



HAL
open science

Recherche des modifications de caractéristiques dans des biomatériaux en verre bioactif par des méthodes nucléaires et physico-chimiques. Combinaison de la cartographie PIXE et de l'histopathologie. Essai de modélisation par la théorie de la percolation de la résorption de biomateriaux

Yves Barbotteau

► **To cite this version:**

Yves Barbotteau. Recherche des modifications de caractéristiques dans des biomatériaux en verre bioactif par des méthodes nucléaires et physico-chimiques. Combinaison de la cartographie PIXE et de l'histopathologie. Essai de modélisation par la théorie de la percolation de la résorption de biomateriaux. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2002. Français. NNT: . tel-00001730

HAL Id: tel-00001730

<https://theses.hal.science/tel-00001730>

Submitted on 20 Sep 2002

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Recherche des modifications de caractéristiques
dans des biomatériaux en verre bioactif par des
méthodes nucléaires et physico-chimiques.
Combinaison de la cartographie PIXE et de
l'histopathologie. Essai de modélisation par la
théorie de la percolation de la résorption de
biomatériaux.

Yves BARBOTTEAU

Commission d'examen :

Président : M. Bernard Michel
Rapporteurs : M. Paul Ducheyne
M. Philippe Moretto
Examineurs : M. Charles Baquey
M. Jean-François Mathiot
Directeur de thèse : M. Jean-Léon Irigaray

*A mes parents
A mes frères
A ma famille*

*A Aurélie
A mes amis
Et à tous ceux qui m'ont soutenu.*

"La terre ne nous appartient pas, ce sont nos enfants qui nous la prêtent."

Proverbe indien.

Remerciements

Je remercie Monsieur B. Michel, Directeur de Recherches au CNRS et Directeur du Laboratoire de Physique Corpusculaire, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et de me faire l'honneur de présider le jury de thèse.

Monsieur le Professeur Emérite J.L. Irigaray, responsable de l'équipe de Physique Appliquée aux Biomatériaux est à l'origine de ce travail. Il a assuré la direction de mes recherches avec constance et rigueur. Qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude pour ses remarques toujours pertinentes et également pour ses qualités humaines.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Professeur Ph. Moretto, responsable de l'équipe microsonde au Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan, pour avoir accepté d'être rapporteur de ce mémoire et surtout pour son accueil, sa patience et sa disponibilité tout au long de ces trois années. Je remercie également l'équipe microsonde au complet pour sa sympathie.

Je suis honoré que Monsieur le Professeur P. Ducheyne, Professeur à l'Université de Pennsylvanie (USA) et post-président de l'american Society For Biomaterials, ait accepté d'être rapporteur de mes travaux. Je le remercie pour sa participation effective à ce jury.

Je remercie Monsieur J.F. Mathiot, Directeur de Recherches au CNRS, pour sa participation au jury et pour les conversations fructueuses et enthousiastes que nous avons eues sur la partie modélisation.

Je suis honoré que Monsieur Ch. Baquey, Directeur de Recherches à l'INSERM et vice-président de l'European Society for Biomaterials, ait accepté de participer à ce jury. Qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance.

Je remercie Monsieur E. Jallot, bientôt professeur dans l'équipe, pour sa collaboration et sa disponibilité tout au long de ce travail. Je lui souhaite beaucoup de succès dans ses nouvelles responsabilités. Je tiens à féliciter Mademoiselle E. Chassot pour sa réussite au concours de Maître de Conférence et je souhaite bonne chance à Monsieur G. Guibert dans cette belle (et parfois angoissante) aventure qu'est la préparation d'une thèse.

Je suis très reconnaissant envers Monsieur le Professeur S. Terver du CHRU de Clermont-Ferrand et Monsieur le Professeur G. Vanneville pour leur participation, leurs conseils avisés et leur disponibilité malgré leur charge de chirurgien.

Je remercie Monsieur J.P. Gallien, ainsi que tous les membres de l'équipe microsonde du Laboratoire Pierre Süe (CEA Saclay) pour leur aide précieuse lors de mes analyses sur le site de Saclay.

Je remercie Madame R. Eloy et Monsieur A. Alves de l'entreprise BIOMATECH, à Chasse-sur-Rhône, pour la réalisation des coupes et pour tout le travail effectué en histologie.

Madame V. Coxam et Monsieur P. Lebecque de L'INRA de Theix, Madame Veschambre du Laboratoire des Magmas et des Volcans de Clermont-Ferrand, Monsieur Labarre de l'INSERM ainsi que Madame A.M. Gélinaud de CASIMIR à Clermont-Ferrand, sont remerciés pour l'aide qu'ils m'ont apportée lors de la préparation des échantillons.

Je remercie Monsieur Carl Castanier qui m'a permis d'utiliser de nombreuses fois son matériel informatique. Je lui souhaite beaucoup de réussite pour la fin de sa thèse : j'ai pris beaucoup de plaisir à déjeuner presque chaque midi avec Carl et son directeur de thèse Monsieur le Professeur P. Force.

Enfin, je tiens à remercier tous les membres du Laboratoire de Physique Corpusculaire, notamment le personnel du secrétariat pour sa gentillesse et son efficacité.

Table des matières

Introduction	7
I Biomatériaux en site osseux	9
1 Implants métalliques	11
1.1 Considérations générales	11
1.2 Phénomènes d'usure	12
1.3 Alliages de titane comme biomatériaux	13
2 Revêtements non-métalliques	15
2.1 Vaporisation par torche à plasma	15
2.2 Hydroxyapatites (HA)	16
2.3 Verres bioactifs	16
2.3.1 Processus d'interaction entre l'os et le bioverre	16
2.3.2 Facteurs de composition influençant la liaison	17
II Méthodes expérimentales	19
3 Description des implants et du protocole d'échantillonnage	21
3.1 Fabrication et composition des verres bioactifs BVA et BVH	21
3.2 Description des implants de l'étude	22
3.3 Protocole d'échantillonnage	23
3.3.1 Temps d'implantation	23
3.3.2 Site d'implantation et opérations chirurgicales	23
3.3.3 Préparation des échantillons	24
3.3.4 Techniques de mesure et d'analyse	25
4 Méthodes d'analyse par faisceau d'électrons	27
4.1 Microscopie électronique - Généralités	27
4.2 Microscope électronique à balayage	28
4.2.1 Image par réflexion - Electrons rétrodiffusés	28
4.2.2 Caractéristiques du microscope	29
4.3 Microscopie électronique en transmission	29
4.3.1 Formation du contraste	29
4.3.2 Contraste de diffusion et de diffraction	30
4.4 Microscope électronique à balayage en transmission	31
4.4.1 EDXS couplé au STEM : fluorescence X	31
4.4.2 Caractéristiques du microscope	35

4.5	Dégâts d'irradiation	35
4.5.1	Effets produits par interaction élastique électron-matière.	35
4.5.2	Migration des ions alcalins dans les verres irradiés par des électrons	36
5	Méthodes d'analyse par faisceau d'ions	37
5.1	Pouvoir d'arrêt	37
5.2	Méthode PIXE	38
5.2.1	Principe de la méthode : fluorescence X	39
5.2.2	Spectromètre de dispersion d'énergie de photons X	45
5.2.3	Analyse quantitative	46
5.2.4	Calcul des concentrations avec le logiciel GUPIX	48
5.3	Technique RBS	51
5.3.1	Principe de la méthode	51
5.3.2	Code de simulation RUMP	52
5.3.3	Résonance dans les sections efficaces de diffusion élastique	54
5.4	Réactions nucléaires : la méthode PIGE	55
5.4.1	Considérations énergétiques	55
5.4.2	Aspects analytiques	56
5.5	Dispositif expérimental	56
5.5.1	Microsonde nucléaire du CENBG	56
5.5.2	Microsonde nucléaire du LPS	58
5.6	Dégâts d'irradiation.	59
5.6.1	Mécanismes des dommages	59
5.6.2	Elévation de température	60
5.6.3	Pertes d'éléments	61
III	Résultats expérimentaux et interprétation	63
6	Caractérisation des revêtements au cours du temps	65
6.1	Observation de l'ostéointégration des revêtements par SEM et par histomorphométrie	65
6.1.1	Préparation des échantillons	65
6.1.2	Verre BVA	65
6.1.3	Verre BVH	69
6.1.4	Mesure quantitative de l'ostéointégration des implants	73
6.1.5	Conclusion sur ces analyses	74
6.2	Caractérisation des revêtements par TEM/STEM et EDXS	74
6.2.1	Préparation des échantillons	74
6.2.2	Méthode analytique	74
6.2.3	Dissolution sélective et bioactivité : A9 et BVA	75
6.2.4	Bioinertie : le verre BVH	81
6.2.5	Conclusion sur ces analyses	85
6.3	Caractérisation des revêtements par PIXE et RBS	86
6.3.1	Caractéristiques du faisceau	86
6.3.2	Verre BVA	86
6.3.3	Verre BVH	89
6.3.4	Conclusion sur ces analyses	90

7	Etude de l'os néoformé remplaçant les revêtements	93
7.1	Composition de l'os inclus en résine	93
7.2	Evolution de la qualité de l'os néoformé au cours du temps	94
7.2.1	Tenue de l'os sous faisceau - monitoring élémentaire	94
7.2.2	Résultats	97
7.3	Répartition radiale des éléments Zn, Sr et F dans l'os néoformé	98
7.3.1	Caractéristiques du faisceau	98
7.3.2	Tenue d'un tissu osseux sous un faisceau fixe	98
7.3.3	Résultats	99
7.4	Action des verres BVA et BVH contre la corrosion	100
7.4.1	Éléments contaminant l'os	100
7.4.2	Evolution de la contamination de l'os dans les prothèses non recouvertes	100
7.4.3	Evolution de la contamination de l'os dans les prothèses recouvertes de verre BVA ou BVH	101
7.4.4	Répartition radiale du titane dans l'os	102
7.5	Conclusion sur ces analyses	102
8	Combinaison de la cartographie PIXE et de l'histopathologie	105
8.1	Etudes préliminaires	105
8.1.1	Préparation des échantillons	105
8.1.2	Conditions expérimentales	106
8.1.3	Résultats	106
8.2	Perspectives d'amélioration de la technique	110
IV	Essai de modélisation par la théorie de la percolation de la ré-	113
	sorption de biomatériaux	
9	Caractéristiques des biomatériaux intervenant dans le modèle et présen-	115
	tation de la théorie de la percolation	
9.1	Caractéristiques des biomatériaux	115
9.1.1	Corail	115
9.1.2	Hydroxyapatite synthétique	116
9.1.3	Caractéristiques communes	116
9.2	Principe de la théorie de la percolation	117
9.2.1	Introduction	117
9.2.2	Principe	118
9.2.3	Formalisme : les quatre modèles de base	118
9.2.4	Amas et seuil de percolation	121
10	Essai de modélisation	123
10.1	Modèle à deux dimensions (2D)	123
10.1.1	Représentation des implants en 2D - Caractéristiques du réseau	123
10.1.2	Vascularisation de l'implant	123
10.1.3	Résorption et remodelage osseux	124
10.1.4	Effet de la porosité de l'implant	127
10.1.5	Confrontation des simulations aux résultats expérimentaux	128
10.2	Modèle à trois dimensions (3D)	131
10.2.1	Le modèle	131
10.2.2	Effet de la porosité de l'implant	131

10.2.3	Confrontation des simulations aux résultats expérimentaux	134
10.2.4	Simulation de la concentration en fer	138
10.2.5	Effet de la variation de la taille du réseau sur les temps caractéristiques t_p et τ	141
10.3	Conclusion	148
	Conclusion générale	151
	Annexe : Traitement des spectres X	155
A.1	Suppression du fond continu	155
A.2	Modélisation du spectre filtré	156
	Bibliographie	158

Introduction

Beaucoup de thérapeutiques chirurgicales font appel à des biomatériaux¹ ; on peut citer, par exemple, le traitement chirurgical des traumatismes, des problèmes cardiovasculaires, ophtalmologiques, urologiques ou articulaires du vieillissement, des tumeurs, des maladies dégénératives, etc. . .

Le marché mondial des biomatériaux est important et en pleine croissance. La commission européenne a évalué récemment ce marché mondial à 25 milliards d'euros avec un taux annuel de croissance de 5 à 7 % [1]. Un tiers de ce marché mondial reviendrait à l'Europe. Pour le marché américain uniquement, le taux annuel de croissance serait de 20 %. La part orthopédique des biomatériaux est évaluée au niveau mondial à 8 milliards d'euros avec un taux annuel de croissance de 7 %. Ce marché concerne pour 40 % les prothèses de hanche et de genou avec au niveau mondial respectivement 750 000 et 500 000 opérations par an.

La demande croissante est portée par le vieillissement de la population, les perfectionnements des prothèses existantes, et la réticence chez l'homme des pays développés à accepter la douleur et le handicap.

Les biomatériaux implantés posent le problème de leur devenir dans l'organisme : biotolérance, biofonctionnalité. Pour mieux assurer une matériau-vigilance et obtenir des biomatériaux qui assurent un service amélioré, en termes de qualité, des recherches fondamentales et appliquées sont indispensables. En effet, pour les seules prothèses de hanche, soit environ 80 000 interventions par an en France, 12 % de ces prothèses devront être reprises par une seconde opération. Parmi les 9 600 personnes concernées, 3 % subissent un échec [2]. Cet exemple place bien les biomatériaux dans une échelle économique et humaine.

Le CNRS et l'INSERM ont mené une réflexion et ont proposé des directions de recherches [2]. Dans le cas des biomatériaux pour chirurgie orthopédique, les trois grands domaines de recherches soutenus sont :

- la biomécanique cellulaire ;
- les études interface os/biomatériau *in vitro* et *in vivo* ;
- le développement de matériaux nouveaux.

Ces axes de recherches sont complémentaires et, par nécessité, multidisciplinaires.

L'équipe de physique nucléaire appliquée aux biomatériaux du Laboratoire de Physique Corpusculaire de Clermont-Ferrand réalise depuis une douzaine d'années des études sur les biomatériaux à usage orthopédique, tels que le corail, les céramiques de phosphates de calcium (hydroxyapatite pure, dopée, hybride : hydroxyapatite/phosphate tricalcique), et les verres bioactifs. L'équipe est spécialisée dans l'analyse des biomatériaux avec des techniques issues de la physique nucléaire tel que le marquage radioactif, l'activation neutronique, la fluorescence X induite par faisceau de protons ou encore les réactions nucléaires. La sensibilité, la sélectivité, la spécificité et la complémentarité de ces méthodes en font des outils précieux d'analyse.

¹la Conférence de Chester de la Société Européenne des Biomatériaux, dite conférence du consensus a, en 1986, retenu la définition suivante des biomatériaux : *matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques.*

Pour la réalisation de ces travaux, l'équipe a constitué un réseau de partenaires avec des industriels pour la fabrication des biomatériaux, avec des chirurgiens et des biologistes pour la partie implantation/prélèvement et interprétation, et des physiciens auprès des accélérateurs de particules utilisés pour les irradiations. L'équipe a collaboré avec des chercheurs de plusieurs pays européens dans le cadre d'un contrat financé par la commission européenne (contrat No BMH4-CT96-0013).

Ce contrat avait pour but de mettre en place un protocole d'étude des biomatériaux pour établir une nouvelle norme européenne. L'élaboration de ce protocole était basée sur l'étude d'un revêtement en verre bioactif référencé A9 sur une prothèse en alliage de titane. Le sujet de cette thèse est en partie un achèvement du travail entamé au sein de ce contrat mais aussi une contribution à l'amélioration des techniques antérieures.

Dans notre travail, nous avons essentiellement étudié les verres bioactifs référencés BVA et BVH utilisés en tant que revêtement de prothèse en alliage métallique et nous avons proposé de nouvelles méthodologies d'analyse et un modèle de simulation basé sur des phénomènes probabilistes.

La présentation est constituée par :

- une première partie introductive esquissant brièvement des notions générales sur les biomatériaux en site osseux, nécessaires à notre étude ;
- une deuxième partie où nous présenterons les méthodes expérimentales ;
- une troisième partie dédiée aux résultats expérimentaux et à leur interprétation. Dans cette partie, nous caractériserons les revêtements au cours du temps, nous étudierons la qualité de l'os nouvellement formé, nous analyserons la participation des revêtements contre la corrosion de la prothèse métallique et enfin nous présenterons une nouvelle méthode pour l'étude des biomatériaux, basée sur la combinaison de la cartographie PIXE et de l'histopathologie.
- une dernière partie est consacrée à l'essai de la modélisation par la théorie de la percolation de la résorption de biomatériaux. Nous avons appliqué ce modèle de simulation d'abord aux biomatériaux poreux pour lesquels l'équipe possédait des données quantitatives suite à leur utilisation en comblement. Ce travail est préliminaire et il autorisera ensuite son extension à d'autres types de matériaux tels que les verres bioactifs lorsque des données suffisantes seront disponibles.

En conclusion, nous formulerons des perspectives pour développer de nouveaux biomatériaux par l'amélioration des procédés de conception et des méthodologies d'analyse.

Première partie

Biomatériaux en site osseux

Chapitre 1

Implants métalliques

1.1 Considérations générales

L'utilisation d'implants métalliques est devenue courante. C'est à partir des années 1930, avec le perfectionnement de la technologie, que certains métaux sont utilisés dans le domaine médical. Pour qu'une implantation à long terme soit un succès thérapeutique, il est nécessaire que l'implant soit biocompatible¹, résistant mécaniquement, résistant à la corrosion, résistant à la charge et aux fractures [3]. En considérant les qualités requises pour les applications médicales, ce sont les prothèses en acier inoxydable, en alliage de cobalt, en titane pur ou alliage de titane qui sont les plus utilisées [4].

Les métaux en contact avec les fluides biologiques sont soumis à la corrosion, ce qui peut engendrer différentes réactions tissulaires [5], référencées suivant une classification :

- **viabilité** : formation d'un tissu conjonctif² vascularisé et d'un épithélium³ (zircone, titane, tantale, platine) ;
- **encapsulation** : formation d'un tissu viable, dense et non vascularisé, qui évoque l'encapsulation de l'implant par un tissu fibreux (argent, or, molybdène, aluminium, fer) ;
- **toxicité** : réaction inflammatoire importante et dommage cellulaire (vanadium, cuivre, nickel, cobalt).

L'état de la surface de ces implants est un des paramètres les plus importants dans ce contexte. On désigne par surface les couches atomiques externes, comprises entre 0.2 et 1 nm. Dans cette région, aussi bien les propriétés physiques que les propriétés chimiques peuvent être considérablement différentes de celles du matériau original. La plupart des métaux s'oxydent quand ils sont exposés à un milieu contenant de l'oxygène. Le processus d'oxydation est extrêmement rapide (moins d'une milliseconde suffit à oxyder les premières couches atomiques de la surface du métal). Ainsi, les propriétés de surface seront déterminées par l'oxyde et non par le métal lui-même [6].

Les couches de passivation sont minces, denses et formées de couches homogènes d'oxyde qui ralentissent la corrosion du métal. Les métaux utilisés comme biomatériaux peuvent tous être passivés. Cependant, un métal passivé peut subir une corrosion très localisée, notamment au niveau des défauts de la couche de passivation. On définit le temps de repassivation, comme étant le temps nécessaire à reformer la couche de passivation en-

¹capacité d'un matériau à remplir une fonction médicale, avec une réponse appropriée pour l'hôte.

²tissu servant de soutien aux autres tissus du corps assurant leur nutrition et participant aux mécanismes de défense immunitaire de l'organisme.

³ensemble de cellules (tissu) recouvrant la surface et les cavités internes de l'organisme.

dommagée. Ce temps permet de prévoir et de caractériser le comportement d'un matériau métallique face à la corrosion. La repassivation du titane et de ses alliages est plus rapide que celle des aciers inoxydables ou des alliages en Co-Cr.

A l'interface implant/tissu, on rencontre les réactions suivantes :

physico-chimiques :

- oxydation du métal : diffusion d'atomes de métal vers le milieu biologique / diffusion oxygène vers le métal ;
- formation d'hydroxyde dans la couche d'oxyde : diffusion d'oxygène et d'hydrogène ;
- dissolution de la couche d'oxyde du métal (corrosion) ;
- diffusion de minéraux (ions ou atomes) vers la couche d'oxyde du métal provenant du milieu biologique (Ca, P, ...).

moléculaires :

- adsorption de molécules ;
- désorption (remplacement) de molécules ;
- fragmentation ou modification de molécules.

Ces réactions sont probablement déterminées par la concentration de défauts dans la surface oxydée. La corrosion de la surface [7] est le processus qui influence le plus la biocompatibilité et le fonctionnement à long terme d'un implant. En effet, le processus de corrosion entraîne le relargage d'ions métalliques dans les tissus environnants puis, par transport via le système vasculaire, dans d'autres organes : une forte concentration de titane a été détectée dans le foie et dans les poumons (organes filtres) [8].

1.2 Phénomènes d'usure

Depuis que les matériaux métalliques sont communément utilisés sous forme passivée, il n'a pas été observé de corrosion globale des implants. Par contre, après un dommage local de la couche de passivation, il arrive que la repassivation ne se fasse pas [9]. On observe alors, une corrosion localisée sous forme de pics de corrosion, de fissure, de corrosion sélective ou bien inter-granulaire[10].

Certains facteurs semblent accélérer la corrosion :

- l'endommagement mécanique de la couche de passivation ;
- l'hétérogénéité ou la pollution de l'alliage.

D'autres types de dommages issus de la corrosion résultent de l'effet simultané de l'attaque des fluides biologiques et des contraintes mécaniques. Ainsi la formation de fissures de corrosion sous contrainte est obtenue seulement si les conditions suivantes sont remplies : un agent spécifique présent et une charge de tension mécanique appliquée au matériau. Ensuite, la formation et la propagation de fissures risquent d'endommager la totalité de l'implant. Des phénomènes de corrosion sous fatigue dans le cas de forces mécaniques alternatives peuvent induire la formation de fissures.

Les phénomènes de contrainte (stress) et de fatigue sont très importants, car ils peuvent conduire à l'échec thérapeutique total. Dans les alliages de titane, la présence d'aluminium dans des proportions supérieures à 6 % en masse rend l'alliage particulièrement fragile au stress. La présence de vanadium réduit cette sensibilité.

Dans le cas de remplacement total d'articulation, il est avantageux, en fonction des différentes contraintes mécaniques présentes, d'utiliser un implant modulaire. Mais cette modularité entraîne des usures supplémentaires dues aux frottements entre les différents modules.

L'usure de ces métaux est considérée avec de plus en plus d'importance dans le domaine des matériaux à usage orthopédique. En effet, des particules de métal sont engendrées par l'usure de l'implant et conduisent parfois à un échec thérapeutique notamment par ostéolyse⁴ ou par descellement de la prothèse [11]. Bischoff *et al.* ont analysé l'usure générée *in vitro* par le frottement entre un os cortical et différentes surfaces métalliques (alliage Co-Cr et alliage de Ti). Pour des surfaces polies, les alliages de titane s'usent plus rapidement que les alliages en Co-Cr (ratio de 200 : 1). Grâce à un procédé de traitement de surface appelé le grenailage⁵, on améliore la résistance à la fatigue et à la corrosion; mais on augmente en même temps la rugosité de l'implant, ce qui augmente l'usure de l'os [12].

Shahgaldi *et al.* [13] ont utilisé une microsonde électronique afin d'analyser la composition élémentaire des débris d'usure qui avaient migré dans les tissus mous entourant des prothèses de genou et de hanche qui s'étaient descellées. Les implants étaient soit en alliage cobalt-chrome-molybdène, soit en alliage de titane-aluminium-vanadium. L'examen histologique montrait une réaction inflammatoire autour des particules (présence de cellules géantes). L'analyse élémentaire a montré que la composition chimique des particules était différente de l'implant initial : le cobalt et le titane étaient en quantité moindre et souvent quasiment nulle, alors que le chrome et l'aluminium persistaient. Ces débris d'usure jouent un rôle trop souvent sous-estimé dans les échecs thérapeutiques par ostéolyse [14].

1.3 Alliages de titane comme biomatériaux

Bien que les aciers inoxydables et les alliages Co-Cr soient encore utilisés comme biomatériaux, nous nous intéresserons, dans ce travail, seulement aux alliages de titane qui sont employés dans le domaine médical dans les applications suivantes :

- les implants dentaires ;
- le remplacement total d'articulation ;
- les lésions osseuses.

L'alliage de titane le plus largement utilisé est le Ti6Al4V. Il est forgé à 1050°C environ, en atmosphère oxydante et recuit à 700/730°C. C'est un alliage à structure biphasé $\alpha - \beta$, α étant une phase hexagonale et β une phase cubique. Elles apparaissent quand le titane pur est chauffé, mélangé à des éléments comme Al et V, et refroidi. L'aluminium joue le rôle de stabilisateur de la phase α , ce qui permet d'augmenter la force tout en diminuant le poids de l'alliage. Quant au vanadium, il stabilise la phase β . Ainsi, les deux phases peuvent coexister. La composition du Ti6Al4V, selon la norme NF S 90-405, est donnée dans le tableau 1.1.

Le titane présente une très bonne résistance à la corrosion et une biocompatibilité supérieure à celle des autres métaux. Ces deux propriétés sont liées à la présence d'un film d'oxyde de titane (TiO_2), relativement stable en milieu biologique [15]. L'épaisseur de cette couche de passivation est de 3-5 nm. Quant à l'alliage, il présente des avantages mécaniques tel qu'un module de Young se rapprochant le plus de celui d'un tissu osseux et d'une faible densité. Ceci permet une prothèse plus légère et une distribution de la contrainte plus égale à l'interface critique os/implant, puisque l'os et l'implant fléchiront de la même façon [3].

⁴destruction du tissu osseux visible sur une radio.

⁵le grenailage consiste à projeter sur la surface métallique des particules adéquates toujours sphériques, provoquant des déformations à la surface. Ces modifications produisent des contraintes superficielles de compression qui s'opposent aux efforts que la surface subit.

Aluminium	5.50 à 6.75 %
Vanadium	3.50 à 4.50 %
Fer	0.3 % max.
Oxygène	0.2 % max.
Carbone	0.08 % max.
Azote	0.05 % max.
Hydrogène	0.015 %
Titane	soit x %

TAB. 1.1 – Composition du Ti6Al4V selon la norme NF S 90-405

Il est possible d'améliorer les performances du Ti6Al4V grâce à des techniques de traitement de surface. Les plus courantes sont :

- le traitement thermique et le vieillissement de la surface ;
- l'implantation ionique et la passivation à l'acide nitrique ;
- le sablage ;
- l'utilisation d'un revêtement non-métallique.

Nous allons nous intéresser particulièrement à l'utilisation des revêtements. On notera toutefois que le sablage de la surface d'un implant en alliage de titane a un effet très significatif sur l'apposition de l'os sur l'implant et donc améliore l'ancrage de celui-ci [16]. Il s'agit d'augmenter la rugosité de la surface de la prothèse. Ainsi, en favorisant une fixation mécanique, on réduit les micro-mouvements possibles qui sont responsables de l'usure de l'implant.

Chapitre 2

Revêtements non-métalliques

La mise en place d'un revêtement peut schématiquement conduire à trois types d'interfaces entre l'os et le matériau :

- Les matériaux biotolérants sont séparés de l'os environnant par une couche fibreuse ;
- Les matériaux bioinertes sont au contact direct du tissu osseux sans établir de liaison chimique ;
- Les matériaux bioactifs établissent par des processus physico-chimiques une continuité avec le tissu osseux.

Les revêtements de prothèse métallique, avec une couche de quelques dizaines de micromètres de biomatériaux, permettent d'isoler l'implant de l'environnement corrosif pendant un certain temps après l'opération, de conférer la biocompatibilité de la couche à la prothèse, tout en gardant les propriétés mécaniques de l'alliage.

2.1 Vaporisation par torche à plasma

Le développement de revêtements ostéoconducteurs¹, fabriqués à partir de matériaux inorganiques bioactifs, a été facilité grâce à la méthode de vaporisation par torche à plasma.

Le principe de cette technique consiste à créer un plasma en injectant un flux de gaz (mélange de gaz inertes tel que Ar ou He et de gaz diatomiques tel que H_2 ou N_2) dans une chambre où il est ionisé par un arc électrique. On produit un plasma à haute température (10 000 à 30 000 K). Puis, les matériaux à vaporiser sont introduits sous forme de poudre dans le jet de plasma. La poudre chauffée est fortement accélérée (vitesse pouvant atteindre 100 à 350 m/s) vers le substrat (dans notre cas : l'alliage de titane) sur lequel les particules du matériau perdent leur énergie cinétique et thermique, constituant ainsi la couche de revêtement. Le passage très rapide des grains dans le plasma, entraînant leur fusion en surface, permet de produire une très forte liaison avec le substrat lors de l'impact.

Cette technique de dépôt est bien établie industriellement. Elle est utilisée pour une production massive de couches et présente plusieurs avantages pour les implants à usages médicaux [17] :

- rugosité superficielle élevée ;
- conservation de la stabilité thermique du substrat ;
- possibilité d'une structure de dépôt final lamellaire.

Mais, elle présente aussi des limites :

¹matériau capable d'engendrer la formation du tissu osseux lorsqu'il est mis au contact d'un os.

- adhérence moyenne alliage/revêtement ;
- modification de la composition chimique du revêtement due à l'évaporation de certains composants volatiles ;
- non uniformité morphologique et cristalline du dépôt ;
- pas de contrôle sur l'interconnection des pores.

2.2 Hydroxyapatites (HA)

Plusieurs méthodes ont été mises en place afin de produire un revêtement en HA pure, fin et adhérent, la vaporisation par torche à plasma étant la méthode la plus utilisée.

L'hydroxyapatite synthétique² est biocompatible et possède un profil biologique attractif. Sa structure chimique et cristalline est la même que la phase majoritaire de la partie minérale de l'os. Il est actuellement bien établi que l'HA est un matériau sûr, non-toxique et stable [18].

L'application d'un revêtement d'HA sur des implants métalliques a fourni l'opportunité de réaliser une fixation stable de la prothèse, sans la présence d'une couche de tissus fibreux [11]. Le choix de l'épaisseur d'un tel revêtement est le compromis entre plusieurs facteurs : plus la couche est fine, meilleures sont les propriétés mécaniques, mais, dans les premiers mois de bioactivité, une épaisseur de 10 à 15 μm à la surface de l'HA peut se dissoudre. De plus, un revêtement d'une épaisseur de plus de 100-150 μm risque de souffrir de rupture par fatigue. Un compromis consiste à utiliser un revêtement d'une épaisseur d'environ 50 μm [19].

Cook *et al.* [20] ont analysé les effets de macro-textures à la surface d'implants dentaires recouverts d'HA. L'addition de macro-textures (filetage, rayure) ne semble pas avoir d'effet sur la résistance à l'extraction axiale par rapport à des contrôles.

Hayashi *et al.* [21] ont comparé différentes rugosités (micro-texture de surface) d'implant de Ti6Al4V recouvert d'HA. Il n'a pas été relevé de différence significative sur la résistance au cisaillement entre les différents implants étudiés. Par contre, Wong *et al.* [22] ont analysé les effets de la rugosité de la surface de ces implants sur la résistance à l'extraction axiale. Une excellente corrélation a été trouvée entre la rugosité de l'implant et la résistance à l'extraction axiale. La qualité de l'ancrage d'une prothèse recouverte est proportionnelle à la rugosité moyenne du revêtement.

2.3 Verres bioactifs

Les verres bioactifs ont la propriété de se lier à l'os vivant. La condition essentielle pour la création de ce lien est la formation *in vivo* d'une couche d'apatite à la surface du matériau. L'os naturel a une structure micro-composite dans laquelle s'assemblent des petites particules d'apatite renforcées par des fibres de collagène³. La dissolution des ions calcium et silicium des verres ou céramiques de verre joue un rôle important dans la formation de cette couche d'apatite [23].

2.3.1 Processus d'interaction entre l'os et le bioverre

L'os adhère aux verres bioactifs grâce à la création d'un lien chimique [24]. La surface des verres bioactifs sert de support à la repousse osseuse [25]. La structure du verre doit

²formule chimique : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

³protéine la plus abondante du corps, responsable de la cohésion des tissus.

être vue comme un réseau 3D de SiO_2 modifié par l'incorporation d'autres oxydes comme Na_2O , CaO , P_2O_5 , Al_2O_3 . Après immersion du verre bioactif dans une solution aqueuse contenant du calcium et du phosphore, trois principales réactions ont lieu [26] :

- dissolution (décomposition du réseau de silicium) ;
- lessivage (relargage de certains éléments) ;
- précipitation (une couche riche en Ca-P est formée à la surface, qui se lie fermement à l'os).

La résistance à la fracture d'un lien fixé bioactivement est inversement proportionnelle à l'épaisseur de la zone liée. A long terme, le lessivage du verre bioactif conduit à fragiliser la fixation.

Les verres bioactifs sont biocompatibles, non toxiques, n'engendrent pas de réactions inflammatoires et sont ostéoconducteurs. Les verres bioactifs en contact avec une solution sanguine sont le siège d'une série de transformations physico-chimiques consistant en une séquence d'étapes complexes [27] :

- échange rapide d'ions Na^+ et K^+ du verre avec les ions H_3O^+ de la solution ;
- migration du Si soluble vers la solution, due à la rupture des liens $Si - O - Si$ et formation de groupes $Si - OH$ et $Si - (OH)_4$ à l'interface ;
- condensation et repolymérisation des groupes Si, avec la formation d'une couche riche en SiO_2 sous forme d'un hydrogel ;
- migration des ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} à travers la couche de gel vitreux ;
- formation d'une couche riche en $CaO - P_2O_5$ sur le gel vitreux ;
- croissance du gel vitreux par échange d'ions alcalins ;
- croissance du film amorphe riche en $CaO - P_2O_5$ par incorporation des phosphates de calcium solubles dans la solution ;
- cristallisation du film amorphe riche en $CaO - P_2O_5$ par incorporation d'anions OH^- , CO_3^{2-} ou F^- de la solution, conduisant à la formation d'une couche mélangée d'hydroxyapatite, d'apatite carbonatée et de fluoroapatite ;
- agglomération et formation d'un lien chimique entre les cristaux d'apatite, les fibres de collagène et autres protéines produites par les ostéoblastes⁴ et les fibroblastes⁵.

Durant ces étapes, le verre subit une dégradation par hydrolyse : les éléments du verre interagissent avec les mêmes éléments naturellement présents dans l'os à travers un phénomène de migration réciproque pour stimuler la croissance d'une apatite autologue.

Ducheyne *et al.* [28] ont montré que le verre bioactif représente un matériau qui combine de manière optimale les conditions idéales pour la synthèse de tissu osseux *in vitro*.

2.3.2 Facteurs de composition influençant la liaison

D'après Hench [29], pour être bioactif, un verre doit :

- contenir moins de 60 % molaire de SiO_2 afin d'éviter la formation de capsules fibreuses non adhérentes. Augmenter la quantité de SiO_2 réduit le taux d'échanges d'ions, ce qui ralentit la cinétique de formation de la couche riche en phosphate de calcium, allant jusqu'à empêcher sa formation ;
- contenir une quantité élevée de Na_2O et CaO : ceux-ci permettent un échange rapide de cations à l'interface et une repolymérisation rapide du Si à la surface ;
- avoir une proportion élevée de CaO/P_2O_5 , afin d'obtenir par super-saturation, sur le gel vitreux, un film riche en phosphate de calcium.

⁴cellules qui synthétisent la matrice osseuse.

⁵cellules du tissu conjonctif qui ont la capacité de synthétiser entre autres du collagène.

Une substitution partielle ou totale du K par le Na n'affaiblit pas la formation du lien os/verre bioactif. Ceci suggère que le rôle de ces deux éléments dans la formation du lien est très similaire. Par contre, la substitution du Mg par le Ca diminue la formation du lien, ce qui est dû à la sensibilité de l'ostéogenèse⁶ au rapport CaO/MgO et au fait que le magnésium joue un rôle très important lors des premières phases de la croissance osseuse.

La limite de bioactivité approximative pour le système $Na_2O - CaO - SiO_2$ (avec une quantité de 6 % en masse de P_2O_5) est déterminée dans le triangle de Hench [30] (figure 2.1). Plus on se rapproche d'un sommet, plus le pourcentage massique de l'oxyde indiqué au sommet augmente.

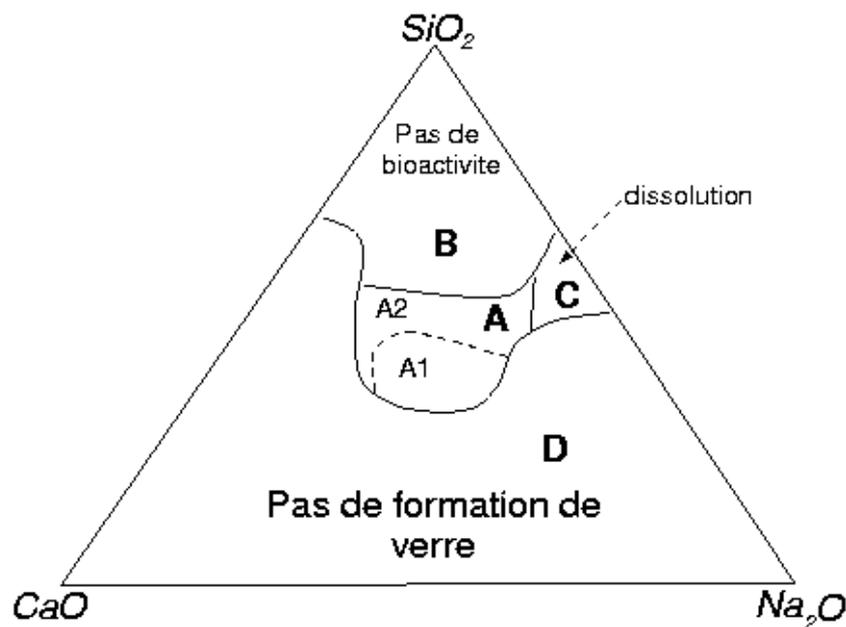


FIG. 2.1 – Triangle de Hench - Limite de bioactivité pour le système $Na_2O - CaO - SiO_2$ (avec 6 % en masse de P_2O_5)

La région **A** correspond aux verres bioactifs et se compose de deux classes : A1 (matériaux ostéoinducteurs⁷) et A2 (matériaux ostéoconducteurs). La région **B** est celle des verres inertes (plus de 60 % de SiO_2 , pas de lien avec l'os, réactivité trop basse). La région **C** correspond à des verres dont la réactivité est trop forte, pas de lien avec l'os : ce sont les verres biorésorbables. Enfin, les compositions de la région **D** ne permettent pas la formation de verre.

⁶ constitution et développement du tissu osseux.

⁷ matériau capable d'engendrer la formation de tissu osseux dans un site extra-osseux.

Deuxième partie

Méthodes expérimentales

Chapitre 3

Description des implants et du protocole d'échantillonnage

Nous présentons, ici, les implants étudiés dans le cadre de ce travail, ainsi que le protocole d'échantillonnage. Il s'agit de prothèses en alliage de titane recouvertes de verre bioactif : BVA et BVH. Elles sont fabriquées par une firme italienne [31].

3.1 Fabrication et composition des verres bioactifs BVA et BVH

Le procédé de fabrication d'un verre bioactif est le même que pour un verre classique. Une fois la composition du verre choisie, le mélange vitrifiable est placé à l'intérieur d'un four, dans un creuset constitué d'un matériau réfractaire (Pt). Dans le but d'homogénéiser cette masse fondue, une étape d'affinage est nécessaire. Durant cette phase, la propriété critique est la viscosité du liquide fondu. Les bulles tendent à atteindre la surface du verre et rencontrent une résistance proportionnelle à la viscosité. Une augmentation de la température pouvant atteindre 1500°C diminue cette viscosité. Ensuite, le verre homogène est refroidi dans des conditions contrôlées jusqu'à ce qu'il atteigne la température ambiante ; puis il est réduit en poudre. Cependant, un tel processus est pleinement efficace lorsqu'on prépare une grande quantité de matériau. Or, dans le cas de notre étude, le matériau servant de revêtement est préparé en petite quantité (de l'ordre du kg). Il persiste un certain degré d'hétérogénéité [32].

Dans le tableau 3.1 nous indiquons la composition en oxyde des deux bioverres BVA et BVH, ainsi que la composition de A9. Ce verre bioactif ayant été déjà étudié par notre équipe [33], il servira, lorsque cela sera utile, de comparaison. Les compositions sont données par le fabricant.

Les matériaux bruts du mélange initial sont sous forme d'oxydes. Mais lors de la fabrication du verre, ces différents éléments se retrouvent sous forme de silicate. Il est d'usage de ramener la composition d'un verre à des pourcentages d'oxyde.

	BVA	A9	BVH
SiO_2	47 %	50 %	71 %
Na_2O	19 %	20 %	14 %
CaO	20 %	16 %	9 %
P_2O_5	7 %	6 %	–
K_2O	5 %	5 %	1 %
Al_2O_3	1 %	2 %	2 %
MgO	1 %	1 %	3 %

TAB. 3.1 – Composition massique des verres bioactifs utilisés

3.2 Description des implants de l'étude

Nous disposons pour cette étude de cylindres en alliage Ti6Al4V, sablés. Les prothèses peuvent être :

- sans revêtement ;
- revêtues avec le verre BVA ;
- revêtues avec le verre BVH.

Les cylindres ont une longueur de 18 mm et un diamètre de 4 mm. Le revêtement est effectué par vaporisation par torche à plasma.

