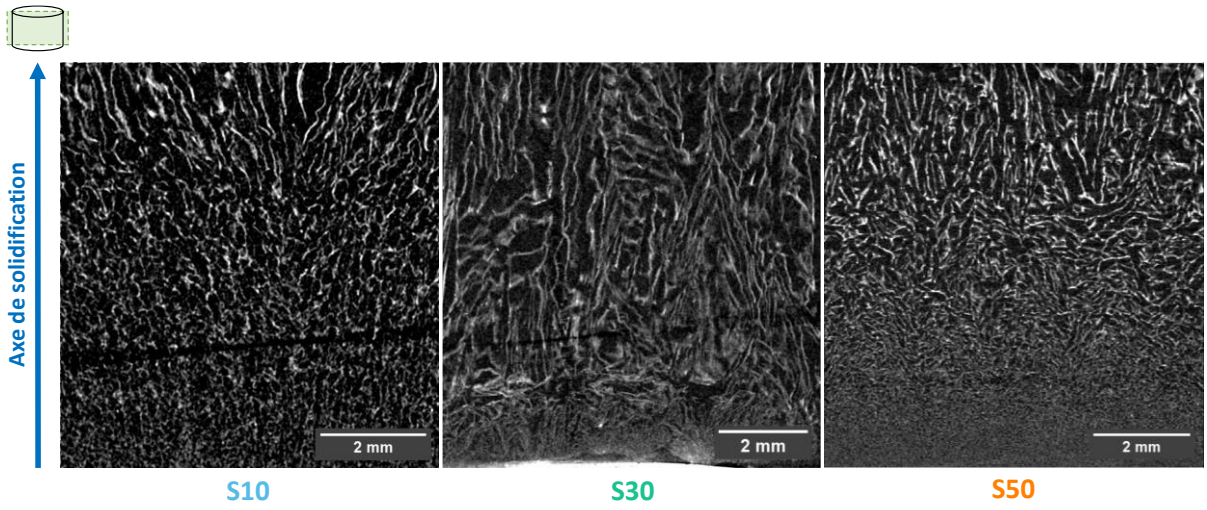


Figure 4.25 : Images des coupes longitudinales de tomographie X prises au milieu des scaffolds S10, S30 et S50 (celle du S0 étant trop peu contrastée pour analyse plus avancées). Les lignes blanches constituent les murs des pores et les zones noires la porosité. Les lignes horizontales larges noires observées pour S10 et S30 proviennent de pixels morts du détecteur, n'ayant pas pu être corrigés a posteriori.

Les différences de porosité entre scaffolds de composition différente seront quantifiées et discutées dans la partie IV.2.3.

IV.2.2 Evaluation quantitative de l'évolution de la porosité dans les scaffolds

Une structure à gradient de porosité dans l'axe de solidification a été mise en évidence par les images MEB et de tomographie X sur les coupes longitudinales des scaffolds. Dans le but de quantifier ces différences de porosité (et de tailles de pores), des analyses systématiques des coupes transversales dans les différentes zones de porosité (haut, milieu, bas) ont été réalisées. La Figure 4.26 présente une image de tomographie X associée à chacune de ces zones pour chaque scaffold. Les images du scaffold composé entièrement d'alginate (S0) sont peu contrastées. En effet, l'alginate étant peu dense et composé d'éléments légers, il est difficile d'appliquer un bon seuillage pour séparer les murs (constitués d'alginate) de l'air contenu dans la porosité. On retrouve le même type d'images de tomographie X pour des scaffolds alginate/chitosane dans l'article de Francis *et al.* [642]. De fait, les analyses d'images n'ont pas pu être réalisées pour l'échantillon S0. Pour les autres (*i.e.* S10, S30 et S50 ; S70 n'ayant pas été analysé en tomographie X), l'évolution de la taille des pores entre le bas et le haut du scaffold est bien visible. Sur la coupe inférieure, on distingue uniquement des petits points blancs (les murs) sur le fond noir (l'air dans la porosité). Pour S30, on repère déjà une organisation des murs, formant des lignes associées à des pores lamellaires. On peut supposer que pour cet échantillon la coupe numérique a été faite plus loin du bas de l'échantillon que pour les autres, donc qu'on regarde déjà une zone plus organisée située plus haut (selon la direction de congélation). Sur les images médianes, la formation de pores cellulaires (de forme plutôt arrondie) et lamellaires (pour S30) de

petite taille est visible, mais ceux-ci semblent encore désorganisés. Sur les images du haut néanmoins, la structure poreuse en lamelles est nette pour les trois scaffolds, présentant des pores allongés de largeur variable selon les échantillons.

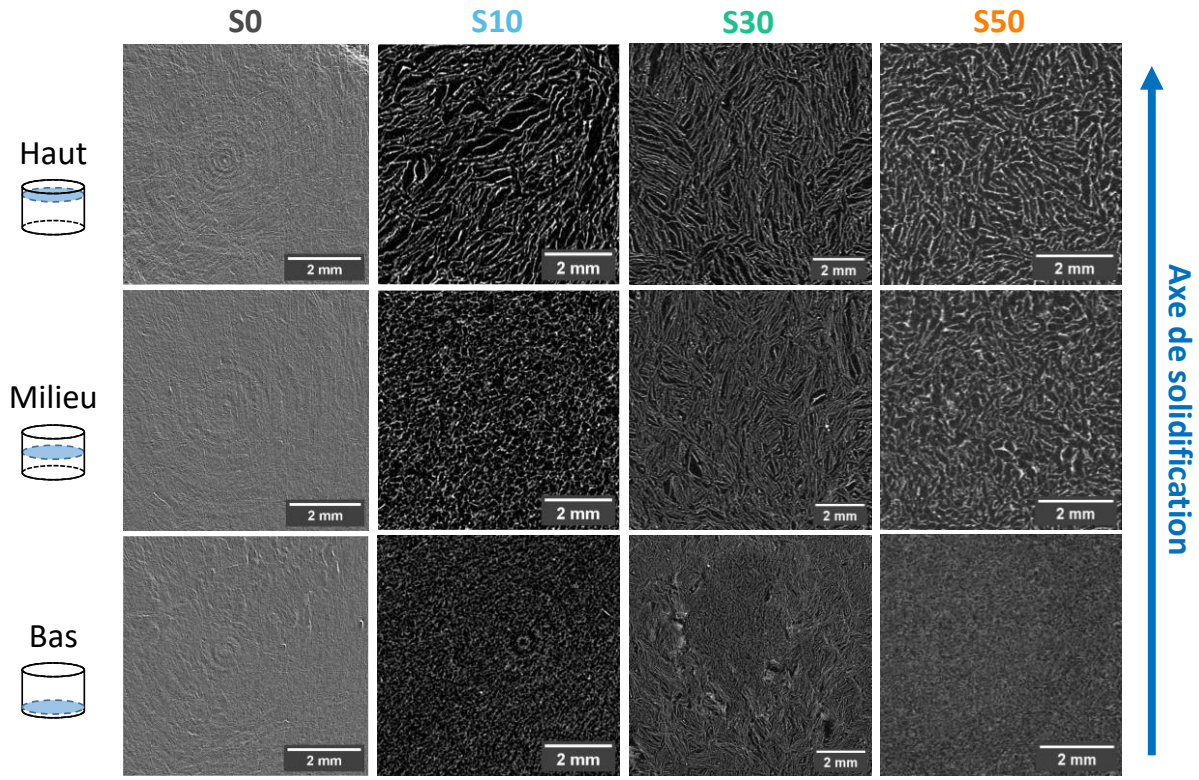


Figure 4.26 : Images des coupes transversales de tomographie X prises en bas, au milieu et en haut des scaffolds S0, S10, S30 et S50. Les cercles concentriques apparaissant sur les images de S0 et le bas de S10 sont dues au durcissement du faisceau (beam hardening) : le faisceau de rayons X utilisé pour la tomographie est conique, les épaisseurs de l'échantillon qu'il traverse sont donc différentes, ce qui peut parfois induire des défauts quand le contraste est faible.

A partir des coupes transversales réalisées numériquement tous les 100 µm sur les images de tomographie X, une analyse de la porosité a été réalisée. Pour cela, 5 images successives ont été sélectionnées pour chaque zone (bas, milieu, haut), puis un comptage des diamètres de Féret des pores a été réalisé avec ImageJ et la fonction *Analyze Particles*. Ce diamètre correspond à la distance maximale entre deux tangentes parallèles entre elles et à la forme du pore sur des côtés opposés, le contenant entièrement, et permet donc de s'affranchir de la forme du pore. Préalablement au comptage, un seuillage pour faire ressortir les murs de la porosité puis les fonctions *skeletonize* et *watershed* d'ImageJ ont été appliquées sur les images, pour redessiner de manière binaire les murs des pores et fermer la porosité, respectivement. De plus, les surfaces minimales et maximales à prendre en compte lors du comptage ont été bornées, à partir des tailles minimales et maximales des pores mesurées sur les images MEB de chaque zone (expliqué plus loin). Une fois que tous les diamètres de Féret ont été mesurés (entre 6000 et 19000 selon les zones), les valeurs sont reportées dans le logiciel Origin et des histogrammes de répartition sont tracés. Une loi log normale est appliquée aux histogrammes afin de modéliser la distribution, puis un diamètre de Féret moyen en est extrait, noté D_F. Il est comparé dans le Tableau 4.10 avec la moyenne arithmétique des valeurs brutes D, et avec la valeur de diamètre correspondant au maximum de la loi log normale (intervalle de diamètres le plus fréquent) D_M. La gamme des diamètres obtenus est aussi indiquée, ainsi que l'indice de polydispersité (PDI), calculé selon l'équation $PDI = \left(\frac{\sigma}{D_F}\right)^2$, avec σ l'écart-type de la loi log normale.

La méthode est détaillée plus précisément en Annexe V.7.6. Il faut noter que cette méthode permet une quantification des tailles des pores mais présente cependant de nombreuses imprécisions, provenant d'une part du seuillage appliqué avant l'analyse d'images, assez subjectif du fait du faible contraste entre les murs et les pores, et d'autre part du comptage numérique, pouvant aussi prendre en compte des défauts des images comme étant de la porosité.

Tableau 4.10 : Valeurs issues de l'analyse des coupes transversales de tomographie X. La gamme indiquée est celle des diamètres de Féret après comptage par ImageJ, les variables D, D_F et D_M correspondent respectivement à la moyenne arithmétique des diamètres de Féret mesurés, au diamètre moyen extrait de la modélisation par la loi log normale et au diamètre lié au maximum de cette loi (diamètre le plus fréquent). L'indice de polydispersité (PDI) est calculé comme indiqué dans le texte. N est le nombre total de diamètres mesurés.

SCAFFOLD	ZONE	GAMME (µm)	D (µm)	D_F (µm)	D_M (µm)	PDI	N
S10	Haute	35 – 1271	278 ± 142	301 ± 177	193	0,34	6103
	Médiane	18 – 680	223 ± 85	242 ± 109	184	0,20	8812
	Basse	17 – 568	193 ± 70	201 ± 78	163	0,15	11762
S30	Haute	40 – 1231	277 ± 149	319 ± 221	177	0,48	12095
	Médiane	25 – 1489	265 ± 141	286 ± 172	180	0,36	14292
	Basse	25 – 456	179 ± 69	205 ± 104	146	0,25	18927
S50	Haute	19 – 808	228 ± 105	247 ± 131	171	0,28	6913
	Médiane	73 – 776	235 ± 100	262 ± 143	177	0,30	6483
	Basse	19 – 341	143 ± 51	163 ± 79	119	0,23	13522

Les histogrammes par zone pour les scaffolds S10, S30 et S50 sont présentés sur la Figure 4.27. Les pores comptés lors de l'analyse sont identifiés par des numéros écrits en rouge sur les images en insert, la coloration de l'image donnant une information sur le nombre de pores considérés (et leur taille respective). Les distributions sont toutes monomodales, traduisant une morphologie dominante de pores. Celles des zones basses sont très centrées vers des petits diamètres de pores, se traduisant par un PDI plus bas (voir Tableau 4.10). Dans la zone médiane, les distributions s'élargissent vers les plus grands pores, il y a plus de diversité de taille de pores. Enfin, dans la zone haute les distributions sont encore plus larges, donnant des PDI plus élevés, contenant toujours une population de petits pores mais aussi beaucoup de grands. Globalement, du bas des scaffolds vers le haut, les distributions s'élargissent et se décalent vers les plus grands diamètres, ce qui coïncide avec les observations déjà faites sur les coupes longitudinales. Les diamètres de Féret D_F suivent cette tendance, et augmentent de bas en haut. En accord avec cela, pour les diamètres D_M (les plus fréquents par distribution), une augmentation est notable pour tous les scaffolds entre la zone basse et la zone médiane, mais pour la zone haute la tendance diffère : pour S30 et S50 le diamètre D_M diminue de nouveau, tandis qu'il augmente (mais peu) pour S10. Cela pourrait traduire l'apparition d'une petite porosité (avec de nombreux pores) dans la zone haute pour S30 et S50, potentiellement issue de germination secondaire de cristaux (liée à la durée de congélation élevée), qui semble moindre pour S10. La différence de réticulation/viscosité entre les scaffolds S30-S50 (élevée donc limitant les réorganisations des molécules d'eau et favorisant la formation de nouveaux points de germination) et S10 en est une explication potentielle.

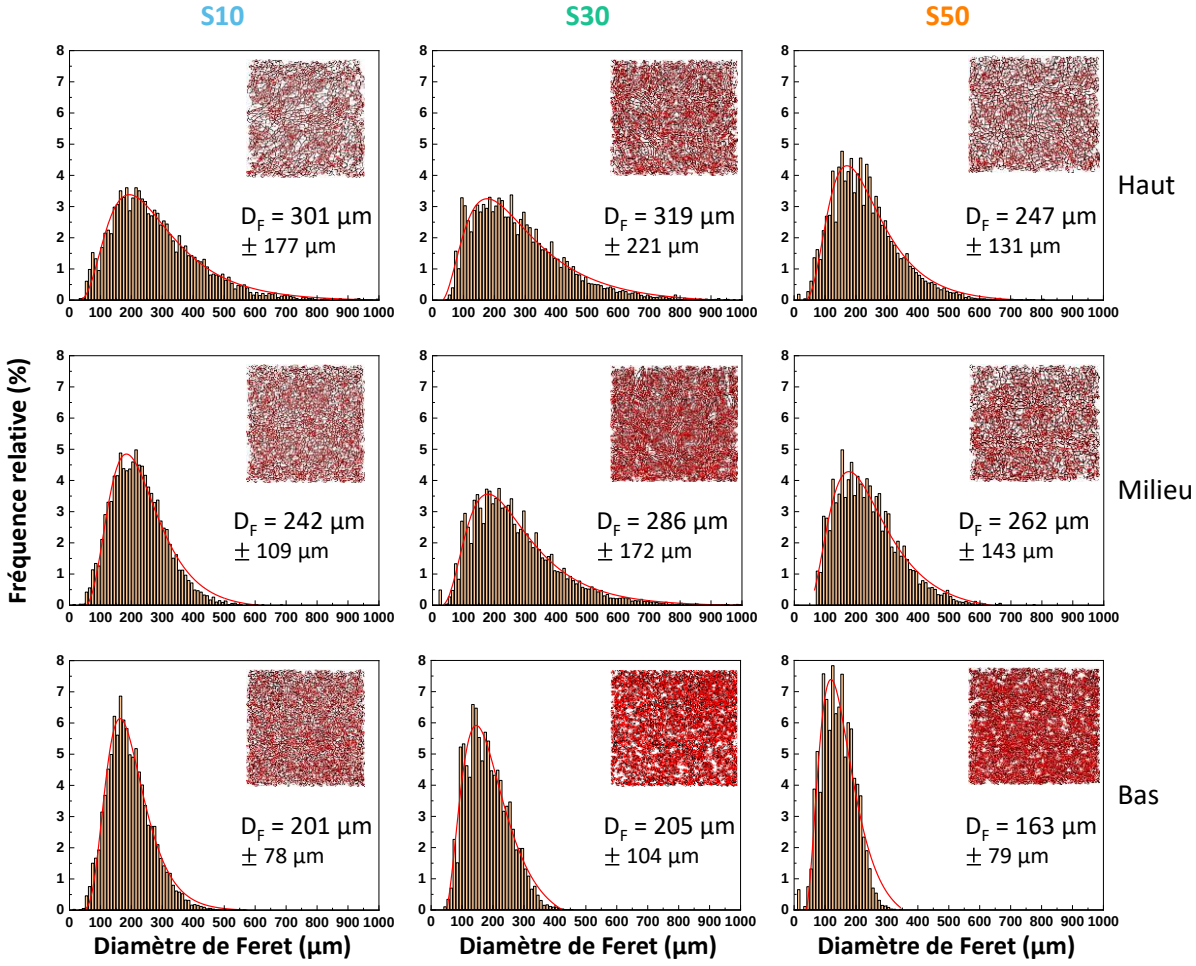


Figure 4.27 : Histogrammes de répartition des diamètres de Féret issus de l'analyse des images de tomographie X (5 images par zone). Le tracé de la loi log normale modélisant la distribution est en rouge. Les images en insert montrent les pores ayant été mesurés (numéro en rouge à l'intérieur du pore, la coloration de l'image donnant une idée de la taille et densité des pores). Les diamètres D_F sont ceux issus de la loi log normale (espérance de la loi ou moyenne), l'incertitude correspondant à l'écart-type de la loi.

La gamme des diamètres mesurés (Tableau 4.10) traduit l'élargissement des distributions : il y a des pores plus grands dans les parties hautes des scaffolds. Etonnamment, il reste toujours une population de petits pores dans toutes les zones (valeurs basses des gammes globalement du même ordre de grandeur quelle que soit la zone considérée), ce qui est corrélé aux variations du diamètre D_M détaillées plus haut.

Les courbes tracées sur la Figure 4.28 permettent de mieux visualiser l'évolution de ces valeurs. Même si les incertitudes sont élevées, des tendances se dégagent. Les évolutions des diamètres de Féret D_F et D_M suivants les zones ont la même allure : D_M et D_F augmentent globalement de bas en haut au sein des scaffolds. Pour les PDI, cette augmentation est très nette entre la zone basse et la zone médiane, traduisant l'apparition de cristaux de taille plus grande dans la zone médiane, la croissance des cristaux commençant à être favorisée par rapport à leur germination du fait d'un ralentissement de la vitesse du front de congélation. Entre les milieux et hauts, le PDI augmente pour S10 et S30, expliqué par la présence de pores de taille encore plus grande (toujours liée à la croissance des cristaux quand la vitesse de congélation ralentit). Pour S50, le PDI diminue et le diamètre moyen de Féret aussi mais faiblement. Les écarts-types étant très élevés, il est difficile de savoir si cette baisse est significative. On peut cependant penser à des phénomènes de surfusion des petits cristaux secondaires, qui

pendant la congélation coalescent pour en former des plus grands, resserrant ainsi la distribution de taille sur des diamètres plus grands. Les PDI restent inférieurs à 0,7, montrant que la répartition des diamètres des pores n'est pas considérée comme polydisperse (*i.e.* avec un PDI > 0,7, en accord avec l'ISO 22.412 : 2017) [663].

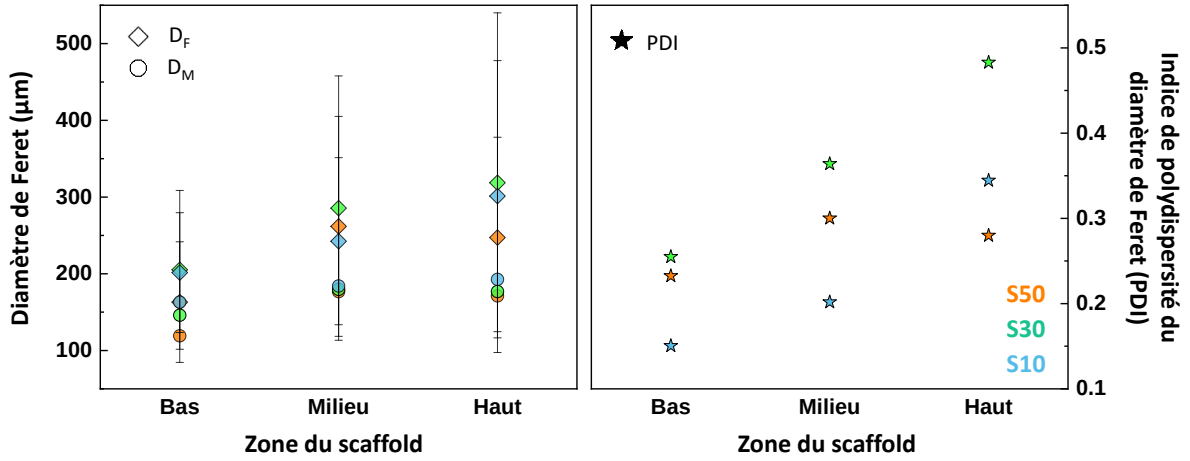


Figure 4.28 : Evolution des diamètres de Féret issus des images de tomographie X, D_F diamètre moyen ± l'écart-type de la loi log normale appliqué sur la distribution et D_M maximum de la loi (à gauche) et indice de polydispersité PDI (à droite), déterminés pour les zones basses, médianes et hautes des scaffolds S10 (bleu), S30 (vert) et S50 (orange).

Afin de confirmer ces tendances obtenues par tomographie X, des mesures de taille de pores ont été effectuées manuellement avec ImageJ sur les images MEB des coupes transversales, aux grossissements x20 ou x50, avec plus de 100 pores mesurés par échantillon. Les mesures sur images MEB ont une meilleure précision, du fait de la plus grande résolution de cette technique par rapport à la tomographie X, et les mesures manuelles permettent de s'assurer de la fiabilité des mesures (avec la certitude de mesurer uniquement des pores et pas des défauts) et de discriminer longueur et largeur le cas échéant. Cependant, comme les mesures sont manuelles le nombre de pores est moins conséquent, les images sont locales donc il peut y avoir des problèmes de reproductibilité et d'inhomogénéités (contre lesquels on essaye de se prémunir en réalisant les mesures sur 2 ou 3 images différentes) et une sous-estimation des tailles maximales et minimales liées à des biais humains (les pores les plus grands sortent de l'image donc ne sont pas pris en compte, et on a plus tendance à mesurer des grands pores bien définis que de la petite porosité en limite de résolution). A la différence des analyses par microscopie électronique, la tomographie X présente l'avantage de pouvoir réaliser des coupes numériques sans déformer ou écraser les pores. Il est donc important de mettre en regard les analyses faites à partir des images provenant des deux techniques, afin de s'assurer de la validité des mesures. La gamme des tailles de pores, leur largeur et longueur moyennes ainsi que l'épaisseur moyenne des murs sont présentées dans le Tableau 4.11 pour chaque zone des scaffolds S0 à S50 (comme expliqué précédemment, le scaffold S70 n'a pas pu être analysé car trop friable). Certaines cases sont vides car la morphologie des pores et/ou leur non-organisation ne permettaient pas de mesure.

Comme c'était le cas pour la tomographie X, les gammes de taille des pores augmentent entre la zone basse et la zone haute des échantillons, marquant la présence de plus gros pores en fin de congélation. Il y a une nette augmentation des longueurs moyennes entre la zone basse et la zone haute, variant entre 61 ± 35 µm en bas et 527 ± 63 µm en haut pour S10, ou 65 ± 36 µm et 371 ± 63 µm pour S30 ou encore 49 ± 12 µm et 357 ± 69 µm pour S50. Pour les largeurs, cette augmentation est moins marquée : 36 ± 23 µm en bas à 110 ± 20 µm en haut pour S10, 40 ± 22 µm à 110 ± 6 µm pour S30 et

31 ± 7 µm à 118 ± 9 µm pour S50. Cela s'explique par la forme lamellaire des pores, visible sur la Figure 4.24, formés par des cristaux ayant une croissance en longueur avec des largeurs limitées. En comparant ces valeurs à celles des diamètres de Féret issues de la tomographie X (Tableau 4.10, Tableau 4.11), on peut noter que les gammes de taille de pores sont similaires, hormis pour la valeur maximale de la zone basse, qui est systématiquement surestimée en tomographie X/sous-estimée par image MEB, *i.e.* pour les parties basses des scaffolds, des pores plus gros sont mesurés à partir des images de tomographie X que pour celles de MEB. Cela pourrait provenir du *binning* réalisé en tomographie X, couplant les pixels deux à deux pour augmenter la résolution, et donc augmentant artificiellement la taille des pores ; ou des biais dans la mesure manuelle des pores sur les images MEB (ne comptant pas les pores les plus grands dépassant de l'image), comme dit précédemment.

Tableau 4.11 : Gammes de taille, largeurs et longueurs moyennes des pores mesurés à partir des images MEB, pour les différentes zones des scaffolds S0 à S50.

SCAFFOLD	ZONE	GAMME DE TAILLE DES PORES (µm)	LARGEUR DES PORES (µm)	LONGUEUR DES PORES (µm)
S0	Haute	29 – 885	89 ± 18	275 ± 68
	Médiane			
	Basse			
S10	Haute	22 – 1141	110 ± 20	527 ± 63
	Médiane			
	Basse	16 – 111	36 ± 23	61 ± 35
S30	Haute	40 – 1146	110 ± 6	371 ± 63
	Médiane	14 – 577	67 ± 34	138 ± 22
	Basse	27 – 100	40 ± 22	65 ± 36
S50	Haute	26 – 1795	118 ± 9	357 ± 69
	Médiane			
	Basse	15 – 115	31 ± 7	49 ± 12

La Figure 4.29 compare les diamètres de Féret et les longueurs des pores (issus des analyses par tomographie X et par MEB respectivement). Les valeurs se recoupent toutes dans la gamme des incertitudes, et les tendances d'évolution de la taille des pores entre le bas et le haut des échantillons est confirmée. Mais on peut noter une surestimation globale du diamètre de Féret pour la zone basse, liée probablement comme expliqué précédemment au manque de résolution de la tomographie X, qui ne prend pas en compte les plus petits pores.

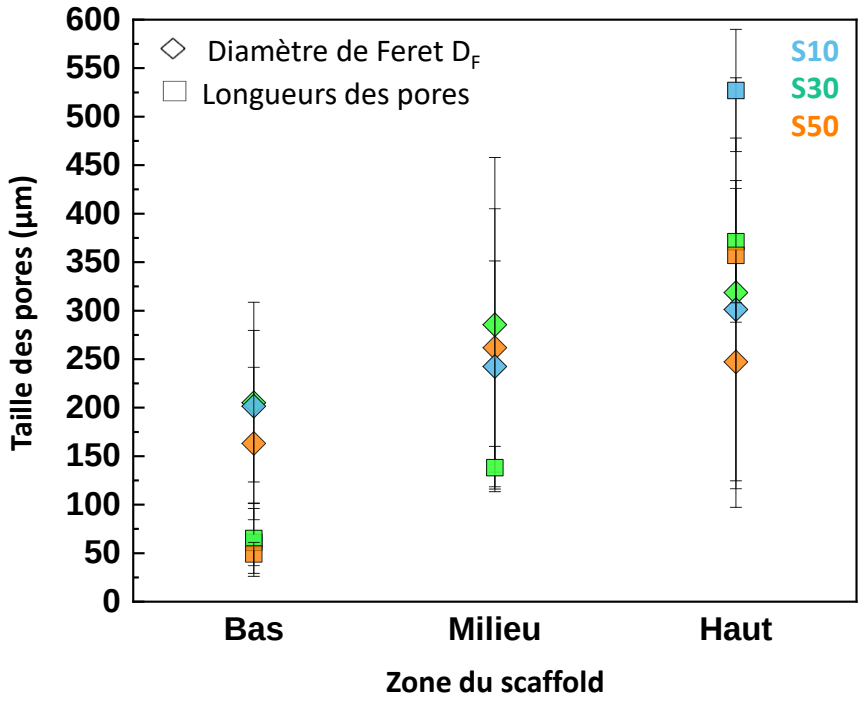


Figure 4.29 : Comparaison entre les diamètres de Féret D_F (issus des images de tomographie X) et des longueurs de pores mesurées sur les images MEB, pour chaque zone des scaffolds S10 à S50.

Ces deux techniques (MEB et tomographie X) nous donnent une estimation de la taille des pores créés par la croissance des cristaux de glace pendant le freeze-casting. Mais les images MEB à fort grossissement du scaffold S0 (Figures 4.30a et 4.30b) montrent qu'il existe en plus une petite porosité, sous forme de trous circulaires dans les murs des pores, dirigée perpendiculairement à la direction de solidification. Ces trous ont un diamètre moyen de 19 $\pm$ 6 µm (mesurés par ImageJ sur 40 trous). Ils sont liés à l'eau piégée par l'alginate, fortement liée à ses chaînes et donc ne pouvant pas se réorganiser sous forme de cristaux de glace, laissant ainsi une empreinte circulaire après sublimation [594]. Ces petits pores circulaires sont moins visibles pour les autres scaffolds, mais ils sont quand même présents, comme l'attestent les Figures 4.30c et 4.30d. La morphologie de ces macropores intra-mur est un peu différente, ils sont plus allongés. En effet, leur longueur a été estimée à 37 $\pm$ 7 µm et leur largeur à 14 $\pm$ 3 µm (mesures sur 6 pores avec ImageJ). L'augmentation de la taille de cette porosité intra-mur pourrait s'expliquer par la réticulation croissante de l'alginate quand le taux de charge augmente : les chaînes de polymère sont moins mobiles, donc elles piègent plus de molécules d'eau qui ne peuvent pas se réorganiser et cristalliser, entraînant après sublimation de la glace des macropores de taille plus grande dans les murs. La réticulation étant concomitante à la congélation (*cf.* Tableau 4.5), cet effet est d'autant plus marqué au fur et à mesure que le front de solidification progresse, ce qui explique que cette macroporosité intra-mur soit uniquement visible sur les parties hautes des scaffolds.

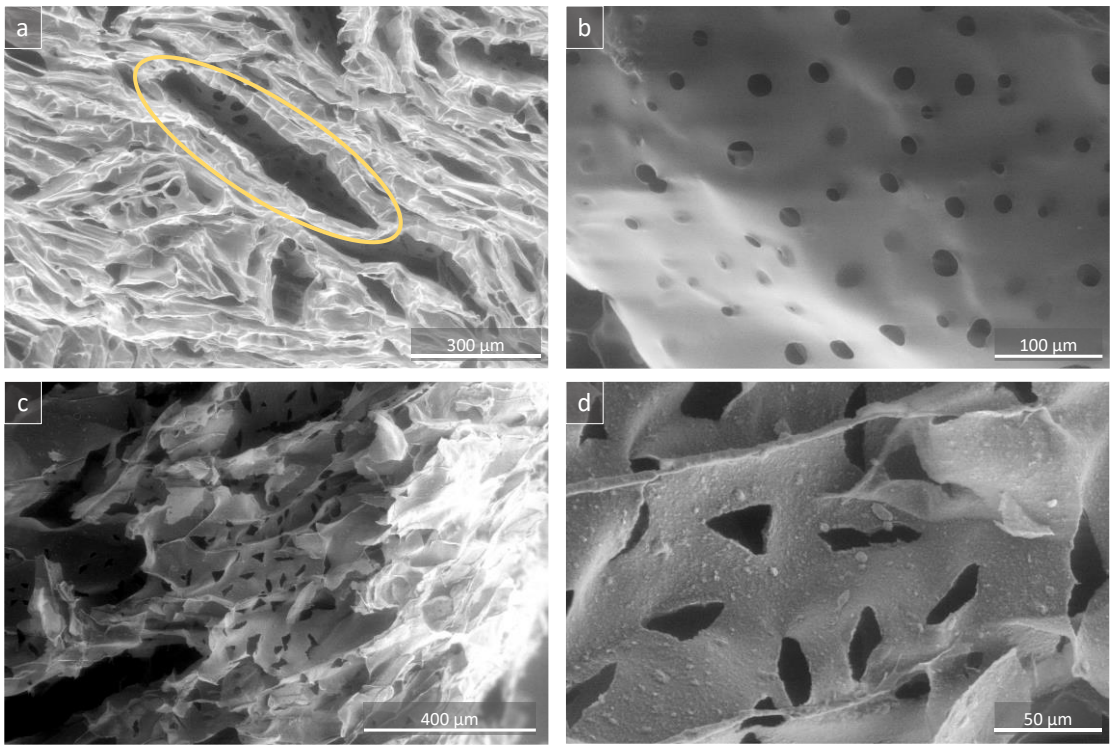


Figure 4.30 : Images MEB du scaffold S0 (a et b) et S50 (c et d). (a) Vue de dessus (haut) du scaffold S0, l'ovale jaune dessiné met en évidence des trous circulaires présents dans la paroi du mur. (b) Image à plus fort grossissement du haut d'une coupe longitudinale de S0, agrandie sur les trous présents dans un mur. (c) Image du haut d'une coupe longitudinale du scaffold S50. (d) Image à plus fort grossissement de cette même coupe de S50, montrant les trous allongés présents dans les murs des pores.

En complément des techniques d'imagerie 2D et 3D, la porosimétrie mercure, donne des informations sur les pourcentages de porosité globale (comparés à ceux issus de la tomographie X dans le Tableau 4.12) et permet d'accéder à une distribution de taille des pores, présentée sur la Figure 4.31. Les pics principaux des courbes, correspondant aux diamètres les plus fréquents des échantillons, sont reportés dans le Tableau 4.12, montrant que des pores de taille variant entre 3 µm et 136 µm sont présents. La première colonne du Tableau 4.12 met en évidence une petite porosité (D_1), non visible par MEB et tomographie X, de 3 µm en moyenne. Le volume incrémental de mercure pour cette valeur (Figure 4.31) est très faible et la distribution est assez large, montrant une répartition assez polydisperse, qui doit correspondre à la petite porosité contenue dans les murs. Pour le reste de la distribution, les courbes sont étalées et présentent pas/peu de pics marqués. Cette technique étant globale et prenant en compte tout le volume, la grande dispersion peut provenir des différences de porosité discutées précédemment entre le bas, dense et désorganisé, et le haut de l'échantillon, avec des pores lamellaires de plus grande taille. Les autres pics sont centrés autour de 42 – 50 µm (D_3) et 75 – 89 µm (D_4), en accord avec des largeurs et longueurs de pores (MEB). Au regard des mesures réalisées par MEB et tomographie X, il semble étonnant de prime abord qu'aucun pic associé aux pores de plus grande taille (200 – 300 µm) ne soient visibles ici ; le seul de grand diamètre étant celui à 136 µm pour S0. C'est une des limites de cette technique : les pores des scaffolds S10 à S50 possèdent probablement des murs trop fins pour résister à la pression appliquée lors de l'intrusion du mercure [664]. Ils sont alors probablement délaminés et ne sont pas comptabilisés en tant que pores dans la distribution des diamètres. De plus, la taille maximale des pores mesurables est limitée par la hauteur de l'échantillon (ici < 1 cm), de par l'écart de pression exercée par le poids de la colonne de mercure entre le haut et le bas de l'échantillon [665]. Une autre limite vient de l'utilisation d'un modèle de pores cylindriques pour l'analyse et l'extrapolation des données en sortie de mesure de porosimétrie Hg, ce

qui n'est pas forcément adapté à un système lamellaire tel que le nôtre et peut fortement influer sur les résultats obtenus [666].

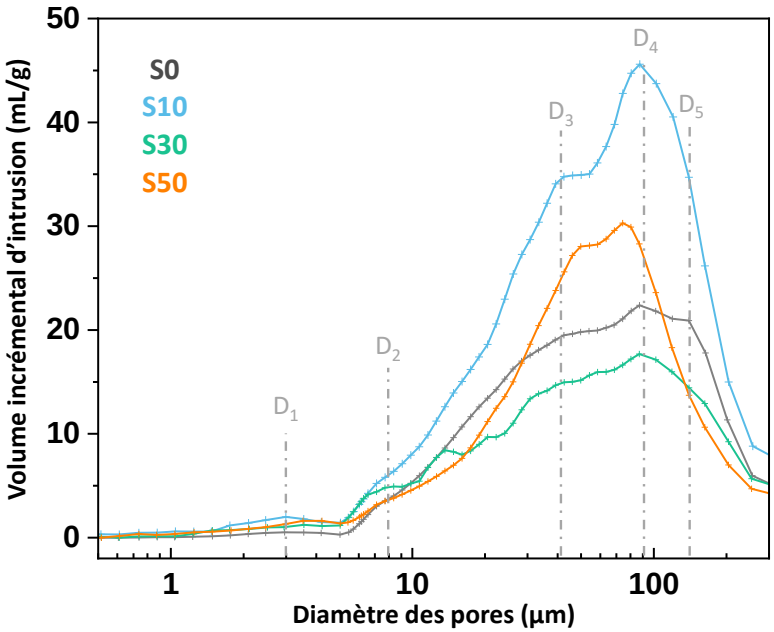


Figure 4.31 : Distribution de la taille des pores déterminée par intrusion de mercure pour les scaffolds S0 à S50, les différentes tailles D_1 à D_5 de S0 présentées dans le Tableau 4.12 sont identifiées sur le graphique.

Tableau 4.12 : Diamètre des pores correspondant aux principaux pics présents dans la distribution provenant de la porosimétrie par intrusion de mercure, pour les scaffolds S0 à S50.

SCAFFOLD	DIAMETRE DES PORES				
	D_1 (µm)	D_2 (µm)	D_3 (µm)	D_4 (µm)	D_5 (µm)
S0	3	7	43	87	136
S10	3	7	42	87	
S30	4	6		89	
S50	4		50	75	

Pour résumer les informations précédemment obtenues, les scaffolds S0 à S50 présentent donc une structure poreuse graduelle, avec une petite porosité dans la partie basse du scaffold (en contact avec le doigt froid, pour une vitesse de congélation plus rapide) et une porosité plus grande et plus dispersée dans la partie haute. Les diamètres de Féret issus des coupes de tomographie X sont compris entre 17 µm et 1489 µm, pour des diamètres moyens entre 163 ± 79 µm et 319 ± 221 µm selon les zones et les échantillons. Les longueurs et largeurs des pores mesurés sur les images MEB sont comprises dans la gamme 17 – 1489 µm, pour des longueurs moyennes entre 61 ± 35 µm et 527 ± 63 µm et des largeurs moyennes entre 31 ± 7 µm et 118 ± 9 µm. Une porosité intra-mur est aussi observée, dont la taille (14 – 37 µm) varie avec le taux de réticulation. Avec le même dispositif et le même gradient de température mais pour des solutions de nanoparticules de bioverre greffées/PLGA dans du carbonate de diméthyle (DMC), des diamètres de Féret équivalents ont été obtenus par Lagarrigue *et al.* [610] : 293 ± 55 µm pour la zone médiane. La gamme des diamètres est plus restreinte que celle que nous avons obtenue (183 – 776 µm), avec moins de petits pores. Pour les analyses MEB, les longueurs

moyennes de 380 ± 55 µm sont équivalentes. On ne peut pas comparer les largeurs, car les pores obtenus avec le DMC ont une morphologie tubulaire différente de celle lamellaire créée par les cristaux de glace. Avec un scaffold composé uniquement d'alginate et d'eau (comme S0) et avec une vitesse de congélation (- 0,36 °C/min) proche de la nôtre (- 0,1 °C/min), les tailles de pores sont aussi similaires (110 ± 30 µm en bas, 210 ± 80 µm en haut) [650]. Quand des nanoparticules de bioverres sont ajoutées à un système alginate/eau, les pores sont légèrement plus gros (100 – 300 µm) [646]. Pour des applications de substitution osseuse, il est important d'avoir un réseau de pores tridimensionnel interconnecté permettant une colonisation cellulaire, angiogenèse et transport de nutriments et déchets [667]. Les macropores doivent donc être suffisamment grands pour accommoder les cellules (100 – 500 µm) [53], ce qui est le cas en moyenne pour les scaffolds élaborés ici. Une plus petite porosité va augmenter la surface spécifique et ainsi favoriser la dégradation, l'inter-diffusion des espèces ioniques et (bio)moléculaires et leur interaction avec les cellules. La présence d'une plus grande porosité, comme c'est le cas ici, va accélérer la dégradation du scaffold et la libération des charges minérales bioactives des murs des scaffolds [585]. Le gradient et l'orientation de la porosité, obtenus avec ce dispositif de freeze-casting, peuvent être requis pour des applications spécifiques pour lesquelles une régénération dirigée du tissu est nécessaire, comme à une interface os/cartilage par exemple [667]. De plus, ils peuvent permettre de conserver des propriétés élastiques lors d'une déformation et d'avoir une bonne récupération après [585]. L'hétérogénéité de la porosité peut enfin être bénéfique pour stimuler la réparation de l'os [585].

IV.2.3 Discussion de l'effet chimique des charges sur la porosité et les murs

Les scaffolds S0 à S50 possèdent des tailles de pores adaptées à des applications de substitution osseuse (le S70 mis à part car trop friable pour être manipulé et soumis à des caractérisations plus poussées). Cependant, en fonction de la quantité de charges inorganiques (Alg-PyACC) présentes dans la suspension initiale, la porosité diffère. C'est ce qui est étudié dans cette sous-partie.

Les largeurs et longueurs moyennes des pores sont tracées sur la Figure 4.32 en fonction de la zone du scaffold, avec un zoom sur les largeurs sur le graphique de droite. Il y a peu de différences entre les largeurs et longueurs moyennes des différents scaffolds dans la zone basse, ce qui est dû à la formation de la zone dense induite par le fort gradient de température au contact du culot inférieur, peu dépendante donc de la composition de la suspension. On peut néanmoins observer une légère diminution de la longueur des pores pour S50. Dans la zone médiane, le MEB ne permet pas de conclure (uniquement des points pour le S30) tout comme la tomographie X Figure 4.28 à cause des incertitudes élevées. Pour la partie haute cependant, des différences sont observables entre les scaffolds chargés en Alg-PyACC. En effet, la longueur des pores diminue de S10 à S50, passant de 527 ± 63 µm (S10) à 357 ± 69 µm (S50). Au contraire, la largeur des pores augmente légèrement pour S50 (118 ± 9 µm) par rapport à S30 ou S10 (110 ± 20 µm). Les mêmes tendances sont observées en tomographie X telles que reportées dans le Tableau 4.10 (D_F = 247 ± 131 µm pour la partie haute de S50 et D_F = 301 ± 177 µm pour S10), malgré de hautes incertitudes. Ces différences peuvent s'expliquer par la réticulation des chaînes de polymère par les cations Ca^{2+} libérés par les particules d'Alg-PyACC (détaillé dans le paragraphe IV.1), et l'augmentation de viscosité qui en découle, renforcée par la plus forte concentration en charges inorganiques. Quand la réticulation augmente (de S10 à S50), les chaînes d'alginate sont moins mobiles, bloquant le mouvement des molécules d'eau pour se réorganiser en cristaux de glace et le rejet des particules par le front de solidification [594]. Les cristaux (et donc pores, après sublimation de la glace) formés sont plus petits et plus ovales, ce qui explique la diminution de longueur mais l'augmentation de largeur des pores de S50. Pour S10, les tailles de pores sont maximales : il y a un début de réticulation de l'alginate mais limité (car peu de calcium disponible), donc la viscosité n'est pas trop élevée. Les chaînes sont moins mobiles, ce qui

diminue la vitesse du front de congélation, favorisant la croissance de gros cristaux. C'est en accord avec les hauteurs relatives des différentes zones d'organisation de la porosité (Tableau 4.9) mises en évidence sur les coupes longitudinales des scaffolds Figure 4.23), le scaffold S10 ayant une zone de porosité désorganisée non lamellaire de hauteur relative plus faible (14 %) que S30 et S50 (23 % pour les deux), montrant un début de croissance lamellaire des pores plus anticipé pour S10. Enfin, pour S0 ne contenant pas de particules d'Alg-PyACC, les tailles de pores mesurées en MEB sont inférieures à celles des autres scaffolds, mais il n'y a pas de données de tomographie X permettant de confirmer ces résultats. Devant le peu de valeurs et sachant que le scaffold se déforme facilement à la découpe avec le scalpel, il est difficile de conclure sur ce point pour l'échantillon S0 (sans charge inorganique).

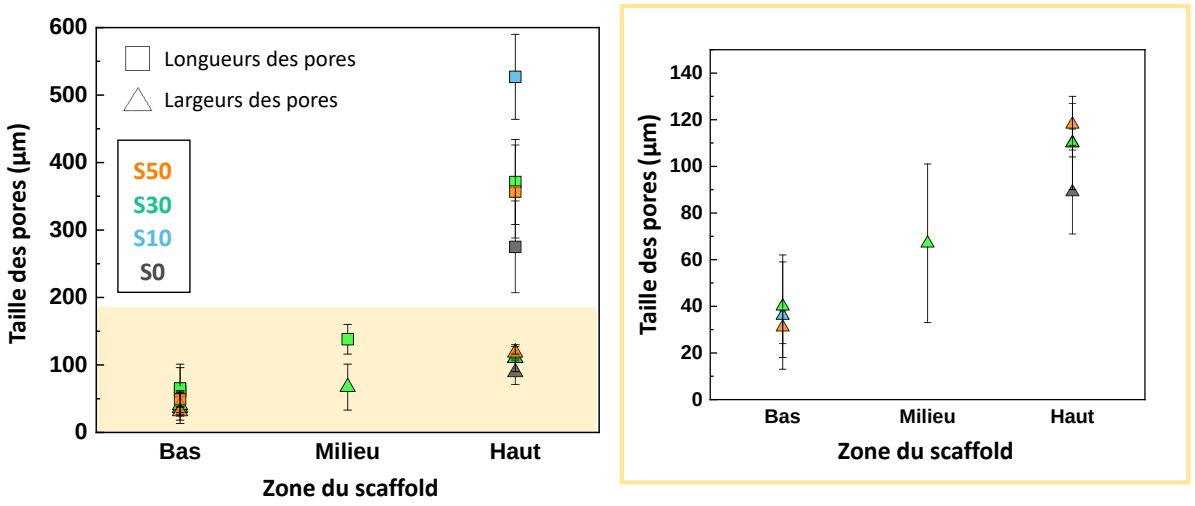


Figure 4.32 : Largeurs et longueurs moyennes de pores mesurées sur les images MEB en fonction de la zone du scaffold analysée (basse, médiane ou haute), pour les scaffolds S0 à S50 (à gauche). Le graphique de droite présente uniquement les largeurs des pores, pour un zoom dans le rectangle jaune du graphique de gauche, permettant de distinguer les différences entre elles.

Les épaisseurs de murs, présentées dans le Tableau 4.13, ont été mesurées sur les parties hautes des scaffolds (vue de dessus), sur 15 – 20 murs au grossissement x100. Les murs de S0, S10 et S30 ont des épaisseurs très similaires (entre 42 $\pm$ 21 µm et 46 $\pm$ 21 µm). C'est en accord avec Zmora *et al.* [650] ayant des murs de 43 $\pm$ 26 µm pour des scaffolds composés de solution d'alginate à 2 % mass. et congelés à une vitesse de - 0,36 °C/min, proche de celle que nous avons utilisée (- 0,1 °C/min). Pour S50 cependant les murs ont une épaisseur nettement plus faible (27 $\pm$ 14 µm), qui peut s'expliquer par la réticulation de l'alginate décrite précédemment, entraînant plus de germination donc des pores plus petits et plus nombreux, et par conséquent des murs plus fins. Il a aussi été montré dans la littérature qu'une quantité de charges plus élevée augmentait le nombre de germes potentiels pour la germination des cristaux de solvant et donc augmentait *in fine* le nombre de pores [594].

Tableau 4.13 : Epaisseur des murs des pores des scaffolds S0 à S50, mesurées avec ImageJ sur les images MEB des parties hautes des scaffolds.

SCAFFOLD	EPAISSEUR DES MURS (µm)
S0	42 $\pm$ 21
S10	46 $\pm$ 21
S30	43 $\pm$ 14
S50	27 $\pm$ 14

V INFLUENCE DU TAUX DE CHARGE SUR LES PROPRIETES MECANIQUES DES SCAFFOLDS

Les propriétés mécaniques des scaffolds sont prépondérantes, pour permettre la manipulation avant l'opération chirurgicale sans effondrement de la porosité et une bonne récupération après déformation élastique. Le taux de charge peut faire varier de manière significative ces propriétés, renforçant la matrice polymérique pour augmenter sa résistance en compression mais diminuant la cohésion du matériau au-delà d'un certain taux, et/ou si les charges ne sont pas réparties de manière homogène dans la matrice.

V.1 REPARTITION SPATIALE DES CHARGES DANS LES SCAFFOLDS

Des volumes de petite taille ont été reconstruits à partir des images de tomographie X, dans les parties haute, médiane et basse des scaffolds S0 à S50 (Figure 4.33). On retrouve la structure à gradient de porosité discutée dans les paragraphes précédents, avec des matériaux moins denses dans la partie haute et avec des pores de plus grande taille. La morphologie lamellaire est bien visible dans cette partie haute, en particulier pour S10 et S30. Les cubes de la partie basse de S30 et S50 paraissent très inhomogènes et montrent une structure très granulaire, témoignant d'une sédimentation. Celle-ci n'est pas visible pour S10, contenant peu de charges, mais elle est exacerbée pour S50 (par rapport à S30).

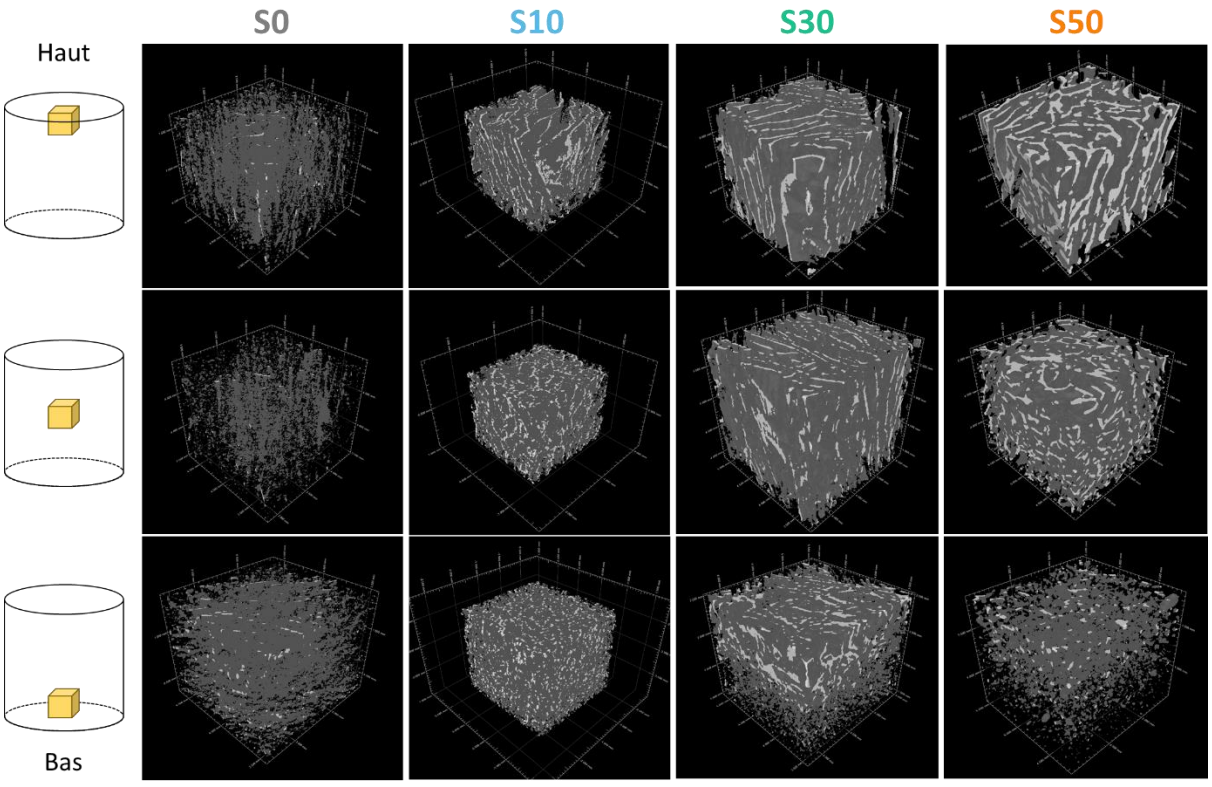


Figure 4.33 : Images 3D des scaffolds S0 à S50 obtenues par tomographie X, pour des petits volumes reconstruits situés en haut, au milieu et en bas des scaffolds complets (dont la position est représentée sur le schéma à gauche des images).

La sédimentation est aussi visible sur les images MEB du bas des scaffolds (vue de dessous) en Figure 4.34. En comparaison au scaffold constitué uniquement d'alginate (S0), qui a une zone inférieure homogène uniquement composée de chaînes de polymère organisées en réseau fibreux très dense,

S70 a une structure très inhomogène. On peut distinguer sur l'image à plus fort grossissement (Figure 4.34d) plusieurs composants : des murs très lisses formés par l'alginate seul, identifiés par l'astérisque jaune sur l'image, coexistant avec des murs composites alginate/Alg-PyACC et des agglomérats de particules d'Alg-PyACC sans polymère, identifiés par les symboles « + » rouges.

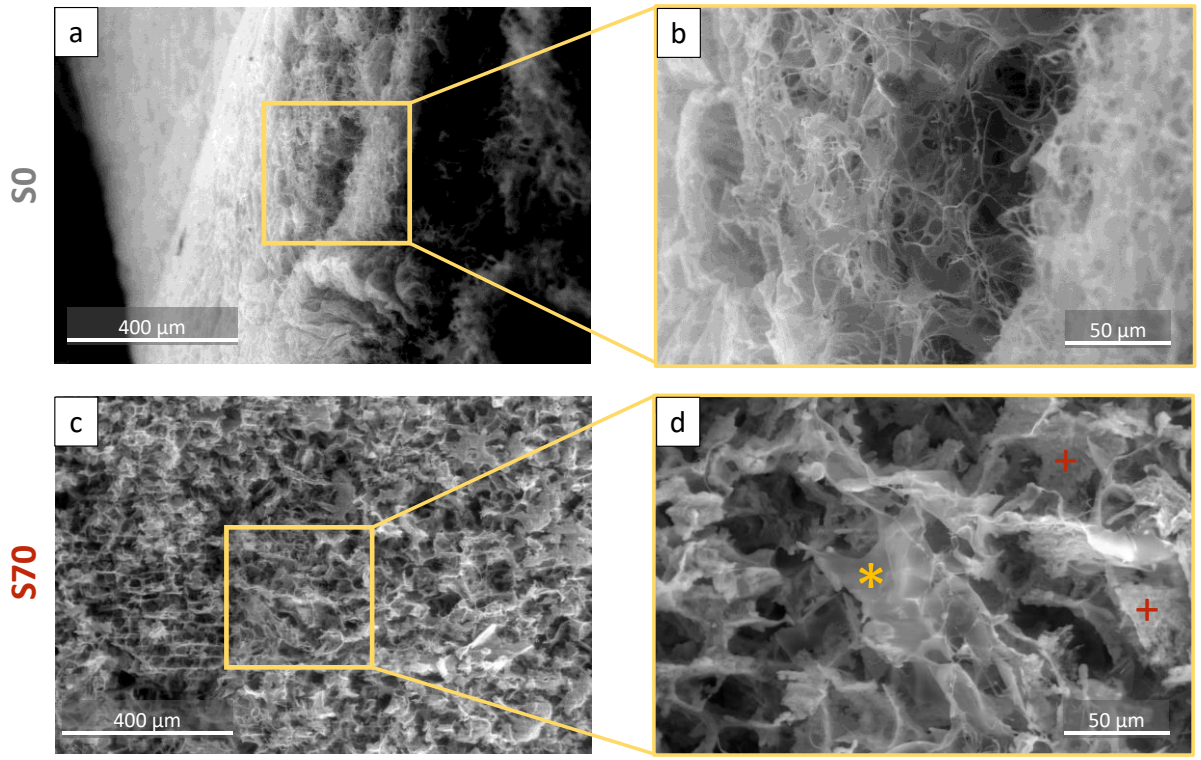


*Figure 4.34 : Images MEB des parties basses (vue de dessous) des scaffolds S0 (a et b) et S70 (c et d). Les images b et d correspondent à des observations à plus fort grossissement des zones dans les carrés jaunes des images a et c respectivement. Sur l'image d, l'astérisque * jaune désigne un mur d'alginate, tandis que les symboles « + » rouges montrent des agrégats de particules d'Alg-PyACC.*

Les images de MEB-FEG (Figure 4.35) illustrent la répartition des charges dans les murs d'alginate, pour la partie médiane des scaffolds (donc ne montrant pas la sédimentation de la partie basse). Sur l'image à fort grossissement de S0, on distingue des petits trous dans le mur, correspondant à une très petite porosité (< 100 nm) créée par l'emprisonnement de molécules d'eau par l'alginate (liaisons hydrogène et de Van der Waals). Pour S10, les particules de 100 nm en moyenne sont bien réparties dans la matrice, et ne semblent pas former d'agrégats. Certains agrégats sont par contre visibles sur l'image de S30, de 2 à 5 µm en moyenne, mais globalement les charges sont dispersées sur toute la surface du mur. A partir de S50, les hétérogénéités de répartition des charges augmentent : des agrégats plus gros sont visibles, moins de particules individualisées de 100 nm sont présentes, ce qui est aussi probablement lié à la sédimentation montrée par tomographie X (concentrant les particules sur le bas du scaffold). Pour S70, le taux de charge est tel qu'il y a une perte de cohésion, visible à l'échelle macroscopique par l'effritement du scaffold et les difficultés à réaliser des découpes et observations MEB avec cet échantillon. La quantité d'alginate est trop peu importante pour maintenir la cohésion entre les charges, qui forment des agglomérats.

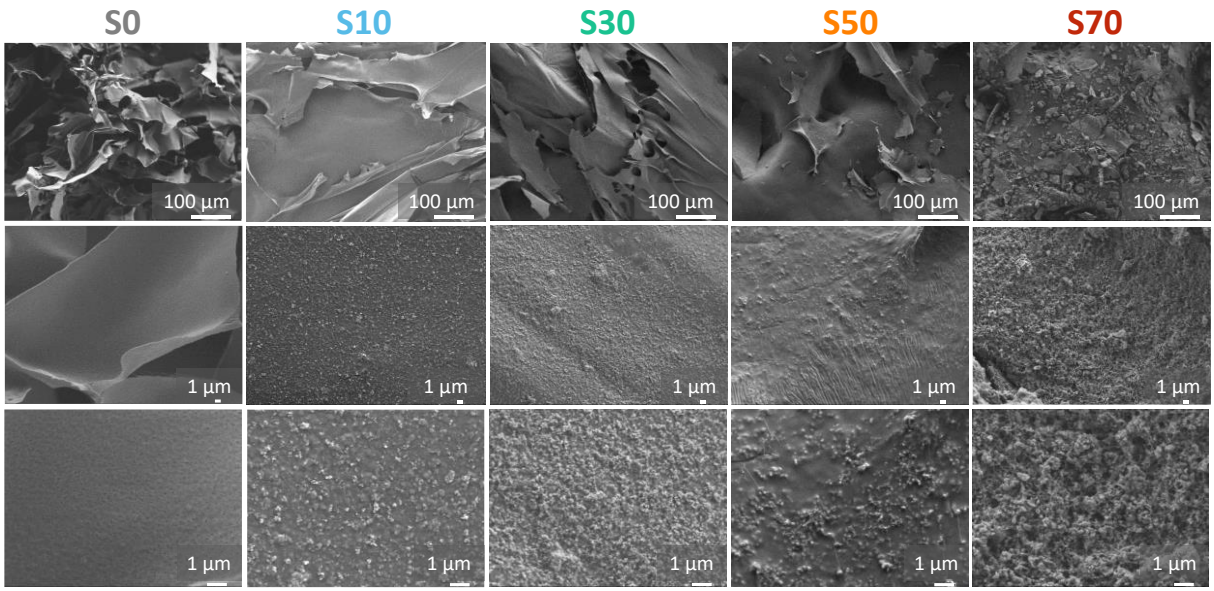


Figure 4.35 : Images de MEB-FEG des murs de la partie médiane des scaffolds S0 à S70, pour des grossissements faibles (images du haut), moyens (images du milieu) et forts (images du bas).

La répartition des charges inorganiques dans les murs peut impacter les propriétés mécaniques des scaffolds, jouant sur leur cohésion macroscopique et la résistance mécanique [610,614,646,651], cela sera abordé dans la partie suivante V.2. Mais la dégradation du scaffold et donc son évolution *in vitro* et *in vivo* est aussi dépendante de la distribution de particules inorganiques dans son volume, qui en formant des agrégats peuvent constituer des zones préférentielles de dégradation [614], tout comme sa bioactivité en contact avec les cellules [667].

V.2 ESSAIS MECANIQUES

Afin d'évaluer l'influence du taux de charge sur les propriétés mécaniques des scaffolds, des essais de compression uniaxiale selon l'axe de solidification ont été effectués sur les scaffolds S0, S10, S30 et S50 (le S70 étant écarté car trop friable), pour 4 échantillons par composition (excepté S50 en triplicat). L'essai est décrit en Annexe V.7.7.

La courbe de déformation-contrainte classique pour un scaffold est présentée sur la Figure 4.36, les calculs pour passer des forces et déplacements aux contraintes et déformations sont expliqués en détail dans l'annexe. Sur ces courbes, on peut différencier trois domaines [668] :

- Le domaine élastique (zone I), correspondant à la pente initiale et donnant la valeur du module d'élasticité ou de compression, pendant lequel les murs sont fléchis de manière réversible ;
- Le domaine de déformation visco-plastique (zone II), après le changement de pente, souvent constitué d'un plateau correspondant au flambement progressif des murs, associé parfois en fin de domaine à une densification, pendant laquelle les murs s'écrasent les uns contre les autres avec un effondrement de la porosité (flambage) ;
- Enfin, la décharge (diminution de la contrainte), qui a lieu en fin d'essai (zone III) quand la compression est stoppée après avoir atteint 10 N.

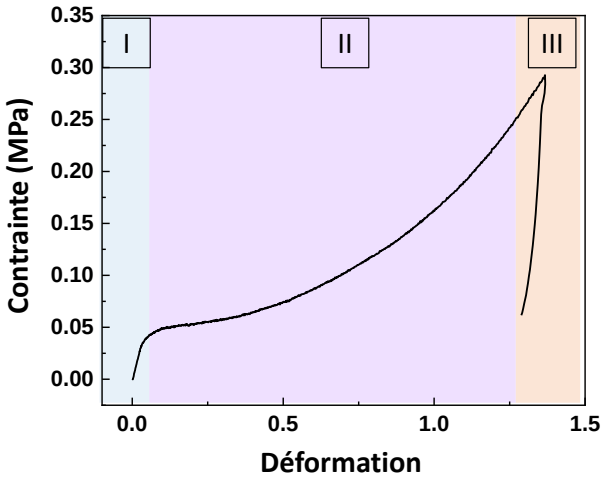


Figure 4.36 : Courbe contrainte-déformation classique mettant en évidence les différents domaines : la zone I est le domaine élastique, la zone II le domaine de déformation visco-plastique, et la zone III la décharge.

La Figure 4.37 présente les courbes de tous les réplicats par type de scaffolds. Les pentes initiales sont similaires pour chaque type de scaffold. Par contre, les allures de la transition domaine élastique-domaine plastique diffèrent entre les réplicats du même type de scaffolds. Certaines tendances se dégagent des courbes contrainte-déformation malgré tout. Le domaine élastique s'étend sur une large plage de déformation pour S0, et celle-ci devient de plus en plus faible, *i.e.* s'étend sur une plage de déformation plus restreinte, quand des charges sont ajoutées (de S10 à S50) : pour une même contrainte, la déformation diminue de S10 à S50. Cette tendance va de pair avec une augmentation notable de la pente élastique. Cet effet provient de l'augmentation de la rigidité des chaînes d'alginate dans le composite comparée à celle de l'alginate seul [647], bloquées par les particules d'Alg-PyACC et leur réticulation par Ca^{2+}, et ainsi retardant le flambage [614]. Les mêmes tendances ont été obtenues dans la littérature, avec l'ajout de particules d'apatite dans une matrice de PLGA [614] ou de verre bioactif avec du PLGA et PDLLA [669].

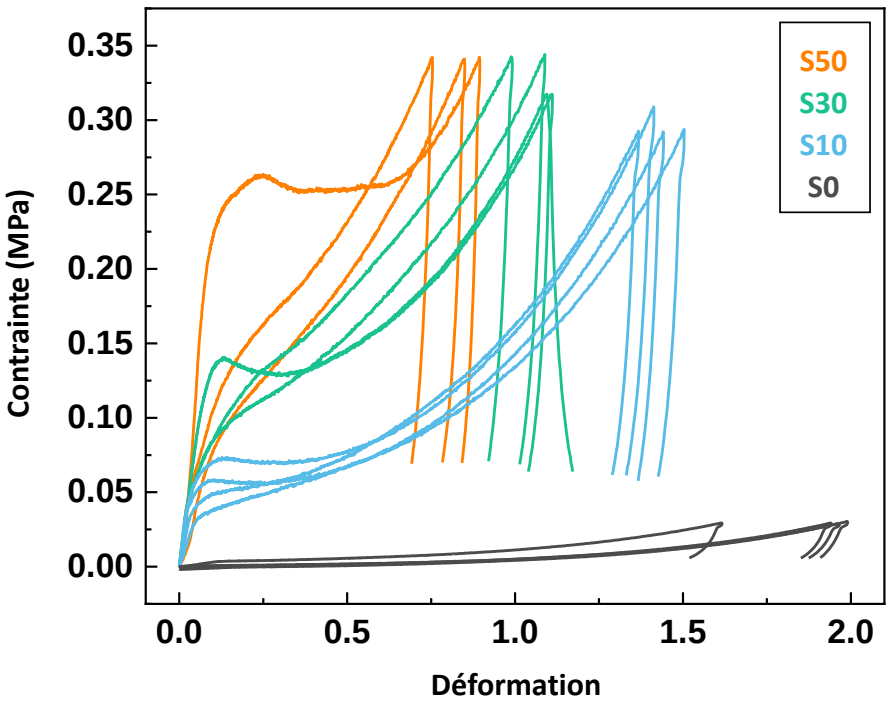


Figure 4.37 : Courbes contrainte-déformation des différents réplicats pour les échantillons S0 à S50.

Le plateau du domaine plastique n'est visible que pour S10, S30 et S50, il est plus ou moins marqué au sein d'un même réplicat et avec des niveaux de contrainte seuil variables. En effet, la moitié des réplicats de S10 à S50 (deux pour S10, S30 et un pour S50) présentent des plateaux plastiques bien horizontaux, signes d'une homogénéité de la structure poreuse : ils sont composés de cellules proches en comportement, dont le flambage des murs a lieu en même temps (lorsque la contrainte ré-augmente sur le graphique). Pour les autres réplicats, la présence d'un « maillon faible » ou cellule moins résistante à la contrainte (murs plus fins, de plus grande taille, avec une répartition de particules inhomogène) induit un flambage progressif, se traduisant sur la courbe contrainte-déformation par une pente dans le domaine plastique.

Le Tableau 4.14 présente les valeurs moyennes des densités, modules d'élasticité en compression (pris en début de compression), limites d'élasticité et taux de récupération après 7 jours. Les valeurs pour chacun des échantillons des réplicats peuvent être trouvées en Annexe AIV.2 (Figure AIV.2). Le module de compression ou d'élasticité est calculé en mesurant la pente initiale de la charge, car cette étape est plus reproductible que la décharge qui intervient après des déformations irréversibles potentiellement endommageantes et surtout, donne le module de la structure initiale avec les pores intacts. Il définit donc la rigidité de la structure globale, impliquant d'une part une contribution de son architecture liée à la porosité ; et d'autre part une contribution liée à la rigidité des murs la composant (ces murs étant des matériaux composites à part entière possédant leur module d'Young propre). La limite d'élasticité est donnée par l'intersection des tangentes des domaines élastique et plastique, comme décrit en annexe V.7.7, et est assimilé à la limite de déformation réversible. Le taux de récupération équivaut à la hauteur du scaffold 7 jours après l'essai par rapport à sa hauteur initiale. Comme illustré par la Figure 4.38a, le module de compression (croix sur la figure) augmente avec la densité de l'échantillon *i.e.* avec son taux de charge : il y a un grand écart entre le scaffold sans charge S0 ($0{,}02 \pm 0{,}01$ MPa) et celui le moins chargé S10 pour lequel il est multiplié par 70 ($1{,}4 \pm 0{,}6$ MPa). Puis le module augmente de manière plus continue jusqu'à S50, alors égal à $2{,}1 \pm 0{,}9$ MPa. Comme expliqué précédemment, cela provient de l'augmentation de la rigidité des scaffolds du fait de la présence des charges au sein des murs des pores et de la réticulation des chaines d'alginate. Mais la taille des pores peut aussi avoir une influence, les pores de grande taille (S10) diminuant la tenue à la compression [629] en favorisant le flambage [668], constituant un « maillon faible » qui s'écroule plus facilement et ce malgré la plus grande épaisseur des murs. La sédimentation observée pour S50 ne semble pas impacter ses propriétés mécaniques.

Tableau 4.14 : Comparaison des modules d'élasticité, limites d'élasticité et taux de récupération moyens après 7 jours des scaffolds S0 à S50 en fonction de leur densité, issus d'essais de compression uniaxiale.

SCAFFOLD	DENSITE ($g.cm^{-3}$)	MODULE DE COMPRESSION (MPa)	LIMITE D'ELASTICITE (MPa)	TAUX DE RECUPERATION APRES 7 JOURS (%)
S0	$0{,}0110 \pm 0{,}0004$	$0{,}02 \pm 0{,}01$	$0{,}11 \pm 0{,}04$	25 ± 8
S10	$0{,}0129 \pm 0{,}0005$	$1{,}4 \pm 0{,}6$	$0{,}04 \pm 0{,}01$	37 ± 4
S30	$0{,}0179 \pm 0{,}0009$	$1{,}8 \pm 0{,}1$	$0{,}07 \pm 0{,}02$	56 ± 6
S50	$0{,}0260 \pm 0{,}0008$	$2{,}1 \pm 0{,}9$	$0{,}10 \pm 0{,}02$	66 ± 3

Le taux de récupération après 7 jours est également tracé sur la Figure 4.38a (ronds pleins sur la figure). Il augmente de manière continue entre S0 et S50, de 25 ± 8 % à 66 ± 3 %, et son augmentation semble suivre celle du module. La récupération est plus importante quand la réticulation de l'alginate est plus marquée et /ou la présence de particules plus élevée, car celle-ci empêche le désenchevêtrement des

chaînes et ainsi la rupture. Au contraire, quand le taux de charges est faible, il y a moins de récupération car il y a beaucoup de plastification, induisant l'effondrement progressif des parois de manière irréversible.

La limite de compression, tracée sur la Figure 4.38b, est élevée pour S0 et vaut 0,11 ± 0,04 MPa, la déformation de ce scaffold composé uniquement d'alginate est en grande majorité élastique. Quand peu de charges sont introduites, il y a une diminution brutale de la limite (0,04 ± 0,01 MPa pour S10), liée à la plastification créée par la présence d'une grande porosité : les murs sont moins nombreux donc chacun supporte une charge plus importante, et de fait la limite de plasticité de chaque mur est plus basse. Ils sont donc sujets à l'effondrement, irréversible, lors de la compression. L'augmentation de la réticulation et la diminution de la taille des pores pour S30 et S50 permettent la diminution des déformations plastiques irréversibles et ainsi l'augmentation de la limite d'élasticité, jusqu'à 0,10 ± 0,02 MPa pour S50.

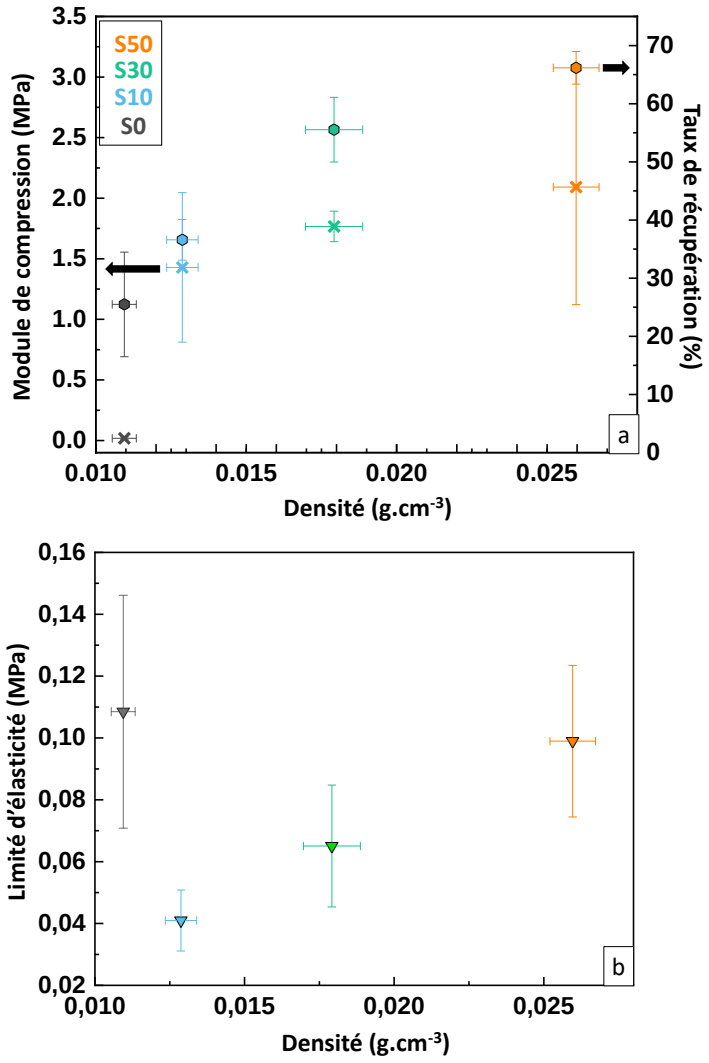


Figure 4.38 : Tracé des valeurs issues des essais de compression uniaxiale pour les scaffolds S0 à S50. Le module de compression (axe de gauche) est représenté par des croix, le taux de récupération (image du haut, axe de droite) par des cercles pleins (a) et la limite d'élasticité (b) par des triangles pleins.

Dans la littérature, les scaffolds composés d'alginate sans charge mais réticulé ont un module de compression plus élevé que S0, de 0,15 à 0,35 MPa selon l'agent réticulant pour des solutions à 1 – 3 % mass. d'alginate et des scaffolds avec des tailles de pores et murs similaires à S0 [647] ; ou de

1,1 MPa pour 2 % mass. d'alginate (et des pores entre 131 et 170 µm, un peu plus larges que ceux de S0) [650]. Cela montre l'impact de la réticulation du polymère, rigidifiant le matériau et donc augmentant le module de compression. Au-delà de l'apport de calcium permettant la réticulation de l'alginate, l'introduction de charges inorganiques, comme les particules de Alg-PyACC, a montré dans divers articles une amélioration des propriétés mécaniques de scaffolds composites à matrice polymérique. Ajouter 40 % mass. de particules d'apatite dans une solution à 3,5 % de PLGA permet d'obtenir des scaffolds de module deux fois plus élevé que sans apatite (0,34 MPa avec et 0,16 MPa sans) [614], de même pour des particules de bioverre greffées dans du PLGA (0,37 MPa) [610]. Les modules obtenus pour les scaffolds composites alginate/Alg-PyACC sont un peu inférieurs à ceux de Turco *et al.* [652], issus d'une solution à 2 % mass. d'alginate réticulé *in situ* par la lente dissolution d'hydroxyapatite, avec un module de 6,3 MPa. Le procédé de congélation n'est pas tout à fait le même, et la quantité d'alginate supérieure de 1 % par rapport aux compositions des scaffolds élaborés dans notre étude peut expliquer ce faible écart. Enfin, les modules d'élasticité des scaffolds S0 à S50 sont nettement inférieurs à ceux de l'os cortical (12 – 18 GPa) ou spongieux (0,1 – 0,5 GPa) [49], mais ce n'est pas une limitation pour des applications dans des sites non porteurs, pour lesquels on cherche avant tout une résistance mécanique suffisante pour permettre une manipulation aisée. De plus, ces matériaux composites ont de bons taux de récupération, ce qui est avantageux pour des chirurgies pendant lesquelles les matériaux sont déformés très significativement par la chirurgienne ou le chirurgien lors de l'implantation pour combler un défaut osseux.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La synthèse de 10PyACC développée dans le Chapitre 2 a été adaptée avec succès pour une co-précipitation *in situ* permettant de synthétiser des poudres composites alginate/PyACC amorphes avec une bonne intégration de l'alginate. Celui-ci stabilise l'amorphe en solution et favorise l'obtention de vatérite, et améliore la cytocompatibilité de 10PyACC *in vitro*.

Des scaffolds macroporeux ont alors été élaborés à partir de ces poudres composites d'Alg-PyACC et d'alginate libre par freeze-casting, et avec différents taux de charge. Les ions calcium libérés lors de la mise en suspension des poudres inorganiques induisent une réticulation *in situ* des chaînes de l'alginate, influant sur les propriétés de porosité et mécaniques des scaffolds. La porosité obtenue est lamellaire et interconnectée pour tous les échantillons, avec un volume poreux entre 71 % et 89 %, et arbore un gradient dans la direction de solidification, inhérent au procédé de freeze-casting pour ce type de suspensions : une zone très dense peu poreuse dans la zone basse de l'échantillon en contact avec le culot de cuivre ; une zone de porosité désorganisée, plus ou moins étendue selon la viscosité de la suspension ; puis une zone dans laquelle la croissance des cristaux l'emporte sur la germination, contenant des pores allongés de plus grande taille. Avoir un gradient de porosité dans les scaffolds peut s'avérer d'un grand intérêt pour certaines applications, comme des implantations aux interfaces os/cartilage.

Les scaffolds ont été découpés transversalement en plusieurs zones verticales (haut, milieu, bas) dont la porosité a été quantifiée via des images MEB et de tomographie X. Malgré les inconvénients présentés par les deux techniques, il a été possible de mettre en évidence une plus petite porosité dans la zone basse, avec une grande population de petits pores (30 – 40 µm en MEB) et une distribution de tailles resserrée, qui s'élargit et se décale vers des plus grandes tailles pour la zone médiane et la zone haute, cette dernière comportant des pores de 200 – 500 µm, adaptés à la colonisation et migration cellulaires. Une porosité intra-mur est aussi présente et liée à l'emprisonnement de molécules d'eau par les chaînes d'alginate, favorisant potentiellement la dégradation du matériau et

la libération d'espèces actives pouvant interagir avec les cellules. A fort taux de charge, allant de pair dans notre cas avec une réticulation importante de l'alginate, la taille des pores diminue. Ils deviennent plus cellulaires et arrondis du fait de la faible mobilité des chaînes de polymère, bloquant aussi la réorganisation des molécules d'eau pour former des plus gros cristaux. Les murs des pores sont aussi plus fins avec plus de charges, les pores étant plus petits et plus nombreux.

Les images de tomographie X et de MEB et MEB-FEG ont montré que les charges sont réparties de manière homogène pour les scaffolds avec les plus faibles taux de charge (S10 et S30), mais qu'une agrégation et sédimentation apparaissent lorsque la quantité de particules est trop importante (S50 et S70), conduisant même à une perte de cohésion macroscopique pour le scaffold S70.

Cette hétérogénéité a finalement peu d'impact sur les propriétés mécaniques, qui ont été testées en compression uniaxiale. L'augmentation du taux de charge et de la viscosité améliore la rigidité du scaffold, augmentant le modulé de compression et le taux de récupération après compression, en limitant le flambage des cellules poreuses et les déformations irréversibles. C'est aussi lié à la taille des pores, des pores plus petits (et donc avec des murs plus nombreux) répartissant mieux la charge dans l'ensemble des murs et limitant ainsi l'effondrement de la porosité. Les propriétés mécaniques sont beaucoup plus faibles que celles de l'os, mais adaptées pour des applications pour des sites non porteurs, et le taux de récupération élevé permet une récupération de la porosité après les déformations pouvant avoir lieu lors de l'implantation du scaffold.

Nous nous sommes confrontés dans cette étude aux écueils de la caractérisation quantitative de la porosité pour des composés peu denses et difficiles à découper. Des développements pourraient être envisagés sur la tomographie X dans le but d'augmenter le contraste entre les scaffolds et l'air, par exemple par imprégnation de ceux-ci par un électrolyte contenant des ions lourds (augmentant la densité électronique et donc la visualisation de la porosité), à condition que cette étape ne soit pas néfaste aux particules d'Alg-PyACC. Il avait été envisagé d'inclure les scaffolds en résine, en appliquant une pression afin que celle-ci pénètre dans tous les pores et crée un « négatif » de la porosité, mais cette idée a été abandonnée devant la souplesse de la matrice polymérique trop facilement déformable, et la résine n'aurait de plus pas eu accès à la porosité fermée. Au-delà de la tomographie X, d'autres techniques pourraient être utilisées pour corréler la nanostructure des composites et les propriétés macroscopiques des scaffolds. En effet, la répartition des particules de PyACC au sein du réseau polymérique d'alginate lors de la co-précipitation n'a pas été pas décrite, or cet enchevêtrement pouvant être nanométrique ou même à l'échelle moléculaire (matériaux hybrides) peut avoir un rôle clé sur la stabilisation de l'amorphe et ainsi la dégradation et les propriétés biologiques des scaffolds. Le SAXS, SANS ou la RMN du solide pourraient être des techniques adaptées pour obtenir ce genre d'informations, qui seraient alors à corréler aux propriétés mécaniques et à des études de dégradation des scaffolds dans des milieux aqueux et/ou cellulaires, nécessaires avant toute application de substitution osseuse. Enfin, les propriétés mécaniques pourraient être améliorées en augmentant la réticulation de l'alginate. Pour cela, une solution de calcium pourrait remplacer l'eau utilisée comme solvant de la suspension, mais avec le risque d'obtenir une solution trop visqueuse formant des pores trop petits pour la colonisation cellulaire. On pourrait envisager alternativement d'utiliser un composé d'Alg-PyACC moins stable comme charge inorganique (contenant moins de pyrophosphate par exemple) donc se dégradant plus rapidement, libérant ainsi des ions Ca^{2+} alors chélatés par l'alginate pour former un réseau tridimensionnel homogène avec un taux de charge limité donc ne provoquant pas une perte de cohésion macroscopique. Dans une autre approche, une plus grande proportion d'alginate libre pourrait augmenter l'épaisseur des murs pour améliorer la résistance à la compression uniaxiale.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les carbonates de calcium et en particulier leurs phases amorphes métastables présentent un grand intérêt pour la substitution osseuse, de par leur dissolution plus rapide que celle de la plupart des phases de phosphate de calcium (les plus utilisées à ce jour dans ce domaine), conférant des propriétés de résorption plus rapide aux formulations de biomatériaux les incorporant. Dans ce cadre, la mise en évidence d'une famille d'ACC stabilisés par l'ion pyrophosphate permet d'envisager une modulation de cette résorption, par le biais de l'hydrolyse *in vivo* des ions pyrophosphate par des enzymes dont la PAL, naturellement présentes notamment dans les membranes des ostéoblastes. Cette famille de composés étant particulièrement peu décrite dans la littérature, ce travail de thèse avait pour objectif d'améliorer la compréhension de la synthèse et des mécanismes menant au matériau final et en particulier l'influence du pyrophosphate, le dopage de ces PyACC par des ions bioactifs et leur mise en forme par freeze-casting. Pour cela, des poudres avec différents ratios *z* de pyrophosphate/carbonate ont été synthétisées par co-précipitation puis caractérisées.

Dans un premier temps, la caractérisation des poudres d'ACC avec différents pourcentages de pyrophosphate introduits lors de la précipitation démontre que pour des ratios P_2O_7/CO_3 supérieurs ou égaux à 3,5 % mol., les poudres synthétisées sont totalement amorphes, tandis que pour des ratios plus faibles l'inhibition de la cristallisation par les ions pyrophosphate n'est que partielle et outre la phase amorphe, des cristaux de calcite nanoscopiques sont observés. Une organisation multi-échelle des *z*PyACC purement amorphes est mise en évidence par le biais de techniques de caractérisation avancées et complémentaires (dont le MEB-FEG, le MET, le SAXS, le WAXS-PDF, et la RMN en phase solide), conduisant à la proposition d'un modèle expérimental : la phase amorphe serait composée de clusters d'environ 1 nm de diamètre, de structuration similaire à celle de la vatérite (clusters proto-vatérite), entourés par une couche d'eau structurale fortement liée contenant des ions pyrophosphate stabilisant le cluster, au sein d'entités sub-particulaires de 5 nm de diamètre avec de l'eau plus mobile, elles-mêmes constituant les nanoparticules de PyACC. Quand l'ensemble des clusters est stabilisé par les ions pyrophosphate, ceux-ci adopteraient alors un rôle de tensioactif en stabilisant les nanoparticules sphériques et réduisant leur taille.

Le dopage de la poudre 10PyACC avec des ions Sr^{2+}, Cu^{2+} et Zn^{2+} n'a pas affecté son caractère amorphe et une intégration quantitative de ces ions a été démontrée. Ces derniers ont probablement une distribution spatiale différenciée selon leur nature (liée à leur taille et leur électropositivité), en lien avec le modèle proposé précédemment. Il est envisageable que le strontium soit substitué au calcium dans le cluster proto-vatérite, alors que le cuivre et le zinc seraient localisés plutôt en périphérie dans une couche dense d'eau et formeraient des composés mixtes avec des hydroxydes et des ions carbonate. Les essais d'évolution dans l'eau et dans le SBF des poudres de référence 5PyACC et 10PyACC attestent de l'effet stabilisateur du pyrophosphate sur la phase amorphe. Concernant les poudres dopées, le strontium est libéré en plus grande quantité que le zinc et le cuivre, *a priori* du fait de l'association de ces derniers dans les solides mixtes stables en solution ou des complexes formés rapidement après leur libération et par la suite également stables. Dans le SBF, la dissolution des PyACC (dopés ou non) est exacerbée. Pour toutes les évolutions, la libération est prolongée sur quatre semaines et n'est pas/peu associée à un phénomène de libération incontrôlée aux premiers temps d'évolution. *In vitro*, les tests cellulaires préliminaires indiquent la cytocompatibilité des poudres (à l'exception du cuivre aux plus hautes concentrations) et le potentiel ostéogénique de celles dopées au zinc.

La synthèse de 10PyACC a été modifiée pour co-précipiter *in situ* de l'alginate dans une poudre composite, qui est également stabilisée en solution par la présence du polymère et est cytocompatible. Des scaffolds avec différents ratios phase organique/charges minérales ont été élaborés avec succès par freeze-casting à partir de cette poudre composite et d'alginate libre, et possèdent tous une macroporosité lamellaire interconnectée suivant un gradient dans la direction de solidification. Les analyses d'images sur des coupes transversales des scaffolds ont montré l'existence de petits pores en bas des scaffolds, qui s'élargissent vers le haut, associés à une distribution de tailles plus large et à la présence d'une porosité intra-murs, favorisant potentiellement la dégradation des matériaux. Les tailles de pores sont adaptées à la colonisation cellulaire, et elles sont réduites par l'augmentation du taux de charges minérales et la réticulation *in situ* que celles-ci induisent en libérant des ions Ca^{2+}. A l'inverse, les propriétés mécaniques (rigidité, module de compression) augmentent, en conséquence de la limitation du flambage par la réticulation, de la diminution de la mobilité des segments de chaînes de polymère bloqués par les charges minérales et également de la réduction de taille des pores.

Suite à cette étude exhaustive sur les poudres amorphes de PyACC, allant de leur caractérisation structurale fine à des développements à visée plus appliquée telle que leur dopage et leur mise en forme de scaffolds macroporeux, de nombreuses perspectives peuvent être proposées :

Caractérisation encore plus fine, complète et avancée …

Du point de vue des caractérisations structurales fines, les techniques utilisées pour les *z*PyACC (SAXS, WAXS-PDF, RMN en phase solide) pourraient être appliquées aux poudres dopées ainsi qu'à la poudre composite afin de caractériser de la même manière leur structuration à petite échelle. Dans le premier cas, pour connaître la répartition des dopants des techniques complémentaires seraient requises, comme par exemple l'EXAFS. Cela permettrait d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes d'évolution et de libération des ions actifs en milieux aqueux et cellulaire. Nous n'avons par ailleurs pas discuté l'influence du pyrophosphate (par manque de données expérimentales sur son dosage) dans les mécanismes de libération des ions. Pourtant il a démontré avoir un rôle majeur dans la structuration des PyACC et cela pourrait donc être aussi le cas lors de sa dissolution, d'autant plus en milieu cellulaire avec le clivage du pyrophosphate par la PAL. Pour le deuxième cas, les chaînes de polymère et des particules de 10PyACC pourraient être associées avec une grande proximité sous forme de particules hybrides ou au contraire en structures composites intégrant le polymère en surface des agrégats de PyACC. Comprendre l'enchevêtrement de ces phases minérale et organique, par une combinaison de techniques structurales (SAXS, WAXS-PDF, RMN en phase solide) serait utile pour appréhender les propriétés macroscopiques des scaffolds ensuite élaborés à partir de ces poudres composites et potentiellement anticiper leur dégradation en milieu aqueux et/ou cellulaire. Il serait également intéressant de mener l'étude d'évolution des scaffolds en milieu acellulaire puis en culture cellulaire 3D, pour évaluer la migration et l'activité des cellules au sein des scaffolds et ainsi attester de leurs potentielles propriétés comme substituts osseux. Pour les matériaux initiaux *z*PyACC, les caractérisations fines pourraient être étendues, en réalisant par exemple un suivi de germination *in situ* par SAXS et/ou SANS sur un grand instrument (synchrotron), afin d'appréhender le rôle du pyrophosphate sur la stabilisation de l'amorphe et ce dès la formation de ses premiers germes (clusters de pré-nucléation). La méthodologie développée ici pour la caractérisation fine pourrait être complétée par une étude de modélisation moléculaire, permettant de valider la stabilité d'un tel modèle expérimental. En outre, elle pourrait même être appliquée pour d'autres anions stabilisateurs, cités dans la littérature, qui elle est limitée quant aux détails sur la structuration à petite échelle des ACC formés.

… Vers la création d'un biomatériau bioactif modulable

En mettant en regard tous les résultats de cette thèse et les perspectives à plus court terme, des perspectives à plus long terme paraissent prometteuses pour le développement de matériaux modulables pour la substitution osseuse. En effet, les poudres composites pourraient d'abord être dopées avant de les mettre en forme par freeze-casting, afin de conférer des propriétés bioactives supplémentaires aux scaffolds, présentant déjà *a priori* les prérequis de porosité adaptés à la colonisation cellulaire. Nous pourrions ensuite envisager de faire varier les quantités de pyrophosphate dans ces poudres composites dopées pour moduler leur stabilité (par le biais du clivage de ces anions par la PAL en milieu cellulaire) et ainsi les cinétiques de libération d'ions bioactifs. En contrôlant précisément la synthèse de PyACC, les additifs ajoutés pendant la co-précipitation (anion(s) stabilisateur(s), cations dopants, polymère formant le composite *in situ*), leur quantité respective, et la composition des suspensions de freeze-casting, il est alors possible d'imaginer le développement de toute une gamme de scaffolds bioactifs dont les propriétés biologiques (ions libérés et cinétiques de libération et de résorption par exemple) seraient ajustées à l'indication médicale. Par exemple, le développement de tels scaffolds macroporeux et multifonctionnels permettrait de répondre à des pathologies requérant un cahier des charges multi-contraintes, telle que l'ostéoradionécrose mandibulaire, complication apparaissant chez certains patients après le traitement d'un cancer des voies aérodigestives supérieures par radiothérapie, et associant infection bactérienne et présence de défauts critiques nécessitant une ostéogénèse et une angiogenèse sur un site non porteur.