Les caractéristiques du revêtement telles que son épaisseur ou sa rugosité ont été mesurées dans le cadre du contrat européen BMH4-CT96-0013 [32]. Il est indiqué, dans le rapport final de ce contrat, que le dépôt de verre bioactif ne forme pas une couche compacte continue avec la technique de vaporisation de torche à plasma. On observe des craquelures et des particules globulaires (cf. figure 3.1). Il est inhomogène dans sa composition. Le dépôt augmente la rugosité de surface de l'implant (cf. tableau 3.2). La rugosité de surface est

cylindre	avec revêtement	sans revêtement
R_a (en μm)	08.61	0.76
R_{max} (en μm)	63.80	8.70

TAB. 3.2 – Rugosité de surface des implants – R_a est la rugosité moyenne, R_{max} est la rugosité maximale.

mesurée au moyen d'un profilomètre. R_a est définie comme la moyenne arithmétique de toutes les distances absolues du profil de rugosité mesurées à partir de la ligne médiane du profil. R_{max} est la distance absolue maximale mesurée à partir de la ligne médiane du profil de rugosité.

L'épaisseur du dépôt varie entre 30 et 100 μm .

Ces caractéristiques (épaisseur et rugosité du revêtement) sont favorables à l'amélioration de la biocompatibilité, de l'ostéointégration¹ et de l'ancrage des implants. De cette manière, on obtient la coexistence de deux types de fixation : mécanique et bioactive (grâce à la bioactivité des verres).

Cook *et al.* [34] ont montré que les craquelures, fissures, d'un revêtement d'HA sur des implants métalliques ne diminuent pas les caractéristiques mécaniques des prothèses.

¹contact direct du tissu osseux avec l'implant, sans interposition de tissu conjonctif.

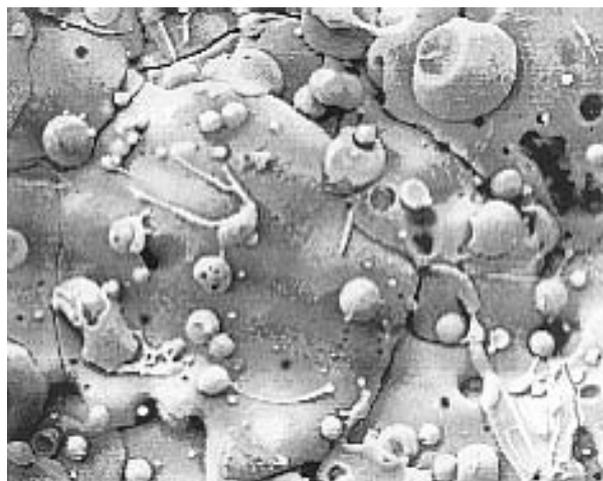


FIG. 3.1 – Cliché obtenu par SEM, de la surface d'un revêtement en A9 (grossissement X 1000)

Lors de la vaporisation par torche à plasma, on constate une volatilisation du phosphore, du potassium et du sodium en proportions respectives moyennes de 14 %, 18 % et 16 % [33].

3.3 Protocole d'échantillonnage

3.3.1 Temps d'implantation

Dans le cadre du contrat européen, 3 temps d'implantation avaient été fixés : 3, 6 et 12 mois. Pour chacune de ces durées, 9 brebis adultes, de la même provenance (Pré-Alpes du Sud), sont opérées. Pour chaque brebis, 6 cylindres Ti6Al4V sont implantés : 3 recouverts d'un verre bioactif (BVA, BVH ou A9) et 3 non recouverts ; ces derniers servant d'implants témoins. Ainsi, pour chaque temps d'implantation et pour chaque type de verre, nous disposons de 18 échantillons. Il est nécessaire de faire des coupes des échantillons pour permettre leur analyse. A raison d'une coupe par échantillon, l'analyse porte sur 18 coupes par temps. Pour le verre bioactif A9, deux autres temps d'implantation (2 et 9 mois), avaient été rajoutés par notre équipe [33]. Les implantations sont réalisées dans les mêmes conditions que citées précédemment.

3.3.2 Site d'implantation et opérations chirurgicales

Les implantations des cylindres revêtus de verre bioactif sont réalisées en site spongieux dans les épiphyses² des fémurs de la brebis au niveau des genoux. Les témoins sont implantés dans le genou opposé. La figure 3.2 représente la localisation de l'implantation des cylindres, il est reproduit à partir d'une radiographie des genoux de l'animal.

Le choix du site d'implantation est motivé par la plus grande activité biologique présente au niveau de l'os spongieux (ou trabéculaire) que dans l'os compact (ou cortical). L'os spongieux est constitué de trabécules osseux en forme de plaques organisées en un réseau tridimensionnel. La surface de l'os en contact avec la moelle osseuse est considérable,

²extrémité d'un os long, contenant la moelle rouge (renouvellement cellulaire sanguin), constituée d'os compact en surface et d'os spongieux à l'intérieur.

permettant une mobilisation rapide du calcium. De plus, les espaces entre les trabécules (espace médullaire dit aussi lacune osseuse) sont un des lieux principaux de production de cellules circulantes impliquées dans la réaction inflammatoire et dans la réaction à un corps étranger [35].

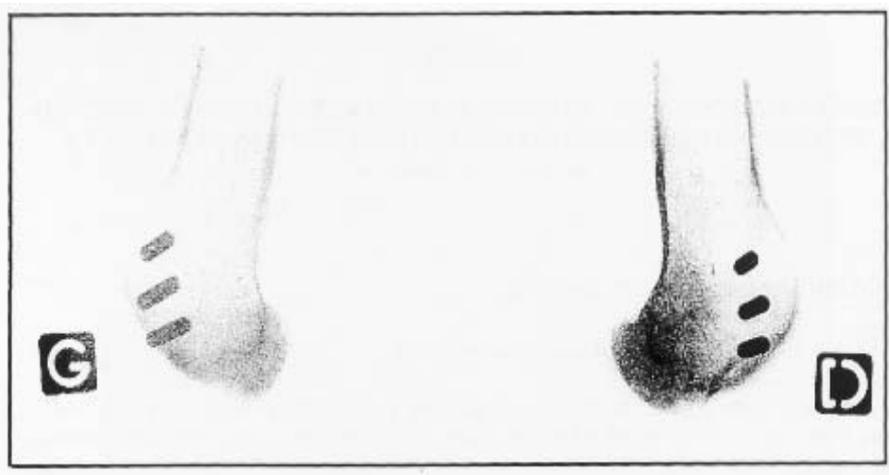


FIG. 3.2 – Radiographie montrant l'emplacement des implants dans l'os.

Tous les animaux sont anesthésiés selon le même protocole. Les membres postérieurs sont préparés selon les règles de chirurgie aseptique. Les épiphyses fémorales distales sont abordées par voie latérale.

Des trous de 4 mm de diamètre sont forés sous constante irrigation à l'aide d'un moteur à vitesse contrôlée. Les échantillons sont insérés par pression manuelle. Après implantation, le champ opératoire est refermé plan par plan au fil résorbable.

Les animaux sont laissés libres de toute contention dès leur réveil. Un traitement prophylactique anti-infectieux est administré après l'intervention.

3.3.3 Préparation des échantillons

Avant sacrifice, un marquage à la tétracycline est effectué afin de permettre la visualisation de la néoapposition osseuse en histologie. Au temps d'implantation déterminé par le protocole, les animaux sont sacrifiés par injection d'une dose létale de barbituriques. Après sacrifice, les épiphyses fémorales implantées sont prélevées. Les sites d'implantation contenant les cylindres sont réséqués à la scie à ruban classique, identifiés puis fixés dans le formol tamponné à 10 %. Ils sont déshydratés dans des bains successifs d'alcool de concentrations croissantes, puis inclus dans le polyméthylmétacrylate (PMMA) sans décalcification préalable. Les blocs obtenus pour chaque cylindre implanté sont réduits à la scie à ruban diamanté (la scie à ruban classique induit des fractures au niveau de l'interface verre – titane [33]) afin qu'ils s'adaptent aux divers porte-échantillons des dispositifs d'analyse. Pour chaque cylindre, une coupe transversale par rapport à l'axe de l'implant est réalisée sur système Exakt, selon une technique de micro-section avec une scie à ruban diamanté. Ces coupes sont collées sur une lame de plexiglas. Le ponçage et le polissage sont réalisés sur système Exakt selon une technique de micro-ponçage de manière équivalente pour l'ensemble des coupes.

L'épaisseur finale des coupes est d'environ 400 μm . Nous disposons de 9 coupes par durée d'implantation et par type de revêtement.

3.3.4 Techniques de mesure et d'analyse

La complexité inhérente à l'étude des biomatériaux nécessite l'emploi de plusieurs techniques d'analyse complémentaires :

- la microscopie électronique à balayage : SEM³ ;
- la microscopie électronique à balayage en transmission (STEM/TEM⁴) couplé à la spectroscopie de rayonnement X (EDXS⁵) ;
- la méthode PIXE (Particle Induced X-ray Emission) ;
- la méthode RBS (Rutherford Back Scattering) ;
- la méthode PIGE (Particle Induced Gamma-ray Emission).

Le microscope électronique à balayage (SEM) va nous servir à repérer les échantillons et à effectuer une première analyse qualitative du comportement des revêtements au cours du temps. La microscopie électronique à balayage en transmission (STEM/TEM) couplé avec la spectroscopie X (EDXS) nous permettra de déterminer la composition des revêtements au cours du temps et grâce à la haute résolution de ce microscope, nous pourrions observer la formation de structure particulière lors du processus de bioactivité.

Les méthodes PIXE, RBS et PIGE seront utilisées en simultanés. La PIXE⁶ identifie et, lorsque cela sera possible, quantifie les éléments traces à la fois dans les revêtements et dans l'os (qualité de l'os néoformé, présence de métal provenant de la corrosion de la prothèse.). La PIGE vérifie la présence de fluor⁷ dans l'os. Enfin, le RBS détermine la composition de la matrice organique (carbone, oxygène) et la quantité de charge reçue par l'échantillon lors de l'irradiation.

Toutes ces méthodes sont basées sur les interactions particules-matière. Avant de présenter les résultats, nous allons rappeler les spécificités et le principe de fonctionnement de ces techniques. Nous avons choisi de regrouper ces méthodes d'analyse en fonction de la particule incidente utilisée : électron ou ion.

³Scanning Electronic Microscopy.

⁴Scanning Transmission Electronic Microscopy/Transmission Electronic Microscopy.

⁵Energy Dispersive X-ray Spectroscopy.

⁶afin de limiter l'emploi des mots *méthode* et *technique* je désignerais "la méthode PIXE" par "la PIXE" dans le texte ; il en sera de même pour les autres techniques.

⁷le fluor stimule la formation osseuse par effet direct sur la prolifération des cellules précurseurs des ostéoblastes.

Chapitre 4

Méthodes d'analyse par faisceau d'électrons

Lorsqu'un électron pénètre dans un matériau, l'électron peut interagir soit avec le cortège électronique d'un atome dans son ensemble (interaction élastique), soit avec des électrons individuels du nuage électronique d'un atome (interaction inélastique). Les effets sur l'électron sont un ralentissement et une modification de sa trajectoire.

Les interactions élastiques sont caractérisées par une diffusion de l'électron. Lorsque l'angle de diffusion est petit, la perte d'énergie par choc élastique est négligeable, la cohérence de l'onde diffusée est conservée, ce qui permet l'observation de phénomènes de diffraction sur les solides cristallisés.

Les interactions inélastiques électrons-matière peuvent produire différents effets correspondant à une modification de la structure interne des atomes irradiés. Ces effets sont :

- l'excitation d'un niveau de valence ou de conduction : l'excitation des niveaux de conduction est collective et quantifiée sous forme de plasmons¹ ;
- l'excitation de niveaux atomiques profonds : l'énergie transférée à un atome se retrouve soit sous forme d'énergie potentielle (l'atome excité revient à son état fondamental par émission de photons X caractéristiques ou par effet Auger), soit sous forme d'énergie cinétique des électrons éjectés (électrons secondaires).

La plupart de ces interactions sont utilisables pour la formation d'image (microscopie électronique) ou pour réaliser des analyses qualitatives/quantitatives du matériau irradié.

4.1 Microscopie électronique - Généralités

Les microscopes électroniques actuels peuvent être classés dans trois catégories :

- microscope électronique à balayage : comme dans les techniques de télévision, l'image est formée de façon séquentielle en traitant les informations fournies par l'interaction d'un faisceau qui balaye l'objet (SEM, STEM) ;
- microscope à formation d'images stigmatiques (ou images de Gauss) : comme dans les microscopes optiques, l'image est formée de façon simultanée par des lentilles électroniques. Les lois classiques de l'optique s'appliquent à l'onde associée aux électrons. Ces microscopes fonctionnent en général en transmission (TEM) ;
- microscope électronique à effet tunnel.

¹oscillation cohérente des électrons libres.

Un microscope électronique comporte un canon à électrons, un système de focalisation électromagnétique, un objectif, un système optique de projection permettant de visualiser une image soit sur un écran phosphorescent (TEM) soit sur un tube cathodique (SEM ou STEM), ainsi qu'un système de pompage pour faire le vide.

4.2 Microscope électronique à balayage

L'échantillon, balayé par la sonde électronique, est le siège de divers phénomènes : diffusion et diffraction des électrons ; émissions d'électrons secondaires et Auger ; émissions de photons X et de photons lumineux . . . Chacun des effets peut donner lieu à la formation d'une "image", si on dispose d'un détecteur correspondant.

Le signal électrique d'un détecteur sélectionné, après amplification, sert à moduler le faisceau d'un tube image, dont le balayage est synchrone avec celui de l'objet. L'intensité de ce faisceau est proportionnelle à l'intensité du signal du détecteur, donc de l'intensité du phénomène physique mesuré. Pour un type d'information choisi, capté par le détecteur respectif, il y a une correspondance ponctuelle entre un point de l'objet et un point de l'image sur l'écran, à un moment donné.

4.2.1 Image par réflexion - Electrons rétrodiffusés

Les images obtenues par électrons rétrodiffusés ou par électrons secondaires sont les plus couramment utilisées pour la caractérisation de matériaux. Dans le cas de notre étude, nous n'avons pas utilisé les images obtenues par électrons secondaires car leur spécificité est d'obtenir un contraste topographique, or nos échantillons sont polis.

Les électrons rétrodiffusés proviennent de diffusion élastique ou quasi-élastique et ont une énergie voisine de l'énergie incidente ($\Delta E \cong 0$).

détection

Pour avoir un meilleur rapport signal/bruit de l'image en électrons rétrodiffusés, on utilise un détecteur à semi-conducteur à jonction superficielle ayant la forme d'un disque placé au-dessus de l'échantillon. On obtient ainsi un angle solide de détection élevé. Le disque est percé d'un trou pour le passage du faisceau incident.

formation du contraste de l'image

Le coefficient de rétrodiffusion croît avec le numéro atomique comme l'indique la figure 4.1. Les électrons rétrodiffusés pouvant traverser facilement une éventuelle couche étrangère très fine, ils sont à l'origine d'un contraste de composition ou de numéro atomique.

Le coefficient de rétrodiffusion dépend aussi de l'inclinaison entre l'échantillon et le faisceau incident. Cette variation angulaire de la rétrodiffusion permet de privilégier le contraste topographique ou de composition. Pour favoriser ce dernier, il faut se placer en incidence normale et utiliser un angle de sortie (surface échantillon/détecteur) le plus grand possible : ce qui est le cas avec le détecteur à semi-conducteur annulaire cité précédemment.

Le contraste global peut être altéré par des électrons secondaires ou rétrodiffusés provenant de pièces de la chambre d'observation de l'appareil atteintes par des électrons incidents ou rétrodiffusés.

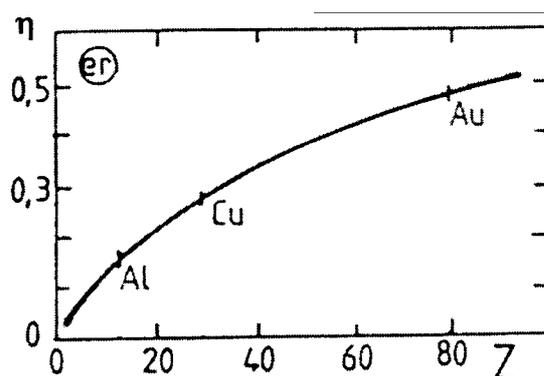


FIG. 4.1 – Coefficient de rétrodiffusion η en fonction de Z

4.2.2 Caractéristiques du microscope

Le microscope utilisé est le STEREOSCAN 360. Il comporte un canon à électrons, un système de focalisation électromagnétique, un objectif, un système de balayage et un système de pompage pour faire le vide.

Le canon à électrons de ce microscope peut fonctionner avec une tension de 200 V à 40 kV. La source d'électrons est constituée d'un filament de tungstène. La gamme des grossissements disponibles varie entre $\times 10$ et $\times 300\,000$.

Ce microscope est équipé de détecteurs d'électrons secondaires et d'électrons rétrodiffusés. Le détecteur d'électrons secondaires est un système utilisant un scintillateur couplé à un photomultiplicateur classique à dynodes, placé en incidence rasante pour un bon rendu des faibles reliefs. Le détecteur d'électrons rétrodiffusés est un semi-conducteur qui comporte des diodes à barrière de surface (Si de type N recouvert d'une couche d'or) constituées de jonctions P-N polarisées en sens inverse afin de réaliser une zone désertée en surface. Ce détecteur est annulaire et placé sous le faisceau.

4.3 Microscopie électronique en transmission

L'image formée par le microscope est une image stigmatique formée simultanément en tous ses points par focalisation, d'après les lois classiques de l'optique. La qualité principale de tout microscope est sa *résolution ou pouvoir séparateur*. La résolution est limitée par les effets de diffraction à la pupille d'ouverture de l'objectif. Pour un microscope optique, la distance de résolution limite est de l'ordre de $0.15\ \mu\text{m}$, elle est de l'ordre de quelques angströms pour un microscope électronique à transmission (plus la tension V_0 est grande, meilleure est la résolution).

4.3.1 Formation du contraste

Une image est observable lorsqu'elle présente un contraste, c'est-à-dire un écart d'intensité entre les différents points de l'image. Les mécanismes de formation du contraste dans le microscope à lumière et dans le microscope électronique à transmission diffèrent entre eux par les effets dus à l'échantillon et par les effets dus à l'instrument lui-même.

effets dus à l'échantillon

Dans le cas d'un microscope optique l'effet d'absorption est prépondérant ; d'un point à un autre de la face de sortie de l'échantillon, le rayonnement varie principalement en intensité. Dans le cas des électrons, c'est la diffusion qui est prépondérante, les différences d'absorptions étant généralement faibles par suite de l'épaisseur nécessairement très réduite de l'échantillon ; d'un point à un autre de la face de sortie, le rayonnement varie principalement en direction.

effets dus à l'instrument

Dans le microscope optique, l'ouverture α de l'objectif est grande ; sur l'écran, on observe l'image de la répartition d'intensité sur la face de sortie de l'échantillon. Dans le microscope électronique à transmission, pour limiter l'aberration sphérique, l'ouverture de l'objectif est très faible, de l'ordre de 5.10^{-3} rd. Seuls les électrons qui sont diffusés avec un angle inférieur à α peuvent participer à la formation de l'image ; ceux diffusés avec un angle supérieur sont arrêtés dans l'instrument. Le contraste est produit par soustraction des photons diffusés ou diffractés ; on observe un contraste de diffusion ou de diffraction.

4.3.2 Contraste de diffusion et de diffraction

objet diffusant amorphe

Considérons un échantillon mince éclairé par un faisceau parallèle d'électrons. L'ouverture de l'objectif est limitée par un diaphragme placé dans son plan focal image. Supposons que l'échantillon comporte un objet diffusant AB et que le reste de l'échantillon ne diffuse pas les électrons. Soit M un point de l'objet AB. Parmi les photons diffusés par ce point M, seuls ceux qui font avec l'axe optique un angle inférieur à α traversent le diaphragme d'ouverture ; tous les autres sont arrêtés.

Dans le plan image de l'objectif, on observe un éclairage uniforme, sauf aux points qui correspondent à l'image A'B' de l'objet AB : l'image de l'objet paraît sombre sur un fond clair, à cause d'un déficit d'éclairage.

Si la diffusion est parfaitement élastique, il y a correspondance ponctuelle entre l'objet et l'image ; cette dernière est nette. Si la diffusion est en partie inélastique, les photons ayant subi une perte d'énergie ne convergent pas dans le plan image théorique : la netteté et le contraste de l'image diminuent. Plus le diaphragme d'objectif est petit, plus le contraste de diffusion est marqué ; pour cette raison, il est souvent appelé diaphragme de contraste. Il est interchangeable.

objet diffractant cristallisé

Considérons, dans les mêmes conditions que précédemment (faisceau d'électrons parallèle, diaphragme dans le plan focale image . . .), un échantillon mince comportant un objet AB cristallin, le reste de l'échantillon étant amorphe. Supposons que cet objet se trouve en position de réflexion de Bragg de premier ordre pour une de ses familles de plan (hkl) ; les photons diffractés parallèles entre eux sortent de l'échantillon avec un angle 2θ par rapport à l'axe optique. Les modes de fonctionnement possibles sont : soit le diaphragme est centré sur le faisceau direct (image en champ clair) , soit le diaphragme est centré sur le faisceau diffracté hkl (image en champ sombre). Si on enlève le diaphragme de contraste, on observe un diagramme de diffraction étendu qui représente une section plane du réseau réciproque de diffraction.

Image en champ clair : seuls les photons transmis sans diffraction contribuent à la formation de l'image ; toutes les parties cristallisées de l'échantillon apparaissent sombres sur fond clair. Une partie cristallisée apparaît d'autant plus sombre qu'elle est proche d'une orientation de zone importante. Un point de l'échantillon apparaît d'autant plus clair qu'il diffuse moins les électrons.

Image en champ sombre : seuls les photons qui correspondent à la réflexion sélective hkl contribuent à la formation de l'image. Le cristal apparaît clair sur fond sombre. Dans un échantillon polycristallin, seuls les cristallites dont un faisceau diffracté est sélectionné apparaissent brillants.

4.4 Microscope électronique à balayage en transmission

Le principe général est le même que celui du microscope à balayage classique. La partie transmise du faisceau d'électrons incident focalisé sur l'échantillon mince est reçue dans un détecteur d'électrons placé sous le porte échantillon. L'image est reproduite ligne par ligne sur l'écran du tube image associé.

L'image ainsi formée présente des analogies avec celle fournie par un microscope à transmission conventionnel.

L'élargissement du faisceau par diffusion étant faible dans un objet mince, la résolution est déterminée approximativement par le diamètre de la sonde électronique. Pour atteindre une résolution comparable à celle d'un microscope à transmission conventionnel, soit quelques angströms, il faut un faisceau dont le diamètre sur l'objet est du même ordre, ce qui est réalisé dans des appareils spécialement conçus comme le microscope électronique à balayage à transmission.

Le mode de formation d'image le plus courant en STEM met en œuvre un détecteur axial et un détecteur annulaire. On peut obtenir différents modes de contraste. Notamment, on retrouve la formation d'images dites en champ clair et en champ sombre.

L'image en champ clair est formée par le signal du détecteur axial qui ne reçoit que les électrons transmis et diffusés à l'intérieur de l'angle de collection α_0 . Le signal correspond à une grande proportion d'électrons diffusés inélastiquement qui sont concentrés dans un étroit domaine angulaire. Pour une faible ouverture de collection et un objet mince, le contraste est équivalent au contraste de diffraction en champ clair du TEM conventionnel.

L'image en champ sombre est formée par le signal d'un détecteur annulaire qui reçoit tous les électrons diffusés et diffractés dans un angle supérieur à l'ouverture de collection axiale. Dans le signal ainsi détecté prédominent les électrons diffractés et diffusés élastiquement qui sont dispersés dans un large domaine angulaire.

4.4.1 EDXS couplé au STEM : fluorescence X

L'EDXS est une technique d'analyse quantitative permettant de déterminer les concentrations élémentaires d'une zone irradiée par un faisceau d'électrons. Cette technique est utilisée en simultanée avec un microscope électronique à balayage. La combinaison de l'imagerie et de l'EDXS offre un outil performant de microanalyse.

L'EDXS, comme la méthode PIXE, est basé sur le principe de la fluorescence X. On peut schématiser l'émission de fluorescence X comme un processus en deux étapes : l'ionisation de l'atome et retour à l'état fondamental de l'atome par émission d'un rayonnement X caractéristique.

Un rayonnement non caractéristique ou fond continu est aussi émis. Ces deux types de rayonnements sont recueillis par un détecteur X et traduits sous forme d'un spectre X où

l'énergie est représentée en fonction du nombre d'impulsions par seconde. Nous décrirons brièvement le fonctionnement de ce type de détecteur lors de la description de la méthode PIXE.

A de rares exceptions², l'atome ionisé n'a pas le "souvenir" de la manière dont il a été amené dans cet état que ce soit au cours de l'interaction avec un électron (EDXS) ou avec un ion (PIXE). Pour éviter des redondances et pour alléger le contenu de la description des méthodes d'analyse, nous avons choisi de décrire la production des raies caractéristiques lors de la présentation de la méthode PIXE. En revanche, le fond continu est dépendant du projectile et doit faire l'objet d'une description pour chaque type de particule.

le fond continu

La perte d'énergie, subie par les électrons diffusés élastiquement lors de leur passage près des noyaux des atomes de l'échantillon, est émise sous forme d'un rayonnement non caractéristique. Il est appelé rayonnement de freinage car il provient de la décélération des électrons incidents en mouvement dans la matière et passant dans le champ électrostatique intense des noyaux atomiques.

Cette énergie cinétique perdue est transformée en énergie électromagnétique rayonnée (photons X) dont l'énergie est distribuée de façon continue d'une valeur nulle jusqu'à la valeur de l'énergie cinétique de l'électron incident.

La forme du fond continu dépend de l'énergie du faisceau d'électrons incident ainsi que de la masse de l'échantillon.

Une autre contribution au fond continu est due à la grille de support de l'échantillon. Celle-ci est très souvent en cuivre. Lors de l'analyse, se superposent au rayonnement de freinage, un signal parasite composé des pics caractéristiques du cuivre (raie K_α , K_β et L_α) plus un fond continu. Ces signaux évoluent dans des proportions variables selon la position de la sonde par rapport aux barreaux du carreau de la grille, ce qui rend la modélisation de ce fond parasite difficile. Les sources d'excitation de ce rayonnement parasite proviennent soit des effets de fluorescence des photons X induits par le bombardement électronique du faisceau au niveau du diaphragme et qui irradient toute la colonne, soit des électrons rétrodiffusés sollicitant les parties voisines (grille du support et porte échantillon) de l'échantillon étudié [36].

Pour minimiser ces signaux parasites, dans une première étape, il est préférable de travailler à 100 keV [37] afin de réduire les effets de fluorescence du diaphragme et dans une seconde étape, il convient d'effectuer l'analyse dans une zone éloignée du bord des barreaux. L'échantillon est incliné de 30° afin d'augmenter l'épaisseur de l'échantillon à traverser par le faisceau et de minimiser l'influence de la grille support.

méthode de quantification et calcul des concentrations

L'intensité des pics observés sur un spectre X dépend de plusieurs facteurs fondamentaux : la section efficace d'ionisation, le rendement de fluorescence, la probabilité de la transition considérée ainsi que l'absorption du rayonnement par la matière.

Pour que l'interaction engendre un rayonnement caractéristique, il faut qu'un électron incident dont l'énergie est supérieure au seuil d'ionisation interagisse avec un électron lié à l'atome cible. Ceci se mesure en terme de probabilité ou de section efficace d'ionisation.

²lorsque l'ionisation provient d'une collision avec un ion lourd, les cortèges électroniques des deux partenaires peuvent se recouvrir pendant un temps suffisamment long pour qu'il y ait formation d'orbitales quasi-moléculaires. Dans ce cas, la nature du projectile influe donc sur les caractéristiques des transitions électronique ultérieures.

Cette section efficace d'ionisation, notée σ^{ion} et exprimée en cm^2/atome , dépend de l'énergie incidente E_0 ainsi que de l'énergie critique d'ionisation E_i du niveau i considéré et est donnée par l'équation de Bethe dont la forme simplifiée est [38] :

$$\sigma^{ion} = \frac{7.92 \times 10^{14}}{E_0 \times E_i} \ln\left(\frac{E_0}{E_i}\right) \quad (4.1)$$

(E_0 et E_i sont exprimés en eV)

Parmi les transitions permises vers un niveau donné, toutes n'ont pas la même probabilité. Ce sont les raies K et L qui ont les probabilités les plus élevées.

Une partie du rayonnement émis est absorbée par l'échantillon, ainsi que dans les fenêtres traversées du détecteur. L'utilisation d'un détecteur à fenêtre ultrafine réduit cette absorption. Dans notre cas où l'étude porte sur des échantillons biologiques minces, il n'est pas nécessaire d'introduire des facteurs de correction du numéro atomique, de fluorescence et d'absorption qui dépendent de la composition de l'échantillon [39][40].

Tous ces facteurs interviennent sur l'intensité des raies et il convient de tenir compte de ces paramètres puisque la méthode de quantification utilise l'intensité des raies pour déterminer les concentrations.

La méthode de Hall est une méthode de quantification des éléments dans les conditions d'échantillons minces. Un échantillon est dit mince si la majorité des électrons incidents le traverse sans perdre d'énergie et si les photons X émis ne sont pas réabsorbés par l'échantillon. Cela revient à considérer, pour une analyse à 100 keV, un échantillon d'épaisseur inférieure au μm .

L'analyse quantitative consiste à traduire le rayonnement X caractéristique en un nombre d'atomes pour chaque élément détectable en utilisant la relation suivante donnant l'intensité de la raie de l'élément x :

$$I_x = I_0 \cdot N_x \cdot \sigma_x^{ion} \cdot \omega_x \cdot p_x \cdot t \quad (4.2)$$

avec

N_x le nombre d'atomes de l'espèce x par unité de volume.

σ_x^{ion} la section efficace d'ionisation.

ω_x le rendement de fluorescence.

p_x le poids de la raie considérée.

t l'épaisseur de l'échantillon.

I_0 l'intensité du faisceau incident.

Pour déterminer l'intensité du fond continu dû à l'échantillon et à la grille support, nous utilisons la théorie simplifiée de Kramers [41] selon laquelle, l'intensité du fond continu, dans le cas d'un échantillon constitué de c types d'atomes, s'écrit :

$$I_{fc} dE = I_0 \cdot \frac{k_1}{E_0} \cdot \frac{dE}{E} \cdot t \cdot \sum_c (N_c \cdot Z_c^2) \quad (4.3)$$

avec

E_0 l'énergie des électrons incidents.

Z le numéro atomique, A le nombre de masse.

k_1 une constante.

En posant :

$$\overline{\left(\frac{Z^2}{A}\right)} = \sum_c \left[\left(\frac{Z_c^2}{A_c}\right) \cdot C_c \right] \quad (4.4)$$

$$\text{avec } C_c = \frac{N_c \cdot A_c}{\sum_c N_c \cdot A_c} \quad (4.5)$$

C_c est la concentration massique de l'élément c .

Nous obtenons en intégrant sur un domaine d'énergie arbitraire :

$$I_{fc} = \int I_{fc}(E) dE = I_0 \cdot k_2 \cdot \overline{\left(\frac{Z^2}{A}\right)} \cdot t \cdot \sum_c (N_c \cdot A_c) \quad (4.6)$$

avec k_2 une constante. $\overline{(Z^2/A)}$ la valeur moyenne de (Z_c^2/A_c) pour tous les constituants c de l'échantillon. Cette relation signifie que l'intensité du fond continu est proportionnelle à la masse totale du volume irradié.

Pour estimer C_x la concentration massique d'un élément x définie par :

$$C_x = \frac{N_x \cdot A_x}{\sum_c N_c \cdot A_c} \quad (4.7)$$

nous utilisons les relations 4.2 et 4.6 et nous multiplions I_x/I_{fc} par $A_x \cdot \overline{(Z^2/A)}$, pour obtenir :

$$C_x = \frac{k_2 \cdot A_x}{\sigma_x \cdot \omega_x \cdot Z_x} \cdot \overline{\left(\frac{Z^2}{A}\right)} \cdot \frac{I_x}{I_{fc}} = k_x \cdot \overline{\left(\frac{Z^2}{A}\right)} \cdot \frac{I_x}{I_{fc}} \quad (4.8)$$

Cette dernière équation exprime la concentration d'un élément X comme proportionnelle au rapport raie sur fond continu de cet élément mesuré dans le spectre.

Pour déterminer la valeur exacte de C_x , nous utilisons des standards d'éléments de concentration connue C_x^{st} dont nous mesurons le rapport I_x/I_{fc} dans les mêmes conditions expérimentales.

$$C_x^{st} = k_x \cdot \overline{\left(\frac{Z^2}{A}\right)}^{st} \cdot \left(\frac{I_x}{I_{fc}}\right)^{st} \quad (4.9)$$

Grâce à ces standards, nous pouvons nous affranchir de la valeur k_x et nous obtenons :

$$C_x = C_x^{st} \cdot \frac{\left(\frac{I_x}{I_{fc}}\right)}{\left(\frac{I_x}{I_{fc}}\right)^{st}} \cdot \frac{\overline{\left(\frac{Z^2}{A}\right)}}{\overline{\left(\frac{Z^2}{A}\right)}^{st}} \quad (4.10)$$

Il est nécessaire de connaître le terme $\overline{(Z^2/A)}$ de l'échantillon expérimental. Cette valeur moyenne dépend a priori de la nature de l'échantillon analysé. Pour les matériaux biologiques, la composition moyenne est stable d'un échantillon à un autre. Cette valeur de $\overline{(Z^2/A)}$ est comprise entre 3.2 et 3.3 [39].

Les standards doivent être homogènes, de faible épaisseur, stables sous le faisceau d'électrons et de concentration connue. Cependant, il n'est pas nécessaire que les échantillons et les standards soient de la même épaisseur [39][40].

L'équation 4.10 se met finalement sous la forme :

$$C_x = C_x^{st} \cdot \frac{\left(\frac{I_x}{I_{fc}}\right)}{\left(\frac{I_x}{I_{fc}}\right)^{st}} = K_x \cdot \left(\frac{I_x}{I_{fc}}\right) \quad (4.11)$$

C'est l'équation 4.11 qui exprime la relation fondamentale de la méthode de Hall traduisant le signal mesuré (I_x et I_{fc}) en une concentration C_x de l'élément considéré. Les

concentrations obtenues sont exprimées en millimoles par kilogramme de la matière sèche de l'échantillon considéré.

En pratique, il est difficile de disposer de standards de concentrations connues pour tous les éléments. Cliff et Lorimer [43] ont développé la méthode dites des K-facteurs. Cette méthode repose sur l'hypothèse suivante : dans le cadre d'échantillons minces, le rapport d'intensité de deux raies I_x/I_y d'un même spectre est directement proportionnel aux concentrations des éléments X et Y. Ainsi, avec un seul standard on peut déterminer la concentration de tous les éléments.

Le calcul des intensités du fond continu I_{fc} et des raies caractéristiques I_x est donné en annexe.

4.4.2 Caractéristiques du microscope

Nous avons utilisé le microscope électronique PHILIPS CM 30. Il comporte un canon à électrons, un système de focalisation électromagnétique, un objectif, un système optique de projection permettant de visualiser une image soit sur un écran phosphorescent (mode TEM) soit sur un tube cathodique synchronisé avec le système de balayage (mode STEM) ainsi qu'un système de pompage pour faire le vide à l'intérieur de la colonne du microscope.

Le canon à électrons de ce microscope peut fonctionner jusqu'à une tension de 300 kV, mais en pratique, la tension est limitée à 250 kV. La source d'électrons est constituée par un filament d'héxaborure de lanthane (LaB_6). Le système de focalisation donne une sonde électronique réglable de 80 nm à 1.2 nm.

Ce microscope est équipé d'un spectromètre de dispersion d'énergie de photons X, constitué d'une fenêtre ultrafine (épaisseur de 0.3 μm) afin de détecter les éléments légers à partir du bore ($Z > 5$). Le principe de détection repose sur l'absorption des photons par un cristal semi-conducteur Si(Li). Il est situé latéralement avec un angle d'élévation de 20° par rapport à l'échantillon. Afin de protéger la diode en cas de surexposition, le spectromètre est équipé d'un système mécanique de rétraction.

4.5 Dégâts d'irradiation

Il est important de tenir compte des effets éventuels des faisceaux sur nos échantillons biologiques car les mesures pourraient être perturbées.

4.5.1 Effets produits par interaction élastique électron-matière.

L'énergie transférée produit les effets suivants, par ordre d'énergie croissante.

effet thermique

L'énergie transférée est de l'ordre de 0.01 à 0.1 eV. Les atomes sont soumis à des oscillations autour de leur position d'équilibre. L'interaction peut avoir lieu par excitation de vibrations individuelles des atomes (effet Debye) ou par excitation d'oscillations collectives à états d'énergie quantifiés (phonons). La vibration des atomes se traduit par un dégagement de chaleur.

effet chimique

L'énergie transférée de l'ordre de 3 à 5 eV, peut provoquer la rupture de liaisons chimiques, en particulier de liaisons faibles, comme les liaisons organiques.

effet de déplacement atomique

Lorsque le transfert d'énergie est supérieur au seuil de déplacement E_d de l'atome, ce dernier peut sortir du puits de potentiel qui entoure sa position d'équilibre dans le solide. L'énergie nécessaire est de l'ordre de 15 à 30 eV. Il y a création de dommages d'irradiation permanents.

Dans le cas particulier d'électrons de 100 keV, on constate que, pour les faibles angles de diffusion, de l'ordre de 0.01 rad (conditions d'utilisation courantes en microscopie en mode transmission – TEM/STEM), la perte d'énergie est négligeable. Pour la rétrodiffusion, le transfert est maximal et devient appréciable, de l'ordre de quelques eV, mais ce n'est que pour les éléments très légers (par exemple Li) que le seuil de déplacement atomique est nettement franchi avec des électrons de 100 keV. Pour les autres éléments, on observe un effet thermique et éventuellement des ruptures de liaisons.

4.5.2 Migration des ions alcalins dans les verres irradiés par des électrons

L'irradiation d'un verre contenant des ions alcalins par une sonde électronique modifie la structure de ce verre. Ce changement de structure concerne le volume irradié et est caractérisé par une rapide décroissance de l'intensité du rayonnement X caractéristique des alcalins constitutifs du verre. Cette décroissance de variation de l'intensité des photons X émis suit normalement une période d'incubation pendant laquelle l'intensité des photons X émis varie très peu. La durée de ce temps d'incubation dépend des caractéristiques de la sonde utilisée.

Gedeon *et al.* [44] suggèrent un modèle théorique expliquant la nature des phénomènes observés. L'irradiation d'un verre par un faisceau d'électrons de haute énergie produit une double ionisation des alcalins. Ces ions doublement ionisés sont accélérés par le champ électrique qui a été créé par le faisceau d'électrons. Une migration spontanée commence dès que le nombre d'ions alcalins libérés de leurs positions initiales atteint un seuil de percolation.

Chapitre 5

Méthodes d'analyse par faisceau d'ions

L'analyse par faisceau d'ions est un terme générique qui reprend toutes les méthodes d'analyse qui sont basées sur les interactions au niveau nucléaire et atomique d'un faisceau de particules chargées¹ avec un échantillon-cible. Lorsqu'une particule chargée énergétique (de l'ordre du MeV) pénètre dans un matériau, elle interagit avec les électrons et les noyaux des atomes constitutifs. Une émission secondaire de rayonnement X, γ ou corpusculaire caractéristique des éléments constitutifs de l'échantillon peut se produire. Une analyse spectroscopique de ce rayonnement secondaire fournit diverses informations sur le matériau bombardé, telles que :

- composition élémentaire et détermination des concentrations en surface ou en profondeur ;
- détermination de la nature, de la position, de l'épaisseur ou du gradient de concentration de plusieurs couches d'éléments ou de composés.

Technique	Ions incidents	Interaction	Détection
PIXE	p, α	Ionisation	Photons X
RBS	p, α	Diffusion nucléaire	p, α
PIGE	p	Réaction nucléaire	Photons γ
NRA	p, d	Réaction nucléaire	Particules chargées

TAB. 5.1 – Description des techniques d'analyse par faisceaux d'ions

La nature du rayonnement détecté définit le type d'analyse. La table 5.1 reprend les principales techniques avec les particules incidentes généralement utilisées ainsi que le type d'interaction et de rayonnement.

5.1 Pouvoir d'arrêt

Quand un faisceau de particules chargées de quelques MeV pénètre dans la matière, il perd son énergie graduellement avec la profondeur jusqu'à éventuellement son arrêt. La perte d'énergie est principalement due aux interactions coulombiennes inélastiques avec les

¹on entend par particule chargée un ion (proton, deuton, particule α , ...).

électrons liés. Le pouvoir d'arrêt $S(E)$ ($cm^2 MeV/g$) d'un ion d'énergie E (MeV) est défini comme étant la perte d'énergie par unité de masse superficielle traversée :

$$S(E) = \frac{1}{\rho} \frac{dE}{dx} \quad (5.1)$$

où ρ (g/cm^3) est la densité de matière traversée et x la profondeur (cm).

De nombreuses mesures expérimentales des pouvoirs d'arrêt sont disponibles [45]. Ces données ont été ajustées par des relations semi-empiriques qui sont maintenant utilisées pour obtenir les pouvoirs d'arrêt de tous les éléments du tableau périodique [46].

Le pouvoir d'arrêt de composés est obtenu à partir de ceux des éléments constitutifs grâce à la loi d'additivité de Bragg-Kleemann :

$$S_M(E) = \sum_{i=1}^n \omega_i S_i(E) \quad (5.2)$$

où ω_i est la stœchiométrie de l'élément i .

Le parcours² R d'un ion est calculé par l'intégration du pouvoir d'arrêt :

$$R = \int_{E_0}^0 \frac{dE}{S(E)} \quad (5.3)$$

où E_0 est l'énergie de l'ion incident. Comme les ions ne sont que légèrement déviés par les électrons, on a une bonne estimation de leur parcours (figure 5.1).

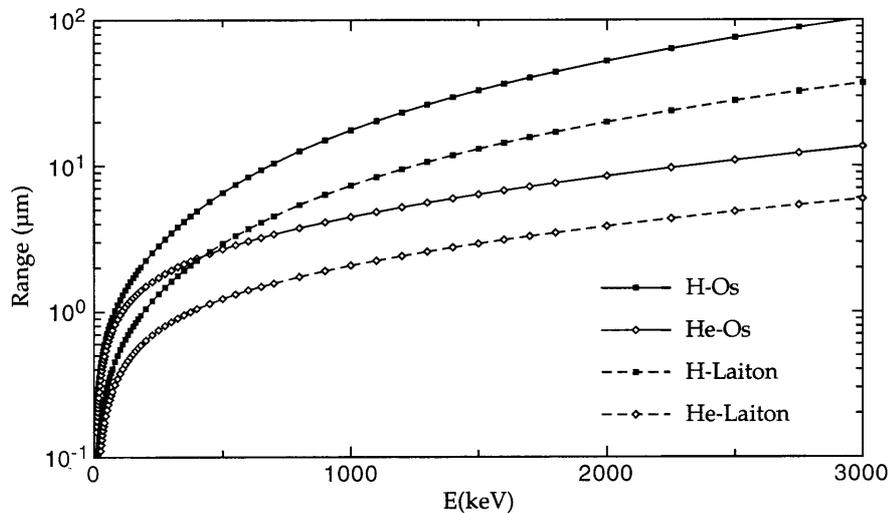


FIG. 5.1 – Parcours moyen $R(\mu m)$ de faisceaux de protons et d'hélium dans de l'os et du lait

5.2 Méthode PIXE

Johansson *et al.* [47] ont démontré que l'émission de photons X caractéristiques produits lors du bombardement d'un matériau par des protons de quelques MeV est à la base d'une analyse élémentaire très sensible (figure 5.2). Dans la majorité des cas, les faisceaux

²range en anglais.

incidents de particules chargées, généralement des protons de 1 à 4 MeV, sont produits par des accélérateurs (cyclotron, accélérateur van de Graaff). Une étude simultanée par PIXE et d'autres techniques d'analyse (PIGE et RBS) est possible, conduisant à une couverture plus large des éléments, notamment vers les éléments légers pour lesquels la PIXE n'est pas adaptée.

Le potentiel de la PIXE pour résoudre de nombreux problèmes d'analyse des éléments traces a été démontré [48][49][50]. La PIXE peut s'appliquer aussi bien à des échantillons de petite ou de grande taille, fins ou épais.

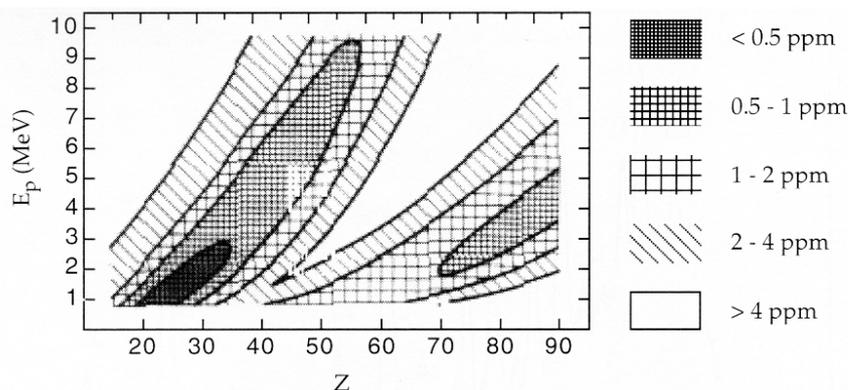


FIG. 5.2 – Limites de détection (ppm) en fonction de l'énergie incidente des protons et du numéro atomique des éléments analysés.

Les limites de détection constituent le trait le plus important d'une technique d'analyse. En PIXE, la plus grande sensibilité est obtenue pour les éléments de numéro atomique compris entre 20 et 40, et supérieur à 75 (de l'ordre du $\mu g/g$). La bonne sensibilité de la PIXE par rapport aux autres méthodes d'analyse est encore plus prononcée quand on considère les limites de détection en valeur absolue. Pour des échantillons minces, c'est-à-dire des échantillons pour lesquels la perte d'énergie des protons dans l'échantillon est négligeable, il est possible de détecter des éléments traces au niveau du picogramme.

5.2.1 Principe de la méthode : fluorescence X

ionisation par particules chargées

Des particules chargées telles que les protons ou les particules α sont utilisées comme projectiles. Les modèles théoriques rendant compte de l'ionisation des couches atomiques profondes sont basés sur l'interaction coulombienne entre un électron lié et une particule chargée incidente dans une gamme d'énergie où les partenaires de la collision sont considérés comme des particules de charge ponctuelle. Ces approches théoriques se limitent généralement aux protons et particules α dans la gamme d'énergie 1-5 MeV. Parmi les modèles les plus couramment employés, on peut citer l'approximation de Born en ondes planes (Plane Wave Born Approximation, PWBA) [51] ou encore l'approximation du choc binaire (Binary Encounter Approximation, BEA) [52].

La probabilité d'ionisation d'une couche atomique est décrite par la section efficace d'ionisation σ^{ion} . Les valeurs prédites par les différents modèles théoriques sont en assez bon accord ($\pm 30\%$) avec les données expérimentales, ce qui semble satisfaisant si l'on note que les variations en fonction du numéro atomique Z de l'atome ionisé peuvent atteindre

3 à 4 ordres de grandeur. Elles rendent compte en particulier :

- de la décroissance rapide de σ^{ion} en fonction du numéro atomique de l'atome cible, pour une énergie d'incidence E fixée ;
- de la variation de σ^{ion} en fonction de l'énergie E d'incidence pour un atome cible donné. σ^{ion} croît en fonction de E et atteint une valeur maximale lorsque la vitesse de l'ion incident est comparable à celle de l'électron sur sa couche ;
- de la dépendance de σ^{ion} en $\left(\frac{E}{A}\right)^4$ en fonction de l'énergie par nucléon du projectile E/A . Ceci explique notamment l'utilisation préférable de particules légères (protons) si l'on veut optimiser σ^{ion} .

L'incertitude sur la valeur absolue de ces sections efficaces est encore trop grande pour qu'elles puissent être employées dans le calcul de résultats quantitatifs lors de la mise en œuvre d'une technique d'analyse. Dès 1976, Johansson [53] développe une formule semi-empirique, à partir du modèle de Garcia dans le cadre de la théorie BEA. Ce modèle empirique prédit l'existence d'une fonction universelle, valable pour tous les éléments et pour des protons dans une gamme d'énergie autour de quelques MeV. Celle-ci exprime le produit $\sigma_j^{ion} \cdot U_j^2$ (U_j est l'énergie de liaison sur la couche j , avec $j = K$ ou L) en fonction de $E/(\lambda U_j)$ (E est l'énergie d'incidence et λ le rapport des masses proton sur électron).

$$\ln(\sigma_j^{ion} U_j^2) = \sum_{n=0}^5 b_{j,n} \left[\ln \left(\frac{E}{\lambda U_j} \right) \right]^n \quad (5.4)$$

Par ailleurs, une nouvelle approche basée sur les travaux de Merzbacher et Lewis a été développée par Brandt et Lapiski [54][55]. Ils ont modifié l'approximation PWBA (Plane Wave Born Approxiamtion) en incorporant la polarisation et l'effet de bord de l'approximation PSS (Perturbed Stationnary States) [56] et en corrigeant les effets relativistes (R), la perte d'énergie du projectile durant la collision (E) et la répulsion coulombienne entre la particule et l'atome cible (C). Ceci, appelé ECPSSR, est devenu la théorie la plus utilisée pour la prédiction de sections efficaces d'ionisation des niveaux énergétiques K et L pour des ions de faible numéro atomique. Cohen et Harrigan [57] ont utilisé ce modèle pour calculer et publier une table des sections efficaces d'ionisation en protons et particules α qui est aujourd'hui employée. La figure 5.3 montre les sections efficaces d'ionisation (ECPSSR) des couches K et L pour des protons d'énergies 1, 2 et 3 MeV et en fonction du numéro atomique [57]. Johansson et Campbell [48] ont vérifié les valeurs prédites par la théorie ECPSSR grâce à la formule semi-empirique de Johansson. Ces valeurs servent actuellement de référence dans le domaine.

les raies caractéristiques

Les raies correspondent à l'émission de photons X pour assurer les transitions électroniques en cascades permettant le retour de l'atome à son état fondamental. Toutes les transitions possibles ne sont pas observées car elles ne s'effectuent que si des règles de sélection, établies par la mécanique quantique, sont respectées. Ces règles dépendent des différents nombres quantiques : n le nombre quantique principal, l le nombre quantique orbital et j le moment cinétique total.

Chaque niveau d'énergie est caractérisé par ces nombres quantiques. Pour que la transition entre deux niveaux soit permise, il faut que les nombres quantiques de ces niveaux vérifient les relations suivantes :

$$\Delta n \geq 1, \Delta l = \pm 1, \Delta j = \pm 1 \text{ ou } 0 \quad (5.5)$$

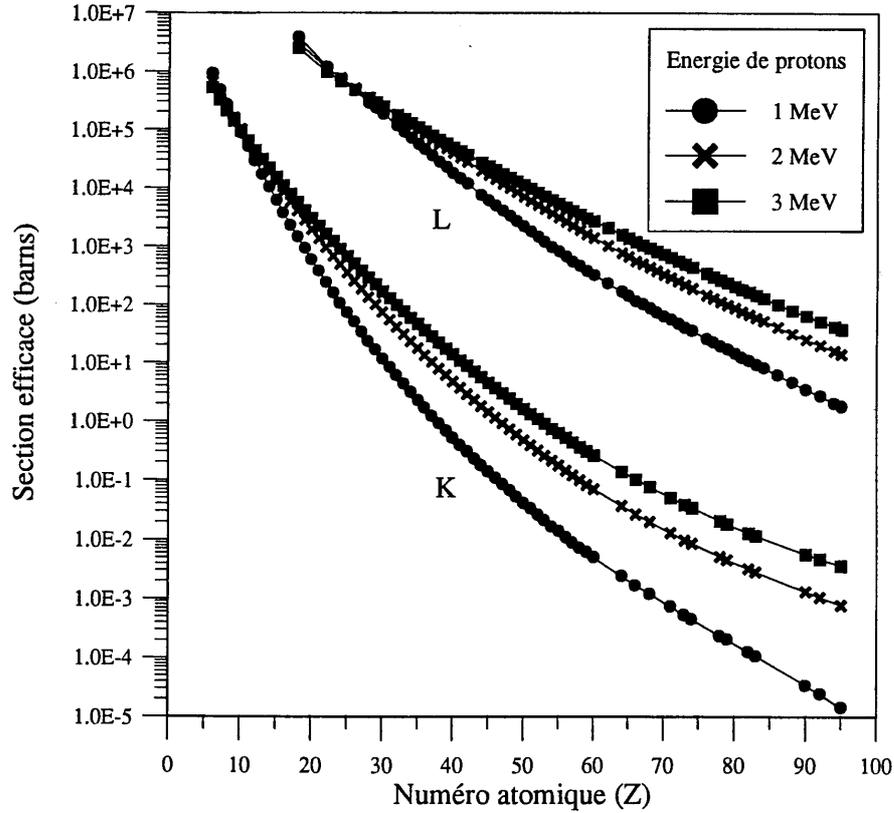


FIG. 5.3 – Sections efficaces d’ionisation (ECPSSR) des couches K et L pour des protons de 1, 2 et 3 MeV .

La figure 5.4 montre un diagramme de niveau avec les transitions permises par les règles de sélection. Les transitions vers le niveau K sont notées raies K . Si l’électron vient du niveau L , on note la raie K_α , et s’il vient du niveau M , K_β . De part la structure fine, les raies K_α et K_β sont des doublets. Les transitions vers les niveaux L sont notées raies L . Ces dernières ont de nombreuses composantes, surtout pour les éléments lourds. Un spectre X complet est généralement assez compliqué. Toutefois, certaines composantes ont à peu près la même énergie (e.g. les raies K_{α_1} et K_{α_2}) et apparaissent comme une seule raie. De plus, certaines transitions ont une faible intensité. En résumé, les éléments légers et moyens sont détectés seulement par les deux raies K_α et K_β :

$$K_\alpha = K_{\alpha_1}(K - L_{III}) + K_{\alpha_2}(K - L_{II}) \quad (5.6)$$

$$K_\beta = K_{\beta_1}(K - M_{III}) + K_{\beta_2}(K - M_{II}) \quad (5.7)$$

Dans le spectre L des éléments lourds, on regroupe généralement les raies en trois groupes principaux :

$$L_\alpha = L_{\alpha_1}(L_{III} - M_V) + L_{\alpha_2}(L_{III} - M_{IV}) \quad (5.8)$$

$$L_\beta = L_{\beta_1}(L_{II} - M_{III}) + L_{\beta_2}(L_{III} - N_V) + L_{\beta_3}(L_I - M_{III}) + \dots \quad (5.9)$$

$$L_\gamma = L_{\gamma_1}(L_{II} - N_{IV}) + L_{\gamma_2}(L_I - N_{II}) + L_{\gamma_3}(L_I - N_{III}) + \dots \quad (5.10)$$

L’analyse des éléments d’un échantillon se fera préférentiellement soit par ses raies K , soit par ses raies L , suivant son numéro atomique. Les photons X émis par l’échantillon

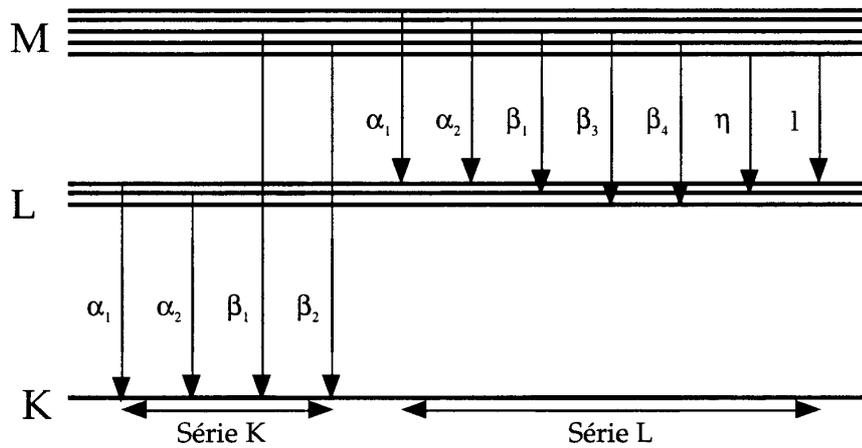
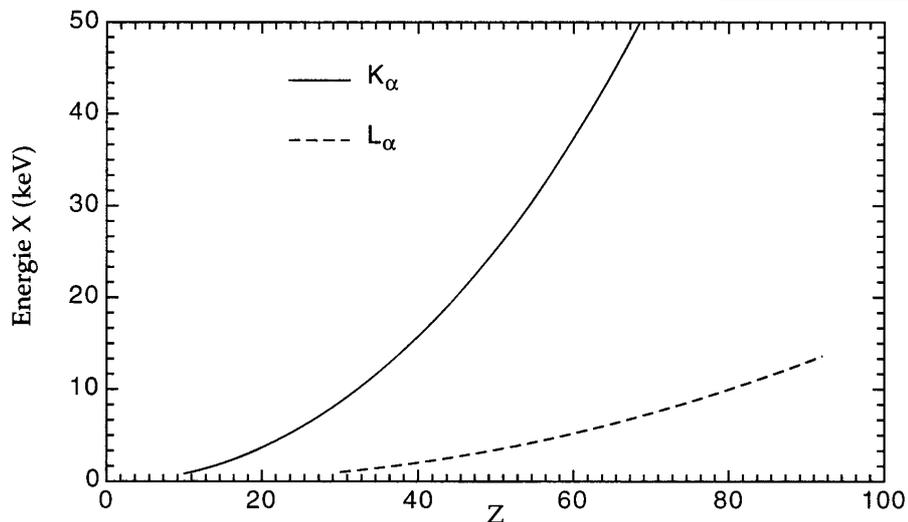


FIG. 5.4 – Diagramme d'énergie des transitions X.

sont enregistrés grâce à un détecteur semi-conducteur dont le principe de fonctionnement est donné au paragraphe 5.2.2. Les énergies des photons X émis en fonction du numéro atomique sont représentées sur la figure 5.5.

D'autre part, un atome excité peut aussi retourner à son état fondamental par l'éjection d'un de ses propres électrons d'un état moins lié. Cette transition non radiative est appelée effet Auger et les électrons éjectés, électrons Auger. Généralement, la probabilité d'avoir un effet Auger augmente avec la différence entre les états d'énergie correspondants ; elle est maximale pour les éléments de Z petit.

FIG. 5.5 – Energie des photons X K_α et L_α en fonction du numéro atomique.

Une conséquence importante de l'effet Auger est que le nombre réel de photons X produits est plus petit qu'attendu. La probabilité pour qu'une lacune soit remplie via une transition radiative est appelée rendement de fluorescence (figure 5.6). Pour les raies K, on note ce rendement de fluorescence ω_K . De même, on note a_K le rendement d'émission

Auger pour la couche K.

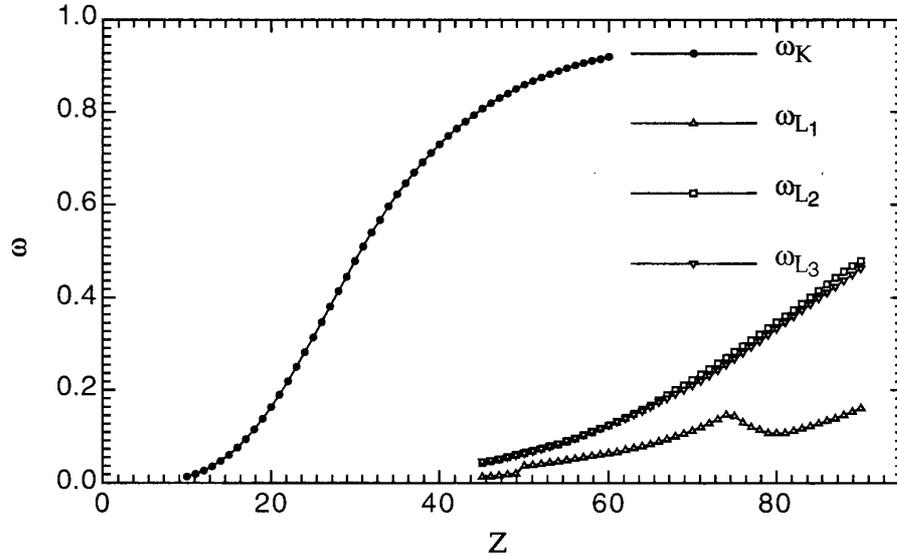


FIG. 5.6 – Rendement de fluorescence en fonction de Z .

Bien que les rendements de fluorescence de la couche K soient calculés théoriquement, des données expérimentales [58], modélisées par la relation suivante, sont plus utilisées :

$$\left(\frac{\omega_K}{1 - \omega_K} \right)^{1/4} = 0.033 + 0.032 \cdot Z - 2.810^{-7} \cdot Z^3 \quad (5.11)$$

Cette relation permet de déterminer les rendements de fluorescence de la couche K pour les éléments de Z compris entre 10 et 60 avec une erreur de 1 à 5 %. Par contre, les rendements de fluorescence des couches L ne sont pas connus avec beaucoup de précision.

le fond continu

Le bruit de fond continu est la principale cause de limitation de la détection d'un élément. Ce bruit de fond provient du bremsstrahlung des particules chargées incidentes, du bremsstrahlung des électrons secondaires et des photons γ provenant des réactions nucléaires.

Le bremsstrahlung³ dû aux particules chargées incidentes est beaucoup moins intense que dans le cas d'électrons incidents. En terme classique, l'intensité du rayonnement de freinage est proportionnelle au carré de l'accélération, donc au terme $(F/m)^2$, où F est la force électrique et m la masse du projectile. L'intensité du bremsstrahlung produit par les protons est en première approximation de l'ordre de $(1836)^2$ fois moins intense que celle du bremsstrahlung produit par des électrons.

La principale contribution au bruit de fond continu provient du rayonnement de freinage associé non à la décélération des ions incidents mais plutôt aux électrons éjectés suite à des collisions inélastiques (figure 5.7). Le bremsstrahlung des électrons secondaires (noté BES) est émis quand un électron éjecté est diffusé par le champ coulombien d'un noyau atomique d'un des éléments de l'échantillon. Pour une collision frontale entre un ion de masse M_p

³rayonnement de freinage.

et d'énergie E_p et un électron libre, l'énergie cinétique maximum T_m qui est transmise à l'électron s'écrit :

$$T_m = 4 \cdot \frac{m_e}{M_p} \cdot E_p \quad (5.12)$$

L'intensité du spectre BES décroît très rapidement au-dessus de l'énergie T_m .

Le bremsstrahlung des électrons quasi libres (BEQL) provient du fait que la vitesse du projectile v_p est tellement grande par rapport à la vitesse des électrons que ceux-ci sont considérés comme au repos. Un électron peut être diffusé par le champ coulombien du projectile et émettre des photons X. En prenant le système de référence du projectile, on voit que l'énergie maximum est :

$$T_r = \frac{1}{2} m_e v_p^2 \quad (5.13)$$

La valeur de T_r ne change pas beaucoup lorsque l'on repasse dans le système de référence du laboratoire. Pour des protons de 3 MeV, $T_m = 6$ keV et $T_r = 1.6$ keV.

Quand un électron retombe dans son état lié initial dans l'atome ionisé, du bremsstrahlung atomique (BA) est émis. Le BA est la principale composante du bruit de fond pour des énergies supérieures à T_m .

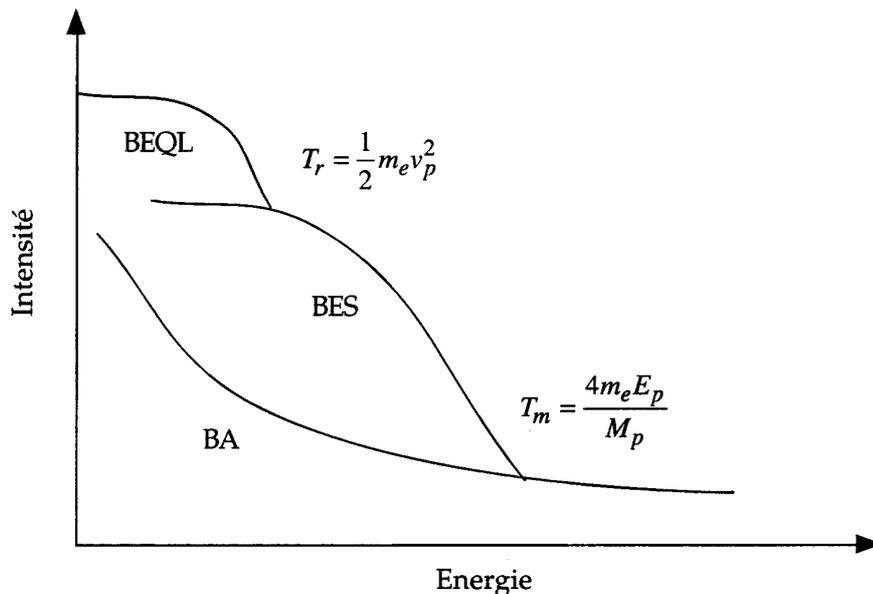


FIG. 5.7 – Bruit de fond total dû au bremsstrahlung décomposé en BES pour la contribution des électrons secondaires, BEQL pour la contribution des électrons quasi libres et BA pour la contribution atomique.

L'autre source de bruit de fond est la radiation γ produite par les réactions nucléaires. Il a deux sources possibles : les réactions nucléaires qui sont produites lors du transport du faisceau incident de la sortie de l'accélérateur jusqu'à l'échantillon et les réactions nucléaires qui sont produites via des éléments légers présents dans l'échantillon lui-même. La première source est minimisée en utilisant des collimateurs en éléments lourds. La deuxième source est impossible à éviter. Comme ce rayonnement γ a des énergies de plusieurs centaines de keV, l'interaction avec le détecteur X dans la région 1-30 keV se fera par effet Compton et donnera un bruit de fond plat.

Nous avons une compréhension adéquate des processus intervenant dans le bruit de fond continu en PIXE. Toutefois, cela ne nous donne pas encore accès à une expression universelle qui puisse être utilisée pour décrire le bruit de fond continu en routine pour l'analyse des spectres PIXE.

5.2.2 Spectromètre de dispersion d'énergie de photons X

Le principe de détection repose sur l'absorption des photons X par un cristal semi-conducteur Si(Li).

Dans une diode Si(Li), les photons X ionisent les atomes de silicium, créant des paires électrons-trous. Pour les séparer et éviter qu'elles se recombinent, la diode est soumise à un potentiel important (environ 750 V) et maintenue à basse température par de l'azote liquide ($T=77$ K). A cette température, l'énergie nécessaire à la création d'une paire électron-trou ϵ vaut $3.8 eV$. Un photon X, d'énergie E , produit en moyenne $\bar{n} = E/\epsilon$ paires électrons-trous. La charge résultant est directement proportionnelle à l'énergie du photon incident. C'est pourquoi ce système de détection est dit dispersif en énergie.

Les pics caractéristiques observés sur un spectre X ont une forme gaussienne. Le détecteur X étant en mode comptage de particules, l'hypothèse de base est que les particules incidentes obéissent à une statistique poissonnienne. Si, sur un grand nombre de comptages effectués dans le même intervalle de temps, sont comptées en moyenne \bar{n} particules, la probabilité pour que n particules arrivent durant cet intervalle de temps est donnée par la relation :

$$P(n, \bar{n}) = \frac{(\bar{n})^n}{n!} \cdot \exp[-\bar{n}] \quad (5.14)$$

Dans ce cas, la variance V , carré de la déviation standard σ , et qui exprime la moyenne du carré de l'écart à la moyenne, est égale à :

$$V = \sigma^2 = \bar{n} \quad (5.15)$$

Lorsque \bar{n} augmente, la distribution de Poisson se symétrise et conduit à une gaussienne :

$$P(n, \bar{n}, \sigma) = \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot \exp\left[\frac{-(n - \bar{n})^2}{2\sigma^2}\right] \quad (5.16)$$

La largeur à mi-hauteur de cette distribution a pour valeur 2.355σ . C'est une caractéristique importante en spectrométrie à dispersion d'énergie.

De manière conventionnelle, il est admis que des particules d'énergies différentes peuvent être discriminées en énergie si leurs raies caractéristiques sont espacées d'une distance supérieure à leur largeur à mi-hauteur. La résolution énergétique du détecteur est :

$$\frac{\Delta E}{E} = 2.355 \cdot \frac{\sigma}{\bar{n}} = 2.355 \cdot \sqrt{\frac{\epsilon}{E}} \quad (5.17)$$

et donne une résolution absolue :

$$\Gamma = \Delta E = 2.355 \cdot \sqrt{\epsilon \cdot E} \quad (5.18)$$

La relation 5.18 conduit, pour un photon X de 5.9 keV (raie K_α du manganèse), à une résolution théorique de 350 eV. L'expérience montre que la résolution du détecteur se situe autour de 140 eV ce qui remet en cause l'hypothèse initiale de la statistique poissonnienne. Pour produire en moyenne une paire électron-trou, une énergie de l'ordre de trois fois la largeur de la bande interdite est nécessaire, ce qui montre qu'une partie de l'énergie est

perdue dans le réseau sous forme de phonons⁴. C'est cette fraction d'énergie qui donne le caractère aléatoire à la conversion photon X / paire électron-trou. Il faut introduire un facteur correctif F, appelé *facteur de Fano*, dans l'expression de la résolution :

$$\Gamma = 2.355 \cdot \sqrt{(F \cdot \epsilon \cdot E)} \quad (5.19)$$

En pratique, ce facteur est proche de 0.12 pour le silicium. Si nous reprenons l'exemple du photon X émis par la raie K_α du manganèse, nous aboutissons à une résolution de 120 eV. A cette valeur, il faut ajouter la contribution des différents bruits de la chaîne d'amplification Γ_a qui se situe autour de 100 eV. Ce qui nous donne finalement une résolution de :

$$\Gamma = \left[\left(2.355 \cdot \sqrt{(F \cdot \epsilon \cdot E)} \right)^2 + \Gamma_a^2 \right]^{1/2} \quad (5.20)$$

La charge induite dans le cristal est convertie en tension par un préamplificateur JFET⁵, refroidi lui aussi par azote liquide. Le signal est amplifié, numérisé et mémorisé par un analyseur multicanal (10 eV/canal).

Deux phénomènes dus au détecteur peuvent modifier les résultats obtenus : le pic d'échappement du silicium et les pics d'empilement.

le pic d'échappement

L'effet du pic d'échappement se rencontre dans tous les détecteurs à ionisation. Lorsque l'énergie E_0 d'un rayonnement incident monochromatique est supérieure à l'énergie d'excitation W_K du niveau K des atomes du détecteur, un certain nombre de photons induisent l'émission du rayonnement K de ces atomes. Une partie des photons secondaires s'échappe sans produire d'effet de détection, un élément étant relativement transparent à son propre rayonnement K ; leur énergie E'_K est perdue pour la mesure. Pour le détecteur tout se passe comme s'il y avait deux énergies de photons incidents, E_0 et $E_0 - E'_K$. On observe deux pics de distribution d'énergie, un pic normal centré sur E_0 et un pic plus large, appelé *pic d'échappement*, centré sur $E_0 - E'_K$. Ce phénomène ne devient gênant que lorsque l'intensité d'émission secondaire est importante. Or, le rendement de fluorescence n'est pas très élevé dans les détecteur Si(Li).

les pics "somme"

Lorsque deux impulsions, associées à deux photons X de même énergie caractéristique d'un élément en forte concentration, arrivent quasi simultanément dans le détecteur, ce dernier ne peut les séparer. Il apparaît sur le spectre une augmentation de l'intensité du rayonnement continu s'étalant depuis l'énergie du rayonnement caractéristique au double de cette énergie (somme des deux photons X). Ces pics risquent d'être confondus avec des raies d'éléments existant dans la cible. Néanmoins, ils ont la particularité d'être dissymétriques.

5.2.3 Analyse quantitative

Comme la perte d'énergie encourue par un ion entre chaque collision inélastique est très petite, sa trajectoire est quasi rectiligne. Le profil énergétique le long de cette ligne est connu grâce au pouvoir d'arrêt de la matrice (Eq. 5.2).

⁴quanta de vibration.

⁵transistor à effet de champ.

Pour un constituant distribué de façon homogène et ayant un numéro atomique Z , une masse atomique A_Z et une concentration C_Z , le nombre dN de photons X émis pour une raie particulière et produits sur une distance dx est donné par la relation suivante :

$$dN = \frac{N_i \cdot \mathcal{N} \cdot C_Z \cdot \sigma(Z, E) dE}{A_Z \cdot S_M(E)} \quad (5.21)$$

où

N_i est le nombre d'ions

\mathcal{N} est le nombre d'Avogadro

$\sigma(Z, E) = \sigma^{ion}(Z, E) \cdot \omega_Z \cdot p_Z$ est la section efficace de production de la raie considérée pour un ion d'énergie E .

Si on définit les angles ϕ et θ respectivement comme l'angle d'incidence du faisceau et de détection des photons X par rapport à la normale à la surface de l'échantillon, l'intensité des raies de l'élément étudié a un facteur de transmission $T_Z(E)$ égal à :

$$T_Z(E) = \exp \left[- \left(\frac{\mu}{\rho} \right)_{Z,M} \frac{\cos \phi}{\cos \theta} \int_{E_0}^{E_f} \frac{dE}{S_M(E)} \right] \quad (5.22)$$

où le coefficient d'atténuation de masse de la matrice $(\mu/\rho)_{Z,M}$ est la somme pondérée par leur concentration des coefficients d'atténuation de masse (μ/ρ_Z) des éléments majeurs de la matrice. Nous indiquons sur la figure 5.8 le coefficient d'atténuation pour divers matériaux.

L'intégration sur tous les segments de la trajectoire de l'ion donne l'intensité totale ou rendement de chacune des raies X résultant du passage de N_i ions dans l'échantillon :

$$Y(Z) = \frac{N_p \cdot \mathcal{N} \cdot C_Z}{A_Z} \int_{E_0}^{E_f} \frac{\sigma(Z, E) \cdot T_Z(E)}{S_M(E)} dE \quad (5.23)$$

où E_0 et E_f sont les énergies incidente et de sortie des ions de l'échantillon.

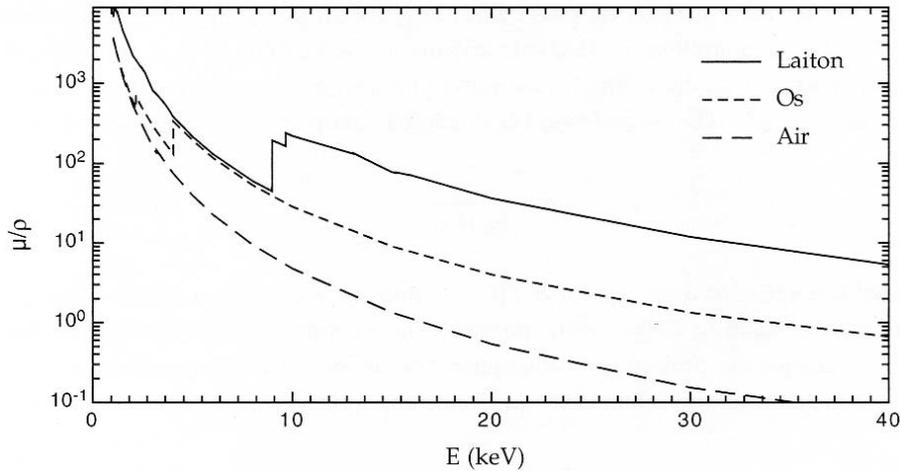


FIG. 5.8 – Facteur d'atténuation pour du laiton, de l'os et l'air.

L'intégrale dans l'équation 5.23 représente les effets de matrice, c'est-à-dire l'influence des éléments majeurs d'un échantillon sur la détermination de tout élément constitutif de cet échantillon. Le fait que les effets de matrice soient physiquement simples et que les bases de données sur ces effets soient relativement abondantes donne un avantage certain à

la PIXE par rapport à d'autres techniques d'analyse où les effets de matrice sont difficiles à calculer et ne sont pas toujours reproductibles.

La relation 5.23 se simplifie lorsque l'échantillon est considéré comme mince : il n'y a pas d'effet d'absorption, ni de variation de la section efficace. On obtient la relation simplifiée :

$$Y(Z) = \frac{N_p \cdot \mathcal{N} \cdot C_Z}{A_Z} \cdot \sigma(Z, E_0) \cdot m_Z \quad (5.24)$$

avec m_Z la masse superficielle de l'élément Z (g/cm²).

On remarque que l'équation 5.24 et l'équation 4.2 sont équivalentes.

Le cas des échantillons épais est plus délicat à traiter car il implique une connaissance préalable des concentrations en éléments majeurs de l'échantillon pour tenir compte des effets de matrice.

5.2.4 Calcul des concentrations avec le logiciel GUPIX

procédure d'ajustement

Nous avons utilisé dans notre étude le logiciel GUPIX, développé à l'Université de Guelph, Canada par Maxwell et Campbell [59]. Ce programme détermine les intensités des pics de photons X caractéristiques par la procédure d'ajustement d'un spectre modélisé M_j au spectre mesuré Y_j contenant j pics en utilisant la technique non-linéaire des moindres carrés.

Le spectre théorique est construit sur la base des données contenant les énergies des photons X (K, L, M, ...) [60], les rendements de fluorescence, les intensités relatives des raies.

Le logiciel élimine la contribution de l'émission continue en utilisant un filtre "Top Hat" dont le fonctionnement est donné en annexe. Ce spectre est ensuite modifié pour refléter les effets d'efficacité du détecteur, les effets d'un filtre éventuel placé devant le détecteur et des effets de matrice. Les effets de la matrice sont calculés sur une base de données des sections efficaces d'ionisation des protons et des pouvoirs d'arrêt et des coefficients d'atténuation massique des photons X.

La description de chaque spectre implique de nombreux paramètres. Pour réduire le nombre de variables dans la procédure d'ajustement, la relation suivante est utilisée pour déterminer l'énergie de chaque rayonnement X :

$$c(E) = a_1 + a_2 E + a_3 E^2 \quad (5.25)$$

où c est la position du canal de mesure correspondant au maximum de pic et E est l'énergie de la raie des photons X.

Le paramètre a_3 est en pratique proche de zéro. Pour de nombreux matériaux les éléments majeurs sont des éléments de faible numéro atomique (Si, Ca, P, ...) et les spectres d'émission X présentent des raies d'émission X intenses dans les domaines des faibles énergies ($E \leq 4$ keV). Les paramètres a_1 et a_2 de la relation 5.25 sont déterminés principalement à partir des positions des pics intenses de la matrice pour calibrer l'énergie de l'ensemble des raies d'émission dans la totalité du spectre. Une erreur, même très faible, sur les paramètres a_1 et a_2 , produit une calibration erronée des pics de haute énergie. L'introduction du paramètre a_3 non nul peut se révéler indispensable pour caractériser un pic de faible intensité situé dans le domaine des hautes énergies.

La relation entre la largeur des pics et l'énergie est déterminée par la formule suivante :

$$\sigma(E) = \sqrt{a_4 + a_5 E} \quad (5.26)$$

Les paramètres a_4 et a_5 sont déterminés pour caractériser la largeur des pics.

La procédure d'ajustement du spectre analytique calculé au spectre expérimental est réalisée par la méthode des moindres carrés pondérés, développée par Marquardt [61]. Le logiciel traite un spectre jusqu'à 2048 canaux, bien que le nombre usuel de canaux soit 1024. Un maximum de 60 éléments peut être pris en compte. Le procédé d'ajustement par minimisation de la valeur χ^2 (degré de liberté) sur chaque valeur ajustée est donné par la formule suivante :

$$\chi^2 = \sum_j (Y_j - M_j)^2 W_j \quad (5.27)$$

où W_j est le poids de chaque canal.

calcul des concentrations

Pour une cible donnée, l'intensité mesurée $I(Z)$ du rayonnement caractéristique est donnée par la formule suivante :

$$Y(Z) = \Omega Q C_Z \epsilon_Z^i T_Z M(Z) \quad (5.28)$$

où

$M(Z)$ est l'intensité théorique calculée par unité de concentration, par stéradian et par μC .

C_Z est la concentration de l'élément de numéro atomique Z .

Q est la charge mesurée (μC).

ϵ_Z^i est l'efficacité intrinsèque du détecteur.

T_Z est la transmission des photons X par l'éventuel filtre disposé devant le détecteur.

Ω est l'angle solide en stéradian.

Après ajustement du spectre et connaissant les divers facteurs expérimentaux cités ci-dessus, il est possible de calculer les concentrations des éléments présents dans l'échantillon.

estimation des erreurs

L'erreur sur la mesure est en partie due à l'erreur statistique sur la surface des pics. Elle s'exprime par :

$$\sigma_N^2 = \sigma_B^2 + \sigma_P^2 + \sigma_O^2 \quad (5.29)$$

P est le nombre d'impulsions sous le pic sans bruit de fond.

B est le nombre d'impulsions dues au bruit de fond.

$N = P + B$ est le nombre total d'impulsions.

O est le nombre d'impulsions compris dans l'aire de la partie chevauchée par le pic considéré avec un autre pic voisin.

Le nombre d'impulsions reçues dans le détecteur suit une loi statistique de Poisson, d'où :

$$\sigma_X = \sqrt{X} \text{ avec } X = P, N, \dots$$

L'erreur totale est estimée par $\sqrt{N + B} = \sqrt{P + O + 2B}$, l'erreur statistique relative (en pourcentage) est :

$$\text{erreur statistique en } \% = 100 \times \frac{\sqrt{P + O + 2B}}{P} \quad (5.30)$$

Le programme GUPIX estime une autre erreur notée +1 % overlaps (chevauchement) qui combine le pourcentage d'erreur statistique à une erreur systématique représentée par 1 % sur l'aire de la partie chevauchée du pic avec le pic voisin. Cette erreur comprend les erreurs inhérentes aux paramètres physiques de la base de données. Cette erreur globale est donnée par :

$$+1 \text{ \% overlaps} = 100 \times \frac{\sqrt{P + O + 2B}}{P} + \frac{O}{P} \quad (5.31)$$

Une autre source d'erreur estimée par le logiciel est l'erreur de mesure de l'aire de chaque pic principal. L'erreur sur la détermination de la hauteur du pic est pratiquement plus importante que celle affectant la largeur de ce pic. Cette erreur, liée à la procédure d'ajustement, dépend des conditions initiales fixées pour l'ajustement, par exemple l'étalement d'énergie du pic.

Enfin, il est au soin de l'utilisateur du programme GUPIX d'estimer les erreurs induites par les facteurs instrumentaux, par exemple la mesure de la charge.

L'erreur totale sur les mesures s'obtient en faisant la somme quadratique de toutes les erreurs citées ici.

limites statistiques de détection

L'intensité N_P d'un signal caractéristique est significativement distinguée de l'intensité N_B du fond continu sous-jacent lorsqu'elle est supérieure à trois fois l'écart type de la moyenne estimée du fond continu, soit :

$$N_p \geq 3\sqrt{N_B} \quad (5.32)$$

La valeur limite de détection (notée LOD⁶) est :

$$\text{LOD} = \frac{3\sqrt{N_B}}{N_{Tem}} \quad (5.33)$$

où N_{Tem} est l'intensité de l'élément analysé dans un échantillon de référence.