REFERENCES

1. Couret, I., "Biologie du remodelage osseux", *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique*, **2004**, *28*,
2. Carter, D.R., Spengler, D.M., "Mechanical Properties and Composition of Cortical Bone:", *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **1978**, 192, doi: 10.1097/00003086-197809000-00041,
3. Marie, P.J., "Physiologie du tissu osseux", *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, **1992**, *7*, 17, doi: 10.1016/S0923-2532(05)80182-6,
4. Giudicelli, J., Souberbielle, J.C., "Le remodelage osseux et l'exploration de l'ostéoporose", *Revue de l'ACOMEN*, **1998**, *4*,
5. Rho, J.-Y. et al., "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone", *Medical Engineering & Physics*, **1998**, *20*, 92, doi: 10.1016/S1350-4533(98)00007-1,
6. Bouillon, B., "Module locomoteur - Chapitre 3 - Histologie des os", *Forum Futura-Sciences*. Accessed August 2022 [online], Available at https://forums.futura-sciences.com/attachments/biologie/408785d1586537661-ossification-endonchondrale-module-locomoteur-chapitre-3-histologie-os-extrait-4-.pdf,
7. Wagoner Johnson, A.J., Herschler, B.A., "A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair", *Acta Biomaterialia*, **2011**, *7*, 16, doi: 10.1016/j.actbio.2010.07.012,
8. Murugan, R., Ramakrishna, S., "Development of nanocomposites for bone grafting", *Composites Science and Technology*, **2005**, *65*, 2385, doi: 10.1016/j.compscitech.2005.07.022,
9. Hench, L.L., "An Introduction to Bioceramics", World Scientific, **1993**,
10. LeGeros, R.Z., "Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials", *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 4742, doi: 10.1021/cr800427g,
11. Beifuss, K., "Anatomie et physiopathologie en soins infirmiers", Elsevier Masson, Elsevier., **2018**,
12. Wang, X.-Y. et al., "Comparative Study on Inorganic Composition and Crystallographic Properties of Cortical and Cancellous Bone", *Biomedical and Environmental Sciences*, **2010**, *23*, 473, doi: 10.1016/S0895-3988(11)60010-X,
13. Niyibizi, C., Eyre, D.R., "Structural Characteristics of Cross-Linking Sites in type V Collagen of Bone", *European Journal of Biochemistry*, **1994**, *224*, 943, doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.00943.x,
14. Vandecandelaere, N., "Élaboration et caractérisation de biomatériaux osseux innovants à base d'apatites phospho-calciques dopées", Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse), **2012**,
15. Lefevre, E., "Caractérisation multimodale des propriétés de l'os cortical en croissance", Thèse, Aix-Marseille Université, **2015**,
16. Rey, C. et al., "The carbonate environment in bone mineral: A resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study", *Calcif Tissue Int*, **1989**, *45*, 157, doi: 10.1007/BF02556059,
17. Rey, C. et al., "Surface properties of biomimetic nanocrystalline apatites; applications in biomaterials", *Prog. Crys. Growth Charact. Mat.*, **2014**, *60*, 63, doi: 10.1016/J.PCRYSGROW.2014.09.005,
18. Boanini, E. et al., "Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature", *Acta Biomaterialia*, **2010**, *6*, 1882, doi: 10.1016/j.actbio.2009.12.041,
19. Lakhkar, N.J. et al., "Bone formation controlled by biologically relevant inorganic ions: Role and controlled delivery from phosphate-based glasses", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2013**, *65*, 405, doi: 10.1016/j.addr.2012.05.015,
20. Eichert, D. et al., "Nanocrystalline Apatite Based Biomaterials", In "Biomaterials Research Advances", Nova Science Publishers, Inc, **2009**, Vol. 6, 93,

21. Rey, C. et al., "Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials", *Materials Science and Engineering C*, **2007**, *27*, 198, doi: doi:10.1016/j.msec.2006.05.015,
22. Cazalbou, S. et al., "Adaptative physico-chemistry of bio-related calcium phosphates", *J. Mater. Chem.*, **2004**, *14*, 2148, doi: 10.1039/b401318b,
23. Cazalbou, S. et al., "Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo", *J Bone Miner Metab*, **2004**, *22*, doi: 10.1007/s00774-004-0488-0,
24. Cazalbou, S. et al., "Biological mineralizations based on calcium phosphates", *Comptes Rendus Palevol*, **2004**, *3*, 563, doi: 10.1016/j.crpv.2004.07.003,
25. Combes, C., Rey, C., "Biomatériaux à base de phosphates de calcium", *Techniques de l'ingénieur*, **2013**, doi: 10.51257/a-v1-n4950,
26. Orimo, H., "The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease", *J Nippon Med Sch*, **2010**, *77*, 4, doi: 10.1272/jnms.77.4,
27. Marieb, E.N., Hoehn, K., "Human Anatomy & Physiology", Pearson, **2006**,
28. Wang, W., Yeung, K.W.K., "Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review", *Bioactive Materials*, **2017**, *2*, 224, doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.05.007,
29. Kalfas, I.H., "Principles of bone healing", *Neurosurgical Focus*, **2001**, *10*, 1, doi: 10.3171/foc.2001.10.4.2,
30. Marsell, R., Einhorn, T.A., "Emerging Bone Healing Therapies", *Journal of Orthopaedic Trauma*, **2010**, *24*, S4, doi: 10.1097/BOT.0b013e3181ca3fab,
31. Bert, M., "L'os : remaniement et cicatrisation", In "Implantologie : Bases fondamentales, Conséquences cliniques", **2021**,
32. Gómez-Benito, M.J. et al., "Influence of fracture gap size on the pattern of long bone healing: a computational study", *Journal of Theoretical Biology*, **2005**, *235*, 105, doi: 10.1016/j.jtbi.2004.12.023,
33. Schemitsch, E.H., "Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size!", *Journal of Orthopaedic Trauma*, **2017**, *31*, S20, doi: 10.1097/BOT.0000000000000978,
34. Jacquart, S., "Substitut osseux injectable, antibactérien et résorbable : études physico-chimiques et biologiques d'un ciment composite à base d'apatite", Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse), **2013**,
35. Pariente, J.-L. et al., "Biomatériaux, Biomatériels et Biocompatibilité", *Progrès en Urologie*, **2005**, *15*, 887,
36. Vert, M. et al., "Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)", *Pure and Applied Chemistry*, **2012**, *84*, 377, doi: 10.1351/PAC-REC-10-12-04,
37. Park, J., Lakes, R.S., "Biomaterials: An Introduction", Springer Science & Business Media, **2007**,
38. Williams, D.F., "On the mechanisms of biocompatibility", *Biomaterials*, **2008**, *29*, 2941, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023,
39. Kirkpatrick, C.J. et al., "Current trends in biocompatibility testing", *Proc Inst Mech Eng H*, **1998**, *212*, 75, doi: 10.1243/0954411981533845,
40. Lao, J., Nedelec, J.-M., "Verres bioactifs", *Techniques de l'ingénieur*, **2014**, doi: 10.51257/a-v1-n4955,
41. Hench, L.L., "The story of Bioglass®", *J Mater Sci: Mater Med*, **2006**, *17*, 967, doi: 10.1007/s10856-006-0432-z,
42. Albrektsson, T., Johansson, C., "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration", *Eur Spine J*, **2001**, *10*, S96, doi: 10.1007/ s005860100282,
43. Habraken, W. et al., "Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future?", *Materials Today*, **2016**, *19*, 69, doi: 10.1016/j.mattod.2015.10.008,
44. Diez-Escudero, A. et al., "Synthetic bone graft substitutes: Calcium-based biomaterials", In "Dental Implants and Bone Grafts", Elsevier, **2020**, 125, doi: 10.1016/B978-0-08-102478-2.00006-4,
45. Bohner, M., "Resorbable biomaterials as bone graft substitutes", *Materials Today*, **2010**, *13*, 24, doi: 10.1016/S1369-7021(10)70014-6,

46. Goldberg, V.M., Akhavan, S., "Biology of Bone Grafts", In "Bone Regeneration and Repair: Biology anc Clinical Applications", Humana Press, **2005**,
47. Burg, K.J.L. et al., "Biomaterial developments for bone tissue engineering", *Biomaterials*, **2000**, *21*, 2347, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00102-2,
48. Hofmann, G.O. et al., "Infections and immunological hazards of allogeneic bone transplantation", *Arch Orthop Trauma Surg*, **1995**, *114*, 159, doi: 10.1007/BF00443390,
49. Rezwan, K. et al., "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering", *Biomaterials*, **2006**, *27*, 3413, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.039,
50. Chai, Y.C. et al., "Probing the Osteoinductive Effect of Calcium Phosphate by Using an In Vitro Biomimetic Model", *Tissue Engineering Part A*, **2011**, *17*, 1083, doi: 10.1089/ten.tea.2010.0160,
51. Danoux, C.B.S.S. et al., "Elucidating the individual effects of calcium and phosphate ions on hMSCs by using composite materials", *Acta Biomaterialia*, **2015**, *17*, 1, doi: 10.1016/j.actbio.2015.02.003,
52. Habibovic, P. et al., "Collagen Biomineralization In Vivo by Sustained Release of Inorganic Phosphate Ions", *Adv. Mater.*, **2010**, *22*, 1858, doi: 10.1002/adma.200902778,
53. Giannoudis, P.V. et al., "Bone substitutes: An update", *Injury*, **2005**, *36*, S20, doi: 10.1016/j.injury.2005.07.029,
54. Elliott, J.C., "Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates", Studies in Inorganic Chemistry, Elsevier, **1994**, Vol. 18,
55. Rey, C. et al., "Bioactive Ceramics: Physical Chemistry", In "Comprehensive Biomaterials", Editors Ducheyne, P.; Healy, K.; et al., Elsevier, **2011**, 187, doi: 10.1016/B978-0-08-055294-1.00178-1,
56. LeGeros, R.Z. et al., "Formation and Stability of Apatites Effects of some Cationic Substituents", In , **1980**, 89,
57. Vandecandelaere, N. et al., "Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters", *J Mater Sci: Mater Med*, **2012**, *23*, 2593, doi: 10.1007/s10856-012-4719-y,
58. Denissen, H.W., De Groot, K., "Immediate dental root implants from synthetic denses calcium hydroxylapatite", *The Journal of Prosthetic Dentistry*, **1979**, *42*, 6, doi: 10.1016/0022-3913(79)90253-1,
59. Yuan, H. et al., "A comparison of bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) implanted in muscle and bone of dogs at different time periods", *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **2006**, *78A*, 139, doi: 10.1002/jbm.a.30707,
60. Oliveira, H.L. et al., "Histological Evaluation of Bone Repair with Hydroxyapatite: A Systematic Review", *Calcif Tissue Int*, **2017**, *101*, 341, doi: 10.1007/s00223-017-0294-z,
61. Yuan, H. et al., "A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics", *Biomaterials*, **1999**, *20*, 1799, doi: 10.1016/S0142-9612(99)00075-7,
62. Gosain, A.K. et al., "A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I", *Plast Reconstr Surg*, **2002**, *109*, 619, doi: 10.1097/00006534-200202000-00032,
63. Magan, A., Ripamonti, U., "Geometry of Porous Hydroxyapatite Implants Influences Osteogenesis in Baboons {Papio ursinus)", *The Journal of craniofacial surgery*, **1996**, *7*, 71, doi: 10.1097/00001665-199601000-00016,
64. Bhaskar, S.N. et al., "Biodegradable ceramic implants in bone: Electron and light microscopic analysis", *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, **1971**, *32*, 336, doi: 10.1016/0030-4220(71)90238-6,
65. Wang, S. et al., "Vertical alveolar ridge augmentation with β-tricalcium phosphate and autologous osteoblasts in canine mandible", *Biomaterials*, **2009**, *30*, 2489, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.067,
66. Yuan, H. et al., "Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous α-TCP and β-TCP", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **2001**, *12*, 7, doi: 10.1023/A:1026792615665,

67. Yuan, H. et al., "Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting", *PNAS*, **2010**, *107*, 13614, doi: 10.1073/pnas.1003600107,
68. Daculsi, G. et al., "Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: Ultrastructural and physicochemical characterization", *J. Biomed. Mater. Res.*, **1989**, *23*, 883, doi: 10.1002/jbm.820230806,
69. Kurashina, K. et al., "Ectopic osteogenesis with biphasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits", *Biomaterials*, **2002**, *23*, 407, doi: 10.1016/S0142-9612(01)00119-3,
70. Habibovic, P. et al., "Osteoinduction by biomaterials—Physicochemical and structural influences", *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **2006**, *77A*, 747, doi: 10.1002/jbm.a.30712,
71. Grover, L.M. et al., "The effect of amorphous pyrophosphate on calcium phosphate cement resorption and bone generation", *Biomaterials*, **2013**, *34*, 6631, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.05.001,
72. Kohn, N.N. et al., "The significance of calcium phosphate crystals in the synovial fluid of arthritic patients: the “pseudogout syndrome”. II. Identification of crystals", *Ann. Intern. Med.*, **1962**, *56*, 738, doi: 10.3109/9780203214237-33,
73. Gras, P., "Etude physico-chimique et structurale de pyrophosphates de calcium hydratés : application aux micro-calcifications associées à l’arthrose", Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse), **2014**,
74. 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.*, **2011**, *3*, 238, doi: 10.4055/cios.2011.3.3.238,
75. Webb, N.C., "The crystal structure of β-Ca2P2O", *Acta Cryst*, **1966**, *21*, 942, doi: 10.1107/S0365110X66004225,
76. Zyman, Z. et al., "Phase evolution during heat treatment of amorphous calcium phosphate derived from fast nitrate synthesis", *PAC*, **2017**, *11*, 147, doi: 10.2298/PAC1702147Z,
77. Parodi, J.A. et al., "Electronic Paramagnetic Resonance Study of the Thermal Decomposition of Dibasic Calcium Orthophosphate", *J. Electrochem. Soc.*, **1965**, *112*, 688, doi: 10.1149/1.2423665,
78. Lee, J.H. et al., "Porous Beta-Calcium Pyrophosphate as a Bone Graft Substitute in a Canine Bone Defect Model", *KEM*, **2003**, *240–242*, 399, doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.240-242.399,
79. Günther, C. et al., "In vitro Synthesis and Structural Characterization of Amorphous Calcium Carbonate", *Z. anorg. allg. Chem.*, **2005**, *631*, 2830, doi: 10.1002/zaac.200500164,
80. Addadi, L. et al., "Taking Advantage of Disorder: Amorphous Calcium Carbonate and Its Roles in Biomineralization", *Adv. Mater.*, **2003**, *15*, 959, doi: 10.1002/adma.200300381,
81. Clarke, S.A. et al., "Designs from the deep: Marine organisms for bone tissue engineering", *Biotechnology Advances*, **2011**, *29*, 610, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.04.003,
82. Petite, H. et al., "Tissue-engineered bone regeneration", *Nat Biotechnol*, **2000**, *18*, 959, doi: 10.1038/79449,
83. Ohgushi, H., "Coral Derived Porous Framework Having Different Chemical Compositions as a Scaffold for Osteoblastic Differentitation", *MSF*, **1997**, *250*, 209, doi: 10.4028/www.scientific.net/MSF.250.209,
84. Roudier, M. et al., "The resorption of bone-implanted corals varies with porosity but also with the host reaction: Three coral species implants", *J. Biomed. Mater. Res.*, **1995**, *29*, 909, doi: 10.1002/jbm.820290802,
85. Brečević, L., Nielsen, A.E., "Solubility of amorphous calcium carbonate", *Journal of Crystal Growth*, **1989**, *98*, 504, doi: 10.1016/0022-0248(89)90168-1,
86. Niu, Y.-Q. et al., "Calcium carbonate: controlled synthesis, surface functionalization, and nanostructured materials", *Chemical Society Reviews*, **2022**, doi: 10.1039/D1CS00519G,
87. Plummer, L.N., Busenberg, E., "The solubilities of calcite, aragonite and vaterite in CO2-H2O solutions between 0 and 90°C, and an evaluation of the aqueous model for the system CaCO3-CO2-H2O", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1982**, *46*, 1011, doi: 10.1016/0016-7037(82)90056-4,

88. Clarkson, J.R. et al., "Role of metastable phases in the spontaneous precipitation of calcium carbonate", *Faraday Trans.*, **1992**, *88*, 243, doi: 10.1039/ft9928800243,
89. Kralj, D., Brečević, L., "Dissolution kinetics and solubility of calcium carbonate monohydrate", *Colloids and Surfaces A*, **1995**, *96*, 287, doi: 10.1016/0927-7757(94)03063-6,
90. Zou, Z. et al., "A hydrated crystalline calcium carbonate phase: Calcium carbonate hemihydrate", *Science*, **2019**, *363*, 396, doi: 10.1126/science.aav0210,
91. Zhou, Y. et al., "Investigation on the stability, electronic, optical, and mechanical properties of novel calcium carbonate hydrates via first-principles calculations", *International Journal of Quantum Chemistry*, **2020**, *120*, e26219, doi: 10.1002/qua.26219,
92. Guillemin, G. et al., "The use of coral as a bone graft substitute", *J. Biomed. Mater. Res.*, **1987**, *21*, 557, doi: 10.1002/jbm.820210503,
93. Myszka, B. et al., "Phase-specific bioactivity and altered Ostwald ripening pathways of calcium carbonate polymorphs in simulated body fluid", *RSC Advances*, **2019**, *9*, 18232, doi: 10.1039/c9ra01473j,
94. Myszka, B. et al., "Shape Matters: Crystal Morphology and Surface Topography Alter Bioactivity of Bioceramics in Simulated Body Fluid", *Advanced Engineering Materials*, **2020**, *22*, 2000044, doi: https://doi.org/10.1002/adem.202000044,
95. Lucas, A. et al., "A synthetic aragonite-based ceramic as a bone graft substitute and substrate for antibiotics", *International Journal of Inorganic Materials*, **2001**, *3*, 87, doi: 10.1016/S1466-6049(00)00058-1.,
96. Lowenstam, H.A., Weiner, S., "On biomineralization", Oxford University Press, **1989**,
97. Boyjoo, Y. et al., "Synthesis of micro and nano-sized calcium carbonate particles and their applications", *J. Mater. Chem. A*, **2014**, *2*, 14270, doi: 10.1039/C4TA02070G,
98. Ogino, T. et al., "The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1987**, *51*, 2757, doi: 10.1016/0016-7037(87)90155-4,
99. Sovova, S. et al., "Calcium carbonate particles: synthesis, temperature and time influence on the size, shape, phase, and their impact on cell hydroxyapatite formation", *J. Mater. Chem. B*, **2021**, *9*, 8308, doi: 10.1039/D1TB01072G,
100. Sawada, K., "The mechanisms of crystallization and transformation of calcium carbonates", *Pure and Applied Chemistry*, **1997**, *69*, 921, doi: 10.1351/pac199769050921,
101. Ni, M., Ratner, B.D., "Differentiating calcium carbonate polymorphs by surface analysis techniques-an XPS and TOF-SIMS study", *Surf. Interface Anal.*, **2008**, *40*, 1356, doi: 10.1002/sia.2904,
102. Combes, C. et al., "Preparation, physical–chemical characterisation and cytocompatibility of calcium carbonate cements", *Biomaterials*, **2006**, *27*, 1945, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.09.026,
103. Tai, C.Y., Chen, F.-B., "Polymorphism of CaCO3, precipitated in a constant-composition environment", *AIChE Journal*, **1998**, *44*, 1790, doi: 10.1002/aic.690440810,
104. Nebel, H. et al., "On the Structure of Amorphous Calcium Carbonate: A Detailed Study by Solid-State NMR Spectroscopy", *Inorg. Chem.*, **2008**, *47*, 7874, doi: 10.1021/ic8007409,
105. Al Omari, M.M.H. et al., "Calcium Carbonate", In "Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology", Editor Brittain, H. G., Academic Press, **2016**, Vol. 41, 31, doi: 10.1016/bs.podrm.2015.11.003,
106. Sand, K.K. et al., "Crystallization of CaCO3 in Water–Alcohol Mixtures: Spherulitic Growth, Polymorph Stabilization, and Morphology Change", *Cryst. Growth Des.*, **2012**, *12*, 842, doi: 10.1021/cg2012342,
107. Chen, S.-F. et al., "Polymorph Discrimination of CaCO3 Mineral in an Ethanol/Water Solution: Formation of Complex Vaterite Superstructures and Aragonite Rods", *Chem. Mater.*, **2006**, *18*, 115,
108. Han, Y.S. et al., "Effect of flow rate and CO2 content on the phase and morphology of CaCO3 prepared by bubbling method", *Journal of Crystal Growth*, **2005**, *276*, 541, doi: 10.1016/j.jcrysgro.2004.11.408,

109. Lauth, V. et al., "An evaluation of colloidal and crystalline properties of CaCO3 nanoparticles for biological applications", *Materials Science and Engineering: C*, **2017**, *78*, 305, doi: 10.1016/j.msec.2017.04.037,
110. Tolba, E. et al., "High biocompatibility and improved osteogenic potential of amorphous calcium carbonate/vaterite", *J. Mater. Chem. B*, **2016**, *4*, 376, doi: 10.1039/C5TB02228B,
111. Long, X. et al., "Biogenic and synthetic high magnesium calcite – A review", *Journal of Structural Biology*, **2014**, *185*, 1, doi: 10.1016/j.jsb.2013.11.004,
112. Mann, S., "Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry", Oxford University Press, **2001**,
113. Young, J.R., Henriksen, K., "Biomineralization Within Vesicles: The Calcite of Coccoliths", *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, **2003**, *54*, 189, doi: 10.2113/0540189,
114. Beuvier, T. et al., "X-ray nanotomography of coccolithophores reveals that coccolith mass and segment number correlate with grid size", *Nat Commun*, **2019**, *10*, 751, doi: 10.1038/s41467-019-08635-x,
115. Behrens, G. et al., "Raman Spectra of Vateritic Calcium Carbonate", *Spectroscopy Letters*, **1995**, *28*, 983, doi: 10.1080/00387019508009934,
116. Gunasekaran, S. et al., "Raman and infrared spectra of carbonates of calcite structure", *J. Raman Spectrosc.*, **2006**, *37*, 892, doi: 10.1002/jrs.1518,
117. Clark, S.M. et al., "The nano- and meso-scale structure of amorphous calcium carbonate", *Sci Rep*, **2022**, *12*, 6870, doi: 10.1038/s41598-022-10627-9,
118. Song, X. et al., "Porous vaterite and cubic calcite aggregated calcium carbonate obtained from steamed ammonia liquid waste for Cu2+ heavy metal ions removal by adsorption process", *Applied Surface Science*, **2021**, *536*, 147958, doi: 10.1016/j.apsusc.2020.147958,
119. Brečević, L., Kralj, D., "On Calcium Carbonates: from Fundamental Research to Application", *Croat. Chem. Acta*, **2007**, *80*, 467,
120. Nehrke, G., "Calcite precipitation from aqueous solution: transformation from vaterite and role of solution stoichiometry", Thèse, Universiteit Utrecht, **2007**,
121. Beck, R., Andreassen, J.-P., "Spherulitic Growth of Calcium Carbonate", *Cryst. Growth Des.*, **2010**, *10*, 2934, doi: 10.1021/cg901460g,
122. Gueta, R. et al., "Local Atomic Order and Infrared Spectra of Biogenic Calcite", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 291, doi: 10.1002/anie.200603327,
123. Volodkin, D.V. et al., "Matrix Polyelectrolyte Microcapsules: New System for Macromolecule Encapsulation", *Langmuir*, **2004**, *20*, 3398, doi: 10.1021/la036177z,
124. Cuesta Mayorga, I. et al., "Precipitation of CaCO3 Polymorphs from Aqueous Solutions: The Role of pH and Sulphate Groups", *Minerals*, **2019**, *9*, 178, doi: 10.3390/min9030178,
125. Fernandez-Martinez, A. et al., "Pressure-Induced Polyamorphism and Formation of "Aragonitic" Amorphous Calcium Carbonate", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 8354, doi: 10.1002/anie.201302974,
126. Stanley, S.M., Hardie, L.A., "Secular oscillations in the carbonate mineralogy of reef-building and sediment-producing organisms driven by tectonically forced shifts in seawater chemistry", *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **1998**, *144*, 3, doi: 10.1016/S0031-0182(98)00109-6,
127. Richards, C.S. et al., "A 21st-Century Perspective on Calcium Carbonate Formation in Potable Water Systems", *Environmental Engineering Science*, **2018**, *35*, 143, doi: 10.1089/ees.2017.0115,
128. Nassif, N. et al., "Synthesis of Stable Aragonite Superstructures by a Biomimetic Crystallization Pathway", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 6004, doi: 10.1002/anie.200500081,
129. Nassif, N. et al., "Amorphous layer around aragonite platelets in nacre", *PNAS*, **2005**, *102*, 12653, doi: 10.1073/pnas.0502577102,
130. Tadier, S., "Étude des propriétés physico-chimiques et biologiques de ciments biomédicaux à base de carbonate de calcium : apport du procédé de co-broyage", Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse), **2009**,

131. Friedman, G.M., Schultz, D.J., "Precipitation of vaterite ($CaCO_3$) during oil field drilling", *Mineral. mag.*, **1994**, *58*, 401, doi: 10.1180/minmag.1994.058.392.05,
132. Gibson, R.E. et al., "Vaterite and mu -calcium carbonate", *American Journal of Science*, **1925**, *s5-10*, 325, doi: 10.2475/ajs.s5-10.58.325,
133. Dědek, J., "Le carbonate de chaux", **1966**,
134. Meyer, H.J., "Struktur und Fehlordnung des Vaterits", *Zeitschrift für Kristallographie - Crystalline Materials*, **1969**, *128*, doi: 10.1524/zkri.1969.128.16.183,
135. Burgess, K.M.N., Bryce, D.L., "On the crystal structure of the vaterite polymorph of CaCO3: A calcium-43 solid-state NMR and computational assessment", *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, **2015**, *65*, 75, doi: 10.1016/j.ssnmr.2014.08.003,
136. Demichelis, R. et al., "A new structural model for disorder in vaterite from first-principles calculations", *CrystEngComm*, **2012**, *14*, 44, doi: 10.1039/C1CE05976A,
137. Demichelis, R. et al., "The Multiple Structures of Vaterite", *Cryst. Growth Des.*, **2013**, *13*, 2247, doi: 10.1021/cg4002972,
138. Guinier, A. et al., "Nomenclature of polytype structures. Report of the International Union of Crystallography Ad hoc Committee on the Nomenclature of Disordered, Modulated and Polytype Structures", *Acta Cryst A*, **1984**, *40*, 399, doi: 10.1107/S0108767384000842,
139. Christy, A.G., "A Review of the Structures of Vaterite: The Impossible, the Possible, and the Likely", *Cryst. Growth Des.*, **2017**, *17*, 3567, doi: 10.1021/acs.cgd.7b00481,
140. Qiu, N. et al., "Calcium carbonate microspheres as carriers for the anticancer drug camptothecin", *Materials Science and Engineering: C*, **2012**, *32*, 2634, doi: 10.1016/j.msec.2012.08.026,
141. Wang, X. et al., "Role of Ovalbumin in the Stabilization of Metastable Vaterite in Calcium Carbonate Biomineralization", *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 8975, doi: 10.1021/jp810281f,
142. Huang, S.-C. et al., "Effect of Molecular Weights of Poly(acrylic acid) on Crystallization of Calcium Carbonate by the Delayed Addition Method", *Polym J*, **2008**, *40*, 154, doi: 10.1295/polymj.PJ2007162,
143. Saraya, M.E.-S.I., Rokbaa, H.H.A.E.-L., "Formation and Stabilization of Vaterite Calcium Carbonate by Using Natural Polysaccharide", *Advances in Nanoparticles*, **2017**, *06*, 158, doi: 10.4236/anp.2017.64014,
144. Qiao, L. et al., "The Crystallization Process of Vaterite Microdisc Mesocrystals via Proto-Vaterite Amorphous Calcium Carbonate Characterized by Cryo-X-ray Absorption Spectroscopy", *Crystals*, **2020**, *10*, 750, doi: 10.3390/cryst10090750,
145. Maeda, H. et al., "Bioactive coatings by vaterite deposition on polymer substrates of different composition and morphology", *Materials Science and Engineering: C*, **2007**, *27*, 741, doi: 10.1016/j.msec.2006.07.021,
146. Rodriguez-Blanco, J.D. et al., "The role of Mg in the crystallization of monohydrocalcite", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **2014**, *127*, 204, doi: 10.1016/j.gca.2013.11.034,
147. Neumann, M., Epple, M., "Monohydrocalcite and Its Relationship to Hydrated Amorphous Calcium Carbonate in Biominerals", *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2007**, *2007*, 1953, doi: 10.1002/ejic.200601033,
148. Swainson, I.P., "The structure of monohydrocalcite and the phase composition of the beachrock deposits of Lake Butler and Lake Fellmongery, South Australia", *American Mineralogist*, **2008**, *93*, 1014, doi: 10.2138/am.2008.2825,
149. Fukushi, K. et al., "Monohydrocalcite: a promising remediation material for hazardous anions", *Science and Technology of Advanced Materials*, **2011**, *12*, 064702, doi: 10.1088/1468-6996/12/6/064702,
150. Effenberger, H., "Kristallstruktur und Infrarot-Absorptionsspektrum von synthetischem Monohydrocalcit, CaCO3.H2O", *Monatshefte für Chemie*, **1981**, *112*, 899,
151. Brooks, R. et al., "Calcium carbonate and its hydrates", *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, **1950**, *243*, 145, doi: 10.1098/rsta.1950.0016,

152. Wang, Y.-Y. et al., "Transformation of amorphous calcium carbonate into monohydrocalcite in aqueous solution: a biomimetic mineralization study", *ejm*, **2015**, *27*, 717, doi: 10.1127/ejm/2015/0027-2486,
153. Kimura, T., Koga, N., "Monohydrocalcite in Comparison with Hydrated Amorphous Calcium Carbonate: Precipitation Condition and Thermal Behavior", *Cryst. Growth Des.*, **2011**, *11*, 3877, doi: 10.1021/cg200412h,
154. Pauly, H., ""“Ikaite”, a New Mineral from Greenland", *ARCTIC*, **1963**, *16*, 263, doi: 10.14430/arctic3545,
155. Bischoff, J.L. et al., "Ikaite precipitation by mixing of shoreline springs and lake water, Mono Lake, California, USA", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1993**, *57*, 3855, doi: 10.1016/0016-7037(93)90339-X,
156. Gal, J.-Y. et al., "Calcium carbonate solubility: a reappraisal of scale formation and inhibition", *Talanta*, **1996**, *43*, 1497, doi: 10.1016/0039-9140(96)01925-X,
157. Lennie, A.R. et al., "The structure and thermal expansion behaviour of ikaite, CaCO3.6H2O, from T = 114 to T = 293 K", *Mineralogical Magazine*, **2004**, *68*, 135, doi: 10.1180/0026461046810176,
158. Swainson, I.P., Hammond, R.P., "Hydrogen bonding in ikaite, CaCO 36H2O", *Mineralogical Magazine*, **2003**, *67*, 555, doi: 10.1180/0026461036730117,
159. Zou, Z. et al., "Reentrant phase transformation from crystalline ikaite to amorphous calcium carbonate", *CrystEngComm*, **2018**, *20*, 2902, doi: 10.1039/C8CE00171E,
160. Tollefsen, E. et al., "Ikaite nucleation at 35 °C challenges the use of glendonite as a paleotemperature indicator", *Sci Rep*, **2020**, *10*, 8141, doi: 10.1038/s41598-020-64751-5,
161. Chhim, N. et al., "Inhibition of calcium carbonate crystal growth by organic additives using the constant composition method in conditions of recirculating cooling circuits", *Journal of Crystal Growth*, **2017**, *472*, 35, doi: 10.1016/j.jcrysgro.2017.03.004,
162. Gebauer, D. et al., "Stable Prenucleation Calcium Carbonate Clusters", *Science*, **2008**, *322*, 1819, doi: 10.1126/science.1164271,
163. Dey, A. et al., "In situ techniques in biomimetic mineralization studies of calcium carbonate", *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 397, doi: 10.1039/B811842F,
164. Nielsen, M.H. et al., "In situ TEM imaging of CaCO3 nucleation reveals coexistence of direct and indirect pathways", *Science*, **2014**, *345*, 1158, doi: 10.1126/science.1254051,
165. Kelly, D.J. et al., "In Situ TEM Imaging of Solution-Phase Chemical Reactions Using 2D-Heterostructure Mixing Cells", *Adv. Mater.*, **2021**, *33*, 2100668, doi: 10.1002/adma.202100668,
166. Du, H. et al., "Amorphous CaCO3: Influence of the Formation Time on Its Degree of Hydration and Stability", *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 14289, doi: 10.1021/jacs.8b08298,
167. Dey, A. et al., "The role of prenucleation clusters in surface-induced calcium phosphate crystallization", *Nature Mater*, **2010**, *9*, 1010, doi: 10.1038/nmat2900,
168. Pouget, E.M. et al., "The Initial Stages of Template-Controlled CaCO3 Formation Revealed by Cryo-TEM", *Science*, **2009**, *323*, 1455, doi: 10.1126/science.1169434,
169. Tao, J. et al., "Nucleation and phase transformation pathways in electrolyte solutions investigated by in situ microscopy techniques", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2018**, *34*, 74, doi: 10.1016/j.cocis.2018.04.002,
170. Wang, L. et al., "Posner’s cluster revisited: direct imaging of nucleation and growth of nanoscale calcium phosphate clusters at the calcite -water interface", *CrystEngComm*, **2012**, *14*, 6252, doi: 10.1039/C2CE25669J,
171. Gebauer, D. et al., "Crystal Nucleation and Growth of Inorganic Ionic Materials from Aqueous Solution: Selected Recent Developments, and Implications", *Small*, **2022**, *18*, 2107735, doi: 10.1002/smll.202107735,
172. Levi-Kalisman, Y. et al., "Stuctural differences between biogenic amorphous calcium carbonate phases using X-ray absorption spectroscopy", *Adv. Funct. Mater.*, **2002**, *12*, 43, doi: 10.1002/1616-3028(20020101)12:1<43::AID-ADFM43>3.0.CO;2-C,
173. Michel, F.M. et al., "Structural Characteristics of Synthetic Amorphous Calcium Carbonate", *Chem. Mater.*, **2008**, *20*, 4720, doi: 10.1021/cm800324v,

174. Avaro, J., "Calcium carbonate prenucleation clusters: towards unification of classical and non-classical nucleation theory", Thèse, Southern Cross University, **2017**,
175. Singer, J.W. et al., "Structure and Transformation of Amorphous Calcium Carbonate: A Solid-State 43Ca NMR and Computational Molecular Dynamics Investigation", *Chem. Mater.*, **2012**, *24*, 1828, doi: 10.1021/cm300389q,
176. Gras, P. et al., "From crystalline to amorphous calcium pyrophosphates: A solid state Nuclear Magnetic Resonance perspective", *Acta Biomaterialia*, **2016**, *31*, 348, doi: 10.1016/j.actbio.2015.10.016,
177. Shir, I.B. et al., "Molecular-Level Structure-Property Relationships in Biogenic Calcium Carbonates: The Unique Insights of Solid-State NMR Spectroscopy", *Israel Journal of Chemistry*, **2014**, *54*, 74, doi: 10.1002/ijch.201300121,
178. Colas, B., "Structural Constraints on the Crystallisation of Amorphous Calcium Carbonate", Thèse, Macquarie University, **2017**,
179. Gebauer, D. et al., "Proto-Calcite and Proto-Vaterite in Amorphous Calcium Carbonates", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 8889, doi: 10.1002/anie.201003220,
180. Gajan, D. et al., "La RMN à l'état solide : Un outil clé pour la compréhension moléculaire des catalyseurs hétérogènes bien définis", *L'Actualité Chimique*, **2012**, *juin-juillet-août 2012*, 82,
181. Saidi, F., "RMN haute résolution solide par multiple-résonance: transfert de polarisation simple et multiple entre noyaux à fréquences de Larmor proches", Thèse, Université Paris-Saclay, **2016**,
182. Yu, Y. et al., "Advanced solid-state 1H/31P NMR characterization of pyrophosphate-doped calcium phosphate cements for biomedical applications: The structural role of pyrophosphate", *Ceramics International*, **2019**, *45*, 20642, doi: 10.1016/j.ceramint.2019.07.047,
183. Von Euw, S. et al., "Amorphous surface layer versus transient amorphous precursor phase in bone – A case study investigated by solid-state NMR spectroscopy", *Acta Biomaterialia*, **2017**, *59*, 351, doi: 10.1016/j.actbio.2017.06.040,
184. Von Euw, S. et al., "Solid-State Phase Transformation and Self-Assembly of Amorphous Nanoparticles into Higher-Order Mineral Structures", *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*, 12811, doi: 10.1021/jacs.0c05591,
185. Schmidt, M.P. et al., "Structural Changes upon Dehydration of Amorphous Calcium Carbonate", *Cryst. Growth Des.*, **2014**, *14*, 938, doi: 10.1021/cg401073n,
186. Mohammed, A.S.A. et al., "In Situ Liquid SAXS Studies on the Early Stage of Calcium Carbonate Formation", *Part. Part. Syst. Charact.*, **2019**, *36*, 1800482, doi: 10.1002/ppsc.201800482,
187. Goodwin, A.L. et al., "Nanoporous Structure and Medium-Range Order in Synthetic Amorphous Calcium Carbonate", *Chem. Mater.*, **2010**, *22*, 3197, doi: 10.1021/cm100294d,
188. Slater, C. et al., "Enhanced stability and local structure in biologically relevant amorphous materials containing pyrophosphate", *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*, 18783, doi: 10.1039/c1jm13930d,
189. Cölfen, H., Pauck, T., "Determination of particle size distributions with angström resolution", *Colloid Polym Sci*, **1997**, *275*, 175, doi: https://doi.org/10.1007/s003960050068,
190. Kellermeier, M. et al., "Colloidal Stabilization of Calcium Carbonate Prenucleation Clusters with Silica", *Adv. Funct. Mater.*, **2012**, *22*, 4301, doi: 10.1002/adfm.201200953,
191. Bushuev, Y.G. et al., "Stability and Structure of Hydrated Amorphous Calcium Carbonate", *Cryst. Growth Des.*, **2015**, *15*, 5269, doi: 10.1021/acs.cgd.5b00771,
192. Raiteri, P., Gale, J.D., "Water Is the Key to Nonclassical Nucleation of Amorphous Calcium Carbonate", *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 17623, doi: 10.1021/ja108508k,
193. Quigley, D., Rodger, P.M., "Free energy and structure of calcium carbonate nanoparticles during early stages of crystallization", *J. Chem. Phys.*, **2008**, *128*, 221101, doi: 10.1063/1.2940322,
194. Buljan Meić, I. et al., "How similar are amorphous calcium carbonate and calcium phosphate? A comparative study of amorphous phase formation conditions", *CrystEngComm*, **2018**, *20*, 35, doi: 10.1039/C7CE01693J,

195. Samavedi, S. et al., "Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior", *Acta Biomaterialia*, **2013**, *9*, 8037, doi: 10.1016/j.actbio.2013.06.014,
196. Popp, J.R. et al., "In vitro evaluation of osteoblastic differentiation on amorphous calcium phosphate-decorated poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds", *J Tissue Eng Regen Med*, **2011**, *5*, 780, doi: 10.1002/term.376,
197. Christoffersen, J. et al., "A contribution to the understanding of the formation of calcium phosphates", *Journal of Crystal Growth*, **1989**, *94*, 767, doi: 10.1016/0022-0248(89)90102-4,
198. Edén, M., "Structure and formation of amorphous calcium phosphate and its role as surface layer of nanocrystalline apatite: Implications for bone mineralization", *Materialia*, **2021**, *17*, 101107, doi: 10.1016/j.mtla.2021.101107,
199. Termine, J.D., Eanes, E.D., "Comparative chemistry of amorphous and apatitic calcium phosphate preparations", *Calc. Tis Res.*, **1972**, *10*, 171, doi: 10.1007/BF02012548,
200. Heughebaert, J.C., Montel, G., "Conversion of amorphous tricalcium phosphate into apatitic tricalcium phosphate", *Calcif Tissue Int*, **1982**, *34 Suppl 2*, S103,
201. Le Grill, S. et al., "Spray-drying-derived amorphous calcium phosphate: a multi-scale characterization", *J Mater Sci*, **2021**, *56*, 1189, doi: 10.1007/s10853-020-05396-7,
202. Yasar, O.F. et al., "Structural Role and Spatial Distribution of Carbonate Ions in Amorphous Calcium Phosphate", *J. Phys. Chem. C*, **2021**, *125*, 4675, doi: 10.1021/acs.jpcc.0c10355,
203. Müller, W.E.G. et al., "Induction of carbonic anhydrase in SaOS-2 cells, exposed to bicarbonate and consequences for calcium phosphate crystal formation", *Biomaterials*, **2013**, *34*, 8671, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.096,
204. Betts, F., Posner, A.S., "An X-ray radial distribution study of amorphous calcium phosphate", *Materials Research Bulletin*, **1974**, *9*, 353, doi: 10.1016/0025-5408(74)90087-7,
205. Treboux, G. et al., "Symmetry of Posner's Cluster", *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 8323, doi: 10.1021/ja994286n,
206. Combes, C., Rey, C., "Amorphous calcium phosphates: Synthesis, properties and uses in biomaterials", *Acta Biomaterialia*, **2010**, *6*, 3362, doi: 10.1016/j.actbio.2010.02.017,
207. Kojima, Y. et al., "Dehydration of water molecule in Amorphous Calcium Phosphate", *Phosphorus Research Bulletin*, **1994**, *4*, 47, doi: 10.3363/prb1992.4.0_47,
208. Yin, X., Stott, M.J., "Biological calcium phosphates and Posner's cluster", *J. Chem. Phys.*, **2003**, *118*, 3717, doi: 10.1063/1.1539093,
209. Habraken, W.J.E.M. et al., "Ion-association complexes unite classical and non-classical theories for the biomimetic nucleation of calcium phosphate", *Nat Commun*, **2013**, *4*, 1507, doi: 10.1038/ncomms2490,
210. Blumenthal, N.C., Posner, A.S., "Hydroxyapatite: Mechanism of formation and properties", *Calc. Tis Res.*, **1973**, *13*, 235, doi: 10.1007/BF02015413,
211. Boskey, A.L., Posner, A.S., "Conversion of amorphous calcium phosphate to microcrystalline hydroxyapatite. A pH-dependent, solution-mediated, solid-solid conversion", *J. Phys. Chem.*, **1973**, *77*, 2313, doi: 10.1021/j100638a011,
212. Ibsen, C.J.S. et al., "Apatite Formation from Amorphous Calcium Phosphate and Mixed Amorphous Calcium Phosphate/Amorphous Calcium Carbonate", *Chemistry – A European Journal*, **2016**, *22*, 12347, doi: 10.1002/chem.201601280,
213. Onuma, K., Ito, A., "Cluster Growth Model for Hydroxyapatite", *Chem. Mater.*, **1998**, *10*, 3346, doi: 10.1021/cm980062c,
214. Tao, J. et al., "Roles of Amorphous Calcium Phosphate and Biological Additives in the Assembly of Hydroxyapatite Nanoparticles", *J. Phys. Chem. B*, **2007**, *111*, 13410, doi: 10.1021/jp0732918,
215. Puech, J. et al., "A new mode of growing apatite crystallites", *Journal of Crystal Growth*, **1982**, *56*, 20, doi: 10.1016/0022-0248(82)90008-2,
216. Lotsari, A. et al., "Transformation of amorphous calcium phosphate to bone-like apatite", *Nat Commun*, **2018**, *9*, 4170, doi: 10.1038/s41467-018-06570-x,

217. Somrani, S. et al., "Physico-chemical and thermochemical studies of the hydrolytic conversion of amorphous tricalcium phosphate into apatite", *Journal of Solid State Chemistry*, **2005**, *178*, 1337, doi: 10.1016/j.jssc.2004.11.029,
218. Posner, A.S., Betts, F., "Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure", *Acc. Chem. Res.*, **1975**, *8*, 273, doi: 10.1021/ar50092a003,
219. Roohani, I. et al., "How to build a bone? - Hydroxyapatite or Posner's clusters as bone minerals", *Open Ceramics*, **2021**, *6*, 100092, doi: 10.1016/j.oceram.2021.100092,
220. Garcia, N.A. et al., "Simulation of Calcium Phosphate Prenucleation Clusters in Aqueous Solution: Association beyond Ion Pairing", *Cryst. Growth Des.*, **2019**, *19*, 6422, doi: 10.1021/acs.cgd.9b00889,
221. Wang, C.-G. et al., "Crystallization at Multiple Sites inside Particles of Amorphous Calcium Phosphate", *Cryst. Growth Des.*, **2009**, *9*, 2620, doi: 10.1021/cg801069t,
222. Veis, A., Dorvee, J.R., "Biomineralization Mechanisms: A New Paradigm for Crystal Nucleation in Organic Matrices", *Calcif Tissue Int*, **2013**, *93*, 307, doi: 10.1007/s00223-012-9678-2,
223. Lutsko, J.F., Nicolis, G., "Theoretical Evidence for a Dense Fluid Precursor to Crystallization", *Phys. Rev. Lett.*, **2006**, *96*, 046102, doi: 10.1103/PhysRevLett.96.046102,
224. Gower, L.B., Odom, D.J., "Deposition of calcium carbonate films by a polymer-induced liquid-precursor (PILP) process", *Journal of Crystal Growth*, **2000**, *210*, 719, doi: 10.1016/S0022-0248(99)00749-6,
225. Glimcher, M.J. et al., "Recent studies of the mineral phase in bone and its possible linkage to the organic matrix by protein-bound phosphate bonds", *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, **1984**, *304*, 479, doi: 10.1098/rstb.1984.0041,
226. Grynpas, M.D., Omelon, S., "Transient precursor strategy or very small biological apatite crystals?", *Bone*, **2007**, *41*, 162, doi: 10.1016/j.bone.2007.04.176,
227. Mahamid, J. et al., "Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish: Indications for an amorphous precursor phase", *PNAS*, **2008**, *105*, 12748, doi: 10.1073/pnas.0803354105,
228. Mahamid, J. et al., "Mapping amorphous calcium phosphate transformation into crystalline mineral from the cell to the bone in zebrafish fin rays", *PNAS*, **2010**, *107*, 6316, doi: 10.1073/pnas.0914218107,
229. Mahamid, J. et al., "Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: A cryo-electron microscopy study", *Journal of Structural Biology*, **2011**, *174*, 527, doi: 10.1016/j.jsb.2011.03.014,
230. Tertuliano, O.A., Greer, J.R., "The nanocomposite nature of bone drives its strength and damage resistance", *Nature Mater*, **2016**, *15*, 1195, doi: 10.1038/nmat4719,
231. Nudelman, F. et al., "The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors", *Nature Mater*, **2010**, *9*, 1004, doi: 10.1038/nmat2875,
232. Von Euw, S. et al., "Organization of Bone Mineral: The Role of Mineral–Water Interactions", *Geosciences*, **2018**, *8*, 466, doi: 10.3390/geosciences8120466,
233. Drouet, C. et al., "Nanocrystalline apatites: The fundamental role of water", *American Mineralogist*, **2018**, *103*, 550, doi: 10.2138/am-2018-6415,
234. Oosterlaken, B.M. et al., "In Vitro Mineralization of Collagen", *Adv. Mater.*, **2021**, *33*, 2004418, doi: 10.1002/adma.202004418,
235. Nudelman, F. et al., "The role of the amorphous phase on the biomimetic mineralization of collagen", *Faraday Discuss.*, **2012**, *159*, 357, doi: 10.1039/C2FD20062G,
236. Wang, Y. et al., "Water-mediated structuring of bone apatite", *Nature Mater*, **2013**, *12*, 1144, doi: 10.1038/nmat3787,
237. Olszta, M.J. et al., "Bone structure and formation: A new perspective", *Materials Science and Engineering: R: Reports*, **2007**, *58*, 77, doi: 10.1016/j.mser.2007.05.001,
238. Boonrungsiman, S. et al., "The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation", *PNAS*, **2012**, *109*, 14170, doi: 10.1073/pnas.1208916109,

239. Lebugle, A. et al., "Effect of structure and composition on the thermal decomposition of calcium phosphates (Ca/P = 1.33)", *Reactivity of Solids*, **1986**, *2*, 151, doi: 10.1016/0168-7336(86)80071-7,
240. Rodrigues, A., Lebugle, A., "Influence of ethanol in the precipitation medium on the composition, structure and reactivity of tricalcium phosphate", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **1998**, *145*, 191, doi: 10.1016/S0927-7757(98)00660-8,
241. Layrolle, P., Lebugle, A., "Characterization and Reactivity of Nanosized Calcium Phosphates Prepared in Anhydrous Ethanol", *Chem. Mater.*, **1994**, *6*, 1996, doi: 10.1021/cm00047a019,
242. Termine, J.D. et al., "Calcium phosphate formation in vitro", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1970**, *140*, 318, doi: 10.1016/0003-9861(70)90072-X,
243. Blumenthal, N.C. et al., "Stabilization of amorphous calcium phosphate by Mg and ATP", *Calc. Tis Res.*, **1977**, *23*, 245, doi: 10.1007/BF02012793,
244. Boskey, A.L., Posner, A.S., "Magnesium stabilization of amorphous calcium phosphate: A kinetic study", *Materials Research Bulletin*, **1974**, *9*, 907, doi: 10.1016/0025-5408(74)90169-X,
245. Montel, G. et al., "New concepts in the composition, crystallization and growth of the mineral component of calcified tissues", *Journal of Crystal Growth*, **1981**, *53*, 74, doi: 10.1016/0022-0248(81)90057-9,
246. Jin, B. et al., "Phase Transformation Mechanism of Amorphous Calcium Phosphate to Hydroxyapatite Investigated by Liquid-Cell Transmission Electron Microscopy", *Cryst. Growth Des.*, **2021**, *21*, 5126, doi: 10.1021/acs.cgd.1c00503,
247. Mayen, L. et al., "A soft-chemistry approach to the synthesis of amorphous calcium ortho/pyrophosphate biomaterials of tunable composition", *Acta Biomaterialia*, **2019**, S1742706119308566, doi: 10.1016/j.actbio.2019.12.027,
248. Robertson, W.G., "Factors affecting the precipitation of calcium phosphatein vitro", *Calc. Tis Res.*, **1973**, *11*, 311, doi: 10.1007/BF02547230,
249. Tovani, C.B. et al., "Formation of stable strontium-rich amorphous calcium phosphate: Possible effects on bone mineral", *Acta Biomaterialia*, **2019**, *92*, 315, doi: 10.1016/j.actbio.2019.05.036,
250. Chatzipanagis, K. et al., "Crystallization of citrate-stabilized amorphous calcium phosphate to nanocrystalline apatite: a surface-mediated transformation", *CrystEngComm*, **2016**, *18*, 3170, doi: 10.1039/C6CE00521G,
251. Robin, M. et al., "The Concentration of Bone-Related Organic Additives Drives the Pathway of Apatite Formation", *Cryst. Growth Des.*, **2021**, *21*, 3994, doi: 10.1021/acs.cgd.1c00316,
252. Ding, H. et al., "Toward a Detailed Understanding of Magnesium Ions on Hydroxyapatite Crystallization Inhibition", *Cryst. Growth Des.*, **2014**, *14*, 763, doi: 10.1021/cg401619s,
253. Chen, Y. et al., "Stabilizing amorphous calcium phosphate phase by citrate adsorption", *CrystEngComm*, **2014**, *16*, 1864, doi: 10.1039/C3CE42274G,
254. Gras, P. et al., "Synthesis and Characterisation of Hydrated Calcium Pyrophosphate Phases of Biological Interest: Hydrated Calcium Pyrophosphate Phases of Biological Interest", *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2013**, *2013*, 5886, doi: 10.1002/ejic.201300955,
255. Guo, H. et al., "Quantitative phase analyses of biomedical pyrophosphate-bearing monetite and brushite cements by solid-state NMR and powder XRD", *Ceramics International*, **2020**, *46*, 11000, doi: 10.1016/j.ceramint.2020.01.116,
256. Brown, E.H. et al., "Fertilizer Materials, Preparation and Characterization of Some Calcium Pyrophosphates", *J. Agric. Food Chem.*, **1963**, *11*, 214, doi: 10.1021/jf60127a020,
257. Groves, P.J. et al., "Synthesis of triclinic calcium pyrophosphate crystals", *J Mater Sci: Mater Med*, **2007**, *18*, 1355, doi: 10.1007/s10856-007-0129-y,
258. Soulié, J. et al., Pyrophosphate material, process for preparing such material, and use for bone repair, FR3026292A1, **2016**,
259. Soulié, J. et al., "Development of a new family of monolithic calcium (pyro)phosphate glasses by soft chemistry", *Acta Biomaterialia*, **2016**, *41*, 320, doi: 10.1016/j.actbio.2016.05.030,