N_{Tem} est calculée à partir de la base de paramètres fondamentaux et instrumentaux d'où l'équation utilisée par le programme GUPIX :

$$\text{LOD (ppm)} = \frac{3\sigma}{Q H M(Z) \epsilon_Z T_Z} \quad (5.34)$$

où σ est la déviation standard : $\sigma = \sqrt{B + O} + 0.01 \times O$

D'après la formule 5.34, on remarque que la limite statistique de détection dépend de l'émission continue, et du chevauchement des pics qui affecte la mesure de l'intensité du rayonnement analysé. Lorsqu'un filtre est utilisé, la faible transmission des photons X joue un rôle important pour la limite de détection. Dans le cas général, la limite de détection d'un élément dépend de la matrice qui le contient. La détection des éléments lourds dans des matrices légères est le cas le plus favorable. Notons que la formule 5.34 ne fait appel qu'à des considérations statistiques affectant les intensités des rayonnements caractéristiques et continus, mais qu'elle ne comporte aucune information concernant la justesse des analyses au voisinage des seuils de détection.

⁶Limit Of Detection.

5.3 Technique RBS

La méthode d'analyse par diffusion de Rutherford [62][63] est basée sur les interactions coulombiennes entre noyaux atomiques. Elle consiste à mesurer le nombre et l'énergie des ions d'un faisceau qui sont rétrodiffusés après interaction avec les noyaux des atomes de l'échantillon. Cette information rend possible la détermination de la masse atomique et des concentrations élémentaires en fonction de la profondeur.

Quand un échantillon est bombardé avec un faisceau de particules chargées, une petite fraction des particules incidentes entre en interaction coulombienne avec le noyau d'un atome des premiers micromètres de l'échantillon.

L'énergie des particules rétrodiffusées à un angle donné dépend principalement de deux phénomènes. Premièrement, les particules perdent de l'énergie lors de leur passage dans l'échantillon, aussi bien à l'aller qu'au retour. La quantité d'énergie perdue dépend du pouvoir d'arrêt du matériau. Deuxièmement, une particule perdra de l'énergie via la collision elle-même. Cette perte dépendra essentiellement des masses de l'atome cible et du projectile. Le rapport entre l'énergie du projectile avant et après la collision est appelé facteur cinématique.

Le nombre de rétrodiffusions provoquées par un élément particulier dépend de deux facteurs : la concentration de cet élément dans l'échantillon et de sa section efficace de diffusion, qui dépend essentiellement de la taille de son noyau.

Le dispositif expérimental nécessaire à l'analyse RBS est exactement le même que pour la PIXE, excepté le système de détection qui est ici un détecteur de particules chargées, de type détecteur à barrière de surface.

5.3.1 Principe de la méthode

Les paramètres importants pour décrire la collision entre un ion et le noyau d'un atome sont l'angle θ_s entre la direction du faisceau incident et le détecteur, la probabilité que les ions soient diffusés à cet angle, appelée section efficace de diffusion $\sigma(\theta_s)$, et le facteur cinématique $K(\theta_s)$. Le facteur cinématique et la section efficace de diffusion doivent être connus précisément pour pouvoir interpréter le spectre en énergie des ions rétrodiffusés.

Quand un ion de masse M_1 entre en collision avec un noyau atomique de masse M_2 , de l'énergie est transférée vers le noyau. Dans une collision purement coulombienne, l'ion diffusé garde toute son énergie exceptée celle perdue par le recul du noyau, et la cinématique de cette collision élastique est définie par la conservation de l'énergie et du moment. Le facteur cinématique est calculé de façon non-relativiste dans le référentiel du laboratoire par la formule :

$$K(\theta_s) = \left\{ \frac{\sqrt{1 - (M_1/M_2)^2 \sin^2 \theta_s} + (M_1/M_2) \cos \theta_s}{1 + M_1/M_2} \right\}^2 \quad (5.35)$$

Il dépend seulement de l'angle de diffusion et du rapport des masses de l'ion et du noyau atomique ; il ne dépend pas de l'énergie de l'ion incident. Plus l'angle de diffusion est grand, plus l'énergie transférée au noyau est grande. La plus grande énergie transférée correspond à la collision frontale qui donne une diffusion de 180° . Cette diffusion n'est possible que pour des ions incidents plus légers que les noyaux cibles. Le facteur cinématique a une influence directe sur la résolution en masse de la technique. Si on se trouve à un angle de détection proche de 180° et pour $M_2 \gg M_1$, on détermine la séparation en énergie qu'auront deux atomes de masse proche :

$$\Delta E = M_1 E_0 \frac{4 - \delta^2}{M_2^2} \Delta M_2 \quad (5.36)$$

où δ est égal à $\pi - \theta_s$ et E_0 est l'énergie de la particule incidente. Comme tout système de détection a une résolution finie, si on veut séparer des atomes de masse élevée, il faut, soit augmenter l'énergie ou la masse de la particule incidente, soit prendre un angle de détection le plus proche de 180° .

La section efficace de diffusion élastique est habituellement donnée en barn (10^{-24} cm²). Si on considère la collision comme une diffusion à deux corps, on trouve l'expression suivante pour la section efficace dans le système de référence du laboratoire :

$$\sigma(E, \theta_s) = \left(\frac{Z_1 Z_2}{4E} \left(\frac{e}{4\pi\epsilon_0} \right)^2 \right)^2 \cdot \frac{4 \left(\sqrt{1 - \left(\frac{M_1}{M_2} \sin \theta_s \right)^2} + \cos \theta_s \right)^2}{\sin^4 \theta_s \sqrt{1 - \left(\frac{M_1}{M_2} \sin \theta_s \right)^2}} \quad (5.37)$$

qui donne en considérant $M_2 \gg M_1$:

$$\sigma(E, \theta_s) \simeq \left(\frac{Z_1 Z_2}{4E} \left(\frac{e}{4\pi\epsilon_0} \right)^2 \right)^2 \left[\sin^{-4} \frac{\theta_s}{2} - 2(M_1/M_2)^2 \right] \quad (5.38)$$

si on se place de nouveau dans le cas $M_2 \gg M_1$ et pour des angles de détection proches de 180° . Cette expression montre des facteurs importants :

1. dépendance en Z_1^2 : $\sigma(E, \theta_s)$ sera d'autant plus grand que le projectile est de Z élevé.
2. dépendance en Z_2^2 : les atomes de Z importants ont une meilleure probabilité de diffuser les particules incidentes.
3. dépendance en $1/E^2$: plus la particule incidente est rapide, moins elle interagit.
4. $\sigma(E, \theta_s)$ est approximativement inversement proportionnelle à la 4^{ème} puissance de sinus de $\theta_s/2$ quand $M_2 \gg M_1$, ce qui entraîne une augmentation rapide de la section efficace quand on diminue l'angle de diffusion.

Les valeurs de la section efficace dévient des valeurs obtenues par cette relation dans certains cas particuliers. Par exemple, à basse énergie, on doit tenir compte des électrons de l'atome cible. De même, à haute énergie, la distance minimale entre les noyaux des particules incidentes et la cible atteint la taille du noyau lui-même. Dans ce cas, on doit tenir compte des forces nucléaires fortes. Toutefois, pour des énergies de l'ordre du Mev, ces déviations sont mineures et on utilise la relation 5.38 pour évaluer la section efficace de diffusion.

5.3.2 Code de simulation RUMP

Pour le traitement des spectres RBS, nous avons utilisé le programme RUMP. Celui-ci simule la diffusion de particules chargées sur des cibles constituées de couches homogènes en composition et en épaisseur. Ce programme, en fonctionnant de manière itérative et en mode conversationnel, ajuste un spectre expérimental à la simulation du spectre en énergie des particules diffusées dans l'échantillon. La description de la cible se fait couche par couche en précisant la stœchiométrie des différents constituants et l'épaisseur totale de cette couche. Le spectre total des particules diffusées dans chaque couche est obtenu en faisant la somme des contributions de chaque isotope constituant l'échantillon.

La simulation peut être menée dans la plupart des géométries, pourvu que la diffusion se fasse vers l'arrière (angle de diffusion $\theta_s \geq 90^\circ$). La méthode RBS est une méthode absolue par ajustements successifs de la courbe calculée aux points expérimentaux. Elle remonte soit aux teneurs des éléments dans l'échantillon et à leur localisation plus ou moins près de la surface, soit aux quantités des charges reçues. La méthode est utilisée pour étalonner les résultats obtenus en PIXE. Faisant appel à des interactions nucléaires, elle s'affranchit de la liaison chimique, et sa précision atteint le pour-cent si la statistique de mesure est convenable.

Pour réaliser la simulation d'un spectre RBS, le programme RUMP considère que chaque couche de l'échantillon est assimilée à un empilement de sous-couches d'épaisseur élémentaire, de composition uniforme et suffisamment fine pour que la section efficace de diffusion Rutherford en cible mince puisse être utilisée. La simulation s'effectue par sous-couches successives à partir de la surface de la cible. La perte d'énergie dans chaque sous-couche est uniquement fonction de sa composition et de l'énergie du projectile à l'entrée de cette sous-couche. La contribution au spectre en énergie des particules diffusées dans chaque sous-couche est constituée par une brique trapézoïdale (figure 5.9). Le spectre final est construit comme une superposition de toutes ces briques.

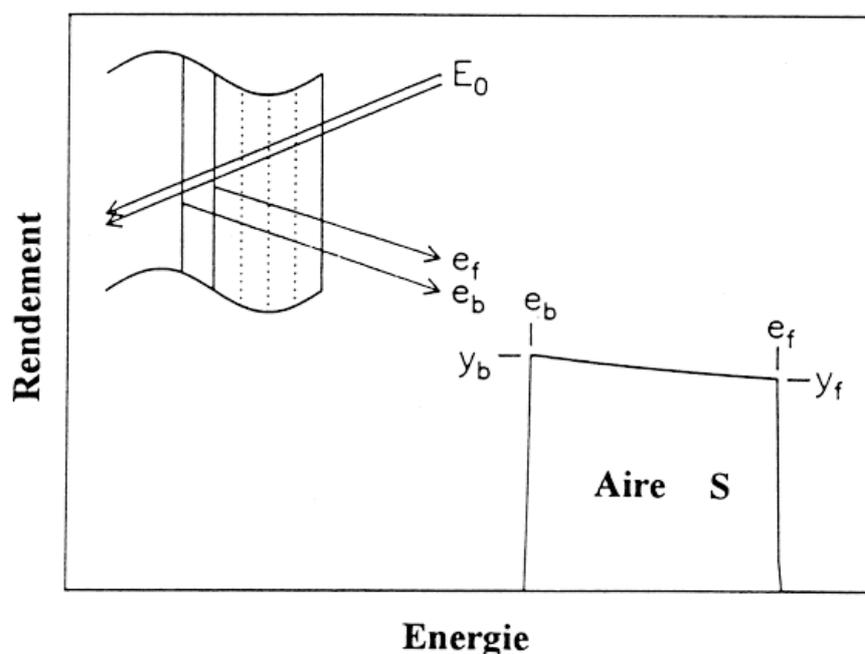


FIG. 5.9 – Caractéristiques d'une brique élémentaire.

Chaque brique élémentaire du spectre en énergie de diffusion est caractérisée par :

- la hauteur y_f à l'énergie e_f de diffusion en début de sous-couche ;
- la hauteur y_b à l'énergie e_b de diffusion en fin de sous-couche ;
- la surface S .

calcul des hauteurs

y_f et y_b sont évaluées à partir d'une généralisation des équations de Chu [62], adaptées pour des empilements de sous-couches.

Dans ce cadre, le rendement de diffusion y_A pour un noyau A à l'interface i entre deux sous-couches est donné par :

$$y_A = \frac{x_A \cdot \sigma(E_i)}{[\epsilon(E_i)]_A \cos \theta_s} \prod_{\text{couches}} \frac{\epsilon(E_{in})}{\epsilon(E_{out})} \quad (5.39)$$

où

E_i est l'énergie du projectile lorsqu'il atteint l'interface i .

x_A est la stœchiométrie (en nombre de noyaux) de l'isotope A dans la sous-couche.

$\sigma(E_i)$ est la section efficace différentielle de Rutherford.

θ_s est la direction d'incidence du faisceau par rapport à la normale.

$\epsilon(E_{in})$ est le pouvoir d'arrêt à l'énergie E_{in} d'un projectile à l'entrée de la sous-couche,

$\epsilon(E_{out})$ est le pouvoir d'arrêt à l'énergie E_{out} d'un projectile à la sortie de la sous-couche.

$[\epsilon(E_i)]_A = K_A \cdot \epsilon(E_i) + \epsilon(K_A \cdot E_i)$ est le facteur de perte en énergie (K_A est le facteur cinématique de diffusion sur l'atome de masse A)

évaluation de la perte d'énergie dans une sous-couche

Les énergies de diffusion aux interfaces de chaque sous-couche sont calculées de manière itérative depuis la surface de la cible, en prenant en compte les pouvoirs d'arrêt de tous les éléments ralentisseurs présents.

Lors du ralentissement d'une particule, la perte d'énergie élémentaire est décrite par $dE = -\epsilon(E)dx$ où dx est le parcours élémentaire dans le matériau, exprimé en atomes/cm² et $\epsilon(E)$ est le pouvoir d'arrêt à l'énergie E dans le matériau considéré.

La variation du pouvoir d'arrêt $\epsilon(E)$ en fonction de l'énergie est décrite par un polynôme de degré 5.

On estime l'énergie $E(x)$ après une distance parcourue x , par un développement en série de Taylor à partir de la surface ($x = 0$).

calcul de la surface S

La surface S est évaluée pour chaque sous-couche d'épaisseur a à partir de l'intégrale suivante :

$$S = \int_0^a \sigma(E(x))dx = C \cdot \int_0^a \frac{dx}{(E(x))^2} \quad (5.40)$$

où C est une constante regroupant, pour un atome diffuseur et un projectile donné, tous les termes de la section efficace de Rutherford indépendants de l'énergie d'incidence E(x).

5.3.3 Résonance dans les sections efficaces de diffusion élastique

Toutes les analyses rapportées dans ce mémoire ont été réalisées à l'aide d'un faisceau de protons. Ce choix est motivé, d'une part, par une section efficace d'ionisation plus grande (c'est-à-dire une meilleure sensibilité en PIXE) pour des protons que pour des particules plus lourdes, et d'autre part, comme nous en discuterons plus loin, le proton est considéré comme étant la particule la moins destructive des échantillons.

La section efficace de diffusion élastique des protons sur les noyaux légers est généralement beaucoup plus élevée que la section efficace de Rutherford pure. Cette augmentation atteint un facteur 7, pour des protons de 2 MeV diffusés sur le ¹²C. La barrière coulombienne est l'énergie minimale qu'une particule doit acquérir pour vaincre le potentiel coulombien répulsif d'un noyau cible. La hauteur de cette barrière est directement proportionnelle au

produit des charges du projectile et du noyau cible. Plus ce noyau est léger, plus facile sera la pénétration de l'ion incident dans le champ coulombien du noyau, et plus il ressentira le potentiel nucléaire. Il en résulte une augmentation de la section efficace. Ce phénomène apparaît lorsque l'énergie du projectile est telle que l'énergie disponible dans le référentiel du centre de masse correspond à un niveau d'excitation du noyau composé (noyau cible + projectile) [64].

Malheureusement, ces sections efficaces ne sont pas toujours connues avec une précision suffisante, surtout à basse énergie (< 1.5 MeV). Les données expérimentales sont souvent parcellaires et ne correspondent que très rarement à la géométrie utilisée (angle de diffusion, ...). En outre, ces données sont anciennes et ne sont pas accessibles sous une forme directement exploitable.

Razafindrabe [65] a utilisé les données expérimentales provenant de différents auteurs pour reconstruire les sections efficaces de diffusion à un angle de 135° dans le référentiel du laboratoire, pour une gamme d'énergie entre 0.5 et 3.0 MeV, pour les éléments C, O et N qui sont particulièrement intéressants pour l'analyse des tissus biologiques. Ces données sont maintenant accessibles au programme RUMP.

5.4 Réactions nucléaires : la méthode PIGE

Dès qu'une particule chargée a une énergie suffisante pour vaincre la répulsion coulombienne, elle peut pénétrer dans le noyau de l'atome et donner une réaction nucléaire :



qui s'écrit habituellement sous la forme : $A(a, b)B$, Q étant l'énergie de réaction.

Connaissant la nature et le nombre de particules incidentes a , la nature et le nombre de particules b émises au cours de l'irradiation, il est possible d'identifier et de quantifier les noyaux A irradiés.

5.4.1 Considérations énergétiques

Comme dans une réaction chimique classique, la réaction nucléaire est endo ou exo-énergétique suivant la valeur de Q . Cette valeur se calcule en fonction des masses exprimées en unité atomique :

$$Q = [m_A + m_a - (m_B + m_b)]^2 \cdot c^2 \quad (5.42)$$

avec m_x avec $x = a, b, A, B$ la masse en unité atomique de l'élément x

Dans le cas où Q est négatif, la réaction nucléaire ne pourra se faire que si l'énergie apportée par la particule incidente est non seulement supérieure à la valeur de Q , mais encore supérieure à une énergie de seuil qui traduit la conservation de la quantité de mouvement :

$$E_s = Q \cdot \frac{m_A + m_a}{m_A} \quad (5.43)$$

Il faut que les particules incidentes puissent atteindre le noyau en quantité suffisante, c'est-à-dire autrement que par effet tunnel, en franchissant la barrière coulombienne de l'atome cible dont l'énergie électrostatique est donnée par la formule :

$$E_c = \frac{Z_a Z_A}{m_a^{1/3} + m_A^{1/3}} \quad (5.44)$$

avec Z_a et Z_A les charges de la particule incidente et de l'atome cible.

5.4.2 Aspects analytiques

analyse quantitative

Le spectre d'énergie des particules émises dans une direction donnée est significatif de l'élément cible et de sa profondeur dans l'échantillon. Comme en RBS, des programmes de calcul [66] ajustent des spectres théoriques aux spectres expérimentaux. En revanche, contrairement à la diffusion élastique, la probabilité de réaction ne se calcule pas simplement. Cette probabilité ou section efficace dépend de l'énergie du faisceau incident, de l'angle de détection, mais elle varie irrégulièrement d'un élément à l'autre. Dans la pratique, les valeurs des sections efficaces sont tirées de tables établies expérimentalement [67]. Les valeurs de ces sections efficaces sont en général plus faibles que celles des diffusions Rutherford.

L'observation directe des réactions nucléaires est particulièrement intéressante pour doser les éléments légers ($Z < 17$) à la microsonde nucléaire. Compte tenu des hauteurs de barrière de potentiel, seuls ces éléments sont excités aux énergies utilisées, avec des valeurs de réactions Q très souvent positives.

résonances

Certaines de ces réactions présentent une brutale augmentation de leur section efficace pour une énergie déterminée de la particule incidente E_R . La réaction est appelée résonnante. De telles réactions sont très utiles pour les analyses en profondeur ; elles permettent la localisation des éléments dans la masse de l'échantillon avec une résolution atteignant 10 nm.

émission γ

Certaines réactions nucléaires émettent des photons γ : c'est la méthode PIGE. Cette méthode utilise principalement des réactions du type : $A(p, x\gamma)B$, par exemple : $^{19}F(p, p'\gamma)^{19}F$. Une étude très complète des possibilités d'analyse offertes par ces réactions a été faite par B. Borderie [68]. Les sections efficaces de ces réactions sont relativement élevées.

5.5 Dispositif expérimental

Nos mesures ont été réalisées auprès des accélérateurs du Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan (CENBG) et du Laboratoire Pierre Süe (LPS) à Saclay, leurs domaines d'applications étant différents. La microsonde du CENBG est beaucoup utilisée dans le domaine du biomédical, alors que la microsonde du LPS est surtout appliquée en science des matériaux et en géologie. Ces deux microsondes conviennent particulièrement pour nos études des biomatériaux en site osseux. Grâce à l'utilisation des deux microsondes, nous avons multiplié les analyses afin d'obtenir des résultats plus représentatifs et d'exploiter les spécificités de chacune des microsondes. Nous avons réalisé particulièrement des cartographies multi-élémentaires au CENBG et des profils de concentrations au LPS.

5.5.1 Microsonde nucléaire du CENBG

La ligne micro-faisceau est implantée auprès de l'accélérateur électrostatique de type Van de Graaff de 4 MV du CENBG, de type vertical, simple étage.

le système optique

L'optique focalisante est constituée par un quadruplet type Dymnikov (quatre quadrupôles magnétiques couplés deux à deux) situé à 6 m des fentes objets. Cette configuration présente l'intérêt d'une symétrie axiale (grandissements identiques dans les plans XZ et YZ) qui autorise l'utilisation de collimateurs objets circulaires et donne une forme finale circulaire à la tache du faisceau. Le rapport de grandissement obtenu est de 1/10 : pour un diaphragme objet de 10 à 50 μm de diamètre, le faisceau peut être concentré sur une tache de 1 à 5 μm de diamètre.

Derrière la dernière lentille quadrupolaire du système optique se trouve le système de déflexion électrostatique qui va permettre au faisceau de balayer la surface de la cible. La déviation électrostatique est réalisée par deux paires de plaques, une pour la déviation horizontale et une pour la déviation verticale.

chambre d'analyse

Un schéma de la chambre d'analyse est présenté sur la figure 5.10.

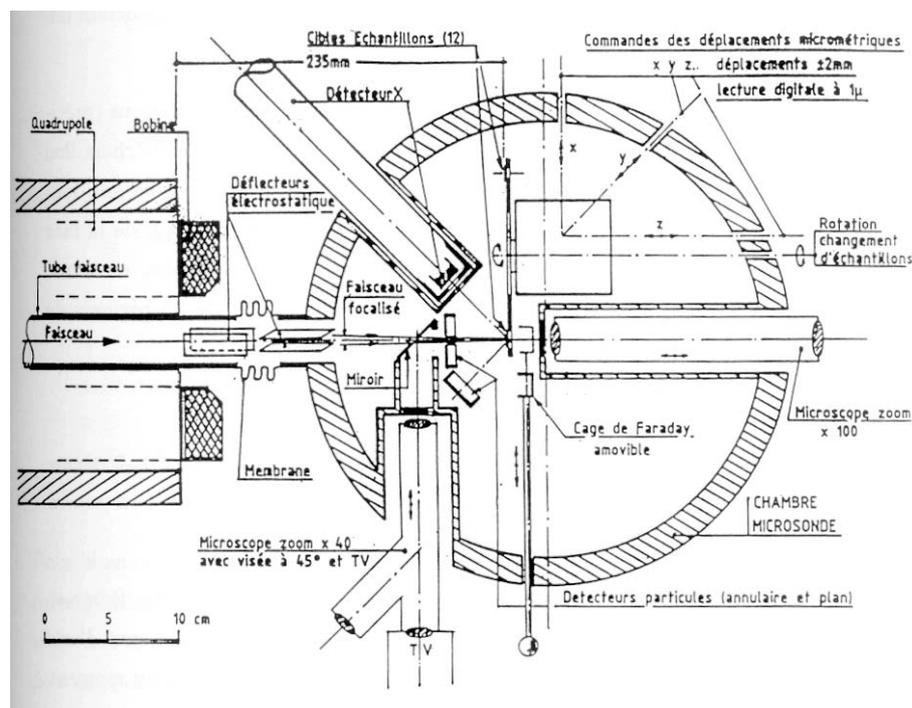


FIG. 5.10 – Schéma de la chambre d'analyse.

La détection du rayonnement X émis est assurée par une jonction Si(Li) placée directement dans la chambre d'analyse dans le plan horizontal à 135° du faisceau. La surface du cristal est de 50 mm^2 , l'épaisseur est de 3 mm. Ce détecteur est équipé d'une fenêtre de béryllium d'une épaisseur de 8 μm . La détection des particules rétrodiffusées est assurée par un détecteur silicium de 20 mm^2 de surface, monté à 135° par rapport à l'axe du faisceau.

Le porte-échantillon est monté sur des platines à déplacement micrométrique (précision $\simeq 1\text{ }\mu\text{m}$) suivant les 3 axes Ox, Oy et Oz ; elles permettent de positionner l'échantillon sous le faisceau. Deux microscopes contrôlent en permanence ce positionnement. Le premier, à

faible grossissement ($\times 40$), autorise la visualisation de la face avant de l'échantillon. Le second (grossissement $\times 100$) fonctionne en transmission. Il est couplé à une caméra vidéo à haute sensibilité qui facilite les réglages de la focalisation du faisceau.

système d'acquisition des données

Les données collectées sont, d'une part, les valeurs des énergies détectées et, d'autres part, la position du faisceau au moment de l'impact sur la cible. Le système permet de gérer deux voies d'acquisition.

Principe de balayage de la cible : le balayage de la cible se fait point par point, de gauche à droite, à partir d'un point d'origine. Il s'effectue en une succession de lignes horizontales. La distance séparant deux points d'une ligne est appelée pas en x. A la fin de la ligne, on passe à la ligne suivante en balayant cette fois de droite à gauche. On obtient un balayage en "zigzag". La distance séparant deux lignes est appelée pas en y. Le nombre et la valeur des pas en X et Y déterminent la taille de la zone balayée. Le nombre de pas est limité à 128 ou 256 selon la résolution requise. Pour chaque événement détecté pendant le balayage, l'énergie (E) et la position (x,y) correspondant à l'impact du faisceau sont pris en compte. Ces données sont triées soit en fonction de E pour obtenir le spectre en énergie, soit en fonction de x et y pour construire les cartographies élémentaires.

Acquisition des données : l'ensemble des événements détectés pendant l'analyse est stocké en mémoire centrale sous forme (E,x,y). Ces données sont sauvegardées régulièrement sur la mémoire de masse du système (disque dur) sous forme de fichiers de 4 Mo de longueur. Ces fichiers peuvent être retraités après analyse. Pendant cette analyse, chaque événement détecté est trié en temps réel de manière à incrémenter le spectre en énergie et la cartographie correspondante. De cette manière, à la fin de chaque balayage (environ 20 secondes), le spectre en énergie est réactualisé ainsi que l'image correspondante. On construit et contrôle, en cours d'analyse, 4 cartographies élémentaires.

Un logiciel développé par l'équipe microsonde du CENBG offre la possibilité de sélectionner n'importe quelle plage de canaux du spectre X ou du spectre RBS et de réaliser une cartographie. Ensuite, on peut extraire les spectres X et RBS, d'une zone choisie pour son intérêt. Les spectres étant ensuite analysés avec Gupix pour le spectre X et Rump pour le spectre RBS.

5.5.2 Microsonde nucléaire du LPS

Le LPS est équipé d'un accélérateur de type Van de Graff de 3.75 MV, de type horizontal, simple étage.

le système optique focalisant du LPS

Entre les fentes "objet" et l'entrée du système de focalisation (5.6 m de distance) on trouve : une cage de Faraday pour contrôler l'intensité du faisceau, quatre fentes en acier inoxydable servant à définir la taille du faisceau, et des collimateurs angulaires afin de limiter la divergence du faisceau.

Le système focalisant est constitué par un doublet de quadrupôle électromagnétique. Le plan image se trouve à 25 cm après le système optique. Cet arrangement permet d'atteindre un faisceau d'un diamètre de 1 μm avec une intensité d'environ 50 pA.

la chambre d'analyse

La chambre d'analyse est équipée pour l'utilisation des méthodes PIXE, RBS, PIGE. La charge est mesurée durant l'expérience via un intégrateur de courant. La détection des photons X est effectuée par une jonction Si(Li) placée directement dans la chambre d'analyse dans le plan horizontal à 135° du faisceau. La surface du cristal est de 50 mm^2 . La fenêtre du détecteur est en béryllium et a une épaisseur de $16 \mu\text{m}$. Les photons γ sont détectés par cristal de germanium placé hors de la chambre d'analyse, et qui peut être placé dans deux positions : 135° ou 0° . Le détecteur des particules rétrodiffusées est un détecteur annulaire en silicium, placé à 170° du faisceau, dans le plan horizontal.

Le repérage des échantillons est possible avec deux caméras optiques. La première donne un aperçu de l'échantillon, la seconde est connectée à un microscope optique cofocal avec un grandissement de $\times 400$. Avec cette caméra, le champ d'observation est de $150 \times 100 \mu\text{m}^2$. Un goniomètre micrométrique à 4 axes sert à se positionner précisément.

le système d'acquisition

L'acquisition des données est basée sur un système multi-paramétrique (MPA/PC de FAST ComTec GmbH) qui admet jusqu'à 8 voies. Seules 4 voies sont dédiées à l'acquisition d'événements physiques, tandis que les autres sont utilisées pour enregistrer la charge, l'horloge et les coordonnées en X et Y du faisceau. Ce système assure une gestion en coïncidence de plusieurs événements, ce qui est indispensable pour l'imagerie par exemple.

Un jeu de logiciel, développé avec LabviewTM, est utilisé pour de nombreuses tâches tels que le positionnement de l'échantillon, le balayage du faisceau (limité à 100 Hz) et le basculement entre les deux caméras optiques.

Il est possible de retraiter les données après leurs acquisitions avec les logiciels MPA/PC et d'extraire les spectres X et RBS exploitables respectivement par les logiciels Gupix et Rump.

5.6 Dégâts d'irradiation.

Pour les différentes méthodes de dosage utilisées avec une microsonde nucléaire, la sensibilité et la limite de détection locale sont tributaires de la statistique de mesure. Pour mesurer un nombre d'événements assurant une statistique suffisante, il faudra augmenter le nombre de charges reçues par unité de surface. Cela peut se traduire par des dommages susceptibles de fausser le résultat des mesures. Le mécanisme des dommages particule-matière commence à être bien connu dans le cas de faisceaux d'électrons. Il n'en est pas de même pour les faisceaux d'ions légers à une énergie incidente de l'ordre de quelques MeV. Plusieurs phénomènes sont identifiés.

5.6.1 Mécanismes des dommages

migration des éléments sous irradiation

Cette migration a été étudiée sous un faisceau d'électrons [69] et elle est souvent mise en évidence lors des analyses avec un faisceau d'ions, notamment dans les verres [70] et les semi-conducteurs. Les mécanismes sont complexes et encore mal connus, mais l'ionisation le long de la trajectoire de l'ion incident joue certainement un rôle prépondérant. Certains éléments paraissent beaucoup plus mobiles que d'autres.

érosion

Avec des ions légers ayant une énergie incidente de quelques MeV, l'érosion de surface est généralement considérée comme négligeable, tout au moins pour des cibles épaisses. Toutefois, elle dépend de l'énergie de liaison et conduit à des erreurs dans le cas de matériaux faiblement liés tels les matériaux biologiques ou organiques. Dans ce cas encore, le dépôt d'un film en surface peut réduire le phénomène.

5.6.2 Elévation de température

C'est l'effet le plus apparent : la plus grande partie de l'énergie est dissipée dans la cible et transformée en chaleur. La température de l'échantillon s'élève jusqu'à ce qu'un équilibre thermique s'établisse. Pour les micro-faisceaux, il est généralement admis que les pertes par conduction sont dominantes. En reprenant les travaux de Talmon et Thomas pour les électrons [71], plusieurs auteurs [72][73][74] ont calculé la température maximale atteinte par un échantillon mince, placé dans un support refroidi, et irradié uniformément. Suivant la nature du matériau irradié, l'élévation de température varie de plusieurs ordres de grandeur et aboutit rapidement à la fusion de l'échantillon au point d'impact. Pour ramener l'échauffement à des valeurs acceptables tout en conservant une intensité de courant compatible avec des déterminations précises, un dépôt conducteur en surface, de carbone ou d'or, est couramment utilisé [75].

influence du balayage du faisceau

Les effets du balayage du faisceau sur l'élévation de température de l'échantillon sont très difficiles à évaluer [76].

Un des paramètres les plus importants, est la fréquence de balayage⁷. L'inverse de cette fréquence représente la durée d'un pas du balayage, c'est-à-dire, le temps durant lequel le faisceau ne bouge pas. Ce temps doit être comparé au temps caractéristique de conduction de chaleur et à l'énergie déposée par le faisceau. Pour un ion individuel pénétrant la matière, Le Moel et Duraud [77] ont estimé que l'équilibre thermique local s'établit entre 10^{-12} et 10^{-9} seconde, soit une durée plus courte que les durées des pas de balayage habituellement utilisés. En effet, les fréquences de balayage couramment utilisées sont comprises entre 1 Hz et 1 kHz. Cholewa *et al.* [78] ont conclu que les fréquences de balayage utilisées sont suffisamment rapides pour que la température de la surface de l'échantillon soit uniforme, mais suffisamment lente pour qu'un équilibre thermique s'établisse.

Cholewa *et al.* estiment à partir du modèle théorique de Cookson [74] que l'utilisation d'un faisceau de proton de 3 MeV sur une feuille de nylon, avec un balayage et à une fréquence considérée comme infinie devant les processus physiques évoqués, réduit l'élévation de température. D'un point de vue pratique, il faut évaluer la limite en dessous de laquelle la fréquence de balayage est considérée comme infinie. Pour une fréquence de balayage lente, Cookson [74] a montré que la température au centre du faisceau est comparable à celle obtenue dans le cas d'un faisceau fixe. Pour réduire cette valeur, il préconise une fréquence de balayage d'au moins 1 kHz.

Ces calculs théoriques dépendent des paramètres physiques des échantillons, tels que la conductivité thermique et la capacité calorifique. Pour des échantillons biologiques, ces données sont généralement difficiles à obtenir. De plus, les dommages causés par l'irradiation modifient ces paramètres. Malgré l'amélioration des modèles, ceux-ci ne sont pas encore en accord avec l'expérience.

⁷ nombre de pixels irradiés par seconde.

5.6.3 Pertes d'éléments

La perte d'éléments est un problème qui a été révélé, quand les premières applications biomédicales ont été développées. A ce jour, plusieurs études ont été réalisées sur des échantillons variés afin d'obtenir des données expérimentales. Les processus physiques et chimiques qui sont responsables de la perte d'éléments sous irradiation ne sont pas bien compris, mais plusieurs recommandations utiles pour minimiser cet effet ont été avancées à la suite des différentes études réalisées.

Les ionisations abondantes le long de la trace de la particule incidente contribuent à casser un certain nombre de liens chimiques, ce qui ne conduit pas nécessairement à une migration des éléments. Mais l'augmentation de température de l'échantillon pourrait faciliter la diffusion et l'échappement de composés volatils formés durant l'irradiation. Ceci implique qu'on réduit ce phénomène en contrôlant l'élévation de température. D'un autre côté, il est impossible de limiter cet effet radiolytique, dépendant de la dose reçue par l'échantillon, sans une réduction de la sensibilité des analyses.

le monitoring élémentaire

Le monitoring des pertes élémentaires est mis en œuvre en mesurant les concentrations élémentaires en fonction du temps. La PIXE est utilisée pour les minéraux et autres éléments lourds, le RBS est utilisé pour la mesure du carbone et de l'oxygène, tandis que le bremsstrahlung reflète la masse organique totale de l'échantillon irradié [76].

Des preuves de perte d'éléments ont été obtenues dans des échantillons biologiques irradiés [79][80]. Les minéraux (Na, P, S, Cl, K, Ca . . .) ont été examinés dans des tissus vivants grâce à la méthode PIXE. Les résultats sont variés : certains éléments peuvent se révéler stables dans certains échantillons et instables dans d'autres. On observe parfois une augmentation apparente de la concentration d'un élément. Les auteurs [81][82] concluent qu'un rétrécissement de l'échantillon dû à l'élévation de température entraîne une augmentation graduelle de la masse sous faisceau. Une explication alternative, mais moins plausible, est basée sur l'éventuelle migration d'éléments spécifiques à travers la zone irradiée [79].

Les données sur les éléments traces plus lourds sont moins abondantes, mais aucune perte d'éléments n'a été observée.

En ce qui concerne les éléments organiques, le carbone et l'azote semblent relativement stables sous faisceau, tandis que l'oxygène et l'hydrogène sont particulièrement volatils. Themner [81] a évalué la perte de masse, pour un échantillon de peau, à 16 % due aux pertes d'éléments de l'hydrogène et de l'oxygène.

influence des paramètres d'irradiation

Les paramètres d'irradiation qui pourraient influencer l'importance de ces pertes d'éléments sont la densité de courant (et par conséquent la taille du spot), la taille de la zone balayée, la fréquence de balayage et la température de l'échantillon. Ces différents paramètres ont été contrôlés dans plusieurs études [81][78].

Themner [81] a démontré que la fréquence de balayage n'a pas d'influence significative sur la perte d'hydrogène et de carbone (en tout cas dans la gamme 1 Hz à 1 kHz) ; pour l'oxygène l'utilisation d'une fréquence de balayage à 1 kHz apporte une faible amélioration. Dans cette même étude, Themner a montré que la perte d'hydrogène est dépendante de l'élévation de température au sein de la zone irradiée. De plus, Themner a montré que la perte d'hydrogène était la même quelque soit l'épaisseur de l'échantillon, ce qui signifie que

la perte d'élément est un phénomène qui touche le volume irradié et non simplement la surface.

en conclusion :

Les différents comportements mis en avant dans ces études montrent une forte dépendance de l'état chimique de l'échantillon. Il est difficile d'extrapoler directement ces résultats aux différents tissus biologiques. Llabador et Moretto [76] préconisent de vérifier les pertes de masses et les dommages causés par l'irradiation en général pour tout nouveau échantillon biologique étudié. Ils recommandent aussi l'utilisation d'un faisceau de protons plutôt qu'un faisceau de particules α .

Troisième partie

Résultats expérimentaux et
interprétation

Chapitre 6

Caractérisation des revêtements au cours du temps

Nous allons, dans ce chapitre, rechercher des modifications de caractéristiques des revêtements en verre BVA et BVH grâce aux techniques expérimentales décrites précédemment.

6.1 Observation de l'ostéointégration des revêtements par SEM et par histomorphométrie

6.1.1 Préparation des échantillons

Nous disposons des coupes réalisées suivant la méthode indiquée au chapitre 3.

Les lames de plexiglas sont adaptées au porte-échantillon du microscope optique utilisé pour les études histologiques (histomorphométrie et histopathologie). Elles sont réduites à une taille de $1 \times 1 \text{ cm}^2$ avec une scie à ruban classique. Ces échantillons vont être analysés avec le microscope électronique à balayage mais aussi, comme nous le verrons plus loin, avec les méthodes PIXE, PIGE et RBS. Cette nouvelle mise en forme n'abîme pas les coupes car seul le plexiglas est réduit, on ne touche pas à la coupe proprement dite. De plus, il est maintenant possible de disposer plusieurs échantillons sur les différents porte-échantillons.

Les échantillons avec revêtement sont observés au microscope électronique à balayage, à chaque délai d'implantation. Les images sont réalisées en mode "électrons rétrodiffusés" pour le contraste chimique. Les tensions accélératrices sont de 12 kV et de 20 kV, les grossissements de $\times 10$ à $\times 600$. Les plus faibles grossissements ($\times 10$ à $\times 150$) servent à repérer les zones où seront faites les analyses par microsonde nucléaire.

6.1.2 Verre BVA

3 mois après implantation

Les clichés montrent un revêtement d'épaisseur non constante et inférieure à l'épaisseur initiale. Dans la figure 6.1, le revêtement est en contact avec une lacune osseuse, remplie de résine lors de la préparation des échantillons. On remarque à certains endroits que la résine a été détériorée par le faisceau d'électrons. Les autres structures (os, prothèse, revêtement) ont une bonne tenue sous faisceau. Dans la figure 6.2, le revêtement est en contact avec l'os.

Sur ces deux clichés, le verre BVA se transforme en une structure hétérogène. D'après sa composition initiale, BVA est bioactif (zone A du triangle de Hench). Il se transforme

selon les processus physico-chimiques indiqués au chapitre 2.3.

Sur le cliché 6.2, on remarque que seule la partie en contact direct avec l'os s'est transformée, alors que le reste du volume du revêtement a une composition différente et homogène. Dans le cas d'un contact avec une lacune osseuse, tout le volume de la couche de BVA s'est transformé. La dégradation du revêtement se fait par hydrolyse. Or, dans le cas d'un contact avec une lacune, le revêtement est régulièrement en présence des liquides biologiques. Ceci explique vraisemblablement cette différence de comportement entre les deux types de contact. Le même phénomène avait été observé pour le verre bioactif A9 [33].

6 mois après implantation :

Le revêtement s'est en très grande partie dissous et a été remplacé par de l'os néoformé, non mature. Dans de larges zones, cet os est en contact direct avec la prothèse métallique. Comme le montre la figure 6.3, la prothèse est bien intégrée dans le milieu osseux (ostéointégration). La figure 6.4 illustre, avec un plus fort grossissement, l'os néoformé. Le contraste chimique fait voir une différence de composition entre cet os nouveau et l'os initial, plus ancien.

12 mois après implantation :

Le revêtement a disparu mais on observe des restes de verre en cours de dissolution, à l'intérieur de lacunes de résorption (figure 6.5). L'absence de contraste dans l'os suggère que l'os néoformé est devenu mature. La quasi-totalité des implants est recouverte d'os en contact direct.

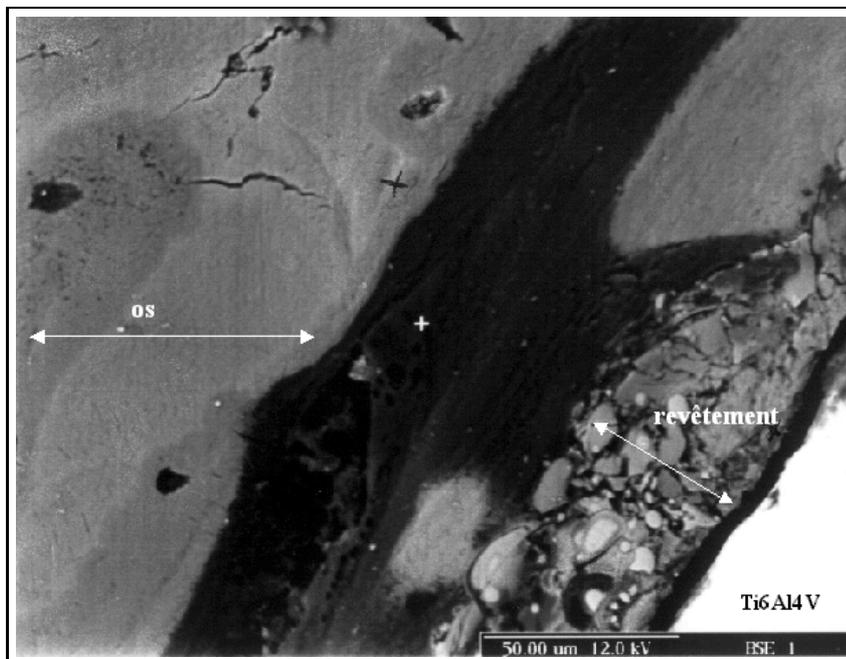


FIG. 6.1 – Cliché SEM ($\times 600$) d'un cylindre de Ti6Al4V recouvert de BVA, après 3 mois d'implantation, en contact avec une lacune osseuse.