260. Thouverey, C. et al., "Inorganic pyrophosphate as a regulator of hydroxyapatite or calcium pyrophosphate dihydrate mineral deposition by matrix vesicles", *Osteoarthritis and Cartilage*, **2009**, *17*, 64, doi: 10.1016/j.joca.2008.05.020,
261. Desbord, M., "Elaboration et étude des propriétés physico-chimiques et biologiques de nouveaux matériaux amorphes bioactifs pyro/orthophosphate de calcium", Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse), **2020**,
262. Desbord, M. et al., "Tunable Behavior in Solution of Amorphous Calcium Ortho/Pyrophosphate Materials: An Acellular In Vitro Study", *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2022**, *8*, 2363, doi: 10.1021/acsbiomaterials.1c01618,
263. Cartwright, J.H.E. et al., "Calcium Carbonate Polyamorphism and Its Role in Biomineralization: How Many Amorphous Calcium Carbonates Are There?", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 11960, doi: 10.1002/anie.201203125,
264. Levi-Kalisman, Y. et al., "X-Ray absorption spectroscopy studies on the structure of a biogenic “amorphous” calcium carbonate phase", *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2000**, 3977, doi: 10.1039/b003242p,
265. Politi, Y. et al., "Structural Characterization of the Transient Amorphous Calcium Carbonate Precursor Phase in Sea Urchin Embryos", *Adv. Funct. Mater.*, **2006**, *16*, 1289, doi: 10.1002/adfm.200600134,
266. Raz, S. et al., "The Transient Phase of Amorphous Calcium Carbonate in Sea Urchin Larval Spicules: The Involvement of Proteins and Magnesium Ions in Its Formation and Stabilization", *Adv. Funct. Mater.*, **2003**, *13*, 480, doi: 10.1002/adfm.200304285,
267. Beniash, E. et al., "Cellular Control Over Spicule Formation in Sea Urchin Embryos: A Structural Approach", *Journal of Structural Biology*, **1999**, *125*, 50, doi: 10.1006/jsbi.1998.4081,
268. Hasse, B. et al., "Calcium Carbonate Modifications in the Mineralized Shell of the Freshwater Snail Biomphalaria glabrata", *Chem. Eur. J.*, **2000**, *6*, 3679, doi: https://doi.org/10.1002/1521-3765(20001016)6:20<3679::AID-CHEM3679>3.0.CO;2-%23,
269. Marxen, J.C. et al., "Early mineralization in biomphalaria glabrata: microscopi and structural results", *Journal of Molluscan Studies*, **2003**, *69*, 113, doi: 10.1093/mollus/69.2.113,
270. Weiss, I.M. et al., "Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite", *J. Exp. Zool.*, **2002**, *293*, 478, doi: 10.1002/jez.90004,
271. Aizenberg, J. et al., "Factors Involved in the Formation of Amorphous and Crystalline Calcium Carbonate: A Study of an Ascidian Skeleton", *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 32, doi: 10.1021/ja016990l,
272. Aizenberg, J. et al., "Stabilization of amorphous calcium carbonate by specialized macromolecules in biological and synthetic precipitates", *Adv. Mater.*, **1996**, *8*, 222, doi: 10.1002/adma.19960080307,
273. Gal, A. et al., "The Stabilizing Effect of Silicate on Biogenic and Synthetic Amorphous Calcium Carbonate", *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 13208, doi: 10.1021/ja106883c,
274. Al-Sawalmih, A. et al., "On the Stability of Amorphous Minerals in Lobster Cuticle", *Adv. Mater.*, **2009**, *21*, 4011, doi: 10.1002/adma.200900295,
275. Taylor, M.G. et al., "An X-ray absorption spectroscopy study of the structure and transformation of amorphous calcium carbonate from plant cystoliths", *Proc. R. Soc. Lond. B*, **1993**, *252*, 75, doi: 10.1098/rspb.1993.0048,
276. Fernandez-Martinez, A. et al., "Structural Characteristics and the Occurrence of Polyamorphism in Amorphous Calcium Carbonate", In "New Perspectives on Mineral Nucleation and Growth", Editors Van Driessche, A. E. S.; Kellermeier, M.; et al., Springer International Publishing, **2017**, 77, doi: 10.1007/978-3-319-45669-0_4,
277. Farhadi-Khouzani, M. et al., "Water as the Key to Proto-Aragonite Amorphous CaCO3", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*, 8117, doi: 10.1002/anie.201603176,
278. Tobler, D.J. et al., "Citrate Effects on Amorphous Calcium Carbonate (ACC) Structure, Stability, and Crystallization", *Adv. Funct. Mater.*, **2015**, *25*, 3081, doi: 10.1002/adfm.201500400,

279. Lam, R.S.K. et al., "Synthesis-dependant structural variations in amorphous calcium carbonate", *CrystEngComm*, **2007**, *9*, 1226, doi: 10.1039/b710895h,
280. Albéric, M. et al., "The Crystallization of Amorphous Calcium Carbonate is Kinetically Governed by Ion Impurities and Water", *Adv. Sci.*, **2018**, *5*, 1701000, doi: 10.1002/advs.201701000,
281. Leukel, S. et al., "Trapping Amorphous Intermediates of Carbonates – A Combined Total Scattering and NMR Study", *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 14638, doi: 10.1021/jacs.8b06703,
282. Tobler, D.J. et al., "Effect of pH on Amorphous Calcium Carbonate Structure and Transformation", *Cryst. Growth Des.*, **2016**, *16*, 4500, doi: 10.1021/acs.cgd.6b00630,
283. Farhadi-Khouzani, M. et al., "Disordered amorphous calcium carbonate from direct precipitation", *CrystEngComm*, **2015**, *17*, 4842, doi: 10.1039/C5CE00720H,
284. Carino, A. et al., "Thermodynamic-Kinetic Precipitation Modeling. A Case Study: The Amorphous Calcium Carbonate (ACC) Precipitation Pathway Unravelled", *Cryst. Growth Des.*, **2017**, *17*, 2006, doi: 10.1021/acs.cgd.7b00006,
285. Hu, Q. et al., "The thermodynamics of calcite nucleation at organic interfaces: Classical vs. non-classical pathways", *Faraday Discuss.*, **2013**, *159*, 509, doi: 10.1039/C2FD20124K,
286. Tribello, G.A. et al., "A Molecular Dynamics Study of the Early Stages of Calcium Carbonate Growth", *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 11680, doi: 10.1021/jp902606x,
287. Nudelman, F. et al., "Stabilization of amorphous calcium carbonate by controlling its particle size", *Nanoscale*, **2010**, *2*, 2436, doi: 10.1039/C0NR00432D,
288. Navrotsky, A., "Energetic clues to pathways to biomineralization: Precursors, clusters, and nanoparticles", *PNAS*, **2004**, *101*, 12096, doi: 10.1073/pnas.0404778101,
289. Guillemet, B. et al., "Nanosized Amorphous Calcium Carbonate Stabilized by Poly(ethylene oxide)-b-poly(acrylic acid) Block Copolymers", *Langmuir*, **2006**, *22*, 1875, doi: 10.1021/la052419e,
290. Xu, Y. et al., "Microscopic structure of the polymer-induced liquid precursor for calcium carbonate", *Nat Commun*, **2018**, *9*, 2582, doi: 10.1038/s41467-018-05006-w,
291. Bewernitz, M.A. et al., "A metastable liquid precursor phase of calcium carbonate and its interactions with polyaspartate", *Faraday Discuss.*, **2013**, *159*, 291, doi: 10.1039/C2FD20080E,
292. Wolf, S.E. et al., "Strong Stabilization of Amorphous Calcium Carbonate Emulsion by Ovalbumin: Gaining Insight into the Mechanism of "Polymer-Induced Liquid Precursor" Processes", *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 12642, doi: 10.1021/ja202622g,
293. Faatz, M. et al., "Amorphous Calcium Carbonate: Synthesis and Potential Intermediate in Biomineralization", *Adv. Mater.*, **2004**, *16*, 996, doi: 10.1002/adma.200306565,
294. Gorna, K. et al., "Amorphous calcium carbonate in form of spherical nanosized particles and its application as fillers for polymers", *Materials Science and Engineering A*, **2008**, *447 (1-2)*, 217, doi: 10.1016/j.msea.2007.05.045,
295. Rodriguez-Navarro, C. et al., "Formation of amorphous calcium carbonate and its transformation into mesostructured calcite", *CrystEngComm*, **2015**, *17*, 58, doi: 10.1039/C4CE01562B,
296. Chao, Y. et al., "In Situ Probing Calcium Carbonate Formation by Combining Fast Controlled Precipitation Method and Small-Angle X-ray Scattering", *Langmuir*, **2014**, *30*, 3303, doi: 10.1021/la500202g,
297. Demichelis, R. et al., "Stable prenucleation mineral clusters are liquid-like ionic polymers", *Nat Commun*, **2011**, *2*, 590, doi: 10.1038/ncomms1604,
298. Kellermeier, M. et al., "Entropy Drives Calcium Carbonate Ion Association", *ChemPhysChem*, **2016**, *17*, 3535, doi: 10.1002/cphc.201600653,
299. Sebastiani, F. et al., "Water Dynamics from THz Spectroscopy Reveal the Locus of a Liquid–Liquid Binodal Limit in Aqueous CaCO3 Solutions", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*, 490, doi: 10.1002/anie.201610554,
300. Gebauer, D. et al., "Pre-nucleation clusters as solute precursors in crystallisation", *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 2348, doi: 10.1039/C3CS60451A,
301. Wallace, A.F. et al., "Microscopic Evidence for Liquid-Liquid Separation in Supersaturated CaCO3 Solutions", *Science*, **2013**, *341*, 885, doi: 10.1126/science.1230915,

302. Cheng, X. et al., "Biomimetic synthesis of calcite films by a polymer-induced liquid-precursor (PILP) process: 1. Influence and incorporation of magnesium", *Journal of Crystal Growth*, **2007**, *307*, 395, doi: 10.1016/j.jcrysgro.2007.07.006,
303. Verch, A. et al., "How to control the scaling of CaCO 3 : a “fingerprinting technique” to classify additives", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, *13*, 16811, doi: 10.1039/C1CP21328H,
304. Gebauer, D. et al., "The Multiple Roles of Additives in CaCO3 Crystallization: A Quantitative Case Study", *Adv. Mater.*, **2009**, *21*, 435, doi: 10.1002/adma.200801614,
305. Sun, R., "Porous Amorphous Calcium Carbonate and Phosphate. Synthesis and Application", Thèse, Uppsala Universitet, **2019**,
306. Ramnarain, V. et al., "Monitoring of CaCO3 Nanoscale Structuration through Real-Time Liquid Phase Transmission Electron Microscopy and Hyperpolarized NMR", *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, *144*, 15236, doi: 10.1021/jacs.2c05731,
307. Smeets, P.J.M. et al., "A classical view on nonclassical nucleation", *PNAS*, **2017**, *114*, E7882, doi: 10.1073/pnas.1700342114,
308. Teychené, S. et al., "Reactive crystallization: From mixing to control of kinetics by additives", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2020**, *46*, 1, doi: 10.1016/j.cocis.2020.01.003,
309. Du, H., Amstad, E., "Water: How Does It Influence the CaCO3 Formation?", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*, 1798, doi: 10.1002/anie.201903662.,
310. Saharay, M. et al., "Dehydration-Induced Amorphous Phases of Calcium Carbonate", *J. Phys. Chem. B*, **2013**, *117*, 3328, doi: 10.1021/jp308353t,
311. Radha, A.V. et al., "Transformation and crystallization energetics of synthetic and biogenic amorphous calcium carbonate", *PNAS*, **2010**, *107*, 16438, doi: 10.1073/pnas.1009959107,
312. Yoshino, T. et al., "Pressure-Induced Crystallization from Amorphous Calcium Carbonate", *Cryst. Growth Des.*, **2012**, *12*, 3357, doi: 10.1021/cg2017159,
313. Sen, S. et al., "Hydrogen bonding induced distortion of CO3 units and kinetic stabilization of amorphous calcium carbonate: results from 2D 13C NMR spectroscopy", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2016**, *18*, 21330, doi: 10.1039/c6cp02729f,
314. Kababya, S. et al., "Phosphate–Water Interplay Tunes Amorphous Calcium Carbonate Metastability: Spontaneous Phase Separation and Crystallization vs Stabilization Viewed by Solid State NMR", *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, 990, doi: 10.1021/ja511869g,
315. Liu, Z. et al., "Shape-preserving amorphous-to-crystalline transformation of $CaCO_3$ revealed by in situ TEM", *PNAS*, **2020**, *117*, 3397, doi: 10.1073/pnas.1914813117,
316. Pontoni, D. et al., "Crystallization of Calcium Carbonate Observed In-situ by Combined Small- and Wide-angle X-ray Scattering", *J. Phys. Chem. B*, **2003**, *107*, 5123, doi: https://doi.org/10.1021/jp0343640,
317. Rodriguez-Blanco, J.D. et al., "The role of pH and Mg on the stability and crystallization of amorphous calcium carbonate", *Journal of Alloys and Compounds*, **2012**, *536*, S477, doi: 10.1016/j.jallcom.2011.11.057,
318. Giuffre, A.J. et al., "Isotopic tracer evidence for the amorphous calcium carbonate to calcite transformation by dissolution–reprecipitation", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **2015**, *165*, 407, doi: 10.1016/j.gca.2015.06.002,
319. Konrad, F. et al., "Transformation of Amorphous Calcium Carbonate in Air", *Cryst. Growth Des.*, **2016**, *16*, 6310, doi: 10.1021/acs.cgd.6b00906,
320. Zou, Z. et al., "Opposite Particle Size Effect on Amorphous Calcium Carbonate Crystallization in Water and during Heating in Air", *Chem. Mater.*, **2015**, *27*, 4237, doi: 10.1021/acs.chemmater.5b00145,
321. Chen, S.-F. et al., "Ethanol assisted synthesis of pure and stable amorphous calcium carbonate nanoparticles", *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 9564, doi: 10.1039/c3cc45427d,
322. Bots, P. et al., "Mechanistic Insights into the Crystallization of Amorphous Calcium Carbonate (ACC)", *Cryst. Growth Des.*, **2012**, *12*, 3806, doi: 10.1021/cg300676b,

323. Rodriguez-Blanco, J.D. et al., "The kinetics and mechanisms of amorphous calcium carbonate (ACC) crystallization to calcite , via vaterite.", *Nanoscale*, **2011**, *3*, 265, doi: 10.1039/C0NR00589D,
324. Ihli, J. et al., "Dehydration and crystallization of amorphous calcium carbonate in solution and in air", *Nat Commun*, **2014**, *5*, doi: 10.1038/ncomms4169,
325. Zou, Z. et al., "Additives Control the Stability of Amorphous Calcium Carbonate via Two Different Mechanisms: Surface Adsorption versus Bulk Incorporation", *Adv. Funct. Mater.*, **2020**, *30*, 2000003, doi: 10.1002/adfm.202000003,
326. Jensen, A.C.S. et al., "Hydrogen Bonding in Amorphous Calcium Carbonate and Molecular Reorientation Induced by Dehydration", *J. Phys. Chem. C*, **2018**, *122*, 3591, doi: 10.1021/acs.jpcc.7b10459,
327. Ihli, J. et al., "Freeze-drying yields stable and pure amorphous calcium carbonate (ACC)", *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 3134, doi: 10.1039/c3cc40807h,
328. Lee, H.S. et al., "Fabrication of unusually stable amorphous calcium carbonate in an ethanol medium", *Materials Chemistry and Physics*, **2005**, *93*, 376, doi: 10.1016/j.matchemphys.2005.03.037,
329. Akhtar, S. et al., "Influence of Phosphate Ions on the Stability of Amorphous Calcium Carbonate", *KEM*, **2006**, *309–311*, 179, doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.309-311.179,
330. Kojima, Y. et al., "Synthesis of Amorphous Calcium Carbonate and Its Crystallization", *Nippon Seramikkusu Kyokai gakujutsu ronbunshi*, **1993**, *101*, 1145, doi: 10.2109/jcersj.101.1145,
331. Rodriguez-Blanco, J.D. et al., "How to make “stable” ACC: protocol and preliminary structural characterization", *Mineral. mag.*, **2008**, *72*, 283, doi: 10.1180/minmag.2008.072.1.283,
332. Koga, N. et al., "Effects of humidity on calcite block fabrication using calcium hydroxide compact", *Ceramics International*, **2015**, *41*, 9482, doi: 10.1016/j.ceramint.2015.04.005,
333. Koga, N. et al., "Crystallization of amorphous calcium carbonate", *Thermochimica Acta*, **1998**, *318*, 239, doi: 10.1016/S0040-6031(98)00348-7,
334. Xu, X.-R. et al., "The roles of water and polyelectrolytes in the phase transformation of amorphous calcium carbonate", *Journal of Crystal Growth*, **2008**, *310*, 3779, doi: 10.1016/j.jcrysgro.2008.05.034,
335. Tewes, F. et al., "Amorphous Calcium Carbonate Based-Microparticles for Peptide Pulmonary Delivery", *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, *8*, 1164, doi: 10.1021/acsami.5b09023,
336. Wang, H.-W. et al., "Synthesis and structure of synthetically pure and deuterated amorphous (basic) calcium carbonates", *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 2942, doi: 10.1039/C6CC08848A,
337. Weiner, S. et al., "Biologically Formed Amorphous Calcium Carbonate", *Connective Tissue Research*, **2003**, *44*, 214, doi: 10.1080/03008200390181681,
338. Politi, Y. et al., "Role of Magnesium Ion in the Stabilization of Biogenic Amorphous Calcium Carbonate: A Structure−Function Investigation", *Chem. Mater.*, **2010**, *22*, 161, doi: 10.1021/cm902674h,
339. Akiva-Tal, A. et al., "In situ molecular NMR picture of bioavailable calcium stabilized as amorphous CaCO3 biomineral in crayfish gastroliths", *PNAS*, **2011**, *108*, 14763, doi: doi.org/10.1073/pnas.1102608108,
340. Ajili, W. et al., "Inorganic phosphate in growing calcium carbonate abalone shell suggests a shared mineral ancestral precursor", *Nat Commun*, **2022**, *13*, 1496, doi: 10.1038/s41467-022-29169-9,
341. Loste, E. et al., "The role of magnesium in stabilising amorphous calcium carbonate and controlling calcite morphologies", *Journal of Crystal Growth*, **2003**, *254*, 206, doi: 10.1016/S0022-0248(03)01153-9,
342. Di Tommaso, D., Leeuw, N.H. De., "Structure and dynamics of the hydrated magnesium ion and of the solvated magnesium carbonates: insights from first principles simulations", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2010**, *12*, 894, doi: 10.1039/B915329B,
343. Reddy, M.M., Nancollas, G.H., "The crystallization of calcium carbonate", *Journal of Crystal Growth*, **1976**, *35*, 33, doi: 10.1016/0022-0248(76)90240-2,

344. Ajikumar, P.K. et al., "Synthesis and Characterization of Monodispersed Spheres of Amorphous Calcium Carbonate and Calcite Spherules", *Cryst. Growth Des.*, **2005**, *5*, 1129, doi: 10.1021/cg049606f,
345. Koishi, A. et al., "Role of Impurities in the Kinetic Persistence of Amorphous Calcium Carbonate: A Nanoscopic Dynamics View", *J. Phys. Chem. C*, **2018**, *122*, 16983, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b05189,
346. Ihli, J. et al., "The Effect of Additives on Amorphous Calcium Carbonate (ACC): Janus Behavior in Solution and the Solid State", *Adv. Funct. Mater.*, **2013**, *23*, 1575, doi: https://doi.org/10.1002/adfm.201201805,
347. Nebel, H., Epple, M., "Continuous Preparation of Calcite, Aragonite and Vaterite, and of Magnesium-Substituted Amorphous Calcium Carbonate (Mg-ACC)", *Z. anorg. allg. Chem.*, **2008**, *634*, 1439, doi: 10.1002/zaac.200800134,
348. Yang, S.-Y. et al., "Is Mg-stabilized amorphous calcium carbonate a homogeneous mixture of amorphous magnesium carbonate and amorphous calcium carbonate?", *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, 11527, doi: 10.1039/C6CC04522G,
349. Lin, Y.-P., Singer, P.C., "Inhibition of calcite precipitation by orthophosphate: Speciation and thermodynamic considerations", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **2006**, *70*, 2530, doi: 10.1016/j.gca.2006.03.002,
350. Zou, Z. et al., "Additives influence the phase behavior of calcium carbonate solution by a cooperative ion-association process", *J. Mater. Chem. B*, **2018**, *6*, 449, doi: 10.1039/C7TB03170J,
351. Zou, Z. et al., "Nonclassical Crystallization of Amorphous Calcium Carbonate in the Presence of Phosphate Ions", *Cryst. Growth Des.*, **2021**, *21*, 414, doi: 10.1021/acs.cgd.0c01245,
352. Meyer, H.J., "The influence of impurities on the growth rate of calcite", *Journal of Crystal Growth*, **1984**, *66*, 639, doi: 10.1016/0022-0248(84)90164-7,
353. Tadier, S. et al., "Crystal growth of aragonite in the presence of phosphate", *Journal of Crystal Growth*, **2017**, *458*, 44, doi: 10.1016/j.jcrysgro.2016.10.046,
354. Lin, Y.-P., Singer, P.C., "Inhibition of calcite crystal growth by polyphosphates", *Water Research*, **2005**, *39*, 4835, doi: 10.1016/j.watres.2005.10.003,
355. Ben, Y. et al., Amorphous calcium carbonate stabilized with polyphosphates or biphosphonates, US20180140631A1, **2018**,
356. Fernández-Díaz, L. et al., "The role of sulfate groups in controlling CaCO3 polymorphism", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **2010**, *74*, 6064, doi: 10.1016/j.gca.2010.08.010,
357. Xu, X. et al., "Formation of Amorphous Calcium Carbonate Thin Films and Their Role in Biomineralization", *Chem. Mater.*, **2004**, *16*, 1740, doi: 10.1021/cm035183d,
358. Pountos, I., Giannoudis, P.V., "Is there a role of coral bone substitutes in bone repair?", *Injury*, **2016**, *47*, 2606, doi: 10.1016/j.injury.2016.10.025,
359. Shors, E.C., "Coralline bone graft substitutes", *Orthopedic Clinics of North America*, **1999**, *30*, 599, doi: 10.1016/S0030-5898(05)70113-9,
360. Wiesmann, H.P. et al., "Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering: Part II", *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **2004**, *33*, 523, doi: 10.1016/j.ijom.2004.04.005,
361. Papa, F. et al., "Outcome of 47 Consecutive Sinus Lift Operations Using Aragonitic Calcium Carbonate Associated With Autologous Platelet-Rich Plasma: Clinical, Histologic, and Histomorphometrical Evaluations", *Journal of Craniofacial Surgery*, **2009**, *20*, 2067, doi: 10.1097/SCS.0b013e3181be88ab,
362. Souyris, F. et al., "Coral, a new biomedicalmaterial experimental and first clinical investigations on Madreporaria", *Journal of Maxillofacial Surgery*, **1985**, *13*, 64, doi: 10.1016/S0301-0503(85)80018-7,
363. Mora, F., Ouhayoun, J.P., "Clinical evaluation of natural coral and porous hydroxyapatite implants in periodontal bone lesions: results of a 1 -year follow-up", *J Clin Periodontol*, **1995**, *22*, 877, doi: 10.1111/j.1600-051X.1995.tb01787.x,

364. Hou, R. et al., "Comparative study between coral-mesenchymal stem cells-rhBMP-2 composite and auto-bone-graft in rabbit critical-sized cranial defect model", *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **2007**, *80A*, 85, doi: 10.1002/jbm.a.30840,
365. Viateau, V. et al., "Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: A study on sheep", *J. Orthop. Res.*, **2007**, *25*, 741, doi: 10.1002/jor.20352,
366. Chiroff, R.T. et al., "Tissue ingrowth of replamineform implants", *J. Biomed. Mater. Res.*, **1975**, *9*, 29, doi: doi.org/10.1002/jbm.820090407,
367. White, R.A. et al., "Replamineform: a new process for preparing porous ceramic, metal, and polymer prosthetic materials", *Science*, **1972**, *176*, 922, doi: 10.1126/science.176.4037.922,
368. Liao, H. et al., "Tissue responses to natural aragonite (Margaritifera shell) implants in vivo", *Biomaterials*, **2000**, *21*, 457, doi: 10.1016/S0142-9612(99)00184-2,
369. Lamghari, M. et al., "Bone reactions to nacre injected percutaneously into the vertebrae of sheep", *Biomaterials*, **2001**, *22*, 555, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00213-1,
370. Lamghari, M. et al., "Arthrodesis of Lumbar Spine Transverse Processes Using Nacre in Rabbit", *J Bone Miner Res*, **2001**, *16*, 2232, doi: 10.1359/jbmr.2001.16.12.2232,
371. Atlan, G. et al., "Interface between bone and nacre implants in sheep", *Biomaterials*, **1999**, *20*, 1017, doi: 10.1016/S0142-9612(98)90212-5,
372. Pereira Mouriès, L. et al., "Bioactivity of nacre water-soluble organic matrix from the bivalve mollusk Pinctada maxima in three mammalian cell types: fibroblasts, bone marrow stromal cells and osteoblasts", *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **2002**, *132*, 217, doi: 10.1016/S1096-4959(01)00524-3,
373. Neunzehn, J. et al., "Eggshells as natural calcium carbonate source in combination with hyaluronan as beneficial additives for bone graft materials, an in vitro study", *Head & Face Medicine*, **2015**, *11*, 12, doi: 10.1186/s13005-015-0070-0,
374. Wang, Y., Thomson, W.J., "The effect of sample preparation on the thermal decomposition of CaCO3", *Thermochimica Acta*, **1995**, *255*, 383, doi: 10.1016/0040-6031(94)02151-D,
375. Monchau, F. et al., "Calcite as a bone substitute. Comparison with hydroxyapatite and tricalcium phosphate with regard to the osteoblastic activity", *Materials Science and Engineering: C*, **2013**, *33*, 490, doi: 10.1016/j.msec.2012.09.019,
376. Vlasov, A.S., Poroskova, A.A., "Sintering of calcium carbonate in the presence of lithium carbonate additive", *Glass Ceram*, **1997**, *54*, 387, doi: 10.1007/BF02766759,
377. Umemoto, S. et al., "*In vivo* bioresorbability and bone formation ability of sintered highly pure calcium carbonate granules", *Dent. Mater. J.*, **2021**, *40*, 1202, doi: 10.4012/dmj.2020-254,
378. He, F. et al., "Fabrication of a Novel Calcium Carbonate Composite Ceramic as Bone Substitute", *J. Am. Ceram. Soc.*, **2015**, *98*, 223, doi: 10.1111/jace.13285,
379. Lemos, A.F., Ferreira, J.M.F., "Porous bioactive calcium carbonate implants processed by starch consolidation", *Materials Science and Engineering: C*, **2000**, *11*, 35, doi: 10.1016/S0928-4931(00)00134-X,
380. Lucas-Girot, A. et al., "Gentamicin-loaded calcium carbonate materials: Comparison of two drug-loading modes", *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, **2005**, *73B*, 164, doi: 10.1002/jbm.b.30210,
381. Chróścicka, A. et al., "Synthetic Calcite as a Scaffold for Osteoinductive Bone Substitutes", *Ann Biomed Eng*, **2016**, *44*, 2145, doi: 10.1007/s10439-015-1520-3,
382. Yamaguchi, K., Hashimoto, S., "Mechanism of densification of calcium carbonate by cold sintering process", *Journal of the European Ceramic Society*, **2022**, *42*, 6048, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2022.06.034,
383. He, F. et al., "In vitro degradation and cell response of calcium carbonate composite ceramic in comparison with other synthetic bone substitute materials", *Materials Science and Engineering: C*, **2015**, *50*, 257, doi: 10.1016/j.msec.2015.02.019,
384. Liu, Y. et al., "Evaluation of the attachment, proliferation, and differentiation of osteoblast on a calcium carbonate coating on titanium surface", *Materials Science and Engineering: C*, **2011**, *31*, 1055, doi: 10.1016/j.msec.2011.03.003,

385. Le Thi, B. et al., "Biological responses of MC3T3-E1 on calcium carbonate coatings fabricated by hydrothermal reaction on titanium", *Biomed. Mater.*, **2020**, *15*, 035004, doi: 10.1088/1748-605X/ab6939,
386. Shi, R. et al., "Fabrication of calcite-coated rough-surface titanium using calcium nitrate", *Surface and Coatings Technology*, **2018**, *356*, 72, doi: 10.1016/j.surfcoat.2018.09.050,
387. Wang, X.-X. et al., "Biological fabrication of nacreous coating on titanium dental implant", *Biomaterials*, **2005**, *26*, 6229, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.03.029,
388. Fontaine, M. et al., Composition de ciment hydraulique à base de carbonates de calcium, FR2830249, **2001**,
389. Combes, C. et al., "Rheological properties of calcium carbonate self-setting injectable paste", *Acta Biomaterialia*, **2010**, *6*, 920, doi: 10.1016/j.actbio.2009.08.032,
390. Tadier, S. et al., "Strontium-loaded mineral bone cements as sustained release systems: Compositions, release properties, and effects on human osteoprogenitor cells", *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, **2012**, *100B*, 378, doi: 10.1002/jbm.b.31959,
391. Noukrati, H., "Etude physicochimique de l'association d'un antibiotique avec un ciment apatitique pour la substitution osseuse", Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse), **2015**,
392. Ishikawa, K., "1.17 Bioactive Ceramics: Cements ☆", In "Comprehensive Biomaterials II", Elsevier, **2017**, 368, doi: 10.1016/B978-0-12-803581-8.10170-5,
393. Dorozhkin, S.V., "Calcium orthophosphate cements for biomedical application", *J Mater Sci*, **2008**, *43*, 3028, doi: 10.1007/s10853-008-2527-z,
394. Lee, Y. et al., "Development of macropores in calcium carbonate body using novel carbonation method of calcium hydroxide/sodium chloride composite", *J Mater Sci*, **2007**, *42*, 5728, doi: 10.1007/s10853-006-0747-7,
395. Woldetsadik, A.D. et al., "Hierarchically Porous Calcium Carbonate Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2017**, *3*, 2457, doi: 10.1021/acsbiomaterials.7b00301,
396. Wang, X. et al., "Amorphous polyphosphate/amorphous calcium carbonate implant material with enhanced bone healing efficacy in a critical-size defect in rats", *Biomed. Mater.*, **2016**, *11*, 035005, doi: 10.1088/1748-6041/11/3/035005,
397. Wang, J. et al., "Calcium Supplement by Tetracycline guided amorphous Calcium Carbonate potentiates Osteoblast promotion for Synergetic Osteoporosis Therapy", *Theranostics*, **2020**, *10*, 8591, doi: 10.7150/thno.45142,
398. Meiron, O.E. et al., "Solubility and bioavailability of stabilized amorphous calcium carbonate", *J Bone Miner Res*, **2011**, *26*, 364, doi: 10.1002/jbmr.196,
399. Popescu, D.C. et al., "Shaping Amorphous Calcium Carbonate Films into 2D Model Substrates for Bone Cell Culture", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 1762, doi: doi.org/10.1002/anie.200502602,
400. Schröder, R. et al., "Particles of vaterite, a metastable CaCO3 polymorph, exhibit high biocompatibility for human osteoblasts and endothelial cells and may serve as a biomaterial for rapid bone regeneration", *J Tissue Eng Regen Med*, **2018**, *12*, 1754, doi: 10.1002/term.2703,
401. Unger, R.E. et al., "In Vivo Biocompatibility Investigation of an Injectable Calcium Carbonate (Vaterite) as a Bone Substitute including Compositional Analysis via SEM-EDX Technology", *International Journal of Molecular Sciences*, **2022**, *23*, 1196, doi: 10.3390/ijms23031196,
402. Fujihara, K. et al., "Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers", *Biomaterials*, **2005**, *26*, 4139, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.014,
403. Dhand, C. et al., "Bio-inspired in situ crosslinking and mineralization of electrospun collagen scaffolds for bone tissue engineering", *Biomaterials*, **2016**, *104*, 323, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.07.007,
404. Kasuga, T. et al., "Preparation of poly(lactic acid) composites containing calcium carbonate (vaterite)", *Biomaterials*, **2003**, *24*, 3247, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00190-X,

405. Olah, L. et al., "Synthesis, structural and mechanical properties of porous polymeric scaffolds for bone tissue regeneration based on neat poly(ε-caprolactone) and its composites with calcium carbonate", *Polymers for Advanced Technologies*, **2006**, *17*, 889, doi: 10.1002/pat.768,
406. Mao, L.-B. et al., "Synthetic nacre by predesigned matrix-directed mineralization", *Science*, **2016**, *354*, 107, doi: 10.1126/science.aaf8991,
407. Zhang, H., "Ice Templating and Freeze-Drying for Porous Materials and Their Applications", John Wiley & Sons, **2018**,
408. Barthelat, F., "Growing a synthetic mollusk shell", *Science*, **2016**, *354*, 32, doi: 10.1126/science.aah6507,
409. Bohner, M. et al., "Calcium phosphate bone graft substitutes: Failures and hopes", *Journal of the European Ceramic Society*, **2012**, *32*, 2663, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2012.02.028,
410. Store, G., Boysen, M., "Mandibular osteoradionecrosis: clinical behaviour and diagnostic aspects", *Clin Otolaryngol*, **2000**, *25*, 378, doi: 10.1046/j.1365-2273.2000.00367.x,
411. Schwartz, H.C., Kagan, A.R., "Osteoradionecrosis of the Mandible: Scientific Basis for Clinical Staging", *American Journal of Clinical Oncology*, **2002**, *25*, 168,
412. Bettoni, J. et al., "L'ostéoradionécrose manidbualire (2e partie) : prise en charge thérapeutique", *Ortho-Rhumato*, **2020**, *18*, 35,
413. Lagarrigue, P. et al., "Biomaterials and osteoradionecrosis of the jaw: Review of the literature according to the SWiM methodology", *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, **2021**, doi: 10.1016/j.anorl.2021.06.006,
414. Holzwarth, U., Gibson, N., "The Scherrer equation versus the "Debye-Scherrer equation"", *Nature Nanotech*, **2011**, *6*, 534, doi: 10.1038/nnano.2011.145,
415. Langford, J.I., Wilson, A.J.C., "Scherrer after Sixty Years: A Survey and Some New Results in the Determination of Crystallite Size", *J. Appl. Cryst.*, **1978**, *11*, 102, doi: 10.1107/S0021889878012844,
416. Forbes, T.Z. et al., "The energetics of nanophase calcite", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **2011**, *75*, 7893, doi: 10.1016/j.gca.2011.09.034,
417. Van Wazer, J.R. et al., "Structure and Properties of the Condensed Phosphates. VII. Hydrolytic Degradation of Pyro- and Tripolyphosphate", *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, *77*, 287, doi: 10.1021/ja01607a011,
418. Sun, S. et al., "Distinct Short-Range Order Is Inherent to Small Amorphous Calcium Carbonate Clusters (<2 nm)", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*, 12206, doi: 10.1002/anie.201604179,
419. Sun, R. et al., "Amorphous Calcium Carbonate Constructed from Nanoparticle Aggregates with Unprecedented Surface Area and Mesoporosity", *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, *10*, 21556, doi: 10.1021/acsami.8b03939,
420. Sun, R. et al., "The effects of additives on the porosity and stability of amorphous calcium carbonate", *Microporous and Mesoporous Materials*, **2020**, *292*, 109736, doi: 10.1016/j.micromeso.2019.109736,
421. Schnablegger, H., Singh, Y., "The SAXS Guide : Getting acquainted with the principles", Anton Paar GmbH, **2013**,
422. Boldon, L. et al., "Review of the fundamental theories behind small angle X-ray scattering, molecular dynamics simulations, and relevant integrated application", *Nano Reviews*, **2015**, *6*, 25661, doi: 10.3402/nano.v6.25661,
423. Hammouda, B., "A new Guinier-Porod model", *J. Appl. Cryst.*, **2010**, *43*, 716, doi: 10.1107/S0021889810015773,
424. Madani, S.H. et al., "Particle and cluster analyses of silica powders via small angle neutron scattering", *Powder Technology*, **2018**, *327*, 96, doi: 10.1016/j.powtec.2017.12.061,
425. Schmidt, P.W., "Small-angle scattering studies of disordered, porous and fractal systems", *J Appl Crystallogr*, **1991**, *24*, 414, doi: 10.1107/S0021889891003400,
426. Billinge, S.J.L., Kanatzidis, M.G., "Beyond crystallography : the study of disorder, nanocrystallinity and crystallographically challenged materials with pair distribution functions", *Chem. Commun.*, **2004**, *0*, 749, doi: 10.1039/B309577K,

427. Terban, M.W., Billinge, S.J.L., "Structural Analysis of Molecular Materials Using the Pair Distribution Function", *Chem. Rev.*, **2022**, *122*, 1208, doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00237,
428. Petkov, V., "Nanostructure by high-energy X-ray diffraction", *Materials Today*, **2008**, *11*, 28, doi: 10.1016/S1369-7021(08)70236-0,
429. Rey, C. et al., "Characterization of Calcium Phosphates Using Vibrational Spectroscopies", In "Advances in Calcium Phosphate Biomaterials", Editor Ben-Nissan, B., Springer Berlin Heidelberg, **2014**, Vol. 2, 229, doi: 10.1007/978-3-642-53980-0_8,
430. Xu, B. et al., "Vibrational properties of isotopically enriched materials: the case of calcite", *RSC Advances*, **2018**, *8*, 33985, doi: 10.1039/C8RA06608F,
431. Massiot, D. et al., "Modelling one- and two-dimensional solid-state NMR spectra", *Magn. Res. Chem.*, **2002**, *40*, 70, doi: 10.1002/mrc.984,
432. Hoppe, A. et al., "A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics", *Biomaterials*, **2011**, *32*, 2757, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.004,
433. Bala, Y. et al., "Bone mineralization: from tissue to crystal in normal and pathological contexts", *Osteoporos Int*, **2013**, *24*, 2153, doi: 10.1007/s00198-012-2228-y,
434. Hassen, A. et al., "Resistance of environmental bacteria to heavy metals", *Bioresource Technology*, **1998**, *64*, 7, doi: 10.1016/S0960-8524(97)00161-2,
435. Cerovic, A. et al., "Effects of zinc on the mineralization of bone nodules from human osteoblast-like cells", *Biol Trace Elem Res*, **2007**, *116*, 61, doi: 10.1007/BF02685919,
436. Sinusaite, L. et al., "Thermally Induced Crystallization and Phase Evolution of Amorphous Calcium Phosphate Substituted with Divalent Cations Having Different Sizes", *Cryst. Growth Des.*, **2021**, *21*, 1242, doi: 10.1021/acs.cgd.0c01534,
437. Schosseler, P.M. et al., "Uptake of Cu2+ by the calcium carbonates vaterite and calcite as studied by continuous wave (cw) and pulse electron paramagnetic resonance", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1999**, *63*, 1955, doi: 10.1016/S0016-7037(99)00086-1,
438. Marie, P.J., "Strontium ranelate: A physiological approach for optimizing bone formation and resorption", *Bone*, **2006**, *38*, 10, doi: 10.1016/j.bone.2005.07.029,
439. Marie, P.J. et al., "Mechanisms of Action and Therapeutic Potential of Strontium in Bone", *Calcif Tissue Int*, **2001**, *69*, 121, doi: 10.1007/s002230010055,
440. Young, S.M. et al., "Human placenta processed for encapsulation contains modest concentrations of 14 trace minerals and elements", *Nutrition Research*, **2016**, *36*, 872, doi: 10.1016/j.nutres.2016.04.005,
441. Otten, J.J. et al. (eds.)., "Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements", National Academies Press, **2006**,
442. Habibovic, P., Barralet, J.E., "Bioinorganics and biomaterials: Bone repair", *Acta Biomaterialia*, **2011**, *7*, 3013, doi: 10.1016/j.actbio.2011.03.027,
443. Livitska, O. et al., "Copper(II), zinc(II) and copper(II)/zinc(II)-containing carbonate-substituted hydroxyapatite: synthesis, characterization and thermal behaviour", *Mat.-wiss. u. Werkstofftech*, **2016**, *47*, 85, doi: 10.1002/mawe.201600460,
444. Yang, F. et al., "Osteoblast response to porous titanium surfaces coated with zinc-substituted hydroxyapatite", *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, **2012**, *113*, 313, doi: 10.1016/j.tripleo.2011.02.049,
445. Renaudin, G. et al., "Structural characterization of sol–gel derived Sr-substituted calcium phosphates with anti-osteoporotic and anti-inflammatory properties", *J. Mater. Chem.*, **2008**, *18*, 3593, doi: 10.1039/b804140g,
446. Marques, C.F. et al., "Biocompatibility and antimicrobial activity of biphasic calcium phosphate powders doped with metal ions for regenerative medicine", *Ceramics International*, **2017**, *43*, 15719, doi: 10.1016/j.ceramint.2017.08.133,
447. Gomes, S. et al., "Cu-doping of calcium phosphate bioceramics: From mechanism to the control of cytotoxicity", *Acta Biomaterialia*, **2018**, *65*, 462, doi: 10.1016/j.actbio.2017.10.028,

448. Gomes, S. et al., "X-ray absorption spectroscopy shining (synchrotron) light onto the insertion of Zn 2+ in calcium phosphate ceramics and its influence on their behaviour under biological conditions", *J. Mater. Chem. B*, **2014**, *2*, 536, doi: 10.1039/C3TB21397H,
449. Renaudin, G. et al., "First-Row Transition Metal Doping in Calcium Phosphate Bioceramics: A Detailed Crystallographic Study", *Materials*, **2017**, *10*, 92, doi: 10.3390/ma10010092,
450. Sayahi, M. et al., "Brushite (Ca,M)HPO4, 2H2O doping with bioactive ions (M = Mg2+, Sr2+, Zn2+, Cu2+, and Ag+): a new path to functional biomaterials?", *Materials Today Chemistry*, **2020**, *16*, 100230, doi: 10.1016/j.mtchem.2019.100230,
451. Adawy, A., Diaz, R., "Probing the Structure, Cytocompatibility, and Antimicrobial Efficacy of Silver-, Strontium-, and Zinc-Doped Monetite", *ACS Appl. Bio Mater.*, **2022**, *5*, 1648, doi: 10.1021/acsabm.2c00047,
452. Jin, W. et al., "Synergic Effect of Sr2+ and Mg2+ on the Stabilization of Amorphous Calcium Phosphate", *Cryst. Growth Des.*, **2018**, *18*, 6054, doi: 10.1021/acs.cgd.8b00908,
453. Ivanets, A. et al., "Effect of Mg2+-, Sr2+-, and Fe3+-substitution on 85Sr and 60Co adsorption on amorphous calcium phosphates: Adsorption performance, selectivity, and mechanism", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **2022**, *10*, 107425, doi: 10.1016/j.jece.2022.107425,
454. Degli Esposti, L. et al., "Antimicrobial Activity of Remineralizing Ion-Doped Amorphous Calcium Phosphates for Preventive Dentistry", *Frontiers in Materials*, **2022**, *9*, doi: 10.3389/fmats.2022.846130,
455. Uchino, T., Keitaro, T., "Synthesis of Zinc-Containing Amorphous Calcium Phosphate", *KEM*, **2012**, *529–530*, 119, doi: https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.529-530.119,
456. LeGeros, R.Z. et al., "Zinc effect on the in vitro formation of calcium phosphates: relevance to clinical inhibition of calculus formation", *Am J Dent*, **1999**, *12*, 65,
457. Matsunaga, K. et al., "First-principles calculations of divalent substitution of Ca2+ in tricalcium phosphates", *Acta Biomaterialia*, **2015**, *23*, 329, doi: 10.1016/j.actbio.2015.05.014,
458. Griesiute, D. et al., "The influence of Fe3+ doping on thermally induced crystallization and phase evolution of amorphous calcium phosphate", *CrystEngComm*, **2021**, *23*, 4627, doi: 10.1039/D1CE00371B,
459. Littlewood, J.L. et al., "Mechanism of Enhanced Strontium Uptake into Calcite via an Amorphous Calcium Carbonate Crystallization Pathway", *Cryst. Growth Des.*, **2017**, *17*, 1214, doi: 10.1021/acs.cgd.6b01599,
460. Shuseki, Y. et al., "Structural analyses of amorphous calcium carbonate before and after removing strontium ions from an aqueous solution", *Journal of the Ceramic Society of Japan*, **2022**, *130*, 225, doi: 10.2109/jcersj2.21155,
461. Parsiegla, K.I., L. Katz, J., "Calcite growth inhibition by copper(II): II. Effect of solution composition", *Journal of Crystal Growth*, **2000**, *213*, 368, doi: 10.1016/S0022-0248(00)00306-7,
462. Zeppenfeld, K., "Prevention of CaCO3 scale formation by trace amounts of copper (II) in comparison to zinc (II)", *Desalination*, **2010**, *252*, 60, doi: 10.1016/j.desal.2009.10.025,
463. Usmany, Y. et al., "Crystallization of calcium carbonate (CaCO3) in a flowing system: Influence of Cu2+ additives on induction time and crystalline phase transformation", *AIP Conference Proceedings*, **2016**, 020093, doi: 10.1063/1.4945547,
464. Ghizellaoui, S. et al., "Inhibition of scaling in the presence of copper and zinc by various chemical processes", *Desalination*, **2007**, *206*, 185, doi: 10.1016/j.desal.2006.02.066,
465. Hsu, A.C.T., "Nucleation and crystal proliferation kinetics: Amorphous-crystalline transformation of basic copper carbonates", *AIChE J.*, **1971**, *17*, 1311, doi: 10.1002/aic.690170609,
466. Candal, R.J. et al., "Precipitation of Copper(I) Hydrous Oxides and Copper(II) Basic Salts", *J. Mater. Chem.*, **1992**, *2*, 657, doi: 10.1039/JM9920200657,
467. Dörner, L. et al., "Cost-effective sol-gel synthesis of porous CuO nanoparticle aggregates with tunable specific surface area", *Sci Rep*, **2019**, *9*, 11758, doi: 10.1038/s41598-019-48020-8,
468. Sheeran, D., "Copper Content in Synthetic Copper Carbonate: A Statistical Comparison of Experimental and Expected Results", *J. Chem. Educ.*, **1998**, *75*, 453, doi: 10.1021/ed075p453,