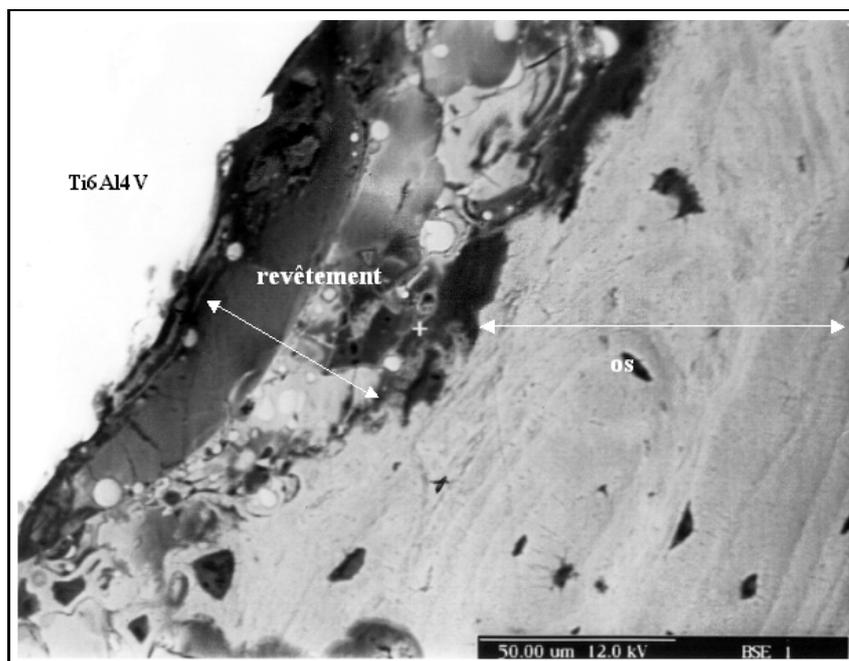


FIG. 6.2 – Cliché SEM ($\times 600$) d'un cylindre de Ti6Al4V recouvert de BVA, après 3 mois d'implantation, en contact direct avec l'os.

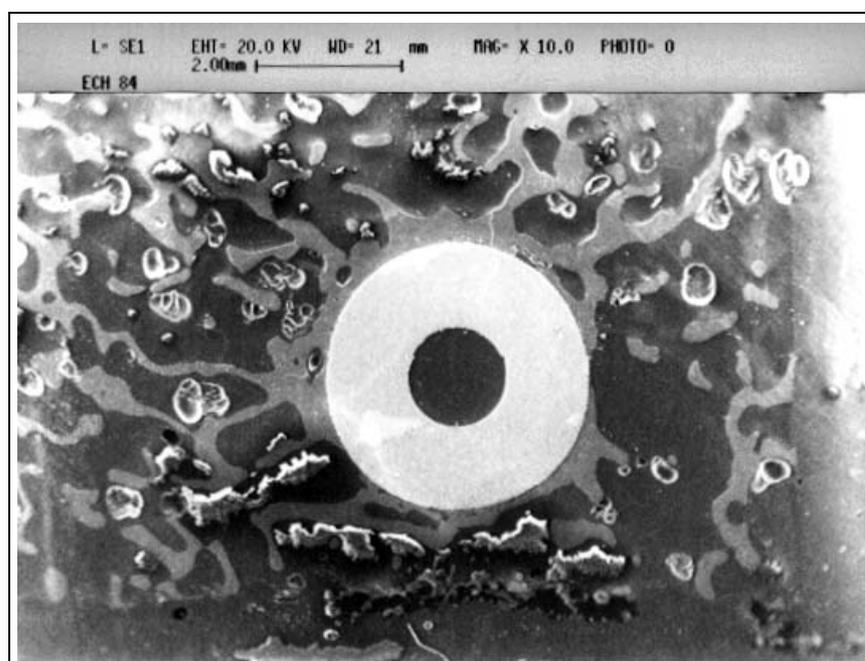


FIG. 6.3 – Cliché SEM ($\times 10$) d'un cylindre de Ti6Al4V recouvert de BVA, après 6 mois d'implantation. Ostéointégration.

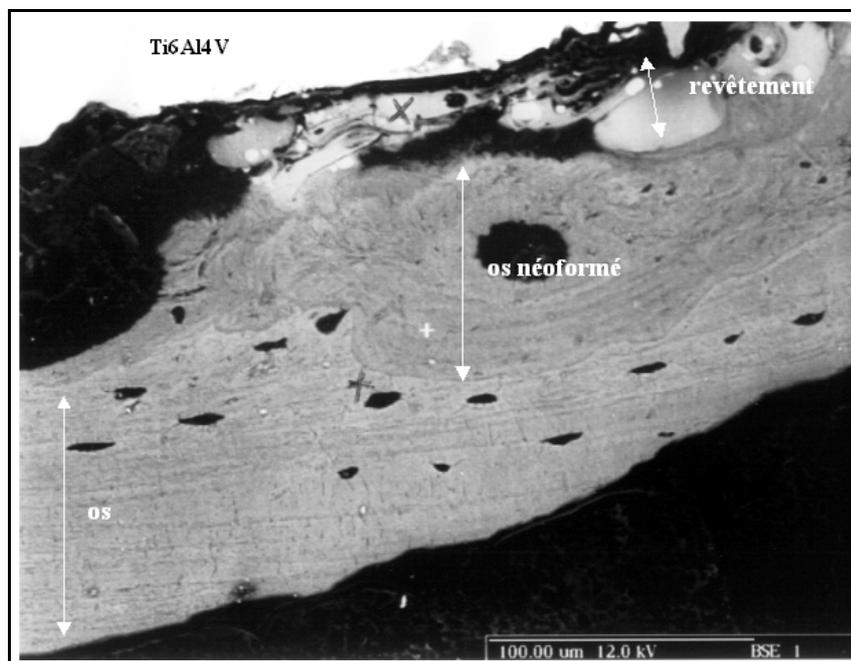


FIG. 6.4 – Cliché SEM ($\times 500$) d'un cylindre de Ti6Al4V recouvert de BVA, après 6 mois d'implantation. Observation de l'os néoformé.

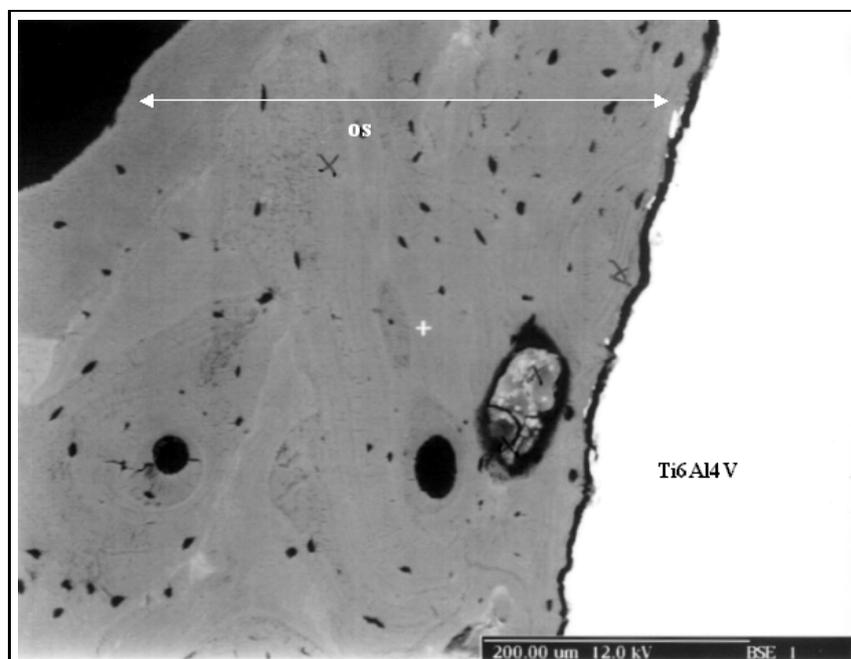


FIG. 6.5 – Cliché SEM ($\times 200$) d'un cylindre de Ti6Al4V recouvert de BVA, après 12 mois d'implantation. Observation de l'os néoformé.

6.1.3 Verre BVH

3 mois après implantation :

Sur la figure 6.6, le revêtement est homogène en composition, et il est en contact direct avec l'os. Il ne semble pas que le verre ait subi d'hydrolyse. Contrairement au verre BVA (et A9), on ne distingue pas de différence lorsque le revêtement est en contact avec l'os ou avec une lacune. La composition du verre BVH, toujours d'après le triangle de Hench, le rend bioinerte.

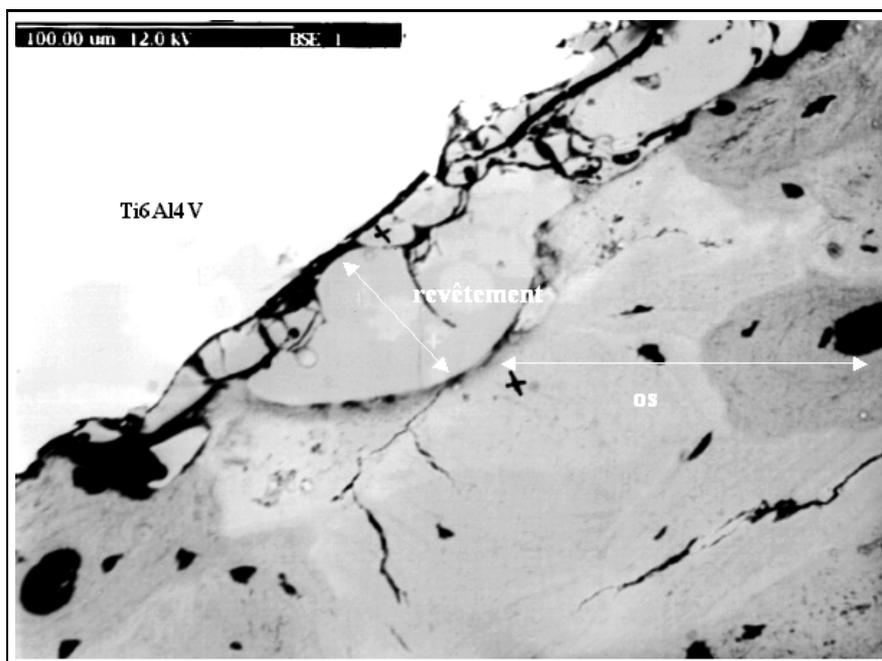


FIG. 6.6 – Cliché SEM ($\times 400$) d'un cylindre de Ti6Al4V recouvert de BVH, après 3 mois d'implantation

6 mois après implantation :

Le verre BVH n'est pas transformé comme BVA en un hydrogel de silicium. Cependant, les grains de verre ne sont plus solidaires entre eux, et leur taille se réduit lentement (figure 6.7). Dans certaines zones, le revêtement s'est détaché de la prothèse et il est remplacé par de l'os néoformé (figure 6.8). L'observation, à plus faible grossissement, montre clairement que l'implant n'est toujours pas ostéointégré (figure 6.9).

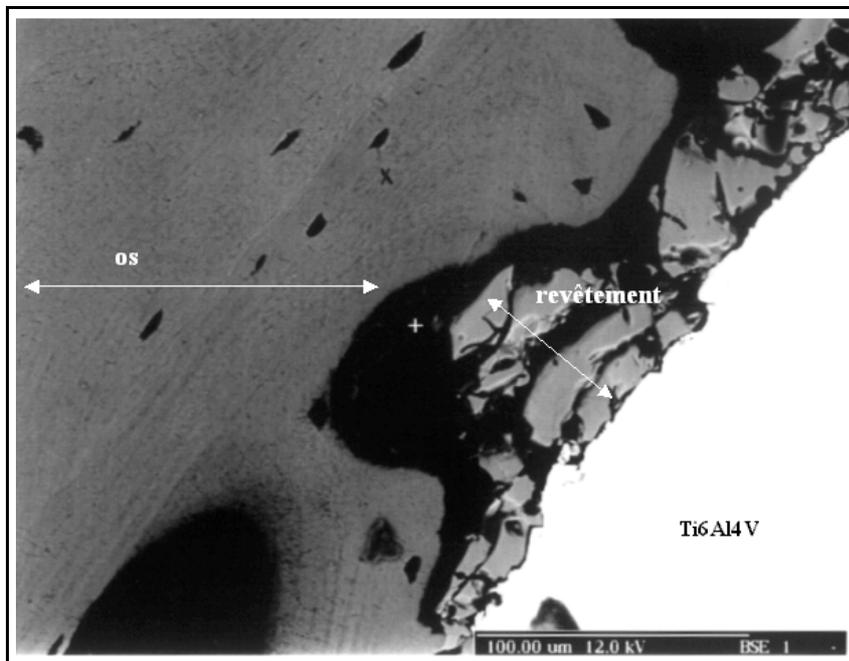


FIG. 6.7 – Cliché SEM ($\times 400$) d'un cylindre de Ti6Al4V recouvert de BVH, après 6 mois d'implantation. Observation du détachement du revêtement

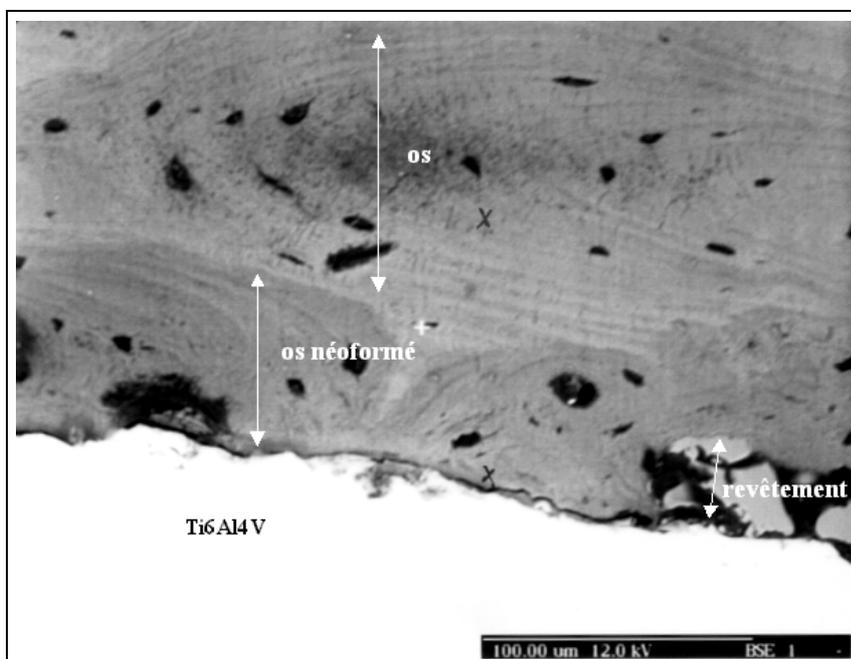


FIG. 6.8 – Cliché SEM ($\times 400$) d'un cylindre de Ti6Al4V recouvert de BVH, après 6 mois d'implantation. Observation de l'os néoformé.

12 mois après implantation :

Le revêtement n'est plus en contact avec l'implant, sur la majorité du périmètre de la prothèse. Le verre BVH n'a pas acquis une structure d'hydrogel. De ce fait, les grains de verre qui se sont détachés de la surface de l'implant migrent à travers le réseau lacunaire de l'os environnant (figure 6.10), ou sont piégés à l'intérieur de lacune de résorption (figure 6.11). Les zones de contact direct entre l'os et la prothèse sont plus nombreuses que pour le délai précédent, ce qui implique une meilleure ostéointégration de l'implant (figure 6.9).

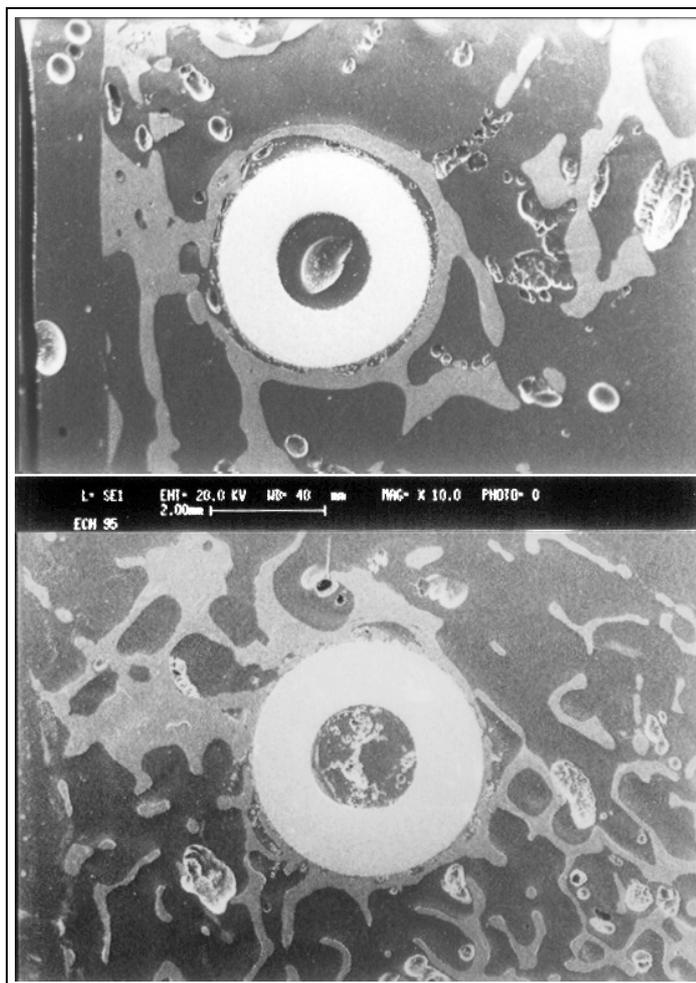


FIG. 6.9 – Cliché SEM ($\times 10$) d'un cylindre de Ti6Al4V recouvert de BVH, (en haut) après 6 mois d'implantation (en bas) après 12 mois d'implantation. Observation de l'ostéointégration.

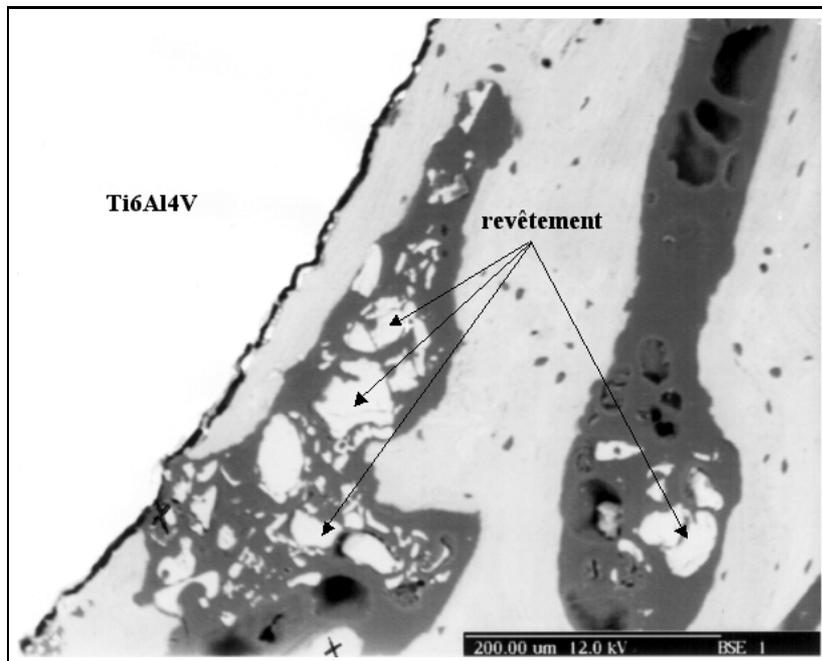


FIG. 6.10 – Cliché SEM ($\times 400$) d'un cylindre de Ti6Al4V recouvert de BVH, après 12 mois d'implantation. Observation du détachement du revêtement.

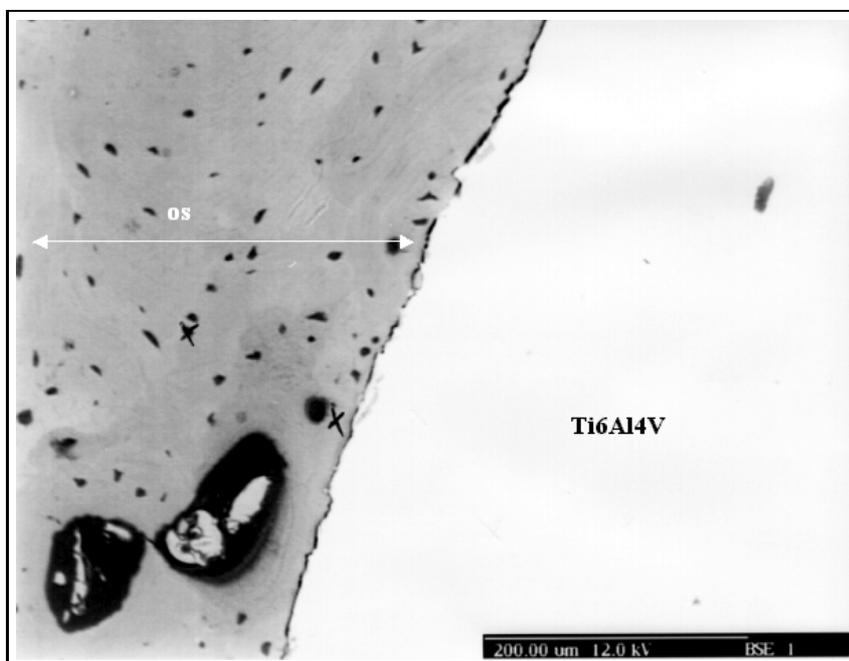


FIG. 6.11 – Cliché SEM ($\times 400$) d'un cylindre de Ti6Al4V recouvert de BVH, après 12 mois d'implantation. Observation de l'os néoformé.

6.1.4 Mesure quantitative de l'ostéointégration des implants

Ces résultats sont basés sur l'observation au microscope et sont qualitatifs. Une manière de caractériser l'ostéointégration des implants est l'histomorphométrie. Cette technique quantifie le périmètre de contact osseux et la densité osseuse autour de l'implant. On numérise les clichés obtenus par microscope optique après coloration des coupes au Giemsa et au Fuchsin basique (colorant Paragon). Avec ce type de coloration, l'os mature se colore en rose, les tissus osseux non-minéralisés et les tissus ostéoides se colorent en bleu, les tissus mous (tissu conjonctif par exemple) en rose pâle ou bleu pâle¹. On différencie chaque type de cellule par un code de couleur.

Il est possible d'utiliser le même principe avec les clichés initiaux (SEM). Il suffit de les numériser et d'associer une plage de dégradés de gris à chaque matériau : l'os, la résine (représentant aussi bien les lacunes de résorption que les lacunes osseuses), le revêtement et le titane. Toutefois, cette technique donne des résultats moins précis que l'histomorphométrie.

Les mesures ont été réalisées à la société BIOMATECH [86].

Le périmètre de contact représente la fraction du périmètre du cylindre de titane en contact direct avec l'os. Les résultats sont donnés en pourcentage.

La densité osseuse est mesurée sur une zone d'épaisseur 1 mm autour de l'implant. Elle représente le rapport de la surface osseuse par l'aire de la zone analysée.

Les résultats suivants sont extraits du rapport final du contrat européen [32] :

	non recouvert	recouvert avec BVA	recouvert avec BVH
3 mois	67 ± 17	31 ± 17	33 ± 16
6 mois	64 ± 20	72 ± 17	28 ± 18
12 mois	70 ± 10	83 ± 9	52 ± 10

TAB. 6.1 – Mesure du périmètre de contact (en %) issue de l'histomorphométrie

	non recouvert	recouvert avec BVA	recouvert avec BVH
3 mois	47 ± 12	55 ± 8	42 ± 12
6 mois	38 ± 9	48 ± 12	48 ± 9
12 mois	29 ± 10	40 ± 12	43 ± 17

TAB. 6.2 – Mesure de la densité osseuse (en %) issue de l'histomorphométrie

Les résultats sont comparés entre eux grâce au test non paramétrique de Mann & Whitney ($p < 0.05$).

Au premier délai d'implantation, les prothèses non recouvertes sont mieux ostéointégrées (périmètre de contact osseux plus important).

Après 6 mois d'implantation, il n'y a pas de différence significative entre les implants non recouverts et ceux recouverts de verre BVA. Par contre, le périmètre de contact des prothèses recouvertes de verre BVH est inférieur à celui des autres types d'implants.

Après 12 mois d'implantation, le périmètre de contact osseux des prothèses recouvertes de verre BVA est significativement plus important que pour les prothèses non recouvertes. Malgré l'augmentation notable du périmètre de contact pour les implants recouverts de verre BVH, celui-ci reste inférieur à celui des autres types de revêtements.

¹méthode consistant à colorer les cellules au moyen de bleu de méthylène et d'éosine : les éléments basophiles deviennent bleus, les éléments acidophiles roses.

Pour les implants non recouverts, la densité osseuse décroît au cours du temps ; alors qu'elle est constante pour les implants revêtus de verre. A partir de 6 mois, après implantation, la densité osseuse des implants non recouverts est inférieure à celle des implants recouverts de verre.

6.1.5 Conclusion sur ces analyses

On constate le besoin de plusieurs techniques d'analyses complémentaires afin de caractériser le comportement et le devenir des verres BVA et BVH au cours du temps.

La microscopie électronique apporte une information qualitative sur la transformation du verre BVA en un hydrogel et sur l'inertie apparente du verre BVH. Cependant, elle ne permet pas de distinguer les différents tissus organiques, ce que peut faire l'histologie en général.

La corrélation des deux analyses montre que le verre BVA se transforme très vite et qu'il est remplacé par de l'os. Il favorise une meilleure ostéointégration de l'implant et ces effets bénéfiques sont visibles à partir de 6 mois d'implantation.

Par contre, le comportement du verre BVH est très différent : le revêtement ne reste pas en place, migre à travers le réseau lacunaire de l'os environnant le site d'implantation, mais a un effet bénéfique sur la densité osseuse.

6.2 Caractérisation des revêtements par TEM/STEM et EDXS

6.2.1 Préparation des échantillons

Pour les techniques de microscopie en transmission, les échantillons doivent être minces par rapport au parcours des électrons.

Nous recoupons les échantillons afin qu'ils aient une épaisseur inférieure à $1\ \mu\text{m}$. Nous coupons le disque de Ti6Al4V perpendiculairement à la surface et nous enlevons les deux moitiés de disque. A ce stade, les échantillons sont composés uniquement d'os et de verre inclus en résine. Finalement, des sections ultrafines ($\approx 100\ \text{nm}$) sont découpées avec un couteau de diamant monté sur un ultramicrotome et recueillies à la surface d'un liquide dont la tension superficielle les maintient étalées. Elles sont ensuite recueillies sur une grille en cuivre (ce matériau est présent dans nos échantillons mais à des concentrations non détectables par cette méthode d'analyse, il n'y a donc pas de risque d'interférence). La présence d'une mince couche de collodion et le dépôt d'un film de carbone sur les coupes améliorent la conduction.

Cette préparation étant destructive, les échantillons ne peuvent plus être étudiés par d'autres méthodes. Le nombre d'échantillons étant limité (9 par type de revêtement et par délais d'implantation), nous utilisons, pour cette étude en microscopie en transmission, un échantillon par type de revêtement et par délais d'implantation.

6.2.2 Méthode analytique

Les échantillons sont localisés, dans un premier temps grâce au microscope électronique par transmission réglé avec une tension accélératrice de 100 kV. Le microscope électronique à balayage par transmission permet de faire de l'imagerie (les clichés obtenus sont accessibles numériquement), et de réaliser une analyse multi-élémentaire grâce à l'EDXS. Les résultats quantitatifs sont obtenus par la méthode de quantification de Hall déjà présentée ; les concentrations sont données en mmol/kg de matériau inclus en résine.

6.2.3 Dissolution sélective et bioactivité : A9 et BVA

le verre A9 *in vivo*

L'étude du verre A9 par Jallot *et al.* [87] montre un lessivage sélectif des ions composant le verre, au cours du temps. La dissolution du verre se décompose en trois étapes :

- *2 mois après implantation* : on observe un rapide lessivage des ions alcalins et alcalino-terreux (Na, Mg et K) ; Si et Ca sont relargués mais plus lentement ; le revêtement a une composition et une structure différentes basées sur un quasi-gel de Si-Al avec incorporation d'ions Ca et P ;
- *entre 2 et 6 après implantation* : la dissolution du verre continue ; Al et P sont relargués ; le revêtement est maintenant un hydrogel de silicium avec des ions Ca et P incorporés ;
- *entre 6 et 12 mois après implantation* : Si, Ca et P sont lentement relargués reflétant la dissolution du revêtement. La présence de soufre dans le revêtement peut être liée à la présence de molécules organiques telles que des acides nucléiques et à l'incorporation de constituants biologiques organiques. Après 12 mois d'implantation, le revêtement est un hydrogel de silicium pur avec des constituants organiques.

Ces changements de concentration pour les éléments Si, Al, Ca et P donnent lieu au développement d'une interface dynamique entre le verre et l'os. Les réactions physico-chimiques sont induites par les interactions entre les tissus environnants et la dissolution du verre. L'évolution de cette interface se décompose en trois étapes :

- *avant 3 mois après implantation* : la perte de silicium soluble induit la condensation et la repolymérisation d'une couche riche en silicium à la surface. C'est une étape importante du mécanisme de liaison à l'os. Ensuite, les ions calcium et phosphore diffusent à travers le verre jusqu'à la couche riche en silicium. Une couche de phosphate de calcium commence à se développer à la surface de la couche riche en silicium. Le silicium pourrait jouer un rôle important en fournissant un site favorable à la nucléation d'apatite à la surface du verre. L'épaisseur de cette couche de Ca-P croît jusqu'à atteindre une épaisseur de 1.5 à 2.5 μm , entre 2 et 3 mois après implantation ;
- *entre 3 et 9 mois après implantation* : Après avoir atteint ce qui semble être une épaisseur optimale de 2.5 μm , la couche de Ca-P se dissout. La présence d'ions de Ca et P dans la couche d'hydrogel de silicium montre que la diffusion de calcium n'est pas suffisante pour augmenter le degré de sursaturation des tissus environnants. La couche enrichie en silicium a une épaisseur de 5 μm et elle est en contact direct avec l'os. Le revêtement a une nouvelle composition : hydrogel de silicium avec des ions de Ca et P incorporés et une couche de silicium pure à sa périphérie ;
- *12 mois après implantation* : le revêtement poursuit sa dissolution et est composé d'un hydrogel de silicium pur, en contact intime avec l'os.

La formation de la couche riche en phosphate de calcium caractérise le phénomène de bioactivité et crée un lien chimique entre le revêtement et l'os tel qu'il a été rapporté par plusieurs auteurs [88] [89]. Cette propriété de bioactivité réalise un contact direct entre l'os et l'implant, assurant son ostéointégration. Cette couche agit comme un catalyseur de la formation de l'os et accélère la repousse osseuse autour de l'implant. Après une certaine période, le relargage des ions est insuffisant et la couche d'apatite formée ne peut plus continuer à croître, et finit par se dissoudre. Malgré la dissolution de cette couche, ses effets bénéfiques sont conservés et l'os reste en contact intime avec le revêtement.

L'addition d'ions multivalents tels que Al_2O_3 peut inhiber la formation de la liaison. Le processus de minéralisation est perturbé si de l'aluminium est relargué dans les tissus

environnants. Les résultats sur le verre A9 indiquent cependant qu'une concentration de 2 % d' Al_2O_3 est insuffisante pour convertir un verre bioactif capable de se lier à l'os en un verre bioinerte.

le verre BVA *in vivo*

La figure 6.12 est un cliché STEM représentant le revêtement (A), l'interface os-revêtement (B) et l'os (C), après 3 mois d'implantation. Le tableau suivant (table 6.3) donne la composition de chaque zone en mmol/kg de matériau inclus en résine.

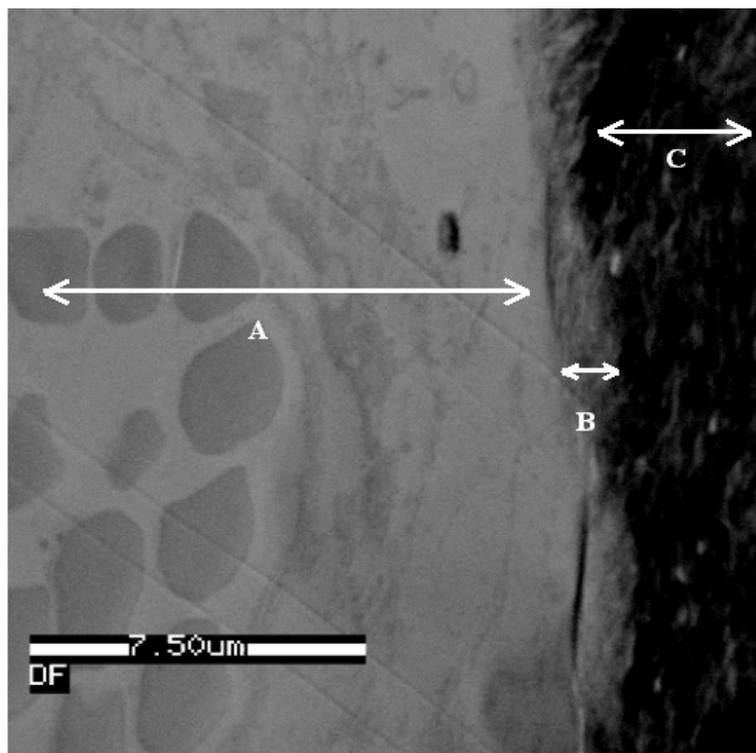


FIG. 6.12 – Cliché STEM en champ clair du verre BVA après 3 mois d'implantation. revêtement (A), interface (B) et os (C).

	A	B	C
Si	659 ± 40	333 ± 46	237 ± 23
Ca	114 ± 22	4031 ± 102	5617 ± 259
P	47 ± 21	2679 ± 116	3662 ± 183
S	140 ± 27	93 ± 42	0
Mg	19 ± 13	138 ± 50	153 ± 10
Na, K, Al	0	0	0

TAB. 6.3 – BVA 3 mois après implantation – Concentration en mmol/kg de matériau inclus en résine dans les zones définies par A, B et C.

Dès 3 mois après implantation, le revêtement (A) a acquis une composition basée essentiellement sur un hydrogel de silicium avec incorporation d'ions Ca et P et de molécules

organiques (présence de soufre). L'interface (B) est une couche riche en phosphate de calcium et a une épaisseur d'environ $1\ \mu\text{m}$.

La dissolution du verre BVA est plus rapide que celle du verre A9. Pour BVA après 3 mois d'implantation, on retrouve la composition obtenue pour A9 après 9-12 mois d'implantation.

La figure 6.13 représente un cliché après 12 mois d'implantation. Le revêtement a une composition proche de celle mesurée après 3 mois d'implantation. En revanche, on observe clairement la présence de sites de nucléation d'os dans l'hydrogel de silicium. L'interface apparaît mieux ostéointégrée.

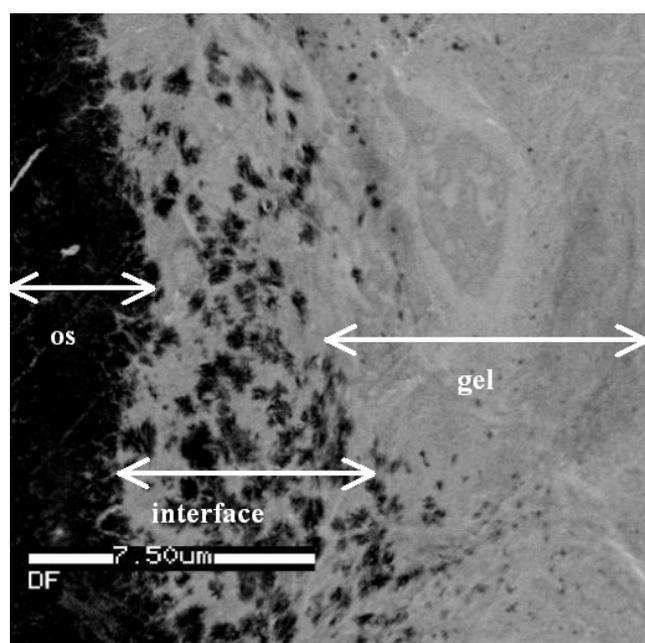


FIG. 6.13 – Cliché STEM en champ clair du verre BVA après 12 mois d'implantation .

le verre BVA *in vitro*

La dissolution du verre BVA étant très rapide, nous avons réalisé une étude *in vitro* afin de caractériser le comportement du verre dans les premiers jours.

Nous avons immergé 2 mg de poudre de verre BVA dans 1 ml de milieu de culture standard : Dulbecco's Modified Eagle Medium² (DMEM). La composition de ce milieu de culture est donnée dans le tableau 6.4 (en mg/l). Le tout est maintenu à une température constante de 37°C dans une étuve contenant 5% de CO_2 et saturée en humidité.

Après chaque délai (1, 2, 3 et 4 jours), la poudre de verre est incluse en résine AGAR 100. Ensuite, des coupes ultrafines ($\approx 100\ \text{nm}$) sont effectuées en suivant le même protocole que pour les échantillons implantés.

Sur les figures 6.14 et 6.15 sont représentés les profils des éléments Si, Al, Ca et P, aux différents délais d'immersion dans le DMEM.

²nous avons utilisé le DMEM à la place du SBF (Simulated Body Fluid) car prochainement nous allons réaliser une étude sur l'interaction verre/cellules osseuses. Or les cultures cellulaires se font dans le DMEM. En outre, les compositions du SBF et du DMEM sont quasi identiques.

Chaque profil correspond à un grain de verre BVA. Le point zéro représente le bord d'un grain de verre BVA. Les profils sont effectués avec un pas de 500 nm. Afin d'alléger la figure, nous n'avons pas présenté les barres d'erreurs.

Les éléments Na, Mg et K sont diffusibles et nous ne pouvons pas savoir si ces ions ont diffusé sous l'action du faisceau ou alors migré dans les premières heures d'immersion.

	concentration en mg/l
<i>NaCl</i>	6400
<i>KCl</i>	400
<i>CaCl₂</i>	200
<i>MgSO₄ - 7H₂O</i>	200
<i>NaH₂PO₄</i>	124
<i>NaHCO₃</i>	3700

TAB. 6.4 – Composition du milieu biologique artificiel (DMEM) en mg/l.

après 1 jour : Dès les premières 24 heures, le verre a interagi avec son environnement. Une interface de 1 μm d'épaisseur est observée. Elle est composée de Ca, P, Al et Si, mais en proportion nettement inférieure au reste du matériau. On commence à apercevoir deux couches significatives de la bioactivité de ce verre : une couche riche en Ca et P et une couche riche en Si et Al.

après 2 jours : La première couche a disparu. En revanche, la structure du grain de verre à ce délai est mieux marquée que précédemment. Il y a une couche riche en Ca et P, avec une épaisseur d'environ 1.5 μm . Une couche riche en Si et Al est observable. Par contre, l'appauvrissement en Ca et P n'est pas encore marqué.

après 3 jours et 4 jours : On décompose maintenant le profil observé en 3 couches distinctes :

- une couche riche en Ca et P d'une épaisseur d'environ 2.5 μm (couche notée A) ;
- une couche riche en Si et Al d'une épaisseur d'environ 2 μm (couche notée B) ;
- le reste du matériau a une composition homogène et indépendante de la profondeur analysée (couche notée C).

Jallot *et al* [87] appliquent la relation 6.1 pour quantifier la supersaturation du calcium qui est responsable de la précipitation et de la croissance de l'apatite sur la surface du verre. Lorsque $k > 0$, on observe l'apparition d'une couche d'apatite.

$$k = 2 \cdot \frac{C_{C,Ca} - C_{B,Ca}}{C_{A,Ca} - C_{B,Ca}} \quad (6.1)$$

Nous n'avons pas calculé la valeur de k pour le premier délai car le cloisonnement des couches n'est pas suffisamment distinct. Nous avons reporté les valeurs de k pour les délais à 2, 3 et 4 jours dans le tableau 6.5. Ces trois valeurs sont positives et correspondent à la formation et à la croissance d'une apatite autologue.

	k
2 J	0.43 \pm 0.08
3 J	0.60 \pm 0.08
4 J	0.64 \pm 0.08

TAB. 6.5 – indice de sursaturation k pour les délais 2, 3 et 4 jours.