469. Pollard, A.M. et al., "The synthesis and composition of georgeite and its reactions to form other secondary copper(II) carbonates", *Mineral. mag.*, **1991**, *55*, 163, doi: 10.1180/minmag.1991.055.379.03,
470. Elzinga, E.J., Reeder, R.J., "X-ray absorption spectroscopy study of Cu2+ and Zn2+ adsorption complexes at the calcite surface: Implications for site-specific metal incorporation preferences during calcite crystal growth", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **2002**, *66*, 3943, doi: 10.1016/S0016-7037(02)00971-7,
471. Kerisit, S.N., Prange, M.P., "Ab Initio Molecular Dynamics Simulation of Divalent Metal Cation Incorporation in Calcite: Implications for Interpreting X-ray Absorption Spectroscopy Data", *ACS Earth Space Chem.*, **2019**, *3*, 2582, doi: 10.1021/acsearthspacechem.9b00247,
472. Schmidt, I. et al., "Effect of Strontium Ions on Crystallization of Amorphous Calcium Carbonate", *Crystal Research and Technology*, **2019**, *54*, 1900002, doi: 10.1002/crat.201900002,
473. Saito, A. et al., "Incorporation of Incompatible Strontium and Barium Ions into Calcite (CaCO3) through Amorphous Calcium Carbonate", *Minerals*, **2020**, *10*, 270, doi: 10.3390/min10030270,
474. Nommeots-Nomm, A. et al., "A review of acellular immersion tests on bioactive glasses—influence of medium on ion release and apatite formation", *International Journal of Applied Glass Science*, **2020**, *11*, 537, doi: 10.1111/ijag.15006,
475. Som, A. et al., "Monodispersed calcium carbonate nanoparticles modulate local pH and inhibit tumor growth in vivo", *Nanoscale*, **2016**, *8*, 12639, doi: 10.1039/C5NR06162H,
476. Krieg, B.J. et al., "In Vivo Predictive Dissolution: Transport Analysis of the CO2, Bicarbonate In Vivo Buffer System", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2014**, *103*, 3473, doi: 10.1002/jps.24108,
477. Silver, I.A. et al., "Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts", *Experimental Cell Research*, **1988**, *175*, 266, doi: 10.1016/0014-4827(88)90191-7,
478. Opitz, P. et al., "Insights into the In Vitro Formation of Apatite from Mg-Stabilized Amorphous Calcium Carbonate", *Adv. Funct. Mater.*, **2021**, *31*, 2007830, doi: https://doi.org/10.1002/adfm.202007830,
479. Konrad, F. et al., "Influence of aqueous Mg concentration on the transformation of amorphous calcium carbonate", *Journal of Crystal Growth*, **2018**, *498*, 381, doi: 10.1016/j.jcrysgro.2018.07.018,
480. Kokubo, T., "Bioactive glass ceramics: properties and applications", *Biomaterials*, **1991**, *12*, 155, doi: 10.1016/0142-9612(91)90194-F,
481. Kokubo, T., Takadama, H., "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", *Biomaterials*, **2006**, *27*, 2907, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017,
482. Bohner, M., Lemaitre, J., "Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?", *Biomaterials*, **2009**, *30*, 2175, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.008,
483. Pan, H. et al., "Apatite-formation ability – Predictor of "bioactivity"?", *Acta Biomaterialia*, **2010**, *6*, 4181, doi: 10.1016/j.actbio.2010.05.013,
484. Juhasz, J.A. et al., "Biological control of apatite growth in simulated body fluid and human blood serum", *J Mater Sci: Mater Med*, **2008**, *19*, 1823, doi: 10.1007/s10856-007-3344-7,
485. Fujita, Y. et al., "The bonding behavior of calcite to bone", *J Biomed Mater Res*, **1991**, *25*, 991, doi: 10.1002/jbm.820250806,
486. Baino, F., Yamaguchi, S., "The Use of Simulated Body Fluid (SBF) for Assessing Materials Bioactivity in the Context of Tissue Engineering: Review and Challenges", *Biomimetics*, **2020**, *5*, 57, doi: 10.3390/biomimetics5040057,
487. Towler, M.R. et al., "Comparison of *in vitro* and *in vivo* Bioactivity of SrO—CaO—ZnO—SiO_2 Glass Grafts", *J Biomater Appl*, **2009**, *23*, 561, doi: 10.1177/0885328208094306,
488. Kotani, S. et al., "Bone bonding mechanism of β-tricalcium phosphate", *J Biomed Mater Res*, **1991**, *25*, 1303, doi: 10.1002/jbm.820251010,
489. Walsh, W.R. et al., "Response of a Calcium Sulfate Bone Graft Substitute in a Confined Cancellous Defect.", *Clin Orthop Relat Res*, **2003**, *406*, 228,

490. Theiss, F. et al., "Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement", *Biomaterials*, **2005**, *26*, 4383, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.11.056,
491. Zadpoor, A.A., "Relationship between in vitro apatite-forming ability measured using simulated body fluid and in vivo bioactivity of biomaterials", *Materials Science and Engineering: C*, **2014**, *35*, 134, doi: 10.1016/j.msec.2013.10.026,
492. Lee, J.H. et al., "Synthetic Aragonite (CaCO3) as a Potential Additive in Calcium Phosphate Cements: Evaluation in Tris-Free SBF at 37°C", *J Am Ceram Soc*, **2014**, *97*, 3052, doi: https://doi.org/10.1111/jace.13124,
493. Rohanová, D. et al., "Is non-buffered DMEM solution a suitable medium for in vitro bioactivity tests?", *J. Mater. Chem. B*, **2014**, *2*, 5068, doi: 10.1039/C4TB00187G,
494. Rámila, A., Vallet-Regí, M., "Static and dynamic in vitro study of a sol–gel glass bioactivity", *Biomaterials*, **2001**, *22*, 2301, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00419-1,
495. 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*, **2015**, *26*, 115, doi: 10.1007/s10856-015-5403-9,
496. Jacobs, A. et al., "Biological properties of copper-doped biomaterials for orthopedic applications: A review of antibacterial, angiogenic and osteogenic aspects", *Acta Biomaterialia*, **2020**, *117*, 21, doi: 10.1016/j.actbio.2020.09.044,
497. Haynes, W.M. (ed.)., "CRC Handbook of Chemistry and Physics", 95th ed., CRC Press, **2014**, doi: 10.1201/b17118,
498. Yoder, C., "The Elements: Symbols, Atomic Numbers(Z), Atomic Weights, and Pauling Electronegativities(c)". Accessed August 2022 [online], Available at https://www.wiredchemist.com/chemistry/data/elements,
499. Gras, P. et al., "Crystallisation of a highly metastable hydrated calcium pyrophosphate phase", *CrystEngComm*, **2013**, *15*, 2294, doi: 10.1039/C2CE26499D,
500. Whittaker, M.L. et al., "Structural Basis for Metastability in Amorphous Calcium Barium Carbonate (ACBC)", *Adv. Funct. Mater.*, **2018**, *28*, 1704202, doi: 10.1002/adfm.201704202,
501. Marcus, Y., "ViscosityB-coefficients, structural entropies and heat capacities, and the effects of ions on the structure of water", *J Solution Chem*, **1994**, *23*, 831, doi: 10.1007/BF00972677,
502. Ciliberto, E. et al., "Nanoparticles of Sr(OH)2: synthesis in homogeneous phase at low temperature and application for cultural heritage artefacts", *Appl. Phys. A*, **2008**, *92*, 137, doi: 10.1007/s00339-008-4464-8,
503. Yoder, C., "Solubility Product Constants, Ksp". Accessed August 2022 [online], Available at http://www.wiredchemist.com/chemistry/data/solubility-product-constants,
504. "Ksp Table". Accessed August 2022 [online], Available at https://owl.oit.umass.edu/departments/Chemistry/appendix/ksp.html,
505. Krishnan, G., "Table of Solubility Product Constant Values". Accessed August 2022 [online], Available at https://users.stlcc.edu/gkrishnan/ksptable.html,
506. Chen, Y.H. et al., "Study on thermal properties of nanocrystalline strontianite", *Journal of Non-Crystalline Solids*, **2010**, *356*, 1530, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2010.04.026,
507. Cudennec, Y., Lecerf, A., "The transformation of Cu(OH)2 into CuO, revisited", *Solid State Sciences*, **2003**, *5*, 1471, doi: 10.1016/j.solidstatesciences.2003.09.009,
508. Li, C. et al., "Preparation and characterization of Cu(OH)2 and CuO nanowires by the coupling route of microemulsion with homogenous precipitation", *Solid State Communications*, **2010**, *150*, 585, doi: 10.1016/j.ssc.2009.12.039,
509. Tanaka, H., Yamane, M., "Preparation and thermal analysis of synthetic malachite CuCO3·Cu(OH)2", *Journal of Thermal Analysis*, **1992**, *38*, 627, doi: 10.1007/BF01979390,
510. Srivastava, O.K., Secco, E.A., "Studies on metal hydroxy compounds. I. Thermal analyses of zinc derivatives ϵ-$Zn(OH)_2$, $Zn_5(OH)_8Cl_2.H_2O$, β-ZnOHCl, and ZnOHF", *Can. J. Chem.*, **1967**, *45*, 579, doi: 10.1139/v67-096,
511. Top, A., Çetinkaya, H., "Zinc oxide and zinc hydroxide formation via aqueous precipitation: Effect of the preparation route and lysozyme addition", *Materials Chemistry and Physics*, **2015**, *167*, 77, doi: 10.1016/j.matchemphys.2015.10.013,

512. Kanari, N. et al., "Thermal decomposition of zinc carbonate hydroxide", *Thermochimica Acta*, **2004**, *410*, 93, doi: 10.1016/S0040-6031(03)00396-4,
513. Hales, M.C., Frost, R.L., "Thermal analysis of smithsonite and hydrozincite", *J Therm Anal Calorim*, **2008**, *91*, 855, doi: 10.1007/s10973-007-8571-0,
514. Ren, L. et al., "High-Performance UV Photodetection of Unique ZnO Nanowires from Zinc Carbonate Hydroxide Nanobelts", *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2013**, *5*, 5861, doi: 10.1021/am401533w,
515. Gotor, F.J. et al., "Simultaneous use of isothermal, nonisothermal, and constant rate thermal analysis (CRTA) for discerning the kinetics of the thermal dissociation of smithsonite", *Int. J. Chem. Kinet.*, **1998**, *30*, 647, doi: 10.1002/(SICI)1097-4601(1998)30:9<647::AID-KIN6>3.0.CO;2-S,
516. Noethig-Laslo, V., Brečević, L., "Mode and sites of incorporation of divalent cations in vaterite", *Faraday Trans.*, **1998**, *94*, 2005, doi: 10.1039/a801604f,
517. Musinu, A. et al., "Coordination of zinc and copper in phosphate glasses by EXAFS", *Journal of Non-Crystalline Solids*, **1991**, *136*, 198, doi: 10.1016/0022-3093(91)90490-W,
518. Pierre, C., "Elaboration, caractérisation et étude des propriétés de revêtements bioactifs à la surface d'implants dentaires", Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse), **2018**,
519. Purgstaller, B. et al., "Control of Mg2+/Ca2+ Activity Ratio on the Formation of Crystalline Carbonate Minerals via an Amorphous Precursor", *Cryst. Growth Des.*, **2017**, *17*, 1069, doi: 10.1021/acs.cgd.6b01416,
520. Coleyshaw, E.E. et al., "Vibrational spectra of the hydrated carbonate minerals ikaite, monohydrocalcite, lansfordite and nesquehonite", *Spectrochimica Acta Part A*, **2003**, *59*, 2231, doi: 10.1016/S1386-1425(03)00067-2,
521. Blue, C.R. et al., "Chemical and physical controls on the transformation of amorphous calcium carbonate into crystalline CaCO3 polymorphs", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **2017**, *196*, 179, doi: 10.1016/j.gca.2016.09.004,
522. Ping Bao, S. et al., "Effects of solvent and additive on controllable mineralization of MCO 3 (M = Ca, Ba, Sr) crystals and their applications as red phosphors doped with Eu 3+ ions", *CrystEngComm*, **2011**, *13*, 2511, doi: 10.1039/C0CE00794C,
523. Chhim, N., "Effets d'additifs polymériques sur les cinétiques de précipitation de carbonate de calcium en présence de matières en suspension et de matériaux de corps d'échange thermique : applications aux circuits de refroidissement industriels", Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse), **2019**,
524. Mitra, R.P. et al., "Dissociation equilibria in pyrophosphates and kinetics of degradation. Part 1.—Dissociation constants of pyrophosphoric acid", *Trans. Faraday Soc.*, **1966**, *62*, 167, doi: 10.1039/TF9666200167,
525. Hodkin, D.J. et al., "Enhanced Crystallographic Incorporation of Strontium(II) Ions into Calcite via Preferential Adsorption at Obtuse Growth Steps", *Cryst. Growth Des.*, **2018**, *18*, 2836, doi: 10.1021/acs.cgd.7b01614,
526. Verberckmoes, S.C. et al., "Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization", *Kidney International*, **2003**, *64*, 534, doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00123.x,
527. Nassrallah-Aboukaïs, N. et al., "Stabilization of the Vaterite Structure in the Presence Of Copper(II): Thermodynamic and Spectroscopic Studies", *Chem. Mater.*, **1999**, *11*, 44, doi: 10.1021/cm9803399,
528. Liu, R., Lian, B., "Non-competitive and competitive adsorption of Cd2+, Ni2+, and Cu2+ by biogenic vaterite", *Science of The Total Environment*, **2019**, *659*, 122, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.199,
529. Wang, X. et al., "Biocomposites of copper-containing mesoporous bioactive glass and nanofibrillated cellulose: Biocompatibility and angiogenic promotion in chronic wound healing application", *Acta Biomaterialia*, **2016**, *46*, 286, doi: 10.1016/j.actbio.2016.09.021,

530. Wu, C. et al., "Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity", *Biomaterials*, **2013**, *34*, 422, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.066,
531. Kong, N. et al., "Synergy effects of copper and silicon ions on stimulation of vascularization by copper-doped calcium silicate", *J. Mater. Chem. B*, **2014**, *2*, 1100, doi: 10.1039/C3TB21529F,
532. Burghardt, I. et al., "A dual function of copper in designing regenerative implants", *Biomaterials*, **2015**, *44*, 36, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.12.022,
533. Su, Y. et al., "Interfacial Zinc Phosphate is the Key to Controlling Biocompatibility of Metallic Zinc Implants", *Adv. Sci.*, **2019**, *6*, 1900112, doi: 10.1002/advs.201900112,
534. Yamamoto, A. et al., "Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells", *J. Biomed. Mater. Res.*, **1998**, *39*, 331, doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199802)39:2<331::AID-JBM22>3.0.CO;2-E,
535. Wataha, J.C. et al., "Effect of cell line on in vitro metal ion cytotoxicity", *Dental Materials*, **1994**, *10*, 156, doi: 10.1016/0109-5641(94)90025-6,
536. Angus, J.G. et al., "Reliability of experimental partition coefficients in carbonate systems: Evidence for inhomogeneous distribution of impurity cations", *Chemical Geology*, **1979**, *27*, 181, doi: 10.1016/0009-2541(79)90038-X,
537. Purgstaller, B. et al., "Control of temperature and aqueous Mg 2+ /Ca 2+ ratio on the (trans-)formation of ikaite", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **2017**, *217*, 128, doi: 10.1016/j.gca.2017.08.016,
538. Boon, M. et al., "Stabilisation of aragonite: the role of Mg2+ and other impurity ions", *ChemRxiv Preprint*, **2019**, 45, doi: doi.org/10.26434/chemrxiv.11364857.v1,
539. Zhang, J. et al., "Concentration-dependent osteogenic and angiogenic biological performances of calcium phosphate cement modified with copper ions", *Materials Science and Engineering: C*, **2019**, *99*, 1199, doi: 10.1016/j.msec.2019.02.042,
540. Maeno, S. et al., "The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture", *Biomaterials*, **2005**, *26*, 4847, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.01.006,
541. Ley-Ngardigal, K., "Effets d'additifs ioniques sur la précipitation de cristaux de pyrophosphate de calcium associés à l'Arthrose", Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse), **2016**,
542. Alkhraisat, M.H. et al., "Strontium modified biocements with zero order release kinetics", *Biomaterials*, **2008**, *29*, 4691, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.08.026,
543. Elrayah, A. et al., "Preparation of Micro/Nano-Structure Copper-Substituted Hydroxyapatite Scaffolds with Improved Angiogenesis Capacity for Bone Regeneration", *Materials*, **2018**, *11*, 1516, doi: 10.3390/ma11091516,
544. Xu, M. et al., "Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells", *J Pharmacol Toxicol Methods*, **2015**, *71*, 1, doi: 10.1016/j.vascn.2014.11.003,
545. Jablonská, E. et al., "Test conditions can significantly affect the results of in vitro cytotoxicity testing of degradable metallic biomaterials", *Sci Rep*, **2021**, *11*, 6628, doi: 10.1038/s41598-021-85019-6,
546. De Jong, W.H. et al., "Toxicity of copper oxide and basic copper carbonate nanoparticles after short-term oral exposure in rats", *Nanotoxicology*, **2019**, *13*, 50, doi: 10.1080/17435390.2018.1530390,
547. Delmas, P.D., "Biochemical markers of bone turnover", *J Bone Miner Res*, **1993**, *8*, S549, doi: 10.1002/jbmr.5650081323,
548. Schmidt-Gayk, H. et al., "Noninvasive parameters of bone metabolism", *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **1995**, *4*, 334, doi: 10.1097/00041552-199507000-00008,
549. Müller, W.E.G. et al., "Amplified morphogenetic and bone forming activity of amorphous versus crystalline calcium phosphate/polyphosphate", *Acta Biomaterialia*, **2020**, *118*, 233, doi: 10.1016/j.actbio.2020.10.023,

550. McQuillan, D.J. et al., "Matrix deposition by a calcifying human osteogenic sarcoma cell line (SAOS-2)", *Bone*, **1995**, *16*, 415, doi: 10.1016/8756-3282(95)90186-8,
551. Gundle, R., Beresford, J.N., "The Isolation and Culture of Cells from Explants of Human Trabecular Bone", *Calcif Tissue Int*, **1995**, *56*, S8, doi: 10.1007/BF03354640,
552. Prasad, A. et al., "State of Art on Solvent Casting Particulate Leaching Method for Orthopedic ScaffoldsFabrication", *Materials Today: Proceedings*, **2017**, *4*, 898, doi: 10.1016/j.matpr.2017.01.101,
553. Yuan, B. et al., "Rapid prototyping technology and its application in bone tissue engineering", *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, **2017**, *18*, 303, doi: 10.1631/jzus.B1600118,
554. Qin, Y., "Alginate fibres: an overview of the production processes and applications in wound management", *Polym. Int.*, **2008**, *57*, 171, doi: 10.1002/pi.2296,
555. Rao, A. et al., "pH-Dependent Schemes of Calcium Carbonate Formation in the Presence of Alginates", *Cryst. Growth Des.*, **2016**, *16*, 1349, doi: doi.org/10.1021/acs.cgd.5b01488,
556. Chalal, M., "Structure multi-échelle et propriétés physico-chimiques des gels de polymères thermosensibles", Thèse, Université de Grenoble, **2011**,
557. Sergeeva, A. et al., "Porous Alginate Scaffolds Assembled Using Vaterite CaCO3 Crystals", *Micromachines*, **2019**, *10*, 357, doi: 10.3390/mi10060357,
558. Hurtado, A. et al., "Alginate: Enhancement Strategies for Advanced Applications", *International Journal of Molecular Sciences*, **2022**, *23*, 4486, doi: 10.3390/ijms23094486,
559. Sikorski, P. et al., "Evidence for Egg-Box-Compatible Interactions in Calcium−Alginate Gels from Fiber X-ray Diffraction", *Biomacromolecules*, **2007**, *8*, 2098, doi: 10.1021/bm0701503,
560. Olderøy, M.Ø. et al., "Growth and Nucleation of Calcium Carbonate Vaterite Crystals in Presence of Alginate", *Cryst. Growth Des.*, **2009**, *9*, 5176, doi: 10.1021/cg9005604,
561. Hori, Y. et al., "Modular injectable matrices based on alginate solution/microsphere mixtures that gel in situ and co-deliver immunomodulatory factors", *Acta Biomaterialia*, **2009**, *5*, 969, doi: 10.1016/j.actbio.2008.11.019,
562. Drouet, C. et al., "Apatites biomimétiques - Des biominéraux aux analogues de synthèse pour le biomédical", **2018**, 30,
563. Wang, C. et al., "Alginate–calcium carbonate porous microparticle hybrid hydrogels with versatile drug loading capabilities and variable mechanical strengths", *Carbohydrate Polymers*, **2008**, *71*, 476, doi: 10.1016/j.carbpol.2007.06.018,
564. Son, K.D. et al., "Effect of alginate as polymer matrix on the characteristics of hydroxyapatite nanoparticles", *Materials Chemistry and Physics*, **2012**, *132*, 1041, doi: 10.1016/j.matchemphys.2011.12.062,
565. Pandi, K., Viswanathan, N., "Synthesis of alginate bioencapsulated nano-hydroxyapatite composite for selective fluoride sorption", *Carbohydrate Polymers*, **2014**, *112*, 662, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.06.029,
566. Xie, M. et al., "Alginate-controlled formation of nanoscale calcium carbonate and hydroxyapatite mineral phase within hydrogel networks", *Acta Biomaterialia*, **2010**, *6*, 3665, doi: 10.1016/j.actbio.2010.03.034,
567. Butler, M.F. et al., "Calcium Carbonate Crystallization in the Presence of Biopolymers", *Cryst. Growth Des.*, **2006**, *6*, 781, doi: 10.1021/cg050436w,
568. Leng, B. et al., "Growth of calcium carbonate mediated by slowly released alginate", *CrystEngComm*, **2010**, *12*, 730, doi: 10.1039/B909413J,
569. Liu, Y. et al., "The Flame Retardancy, Thermal Properties, and Degradation Mechanism of Zinc Alginate Films", *Journal of Macromolecular Science, Part B*, **2014**, *53*, 1074, doi: 10.1080/00222348.2014.891169,
570. Zhao, W. et al., "Morphology and Thermal Properties of Calcium Alginate/Reduced Graphene Oxide Composites", *Polymers*, **2018**, *10*, 990, doi: 10.3390/polym10090990,
571. Kumar, A. et al., "Effect of crosslinking functionality on microstructure, mechanical properties, and in vitro cytocompatibility of cellulose nanocrystals reinforced poly (vinyl alcohol)/sodium

alginate hybrid scaffolds", *International Journal of Biological Macromolecules*, **2017**, *95*, 962, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.085,
572. Kim, J.-W., Lee, H.-G., "Thermal and Carbothermic Decomposition of Na2CO3 and Li2CO3", *Metall Mater Trans B*, **2001**, *32B*, 17, doi: 10.1007/s11663-001-0003-0,
573. Siriwardane, R.V. et al., "Effect of Additives on Decomposition of Sodium Carbonate: Precombustion CO $_2$ Capture Sorbent Regeneration", *Energy Fuels*, **2011**, *25*, 1284, doi: 10.1021/ef101486m,
574. Pathak, T.S. et al., "Preparation of Alginic Acid and Metal Alginate from Algae and their Comparative Study", *J Polym Environ*, **2008**, *16*, 198, doi: 10.1007/s10924-008-0097-4,
575. Kosanović, C. et al., "Crystallization of Calcium Carbonate in Alginate and Xanthan Hydrogels", *Crystals*, **2017**, *7*, doi: doi.org/10.3390/cryst7120355,
576. Zheng, L. et al., "Evaluation of novel *in situ* synthesized nano-hydroxyapatite/collagen/alginate hydrogels for osteochondral tissue engineering", *Biomed. Mater.*, **2014**, *9*, 065004, doi: 10.1088/1748-6041/9/6/065004,
577. Turnbull, G. et al., "3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering", *Bioactive Materials*, **2018**, *3*, 278, doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.10.001,
578. Hutmacher, D.W., "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage", *Biomaterials*, **2000**, *21*, 2529, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00121-6,
579. Lu, J.X. et al., "Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo", *J Mater Sci: Mater Med*, **1999**, *10*, 111, doi: 10.1023/A:1008973120918,
580. Fu, Q. et al., "Proliferation and function of MC3T3-E1 cells on freeze-cast hydroxyapatite scaffolds with oriented pore architectures", *J Mater Sci: Mater Med*, **2009**, *20*, 1159, doi: 10.1007/s10856-008-3668-y,
581. Qiu, Z.-Y. et al., "Natural Bone Tissue and Its Biomimetic", In "Mineralized Collagen Bone Graft Substitutes", Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Woodhead Publishing, **2019**, 1,
582. Müller, B. et al., "High resolution tomographic imaging of microvessel", *Proc. of SPIE*, **2008**, *7078*, doi: 10.1117/12.794157,
583. Sivaraj, K.K., Adams, R.H., "Blood vessel formation and function in bone", *Development*, **2016**, *143*, 2706, doi: 10.1242/dev.136861,
584. Drouet, C. et al., "Impact of Calcium Phosphate Particle Morphology on Osteoconduction: an In Vivo Study", *KEM*, **2007**, *361–363*, 1237, doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.361-363.1237,
585. Abbasi, N. et al., "Porous scaffolds for bone regeneration", *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, **2020**, *5*, 1, doi: 10.1016/j.jsamd.2020.01.007,
586. Brun, N. et al., "Hybrid foams, colloids and beyond: From design to applications", *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 771, doi: 10.1039/B920518G,
587. White, R.J. et al., "Always Look on the "Light" Side of Life: Sustainable Carbon Aerogels", *ChemSusChem*, **2014**, *7*, 670, doi: 10.1002/cssc.201300961,
588. Shahbazi, M.-A. et al., "Directional Freeze-Casting: A Bioinspired Method to Assemble Multifunctional Aligned Porous Structures for Advanced Applications", *Adv. Eng. Mater.*, **2020**, 26, doi: 10.1002/adem.202000033,
589. Deville, S., "Freeze-Casting of Porous Biomaterials: Structure, Properties and Opportunities", *Materials*, **2010**, *3*, 1913, doi: 10.3390/ma3031913,
590. Scotti, K.L., Dunand, D.C., "Freeze casting – A review of processing, microstructure and properties via the open data repository, FreezeCasting.net", *Progress in Materials Science*, **2018**, *94*, 243, doi: 10.1016/j.pmatsci.2018.01.001,
591. Deville, S., "Freeze-Casting of Porous Ceramics: A Review of Current Achievements and Issues", *Advanced Engineering Materials*, **2008**, *10*, 155, doi: 10.1002/adem.200700270,
592. Deville, S., "Ice-templating, freeze casting: Beyond materials processing", *J. Mater. Res.*, **2013**, *28*, 2202, doi: 10.1557/jmr.2013.105,
593. Deville, S. et al., "Ice-templated porous alumina structures", *Acta Materialia*, **2007**, *55*, 1965, doi: 10.1016/j.actamat.2006.11.003,

594. Li, W.L. et al., "Freeze casting of porous materials: review of critical factors in microstructure evolution", *International Materials Reviews*, **2012**, *57*, 37, doi: 10.1179/1743280411Y.0000000011,
595. Yang, J. et al., "An elegant coupling: Freeze-casting and versatile polymer composites", *Progress in Polymer Science*, **2020**, *109*, 101289, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2020.101289,
596. Deville, S. et al., "In Situ X-Ray Radiography and Tomography Observations of the Solidification of Aqueous Alumina Particle Suspensions—Part I: Initial Instants", *J Am Ceram Soc*, **2009**, *92*, 2489, doi: 10.1111/j.1551-2916.2009.03163.x,
597. Hadji, L., "Morphological instability induced by the interaction of a particle with a solid-liquid interface", *Eur. Phys. J. B*, **2004**, *37*, 85, doi: 10.1140/epjb/e2004-00032-2,
598. Deville, S. et al., "In Situ X-Ray Radiography and Tomography Observations of the Solidification of Aqueous Alumina Particles Suspensions. Part II: Steady State", *J. Am. Ceram. Soc.*, **2009**, *92*, 2497, doi: 10.1111/j.1551-2916.2009.03264.x,
599. Porter, M.M. et al., "Biomimetic Materials by Freeze Casting", *JOM*, **2013**, *65*, 720, doi: 10.1007/s11837-013-0606-3,
600. Munch, E. et al., "Architectural Control of Freeze-Cast Ceramics Through Additives and Templating", *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *92*, 1534, doi: 10.1111/j.1551-2916.2009.03087.x,
601. Deville, S. et al., "Time-lapse, three-dimensional in situ imaging of ice crystal growth in a colloidal silica suspension", *Acta Materialia*, **2013**, *61*, 2077, doi: 10.1016/j.actamat.2012.12.027,
602. Artyushkova, K., Atanassov, P., "X-Ray Photoelectron Spectroscopy for Characterization of Bionanocomposite Functional Materials for Energy-Harvesting Technologies", *ChemPhysChem*, **2013**, *14*, 2071, doi: 10.1002/cphc.201300037,
603. Schollick, J.M.H. et al., "Segregated Ice Growth in a Suspension of Colloidal Particles", *J. Phys. Chem. B*, **2016**, *120*, 3941, doi: 10.1021/acs.jpcb.6b00742,
604. Peppin, S.S.L. et al., "Experimental Verification of Morphological Instability in Freezing Aqueous Colloidal Suspensions", *Phys. Rev. Lett.*, **2008**, *100*, 238301, doi: 10.1103/PhysRevLett.100.238301,
605. You, J. et al., "Dynamic particle packing in freezing colloidal suspensions", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2017**, *531*, 93, doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.07.073,
606. Deville, S., "Investigating the Freezing of Colloids: Experimental Techniques to Probe Solidification Patterns, Crystal Growth, and Particle Movement", In "Freezing Colloids: Observations, Principles, Control, and Use", Springer International Publishing, **2017**, 47, doi: 10.1007/978-3-319-50515-2_2,
607. Butler, M.F., "Growth of Solutal Ice Dendrites Studied by Optical Interferometry", *Cryst. Growth Des.*, **2002**, *2*, 59, doi: 10.1021/cg0155604,
608. Butler, M.F., "Freeze Concentration of Solutes at the Ice/Solution Interface Studied by Optical Interferometry", *Cryst. Growth Des.*, **2002**, *2*, 541, doi: 10.1021/cg025591e,
609. Marcellini, M. et al., "Time-Lapse, in Situ Imaging of Ice Crystal Growth Using Confocal Microscopy", *ACS Omega*, **2016**, *1*, 1019, doi: 10.1021/acsomega.6b00217,
610. Lagarrigue, P. et al., "Poly(d,l-lactide)-Grafted Bioactive Glass Nanoparticles: From Nanobricks to Freeze-Cast Scaffolds for Bone Substitution", *ACS Appl. Nano Mater.*, **2022**, doi: 10.1021/acsanm.2c00313,
611. Kumar, A. et al., "Microstructural and mechanical properties of porous biocomposite scaffolds based on polyvinyl alcohol, nano-hydroxyapatite and cellulose nanocrystals", *Cellulose*, **2014**, *21*, 3409, doi: 10.1007/s10570-014-0339-7,
612. Liu, X. et al., "Oriented bioactive glass (13-93) scaffolds with controllable pore size by unidirectional freezing of camphene-based suspensions: Microstructure and mechanical response", *Acta Biomaterialia*, **2011**, *7*, 406, doi: 10.1016/j.actbio.2010.08.025,
613. Yin, T.J. et al., "Characterization of porous fluorohydroxyapatite bone-scaffolds fabricated using freeze casting", *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **2021**, *123*, 104717, doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104717,

614. Schardosim, M. et al., "Freeze-casting for PLGA/carbonated apatite composite scaffolds: Structure and properties", *Materials Science and Engineering: C*, **2017**, *77*, 731, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.302,
615. Ferrer, M.L. et al., "Freezing of Binary Colloidal Systems for the Formation of Hierarchy Assemblies", *Chem. Mater.*, **2006**, *18*, 554, doi: 10.1021/cm052087z,
616. Donius, A.E. et al., "Cryogenic EBSD reveals structure of directionally solidified ice–polymer composite", *Materials Characterization*, **2014**, *93*, 184, doi: 10.1016/j.matchar.2014.04.003,
617. Tai, K. et al., "In Situ Cryogenic Transmission Electron Microscopy for Characterizing the Evolution of Solidifying Water Ice in Colloidal Systems", *Microscopy and Microanalysis*, **2014**, *20*, 330, doi: 10.1017/S1431927613014128,
618. Kobayashi, K. et al., "Atomically Resolved Images of I h Ice Single Crystals in the Solid Phase", *Phys. Rev. Lett.*, **2011**, *106*, 206101, doi: 10.1103/PhysRevLett.106.206101,
619. Hovis, D. b., Heuer, A. h., "The use of laser scanning confocal microscopy (LSCM) in materials science", *Journal of Microscopy*, **2010**, *240*, 173, doi: 10.1111/j.1365-2818.2010.03399.x,
620. Tyagi, S. et al., "Multiple objects interacting with a solidification front", *Sci Rep*, **2021**, *11*, 3513, doi: 10.1038/s41598-021-82713-3,
621. Dedovets, D., Deville, S., "Multiphase imaging of freezing particle suspensions by confocal microscopy", *Journal of the European Ceramic Society*, **2018**, *38*, 2687, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2018.01.045,
622. Kumaraswamy, G. et al., "Colloidal assembly by ice templating", *Faraday Discuss.*, **2016**, *186*, 61, doi: 10.1039/C5FD00125K,
623. Ma, L. et al., "Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering", *Biomaterials*, **2003**, *24*, 4833, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00374-0,
624. Fu, Q. et al., "Freeze casting of porous hydroxyapatite scaffolds. I. Processing and general microstructure", *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, **2008**, *86B*, 125, doi: 10.1002/jbm.b.30997,
625. Sampath Kumar, T.S., "Physical and Chemical Characterization of Biomaterials", In "Characterization of Biomaterials", Elsevier, **2013**, 11, doi: 10.1016/B978-0-12-415800-9.00002-4,
626. Zheng, Y. et al., "Composites with Macroporous Poly(vinyl alcohol) Cryogels with Attached Activated Carbon Microparticles with Controlled Accessibility of a Surface", *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2012**, *4*, 5936, doi: 10.1021/am301577c,
627. Thiery, C., "Tomographie à rayons X", *Techniques d'analyse*, **2013**, doi: 10.51257/a-v3-p950,
628. Deville, S. et al., "Metastable and unstable cellular solidification of colloidal suspensions", *Nature Mater*, **2009**, *8*, 966, doi: 10.1038/nmat2571,
629. Deville, S. et al., "Influence of Particle Size on Ice Nucleation and Growth During the Ice-Templating Process", *J. Am. Ceram. Soc.*, **2010**, *93*, 2507, doi: 10.1111/j.1551-2916.2010.03840.x,
630. Lichtner, A.Z. et al., "Dispersion, connectivity and tortuosity of hierarchical porosity composite SOFC cathodes prepared by freeze-casting", *Journal of the European Ceramic Society*, **2015**, *35*, 585, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2014.09.030,
631. Spannuth, M. et al., "Particle-scale structure in frozen colloidal suspensions from small-angle x-ray scattering", *Phys. Rev. E*, **2011**, *83*, 021402, doi: 10.1103/PhysRevE.83.021402,
632. Chau, M. et al., "Composite Hydrogels with Tunable Anisotropic Morphologies and Mechanical Properties", *Chem. Mater.*, **2016**, *28*, 3406, doi: 10.1021/acs.chemmater.6b00792,
633. Liang, X. et al., "Anisotropically Fatigue-Resistant Hydrogels", *Adv. Mater.*, **2021**, *33*, 2102011, doi: 10.1002/adma.202102011,
634. Do, G. et al., "Three-Dimensional Measurement of Ice Crystals in Frozen Materials by Near-Infrared Imaging Spectroscopy", *Drying Technology*, **2015**, *33*, 1614, doi: 10.1080/07373937.2015.1029073,
635. Blacher, S. et al., "Study of the connectivity properties of Bioglass®-filled polylactide foam scaffolds by image analysis and impedance spectroscopy", *Acta Biomaterialia*, **2005**, *1*, 565, doi: 10.1016/j.actbio.2005.06.003,

636. Hautcoeur, D. et al., "Alumina Porous Ceramics Obtained by Freeze Casting: Structure and Mechanical Behaviour under Compression", *Ceramics*, **2018**, *1*, 83, doi: 10.3390/ceramics1010008,
637. Shao, G. et al., "Freeze Casting: From Low-Dimensional Building Blocks to Aligned Porous Structures—A Review of Novel Materials, Methods, and Applications", *Adv. Mater.*, **2020**, *32*, 1907176, doi: 10.1002/adma.201907176,
638. Lagarrigue, P., "Nanocomposites bioverre/polyester pour le développement de scaffolds macroporeux par freeze-casting : vers le traitement de l'ostéoradionécrose mandibulaire", Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse), **2020**,
639. Qin, K. et al., "Recent advances in ice templating: from biomimetic composites to cell culture scaffolds and tissue engineering", *J. Mater. Chem. B*, **2021**, *9*, 889, doi: 10.1039/D0TB02506B,
640. Sergi, R. et al., "A Review of Bioactive Glass/Natural Polymer Composites: State of the Art", *Materials*, **2020**, *13*, 5560, doi: 10.3390/ma13235560,
641. Henning, L.M. et al., "Manufacturing and Characterization of Highly Porous Bioactive Glass Composite Scaffolds Using Unidirectional Freeze Casting", *Advanced Engineering Materials*, **2017**, *19*, 1700129, doi: 10.1002/adem.201700129,
642. Francis, N.L. et al., "An ice-templated, linearly aligned chitosan-alginate scaffold for neural tissue engineering", *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **2013**, *101*, 3493, doi: doi.org/10.1002/jbm.a.34668,
643. Seifert, A. et al., "Morphological Control of Freeze-Structured Scaffolds by Selective Temperature and Material Control in the Ice-Templating Process", *Advanced Engineering Materials*, **2022**, *24*, 2100860, doi: 10.1002/adem.202100860,
644. Chen, C.-Y. et al., "3D Porous Calcium-Alginate Scaffolds Cell Culture System Improved Human Osteoblast Cell Clusters for Cell Therapy", *Theranostics*, **2015**, *5*, 643, doi: 10.7150/thno.11372,
645. Christoph, S. et al., "Cellularized Cellular Solids via Freeze-Casting", *Macromolecular Bioscience*, **2016**, *16*, 182, doi: 10.1002/mabi.201500319,
646. Srinivasan, S. et al., "Biocompatible alginate/nano bioactive glass ceramic composite scaffolds for periodontal tissue regeneration", *Carbohydrate Polymers*, **2012**, *87*, 274, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.07.058,
647. Shapiro, L., Cohen, S., "Novel alginate sponges for cell culture and transplantation", *Biomaterials*, **1997**, *18*, 583, doi: 10.1016/S0142-9612(96)00181-0,
648. Panseri, S. et al., "Biomimetic Scaffold with Aligned Microporosity Designed for Dentin Regeneration", *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **2016**, *4*, doi: 10.3389/fbioe.2016.00048,
649. Zvukova, N.D. et al., "Cryostructuring of Polymeric Systems. 52. Properties, Microstructure and an Example of a Potential Biomedical Use of the Wide-Pore Alginate Cryostructurates", *Gels*, **2019**, *5*, 25, doi: 10.3390/gels5020025,
650. Zmora, S. et al., "Tailoring the pore architecture in 3-D alginate scaffolds by controlling the freezing regime during fabrication", *Biomaterials*, **2002**, *23*, 4087, doi: 10.1016/S0142-9612(02)00146-1,
651. Porrelli, D. et al., "Alginate–Hydroxyapatite Bone Scaffolds with Isotropic or Anisotropic Pore Structure: Material Properties and Biological Behavior", *Macromolecular Materials and Engineering*, **2015**, *300*, 989, doi: 10.1002/mame.201500055,
652. Turco, G. et al., "Alginate/Hydroxyapatite Biocomposite For Bone Ingrowth: A Trabecular Structure With High And Isotropic Connectivity", *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 1575, doi: 10.1021/bm900154b,
653. Xia, Z. et al., "A biomimetic collagen–apatite scaffold with a multi-level lamellar structure for bone tissue engineering", *J. Mater. Chem. B*, **2014**, *2*, 1998, doi: 10.1039/C3TB21595D,
654. Boccaccini, A.R., Maquet, V., "Bioresorbable and bioactive polymer/Bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications", *Composites Science and Technology*, **2003**, *63*, 2417, doi: 10.1016/S0266-3538(03)00275-6,
655. Blaker, J.J. et al., "In vitro evaluation of novel bioactive composites based on Bioglass®-filled polylactide foams for bone tissue engineering scaffolds", *J. Mater. Chem. A*, **2003**, *67A*, 1401, doi: 10.1002/jbm.a.20055,

656. Wegst, U.G.K. et al., "Bioinspired structural materials", *Nature Mater*, **2015**, *14*, 23, doi: 10.1038/nmat4089,
657. Libonati, F., Buehler, M.J., "Advanced Structural Materials by Bioinspiration", *Advanced Engineering Materials*, **2017**, *19*, 1600787, doi: 10.1002/adem.201600787,
658. Vasiliu, A.-L. et al., "In situ CaCO3 mineralization controlled by carbonate source within chitosan-based cryogels", *Materials Chemistry and Physics*, **2021**, *272*, 125025, doi: 10.1016/j.matchemphys.2021.125025,
659. Soares, J.P. et al., "Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt", *Eclet. Quím.*, **2004**, *29*, 57, doi: 10.1590/S0100-46702004000200009,
660. Zhang, C.-J. et al., "Bio-based calcium alginate nonwoven fabrics: Flame retardant and thermal degradation properties", *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **2016**, *122*, 13, doi: 10.1016/j.jaap.2016.10.030,
661. Ross, A.B. et al., "Influence of cation on the pyrolysis and oxidation of alginates", *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **2011**, *91*, 344, doi: 10.1016/j.jaap.2011.03.012,
662. Deville, S. et al., "Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering", *Biomaterials*, **2006**, *27*, 5480, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.06.028,
663. Mudalige, T. et al., "Characterization of Nanomaterials", In "Nanomaterials for Food Applications", Elsevier, **2019**, 313, doi: 10.1016/B978-0-12-814130-4.00011-7,
664. Egger, C.C. et al., "Characterization of Highly Porous Polymeric Materials with Pore Diameters Larger than 100 nm by Mercury Porosimetry and X-ray Scattering Methods", *Langmuir*, **2008**, *24*, 5877, doi: 10.1021/la800197p,
665. Giesche, H., "Mercury Porosimetry: A General (Practical) Overview", *Part. Part. Syst. Charact.*, **2006**, *23*, 9, doi: 10.1002/ppsc.200601009,
666. Saleh, K., Guigon, P., "Caractérisation et analyse des poudres - Propriétés physiques des solides divisés", *Formulation*, **2009**, doi: 10.51257/a-v1-j2251,
667. Pottathara, Y.B. et al., "Morphological, mechanical, and in-vitro bioactivity of gelatine/collagen/hydroxyapatite based scaffolds prepared by unidirectional freeze-casting", *Polymer Testing*, **2021**, *102*, 107308, doi: 10.1016/j.polymertesting.2021.107308,
668. Gibson, L.J., "Biomechanics of cellular solids", *Journal of Biomechanics*, **2005**, *38*, 377, doi: 10.1016/j.jbiomech.2004.09.027,
669. Maquet, V. et al., "Porous poly(α-hydroxyacid)/Bioglass® composite scaffolds for bone tissue engineering. I: preparation and in vitro characterisation", *Biomaterials*, **2004**, *25*, 4185, doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.082,
670. Rouquerol, F. et al., "Texture des matériaux pulvérulents ou poreux", *Techniques de l'ingénieur*, **2003**, *P2*, 1, doi: 10.51257/a-v3-p1050,
671. Graf, D.L., "Crystallographic tables for the rhombohedral carbonates", *American Mineralogist*, **1961**, *46*, 1283,

ANNEXES

I ANNEXE DU CHAPITRE 1

AI.1 DIFFRACTOGRAMMES RX DES PHASES DE CARBONATE DE CALCIUM

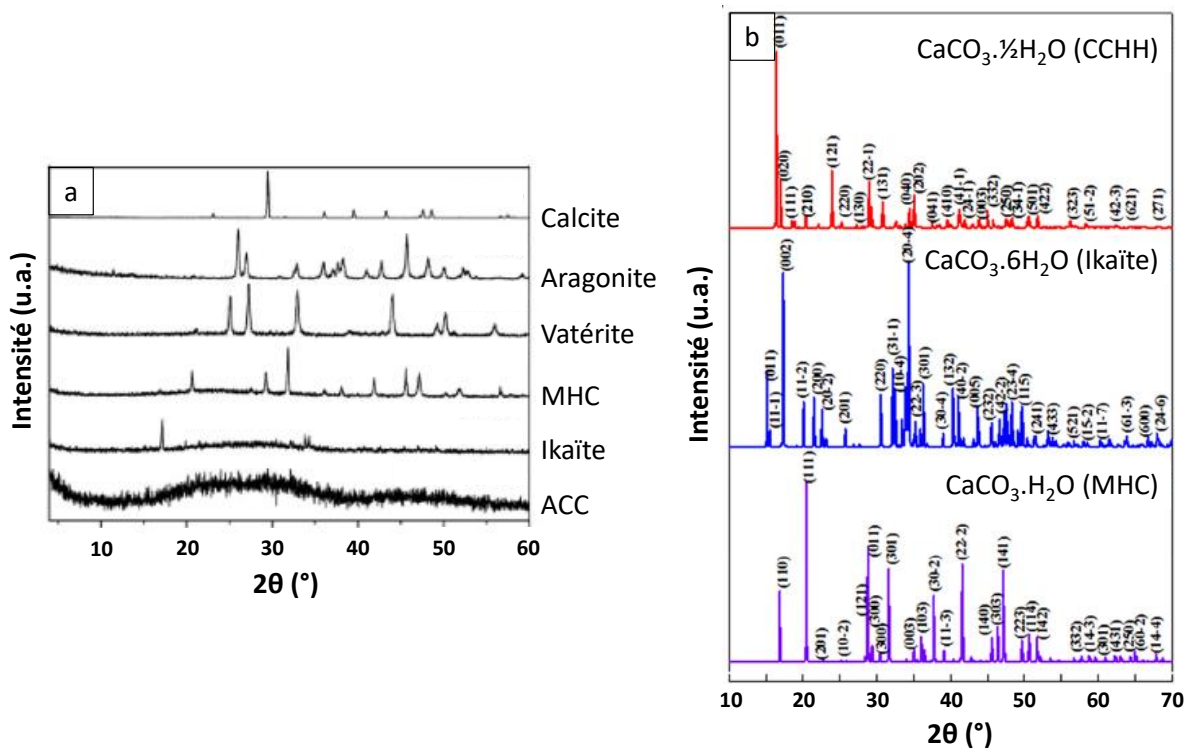


Figure AI.1 : Comparatif des diffractogrammes RX des phases de carbonate de calcium : calcite, aragonite, vatérite, calcite monohydratée (MHC), ikaïte et carbonate de calcium amorphe (ACC), adapté d'Al Omari et al. [105] (a) et diffractogramme RX du carbonate de calcium hémihydraté (CCHH) comparé à celui de la calcite monohydratée (MHC) et de l'ikaïte, adapté de Zhou et al. [91] (b).

AI.2 SPECTRES D'ABSORPTION INFRAROUGE ET RAMAN DES PHASES DE CARBONATE DE CALCIUM

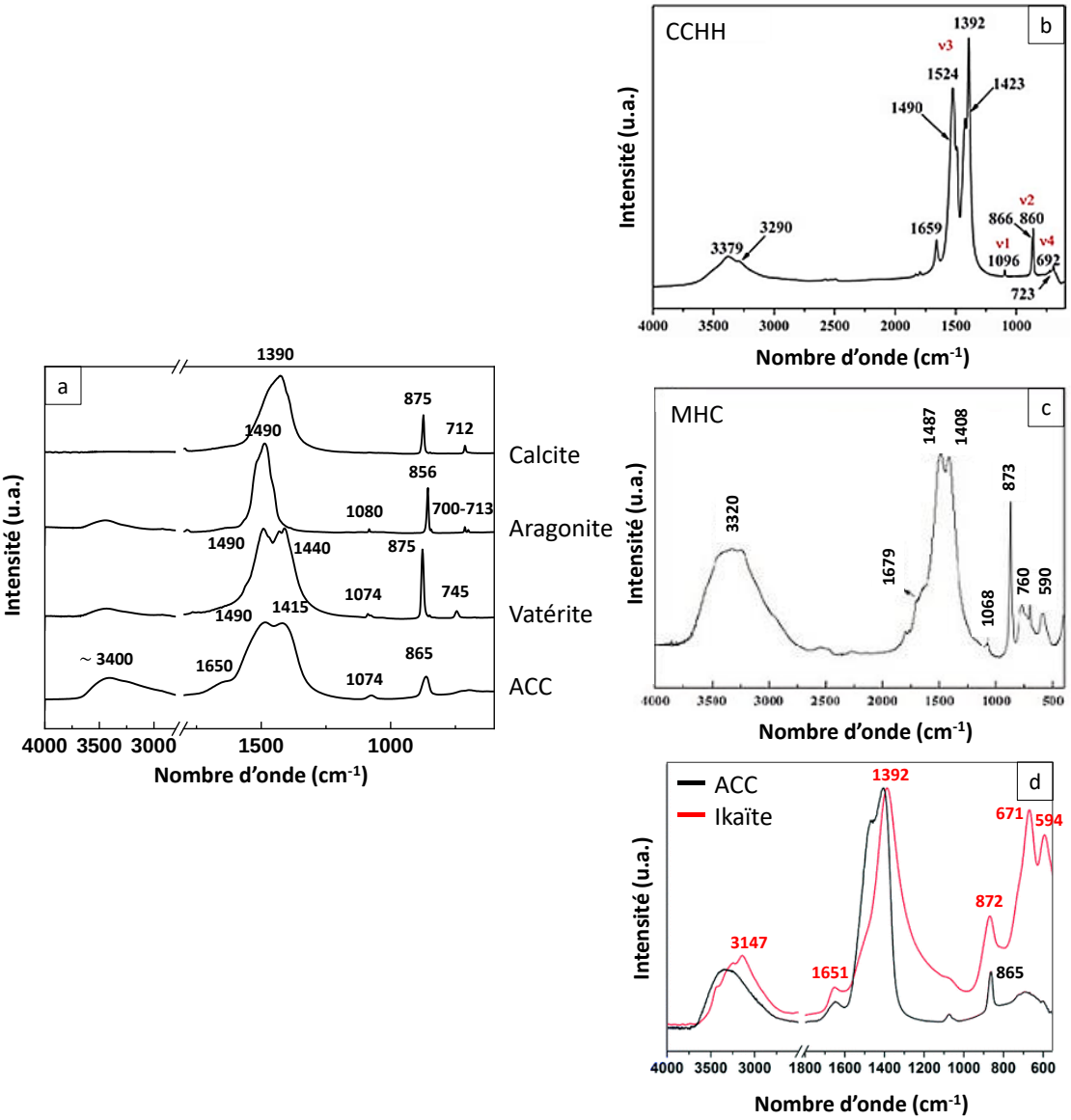


Figure AI.2 : Comparaison des spectres d'absorption infrarouge des phases de carbonate de calcium : calcite, aragonite, vatérite, ACC (a), carbonate de calcium hémihydraté (CCHH), d'après Zou et al. [90] (b), calcite monohydratée (MHC), d'après Wang et al. [152] (c) et ikaïte (en rouge, comparée à l'ACC en noir), d'après Zou et al. [159] (d).