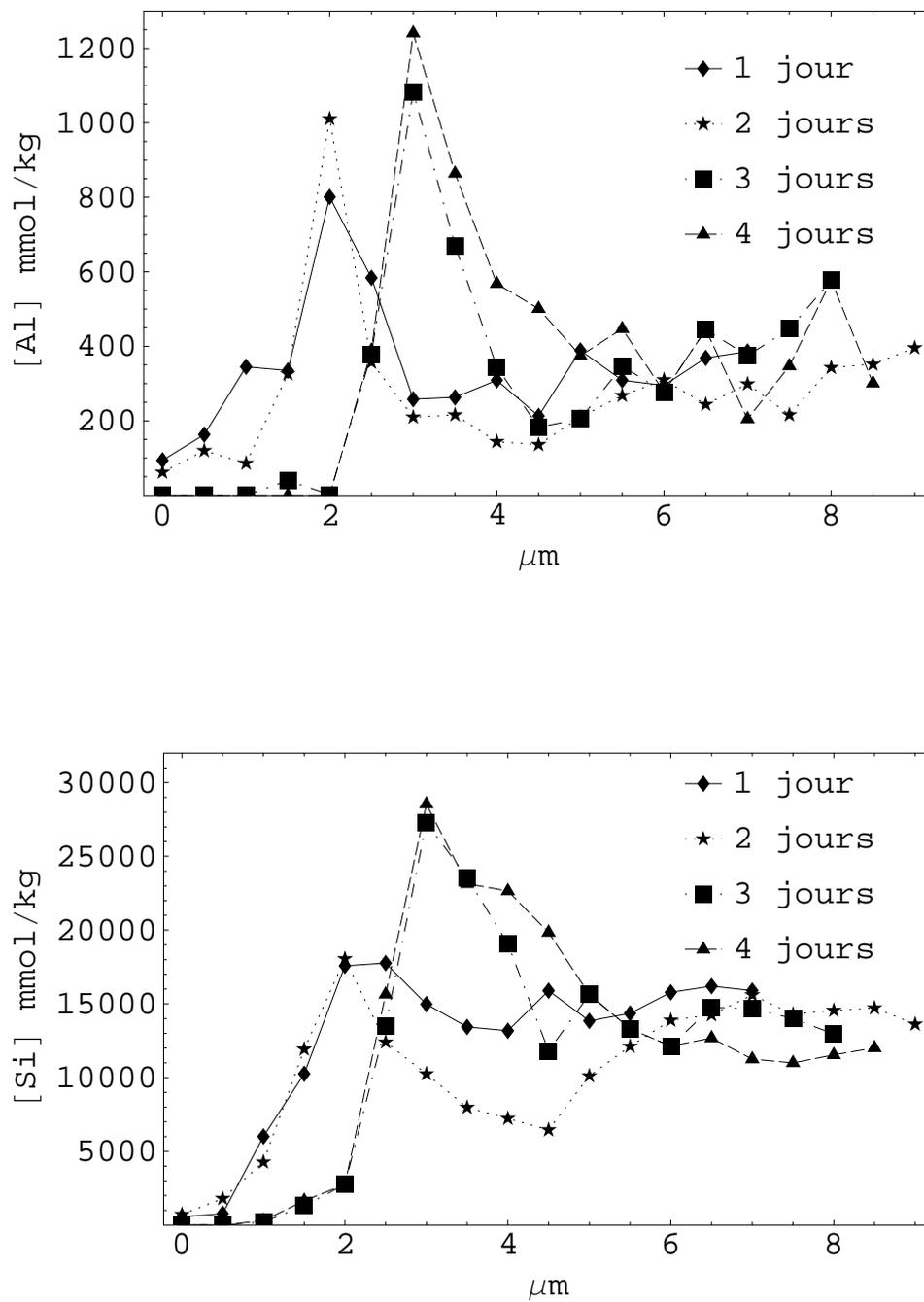


FIG. 6.14 – Profils des éléments Al, Si dans des grains de verre BVA après 1,2,3 ou 4 jours d'immersion dans du DMEM (concentration en mmol/kg de matériau inclus en résine).

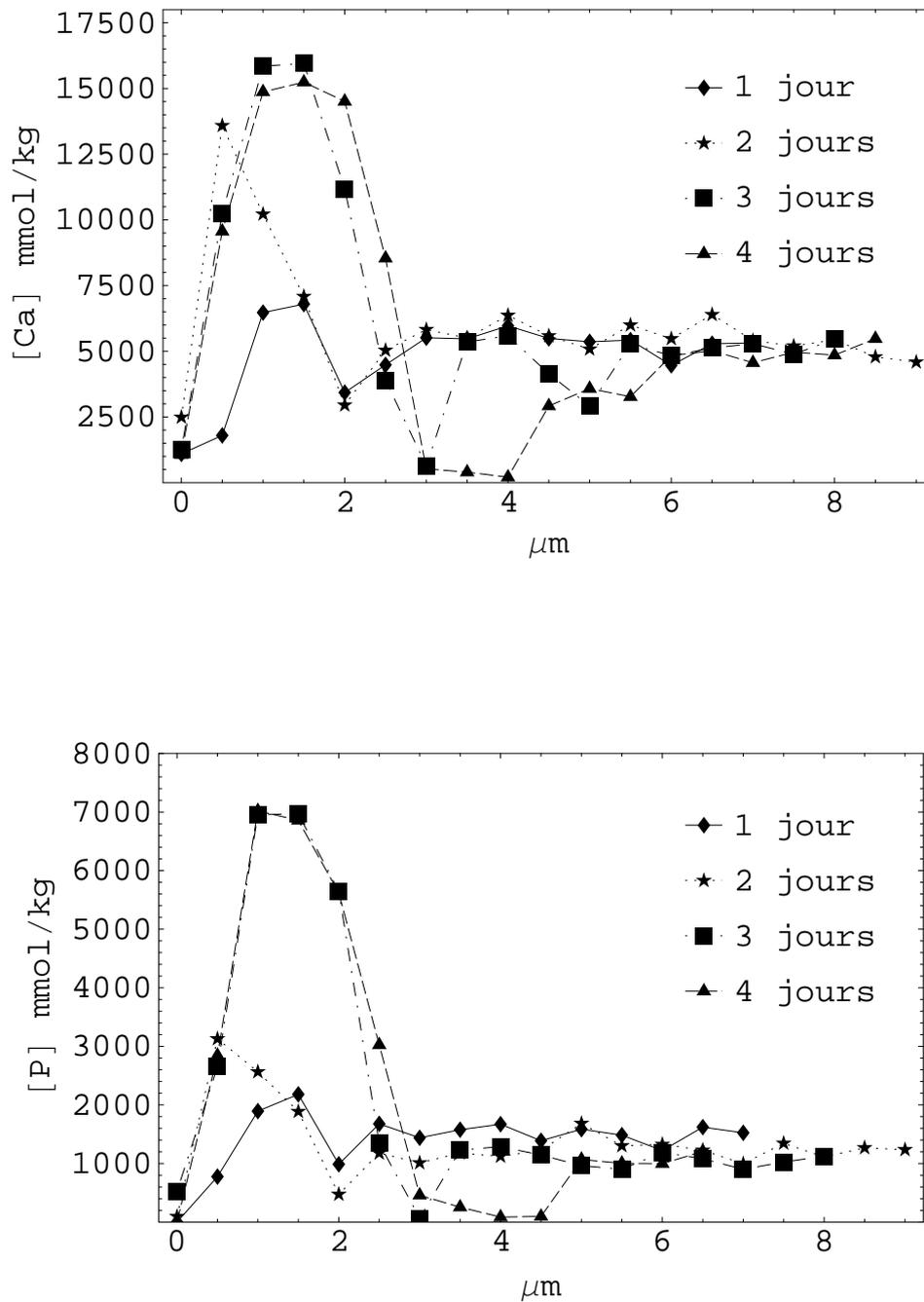


FIG. 6.15 – Profils des éléments Ca, P dans des grains de verre BVA après 1,2,3 ou 4 jours d’immersion dans du DMEM (concentration en mmol/kg de matériau inclus en résine).

Dans le tableau 6.6, nous avons indiqué la composition moyenne de la couche C, pour les quatre délais.

	1 jour	2 jours	3 jours	4 jours
Al	267 ± 99	384 ± 66	361 ± 57	254 ± 102
Si	15537 ± 897	14494 ± 1280	13042 ± 1633	11387 ± 1481
P	1426 ± 97	1158 ± 151	1057 ± 72	1074 ± 136
Ca	5457 ± 454	5277 ± 730	5247 ± 395	5051 ± 799

TAB. 6.6 – Composition en mmol/kg de matériau inclus en résine du verre BVA (zone C) pour les délais 1, 2, 3 et 4 jours .

Bien que la transformation à l'interface du verre commence dès les premiers temps de son immersion dans le DMEM, les analyses sont effectuées sur une période trop courte pour observer entièrement la dissolution du verre. Toutefois, la dissolution du verre a débuté : le relargage des éléments est sélectif ; la relation 6.2 décrit la concentration c_i de l'élément i [87].

$$c_i = A \exp \frac{-t}{\tau_i} \quad (6.2)$$

Dans le tableau 6.7 sont présentées les valeurs de τ_i . L'augmentation du taux d'aluminium entre 1 et 2 jours n'est pas expliquée. Elle avait été observée lors de l'étude du verre A9 *in vivo* après 2 mois d'implantation. Pour le calcul de τ_{Al} , nous n'avons pas tenu compte de la mesure du premier jour d'immersion.

On constate que le relargage du calcium est plus lent que le relargage des autres éléments.

	τ en jour ⁻¹
Al	7.1 ± 0.2
Si	10.24 ± 0.04
P	8.30 ± 0.04
Ca	49.5 ± 0.2

TAB. 6.7 – Constante de décroissance τ (en jour⁻¹) pour les éléments Al, Si, P et Ca.

6.2.4 Bioinertie : le verre BVH

3 mois après implantation

On n'observe pas les structures (hydrogel de silicium, couche de Ca-P) décrites précédemment, au contact de l'os, ni de grains de verre à ce délai d'implantation : lors de la préparation des échantillons, les grains de verre glissent sous le couteau et ne sont pas coupés.

6 mois après implantation

On ne constate pas de différence par rapport au délai précédent dans la majorité des coupes.

En revanche, une coupe a attiré notre attention (figure 6.16) avec l'os (A), une couche riche en Ca-P (B), une couche riche en silicium (C) et un hydrogel avec incorporation des

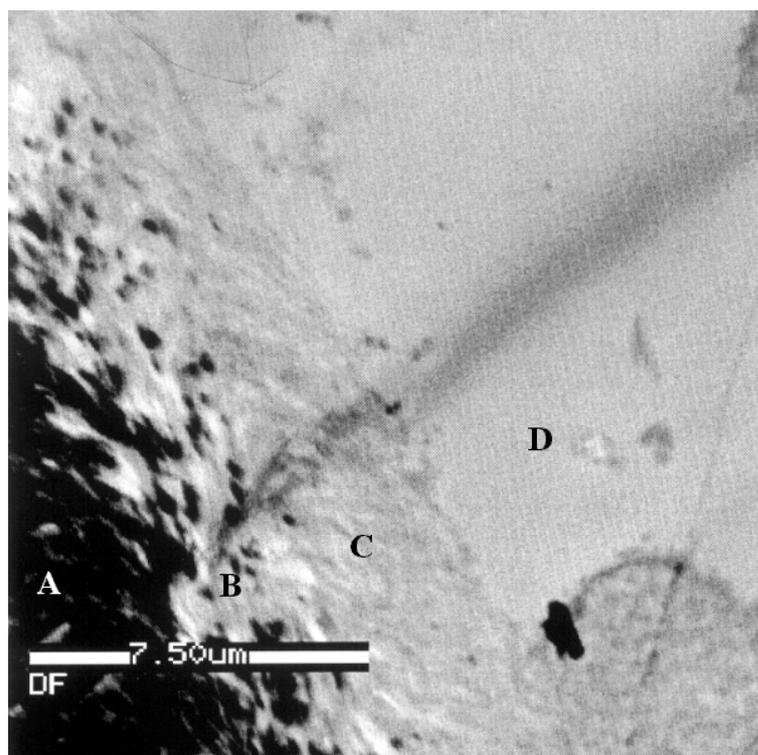


FIG. 6.16 – Cliché STEM en champ clair du verre BVH après 6 mois d'implantation – l'os (A), une couche riche en Ca-P (B), une couche riche en Si (C) et un hydrogel avec incorporation de minéraux et de matières organiques (D) .

minéraux Ca et P, et de matières organiques (présence de soufre) (D). La composition de ces 4 zones est donnée dans le tableau 6.8 en mmol/kg de matériau inclus en résine.

	A	B	C	D
Si	377 ± 8	827 ± 18	1090 ± 12	885 ± 15
Ca	3807 ± 16	1043 ± 17	165 ± 7	255 ± 9
P	2833 ± 19	845 ± 22	133 ± 12	525 ± 15
S	53 ± 12	106 ± 12	125 ± 7	118 ± 10
Mg	132 ± 8	0	0	0
Na, K, Al	0	0	0	0

TAB. 6.8 – BVH 6 mois après implantation – Concentration en mmol/kg de matériau inclus en résine dans les zones définies par A, B, C et D.

Ce cas de figure n'est pas significatif car il n'a été observé qu'une seule fois. On constate la présence de phosphore au sein du gel, alors qu'initialement le verre BVH n'en contient pas. Il y aurait incorporation d'ions P par transfert du milieu biologique vers le verre : l'échange de matière dans ce sens est confirmé par la présence de soufre.

12 mois après implantation

Sur les coupes, il n'y a pas de signes de bioactivité. En revanche, sur l'une d'elles, un grain de verre inclus en résine reste observable et analysable. Nous avons fait un profil de concentration multi-élémentaire de ce grain. Les figures 6.17 et 6.18 montrent l'évolution de ces concentrations dans le grain et à son interface. Les concentrations moyennes des différentes zones sont reportées dans le tableau 6.9 et sont exprimées en mmol/kg de matériau inclus en résine. On ne détecte pas d'ions alcalins dans le verre. Il est impossible de dire si ces ions ont diffusé *in vivo* ou lors de l'irradiation sous faisceau d'électrons.

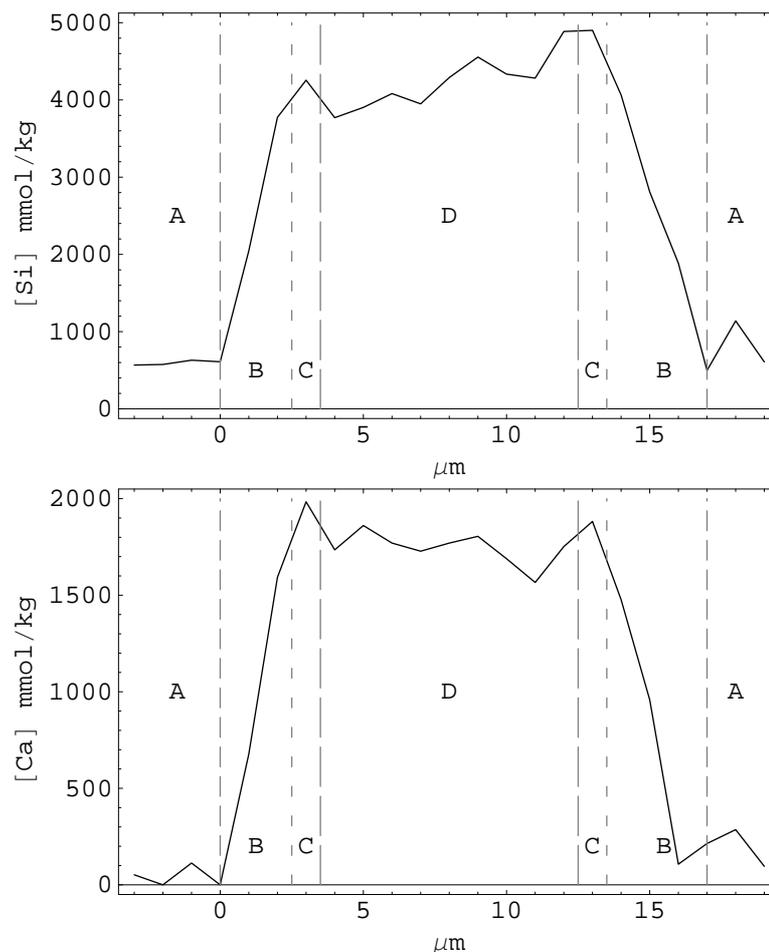


FIG. 6.17 – Profils du Si et Ca dans un grain de verre BVH (largeur $\approx 15 \mu\text{m}$), 12 mois après implantation (en mmol/kg de matériau inclus en résine).

La zone A correspond au milieu biologique au contact du grain de verre. Les concentrations données représentent une moyenne de huit mesures.

Les zones B, C et D représentent le grain. La zone D correspond au cœur du grain. La zone C a une épaisseur de $1 \mu\text{m}$, et tous les éléments sont en quantité supérieure au reste du grain. Enfin, la couche B d'épaisseur $2 \mu\text{m}$, représente l'interface entre le grain et le milieu biologique. Les concentrations données sont une moyenne de deux mesures pour la zone C, de quatre mesures pour la zone B et de neuf mesures pour la zone D.

Ce grain de verre subit une hydrolyse (dissolution du verre dans la zone B) avec formation d'une couche enrichie (C). Cependant, l'absence de phosphore dans la composition

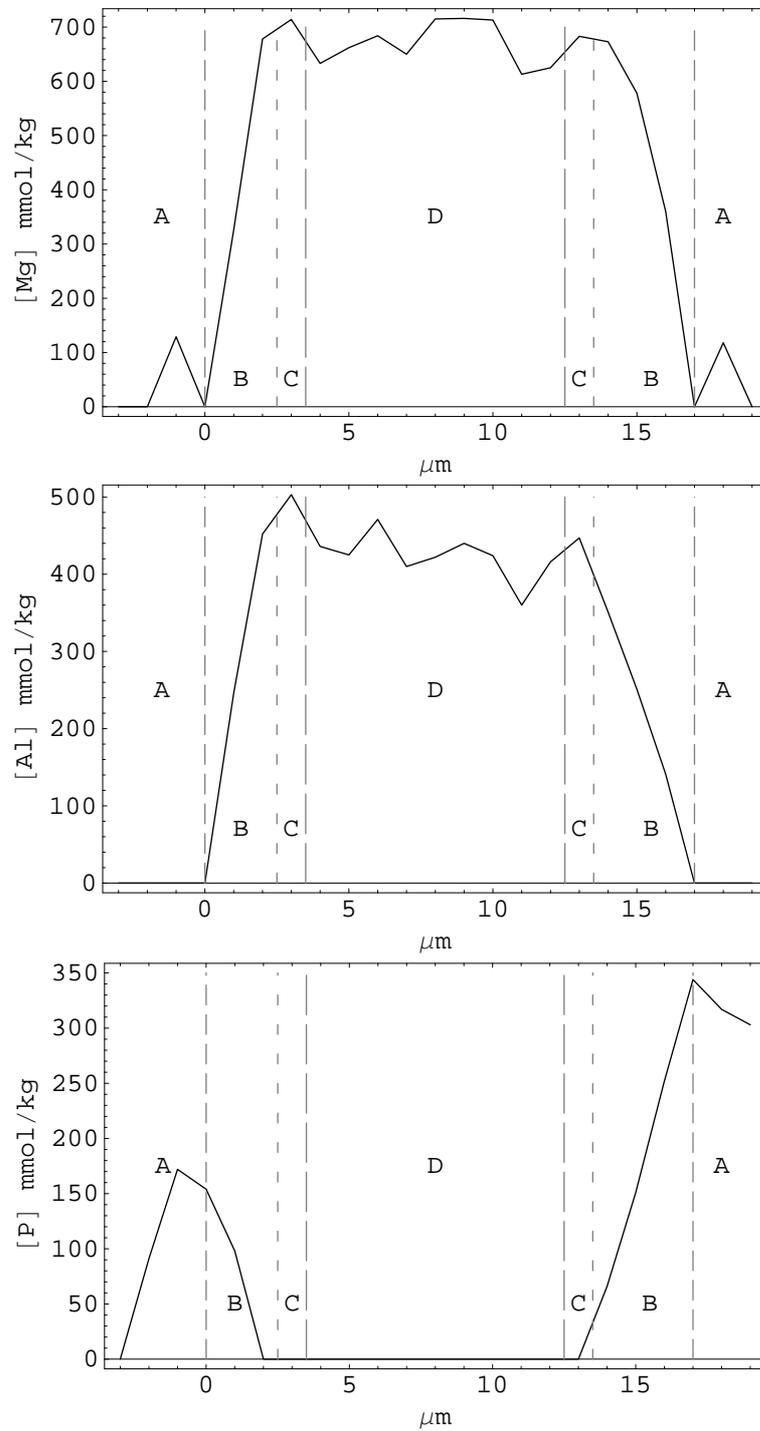


FIG. 6.18 – Profils du Mg, Al et P dans un grain de verre BVH (largeur $\approx 15 \mu\text{m}$), 12 mois après implantation (en mmol/kg de matériau inclus en résine).

	A	B	C	D
O	9288 ± 69	7852 ± 84	6932 ± 218	6162 ± 37
Si	683 ± 7	2978 ± 19	4455 ± 63	4100 ± 11
Ca	121 ± 5	1078 ± 10	1916 ± 39	1753 ± 7
P	201 ± 7	97 ± 9	0	0
Mg	163 ± 15	537 ± 11	704 ± 35	668 ± 6
Al	0	327 ± 11	485 ± 34	430 ± 6
S	150 ± 20	0	0	0
Na, K	0	0	0	0

TAB. 6.9 – Concentrations moyennes multi-élémentaires (en mmol/kg de matériau inclus en résine) d'un grain de verre BVH, 12 mois après implantation, dans les zones définies A, B, C et D.

initiale du verre empêche la formation d'une couche en Ca-P.

6.2.5 Conclusion sur ces analyses

La microscopie électronique à balayage en transmission, couplée à l'analyse par EDXS nous a permis d'observer et de mesurer *in vitro* l'évolution de la composition du verre BVA ainsi que la formation et les changements de structure à l'interface qui sont responsables de sa bioactivité. Nous avons constaté la formation d'un lien intime entre BVA et l'os environnant *in vivo*, puis sa rapide dissolution.

Cette étude devrait être poursuivie en prolongeant les délais d'immersion du verre BVA, dans l'étude *in vitro*. Nous pourrions réaliser les analyses à une température de -196°C afin de pouvoir quantifier les éléments diffusibles, notamment les alcalins qui ont un rôle dans la dissolution dès les premières étapes du processus.

Le verre BVH interagit avec le milieu biologique environnant : il subit une hydrolyse et développe une interface. Cette interface d'une épaisseur de $2\ \mu\text{m}$ serait la cause de fragilisation des liens inter-granulaires du revêtement : elle expliquerait le détachement du revêtement de l'implant et la migration de ces grains à travers le réseau lacunaire de l'os. Cette interface n'induit pas la formation d'une couche en Ca-P car le verre initial ne contient pas de phosphore. Cette absence de couche en Ca-P (à l'exception d'une coupe) confirme la bioinertie du verre BVH.

6.3 Caractérisation des revêtements par PIXE et RBS

6.3.1 Caractéristiques du faisceau

Le faisceau de protons a une énergie de 3 MeV et une intensité de 600 pA. Le diamètre de la sonde est de 5 μm . Le système de balayage est réglé pour réaliser des cartographies sur un carré de côté : 600 μm , et avec une fréquence de 1 kHz.

Nos échantillons sont composés d'éléments majeurs (Ca et P dans l'os, Ti dans l'implant, Si dans le revêtement), d'éléments mineurs et d'éléments traces (Sr et Zn dans l'os). Nous avons employé un filtre de type *funny filter* devant le détecteur X. Ce filtre en aluminium, d'épaisseur 100 μm , est percé au centre (diamètre du trou $\approx 5 \mu\text{m}$). Il diminue l'intensité des photons X aux basses énergies qui correspondent dans nos échantillons aux éléments majeurs et mineurs ; les photons X de plus haute énergie correspondant aux métaux à l'état de traces dans nos échantillons sont mieux détectés .

calibration expérimentale

Les analyses préliminaires ont montré des résultats quantitatifs incohérents car les caractéristiques du filtre interviennent dans la détermination des concentrations et une connaissance imparfaite de la géométrie du filtre provoque des erreurs de calcul. Le trou du *funny filter* n'est pas parfaitement circulaire (observation à la lunette binoculaire) et le logiciel ne simule pas correctement un tel filtre. Toutefois, il est possible de rectifier ces erreurs par une calibration expérimentale.

Nous remplaçons l'angle solide de la relation 5.28 par une constante expérimentale H qui est l'angle Ω du détecteur multiplié par un paramètre compensant les erreurs induites par le filtre.

La valeur de H est dépendante de l'élément dont on cherche à connaître la concentration car le filtre agit différemment selon l'énergie du photon qui le traverse.

La calibration du paramètre H est réalisée pour tous les éléments que nous recherchons, grâce à des standards fabriqués par Agar Scientific et référencés : Standard 4732. Ils ont été analysés dans les mêmes conditions que dans nos mesures. Les différentes valeurs du paramètre expérimental H sont représentées sur la figure 6.19. A partir d'une certaine énergie $E_X \approx 5 \text{ keV}$, la valeur de H est constante et proche de l'angle solide du détecteur.

6.3.2 Verre BVA

Nous avons observé le gel issu du verre BVA, 3 mois après implantation. Nous avons représenté sur la figure 6.20 les cartographies multi-élémentaires : les éléments majeurs sont représentés dans le but de mieux repérer les différents éléments (os, revêtement et prothèse).

La figure 6.21 représente un agrandissement centré sur le revêtement. Pour réaliser ce zoom, nous avons modifié la taille de la zone de balayage (surface de $214 \times 214 \mu\text{m}^2$) et le diamètre du spot (2 μm).

Ces cartographies confirment que le revêtement est inhomogène en composition après 3 mois d'implantation. Il contient essentiellement du calcium et du phosphore. Le silicium et l'aluminium sont peu présents au sein du gel. Par contre, on constate la présence de zinc³

³le zinc est un élément trace important en biologie car il intervient dans l'activité d'un grand nombre d'enzymes, notamment l'anhydrase carbonique qui est présente au sein des ostéoclastes. Cette enzyme joue un rôle important dans le processus de remodelage osseux.

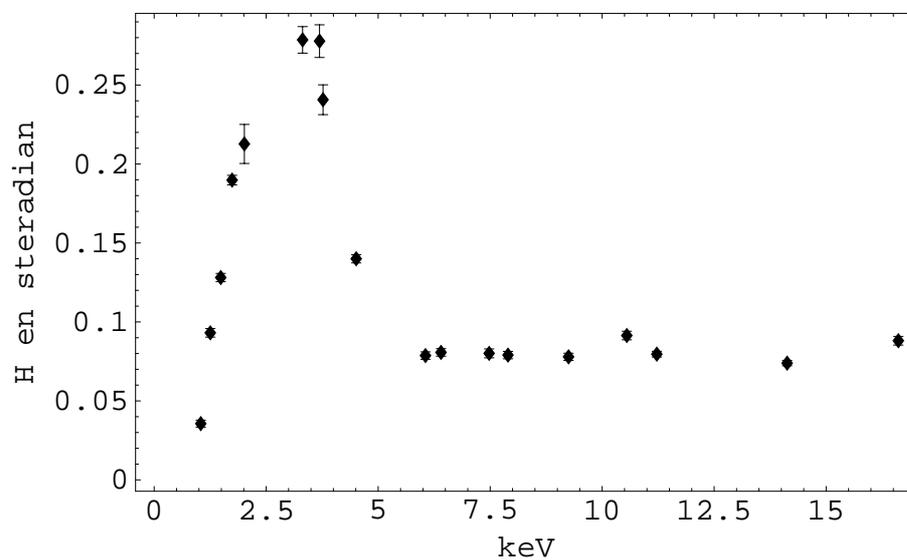


FIG. 6.19 – Valeurs du paramètre expérimental H en fonction de l'énergie des X émis.

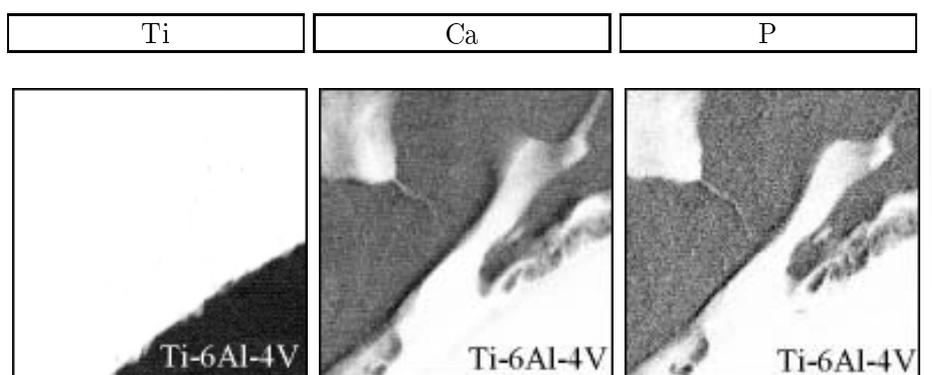


FIG. 6.20 – Cartographies des éléments majeurs.

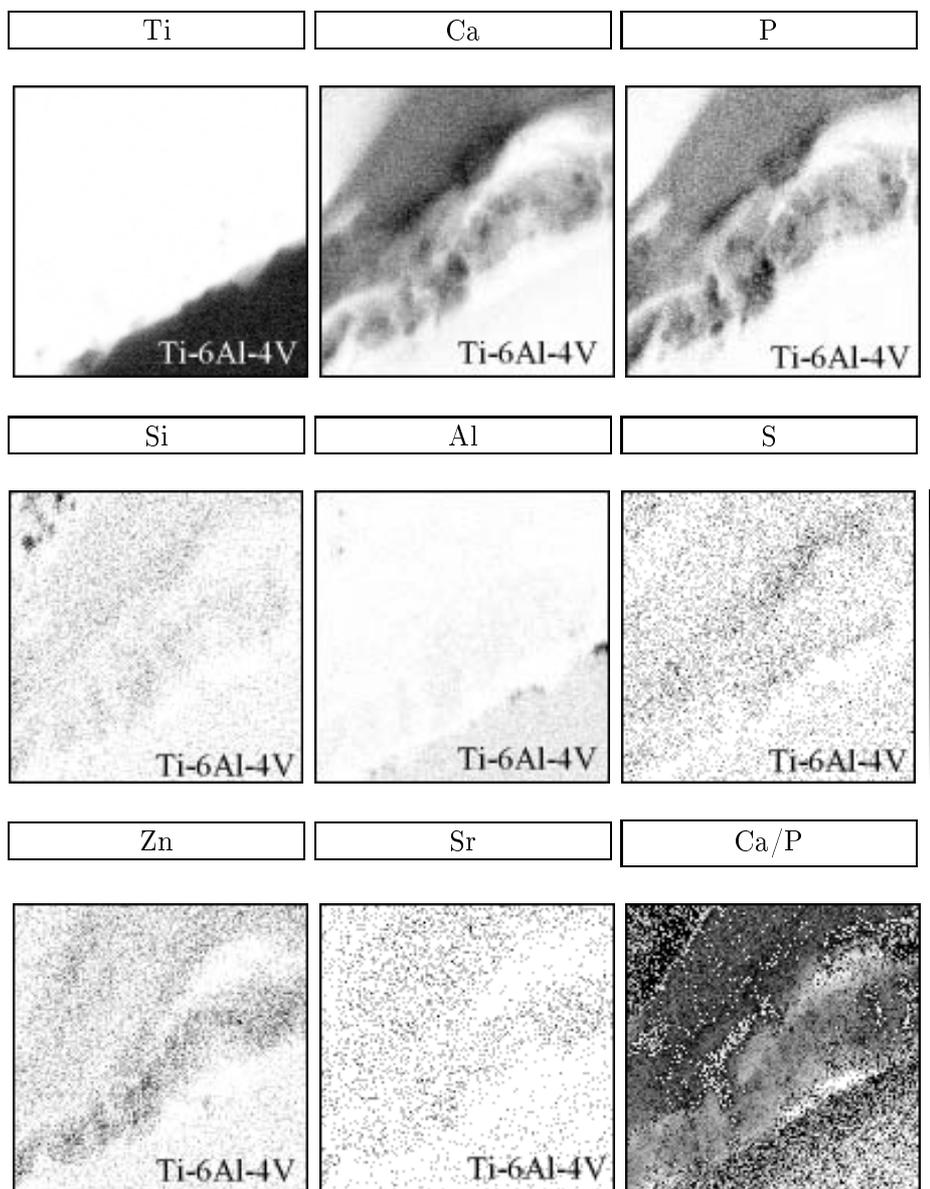


FIG. 6.21 – Cartographies multi-élémentaires du gel BVA, après 3 mois d'implantation.

dans le gel. Pour le soufre et le strontium⁴, les cartographies ne sont pas assez contrastées pour conclure.

Nous avons analysé les spectres X de la zone identifiée comme étant le gel. Nous n'avons pas quantifié ces éléments car cette zone est très hétérogène; l'interprétation des concentrations moyennes n'est pas pertinente. Cependant les photopics des éléments traces Sr et Zn sont suffisamment marqués pour conclure que ces éléments sont présents dans le gel. De même, les éléments Ti et Fe sont présents au sein du gel.

Ces spectres montrent la présence d'alcalins (Na et K) et de magnésium dans le gel. Ces éléments n'étaient pas observés dans l'analyse par faisceau d'électrons. La présence des éléments Ca, P en grande quantité, des éléments traces Zn et Sr, indique que le gel est progressivement remplacé par de l'os.

6.3.3 Verre BVH

Comme pour le verre BVA, après repérage avec les cartographies en éléments majeurs présentées sur la figures 6.22, nous avons réalisé un agrandissement centré sur un grain de verre BVH (figure 6.23).

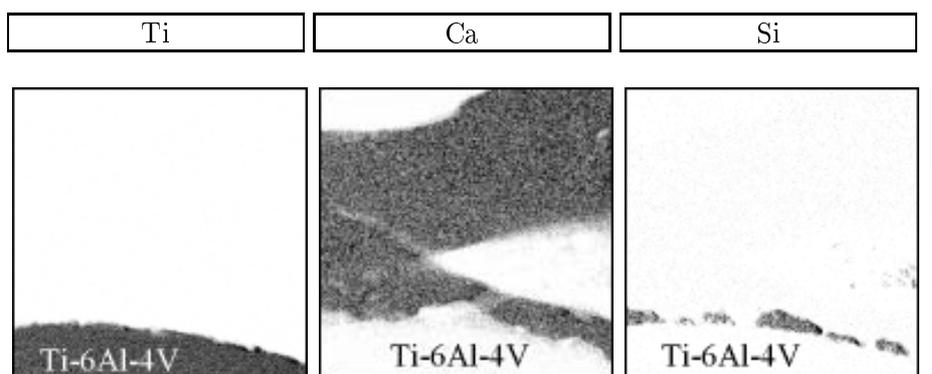


FIG. 6.22 – Cartographies des éléments majeurs (Ti pour la prothèse, Ca pour l'os et Si pour le verre) d'une prothèse revêtue de verre BVH, 3 mois après implantation.

Les grains de verre BVH sont identifiables grâce à la cartographie du silicium. Ces grains de verre sont homogènes en composition. On retrouve dans sa composition, tous les éléments initiaux (Na, Mg, Al, Si, K, Ca et O). Nous n'observons pas les éléments Ti, P, S, Zn et Sr dans le verre, du moins sur les cartographies correspondantes.

Après extraction des spectres X et RBS, nous avons déterminé la composition du revêtement. Nous avons obtenu les concentrations car la composition du verre est homogène. La faible teneur en carbone nous laisse penser qu'il ne contient pas ou peu de résine et qu'il est plus résistant sous faisceau. Nous avons exprimé les résultats en pourcentage massique, sous forme d'oxyde, afin de pouvoir les comparer directement avec la composition initiale du verre (tableau 6.10).

Nous avons constaté la présence de titane et de fer dans le verre, ainsi qu'une augmentation de la concentration en aluminium. On ne détecte pas de vanadium dans le verre. Les intensités des photopics des éléments P, S, Sr et Zn sont, après ajustement, inférieures à la limite de détection.

⁴le strontium intervient dans la formation et la croissance du cristal osseux. Il exerce une action protectrice sur les mécanismes de calcification et augmente la minéralisation.

	concentration		
SiO_2	69	± 4	%
Na_2O	13	± 1	%
CaO	11	± 1	%
K_2O	1.6	± 0.1	%
MgO	3.1	± 0.3	%
Al_2O_3	3.3	± 0.3	%

	concentration		
Ti	2590	± 371	ppm
Fe	56	± 14	ppm

TAB. 6.10 – Composition d'un grain de verre BVH après 3 mois d'implantation.

Les mêmes analyses ont été effectuées aux délais 6 et 12 mois après implantation et sur plusieurs grains de verre ; elles donnent les mêmes résultats. Nous concluons que le revêtement a une composition constante au cours du temps.

Nous avons déterminé la composition d'un grain de verre qui s'est détaché du revêtement, 12 mois après implantation. Les résultats sont donnés dans les tableaux 6.11.

	concentration		
SiO_2	63	± 3	%
Na_2O	6	± 1	%
CaO	16	± 1	%
K_2O	2.1	± 0.1	%
MgO	1.4	± 0.3	%
Al_2O_3	1.6	± 0.3	%
P_2O_5	9.4	± 0.7	%

	concentration		
Ti	439	± 232	ppm
Fe	99	± 20	ppm
S	2164	± 651	ppm
Sr	13	± 7	ppm

TAB. 6.11 – Composition d'un grain de verre BVH qui s'est détaché de la prothèse, après 12 mois d'implantation.

Nous constatons des signes de bioactivité :

- dissolution sélective du verre : la composition en Na_2O et en MgO a diminué de moitié ;
- présence de phosphore (≈ 9.4 % de P_2O_5) ;
- augmentation de la composition en calcium ;
- présence de traces de soufre et de strontium.

Enfin, les concentrations en titane et en aluminium sont significativement inférieures à celles observés pour le revêtement. Ces éléments métalliques pourraient diffuser dans le milieu environnant lors du processus de dissolution.

6.3.4 Conclusion sur ces analyses

Ces analyses apportent de nouveaux renseignements sur les revêtements en verre BVA et BVH, inaccessibles avec les microsondes électroniques.

Nous avons déterminé la composition du revêtement BVH au cours du temps pour les éléments majeurs (Si) mais aussi pour les éléments mineurs tels que le sodium, le magnésium et le potassium. Ces éléments n'ont pas diffusé sous le faisceau de proton. Nous concluons que lors de l'analyse du grain de verre BVH par EDXS, l'absence des éléments Na, Mg et K est due uniquement au faisceau d'électrons et non à migration *in vivo*. En revanche, la résolution spatiale étant moindre avec le faisceau de protons, il est impossible d'observer

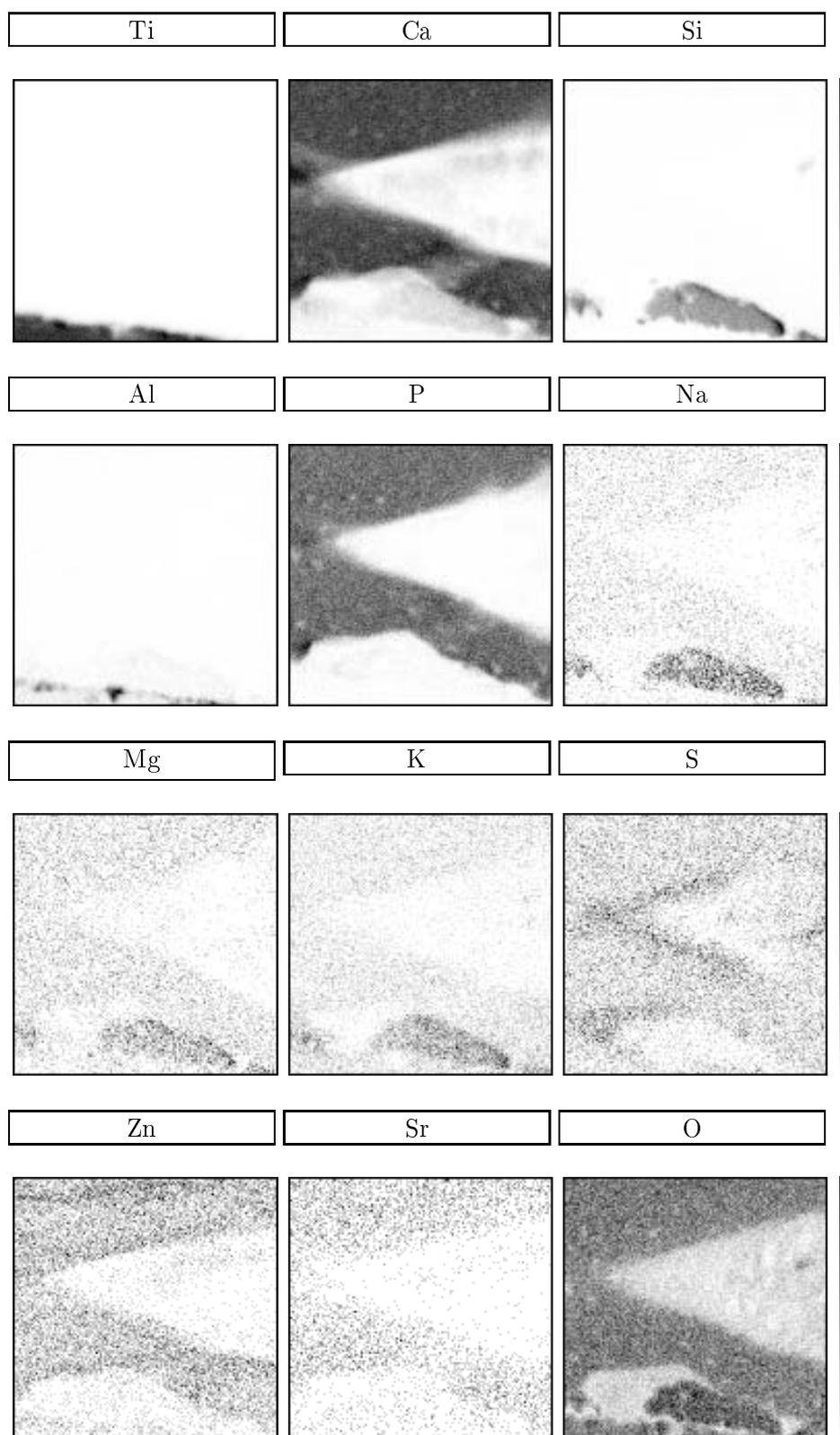


FIG. 6.23 – Cartographies des éléments majeurs, mineurs et traces d'une prothèse revêtue de verre BVH, 3 mois après implantation : (la cartographie de l'oxygène est obtenue par RBS).

la formation de l'interface des grains avec le milieu environnant.

Nous avons identifié les éléments traces contenus dans les revêtements. Il apparaît une contamination des deux types de revêtement par du titane, du fer et de l'aluminium. Lors de l'étude *in vivo* du verre A9, les auteurs [87][33] ont aussi observé l'augmentation du taux d'aluminium. Brun [33] a observé la présence de titane dans le verre A9 après implantation. La préparation des échantillons (vaporisation par torche à plasma⁵ ou polissage) est soupçonnée d'induire une contamination en éléments métalliques. Mais une présence de titane, dans l'os éloigné de quelques centaines de μm du bord de la prothèse, n'a pas été observée dans nos échantillons, de sorte que le polissage des échantillons ne semble pas être en cause. L'analyse par activation neutronique réalisée par Brun [33] pour le verre A9 après vaporisation par torche à plasma et avant implantation ne montre pas la présence de titane dans ce verre. Le verre BVH n'étant pas bioactif, la présence de titane et d'aluminium provient d'un relargage de la prothèse métallique elle-même. Quant au fer, il est issu de la préparation du revêtement car l'analyse par neutron effectuée sur le verre A9 montre la présence de fer avec une teneur de 51 ± 10 ppm.

La présence de zinc et de strontium dans l'hydrogel confirme l'incorporation d'éléments biologiques et l'ossification ultérieure au sein du revêtement BVA.

⁵Le processus de torche à plasma s'effectuant à haute température pour deux matériaux (verre et substrat métallique) de coefficient de dilatation différents, il peut y avoir des phénomènes de micro-craquelures à la surface du substrat et de détachements de débris

Chapitre 7

Etude de l'os néoformé remplaçant les revêtements

Le verre BVA est remplacé par de l'os après 6 mois d'implantation. Nous avons voulu mesurer la qualité de cet os néoformé, pour cela, nous mesurons les rapports de concentration $[Zn]/[Ca]$, $[Sr]/[Ca]$ et $[F]/[Ca]$. L'os en contact avec une prothèse non recouverte nous servira de témoin. Nous considérons que la formation d'os en contact de prothèse initialement recouverte de BVH n'est pas induite par le verre ; nous n'avons donc pas analysé la qualité de cet os. En revanche nous avons mesuré la contamination du titane dans l'os en fonction du type de revêtement.

Les mesures quantitatives dans l'os inclus en résine ne peuvent se faire qu'après vérification de l'homogénéité de sa composition et de sa tenue sous faisceau.

7.1 Composition de l'os inclus en résine

La mesure de la composition en éléments majeurs de l'os inclus en résine est faite par faisceau d'électrons. Lors de la caractérisation des revêtements par STEM/TEM et EDXS, nous avons vérifié la composition de l'os. Nous avons choisi l'EDXS pour ces mesures car la fenêtre ultra-fine du détecteur permet de quantifier les éléments organiques (C, N et O) et les minéraux majeurs de l'os (Ca et P).

Le tableau 7.1 représente la moyenne des mesures sans considération du type de revêtement en contact et du délai d'implantation.

	concentration	(dispersion en %)
Ca	3947 ± 10	(0.25)
P	2644 ± 11	(0.42)
C	14630 ± 62	(0.42)
O	20478 ± 71	(0.35)
Mg	113 ± 4	(3.54)
Si	178 ± 4	(2.25)
N	2766 ± 66	(2.39)

TAB. 7.1 – Composition de l'os inclus en résine (en mmol/kg de matériau inclus en résine).

La dispersion des mesures est inférieure à 1 % pour les éléments majeurs (Ca, P, C et O) du mélange os/résine, la dispersion des éléments mineurs est inférieure à 4 %. Le

mélange os/résine est donc homogène.

Nous pouvons évaluer la quantité de résine en considérant le calcium comme élément caractéristique de l'os et le carbone comme élément caractéristique de la résine ; ces deux éléments sont moins volatiles que les autres.

En prenant le carbone comme élément de référence, nous estimons à 25 % la proportion de résine dans l'os : en prenant le calcium, on aboutit à 31 %. La moyenne de ces deux valeurs nous donne la composition moyenne de l'os inclus en résine dans nos échantillons : 28 % de résine et 72 % d'os (tableau 7.2).

	os	résine PMMA	os inclus en résine
Ca	23 %	–	16.6 %
P	11 %	–	7.9 %
O	46 %	32 %	42.1 %
C	4 %	60 %	19.7 %
H	14 %	8 %	12.3 %

TAB. 7.2 – Composition en % massique de l'os, de la résine et de l'os inclus en résine.

7.2 Evolution de la qualité de l'os néoformé au cours du temps

Les analyses ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales qu'auparavant.

7.2.1 Tenue de l'os sous faisceau - monitoring élémentaire

Dans un premier temps, nous examinons la tenue de la résine sous faisceau. La figure 7.1 montre l'évolution de l'intensité du spectre RBS pour le carbone et l'oxygène, en fonction de la charge déposée dans $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ de résine. Les résultats sont donnés avec une courbe d'ajustement : une constante pour le carbone et une exponentielle décroissante pour l'oxygène. Ces deux résultats sont en accord avec les auteurs cités dans le chapitre 5. Nous n'avons pas suivi l'évolution de l'hydrogène, mais la littérature indique une décroissance exponentielle, souvent plus rapide que pour l'oxygène.

Nous avons examiné l'évolution des rapports des concentrations $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$ et $[\text{Sr}]/[\text{Ca}]$ en fonction de la charge déposée dans $300 \times 300 \mu\text{m}^2$ d'os mature. Nous avons reporté les résultats dans la figure 7.2, avec une courbe d'ajustement :

- une constante pour le rapport $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$;
- une fonction du type $A \cdot (1 - \exp(-x/x_c)) + B$, pour le rapport $[\text{Sr}]/[\text{Ca}]$.

Lorsque l'os est irradié, une partie de l'oxygène et de l'hydrogène se volatilisent. Le calcul des concentrations peut être faussé s'il est effectué avec une matrice de composition non constante. Mais, à partir d'une certaine quantité de charge reçue, la composition de la matrice ne change plus. Ces charges sont déposées sur une zone de $600 \times 600 \mu\text{m}^2$ après environ deux heures d'irradiation et une intensité de 600 pA.

Dans ces conditions expérimentales, nous considérons que les éventuelles variations des rapports des concentrations $[\text{Sr}]/[\text{Ca}]$ et $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$ ont pour origine un phénomène biologique.

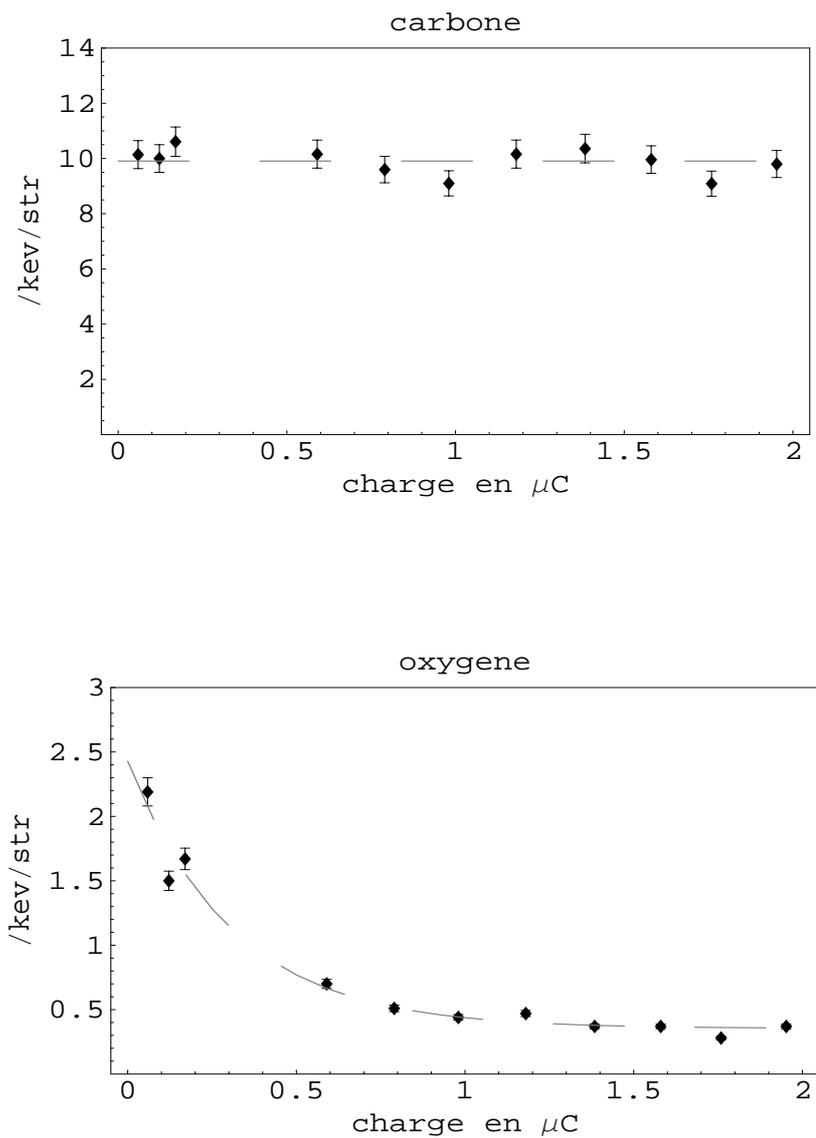


FIG. 7.1 – Evolution de l'intensité des éléments C et O dans le spectre RBS de la résine , en fonction de la charge déposée.

A partir des valeurs mesurées des rapports de concentrations, nous remontons aux concentrations des éléments Zn et Sr dans l'os mature, avant inclusion en résine (tableau 7.3).

	composition en ppm
Zn	94 ± 6
Sr	41 ± 3

TAB. 7.3 – Teneur en ppm des éléments Zn et Sr dans l'os mature avant inclusion en résine.

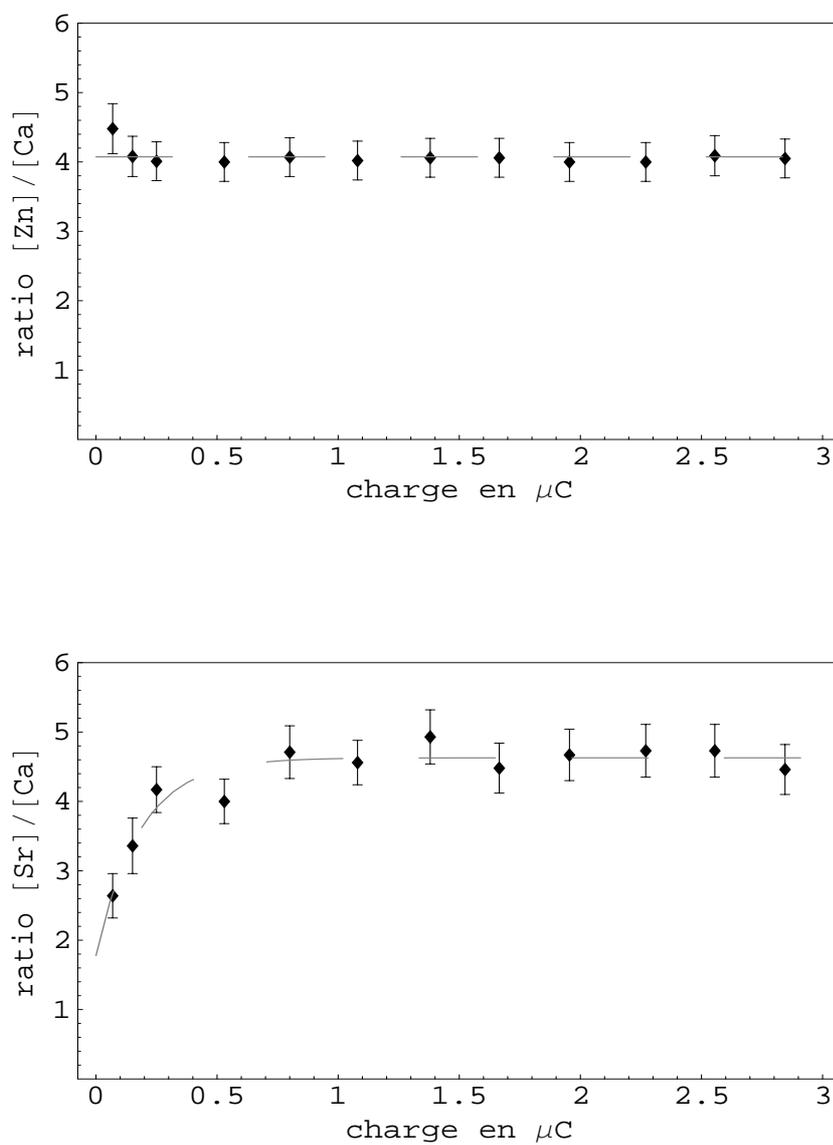


FIG. 7.2 – Evolution des rapports des concentrations $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$ et $[\text{Sr}]/[\text{Ca}]$ dans de l'os mature, en fonction de la charge déposée.

7.2.2 Résultats

Nous avons mesuré la composition de l'os néoformé pour les implants initialement recouverts de verre BVA, pour les délais 6 et 12 mois. En raison de l'épaisseur initiale du revêtement, nous considérons que l'os au contact de la prothèse métallique et sur une épaisseur de $100\ \mu\text{m}$, est néoformé. Nous avons réalisé les mêmes mesures sur les implants non recouverts qui nous servent de témoin.

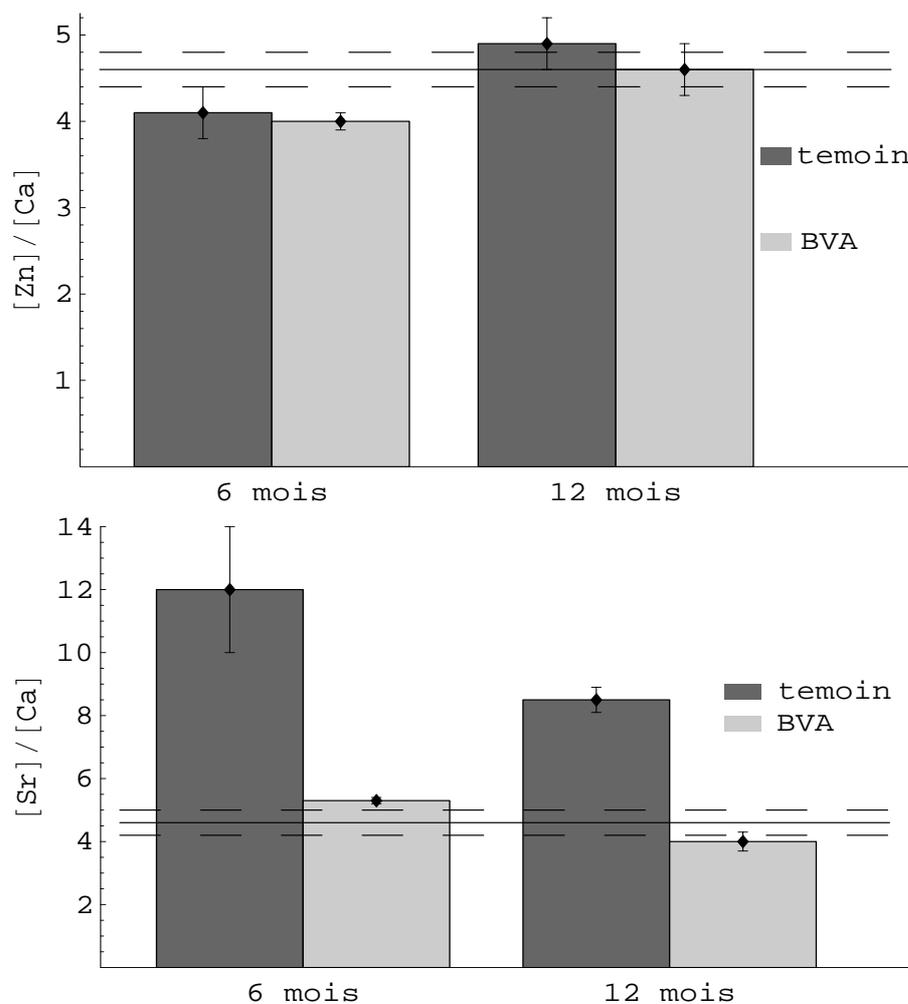


FIG. 7.3 – Evolution des rapports $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$ et $[\text{Sr}]/[\text{Ca}]$ en fonction du temps d'implantation dans l'os néoformé.

Nous avons représenté l'évolution des rapports des concentrations $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$ et $[\text{Sr}]/[\text{Ca}]$ sur la figure 7.3. La valeur de ces rapports dans de l'os mature est donnée pour comparaison (moyenne en trait plein; écart-type en trait pointillé).

Le rapport $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$ est comparable entre les implants non recouverts et ceux initialement recouverts du verre BVA. A 6 mois après implantation, le rapport $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$ est légèrement inférieur à celui observé dans un os mature. A 12 mois après implantation, ce rapport est égal à celui d'un os mature.

Pour le témoin, après 12 mois d'implantation, la valeur du rapport $[\text{Sr}]/[\text{Ca}]$ est supérieure à celle d'un os mature. En revanche, pour les implants initialement recouverts de BVA, dès 6 mois après implantation, la valeur de ce rapport est comparable à l'os mature.

Ces résultats montrent une cinétique d'assimilation différente des éléments traces Sr et Zn dans l'os néoformé, l'os qui a remplacé le revêtement BVA peut être considéré comme mature après 12 mois d'implantation.

7.3 Répartition radiale des éléments Zn, Sr et F dans l'os néoformé

Les profils multi-élémentaires ont été réalisés avec la microsonde du LPS.

7.3.1 Caractéristiques du faisceau

Nous avons effectué des profils avec un pas de 30 μm , des éléments Ca, Zn et Sr (par la méthode PIXE) , et du fluor (par la méthode PIGE : $E_\gamma = 110$ et 197 keV). Les profils donnent une information sur la répartition de éléments traces dans l'os.

Le faisceau de protons a une énergie de 3.5 MeV et une intensité de 600 pA. Il est fixe avec une surface d'impact de $15 \times 15 \mu\text{m}^2$. Un filtre est placé devant le détecteur de photons X pour réduire le taux de comptage dû aux minéraux. Ce filtre est composé d'un film en Kapton¹ de 144 μm et d'un filtre en aluminium de 100 μm d'épaisseur. Le détecteur de photons γ est placé en dehors de la chambre d'analyse et fait un angle de 135° avec le faisceau incident.

7.3.2 Tenue d'un tissu osseux sous un faisceau fixe

Nous devons vérifier la bonne tenue de l'os inclus en résine avec une sonde fixe et déterminer les conditions expérimentales les plus favorables.

Nous avons irradié une zone d'os mature, éloignée de 2 mm de la prothèse, et nous avons analysé l'évolution des rapports de concentrations $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$ et $[\text{Sr}]/[\text{Ca}]$ en fonction de la charge déposée. Nous avons constaté que le rapport $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$ est constant et que le rapport $[\text{Sr}]/[\text{Ca}]$ augmente d'environ 6 % lorsque la charge déposée varie de 0.2 à 0.4 μC . Ces rapports sont peu sensibles aux variations de la quantité de charges déposée dans l'os.

Nous avons irradié deux zones d'os mature, éloignées l'une de l'autre de 30 μm . Le faisceau a une intensité de 200 pA pour la première zone, et 900 pA pour la seconde ; la quantité de charge totale déposée est la même pour les deux zones. Nous avons observé une baisse générale du nombre de photons X et γ émis lorsque l'intensité du faisceau est de 900 pA. Dans le tableau 7.4, nous avons reporté, pour chaque élément mesuré, le taux de variation de l'intensité des photons émis entre la zone irradiée avec une intensité de 200 pA et celle irradiée avec une intensité de 900 pA.

taux de variation en %			
F	Ca	Zn	Sr
-29.7	-10.2	-30.6	-1.9

TAB. 7.4 – Taux de variations de l'intensité des photons émis lorsque l'intensité du faisceau passe de 200 pA à 900 pA.

La variation des éléments fluor, calcium et zinc est importante. La quantité de charge déposée étant la même pour les deux mesures, ces variations ne peuvent pas être induites uniquement par la formation d'un champ électrique au sein de l'os.

¹polymère avec essentiellement des molécules aromatiques à haute stabilité thermique.

En revanche, d'après le calcul théorique de Talmon et Thomas [71], l'élévation de température maximale au centre du faisceau est proportionnelle à l'intensité : elle est multipliée par 4.5 lorsque l'intensité du faisceau passe de 200 pA à 900 pA. Il est possible que cette augmentation de température soit responsable de la volatilisation de certains éléments.

Nous avons utilisé un faisceau avec une intensité constante de 600 pA, et une durée d'irradiation de 20 minutes pour chaque point (correspondant à une quantité de charges de $0.72 \mu\text{C}$).

Dans le tableau 7.5, nous avons indiqué les valeurs des rapports $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$, $[\text{Sr}]/[\text{Ca}]$ et F/Ca dans un os mature. Les rapports F/Ca représentent le rapport des intensités des photopics obtenus par PIGE pour le fluor et par PIXE pour le calcium, après avoir retiré le bruit de fond. Nous avons procédé ainsi car ne connaissant pas la densité du mélange os + résine, après irradiation, nous n'avons pu déterminer précisément le parcours des protons dans l'os. Or, le parcours intervient directement dans le calcul des concentrations du fluor.

F/Ca	103 ± 6
$[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$	4.6 ± 0.3
$[\text{Sr}]/[\text{Ca}]$	7.9 ± 0.5

TAB. 7.5 – Valeurs moyennes des rapport F/Ca, $[\text{Sr}]/[\text{Ca}]$ et $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$ dans l'os mature ($\times 10\ 000$).

La valeur du rapport $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$ est la même que celle obtenue au CENBG. Ce n'est pas le cas, pour le rapport $[\text{Sr}]/[\text{Ca}]$. La quantité de charges déposée lors des analyses effectuées avec un balayage est environ 400 fois plus faible que la celle déposée avec un faisceau fixe ; un calcul rapide explique cette différence des valeurs pour le rapport $[\text{Sr}]/[\text{Ca}]$. Nous avons trouvé une augmentation de 6 % du rapport $[\text{Sr}]/[\text{Ca}]$ lorsque la charge déposée est doublée ; ce rapport augmente donc de $100 \cdot ((1.06)^{\ln(400)/\ln(2)} - 1) \approx 65$ % lorsque la charge déposée est multipliée par 400. Cette variation lente est considérée comme constante sur un petit intervalle.

7.3.3 Résultats

Le choix d'un faisceau de protons d'énergie de $E_p = 3.5$ MeV a été fait pour améliorer la production des réactions nucléaires. Le taux des photons produits par la réaction nucléaire $^{19}\text{F}(p,p'\gamma)^{19}\text{F}$ est faible car le fluor est un élément trace dans l'os. Mais la section efficace de rétrodiffusion RBS de l'oxygène présente une résonance au environ de $E_p = 3.48$ MeV. Cette résonance est mal simulée par le logiciel et occasionne une erreur de 10 % sur le calcul de la quantité de charge. Cette erreur se propage au calcul des concentrations des éléments analysés. Nous arrivons, après avoir tenu compte de toutes les erreurs (statistique, fit, charge, ...), à des erreurs sur les rapports $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$, $[\text{Sr}]/[\text{Ca}]$ et F/Ca compris entre 20 et 30 %.

Les variations des rapports considérés ne sont pas interprétables car elles sont du même ordre de grandeur que les erreurs de mesures.

Par contre, nous avons calculé la moyenne des mesures dans les 100 premiers μm et l'avons comparé à celle de l'os mature. Nous arrivons aux mêmes conclusions que dans les analyses effectuées au CENBG quant à la qualité de l'os. Ce résultat est important car il valide les hypothèses émises sur la tenue de l'os sous faisceau.

7.4 Action des verres BVA et BVH contre la corrosion

7.4.1 Éléments contaminant l'os

Après avoir vérifié que le rapport des concentrations $[Ti]/[Ca]$ est constant au cours de l'irradiation, nous avons mesuré la valeur de ce rapport dans les cas suivants :

- implant non recouvert : dans l'os en contact direct avec la prothèse, pour chaque délai d'implantation ;
- implant initialement recouvert du verre BVA : dans l'os en contact avec le revêtement à 3 mois après implantation, dans l'os en contact direct avec la prothèse métallique pour les autres délais ;
- implant initialement recouvert du verre BVH : dans l'os en contact avec le revêtement pour chaque délai d'implantation, dans l'os en contact direct avec la prothèse métallique pour les délais 6 et 12 mois après implantation.

Pour toutes ces mesures, l'épaisseur d'os analysée est d'environ $100 \mu\text{m}$. A partir de la valeur du rapport $[Ti]/[Ca]$, nous pouvons remonter à la concentration du titane dans l'os, avant inclusion en résine :

$$[Ti] = \frac{[Ti]_{PIXE}}{[Ca]_{PIXE}} \cdot [Ca]_{theorique} \quad (7.1)$$

Nous n'avons pas déterminé la contamination de l'os par l'aluminium ou le vanadium. Pour l'aluminium, les deux revêtements en contiennent et nous ne pouvons pas différencier la provenance de la contamination (alliage ou revêtement) ; les papiers abrasifs utilisés pour le polissage contiennent de l'aluminium et nous avons parfois observé la présence de grain d'alumine en surface ; la limite de détection de l'aluminium dans ces conditions expérimentales n'est pas suffisante pour observer des contaminations de l'ordre de la centaine de ppm. En ce qui concerne le vanadium, il est difficile de conclure sur la contamination de l'os par cet élément. La raie $K\alpha$ du vanadium n'est pas dissociée de la raie $K\beta$ du titane (la différence d'énergie entre les deux raies est de 20 eV). La détermination de la concentration en vanadium se fait à partir de sa raie $K\beta$, ce qui dégrade la sensibilité de la mesure. Nous avons rarement détecté du vanadium dans l'os.

7.4.2 Evolution de la contamination de l'os dans les prothèses non recouvertes

Nous avons présenté les résultats dans la figure 7.4. Chaque point représente la moyenne pondérée de huit mesures.

Dès 3 mois après implantation, la prothèse relargue du titane dans l'os environnant. Entre 3 et 6 mois après implantation, cette contamination augmente et se stabilise entre 6 et 12 mois. La concentration du titane dans l'os est d'environ 1100 – 1200 ppm. Nous avons ajusté nos mesures par une fonction de type exponentiel (trait en pointillé) :

$$[Ti] = \begin{cases} 0 & \text{si } t < t_0 \\ [Ti]_{max} \cdot (1 - \exp[-\frac{(t-t_0)}{\tau}]) & \text{si } t \geq t_0 \end{cases} \quad (7.2)$$

t est la durée d'implantation en mois, $\tau \approx 0.3$ mois est une constante de temps caractéristique. $t_0 \approx 2.75$ mois représente la durée d'implantation pendant laquelle la prothèse ne relargue pas de titane. On considère qu'après un temps d'implantation de $t = t_0 + 3 \cdot \tau \approx 4$ mois, la concentration en titane atteint une valeur constante et égale à $[Ti]_{max} \approx 1161$ ppm.

Agins et al [90] ont mesuré la concentration des éléments Ti, Al et V dans les tissus environnant des prothèses totales de hanches, dans le cas d'échec thérapeutique. La concentration de titane trouvée varie entre une centaine de ppm et environ 3700 ppm (moyenne de 1047 ppm). Ils n'ont mis en évidence aucune corrélation entre le temps d'implantation et la contamination en titane.

Solar et al [91][92] ont proposé un modèle de corrosion de surface et d'usure des prothèses en alliage de titane pour expliquer la présence de titane dans les tissus adjacents à l'implant. Ils ont suggéré que toute la surface de la couche de passivation est constituée d'une alternance de pointes micrométriques et de surfaces planes et lisses. Les pointes représentent des irrégularités de surface qui, sous l'action de frottements, peuvent se casser ou se dissoudre *in vivo*, devenant une source de contamination des tissus.

La composition de ces particules d'usure évolue au cours du temps car la solubilité des éléments Ti, Al et V est différente, le vanadium étant le plus soluble. Il existe des désaccords, dans la littérature, sur les caractéristiques des ions métalliques relargués par la surface de l'implant : seule une étude toxicologique pourrait résoudre ce problème [93].

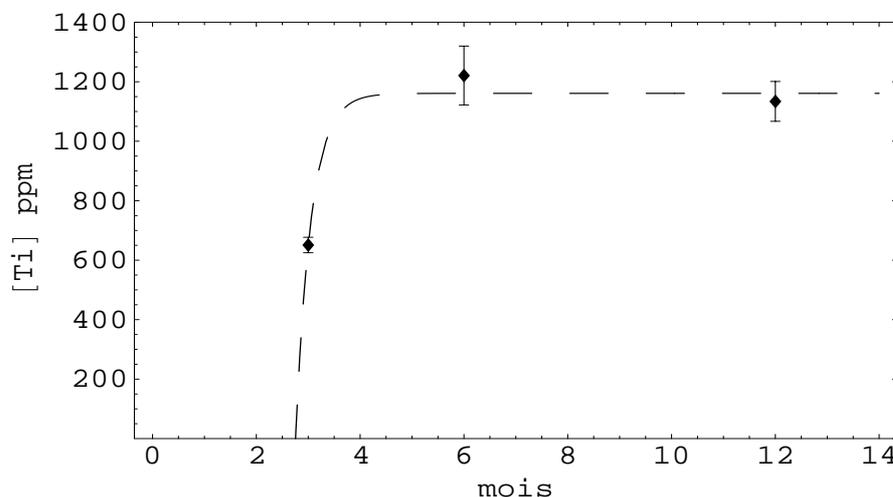


FIG. 7.4 – Evolution de la contamination en titane de l'os environnant un implant sans revêtement, au cours du temps.

7.4.3 Evolution de la contamination de l'os dans les prothèses recouvertes de verre BVA ou BVH

Nous avons observé deux cas :

1. l'os est en contact direct avec la prothèse métallique : il y a une contamination marquée de l'os par le titane.
2. l'os est au-delà du revêtement (en contact ou non) : la concentration de titane est inférieure à la limite de détection.

Lorsque le revêtement est le verre BVA, le cas 1 est très fréquent après 6 et 12 mois d'implantation, car le revêtement a disparu. Le cas 2 s'observe durant le premier délai.

Lorsque le revêtement est le verre BVH, le cas 2 est le plus fréquent. Comme nous l'avons déjà indiqué, le verre BVH se détache et le périmètre de contact osseux augmente avec le temps. Finalement après 12 mois d'implantation, la moitié de la surface de la prothèse est en contact direct avec l'os.

Dans le tableau 7.6, nous avons présenté la moyenne pondérée des concentrations en titane dans l'os environnant l'implant, pour chaque type de revêtement et pour chaque durée d'implantation.

	3 mois	6 mois	12 mois
os en contact direct avec l'implant initialement revêtu de BVA	–	285 ± 14	888 ± 86
os en contact direct avec l'implant initialement revêtu de BVH	–	387 ± 246	1307 ± 167
os au-delà du revêtement en verre (BVA ou BVH)	< LOD	< LOD	< LOD
os en contact direct avec l'implant initialement non revêtu	651 ± 26	1221 ± 99	1134 ± 67

TAB. 7.6 – Concentration du titane en ppm.

Les concentrations en titane mesurées dans l'os entourant les prothèses, après 12 mois d'implantation, pour les différents types de revêtement, ont été comparées entre elles avec le test U de Mann et Whitney. Les trois séries de mesures testées (sans revêtement, revêtu par BVA ou BVH) ne sont pas significativement différentes ($p < 0.05$).

7.4.4 Répartition radiale du titane dans l'os

Sur la figure 7.5, est présenté un profil de concentration en titane en fonction de la distance à la prothèse. Ce profil est réalisé sur une prothèse initialement sans revêtement, après 12 mois d'implantation. Les mesures sont réalisées au LPS dans les conditions décrites précédemment. Les concentrations en titane sont déterminées à partir du rapport $[Ti]/[Ca]$ mesuré (équation 7.1).

Nous constatons que la contamination en titane est concentrée dans les premiers 50–100 μm . Ensuite, la contamination suit une décroissance rapide et disparaît au-delà de 350 μm de la prothèse.

Cette localisation de la contamination a été observée à chaque analyse, indépendamment du temps d'implantation et du type de revêtement. La seule condition commune entre les différentes analyses est que l'os analysé soit en contact direct avec la prothèse métallique.

7.5 Conclusion sur ces analyses

Après vérification de la tenue de nos échantillons sous faisceau de protons, nous avons constaté les effets de la bioactivité du verre BVA sur la qualité de l'os néoformé. La qualité de l'os est déterminée à partir des concentrations des éléments traces Zn, Sr et F, normalisées par rapport à la teneur en calcium. Nous avons observé une assimilation différente

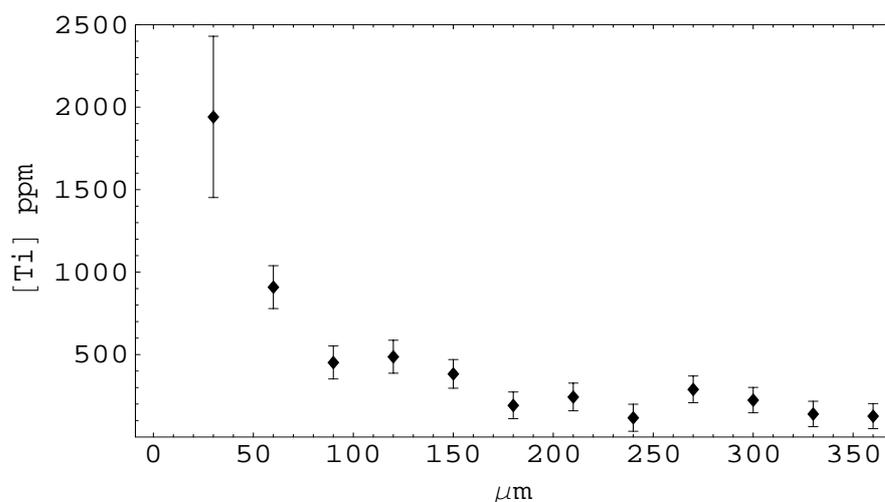


FIG. 7.5 – Profil de la contamination en titane de l'os environnant un implant sans revêtement.

dans l'os des éléments Zn et Sr. Nous concluons que l'os remplaçant le verre BVA après son hydrolyse est mature après 12 mois d'implantation. La mesure quantitative du fluor n'a pu être réalisée correctement à cause d'un problème de standard.

Nous avons constaté la contamination de l'os par du titane. Elle apparaît dès que l'os est en contact direct avec le métal. Le comportement des revêtements est identique de ce point de vue : les verres BVA et BVH protègent l'implant de la corrosion. Cependant, ce résultat positif est limité dans le temps car le verre BVA disparaît rapidement, et le verre BVH se détache progressivement de la prothèse au cours de l'implantation. Dès qu'une zone de la prothèse est mise à nu, la corrosion débute et le titane est relargué quelques semaines après. Au bout de quelques mois, la contamination est constante et localisée dans les premiers micromètres de l'os.

Chapitre 8

Combinaison de la cartographie PIXE et de l'histopathologie

Les analyses précédentes nous ont permis de quantifier les éléments présents dans les revêtements et dans l'os. Mais nous n'avons aucune information sur la présence de cellules. Lorsque nous détectons des débris d'usure de la prothèse, nous ne pouvons pas savoir si ces débris déclenchent une réaction inflammatoire locale. Lorsque les biologistes utilisent les méthodes d'histologie, ils n'ont pas d'information sur la composition élémentaire des zones d'analyse.

Nous avons cherché à développer une nouvelle méthodologie¹ : la combinaison de la cartographie PIXE (utilisée simultanément avec le RBS) et de l'histopathologie.

8.1 Etudes préliminaires

Nous avons réalisé cette étude avec des prothèses métalliques recouvertes de verre BVA, implantées pendant 3 mois dans les mêmes conditions que précédemment. Cette étude préliminaire a pour but d'identifier les conditions expérimentales optimales.

8.1.1 Préparation des échantillons

Les échantillons que nous avons utilisés en PIXE jusqu'à présent sont épais de 400 μm . Les résultats obtenus représentent une moyenne sur le parcours des protons qui est de l'ordre de 100 μm dans le revêtement ou dans l'os. Or, la profondeur d'analyse de l'histopathologie est d'environ 10 μm . Pour être sûr d'analyser le même volume, nous devons réduire l'épaisseur des échantillons.

La préparation des échantillons est la même que jusqu'à présent : il s'agit d'une coupe transversale par rapport à l'axe du cylindre de Ti6Al4V réalisée par un système Exakt, selon une technique de microsection avec une scie à ruban diamanté. Ces coupes sont collées sur une lame de plexiglas. Le ponçage et le polissage sont réalisés sur un système Exakt. L'épaisseur finale des coupes est d'environ 20 μm . Nous disposons de 5 coupes.

Les lames d'origine sont rectangulaires et de dimensions : 75 \times 25 \times 1.5 mm³. Elles sont adaptées à l'observation avec le microscope optique utilisé en histopathologie. Nous les avons retaillées comme indiqué sur la figure 8.1 afin qu'elles s'adaptent aux deux méthodes.

Les colorants utilisés pour l'histopathologie sont les mêmes que pour l'histomorphométrie. L'analyse des colorants par PIXE a montré la présence de calcium, potassium, fer,

¹enveloppe Soleau déposée à l'Institut National de la Protection Industrielle (INPI) le 30/04/2002.

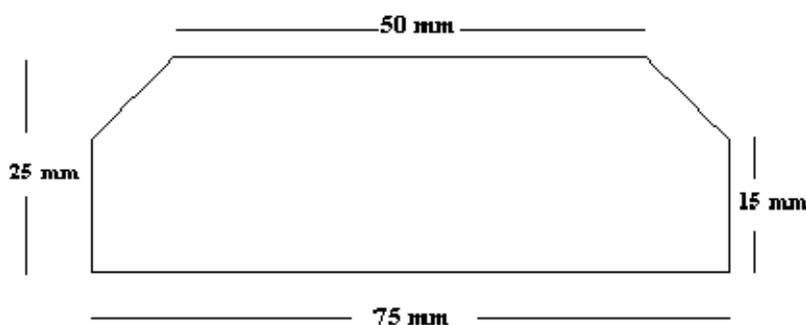


FIG. 8.1 – Adaptation au porte-échantillons des lames de plexiglas (épaisseur 1.5 mm).

manganèse et zinc. Ces éléments polluent l'analyse, il est préférable de réaliser l'histopathologie après la PIXE.

Jusqu'à présent, nous avons utilisé un dépôt de carbone pour améliorer la conduction thermique et électrique des échantillons ; mais ce dépôt empêche les observations avec un microscope optique et n'a pas été fait sur ces coupes.

8.1.2 Conditions expérimentales

Le diamètre de la sonde est de $5 \mu\text{m}$. La surface balayée est de $600 \times 600 \mu\text{m}^2$ avec une fréquence de 1 kHz.

Pour obtenir un meilleur contraste sur les cartographies des minéraux, nous n'avons pas disposé de filtre devant le détecteur X. pour protéger celui-ci des protons retrodiffusés, nous avons abaissé l'énergie des particules incidentes à 2 MeV.

Nous avons utilisé une coupe pour tester plusieurs intensités de faisceau et pour déterminer le meilleur compromis entre une durée d'irradiation minimale, un meilleur contraste des cartographies et des dégâts d'irradiations faibles. Nous avons observé les zones irradiées à la lunette binoculaire et constaté que toutes ces zones étaient plus ou moins dégradées par l'impact du faisceau : le choix d'une intensité de 150 pA pour la suite des analyses nous a semblé un bon compromis.

Pour augmenter la conductivité thermique (meilleure tenue sous faisceau) et la conductivité électrique (amélioration du rapport signal/bruit de fond) des échantillons, nous avons relié la prothèse métallique au porte-échantillon avec de la laque argentée.

8.1.3 Résultats

Nous avons analysé quatre zones par coupes, soit seize zones au total. Chaque irradiation dure environ 8 heures. Nous présentons sur la figure 8.2 les cartographies multi-élémentaires sur une de ces zones.

Comme précédemment, les cartographies des éléments majeurs tel que le titane dans la prothèse, le calcium/phosphore dans l'os et le silicium pour le revêtement permettent de se repérer. Nous constatons un meilleur contraste pour les éléments Al, Si et S sur cette figure, comparé aux figures présentées dans le chapitre précédent. L'absence de filtre devant le détecteur X est responsable de cette amélioration.

Il est intéressant de remarquer la forte concentration de soufre tout autour du verre en cours de dissolution. Nous avons déjà observé la présence de soufre dans le revêtement par faisceau d'électrons. Nous n'avons pas réalisé d'étude quantitative de ces nouvelles zones

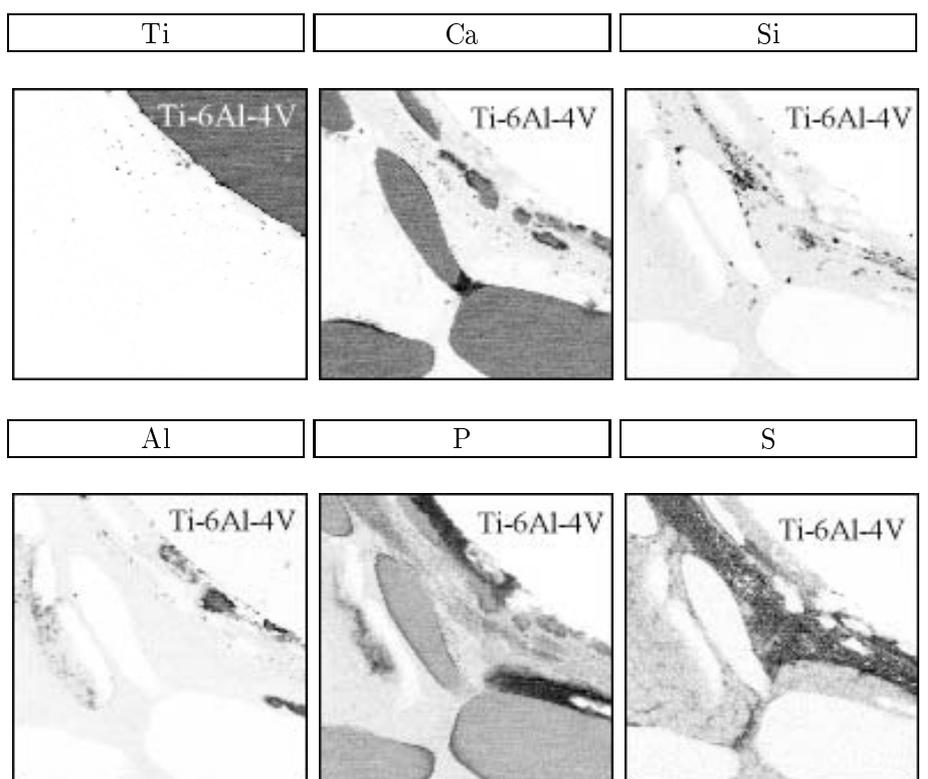


FIG. 8.2 – Cartographies multi-élémentaires d'une prothèse revêtue de verre BVA, 3 mois après implantation.

d'intérêt car la statistique du spectre RBS n'est pas suffisante pour déterminer la quantité de charges déposée.