Tableau AI.1 : Position et attribution des différentes bandes de vibration présentes dans les spectres d'absorption infrarouge des phases de carbonate de calcium : carbonate de calcium amorphe (ACC), vatérite, aragonite, calcite, carbonate de calcium hémihydraté (CCHH), calcite monohydratée (MHC), et ikaïte. Un tiret entre deux valeurs signifie qu'il y a plusieurs positions pour cette bande référencées dans la littérature, et un signe + entre deux valeurs implique la présence de deux pics (ou plus).

Bandes de vibration	**Nombre d'onde (cm^{-1})**						
	ACC 80,105,152	**Vatérite** 34,130	**Aragonite** 80,130	**Calcite** 105	**CCHH** 90	**MHC** 152	**Ikaïte** 159
ν_{OH} élongation symétrique et asymétrique O-H des H_2O	~ 3400	Faible	Faible		3379 + 3290	3320	3147
ν_{HOH} déformation H-O-H des H_2O	1650				1659	1679	1651
ν_3CO_3 élongation asymétrique C-O	1490-1474 + 1420-1415	1490 + 1440 (+ 1412)	1490	1390	1524 + 1490 + 1423 + 1392	1487 + 1408	1392
ν_1CO_3 élongation symétrique C-O	1074-1080	1074	1080		1096	1068	
ν_2CO_3 déformation CO_3 hors du plan	865	875	856	875	860-866	873	872
ν_4CO_3 déformation CO_3 dans le plan		745	713 + 700	712	723-692	760 + 590	671 + 594

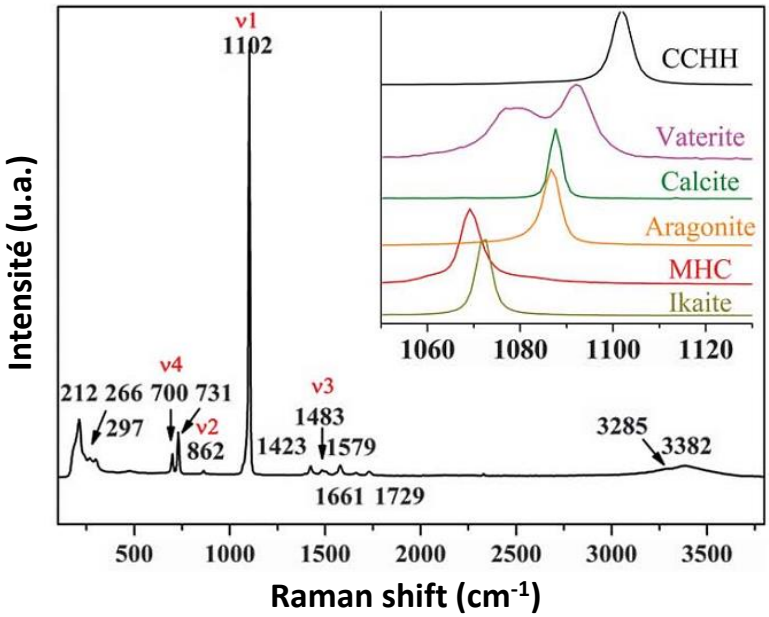


Figure AI.3 : Spectre Raman du carbonate de calcium hémihydraté (CCHH) dont la bande principale à 1102 cm^{-1} est comparée dans l'insert à celle des autres phases cristallines de carbonate de calcium (vatérite, calcite, aragonite, calcite monohydratée (MHC), et ikaïte). Adapté de Zou et al. [90].

II ANNEXE DU CHAPITRE 2

AII.1 PRECURSEUR DE PYROPHOSPHATE DE SODIUM

Le précurseur de pyrophosphate de sodium est synthétisé par condensation de l'hydrogénophosphate de sodium selon : $2\ {HPO_4}^{2-} \leftrightarrow\ {P_2O_7}^{4-} + H_2O$, pendant une nuit à 400 °C. Le diffractogramme RX du produit obtenu est présenté sur la Figure AII.1a, et fait apparaître uniquement les pics de diffraction caractéristiques de $Na_4P_2O_7$. Dans le spectre infrarouge (Figure AII.1b), les bandes présentes sont associées aux vibrations des groupements caractéristiques du pyrophosphate, identifiées sur la figure d'après les travaux de P. Gras [254].

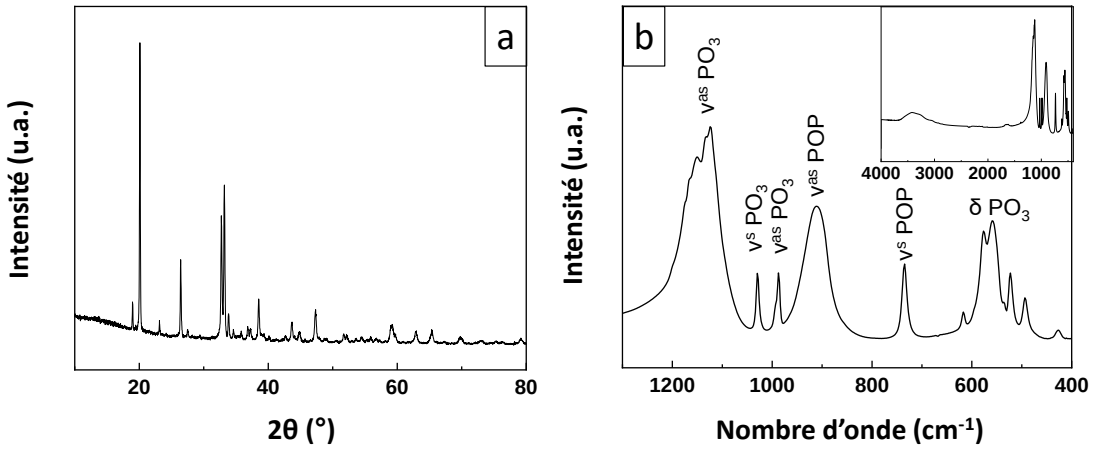


Figure AII.1 : Diffractogramme RX (a) et spectre infrarouge dans le domaine 400 – 1300 cm^{-1} (b) (avec en insert le spectre complet) du précurseur pyrophosphate de sodium synthétisé et mis en œuvre dans la synthèse des poudres de zPyACC.

AII.2 ISOTHERMES D'ADSORPTION-DESORPTION

Les isothermes issues des mesures d'adsorption et désorption d'azote sont tracées sur la Figure AII.2a. L'agrandissement présenté en AII.2b dans la zone des faibles pressions met en évidence l'absence de tangente verticale traduisant ainsi l'absence de microporosité dans tous les échantillons *z*PyACC [670], ce qui peut être corrélé avec un modèle dense intra-nanoparticule, incluant l'eau inter-cluster. Aux plus hautes pressions cependant, on peut noter sur la Figure AII.2c la présence d'une boucle d'hystérésis pour tous les échantillons hormis 0PyACC. Ceci atteste d'une mésoporosité des poudres [670]. La taille moyenne des pores (Figure AII.3) est centrée entre 50 et 100 nm, ce qui est cohérent avec une porosité inter-particulaire pour des particules de cet ordre de grandeur.

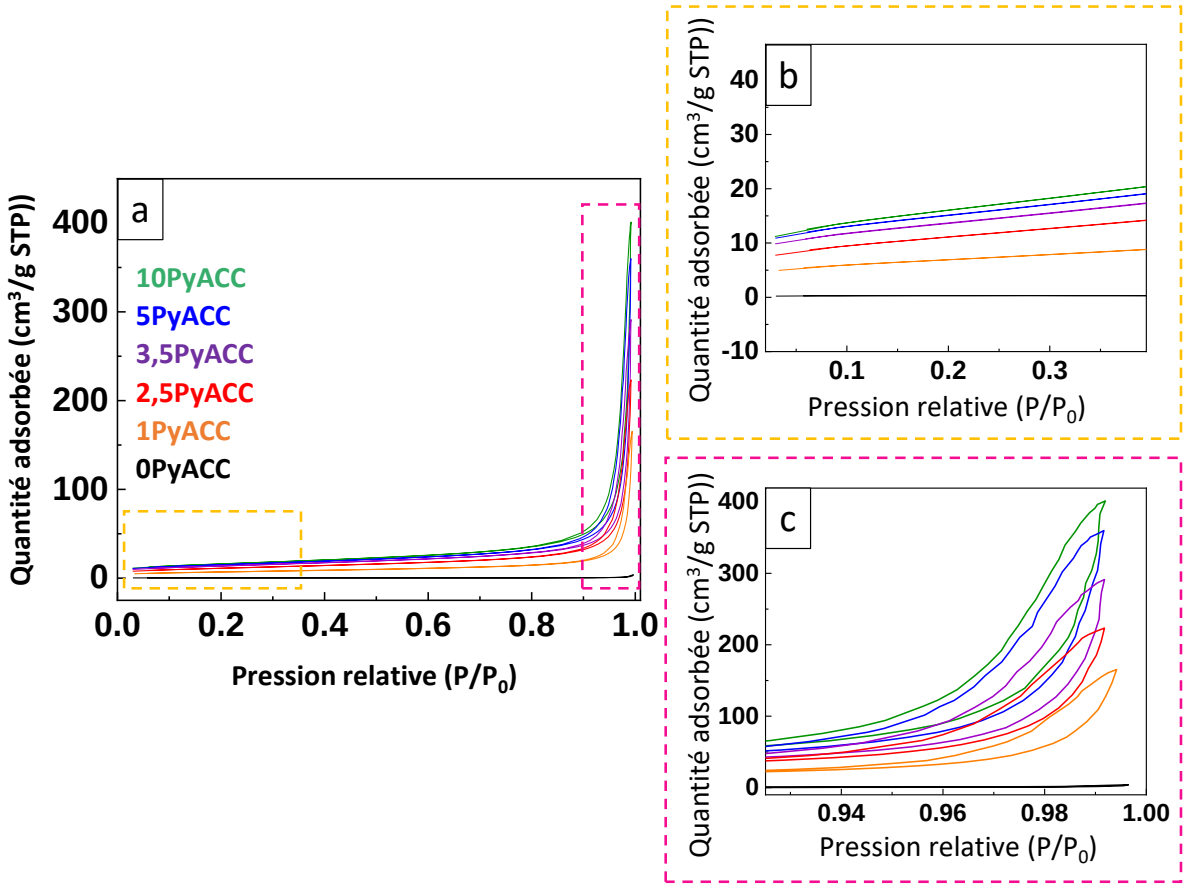


Figure AII.2 : Isothermes d'adsorption d'azote des zPyACC sur toute la gamme de pressions (a), centré sur les faibles pressions (b) ou sur les plus hautes pressions (c), ce dernier agrandissement mettant en évidence les boucles d'hystérésis.

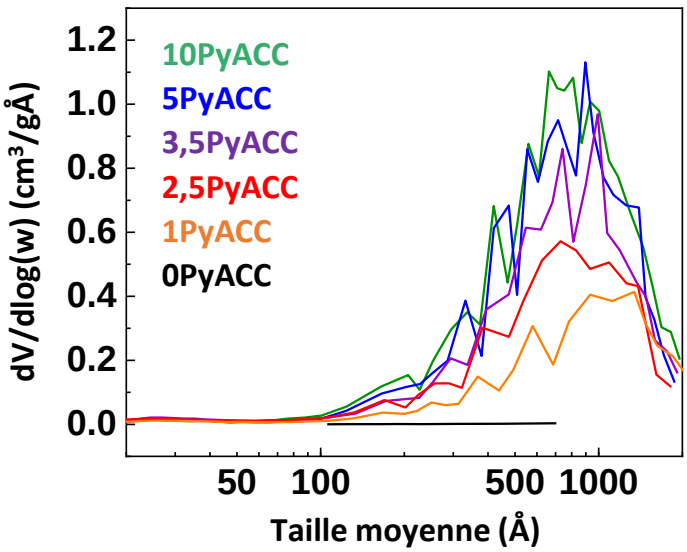


Figure AII.3 : Distribution de taille des pores en volume (volume cumulatif des pores divisé par le log de leur taille moyenne (w) en fonction de leur taille moyenne)

La constante C, extraite de l'équation BET (Equation AII.1), est liée à l'énergie d'adsorption de la première couche de gaz sur la surface de l'échantillon, elle dépend donc de l'affinité adsorbat-adsorbant et/ou de la microporosité [670]. Les valeurs de C présentées dans le Tableau AII.1 ne présentent pas de tendance claire et ne permettent pas de conclure sur des différences de porosité des *z*PyACC.

$$\frac{\frac{p}{p^0}}{n^a\left(1-\frac{p}{p^0}\right)} = \frac{1}{n_m^a C} + \left[\frac{C-1}{n_m^a C}\right]\left(\frac{p}{p^0}\right) \qquad \textit{(Equation AII.1)}$$

Avec $\boldsymbol{p^0}$ pression de vapeur saturante, $\boldsymbol{n_m^a}$ quantité de substance adsorbable nécessaire pour recouvrir la surface du solide d'une couche monomoléculaire et C telle que définie plus haut.

Tableau AII.1 : Constante C issue de l'équation BET et surface spécifique des échantillons zPyACC

*z*PyACC	C	$S_{spé}$ (m^2/g)
10PyACC	186,1	$56,6 \pm 0,3$
5PyACC	335,0	$52,7 \pm 0,3$
3,5PyACC	240,4	$47,9 \pm 0,2$
2,5PyACC	166,1	$39,3 \pm 0,2$
1PyACC	237,4	$24,3 \pm 0,1$
0PyACC	-56,0	$0,97 \pm 0,03$

AII.3 CRISTALLISATION SOUS LE FAISCEAU MET

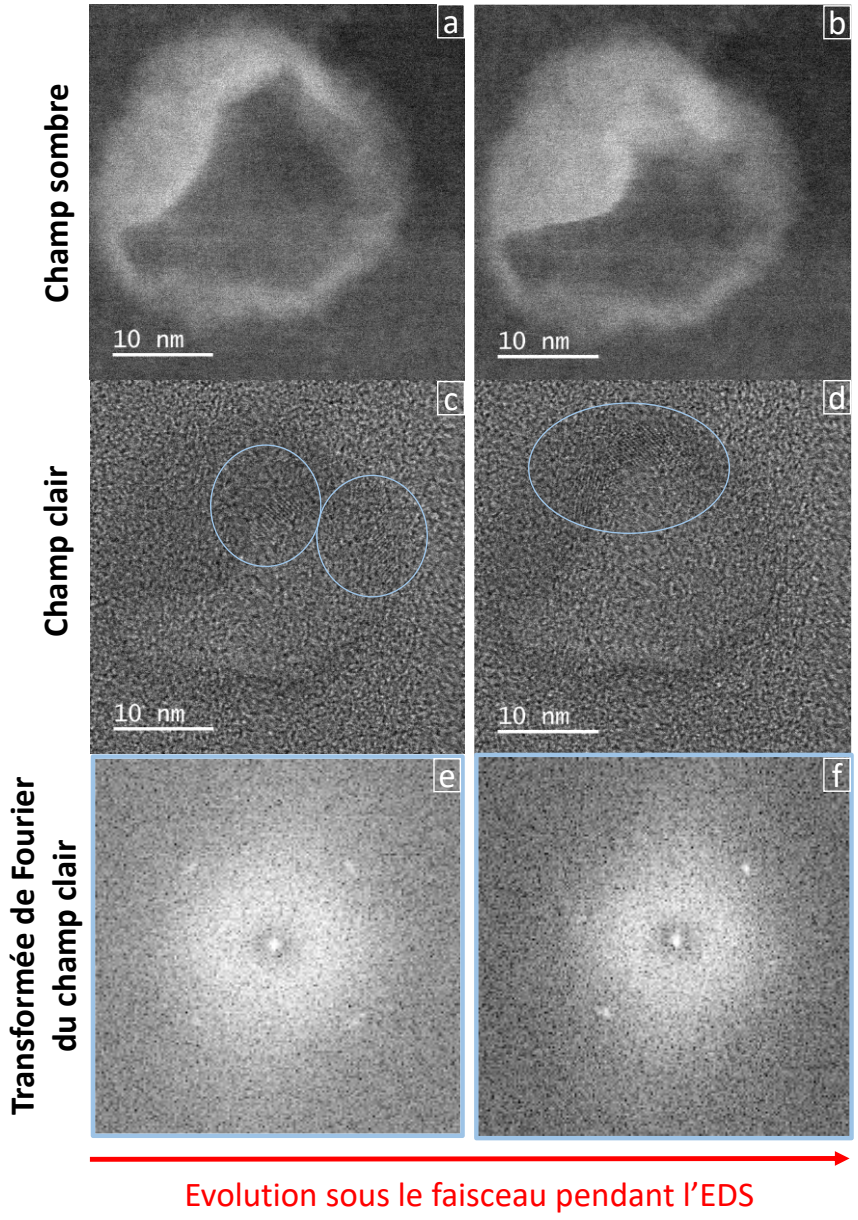


Figure AII.4 : Images MET HR d'une particule de 5PyACC en champ sombre (HAADF) (a,b), en champ clair (c,d) et transformée de Fourier du champ clair (e,f), au cours de son évolution sous le faisceau pendant l'EDS, les images (a,c,e) correspondant au début de l'analyse et les images (b,d,f) à la fin. Les zones entourées par des ovales bleu sur les images en champ clair (c,d) mettent en évidence des zones ayant cristallisé sous le faisceau, comme l'attestent les points blancs des figures de diffraction (e,f).

AII.4 CALCUL DU NOMBRE D'IONS CARBONATE PAR CLUSTERS

Le volume de la maille de vatérite C2 (le modèle choisi pour la PDF) est donné par le logiciel Vesta, et vaut 0,742 nm^3. Or le volume du cœur proto-vatérite est corrélé à la longueur de cohérence issue de la PDF, et en le supposant sphérique on a $V_{coeur} = \frac{4}{3}\pi r^3 = 4{,}2\ nm^3$ avec r = 1 nm. En le divisant par le volume d'une maille il apparaît qu'il y a environ 5,6 mailles par cluster, et donc, comme chaque maille de vatérite contient 3 groupements carbonate, il y a 17 CO_3 par cluster. On notera que ce calcul est surtout indicatif, car faisant appel à plusieurs hypothèses (comme la sphéricité des clusters) non prouvées et des calculs approximatifs.

III ANNEXE DU CHAPITRE 3

AIII.1 SPECTRES D'ABSORPTION INFRAROUGE SUPERPOSES DES POUDRES DOPEES

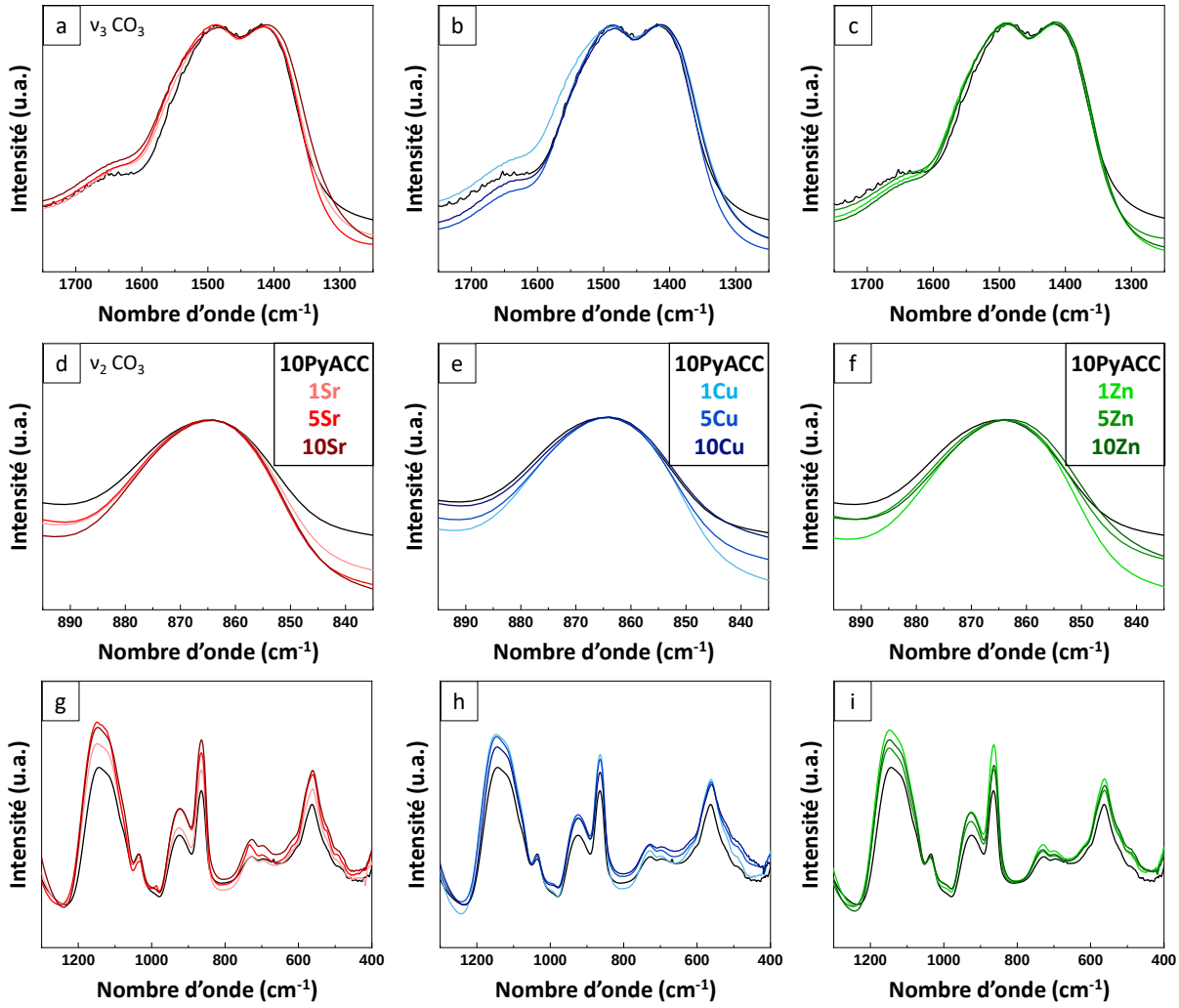


Figure AIII.1 : Spectres d'absorption infrarouge superposés de la poudre de référence 10PyACC et des poudres aSr (a, d, g), aCu (c, e, h) et aZn (b, f, i) centrées sur la vibration v_3CO_3 entre 1200 et 1800 cm^{-1} (a, b, c), v_2CO_3 entre 835 et 895 cm^{-1} (d, e, f) et sur toute la zone entre 400 et 1300 cm^{-1} (g, h, i).

AIII.2 SPECTRES D'ABSORPTION INFRAROUGE COMPLETS DES POUDRES APRES EVOLUTION DANS L'EAU ET LE SBF

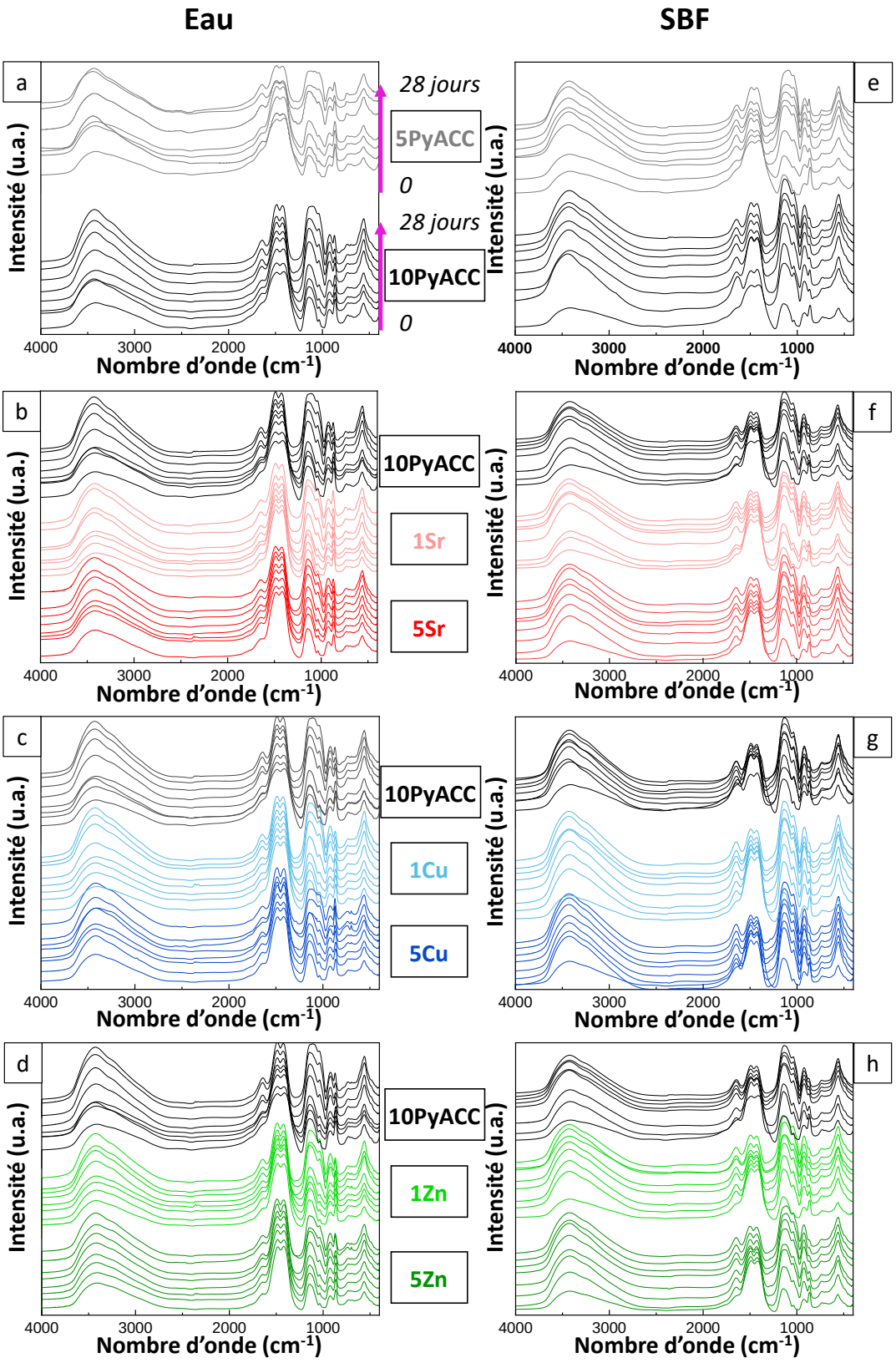


Figure AIII.2 : Spectres infrarouges sur toute la plage 400 – 4000 cm^{-1} pour les poudres de référence 5PyACC et 10PyACC (a, e), aSr (b, f), aCu (c, g), aZn (d, h) ayant évolué dans l'eau (a, b, c, d) et dans le SBF (e, f, g, h).

AIII.3 ESSAIS D'EVOLUTION DES POUDRES DOPEES DANS L'EAU : DONNEES BRUTES DE LIBERATION

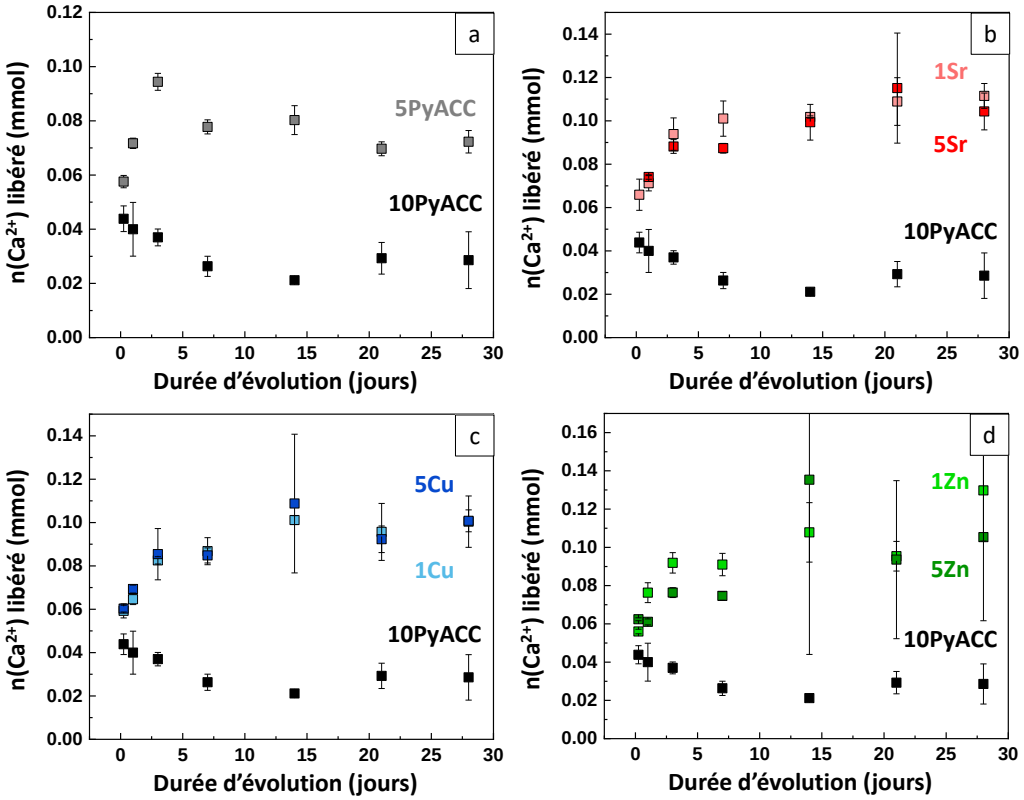


Figure AIII.3 : Nombre de mmoles de calcium libéré (pour 100 mg de poudre) en fonction de la durée d'évolution des poudres de référence 5PyACC, 10PyACC (a), et dopées avec du strontium (b), du cuivre (c) ou du zinc (d) dans l'eau. Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

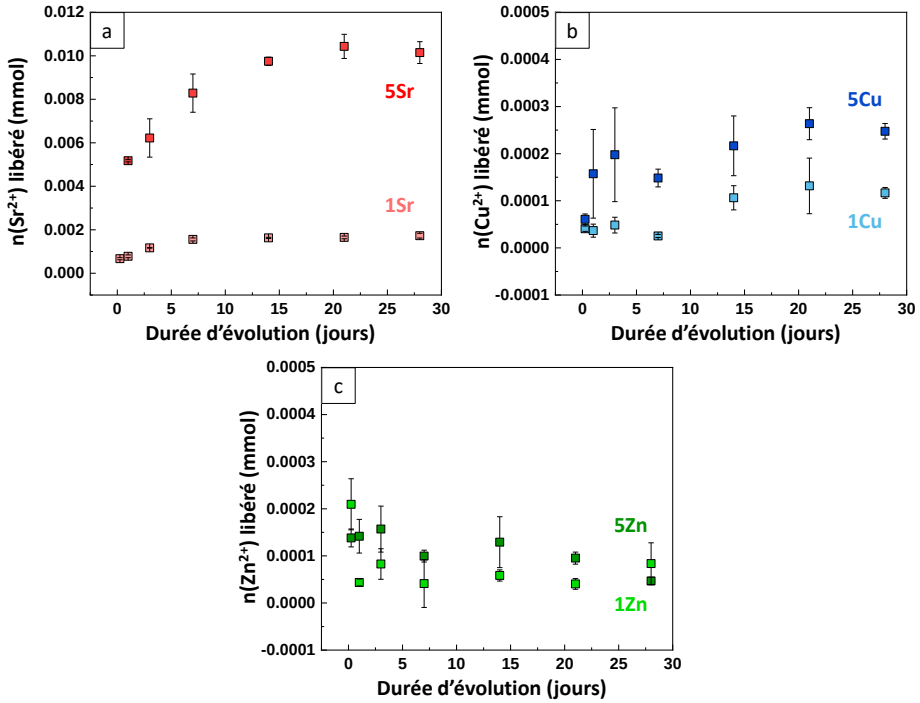


Figure AIII.4 : Nombre de mmoles de dopant libéré (pour 100 mg de poudre) en fonction de la durée d'évolution des poudres dopées avec du strontium (a), du cuivre (b) ou du zinc (c) dans l'eau. Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

AIII.4 ESSAIS D'EVOLUTION DES POUDRES DOPEES DANS LE SBF: DONNEES BRUTES DE LIBERATION

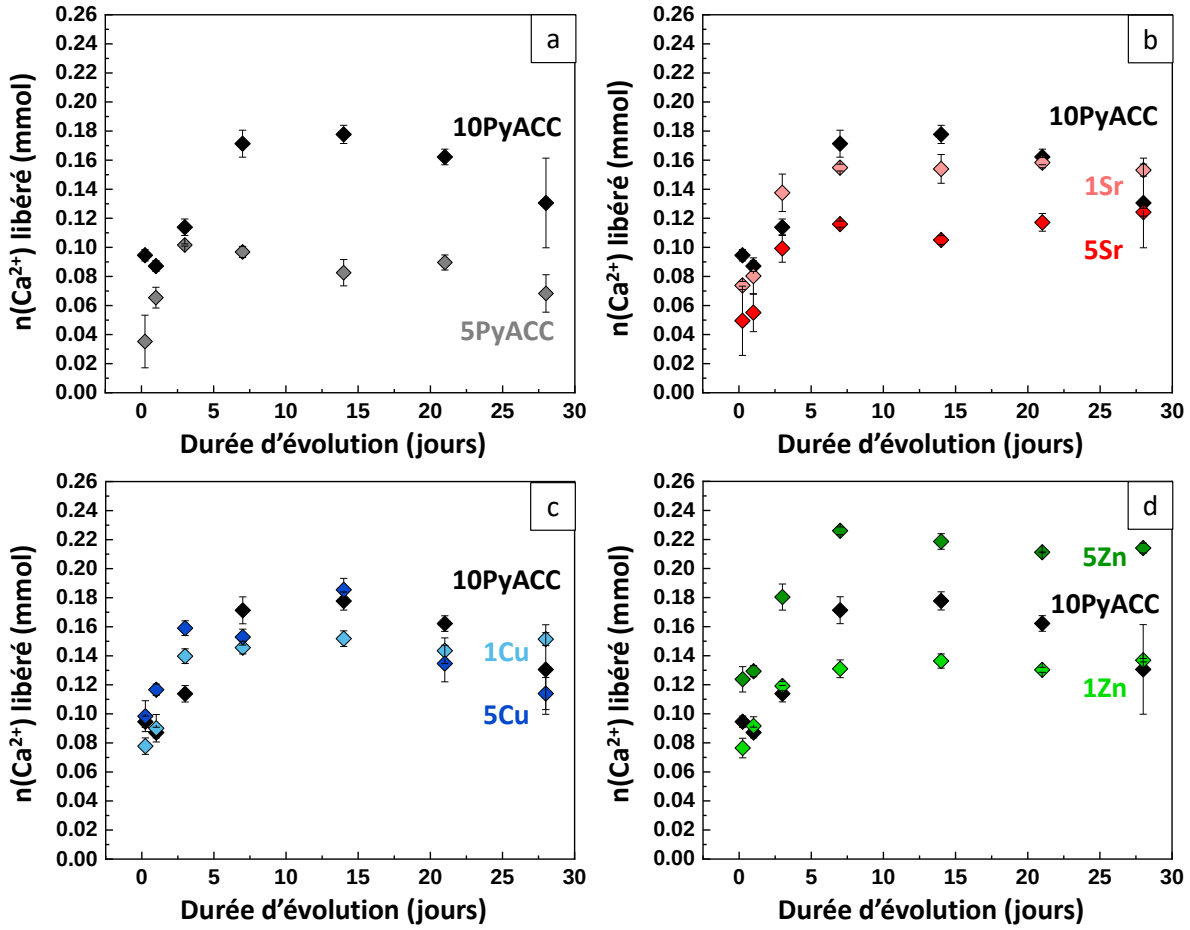


Figure AIII.5 : Nombre de mmoles de calcium libéré (pour 100 mg de poudre) en fonction de la durée d'évolution des poudres de référence 5PyACC, 10PyACC (a), et dopées avec du strontium (b), du cuivre (c) ou du zinc (d) dans le SBF. Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

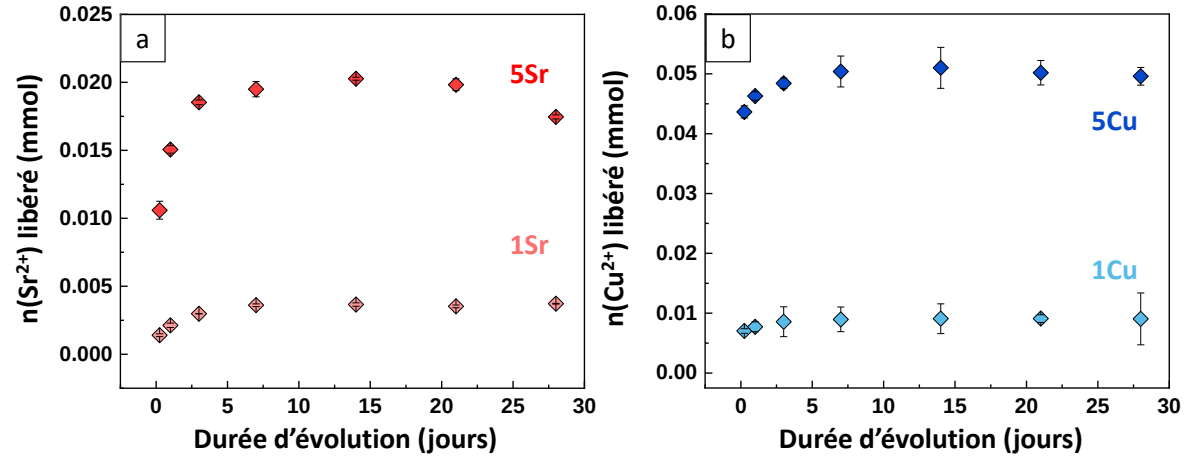


Figure AIII.6 : Nombre de mmoles de dopant libéré (pour 100 mg de poudre) en fonction de la durée d'évolution des poudres dopées avec du strontium (a), du cuivre (b) ou du zinc (c) dans le SBF. Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

AIII.5 QUANTIFICATION DU ZINC DANS LES POUDRES DOPEES AYANT EVOLUE DANS LE SBF

La proportion d'ions zinc libérée par les poudres dopées 1Zn et 5Zn est négative après évolution dans le SBF (Figure 3.42d) : il y aurait donc une plus grande quantité de zinc dans les poudres après évolution que dans les poudres initiales. Or il n'y a pas de zinc introduit initialement dans la solution SBF, donc ces valeurs témoignent d'un problème de quantification et d'une surestimation de la quantité de Zn par spectroscopie d'absorption atomique. Pour expliquer ce phénomène, des dosages par complexométrie par EDTA ont été effectués sur les poudres dopées au zinc ayant évolué dans du SBF, donnant accès au nombre de moles d'ions divalents contenus dans celles-ci. La Figure AIII.7 compare ces valeurs (points carrés) à la somme des nombres de moles de calcium et de zinc (tous deux issus du dosage par spectroscopie d'absorption atomique, points ronds), pour les deux poudres dopées 1Zn et 5Zn après différentes durées d'évolution dans le SBF. Pour toutes les durées d'évolution testées et pour les deux échantillons, les valeurs sont très proches ou se superposent. Cela pourrait alors suggérer que lors de la quantification du zinc par spectroscopie d'absorption atomique, (i) un autre cation est dosé simultanément et (ii) qu'il est divalent (car dosé par complexométrie). De fait, le spectre d'émission du magnésium [w] présente un pic à la même position qu'un des pics de celui du zinc. Des essais supplémentaires et approfondis de quantification du zinc par spectroscopie d'absorption atomique permettant de confirmer ces hypothèses n'ont pas été réalisés par manque de temps.

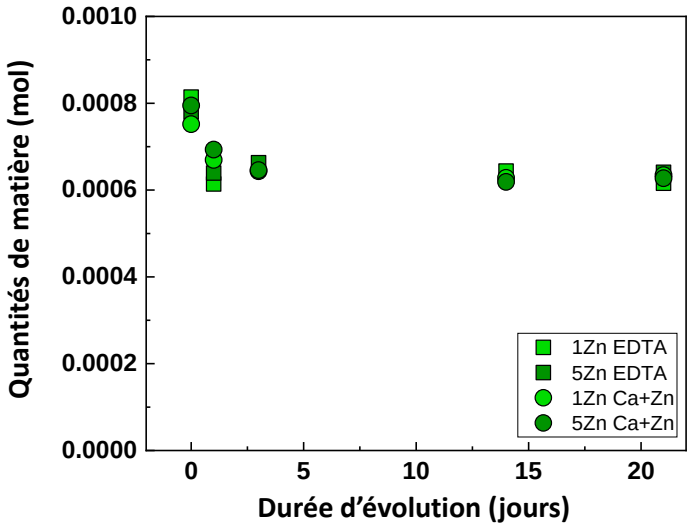


Figure AIII.7 : Comparaison du nombre de moles (pour 100 mg de poudre) d'ions divalents dosés par complexométrie (EDTA, carrés) et de la somme des nombres de moles de calcium et de zinc dosés par spectroscopie d'absorption atomique (ronds) en fonction de la durée d'évolution dans le SBF pour les échantillons 1Zn et 5Zn.

[w] Les deux spectres d'émission du zinc et du magnésium peuvent être consultés aux liens suivants : https://www.atomtrace.com/elements-database/element/30 et https://www.atomtrace.com/elements-database/element/12 respectivement.

IV ANNEXE DU CHAPITRE 4

AIV.1 ESSAI D'EVOLUTION DE LA POUDRE COMPOSITE DANS L'EAU : DONNEES BRUTES DE LIBERATION

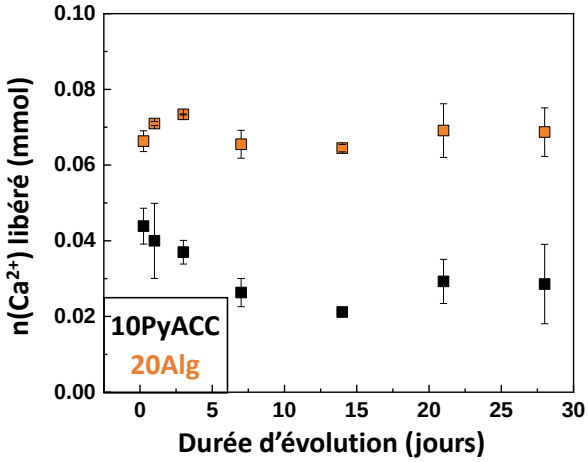


Figure AIV.1 : Nombre de mmoles de calcium libéré (pour 100 mg de poudre) en fonction de la durée d'évolution des poudres 10PyACC et 20Alg dans l'eau. Les valeurs tracées sont des moyennes des triplicats, les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

AIV.2 DONNEES ISSUES DES TESTS MECANIQUES POUR CHAQUE TRIPLICAT

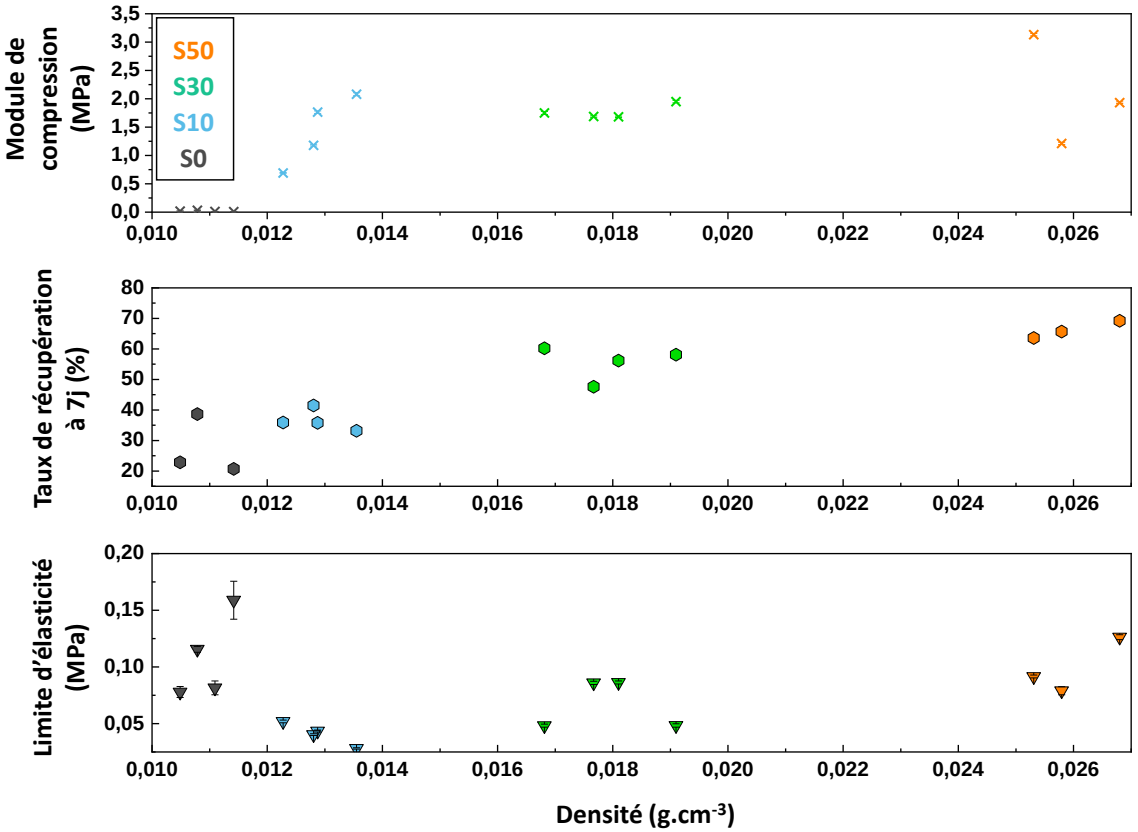


Figure AIV.2 : Module de compression (haut), taux de récupération après 7 jours (milieu) et limité d'élasticité (bas) issus des tests de compression uniaxiale des scaffolds S0 à S50, en fonction de leur densité. Pour chaque scaffold, les différents échantillons testés (3 ou 4) sont représentés sur les graphiques.

V MATERIEL ET METHODES

V.1 PRODUITS UTILISES

L'hydrogénocarbonate de sodium ($NaHCO_3$, VWR, 27778.293, 100.1 %), le nitrate de calcium tétrahydraté ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$, Merck, 1.02121.9050, 99.0 - 102.0 %), l'hydroxyde de sodium (NaOH, VWR, 28244.295, 99 %), la solution d'ammoniaque à 20 % m/m (NH_4OH, VWR, 21188.294, 20.3 % de NH_3) ont été achetés et utilisés pour la synthèse des poudres de PyACC sans traitement supplémentaire.

Le pyrophosphate de sodium $Na_4P_2O_7$ a été synthétisé par condensation de l'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4, Merck, 1.06586.2500, 99.0 %) pendant une nuit à 400°C, et stocké dans un dessiccateur.

Pour les synthèses des PyACC dopés, des sels de nitrate de cuivre trihydraté ($Cu(NO_3)_2.3H_2O$, VWR, ACRO453960010, 98.5 - 104.0 %), de nitrate de strontium ($Sr(NO_3)_2$, VWR, ACRO315175000, ≥ 99.0 %), et de nitrate de zinc hexahydraté ($Zn(NO_3)_2.6H_2O$, VWR, 12313.36, ≥ 99 %) ont été utilisés.

Pour la synthèse de la poudre composite Alg-PyACC ainsi que pour préparer les suspensions de freeze-casting, de l'alginate de sodium (Sigma-Aldrich, W201502) a été utilisé.

L'eau ultrapure (résistivité de 18,2 MΩ.cm) a été produite par un système d'eau Millipore Milli-Q.

V.2 PROTOCOLES DE SYNTHESE

V.2.1 Synthèse des poudres de PyACC

Pour la synthèse d'environ 5 g de poudre de CCA stabilisé avec *z %* de pyrophosphate (ratio molaire de pyrophosphate sur carbonate) (*z*PyACC), une solution anionique est préparée en dissolvant 4,200 g d'hydrogénocarbonate de sodium (50,0 mmol) et 0,133 x *z* g (0,5 x *z* mmol) de pyrophosphate de sodium (préalablement obtenu par condensation d'hydrogénophosphate comme décrit précédemment) dans 250 mL d'eau déionisée à température ambiante. Le facteur *z* vaut respectivement 0,0 ; 1,0 ; 2,5 ; 3,5 ; 5,0 et 10,0 % mol. pour les composés qui sont nommés 0PyACC ; 1PyACC ; 2,5PyACC ; 3,5PyACC ; 5PyACC et 10PyACC. Toutes les quantités de réactifs utilisées pour la co-précipitation des *z*PyACC sont précisées dans le Tableau AV.1. Le pH de cette solution, initialement autour de 8, est ajusté à 12,1 - 12,2 par ajout d'une solution d'hydroxyde de sodium à 6 mol/L. La solution cationique est préparée par dissolution de 11,810 g de nitrate de calcium tétrahydraté (50,0 mmol) dans 250 mL d'eau déionisée à température ambiante. La solution anionique est ensuite ajoutée rapidement à celle cationique sous forte agitation magnétique puis filtrée immédiatement sous vide sur un Büchner avec deux filtres superposés (Sartorius, grade 391) pour éviter les pertes de poudres. Le gâteau obtenu est alors lavé avec une solution ammoniacale (5 mL d'ammoniaque à 20 % m/m dans 1 L d'eau déionisée), puis lyophilisé pendant 24 h. Le temps entre le début de précipitation (mélange des deux solutions) et le début de lyophilisation est inférieur à 10 min. La poudre sèche est pesée puis conservée au congélateur à - 21 °C pour empêcher toute évolution (cristallisation en particulier) avant son utilisation.

V.2.2 Synthèse des poudres de PyACC dopées

Toutes les synthèses des poudres de PyACC dopées par un cation d'intérêt sont réalisées avec le même ratio nominal de pyrophosphate, à savoir 10 % (10PyACC), afin de s'assurer d'une plus grande stabilité des amorphes obtenus et de limiter l'impact de ce paramètre sur le dopage cationique de la poudre de PyACC.

Pour la synthèse des poudres de PyACC dopées par des cations métalliques M^{2+} (M étant le cuivre, le strontium ou le zinc), notés *a*M-10PyACC et contenant *a* % de M (avec *a* ratio molaire de M^{2+} sur la somme des cations initialement dans la solution cationique), 0,678 x *a* mmol de nitrate de M sont dissouts avec 67,8 x (100 - *a*)/100 mmol de nitrate de calcium dans 250 mL d'eau déionisée, *a* valant 1, 5 ou 10. Les pourcentages *a* donnés dans les noms des composés (*a*M-10PyACC) sont arrondis aux valeurs les plus proches pour plus de clarté, les pourcentages réels étant présentés dans les Tableaux AV.2, AV.3 et AV.4 pour le dopage au strontium, au cuivre et au zinc respectivement. La solution anionique est préparée à l'identique que pour la poudre de 10PyACC (même composition et même pH). Les deux solutions sont ensuite mélangées rapidement et le mélange est filtré sous vide sur Büchner comme pour les poudres non dopées. En raison de réactions parasites entre l'eau ammoniacale de lavage et les ions cuivre (formation de complexes stables du cuivre), il a été décidé d'effectuer les lavages des gâteaux de filtration de toutes les poudres dopées avec des cations d'intérêt avec 1 L d'eau déionisée mais sans ammoniaque, après tests préliminaires ne montrant pas de différence pour les poudres résultantes. Puis le gâteau est lyophilisé pendant 24 h et la poudre récupérée est stockée au congélateur à - 21 °C.

V.2.3 Synthèse des poudres composites d'Alg-PyACC

Pour la synthèse des poudres composites alginate-10PyACC, le protocole a été légèrement adapté. En effet, il est d'abord nécessaire de solubiliser l'alginate à chaud dans la solution anionique (contenant le carbonate et le pyrophosphate), pendant 1 h au bain-marie à environ 70°C sous agitation magnétique. 0,500 g ou 1,000 g d'alginate de sodium sont dissouts pour synthétiser les poudres 10Alg-10PyACC et le 20Alg-10PyACC respectivement. Les quantités de réactifs introduites sont présentées dans le Tableau AV.5. Une fois l'alginate solubilisé, la solution est refroidie à température ambiante dans un bain de glace puis le pH est ajusté avec de l'hydroxyde de sodium à 12,1 - 12,2. Cette solution est ajoutée rapidement à la solution cationique sous forte agitation ; un précipité très visqueux se forme immédiatement. La filtration sous vide étant trop lente (plus d'une heure) en raison de la présence de l'alginate bouchant les pores des filtres, nous avons opté pour le procédé de centrifugation afin de séparer la poudre de cette suspension. La solution est donc versée de manière équilibrée dans deux pots de centrifugation de 1 L, puis centrifugée à 4200 rpm pendant 3 min (centrifugeuse HERAEUS MEGAFUGE 40 R, Thermo Scientific). Après évacuation du surnageant, 1 L d'eau déionisée est réparti dans les deux pots qui sont ensuite mis sous agitation magnétique pour casser le gel et ainsi permettre un meilleur lavage. Une nouvelle étape de centrifugation est opérée (4200 rpm, 3 min). Après évacuation des surnageants, les deux gels sont collectés, mis en commun et lyophilisés 48 h avant d'être stockés à - 21°C. Il s'écoule en moyenne 20 min entre le mélange des deux solutions (début de la précipitation) et le début de lyophilisation de la poudre.

V.2.4 Récapitulatif des quantités utilisées pour les synthèses

Tableau AV.1 : Détail des quantités de réactifs utilisées pour la synthèse des poudres de PyACC non dopées.

***z*PyACC**	Nom du composé	0PyACC		1PyACC		2,5PyACC		3,5PyACC		5PyACC		10PyACC	
	Réactif	n (mmol)	m (g)	n (mmol)	m (g)	n (mmol)	m (g)	n (mmol)	m (g)	n (mmol)	m (g)	n (mmol)	m (g)
Solution anionique	$NaHCO_3$	50,00	4,200	50,00	4,200	50,00	4,200	50,00	4,200	50,00	4,200	50,00	4,200
	$Na_4P_2O_7$	0	0	0,50	0,133	1,25	0,333	1,75	0,466	2,50	0,665	5,00	1,330
Solution cationique	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	50,01	11,810	50,01	11,810	50,01	11,810	50,01	11,810	50,01	11,810	50,01	11,810

Tableau AV.2 : Détail des quantités de réactifs utilisées pour la synthèse des poudres de 10PyACC dopées avec du cuivre.

10PyACC dopé Cu	Nom du composé	1Cu-10PyACC		5Cu-10PyACC		10Cu-10PyACC	
	Réactif	n (mmol)	m (g)	n (mmol)	m (g)	n (mmol)	m (g)
Solution anionique	$NaHCO_3$	50,00	4,200	50,00	4,200	50,00	4,200
	$Na_4P_2O_7$	5,00	1,330	5,00	1,330	5,00	1,330
Solution cationique	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	49,50	11,685	47,47	11,213	44,97	10,623
	$Cu(NO_3)_2.3H_2O$	0,68	0,164	3,39	0,819	6,78	1,638
	$Sr(NO_3)_2$						
	$Zn(NO_3)_2.6H_2O$						
*a*M-10PyACC	*a* théorique (%)	1,35		6,67		13,10	

Tableau AV.3 : Détail des quantités de réactifs utilisées pour la synthèse des poudres de 10PyACC dopées strontium.

10PyACC dopé Zn	Nom du composé	1Sr-10PyACC		5Sr-10PyACC		10Sr-10PyACC	
	Réactif	n (mmol)	m (g)	n (mmol)	m (g)	n (mmol)	m (g)
Solution anionique	$NaHCO_3$	50,00	4,200	50,00	4,200	50,00	4,200
	$Na_4P_2O_7$	5,00	1,330	5,00	1,330	5,00	1,330
Solution cationique	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	49,50	11,685	47,47	11,213	44,97	10,623
	$Cu(NO_3)_2.3H_2O$						
	$Sr(NO_3)_2$	0,68	0,143	3,39	0,717	6,78	1,435
	$Zn(NO_3)_2.6H_2O$						
*a*M-10PyACC	*a* théorique (%)	1,35		6,67		13,10	

Tableau AV.4 : Détail des quantités de réactifs utilisées pour la synthèse des poudres de 10PyACC dopées zinc.

10PyACC dopé Sr	Nom du composé	1Zn-10PyACC		5Zn-10PyACC		10Zn-10PyACC	
	Réactif	n (mmol)	m (g)	n (mmol)	m (g)	n (mmol)	m (g)
Solution anionique	$NaHCO_3$	50,00	4,200	50,00	4,200	50,00	4,200
	$Na_4P_2O_7$	5,00	1,330	5,00	1,330	5,00	1,330
Solution cationique	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	49,50	11,685	47,47	11,213	44,97	10,623
	$Cu(NO_3)_2.3H_2O$						
	$Sr(NO_3)_2$						
	$Zn(NO_3)_2.6H_2O$	0,68	0,202	3,39	1,009	6,78	2,017
*a*M-10PyACC	*a* théorique (%)	1,35		6,67		13,10	

Tableau AV.5 : Détail des quantités de réactifs utilisées pour la synthèse des poudres composites Alg-10 PyACC.

Composite Alg-10PyACC	Nom du composé	10Alg-10PyACC		20Alg-10PyACC	
	Réactif	n (mmol)	m (g)	n (mmol)	m (g)
Solution anionique	$NaHCO_3$	50,00	4,200	50,00	4,200
	$Na_4P_2O_7$	5,00	1,330	5,00	1,330
	Alginate		0,500		1,000
Solution cationique	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	50,01	11,810	50,01	11,810
*a*M-10PyACC	*a* théorique (%)	7,8 % mass.		14,6 % mass.	

V.3 PROTOCOLE POUR LES ESSAIS D'EVOLUTION DES POUDRES EN MILIEUX AQUEUX

Les essais d'évolution en milieux aqueux ont été réalisés sur les poudres non dopées 5PyACC et 10PyACC, les poudres dopées 1Cu-10PyACC, 5Cu-10PyACC, 1Sr-10PyACC, 5Sr-10PyACC, 1Zn-10PyACC et 5Zn-10PyACC ainsi que la poudre composite 20Alg-10PyACC. Les deux milieux sont l'eau ultrapure milli-Q et une solution de type *simulated body fluid* (SBF). Nous avons préparé cette dernière en mélangeant un même volume de solutions cationique et anionique de compositions détaillées ci-après, d'après le protocole adapté par M. Desbord dans sa thèse [261]. Pour chaque poudre testée, un

triplicat est réalisé avec 150,0 mg de poudre introduits dans un pilulier avec 100 mL d'eau ou de SBF (ratio recommandé par Maçon *et al*. [495] et choisi pour comparer avec les résultats de Myszka *et al.* [93]). Les échantillons sont ensuite placés dans une étuve à 37°C, puis agités manuellement tous les deux jours. Après différents temps d'évolution à l'étuve (6 h, 1 jour, 3 jours, 7 jours, 14 jours, 21 jours ou 28 jours), les piluliers sont sortis et filtrés sur tulipe avec un filtre de 0,45 µm. Le filtrat est récupéré et son pH est mesuré, puis la poudre est lavée avec 100 mL d'eau ultrapure puis 50 mL d'éthanol pour la sécher. Elle est ensuite collectée et placée une nuit à l'étuve à 37°C pour finir le séchage. Au total, en prenant en compte chaque triplicat, chaque temps d'évolution (7), chaque milieu (2) et chaque composition de poudre (9), cette étude totalise alors 378 échantillons.

A l'issue du test, la poudre sèche est pesée puis, pour un des échantillons du triplicat, caractérisée par DRX, spectroscopie FTIR et MEB (le MEB étant effectué sur un autre échantillon du triplicat l'analyse par DRX nécessitant un broyage des poudres, influant sur l'apparence des cristaux observés en MEB). Les concentrations en calcium et en ion dopant (le cas échéant) dans le filtrat ont été dosées par spectrométrie d'absorption atomique pour les échantillons ayant évolué dans l'eau (la quantification des ions est ici réalisée sur la solution en raison de la faible quantité de poudre collectée ne permettant pas de dosages). Pour les échantillons évoluant dans le SBF, la quantité de sodium initialement très élevée dans le SBF et donc dans le filtrat perturbe la mesure par spectrométrie d'absorption atomique. De plus, il y a des ions calcium introduits dans le SBF, dont la quantité élevée peut masquer les faibles libérations issues de la poudre dopée. Dans ce cas, ce sont alors les poudres récupérées qui sont dissoutes et dosées.

Les poudres ainsi que les filtrats sont stockés au congélateur à - 21 °C avant leur caractérisation/analyse.

Préparation de la solution SBF : Le protocole de préparation de la solution SBF que nous avons suivi est différent de celui reporté dans la norme ISO 23317 : 2014 afin d'éviter certains biais qui peuvent être introduits par cette dernière. Il correspond au protocole adapté et décrit par M. Desbord dans sa thèse [261]. Les grandes lignes des adaptations sont les suivantes :

- La préparation des solutions cationique et anionique séparées permet de les conserver de façon prolongée sans risque de précipitation (la solution SBF étant sursaturée vis-à-vis de l'apatite), et donc d'utiliser une solution SBF fraichement préparée en début de chaque test réalisé. La composition des solutions cationique et anionique qui ont permis de préparer la solution SBF via un mélange équivolumique de ces dernières est détaillée dans les Tableaux AV.6 et AV.7.
- Le pH des deux solutions (cationique et anionique) est ajusté à 7,4 avec du tampon TRIS (Sigma-Aldrich) avant de les mélanger ce qui permet de diminuer la concentration totale en tampon TRIS présent dans la solution SBF finale tout en permettant de tamponner le milieu à 7,4.
- Le sel de carbonate de sodium est ajouté une fois que les solutions cationique et anionique ont été mélangées, pour garantir que la concentration en ions carbonate en début de test soit bien celle attendue dans la solution de SBF.

Tableau AV.6 : Composition de la solution cationique utilisée pour préparer 4 L de solution SBF

Réactif	Masse molaire (g/mol)	Concentration (mM)	Masse à peser (g) (pour 4 L)
NaCl (VWR 27788.297, ≥ 98 %)	58,44	137	32,025
KCl (VWR 26764.298, 99,5 – 101,0 %)	74,55	6	1,890
$MgCl_2.6H_2O$ (VWR 25108.295, 99,0 – 101,1 %)	203,30	3	2,440
$CaCl_2.2H_2O$ (VWR 22317.297, 99,0 – 103,0 %)	147,02	5	2,940
HCl 1 M	x	x	156 mL

pH ajusté à 7,39 avec environ 20 g de TRIS (Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane, VWR, 443866G, ≥ 99,00 %).

Tableau AV.7 : Composition de la solution anionique utilisée pour préparer 4 L de solution SBF

Réactif	Masse molaire (g/mol)	Concentration (mM)	Masse à peser (g) (pour 4 L)
NaCl (VWR 27788.297)	58,44	137	32,025
$K_2HPO_4.3H_2O$ (VWR 26931.263, ≥ 99,0 %)	228,22	2	1,830
Na_2SO_4 (VWR 28114.296, 98,5 – 101,0 %)	142,04	1	0,570
HCl 1M	x	x	156 mL

pH ajusté à 7,39 par environ 20 g de TRIS.

Une fois les deux solutions mélangées, le sel de carbonate de sodium $NaHCO_3$ (VWR, 27778.293, M = 84,01 g/mol, 100,1 %) est ajouté pour atteindre une concentration finale en carbonate de 4,2 mM (2,82 g pour 8 L de solution de SBF).

V.4 COMPOSITION DES SUSPENSIONS POUR LE FREEZE-CASTING

En fonction des proportions inorganiques/organiques choisies pour les scaffolds et compte tenu du volume d'eau fixé à 6 mL et du ratio massique alginate/eau initialement fixé à 1 %, les calculs présentés dans le Tableau AV.8 ont été réalisés pour ajuster les masses de poudre pesées. D'après les calculs théoriques le pourcentage massique d'alginate dans la poudre 20Alg-10PyACC était de 13,2 %, mais il s'est révélé valoir 10 % après caractérisation. Les calculs et masses pesées ayant été calculées avant ces caractérisations, il y a quelques écarts aux valeurs initialement prévues. Le Tableau AV.8 présente les proportions et valeurs réelles dans les composés élaborés.

Tableau AV.8 : Masses réelles pesées et proportions calculées d'alginate (alg) et de poudre composite (20Alg-10PyACC) pour les différentes compositions des scaffolds élaborés.

Scaffold	Masse d'eau (g)	% mass. d'alg total* / suspension	% mass. d'alg *in situ* dans le 20Alg-10PyACC	% mass. d'alg total / au solide final	% mass. de 10PyACC / au solide final	m(20Alg-10PyACC) pesée (g)	m(alg libre) pesée (g)	% mass. d'alg libre / au solide
S0	6,000	0,99	10	100	0	0,0000	0,0600	100
S10	6,000	0,98	10	90	10	0,0077	0,0590	88
S30	6,000	0,97	10	69	31	0,0296	0,0561	65
S50	6,000	0,94	10	48	52	0,0691	0,0509	42
S70	6,000	0,88	10	27	73	0,1613	0,0387	19

* L'alginate total correspond à la somme de l'alginate libre introduit dans la suspension avant la mise en forme par freeze-casting et de l'alginate précipité *in situ* (c'est-à-dire contenu dans la poudre

composite 20Alg-10PyACC initiale). Le 10PyACC ici correspond seulement à la partie inorganique de la poudre 20Alg-10PyACC (donc sans l'alginate).

V.5 TECHNIQUES DE CARACTERISATION DE DIFFUSION/DIFFRACTION DES RAYONS X

V.5.1 Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X sur poudre (DRX) a été réalisée en utilisant un diffractomètre Bruker D8 Advance avec une anticathode de cuivre ($\lambda(K\alpha_1)$ = 1,54060 Å, $\lambda(K\alpha_2)$ = 1,54439 Å). Pour les poudres *z*PyACC, et les poudres dopées au cuivre, strontium, zinc, l'analyse a été effectuée entre 20° et 80° avec un pas de 0,021°. Pour les poudres 10Alg-10PyACC et 20Alg-10PyACC la gamme est étendue de 5° à 120° et le pas est de 0,020°.

Le logiciel EVA (Bruker AXS) a été utilisé pour identifier les phases cristallines présentes et pour quantifier la proportion de phase amorphe restante (pourcentage de cristallinité), en ajustant manuellement la ligne de base au fond continu, puis en comparant l'aire sous celle-ci à celle sous les pics. Pour calculer la taille des cristallites, la formule de Debye-Scherrer a été utilisée après une soustraction de la raie $K\alpha_2$ au diffractogramme mesuré : $t = \frac{k \times \lambda}{\cos\theta \times \sqrt{FWMH^2 - FWMH_0^2}}$, avec t la taille apparente des cristallites, k pris égal à 0,94 (explications du choix de cette valeur dans le Chapitre 2 : II.1), $FWMH$ la largeur à mi-hauteur et $FWMH_0$ la largeur instrumentale, déterminée grâce à un étalonnage de la machine.

Pour les analyses des scaffolds par diffraction des rayons X (DRX), le même diffractomètre a été utilisé que pour les poudres. Les analyses sont réalisées sur une coupe médiane transversale de hauteur ajustée pour être à ras du porte-échantillon. L'analyse est faite entre 5° et 120° avec un pas de 0,020°.

V.5.2 Diffusion des rayons X aux petits angles

Les analyses de diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) ont été réalisées sur les poudres *z*PyACC non dopées par Pierre Roblin au Laboratoire de Génie Chimique, en utilisant le banc de diffusion (XEUSS 2.0 société Xénocs) de la Fédération FERMaT (Fluides, Energie, Réacteurs, Matériaux et Transferts, FR3089) à Toulouse, munie d'une source de rayons X GeniX3D au cuivre à la longueur d'onde λ = 1,5 Å. La mesure a été faite pour trois distances poudre-récepteur : grande distance de 2506,5 mm (vecteur de diffusion q de 0,0028 à 0,2 $Å^{-1}$), moyenne distance de 1216,5 mm (de 0,005 à 0,5 $Å^{-1}$) et faible distance de 188 nm (de 0,02 à 3 $Å^{-1}$) dans le but d'obtenir une grande gamme de vecteur de diffusion q. Les poudres sont placées dans un support entre deux couches de Kapton avec une épaisseur égale à 1 mm. Pour chaque échantillon, 4 acquisitions de 300s ont été réalisées puis les images ont été traitées avec le programme FOXTROT pour obtenir une courbe 1D moyennée et soustraite de la référence (cellule kapton vide).

Les courbes SAXS issues des trois distances de mesures se superposent sur une fraction de la gamme angulaire et leur combinaison permet d'obtenir une courbe SAXS unique allant de 0,0028 A^{-1} à 3 A^{-1}. Les courbes obtenues ont été analysées avec le logiciel SASView (http://www.sasview.org/). Dans la partie petits angles (q = 0,01 A^{-1}), la courbe SAXS présente une rupture pente pour laquelle on peut déterminer la longueur caractéristique D_1. A partir de deux lois de puissance d'équation $I(q) = k.q^{-p}$ appliquées à cette partie de la courbe, le point d'intersection des deux droites à la valeur q_1 permet de calculer D_1 (à partir de l'équation $q_1 = 2\pi/D_1$), donnant une taille caractéristique sur la particule (plusieurs dizaines de nm).

Les valeurs des équations des deux lois appliquées dans la région I et II (identifiés sur la Figure AV.1) des petits angles sont présentées dans le Tableau AV.9 pour chaque échantillon. L'incertitude est calculée à partir des erreurs sur la modélisation donnée par le logiciel SASView.

Tableau AV.9 : Bornes et équations des deux lois de puissance modélisées sur le début des courbes SAXS des poudres zPyACC, et dimension caractéristique D_1 calculée à partir de leur point d'intersection

Echantillon	Loi de puissance 1		Loi de puissance 2		D_1 (nm)
	Bornes ($Å^{-1}$)	Equation	Bornes ($Å^{-1}$)	Equation	
0PyACC	Pas de modélisation possible				
1PyACC	0,0035 – 0,007	$I_{pl1}(q) = 0{,}00008.q^{-3,44}$	0,025 – 0,06	$I_{pl2}(q) = 2{,}15.10^{-5}.q^{-3,706}$	104 ± 1
2,5PyACC	0,0035 – 0,007	$I_{pl1}(q) = 0{,}355.q^{-1,954}$	0,025 – 0,06	$I_{pl2}(q) = 4{,}23.10^{-5}.q^{-3,8938}$	$66{,}3 \pm 0{,}4$
3,5PyACC	0,0035 – 0,007	$I_{pl1}(q) = 0{,}191.q^{-2,094}$	0,025 – 0,06	$I_{pl2}(q) = 2{,}48.10^{-5}.q^{-4,0626}$	$59{,}2 \pm 0{,}4$
5PyACC	0,0035 – 0,007	$I_{pl1}(q) = 0{,}353.q^{-1,970}$	0,025 – 0,06	$I_{pl2}(q) = 3{,}83.10^{-5}.q^{-4,0169}$	$54{,}4 \pm 0{,}3$
10PyACC	0,0035 – 0,01	$I_{pl1}(q) = 0{,}178.q^{-2,105}$	0,025 – 0,06	$I_{pl2}(q) = 4{,}98.10^{-5}.q^{-3,9587}$	$51{,}9 \pm 0{,}2$

La première pente p_1 (0,0035-0,007 $Å^{-1}$) (domaine I, Figure AV.1) donne des informations sur l'organisation des nanoparticules entre elles : plus cette valeur tend vers 3, plus l'assemblage est compact tandis qu'une pente qui tend vers 1 met en évidence une organisation fractale. La valeur intermédiaire de 2 renseigne sur une organisation intermédiaire d'agrégats moyennement compact. La seconde pente p_2 (domaine II, Figure AV.1) est sensible à la surface de la particule de dimension D_1 formant l'agrégat. Plus la valeur est proche de 4, plus la surface est « lisse » présentant peu de fluctuation de densité à l'interface. Une valeur de 3 correspond plutôt à des objets de surfaces fractales.

La courbe SAXS présente aux angles intermédiaires (domaine III, Figure AV.1) un maximum d'intensité vers 0,18 $Å^{-1}$ sur lequel on peut appliquer un modèle reflétant la présence d'objets de plus petite taille (modèles de sphères en interaction) ou d'une pseudo distance caractéristique (pic Gaussien). Pour exacerber ce maximum d'intensité, la loi de puissance 2 est soustraite manuellement aux données SAXS (excepté pour le 0PyACC, ne présentant pas ce maximum). Les courbes obtenues (dont un exemple est donné Figure AV.2a) sont ensuite rechargées dans le logiciel SASView dans le but de réaliser une modélisation sur ce maximum. Le premier essai est fait avec un modèle de pic Gaussien (*Gaussian peak)* d'équation $I_{Gp}(q) = k.\exp\left[\frac{-\frac{1}{2}(q-q_0)^2}{\sigma^2}\right]$, centré sur un maximum à q_0 et avec un écart-type σ. Les paramètres initiaux (bornes inférieure et supérieure, échelle, position du pic, σ) sont d'abord ajustés à la main pour s'approcher au mieux de la courbe, puis ils sont modélisés par le logiciel. Les paramètres de sortie sont listés pour chaque échantillon dans le Tableau AV.10. Ce modèle étant seulement un modèle géométrique ne tenant pas compte de la structuration des poudres, nous avons ensuite affiné l'analyse en appliquant un modèle de sphères dures en interaction (*sphere.hardsphere*), grâce à un facteur de structure ajouté au modèle de sphère. L'équation résultante est :

$$I(q) = I_0.P(q).S(q) \text{ avec } P(q) = \frac{\varphi}{V_{obj}} . \left[3V_{obj}\Delta\rho \frac{\sin(qr)-qr\cos(qr)}{(qr)^3}\right]^2,$$

avec *V* le volume diffractant, φ la fraction volumique, $\Delta\rho$ la différence entre les densités de longueurs de diffusion de la calcite (pour les clusters) et celle de l'eau, et *r* le rayon de la sphère ; le facteur de structure $S(q)$ correspondant aux interactions sphère-sphère.

Pour cela, il a été supposé que les petites entités détectées (assimilées à des clusters) sont sphériques, que la densité de longueur de diffusion (SLD) des clusters est celle de la calcite ($2{,}57.10^{-5}$ Å^{-2}, très proche de celle de la vatérite de $2{,}41.10^{-5}$ Å^{-2}), celle de l'eau valant $9{,}48.10^{-6}$ Å^{-2}. Le modèle est créé à l'aide d'un *Plug-in model* composé de la somme d'un modèle de sphère (*sphere*) et d'un modèle sphère dure (*hardsphere*). Après un ajustement des paramètres initiaux à la main (bornes inférieure et supérieure, échelle, densités de longueur de diffusion, rayon, rayon effectif, fraction volumique), une première modélisation par le logiciel est effectuée, suivie d'une deuxième en ajoutant de la polydispersité (PD) en loi gaussienne sur le rayon et le rayon effectif. Les paramètres obtenus sont listés dans le Tableau AV.10 (les deux SLD ne sont pas relevées car laissées fixes pendant la modélisation). Les incertitudes sont celles données par le logiciel pour la modélisation. Le rayon effectif est tel que 2 r_{eff} est égal à la distance centre à centre entre deux sphères voisines. Comme pour tous les échantillons ce rayon effectif est très proche du rayon obtenu avec le modèle de pic gaussien, nous en avons déduit que le rayon gaussien prend en compte une partie de l'interaction sphère-sphère et pas *stricto sensu* le rayon du cluster. Nous avons donc préféré nous concentrer sur le rayon obtenu par le modèle *sphere.hardsphere* pour l'interprétation des données. Les Figures AV.2b, AV.2c montrent des exemples des modélisations obtenues par le logiciel SASView (en bleu) pour le modèle *Gaussian peak* ou *sphere.hardsphere* respectivement, pour l'échantillon 10PyACC. La Figure AV.1 récapitule les analyses issues de chaque domaine de la courbe.

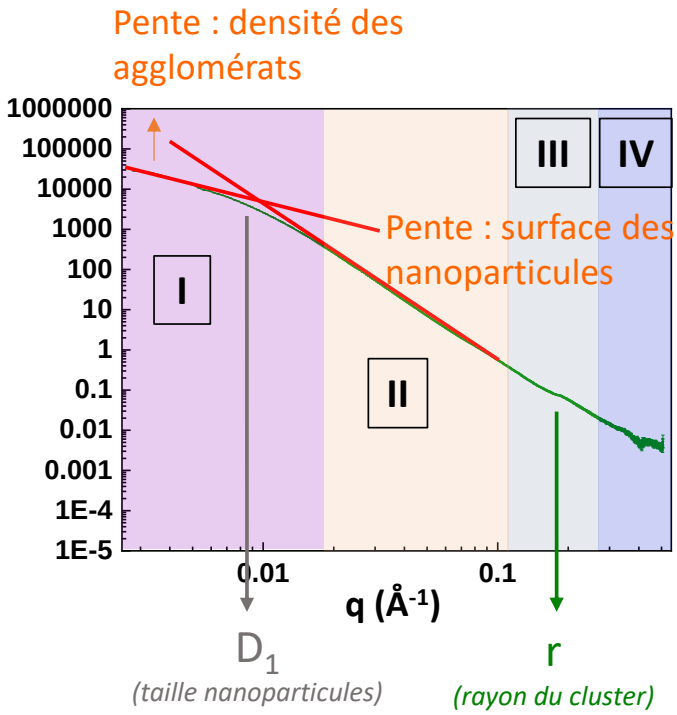


Figure AV.1 : Schéma représentant les informations pouvant être extraites de chaque domaine après analyse de la courbe SAXS tel que décrit ci-avant.

Aux plus grands angles (domaine IV, Figure AV.1), les courbes de WAXS2D sont obtenues. Leur méthodologie d'analyse est entièrement détaillée dans le Chapitre 2 et donc ne le sera pas de nouveau ici.

Tableau AV.10 : Paramètres issus des modélisations sur les courbes SAXS des poudres zPyACC en utilisant le modèle Gaussian Peak et le modèle sphere.hardsphere du logiciel SASView

Echantillon	Modèle Gaussian peak					Modèle sphere.hardsphere						
	Bornes ($Å^{-1}$)	Scale	q_{GP} ($Å^{-1}$)	σ_{GP} ($Å^{-1}$)	$r_{GP\ calculé}$ (nm)	Bornes ($Å^{-1}$)	Scale	$r_{s.hs}$ (nm)	r_{eff} (nm)	φ	PD(r)	PD(r_{eff})
1PyACC	0,17 – 0,21	0,011	0,178	0,038	3,5 ± 0,8	0,145 – 0,26	0,000796	2,48 ± 0,02	3,7 ± 0,2	0,66 ± 0,02	0,153	0,104
2,5PyACC	0,17 – 0,21	0,028	0,181	0,037	3,5 ± 0,7	0,145 – 0,26	0,002040	2,482 ± 0,008	3,7 ± 0,1	0,696 ± 0,005	0,147	0,107
3,5PyACC	0,17 – 0,21	0,030	0,182	0,036	3,5 ± 0,7	0,145 – 0,26	0,002173	2,478 ± 0,008	3,7 ± 0,1	0,689 ± 0,005	0,148	0,107
5PyACC	0,17 – 0,21	0,032	0,181	0,039	3,5 ± 0,8	0,145 – 0,26	0,002339	2,461 ± 0,008	3,7 ± 0,1	0,707 ± 0,003	0,149	0,110
10PyACC	0,17 – 0,21	0,031	0,186	0,033	3,4 ± 0,6	0,145 – 0,26	0,002269	2,484 ± 0,008	3,7 ± 0,1	0,697 ± 0,005	0,141	0,104

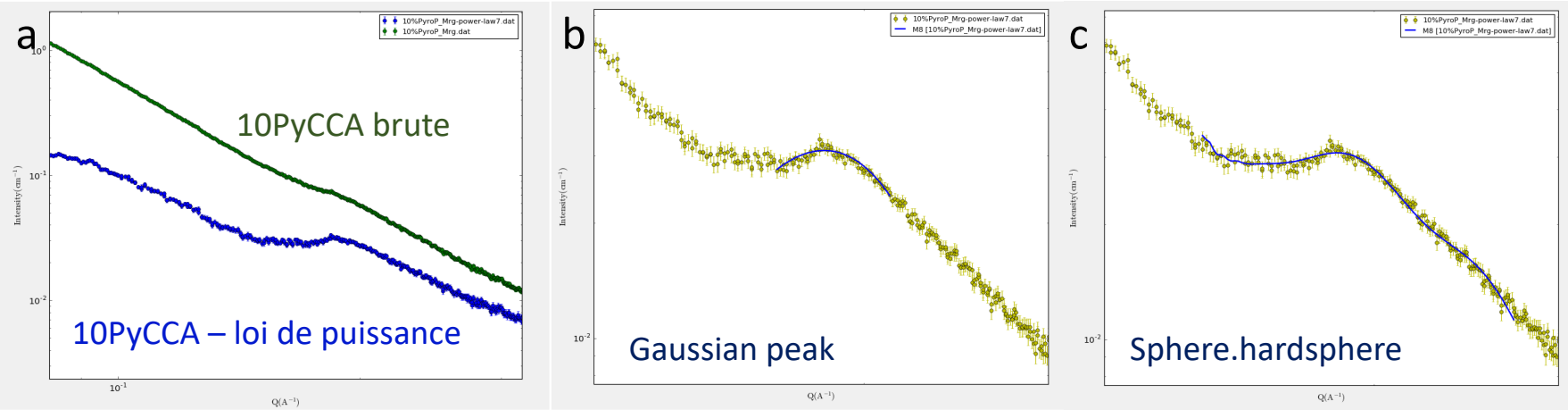


Figure AV.2 : Comparaison entre la courbe SAXS initiale de la poudre 10PyACC (courbe verte) et la courbe à laquelle il a été soustrait la loi de puissance 2 (courbe bleue) pour exacerber le maximum d'intensité (a), et comparaison entre les modèles Gaussian peak (b)) et le modèle sphere.hardsphere (c), représentés en bleu sur la courbe jaune SAXS expérimentale de l'échantillon 10PyACC. Images issues du logiciel SASView.

V.5.3 Diffusion des rayons X aux grands angles

Les analyses de diffusion de rayons X aux grands angles (WAXS) ont été réalisées par Capucine Sassoye au Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris, sur un diffractomètre Bruker D8 ADVANCE équipé d'un miroir Göbel et d'un détecteur de haute énergie LYNXEYE, avec une source au molybdène (moyenne $\lambda(K_{\alpha1\alpha2})$ = 0,71073 Å) à température ambiante. Une dizaine de mg de poudres sont placés dans un capillaire borosilicate fin (parois de 0,01 mm) d'épaisseur de 1,0 mm. Les mesures ont été effectuées de Q_{min} = 0,12 Å^{-1} à Q_{max} = 17,0 Å^{-1}. Les diffractogrammes RX sont obtenus en combinant les 7 jeux de données acquis, dont les paramètres 2θi(°)-2θf(°)-taille du pas(°)-durée du pas(s) sont les suivants : 0,8-31-0,02-2 ; 29-61-0,04-6 ; 59-91-0,06-15 ; 89-121-0,1-40 (deux fois) et 119-150-0,1-100 (deux fois) pour une durée totale de mesure de 34 h. Des mesures additionnelles de diffusion du capillaire vide ont été acquises dans les mêmes conditions pour permettre la soustraction du fond continu. Les données brutes ont été traitées en utilisant le programme PDFgetX3, afin d'obtenir la fonction de distribution des paires (PDF) expérimentale *Gexp*(*r*), en utilisant les paramètres suivants Q_{min} = 0,5 Å^{-1}, Q_{max} = 17 Å^{-1}, r_{poly} = 1,7. Le logiciel PDFGUI a été utilisé pour calculer les fonctions *Gcalc(r)* des modèles structuraux, dans le but d'affiner les structures cristallines de la calcite et de la vatérite des poudres de référence synthétisées. Les paramètres affinés (paramètres de maille, déplacements atomiques isotropes, positions atomiques, facteurs d'élargissement) ont ensuite été combinés à un facteur d'atténuation de 9 Å pour mimer l'organisation des phases amorphes à courte distance, comme expliqué ci-dessous.

Calcul des PDF des phases cristallines

Afin de pouvoir comparer les PDF expérimentales $G_{exp}(r)$ des *z*PyACC aux phases cristallines, celles de la calcite et de la vatérite (les deux phases les plus probables avec nos conditions expérimentales et en accord avec la littérature) sont calculées. Pour cela, une calcite et une vatérite pures sont synthétisées puis analysées, et les $G_{exp}(r)$ sont extraites à partir des données expérimentales de WAXS (comme pour les *z*PyACC). En parallèle, les courbes PDF théoriques $G_{calc}(r)$ de ces deux phases sont calculées, à partir de la structure proposée par Graf [671] pour la calcite. Pour la vatérite, beaucoup plus sujette à controverses, les deux structures C2 [137] et P3$_2$21 [136] sélectionnées à partir de l'article de Burgess et Bryce [135] (*cf.* Chapitre 1 : II.1.2.1.3) ont été testées. Une fois les modèles créés, ils ont été affinés à partir des données expérimentales, en autorisant les variations des paramètres de maille, déplacements atomiques isotropes, positions atomiques et facteurs d'élargissement. Les Figures AV.3a, AV.3b et AV.3c présentent respectivement les G(r) expérimentales (cercles bleus), calculées à partir des modèles précédents (lignes rouges) et la différence des deux (lignes vertes) pour les trois structures. Le facteur d'accord R_w est bon pour la calcite (égal à 12,9 %) et pour la vatérite C2 (10,9 %), ce qui valide les modèles structuraux et la configuration PDF. Pour la vatérite P3$_2$21 le facteur d'accord est plus élevé (20,9 %), c'est donc la structure monoclinique C2 qui a été retenue pour la suite.

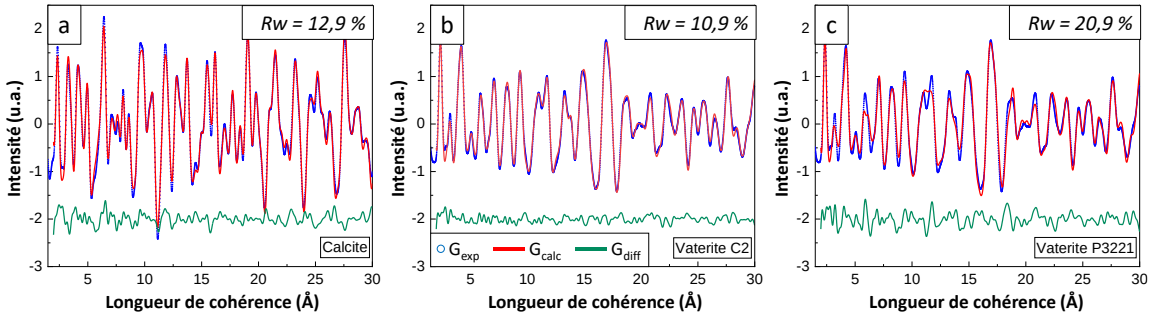


Figure AV.3 : Courbes PDF expérimentales (cercles bleus), calculées (lignes rouges) et différentielles (lignes vertes) de la calcite (a), de la vatérite monoclinique C2 (b) et de la vatérite hexagonale P3$_2$21 (c). Les facteurs d'accord respectifs R_w sont indiqués.

Les phases amorphes des *z*PyACC ne présentant pas d'organisation à longue distance à la différence des phases cristallines, un facteur d'atténuation à 9 Å a été appliqué aux $G_{calc}(r)$ de la calcite et de la vatérite (C2). Les courbes résultantes sont appelées calcite amorphe et vatérite amorphe (aCalcite et aVatérite respectivement). Même à de si faibles distances, la calcite amorphe et la vatérite amorphe ont des signatures distinctes et reconnaissables (Figure AV.4).

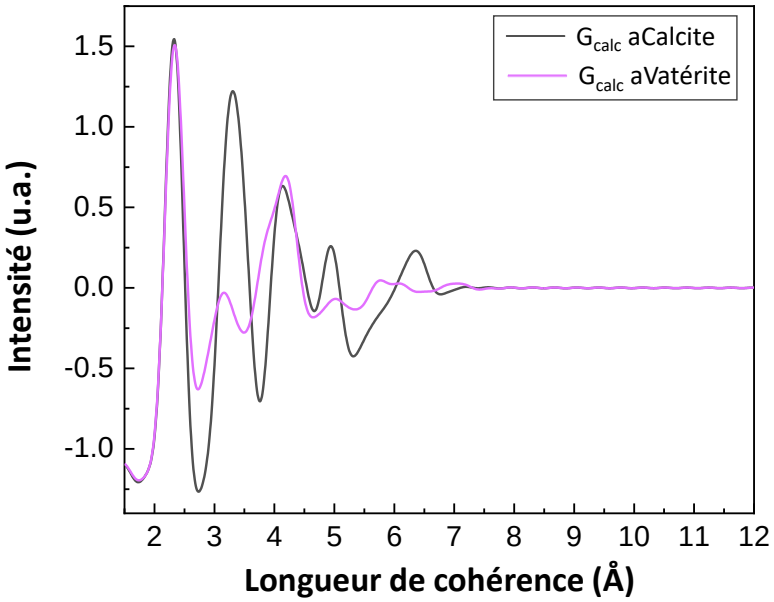


Figure AV.4 : Comparaisons des courbes PDF calculées $G_{calc}(r)$ de la calcite amorphe (aCalcite) et de la vatérite amorphe (aVatérite).

V.6 TECHNIQUES DE CARACTERISATION STRUCTURALES ET CHIMIQUES

V.6.1 Spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier

Les analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ont été réalisées en transmission sur des échantillons inclus dans des pastilles de KBr (environ 1 mg de poudre à analyser mélangé manuellement avec 300 mg de KBr, puis pressé sous 7,5 tonnes avec une presse hydraulique). Les spectres sont ensuite collectés à l'aide d'un spectrophotomètre Nicolet iS50 (ThermoElectron), de 400 à 4000 cm^{-1} (64 scans, résolution 4 cm^{-1}).

V.6.2 Spectroscopie Raman

Les analyses Raman sont réalisées avec un microscope confocal Raman Labram HR 800 Horiba Yvon Jobin, sous un rayonnement continu provenant d'un laser à diode argon de 532 nm et d'une puissance de 8 mW. Les échantillons sont observés avec un microscope Olympus BX 41 et une lentille x100, donnant une résolution spatiale de 0,7 µm et une résolution axiale (profondeur de pénétration) de 2,6 µm. Un étalon de silicium certifié est utilisé pour calibrer l'équipement en utilisant son premier ordre à 520 cm^{-1}. Les spectres sont collectés avec un réseau de 600 lignes par mm *i.e.* une résolution spectrale de 1,5 cm^{-1}, un temps d'acquisition de 60 ou 120 s selon les échantillons et 3 accumulations.

V.6.3 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire en phase solide

Dans le but d'augmenter le rapport signal sur bruit pour les analyses de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) en phase solide, des poudres de *z*PyCCA stabilisées avec 5 et 10 % de pyrophosphate ont été enrichies avec du ^{13}C (nommées par la suite 5PyACC13 et 10PyACC13

respectivement). Pour cela, un sel de bicarbonate de sodium enrichi en ^{13}C est utilisé ($Na_2{}^{13}CO_3$, Cambridge IsotopeLab, CLM-306-5, 99 %). Des tests réalisés au préalable ont montré que l'utilisation du bicarbonate (à la place de l'hydrogénocarbonate $NaHCO_3$ utilisé pour la synthèse classique) permettait bien d'obtenir un composé amorphe, avec pour seul changement dans la synthèse un ajout moindre d'hydroxyde de sodium (1 à 3 gouttes de solution à 6 M) pour ajuster le pH à 12,2 – 12,3 (le pH initial étant déjà très élevé). Le précipité a été recouvert par un parafilm pendant la filtration sous vide puis conservé après lyophilisation dans un contenant fermé hermétiquement pour limiter les échanges des carbonates enrichis en ^{13}C de la poudre précipitée avec le CO_2 de l'air, et conserver un bon rendement d'enrichissement de l'échantillon. Les poudres synthétisées ont ensuite été caractérisées par DRX et par spectroscopie FTIR (caractérisations présentées dans le Chapitre 2).

Dans le but d'étudier les environnements locaux de ^{1}H, ^{13}C et ^{31}P, des analyses par RMN à l'état solide ont été effectuées sur les échantillons enrichis en ^{13}C par Christian Bonhomme au Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris, en utilisant un spectromètre Bruker 700 MHz (16.4 T) AVANCE III, une sonde MAS Bruker et des rotors en zircone de diamètre 4 mm. L'adamantane a été utilisé comme référence secondaire pour les déplacements chimiques de ^{1}H et ^{13}C (0,00 ppm et 38,48 ppm respectivement) et H_3PO_4 (aq) à 85 % comme référence pour le ^{31}P (0,00 ppm). Des expériences SPE (*Single Pulse Excitation*) MAS et CP (*Cross-Polarization*) MAS ont été effectuées. La fréquence de rotation MAS utilisée est 14 kHz. Dans le cas des expériences SPE, la relaxation T_1 des noyaux a été prise en compte. Pour les expériences CP MAS, la condition de Hartmann-Hahn a été réglée précisément à l'aide des composés étudiés. Les spectres ^{13}C et ^{31}P ont été enregistrés en présence de découplage {^{1}H} de type Spinal-64. Les paramètres d'acquisition sont rassemblés dans le Tableau AV.11. Les modélisations des spectres ont été effectuées grâce au programme DMFit.

Tableau AV.11 : Paramètres d'acquisition utilisés pour les analyses RMN en phase solide des échantillons 5PyACC13 et 10PyACC13.

Analyse RMN	Echantillon	Nombre de scans	Délai de relaxation (s)	Durée de la mesure (h)	Line Broadening (LB) (Hz)	Temps de contact (ms)	$t_{90°}$ (µs)
^{1}H fast MAS (14 kHz)	5PyACC13 10PyACC13	8	30		10		5,7 (^{1}H)
^{13}C CP fast MAS (14 kHz) + découplage spinal-64 ^{1}H (50 kHz)	5PyACC13	5000	3	~ 4	20	10	5,2 (^{1}H)
	10PyACC13	5000	3	~ 4	20	10	5,0 (^{1}H)
^{13}C fast MAS (14 kHz) + découplage spinal-64 ^{1}H (50 kHz)	5PyACC13	448	120	~ 16	30		8,2 (^{13}C)
	10PyACC13	504	120	~ 17	30		7,5 (^{13}C)
^{31}P fast MAS (14 kHz) + découplage spinal-64 ^{1}H (50 kHz)	5PyACC13	10000	3	~ 8,5	100	3	5,2 (^{1}H)
	10PyACC13	3336	3	~ 3	100	3	5,0 (^{1}H)

V.6.4 Dosages chimiques

Les dosages détaillés ci-dessous ont permis de déterminer les quantités de matière (nombres de moles) des ions composant les échantillons. Les erreurs issues de ces dosages sont calculées à partir des incertitudes sur la préparation, la verrerie et les appareils utilisés (sauf si une autre chose est précisée).

V.6.4.1 Coulomètrie à CO_2

Le taux de carbonate des poudres PyACC non dopées et dopées a été évalué en utilisant un coulomètre (Coulometrics, USA) qui mesure dans un circuit fermé le CO_2 libéré pendant la dissolution de la poudre dans une solution acide ($HClO_4$ à 2 M). Après deux pièges de KOH à 45 % servant à s'affranchir de la contribution du CO_2 extérieur, le flux de CO_2 émis par la dissolution du carbonate est envoyé dans une cellule électrochimique contenant une anode d'argent, une cathode de platine et une solution de monoéthanolamine, avec laquelle il réagit pour former un acide titrable provoquant l'atténuation de la coloration de la solution. La cellule impose alors un courant pour ramener la solution à sa coloration d'origine, et la loi de Faraday permet par intégration de la densité de courant sur toute la durée de l'analyse de déterminer la quantité de CO_2 émise et ainsi la proportion massique de CO_3 dans la poudre analysée. Les analyses sont réalisées deux ou trois fois par échantillon, en pesant à chaque fois 100 mg de poudre. Pour certains échantillons, il n'a pas pu être fait de triplicat (ni même parfois de duplicat), en raison soit de la faible quantité de poudre disponible, soit de la trop forte consommation de l'électrode d'argent pendant l'analyse (les analyses durent 15 minutes en moyenne, et le fort taux de carbonate dans les échantillons engendre un fort courant électrique imposé et ainsi une oxydation importante de l'anode d'argent). Les résultats sont donnés en pourcentage massique de carbonate avec 1 % d'erreur (liés à l'appareil), et une moyenne par échantillon des différentes mesures est réalisée quand cela est possible.

V.6.4.2 Dosage du phosphore par spectroscopie visible

La concentration de phosphore et ainsi de pyrophosphate dans les poudres de PyACC synthétisées (dopées et non dopées) a été déterminée par spectrophotométrie visible (Shimadzu UV1800) du complexe phospho-vanado-molybdique $VO_3[P(PMo_3O_{10})_4]$ à 460 nm, qui donne une coloration jaune en milieu acide. Ce dosage colorimétrique ne dose que les phosphates sous la forme ortho (PO_4^{3-} / HPO_4^{2-} / $H_2PO_4^-$), ce qui implique d'hydrolyser les pyrophosphates pour pouvoir les doser par cette méthode. 50 mg de poudre sont dissouts par 2 mL d'acide perchlorique ($HClO_4$, 6 M) dans des fioles dont le volume est ajusté à 50 mL par de l'eau ultra-pure. Un volume (adapté à la dilution voulue) de cette solution mère est prélevé, 5 mL d'acide ($HClO_4$, 6 M) y sont ajoutés puis la nouvelle solution est placée dans un bain-marie à 90°C pendant 1 h, afin d'hydrolyser en milieu acide les ions pyrophosphates qui y sont contenus, selon l'équation (1). La présence de carbonates peut aussi donner lieu à des phosphates selon l'équation (2). Le phosphore des ions orthophosphate (PO_4^{3-}, HPO_4^{2-} et $H_2PO_4^-$) est ensuite titré en triplicat (mais à partir du même échantillon initial) par méthode colorimétrique en utilisant un mélange d'indicateurs colorés (solution équivolumique de molybdate d'ammonium à 80 g/L et de monovanadate d'ammonium à 4 g/L) et des solutions étalons de 5 à 20 ppm de phosphore sous forme orthophosphate (préparées à partir d'une solution de KH_2PO_4 à 100 ppm). On suppose que tous les ions titrés à cette étape proviennent des ions pyrophosphate hydrolysés et que l'hydrolyse est totale. Pour les poudres de 10Alg-10PyACC et 20Alg-10PyACC, afin de s'affranchir des potentielles réactions de l'alginate avec l'un des réactifs, les poudres sont préalablement calcinées une nuit à 800°C dans un four tubulaire sous circulation d'air. La concentration de phosphore (et donc de phosphate) déterminée est ramenée par proportionnalité à

une quantité pour la poudre initiale, en tenant compte de la perte de masse ayant eu lieu pendant la calcination.

$P_2O_7^{4-} + 2\ H_3O^+ \rightarrow 2\ HPO_4^{2-} + H_2O$ (eq. 1)

$2\ HPO_4^{2-} + CO_3^{2-} \rightarrow 2\ PO_4^{3-} + CO_2 + H_2O$ (eq. 2)

V.6.4.3 Dosage du calcium par complexométrie

La quantité de calcium contenue dans les poudres PyACC non dopées synthétisées a été déterminée par dosage en retour du complexe formé avec l'EDTA en milieu basique (pH environ 10) et en présence de noir Eriochrome T comme indicateur coloré. Après dissolution des poudres (100 mg dans 100 mL) en milieu acide ($HClO_4$, 6 M) et dosage de la solution d'EDTA par du zinc à 0,05 M, 5 mL d'EDTA sont ajoutés aux 20 mL prélevés des solutions mères de *z*PyCCA dissout, puis l'excès d'EDTA restant (non complexé) est dosé en milieu ammoniacal (5 mL d'ammoniaque à 20 %) par la solution de zinc. Le noir Eriochrome T permet de visualiser le virage du bleu au mauve. Le dosage est réalisé en triplicat (mais à partir du même échantillon initial).

Il est à noter que ce principe de dosage ne permet pas de discriminer divers cations divalents présents dans les poudres synthétisées et n'est donc pas adapté au dosage du calcium dans les poudres de PyACC dopées par le zinc, strontium ou cuivre.

V.6.4.4 Spectroscopie d'émission de plasma à couplage inductif

Pour les poudres de PyACC dopées, du fait de réactions parasites liées à la complexation additionnelle des cations dopants divalents avec l'EDTA, la spectroscopie d'émission de plasma à couplage inductif (ICP-OES, Spectro-Arcos) a été préférée pour le dosage du calcium (λ_{Ca} = 315 nm), du cuivre (λ_{Cu} = 224 nm), du zinc (λ_{Zn} = 202,6 nm) et du strontium (λ_{Sr} = 421 nm) dans les poudres, et réalisée par David Baqué à la plateforme d'analyses du laboratoire Ecolab. Cette technique a également été utilisée pour le dosage du sodium (λ_{Na} = 589 nm) dans les PyACC non dopés. Pour ces différents dosages, pour chaque échantillon une solution de 50 mL contenant 50,0 mg de poudre, 2,17 g (3 % mass.) d'acide nitrique à 69 % (VWR) et de l'eau ultrapure est filtrée à 0,45 µm puis analysée à l'Ecolab. 3 mesures sont effectuées par échantillon.

V.6.4.5 Spectrométrie d'absorption atomique de flamme

Pour doser le calcium et les dopants (Cu, Sr ou Zn) des filtrats issus des essais d'évolution des poudres de PyACC dopées et non dopées, la spectrométrie d'absorption atomique de flamme (SAAF) a été utilisée (iCE 3000, Thermo-Fisher) avec l'aide de David Bertrand du CIRIMAT, en utilisant une flamme d'air-acétylène pour le cuivre et le zinc et une flamme de protoxyde d'azote-acétylène pour le calcium et le strontium (éléments formant des oxydes réfractaires à plus faible température de flamme). Pour les évolutions dans l'eau, la faible quantité de poudre disponible nous a orienté vers un dosage des ions libérés dans les filtrats (plutôt que ceux restants dans les solides). Après décongélation des solutions (filtrats), 1 mL d'acide nitrique à 69 % est ajouté dans chacune pour dissoudre les précipités qui pourraient s'y être formés. Elles sont ensuite filtrées avec une seringue et un filtre à 0,45 µm afin d'éviter de boucher le fin capillaire de la buse. Ensuite, selon l'élément à doser, des dilutions sont réalisées ou non, les gammes d'étalons et paramètres de l'appareil sont ajustés (voir Tableau AV.12). Pour doser le calcium, une dilution par 50 est réalisée, en prélevant 2 mL de solution mère (*i.e.* filtrat acidifié et re filtré) versés dans une fiole de 100 mL. Pour le cuivre et le zinc, aucune dilution n'a été nécessaire, tout comme pour le dosage du strontium du 1Sr-10PyACC. Par contre pour celui du 5Sr-10PyACC, une dilution par 5 a été réalisée (2 mL de solution mère dans 10 mL total de solution).

Avant d'ajuster le volume dans les fioles avec de l'eau ultrapure, 1 % (v/v) d'acide nitrique à 69 % ainsi que des correcteurs de matrice sont ajoutés à chaque solution, à savoir 0,5 % (v/v) de solution de $La(NO_3)_3$ (SCP Science, 140-003-451) et 0,5 % (v/v) de solution de CsCl (SCP Science, 140-003-241). Le lanthane est utilisé pour complexer les ions phosphate qui peuvent sinon réagir avec les ions calcium et limiter leur absorption atomique. Le césium a un potentiel d'ionisation bas (3,87 eV) comme celui du calcium (6,11 eV), il permet de créer des électrons libres qui vont se recombiner avec les ions calcium à doser qui se sont ionisés et leur permettre de revenir à leur état fondamental, favorisant leur dosage [518]. Quand aucune dilution n'est réalisée, ces petites quantités sont ajoutées directement aux solutions mères filtrées (la dilution qu'elles induisent étant négligeable).

Nous avons voulu utiliser la même méthode pour les dosages du calcium et des cations dopants pour les poudres ayant évolué dans le SBF. Cependant, la solution SBF contient déjà du calcium en grande quantité, risquant de masquer les faibles libérations de calcium issues de la dissolution du PyACC. De plus, elle contient également une proportion très élevée de sodium (137 mM, à comparer aux 2,5 mM de calcium introduits initialement dans les solutions de SBF). Le sodium formant un oxyde réfractaire à la flamme, cette concentration élevée crée des dépôts lors de l'atomisation et empêche le bon fonctionnement des analyses. Le ratio Na/Ca dans le SBF est supérieur à 50, donc diluer les filtrats pour rester dans une gamme de concentration de sodium acceptable diluerait trop le calcium, rendant sa concentration trop basse pour une analyse quantitative fiable. Nous avons donc adapté la méthode et dosé les poudres récupérées après évolution (et non les filtrats). Pour cela, pour chaque type d'échantillon, 50,0 mg de poudre ont été pesés (provenant du même triplicat dans la mesure du possible) puis introduits dans une fiole jaugée de 100 mL et dissouts avec 2 mL de HNO_3 à 69 % et un peu d'eau ultrapure. La fiole est complétée au trait de jauge par de l'eau ultrapure, formant une solution mère Sm qui est filtrée avec une seringue et un filtre à 0,45 µm. Pour le dosage du calcium, une dilution de 200 est réalisée, en deux fois par le biais d'une solution S_1 (2 mL de Sm dans une fiole de 100 mL) puis d'une solution S_2 (5 mL de S_1, auxquels sont ajoutés 0,2 mL de HNO_3 à 69 %, 0,1 mL de $La(NO_3)_3$, 0,1 mL de CsCl et 18,6 mL d'eau ultrapure). Du fait des contraintes matérielles et temporelles il a été choisi d'évaluer l'erreur de préparation uniquement pour la dernière solution. Tous les volumes sont prélevés avec une pipette automatique. Pour le dosage des dopants (Cu, Zn et Sr), une dilution de 20 est réalisée, en prélevant 1 mL de la solution mère auquel est ajouté 0,2 mL de HNO_3 à 69 %, 0,1 mL de $La(NO_3)_3$, 0,1 mL de CsCl et 18,6 mL d'eau ultrapure. Les concentrations du cuivre étant trop faibles, il a été décidé de mesurer directement l'absorbance des solutions mères non diluées. Les valeurs des dilutions sont rappelées dans le Tableau AV.12.

Tableau AV.12 : Paramètres expérimentaux utilisés pour l'analyse par spectrométrie d'absorption atomique du calcium, du cuivre, du strontium et du zinc des filtrats après évolution dans l'eau et des poudres après évolution dans le SBF

Elément à doser	Longueur d'onde (nm)	Flamme	Hauteur de brûleur (mm)	Débit de combustible (L/min)	Gamme étalon	Ratio de dilution des filtrats (eau)	Ratio de dilution de Sm (SBF)
Calcium	422,7	N_2O-C_2H_2	11	4,5	0,5 ppm à 2 ppm (6 points)	50 (2 mL de solution mère dans 100 mL)	200
Cuivre	324,8	Air-C_2H_2	7	0,9	0,2 ppm à 6 ppm (6 points)	1	0

Strontium	460,7	N_2O-C_2H_2	7	4,3	0,4 ppm à 2,8 ppm (7 points)	1 pour 1Sr-10PyACC 5 pour 5Sr-10PyACC	20
Zinc	213,9	Air-C_2H_2	7	0,9	0,25 ppm à 1,75 ppm (7 points)	1	20

Le dosage du calcium contenu dans les échantillons co-précipités avec de l'alginate (10Alg-10PyACC et 20Alg-10PyACC) a été réalisé de la même manière que pour les échantillons ayant évolué dans le SBF. Pour que l'alginate n'influe pas sur la mesure, ils ont été au préalable calcinés pendant 6 h à 800 °C dans un four tubulaire sous flux d'air (pour favoriser l'oxydation totale du carbone des chaines polymère), comme pour le dosage du pyrophosphate (*cf.* V.6.4.2 Dosage du phosphore par spectroscopie visible). La perte de masse a été mesurée pour pouvoir calculer les quantités d'éléments après dosage par rapport à la masse initiale. Ensuite, en suivant le même protocole que précédemment pour le calcium, 50,0 mg de poudre ont été pesés puis dissouts avec 2 mL de HNO_3 à 69 % dans une fiole de 100 mL, le volume ajusté au trait de jauge par de l'eau ultrapure. Cette solution mère a été filtrée avec un filtre à 0,2 µm, puis la solution S_1 est préparée par dilution de 2 mL de Sm dans 100 mL. Enfin, la solution S_2 est préparée à partir de 5 mL de S_1 avec 0,2 mL de HNO_3 à 69 %, 0,1 mL de $La(NO_3)_3$, 0,1 mL de CsCl et 14,6 mL d'eau ultrapure.

Pour tous les dosages réalisés par absorption atomique, les erreurs correspondent aux écarts-types entre les triplicats de chaque échantillon initial.

V.6.5 Analyses thermogravimétriques et analyses thermiques différentielles

Les analyses thermogravimétriques (ATG) et thermiques différentielles (ATD) ont été réalisées sur un instrument Setaram (Setsys system), en pesant entre 15 mg et 20 mg de poudre PyACC dopée ou non ou de poudre composite, à laquelle est appliquée après un plateau initial de stabilisation en température de 30 min à 25°C, une rampe de chauffe de 25°C à 800°C à 7°C/min. L'analyse est effectuée sous flux d'air. Un blanc est ensuite soustrait au thermogramme résultant (pour s'affranchir des effets de la poussée d'Archimède). La perte d'eau est estimée en mesurant la perte de masse à la fin du plateau, vers 400 °C. Les incertitudes sur cette mesure viennent des écarts entre la perte de masse au début et à la fin de plateau (plateau non totalement horizontal).

Les ATG-ATD des scaffolds ont été réalisées sur le même instrument et en utilisant le même programme. Des coupes de scaffolds ont été découpées au scalpel (dans le sens longitudinal pour être représentative de l'ensemble de l'échantillon en cas de sédimentation) puis compressées dans le creuset, pour atteindre une masse comprise entre 10 et 15 mg. La quantité d'eau est assimilée à la perte de masse au premier palier (entre 150 et 200 °C), l'incertitude sur cette valeur provient de la différence entre la valeur au début et celle à la fin du palier.

V.7 TECHNIQUES DE CARACTERISATION DE LA MORPHOLOGIE, DE LA POROSITE ET DES PROPRIETES MECANIQUES

V.7.1 Détermination de la surface spécifique des poudres

La surface spécifique des poudres de PyACC non dopées a été déterminée par la méthode Brunauer-Emmett-Teller (BET) en utilisant l'adsorption d'azote multipoints sur un appareil Tristar II 3020. Après des tests préliminaires et la comparaison à la littérature, le dégazage a été fixé à 2 h à 50°C, dans le but d'éliminer l'eau physisorbée mais de laisser le maximum d'eau structurale. Entre 125 et 150 mg de poudre ont été pesés par analyse. La valeur de surface spécifique retenue est celle correspondant à la phase de désorption. Les incertitudes sont calculées à partir des incertitudes de la machine et de celles sur les masses pesées (balance). Ces surfaces spécifiques avaient aussi toutes été mesurées par adsorption d'azote monopoint (Monosorb, Quantachrom Instruments), donnant des résultats très proches de ceux déterminés par adsorption multipoints, avec une surface spécifique à moins de 1 % d'écart (Tableau AV.13). Nous avons donc opté pour l'adsorption monopoint pour estimer la surface spécifique des poudres de PyACC dopées et du 20Alg-10PyACC, toujours avec les mêmes paramètres de dégazage.

Tableau AV.13 : Comparaison des surfaces spécifiques mesurées par méthode BET par adsorption mono et multipoints.

Echantillon	Surface spécifique monopoint (m^2/g)	Surface spécifique multipoints (m^2/g)
10PyACC	56 ± 1 %	$56,6 \pm 0,3$
5PyACC	53 ± 1 %	$52,7 \pm 0,3$
3,5PyACC	52 ± 1 %	$47,9 \pm 0,2$
2,5PyACC	38 ± 1 %	$39,3 \pm 0,2$
1PyACC	24 ± 1 %	$24,3 \pm 0,1$
0PyACC	1 ± 1 %	$0,97 \pm 0,03$

V.7.2 Microscopie électronique à balayage

Les images des poudres synthétisées ont été acquises sur un microscope électronique FEI Quanta 450, sous une pression partielle de vapeur d'eau de 130 Pa, avec une tension d'accélération de 12,5 kV, une taille de spot de 4 et une distance de travail de 12,5 mm. Au préalable de l'observation, une pointe de spatule de poudre est déposée sur un scotch carbone double faces collé sur un plot métallique. Pour les scaffolds, les mêmes conditions d'observation ont été choisies. Des coupes longitudinales ont été réalisées au scalpel pour chaque échantillon pour observer la tranche, en plus de coupes transversales permettant d'observer la partie haute, médiane et basse du scaffold (voir Figure AV.5). Ces coupes sont ensuite fixées sur un plot par un ruban adhésif carbone double face. Pour chaque coupe, des images sont réalisées aux grossissements x20, x50, x100, x250, x500 et x1000 (quand l'image ne charge pas trop). Des images de la coupe longitudinale sont réalisées en se déplaçant sur l'axe z (sens de congélation) et avec les mêmes paramètres en grossissement x20, pour ensuite pouvoir reconstruire une image de la coupe entière (sur PowerPoint, en associant au mieux les images entre elles). Afin de réaliser des découpes plus faciles et sans écraser la porosité ou décrocher des fibres du scaffold, les découpes ont été, dans un deuxième temps, réalisées après immersion du scaffold dans de l'azote liquide. Cependant, nous nous sommes rendus compte que cette méthode produisait des défauts (surfusions locales, dissolution de la matière, trous dans les murs) pour certaines compositions, encore plus marqués pour un taux de charge plus faible ou nul. Ces défauts pourraient provenir de la présence d'une faible proportion d'eau dans l'azote liquide. Nous sommes donc revenus à des découpes classiques pour les derniers échantillons. La méthode de découpe sera précisée dans ce paragraphe.

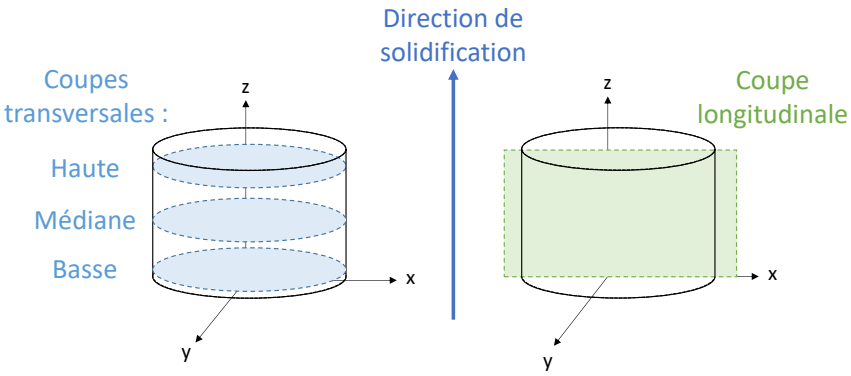


Figure AV.5 : Représentation schématique des coupes réalisées sur les scaffolds (définissant de plus les termes utilisés par la suite) pour être observées au MEB.

Les analyses d'images ont été réalisées avec le logiciel ImageJ, et la méthodologie est détaillée ci-dessous. Les incertitudes sur les mesures correspondent à des écarts-types.

Mesure des tailles de pores

Initialement, les pores devaient être mesurés sur les coupes transversales médianes, afin de ne pas être impactés par les effets de surface induits par le procédé de freeze-casting. Cependant, il s'est avéré qu'il existe dans les scaffolds une zone de porosité désorganisée avec des pores cellulaires (*cf.* Chapitre 4), dont la hauteur relative dépend de la composition des échantillons. Selon les scaffolds, la coupe médiane se trouvait ou non dans cette zone, rendant la comparaison entre les échantillons impossibles. Il a donc été choisi de travailler sur les parties hautes des scaffolds, et ceux découpés à l'azote liquide (ayant plus d'images pour ceux-là). Les largeurs et longueurs de pores ont été mesurées manuellement, pour plus de 20 pores sur plusieurs images (> 3) à différents grossissements (x20 ou x50). Au total, plus de 100 pores ont été mesurés par échantillon. Une moyenne a été réalisée par image sur les largeurs et longueurs de tous les pores, puis une moyenne globale et un écart-type entre toutes les moyennes. Nous avons essayé de modéliser la répartition des largeurs ou longueurs avec une loi normale, mais le modèle n'était pas concluant, donc cette méthode a été abandonnée. Quand c'était possible, dans le cas de pores bien définis, les longueurs et largeurs des pores ont aussi été mesurées sur la coupe médiane. C'est le cas pour le scaffold S30. Pour avoir une estimation des tailles des pores dans la partie basse du scaffold, des mesures ont été réalisées de la même manière sur la coupe transversale basse. Quand celle-ci était trop dense pour pouvoir distinguer les pores, une extrapolation a été faite (les pores étant circulaires dans cette zone) et la partie basse de la coupe longitudinale a été analysée et mesurée (entre 15 et 20 pores). Les gammes des largeurs et longueurs ont été déterminées à partir du minimum et du maximum des tailles mesurées sur l'ensemble des pores. Il n'a pas été possible de réaliser ces mesures sur le scaffold incluant le taux de charge minérale le plus élevé (S70), étant trop friable et ne tenant pas sur le scotch carbone.

Coupes longitudinales

Une fois les coupes longitudinales reconstituées, les hauteurs des différentes zones de porosité (*cf.* Figure 4.23 du Chapitre 4) ont été mesurées avec ImageJ, sur 2 coupes différentes avec 5 à 7 mesures par zone. Une moyenne et un écart-type ont ensuite été calculés.

Mesure des épaisseurs des murs

Pour les mesures de l'épaisseur des murs des scaffolds, nous avons choisi de travailler sur les coupes hautes des scaffolds (même raison que précédemment), sur les images de scaffolds. Les mesures ont été faites sur 15 – 20 murs au total, sur 2 ou 3 images par scaffold, avec un grossissement x100, en

s'assurant que la mesure était bien perpendiculaire à la paroi du mur. De la même manière que pour la mesure des pores, il n'a pas été possible de réaliser ces mesures sur le scaffold incluant le plus fort taux de charge minérale (S70).

Porosité surfacique

Nous avons essayé dans un premier temps de calculer la porosité surfacique à partir du Plugin BoneJ du logiciel ImageJ (et de l'option Area/volume fraction), mais il s'est avéré que ce calcul était trop dépendant du seuillage appliqué manuellement à l'image, seuillage pouvant varier d'une dizaine de pourcents selon les images.

Les images de microscopie électronique à balayage à canon à émission de champ (MEB-FEG) des poudres de PyACC non dopées et des scaffolds ont été réalisées au centre de Microcaractérisation Raimond Castaing à Toulouse par Stéphane Le Blond Duplouy, avec un microscope JEOL JSM 7800F Prime. Les poudres ont été collées sur du scotch carbone et métallisées au platine avant observation, et avec une tension d'accélération entre 2,0 et 10 kV. Pour cette analyse, des morceaux des parties médianes des scaffolds (selon les coupes transversales) ont été choisis, puis métallisés au platine avant observation. La tension d'accélération est de 3,0 kV ou 5,0 kV selon les échantillons.

V.7.3 Microscopie électronique à transmission

Avant observation, les poudres de PyACC non dopées, la poudre composite 20Alg-10PyACC et les scaffolds S0 à S70 ont été inclus en résine (EMbed 812, EMSDiasum, USA) puis découpées par ultramicrotomie par Vanessa Soldan du Centre de Biologie Intégrative sur la plateforme METi de l'Université Paul Sabatier et déposées sur des grilles d'observation de cuivre de 400 mesh. Un dépôt de carbone d'une dizaine de nanomètres a été effectué avant observation. Pour les poudres 5PyACC et 10PyACC, cette dernière a été réalisée au Centre de Microcaractérisation Raimond Castaing par Alessandro Pugliara sur un MET ARM (JEM-ARM200F Cold FEG), avec une tension d'accélération de 80 kV (pour ne pas dégrader les échantillons), en mode balayage (STEM), en champ clair et champ sombre avec détecteur annulaire (High Angle Annular Dark Field HAADF). Cette observation a été couplée à des analyses de composition chimique par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDS), avec entre 25 et 60 frames et une durée d'analyse entre 2min44s et 6min34s. Les autres échantillons (3,5PyACC, 2,5PyACC, 1PyACC, 0PyACC, 20Alg-10PyACC) ont subi la même préparation et ont été observés grâce à un appareil JEOL JEM 1400 avec une tension d'accélération de 120 kV.

Des coupes des parties médianes des scaffolds ont également été incluses en résine puis découpées par ultramicrotomie à la plateforme METi de la même manière que les poudres de PyACC. L'observation a été faite sur le même microscope JEOL JEM 1400, mais sans être concluante (difficile d'isoler les murs de la résine, beaucoup de matière arrachée à la découpe).

V.7.4 Mesure de densité des scaffolds

Les scaffolds ont tous été pesés. Leur diamètre (largeur) a été mesuré au pied à coulisse à trois hauteurs différentes (bas, milieu et haut), puis une moyenne a été calculée. Pour leur épaisseur (hauteur), trois mesures ont aussi été réalisées au pied à coulisse puis moyennées. La densité a ainsi pu être calculée. Cependant pour l'échantillon le plus riche en charge minérale (S70) un seul échantillon a pu être pesé et mesuré, donc l'écart-type n'a pas pu être calculé.

V.7.5 Porosimétrie mercure

Les mesures de porosité des scaffolds ont été réalisées par intrusion de mercure à l'aide d'un porosimètre AutoPore III (Micromeritics Instruments Inc., Norcross, GA), permettant la détection des pores dans une gamme de diamètre 0,003 µm – 360 µm. La distribution de taille des pores correspond à la différentielle du volume de mercure introduit en fonction de la taille des pores. La porosité totale est la multiplication de la densité apparente du scaffold par le volume total de mercure introduit par gramme d'échantillon analysé.

V.7.6 Micro-tomographie à rayons X

Les images de microtomographie à rayons X ont été obtenues sur un instrument GE/Phoenix Nanotom de la Fédération de Recherche FERMaT (Fluides, Energie, Réacteurs, Matériaux et Transferts, FR3089) à Toulouse, par Christophe Tenailleau et Benjamin Duployer. Une cible au molybdène a été utilisée, avec une tension de 30 kV et un courant de 200 – 250 µA selon les échantillons. Les échantillons sont positionnés à 35 mm de la cible de rayons X (25 mm pour S0) et à 35 mm du détecteur. 1440 images ont été produites pendant la rotation de l'échantillon, avec un pas de 750 ms par image et une moyenne de 5 images par pas de 0,25°. Les différences de contraste électronique entre les scaffolds composites 20Alg-10PyCCA/alginate et l'air étant peu marquées, un *binning* (couplage des pixels deux à deux) a été réalisé, pour améliorer la distinction entre les phases, donnant des voxels de taille 14 µm x 14 µm x 14 µm (excepté pour S0, pour lequel les voxels font 10 µm x 10 µm x 10 µm). Les échantillons analysés ont été préalablement découpés longitudinalement au scalpel en cubes d'environ 10 mm de côté, après immersion dans de l'azote liquide pour rendre la découpe plus facile (et éviter le flambage des murs). Le logiciel Datos X (Phoenix X-ray system) a été utilisé pour reconstruire l'image 3D du scaffold et VG Studio Max (Volume Graphic GmbH, Germany) pour traiter les images. Seuls les scaffolds S0, S10, S30 et S50 ont été analysés, le scaffold incluant le taux de charge minérale le plus élevé (S70) étant trop friable.

Porosité volumique

Le pourcentage de porosité volumique a été estimé sur une région d'intérêt interne au volume, de la plus grande taille possible mais en évitant la prise en compte de l'air extérieur. Le seuillage est ajusté visuellement, en cherchant à coloriser toute la porosité et l'air interne mais sans effacer les murs. L'incertitude sur cette mesure est issue des porosités maximales et minimales données par la gamme de seuillages donnant un résultat paraissant à l'œil toujours acceptable.

Taille des pores

L'analyse d'images a été effectuée avec ImageJ, sur des coupes transversales extraites numériquement tous les 100 µm. Trois zones ont été analysées : haut, milieu et bas. Pour chacune de ces zones, une analyse sur 5 images successives a été réalisée : la zone du bas, contenant les 5 premières coupes, (excepté pour le S50 pour lesquelles elles n'étaient pas exploitables, et donc commençant à la 13ème image) ; la zone médiane contenant l'image du milieu, les 2 images précédentes et les 2 suivantes ; et la zone du haut contenant les 5 dernières images. Le protocole développé par Prescillia Lagarrigue pendant sa thèse [638] a ensuite été appliqué pour extraire les diamètres de Féret des pores des images sélectionnées. Ce diamètre représente la distance maximale entre deux tangentes à la forme du pore sur des côtés opposés, parallèles entre elles et contenant toute la surface du pore. Sur ImageJ, le protocole est le suivant : fixer l'échelle de l'image, appliquer un seuillage pour faire ressortir les murs sur un fond noir, appliquer la fonction *skeletonize* (du menu Process/binary) pour tracer de manière binaire la porosité, inverser le seuillage (pour faire ressortir les murs en blanc), appliquer la fonction *watershed* (du menu Process/binary) pour fermer la porosité, puis *analyze particles* en ayant coché

Feret's diameter dans les paramètres de mesure (et *exclude edges*). Pour affiner le comptage, une limite basse et haute a été fixée lors de cette dernière étape, à partir des longueurs-largeurs minimales et maximales des pores par zone, extraites des analyses MEB. Enfin, les mesures numériques des diamètres de Féret ont été copiées sur Origin, puis une analyse automatique a été réalisée pour l'ensemble des 5 images de chacune des zones de chaque scaffold, afin d'extraire les valeurs suivantes : nombre total de pores analysés, moyenne arithmétique des diamètres de Féret et minima et maxima de ces diamètres.

Modélisation par loi normale

Pour cela, pour chacune des zones (basse, médiane et haute) les diamètres de Féret des 5 images successives sont regroupés par intervalles de 0,01 µm, puis les fréquences relatives pour chaque intervalle sont tracées sous forme d'histogramme. Une loi LogNormale est appliquée à ce tracé, selon l'équation suivante : $y = y_0 + \frac{A}{\sqrt{2\pi}wx} e^{\frac{-\left[ln\frac{x}{x_C}\right]^2}{2w^2}}$, en fixant l'ordonnée à l'origine y_0 = 0. Le diamètre moyen correspond à l'espérance de la fonction, et est égal à la valeur *mu* donnée en sortie de la modélisation. La largeur de la distribution (écart-type) correspond à *sigma*. L'indice de polydispersité PDI peut être calculé avec la formule suivante : $PDI = \left(\frac{\sigma}{mu}\right)^2$.

V.7.7 Essais de compression uniaxiale

Des essais de compression ont été réalisés sur des scaffolds cylindriques d'environ 2 cm de diamètre et 1 cm de haut, en utilisant un machine d'essais mécaniques MTS Criterion Model 42 équipée d'une cellule de force de 2 kN. La vitesse de déplacement en charge et décharge est fixée à 0,085 mm/s, ce qui correspond à une vitesse de déformation d'environ 10^{-2} s^{-1}. 10 points sont acquis par seconde. Afin de s'affranchir des irrégularités et de la non planéité de la surface, une précontrainte de compression de 1 N a été appliquée aux scaffolds avant de débuter l'essai, assurant un contact correct sur les 2 faces de l'échantillon pour compenser les défauts morphologiques indiqués ci-dessus. L'essai est stoppé lorsque la force de compression atteint 10 N. Les échantillons sont centrés sur la platine, avec la partie supérieure (à l'opposé du contact avec le doigt froid pendant la congélation) vers le haut, et 4 échantillons sont testés par type de scaffolds (3 pour S50). La hauteur des scaffolds est mesurée de nouveau 7 jours après les essais de compression pour estimer leur taux de récupération (égal à la hauteur après 7 jours divisée par la hauteur initiale, en pourcentage).

La loi de Hooke reliant contrainte σ et déformation ε dans le domaine élastique est la suivante : $\sigma = E\varepsilon$, avec E module d'Young ou d'élasticité. Le déplacement de la traverse de la machine de compression permet de mesurer la hauteur de l'échantillon avec une précision de 10 µm. Un zéro est fait en mettant en contact les deux plateaux. La hauteur initiale du scaffold en début d'essai est prise après la pré-charge de mise en contact quand la force repasse à zéro. Comme $d\varepsilon = \frac{dl}{l}$, si l_0 est la hauteur du scaffold en début d'essai, l_f est la hauteur au maximum de la compression, en intégrant sur toute la durée de l'essai on a :

$$\varepsilon = \int_0^{t_f} d\varepsilon = \int_{l_0}^{l_f} \frac{dl}{l} = ln\frac{l_f}{l_0}.$$

En considérant la section de l'échantillon constante pendant l'essai, $\sigma = \frac{F}{S_0}$. L'approximation des petites déformations est souvent faite quand celles-ci sont inférieures à 10 %, et la loi de Hooke s'écrit alors $\sigma = E.\frac{l_f}{l_0}$. Mais dans notre cas, au vu de la faible résistance mécanique des scaffolds entraînant des déformations importantes, cette approximation n'est pas valide. Les courbes contrainte-

déformation sont donc tracées avec en abscisse $ln\frac{l_f}{l_0}$, appelé déformation, et en ordonnée la contrainte $\sigma = \frac{F}{S_0}$. Pour faciliter la lecture du document, nous avons choisi de représenter la valeur absolue des toutes les contraintes et déformations (qui sont négatives car de compression). D'après la loi de Hooke, $E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F}{S_0 \ln(\frac{l_f}{l_0})}$, cette valeur est donc extraite de la pente du domaine élastique, comme illustré sur la Figure AV.6 ; il s'agit du module de compression, tenant compte du module d'Young intrinsèque aux murs composites ainsi que de la contribution de la structure poreuse ayant une rigidité conférée par son architecture. Cette valeur est normalement prise sur la décharge, mais choisie ici sur la charge car plus reproductible et issue d'une structure avec des pores intacts). Il faut noter que les valeurs des contraintes et donc de E sont surestimées, car la surface S_0 n'est pas constante pendant toute la durée de l'essai : un « diabolo » a été observé, diminuant la surface sur laquelle la force est appliquée. Mais comme les valeurs extraites ici (module de compression, limite d'élasticité) sont calculées à partir du début de déformation des scaffolds, on peut supposer que la diminution de la surface à ce moment-là est négligeable, et donc de même pour la surestimation des valeurs.

En pratique, une régression linéaire de la pente initiale est effectuée avec le logiciel Origin, et son coefficient directeur E est assimilé au module de compression. Cette modélisation est très bonne et donne un coefficient de corrélation R^2 entre 0,995 et 0,998 pour les scaffolds S10 à S50 et entre 0,961 et 0,995 pour S0. La fin du domaine élastique est modélisée de la manière suivante pour toutes les courbes où la contrainte est croissante dans ce domaine : la limite d'élasticité ε_p correspond à l'intersection de la pente du domaine élastique et de la tangente du domaine plastique dans les 10 premiers pourcents de déformation (Figure AV.6). Pour les quatre courbes dont la contrainte ne croit pas de manière monotone dans la zone II (existence d'un plateau ou d'une diminution de la contrainte), la courbe déformation-contrainte présente un minimum sur le plateau et ε_p est défini à l'intersection de la tangente horizontale en ce point et de la tangente au domaine élastique. Cette modélisation est plus difficile à réaliser, le domaine n'étant pas toujours clairement marqué. Cela explique les coefficients de corrélations plus bas, compris dans la gamme 0,745 - 0,995. Ces calculs sont effectués sur chacun des réplicats des différents scaffolds. Les résultats globaux sont tracés dans en Annexe AIV. Mais pour faciliter leur analyse, des moyennes sont calculées sur l'ensemble des données, ainsi que les écarts-types correspondants, et tracées dans le chapitre 4. La densité, en abscisse des courbes présentant les résultats, est calculée comme indiqué plus haut et les écarts-types proviennent des écarts de densité entre l'ensemble des échantillons mesurés par type de scaffold.

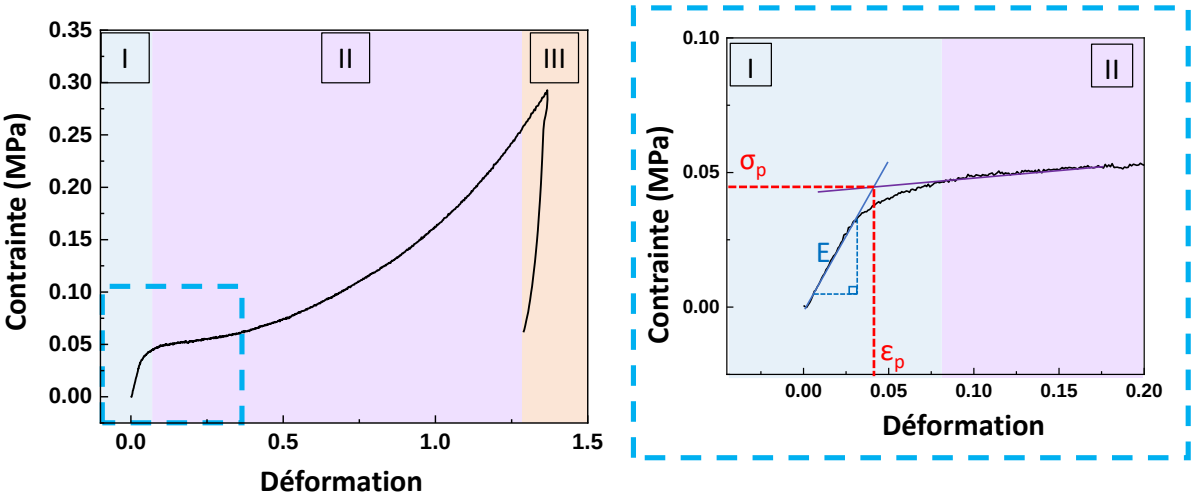


Figure AV.6 : Exemple d'une courbe contrainte-déformation, avec identification des domaines d'élasticité (zone I), de déformation visco-plastique (zone II) ou la décharge (zone III) (gauche). Un agrandissement est réalisé dans le carré bleu (gauche) et montre la méthode utilisée pour déterminer le module de compression E (pente de la tangente initiale) et les limites de déformation ε_p et de contrainte σ_p plastiques (point d'intersection des tangentes aux domaines élastiques et plastiques).

V.8 ESSAIS CELLULAIRES

Les essais cellulaires ont été réalisés à l'Institut de Chimie Physiologique du Centre Universitaire Médical de l'Université Johannes Gutenberg de Mainz (Allemagne), par Shunfeng Wang pour ceux de cytocompatibilité et par moi-même lors d'un séjour de 6 semaines financé par l'EUR NanoX (dans le cadre du *"Programme des Investissements d'Avenir"*) pour ceux relatifs à l'évaluation des capacités de biominéralisation des poudres synthétisées.

Les essais de cytocompatibilité et d'évaluation de la capacité de biominéralisation ont été effectués sur les poudres 5PyACC, 10PyACC, 10Alg-10PyACC (uniquement cytocompatibilité), 20Alg-10PyACC, 1Cu-10PyACC, 5Cu-10PyACC, 1Sr-10PyACC, 5Sr-10PyACC, 1Zn-10PyACC, 5Zn-10PyACC. Les protocoles sont décrits dans le Chapitre 3 : IV, et plusieurs réactifs commerciaux ont été utilisés. Le réactif PrestoBlue (ThermoFisher Scientific A13261) permet de quantifier la viabilité cellulaire, il est composé d'une solution de réazurine réduite en résofurine après avoir pénétré dans une cellule vivante, de dernier composé étant fortement fluorescent et dosé à 590 nm. Le cocktail d'activation de minéralisation (CAM) ajouté aux suspensions de cellules dans les tests de biominéralisation est composé de 10 µL/mL de dexaméthasone à 10 µM (Sigma, D2915), 10 µL/mL d'acide ascorbique à 20 mM (Sigma, A5960) et de 10 µL/mL de β-glycerophosphate à 1 M (Sigma, G9422). Pour quantifier l'activité de la PAL, le dosage du contenu total en protéines est effectué par le biais du réactif de Bradford (Sigma, B6916) avec des étalons préparés avec une albumine de sérum bovin (ASB) commerciale (Bio-Rad, USA, 500-0206), et le dosage du p-nitrophenol (pNP) via un kit ALP Assay (abcam, ab83369), et des étalons de p-nitrophényl phosphate (pNPP, Aldrich, 24.132-6, 99+%). Les erreurs correspondent à des écarts-types entre réplicats pour le même échantillon.

RESUME

Plus de 2,2 millions de greffes osseuses sont réalisées à travers le monde par an, et une augmentation de plus de 5 % du marché des substituts osseux est prévue de 2019 à 2026 en raison du vieillissement de la population, accroissant les besoins de réparation osseuse. Pour éviter les écueils pouvant être associés à l'autogreffe, les substituts synthétiques sont considérablement développés et étudiés depuis une quarantaine d'années, tels que les céramiques de phosphates de calcium (CaP), érigées comme biomatériau synthétique idéal de par leur composition similaire à celle du minéral osseux. Parmi les autres familles de matériaux minéraux utilisés pour le comblement et la reconstruction en site osseux, celle des carbonates de calcium (CC) complète celle des CaP : ils sont biocompatibles, et pour la majorité plus solubles et donc résorbés plus rapidement une fois implantés, entraînant la libération d'ions Ca^{2+} et CO_3^{2-} constitutifs de l'os. En particulier, les carbonates de calcium amorphes (ACC) présentent, par leur structure désordonnée et leur teneur en eau, une grande réactivité en milieu aqueux. Cette famille est constituée de plusieurs phases dont la composition et l'organisation à petite échelle diffèrent selon les conditions de synthèse. Leur métastabilité nécessite de les stabiliser vis-à-vis de la cristallisation lors de la synthèse, majoritairement par le biais d'additifs, dont les phosphates. Ces derniers sont des inhibiteurs efficaces de la cristallisation notamment de la calcite et plusieurs types de phosphates ont été utilisés avec succès (monomères ou chaînes condensées). L'utilisation du dimère pyrophosphate est cependant très peu documentée. Or, outre son rôle d'inhibiteur de la cristallisation, il peut conférer des propriétés biologiques additionnelles liées à son hydrolyse *in vivo* par des enzymes comme la phosphatase alcaline, libérant ainsi des ions orthophosphates constitutifs de l'apatite osseuse.

Dans ce travail de thèse, des ACC stabilisés par différents taux de pyrophosphate (PyACC) ont été synthétisés, et l'impact du ratio de pyrophosphate/carbonate sur la structure et la composition des poudres de PyACC a été étudié, mettant en évidence l'obtention d'une phase totalement amorphe au-delà d'un certain ratio. Celle-ci a été caractérisée à différentes échelles entre autres par SAXS, WAXS-PDF et RMN du solide et présente une organisation à courte distance similaire à celle de la vatérite (proto-vatérite). Un modèle expérimental multi-échelle de la structure des PyACC et des hypothèses sur les mécanismes de stabilisation par le pyrophosphate ont alors été proposés. La poudre de PyACC a ensuite été dopée avec trois ions bioactifs (le strontium, le cuivre et le zinc), montrant une intégration quantitative des dopants. L'étude de leur évolution in vitro dans deux milieux aqueux a mis en évidence des libérations de calcium et d'ions dopants continues sur quatre semaines avec une libération plus élevée aux temps courts (« burst effect »), n'étant pas néfaste aux cellules puisque nous montrons que les différentes poudres synthétisées sont cytocompatibles. En outre, les PyACC dopés au zinc semblent présenter *in vitro* un potentiel ostéogénique marqué. Enfin, des scaffolds macroporeux composites alginate-PyACC ont été élaborés avec succès par freeze-casting, avec des pores interconnectés et orientés de taille et de volume adaptés à la colonisation cellulaire et l'angiogenèse. Le taux de charges minérales ajoutées en suspension et la réticulation de l'alginate par le calcium qui est libéré influe sur la taille des pores, qui diminue lorsque ces paramètres augmentent, à l'opposé des propriétés mécaniques. Celles-ci sont suffisantes pour permettre une manipulation aisée lors de la chirurgie. L'ensemble de ces travaux ouvre la voie au développement de nouveaux substituts macroporeux élaborés à partir de poudres bioactives de PyACC dopés, aux propriétés biologiques modulables pour des applications en substitution osseuse.

ABSTRACT

More than 2.2 million bone grafts are performed worldwide each year, and an increase of more than 5% in the bone substitute market is expected from 2019 to 2026 due to the aging of the population, increasing the number of pathologies or trauma requiring bone repair. To avoid the pitfalls potentially associated to autografts, synthetic substitutes have been considerably developed and studied over the past forty years. Particularly, calcium phosphate (CaP) ceramics are established as the ideal synthetic biomaterial due to their composition similar to that of bone mineral. Among the other families of mineral materials used for bone filling and reconstruction, the calcium carbonates (CC) one is complementary to CaP: they are biocompatible, and for most of them more soluble and therefore resorbed more quickly once implanted, releasing the bone constituents Ca^{2+} and CO_3^{2-} ions. In particular, amorphous calcium carbonates (ACC) exhibit a high reactivity in aqueous media by their disordered structure and water content. This family comprises several phases whose composition and small-scale organization differ according to the synthesis parameters. Their metastability requires stabilizing them against crystallization during synthesis, mainly through additives, including phosphates. The latter are effective inhibitors of crystallization, especially of calcite, and several types of phosphates have been used successfully (monomers or condensed chains). However, the use of the pyrophosphate dimer is poorly documented. Yet, in addition to its crystallization inhibitor role, it can confer additional biological properties due to its *in vivo* hydrolysis by enzymes such as alkaline phosphatase (ALP), thus releasing orthophosphate ions that are the building bricks of bone apatite.

In this work, various pyrophosphate-stabilized (PyACC) were synthesized, and the impact of the pyrophosphate/carbonate ratio on the structure and composition of PyACC powders was studied, highlighting the obtaining of a totally amorphous phase beyond a certain ratio. This phase was characterized at different scales by SAXS, WAXS-PDF and solid-state NMR and exhibited a short-range organization similar to that of vaterite (called proto-vaterite). A multi-scale experimental model of the structure of PyACC and hypotheses on the mechanisms of pyrophosphate-stabilization were then proposed. The PyACC powder was doped with three bioactive ions (strontium, copper and zinc), showing a quantitative integration of the dopants. The study of their in vitro evolution in two aqueous media revealed continuous releases of calcium and doping ions over four weeks, with a higher release at short times ("burst effect"), but without being harmful to the cells since we showed that the various synthesized powders were cytocompatible. In addition, zinc-doped PyACC appeared to exhibit an *in vitro* marked osteogenic potential. Finally, alginate-PyACC composite macroporous scaffolds had been successfully elaborated by freeze-casting, with interconnected and oriented pores whose size and volume were suitable for cell colonization and angiogenesis. The rate of mineral fillers added in suspension and the crosslinking of the alginate by the released calcium influenced the size of the pores, which decreased when these parameters increased, contrary to the mechanical properties. These properties were sufficient to allow easy manipulation by the surgeon. This work paves the way for the development of new macroporous substitutes elaborated from bioactive powders of doped PyACC, with tunable biological properties for bone substitution applications.