Les seize zones irradiées ont été ensuite analysées par histopathologie. Trois zones restent interprétables ; les autres sont dénaturées suite à l'échauffement produit par l'irradiation. Cette augmentation de température pendant l'expérience entraîne une formation de bulles rendant illisible la zone irradiée. La figure 8.3 montre la zone d'impact des protons observée au microscope optique après coloration, aux grossissements $\times 4$ et $\times 10$. Sur cette figure, au plus faible grossissements, on repère les différentes zones :

- en rose : une trabécule osseuse ;
- la fraction de disque opaque : la prothèse métallique ;
- la traînée granuleuse noire : la laque argentée ;
- en brun : la zone de $600 \times 600 \mu\text{m}^2$ irradiée.

L'agrandissement de la zone brunâtre est non interprétable d'un point de vue histologique.

La figure 8.4 représente une zone faiblement dénaturée (grossissement $\times 4$, $\times 10$ et $\times 40$) où l'analyse par histopathologie est réalisable. Les flèches vertes pourraient indiquer des particules, les flèches bleues montrent des cellules révélatrices d'une réaction inflammatoire.

Sur la figure 8.5 sont présentées les cartographies multi-élémentaires de la zone correspondante. D'après ces cartographies, la réaction inflammatoire a lieu en présence de grains de verre en cours de dissolution et de titane relargué.

Lors de l'analyse des deux autres zones faiblement dénaturées, nous avons observé une autre réaction inflammatoire corrélée avec la présence de particules du revêtement et de

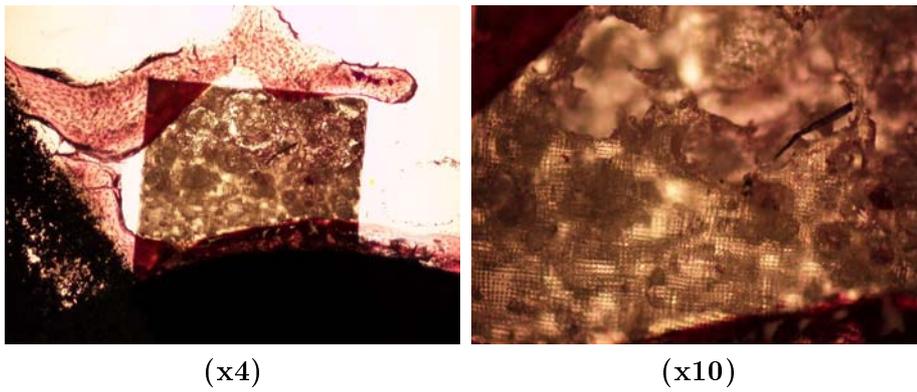


FIG. 8.3 – Observation au microscope optique, après coloration, d'une zone irradiée dénaturée.

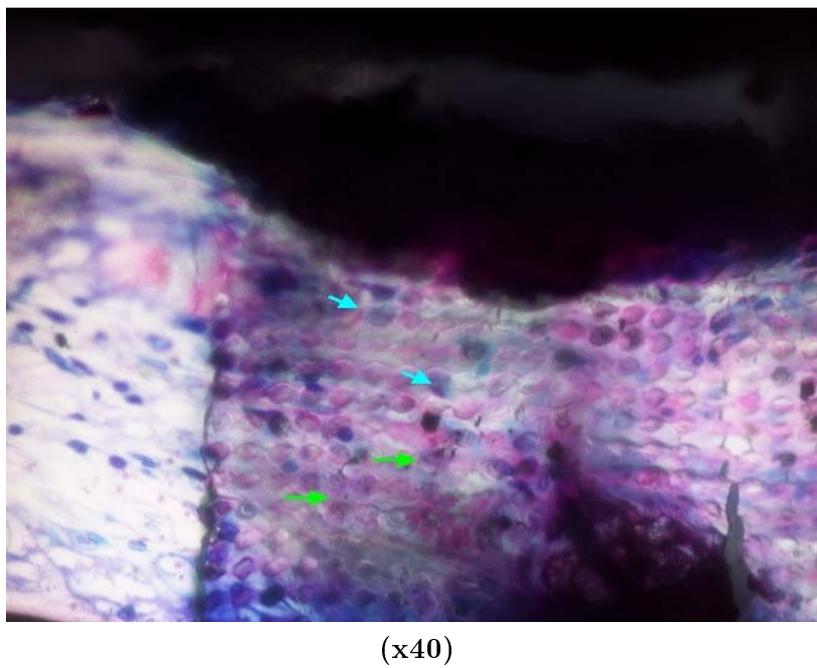
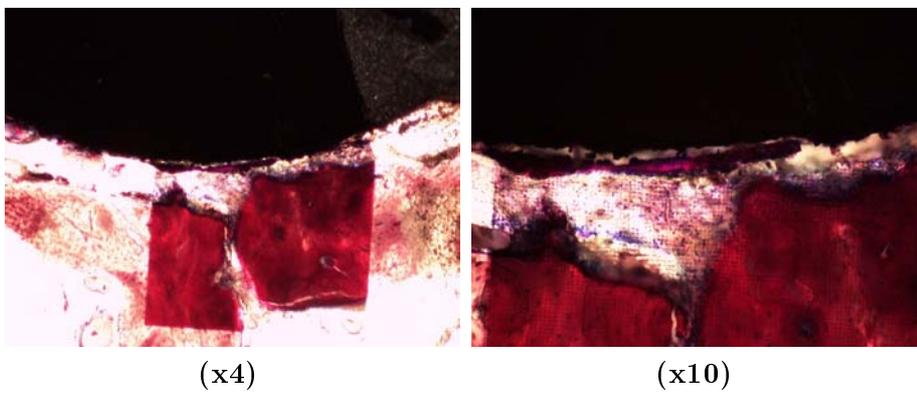


FIG. 8.4 – Observation au microscope optique, après coloration, d'une zone irradiée faiblement dénaturée.

titane. L'autre zone, malgré la présence des mêmes éléments, ne montre pas les signes d'une telle réaction.

Compte tenu de l'altération importante des échantillons et du nombre limité de zones disponibles pour l'analyse microscopique (3/16) une conclusion objective concernant la corrélation entre la présence de minéraux et de métaux relargués par l'implant (prothèse métallique + revêtement) et la réponse tissulaire associée ne peut être proposée, pour le moment.

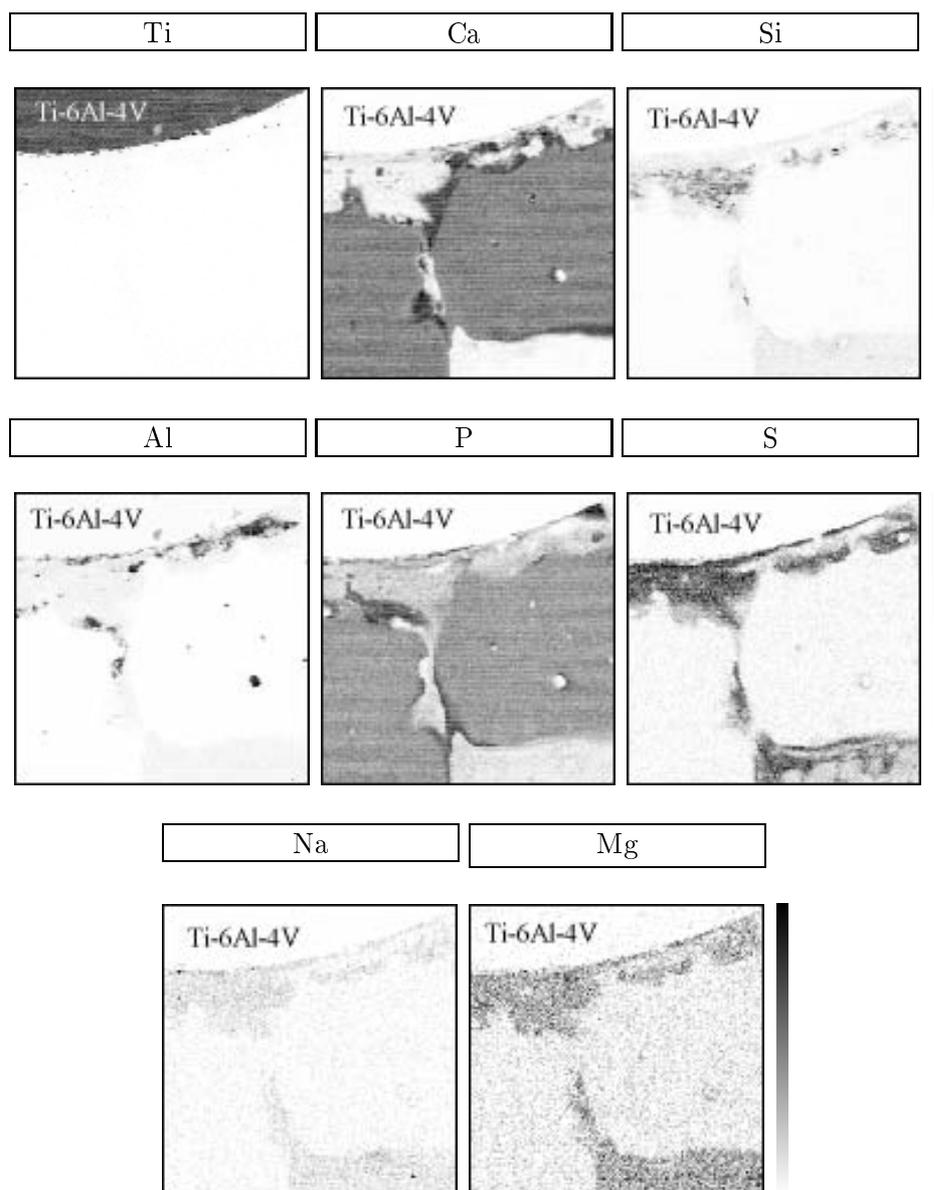


FIG. 8.5 – Cartographies multi-élémentaires de la zone irradiée.

8.2 Perspectives d'amélioration de la technique

L'altération de la zone d'analyse (formation de bulle dans la résine) sous faisceau de protons modifie l'observation histologique. Nous avons imaginé un certain nombre d'améliorations susceptibles d'augmenter la tenue de nos échantillons sous faisceau.

modification de la lame de plexiglas

L'intensité du faisceau et la quantité de charge déposée sont responsables de l'échauffement de la résine. Il faudrait diminuer l'intensité mais on augmente alors la durée d'irradiation. Par ailleurs la stabilité de faisceau est moins facile à obtenir avec de plus faibles intensités. On diminue la quantité de charge déposée sur l'échantillon en réduisant le temps d'irradiation (pour une intensité fixe) mais cela entraîne une statistique plus faible.

Une solution serait de modifier la lame de plexiglas qui sert de support à la coupe. Nous avons comparé deux spectres X obtenus à partir d'échantillon comparable : prothèse en Ti6Al4V recouverte de verre BVA et implantée *in vivo* durant 3 mois. Les deux spectres sont représentés sur la figure 8.6 ; le premier (a) concerne une coupe épaisse (400 μm) et le second (b) une coupe mince (20 μm). Les caractéristiques des faisceaux utilisés sont données dans le tableau 8.1.

En comparant les deux spectres, plusieurs effets sont visibles :

- section efficace d'ionisation différentes (absence des raies K_α et K_β du Sr pour des protons incidents de 2 MeV) ;
- effet de charge de surface (absence de métallisation en (b)) ;
- effet du filtre *funny filter* (b) ;
- bremsstrahlung.

	coupe épaisse (a)	coupe mince (b)
énergie des protons	3 MeV	2 MeV
intensité du faisceau	600 pA	150 pA
métallisation de la coupe	dépôt de carbone	–
filtre devant le détecteur X	<i>funny filter</i>	–

TAB. 8.1 – Caractéristiques des faisceaux de protons utilisés pour obtenir les spectres (a) et (b).

En ce qui concerne la première partie des spectres (région $1 < E_X < 7$ keV) l'effet du bremsstrahlung est particulièrement visible sur le deuxième spectre. En effet, les protons de 2 MeV traversent les 20 μm de la coupe, et ce quelque soit la nature de la zone irradiée (os, prothèse métallise, revêtement, ...) ; ils sont arrêtés par la lame de plexiglas provoquant alors une forte émission de bruit de fond continu.

Il n'est pas possible de se passer de la lame de plexiglas si l'on veut effectuer l'histopathologie. Cependant, il est possible de rendre l'échantillon réellement mince sur les zones que nous analysons en priorité. Celles-ci sont le revêtement en cours de transformation et l'os environnant. L'idée est de percer un trou d'environ 6 mm dans la lame de plexiglas et en ensuite de coller la coupe sur la lame en faisant coïncider le centre du trou avec le centre du cylindre métallique. Celui-ci ayant un diamètre de 4 mm, la zone périphérique de la prothèse (environ 1 mm d'épaisseur de part et d'autre du cylindre) est réellement mince pour l'analyse par PIXE.

Le gain sur le rapport signal/bruit permettrait de diminuer la durée d'irradiation.

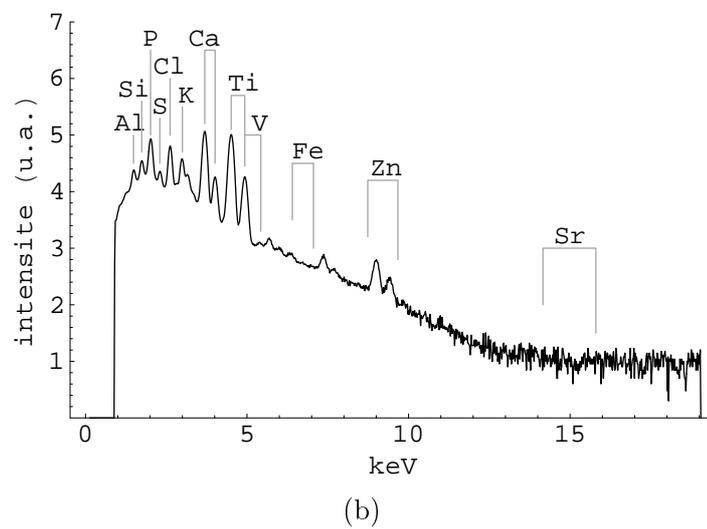
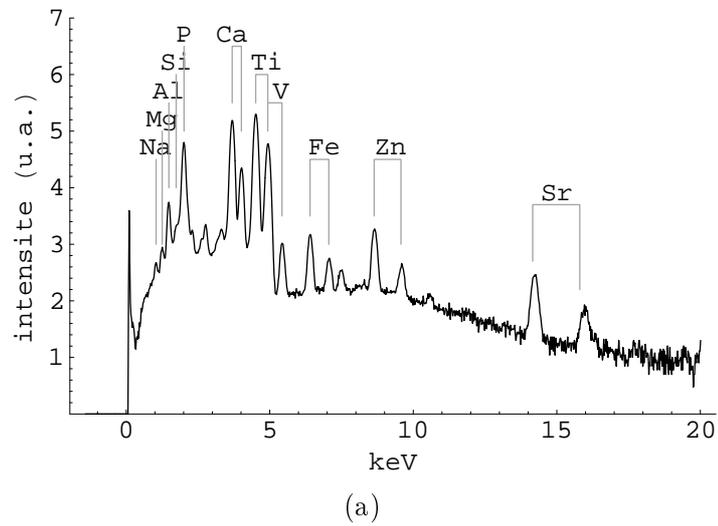


FIG. 8.6 – Spectres PIXE d'une coupe épaisse avec énergie des protons de 3 MeV (a) et d'une coupe mince avec énergie des protons de 2 MeV (b).

repolissage

Une autre manière d'améliorer la méthode est d'inverser l'ordre des analyses. Dans un premier temps : l'histopathologie et dans un deuxième temps : la PIXE. Mais pour que l'analyse PIXE ne soit pas perturbée par le colorant utilisé en histologie, il faut repolir la surface de l'échantillon.

Il semble que ces colorants pénètrent dans la coupe sur une profondeur d'environ 5 - 10 μm . Cette hypothèse est à vérifier. Une fois le colorant retiré, nous pouvons métalliser les coupes (évite les effets de charge en surface) et réaliser l'analyse par PIXE. Il est même envisageable d'utiliser un faisceau de protons plus intense, ce qui permettrait un gain significatif sur la durée d'irradiation.

En revanche, le repérage des zones d'analyses sera plus minutieux.

Quatrième partie

Essai de modélisation par la théorie de la percolation de la résorption de biomatériaux

Chapitre 9

Caractéristiques des biomatériaux intervenant dans le modèle et présentation de la théorie de la percolation

Les biomatériaux de comblement osseux sont chargés de faciliter la réossification d'un site osseux présentant une perte de substance importante. L'ostéointégration de ces matériaux dépend de plusieurs paramètres.

La caractérisation des biomatériaux étudiés par notre équipe ces dernières années, notamment le corail et l'hydroxyapatite, a fait l'objet de plusieurs thèses [94][95][96]. Ces deux biomatériaux montrent des similitudes dans leur comportement *in vivo* et certaines caractéristiques telles que la taille, la porosité, . . . semblent jouer un rôle important sur la durée nécessaire à résorber l'implant. Dans la première partie de ce chapitre, nous allons relever ces caractéristiques. Dans la seconde partie, nous présenterons les notions essentielles de la théorie de la percolation intervenant dans le modèle que nous avons développé.

9.1 Caractéristiques des biomatériaux

9.1.1 Corail

Le récif corallien est dû à des animaux des mers chaudes : les polypes. Les coraux sont constitués par une colonie d'individus, chacun est constitué d'une partie molle, le polype, et de son squelette ectodermique calcaire. Ce squelette est constitué de 99 % de carbonate de calcium ($CaCO_3$) sous forme d'aragonite et de 1 % de matière organique (acides aminés). Le corail est comparable en terme de biocompatibilité à la calcite synthétique [97].

Ca	> 38 %
P	< 0.05 %
Sr	5 à 9 %
Mg	0.5 à 2 %

TAB. 9.1 – Composition du corail étudié (en % massique).

Le corail possède, selon les espèces, une porosité comparable à celle d'un os cortical ou

spongieux. Le Porites, une des variétés du corail, a une porosité de 50 %. Le diamètre des pores est d'environ 150 μm . Son architecture (forme et dimensions) présente une similitude avec le tissu osseux et justifie son utilisation en chirurgie osseuse : orthopédique, maxillo-faciale, dentaire, etc. . .

De même que la porosité, les caractéristiques mécaniques sont variables suivant les espèces de coraux implantés. Le corail étudié par notre équipe est du type *porites asteroïdes* dont la composition est donnée dans le tableau 9.1.

9.1.2 Hydroxyapatite synthétique

L'hydroxyapatite (HA) est utilisée comme revêtement de prothèse et comme matériau de comblement. Elle présente l'avantage de pouvoir être mise en forme facilement. Il est possible de faire varier la porosité, la taille des pores, etc. . .

L'HA, étant synthétique, peut accepter un dopage lors de sa fabrication.

Nous donnons dans le tableau 9.2 la composition en % massique des quatre matériaux synthétiques (céramiques de phosphate de calcium) de comblement osseux, étudiés par notre équipe :

- l'hydroxyapatite pure (HAp) ;
- la céramique constituée de 75 % d'hydroxyapatite et de 25 % de phosphate tricalcique β , appelée phosphate de calcium biphasique (HTCP) ;
- l'hydroxyapatite dopée en manganèse (HA,Mn) ;
- l'hydroxyapatite dopée en zinc (HA,Zn).

	HAp	HTCP	HA,Mn	HA,Zn
Ca	39.8 %	39.5 %	39.8 %	39.8 %
P	18.5 %	18.9 %	18.5 %	18.5 %
Mn	–	–	0.077 %	–
Zn	–	–	–	0.073 %

TAB. 9.2 – Composition des principaux éléments minéraux présents dans l'HAp, l'HTCP, l'HA,Mn et HA,Zn (en % massique).

Les ions métalliques Mn^{2+} , Zn^{2+} , ont été choisis sur des critères biologiques (capacité à favoriser la résorption et l'ossification, ils pourraient jouer un rôle sur la quantité ou la qualité des ostéoblastes).

9.1.3 Caractéristiques communes

Les implants de corail et de céramique se présentent sous forme de cylindres pleins. Ils ont été implantés dans des fémurs d'ovins et de porcins, soit au niveau de l'épiphyse (os spongieux), soit au niveau de la diaphyse (os cortical). Des cylindres de tailles sensiblement différentes ont été étudiés : la longueur variant de 10 à 14 mm et le diamètre de 5 à 6 mm.

Le panel de techniques expérimentales a permis :

- d'étudier la vitesse de résorption de l'implant et l'ossification au cours du temps d'implantation (utilisation de traceurs radioactifs, PIXE, . . .) ;
- de connaître la composition de l'implant au cours du temps (activation neutronique, spectrométrie à émission atomique à couplage inductif, PIXE) ;
- de suivre l'évolution cristallographique de l'implant au cours du temps d'implantation (diffraction de rayons X) ;

- d'étudier la biofonctionnalité de l'implant (molécule MDP marquée avec $^{99m}\text{Tc}^*$).

La résorption d'un matériau de comblement et le remplacement de celui-ci par de l'os se réalisent en deux étapes successives :

1. une phase latente où la composition minérale et la structure cristalline de l'implant sont préservées.
2. résorption du biomatériau et ossification en simultanée
 - (a) une phase rapide au début du processus.
 - (b) une phase lente ensuite.

La première phase correspond à l'invasion par les cellules sanguines et à l'établissement d'une vascularisation de l'implant [98]. Elle précède la résorption du matériaux et la formation osseuse. Cette vascularisation est dépendante de la porosité de l'implant.

porosité

Les matériaux de comblement osseux sont des matériaux poreux car ils sont destinés à être recolonisés par des cellules osseuses et à servir d'expandeur tissulaire. La porosité¹ joue un rôle important quant à la vitesse de résorption du biomatériau.

Des études [99] ont montré que pour deux types différents de coraux, le Porites et l'Acropora, la plus grande vitesse de résorption et de formation osseuse est observée chez le Porites et s'explique par la porosité (50 % de porosité pour le Porites et 10 % pour l'Acropora).

Du fer, présent dans les globules rouges, est détecté durant la phase latente dans le cas d'implant en HAp de porosité 50 %. Il n'en est pas détecté dans le cas d'HAp dense (porosité 5 %), qui se résorbe beaucoup plus lentement que l'HAp poreuse.

La taille des pores joue également un rôle important. Ils doivent avoir une taille voisine des pores de l'os afin de permettre une meilleure vascularisation du matériau. Des tests [100] sur l'HA et le phosphate tricalcique, avec la même porosité mais avec des tailles différentes de pores, ont montré que la vitesse de repousse osseuse dépend de la taille des pores. Enfin, une interconnection totale entre eux assure une vascularisation complète et une recolonisation sur tout le volume de l'implant.

9.2 Principe de la théorie de la percolation

9.2.1 Introduction

La théorie de la percolation a été fondée par Broadbent et Hammersley en 1957. Elle a été proposée pour résoudre la problème suivant :

Quelle est la probabilité pour que soit mouillé le centre d'une pierre poreuse immergée dans un fluide ?

Il s'agissait d'étudier la propagation d'un fluide dans un milieu formé de sites ou atomes, de la pierre. Certains sites sont reliés par des canaux ou ponts, ouverts ou fermés de manière aléatoire. Cette propagation, contrairement à une diffusion classique, ne dépend pas du fluide mais du milieu (la pierre).

La théorie de la percolation est liée à l'outil informatique et l'engouement actuel pour cette théorie provient pour beaucoup de la constante amélioration de l'informatique. Elle

¹elle est représentée par le rapport entre le volume des pores et le volume de l'implant.

est appliquée à des domaines aussi variés que l'épidémiologie, l'économie ou encore la physique nucléaire.

Nous avons choisi d'utiliser la théorie de la percolation pour simuler la résorption de matériaux de comblement car la phase de vascularisation de ces implants présente de fortes analogies avec le problème initial et fondateur de cette théorie. Avant de décrire nos simulations, nous allons présenter brièvement la théorie de la percolation.

9.2.2 Principe

La percolation est un problème de communication qui se pose dans un milieu étendu où sont distribués un grand nombre de *sites* susceptibles de relayer localement une information. Ceux-ci communiquent entre eux par des *liens* dont l'efficacité est aléatoire. Suivant que la proportion de liaisons actives est ou non supérieure à une valeur seuil, il existe ou non une possibilité de transmettre l'information à grande distance. La caractéristique de la percolation réside dans le fait qu'il s'agit d'un phénomène critique. Au-dessous du seuil, une information reste confinée dans le petit îlot où elle est née, sitôt dépassé le seuil, l'information *percole* et se retrouve aussi loin de son point de départ qu'on aille la chercher. Le terme information est pris ici dans son sens le plus large ; il peut s'agir d'une propriété physique ou biologique aussi bien qu'un fluide.

9.2.3 Formalisme : les quatre modèles de base

Considérons un système d'extension $L \in \mathbf{R}^d$, décrit avec une résolution $\Gamma \ll L$, fixé par l'observateur et choisi en fonction de la particule-test dont on souhaite, dans une seconde étape, étudier la diffusion. L'existence d'une échelle minimale Γ conduit naturellement à discrétiser le milieu étudié. Ses configurations sont aléatoires et fortement inhomogènes mais sa statistique est supposée spatialement homogène et indépendante du temps si l'on suppose que ce milieu, isolé, a atteint son équilibre statistique. Les quatre modèles usuels sont les suivants :

percolation de sites

La discrétisation est réalisée par un pavage en cellules identiques de volume a^d , assimilées aux sites d'un réseau indexé dans \mathbf{Z}^d (figure 9.1). L'état d'un site est aléatoire, et les sites sont statistiquement indépendants : chacun d'eux est occupé avec la même probabilité p , donc vide avec la probabilité $1 - p$. La probabilité p qu'un site soit occupé coïncide avec la concentration totale si le réseau est suffisamment grand.

percolation de liens

La discrétisation est réalisée par un maillage en liens de longueur a , statistiquement indépendants et identiques, présents avec une probabilité p_B ², donc absents avec une probabilité $1 - p_B$ (figure 9.2). La probabilité p_B coïncide avec la concentration totale de liens si le réseau est assez grand.

percolation de sites-liens

Ce modèle est un hybride des deux précédents : on parle d'un modèle de sites dans lequel les liens entre deux sites occupés ne sont présents qu'avec une probabilité conditionnelle

²l'indice B réfère à *bond* signifiant lien en anglais

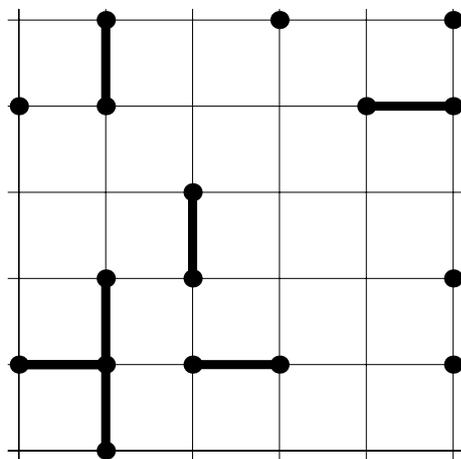


FIG. 9.3 – Percolation de sites-liens.

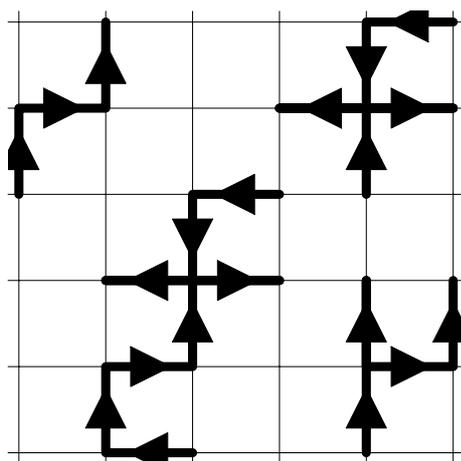


FIG. 9.4 – Percolation dirigée.

9.2.4 Amas et seuil de percolation

Un *amas* est un ensemble connexe de sites occupés ou de liens présents. Dans le premier modèle, les sites d'un amas devront être reliés par une suite de sites occupés proches voisins ; dans le cas des modèles de percolation de liens et de sites-liens, deux liens d'un amas devront être reliés par une chaîne de liens occupés ; dans le dernier modèle, deux sites d'un amas devront être reliés par une suite de liens orientés de façon cohérente. Sauf mention explicite, nous envisagerons le modèle de la percolation de sites.

Dans un réseau infini, on appelle *seuil de percolation*, la concentration p_c à laquelle apparaît le premier amas infini. L'intuition laisse penser que $p_c = 1/2$ par symétrie ou que ce seuil est une variable aléatoire, mais ce n'est pas exact. Dans un réseau d'extension infinie, cette concentration a une valeur bien déterminée, ne dépendant que du modèle de percolation choisi, de la géométrie et de la dimension d du réseau et non de l'interprétation physique des sites occupés ou des liens présents, ni de la façon dont on réalise l'augmentation de p à partir de $p = 0$. La question est alors de calculer p_c et de décrire la transition $p = p_c$.

Dans un réseau fini d'extension linéaire L , on introduit la notion d'*amas percolant*, dont la définition, dépendant du contexte physique, du modèle et de la géométrie du réseau est, par exemple, l'existence d'un amas reliant les différents bords du réseau. La concentration $\tilde{p}_c(L)$ à laquelle apparaît le premier amas percolant est maintenant une variable aléatoire ; sa valeur dépend de la définition choisie pour un amas percolant et de la façon dont on a effectué sa construction, par exemple en remplissant au hasard les sites encore libres.

Il existe une correspondance rigoureuse entre les grandeurs de la percolation et celles des transitions de phases. Ce théorème a été démontré par Kasteleyn et Fortuin en 1969. Ceci offre à la théorie de la percolation le bénéfice de nombreux résultats obtenus dans le domaine des transitions de phases (renormalisation, exposants critiques, ...). Notamment, des études théoriques des réseaux finis permettent d'obtenir, à une précision donnée, la valeur de p_c à partir de $\langle \tilde{p}_c(L) \rangle$.

Chapitre 10

Essai de modélisation

10.1 Modèle à deux dimensions (2D)

Les simulations sont effectuées *via* un logiciel que nous avons écrit : *BiomatSimul*¹

10.1.1 Représentation des implants en 2D - Caractéristiques du réseau

Le choix d'un modèle en 2D est justifié par un gain important sur la durée des simulations informatiques : il nous a permis de tester et d'affiner le modèle plus rapidement.

Les implants que nous simulons sont des cylindres de corail ou de céramique. Un cylindre peut être assimilé en 2D à un rectangle ou à un disque selon l'axe de projection choisi : ces deux cas sont porteurs d'une partie des caractéristiques de la géométrie cylindrique des implants et une étude complète devrait considérer les deux figures. Dans notre travail, le modèle en 2D sert uniquement à trouver le modèle de percolation adéquat. Nous avons représenté un cylindre par un rectangle dont la largeur est égale au diamètre du cylindre implanté.

Nous avons fixé la résolution Γ du réseau à $150 \times 150 \mu\text{m}^2$. Cette valeur est par définition la taille d'un site du réseau : un site occupé représentant le biomatériau ou l'os ; un site vide représentant un pore qui, pour être colonisé par les cellules responsables de la résorption, doit avoir une taille suffisante. L'anhydrase carbonique, enzyme sécrétée en particulier par les ostéoclastes, est responsable de la résorption du corail [101] ou de l'hydroxyapatite. Ces cellules ont un diamètre de 10 à 100 μm .

La modélisation de la résorption de l'implant est réalisée en deux étapes :

- vascularisation de l'implant ;
- résorption proprement dite et ossification.

10.1.2 Vascularisation de l'implant

La vascularisation de l'implant est simulée par un modèle de percolation de type sites-liens entre les pores du biomatériau. Lorsque deux sites vides (pores) sont connectés par un lien, nous considérons qu'ils sont vascularisés. Nous pouvons définir alors un amas de liens activés comme un ensemble de pores vascularisés.

La vascularisation commence sur deux bords opposés du rectangle (en général les longueurs) et s'étend à chaque intervalle de temps à l'intérieur de l'implant. Lorsque ces deux sources de vascularisation se rejoignent, l'ensemble des liens représente l'amas percolant. Le temps nécessaire pour obtenir cet amas est le *temps de percolation* noté t_p .

¹enveloppe Soleau déposée à l'Institut National de la Protection Industrielle le 30/04/2002.

définition des paramètres p et q

Nous considérons, dans notre modèle, que la vascularisation est indépendante de la nature de l'implant. Seules, les caractéristiques de la porosité sont prépondérantes : densité, taille, type (continue ou non ; ouverte ou fermée).

Nous simulons ces trois caractéristiques avec deux paramètres (p et q) :

- p est la densité de site occupé / $1-p$ est la porosité de l'implant ;
- q est la probabilité d'activer un lien entre deux pores.

Ces deux paramètres rendent compte de la plupart des porosités rencontrées dans les biomatériaux. La porosité $1-p$ et la résolution Γ fixent la taille moyenne des pores. La probabilité q définit le type de porosité ; nous considérons, par exemple, que des pores interconnectés sont représentés par $q=1$.

Concrètement, un pore vascularisé est tiré au sort parmi tous les pores vascularisés et il se propage dans une direction permise avec la probabilité q . Le nombre de tirage au sort nécessaire pour simuler une semaine d'implantation est noté n .

visualisation de la simulation

La figure 10.1 montre les étapes de la vascularisation d'un implant. Les sites pleins (biomatériaux) sont en noir ; les sites vides sont en blanc (pores) ; les liens sont en rouge (pores vascularisés). Les caractéristiques de cette simulation sont : porosité de 50 %, pores interconnectés ($p=0.5$ et $q=1$).

(a) représente l'étape initiale : la configuration de départ est obtenue avec un remplissage aléatoire où chaque site a la probabilité p d'être occupé.

(b), (c), (d), (e) et (f) sont les étapes de vascularisation. En (f), nous sommes sur le point d'obtenir l'amas percolant.

10.1.3 Résorption et remodelage osseux

définition du paramètre r

Une fois l'amas percolant établi, la simulation de la résorption de l'implant et l'ossification commencent ; la vascularisation continue simultanément. Les deux mécanismes ossification/résorption sont contrôlés par la même variable : r . Elle est la probabilité qu'un pore vascularisé (contenant le cortège des cellules osseuses avec notamment les ostéoclastes et ostéoblastes)

- s'ossifie (site vide devient un site plein) ;
- résorbe un site plein (biomatériau ou os) parmi ses premiers voisins.

Il est important que les probabilités d'ossification et de résorption de l'os soient identiques afin d'imiter le processus de remodelage osseux qui aboutit à une porosité de l'os de 50 % quelle que soit la porosité initiale de l'implant.

La figure 10.2 représente les étapes de la résorption de l'implant et du remodelage osseux (suite de la figure 10.1). Les sites pleins représentant l'os sont en bleu.

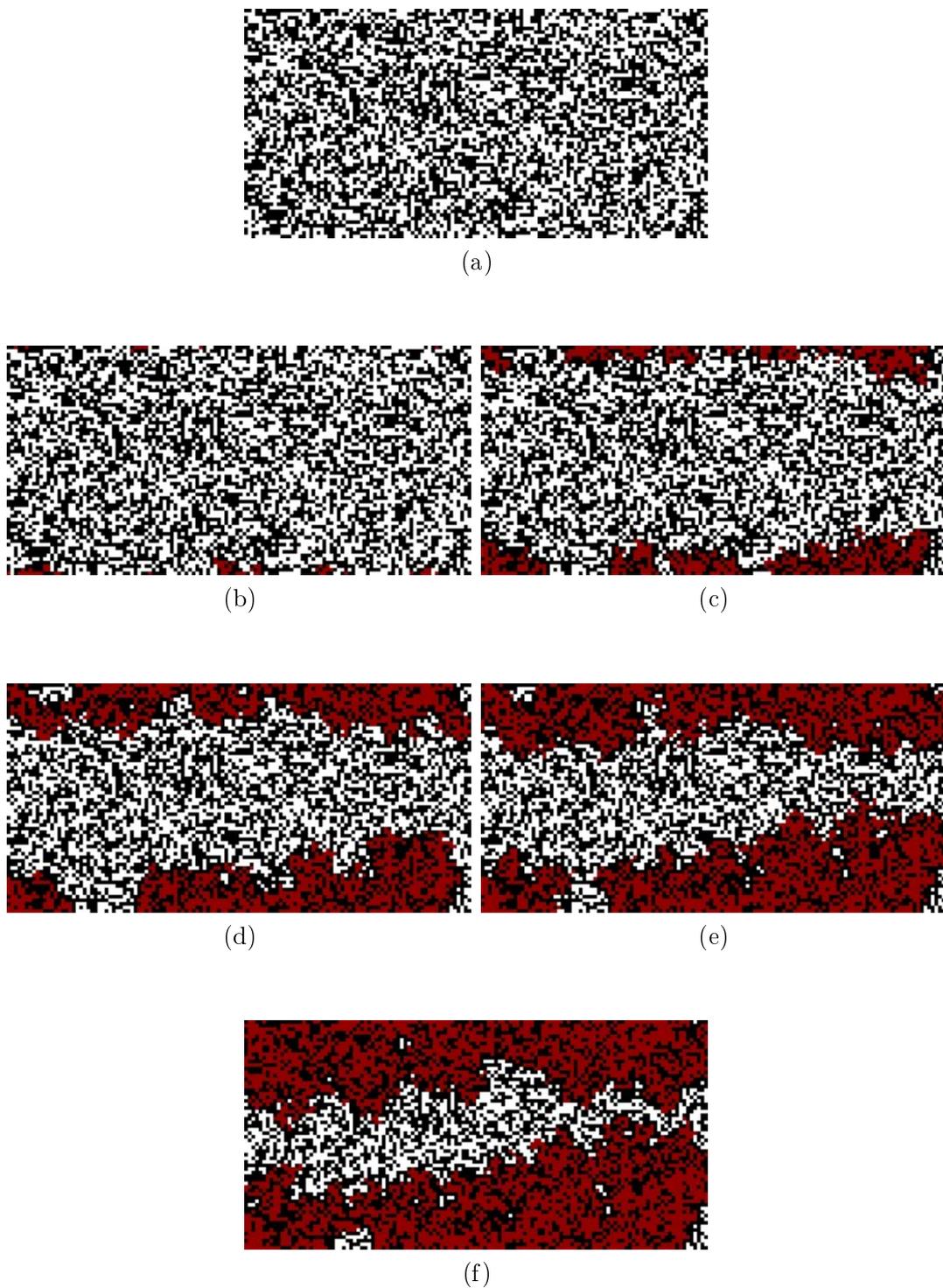
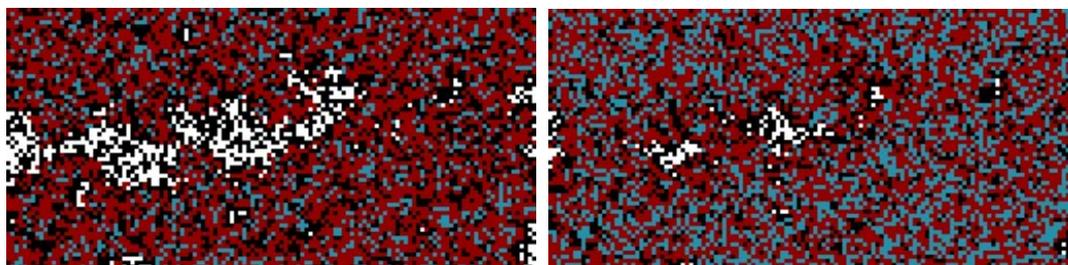
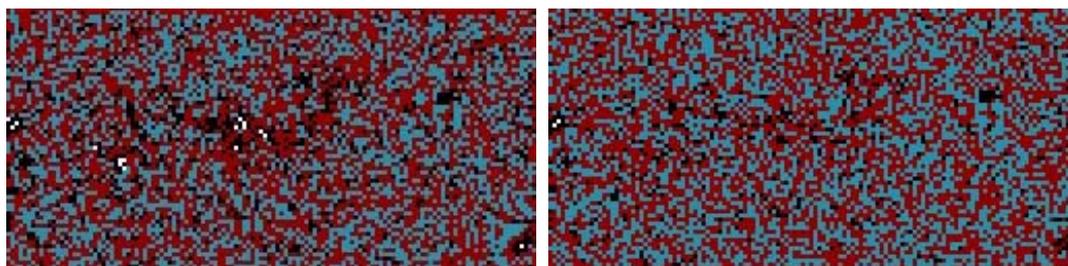


FIG. 10.1 – Exemple de simulation de la vascularisation d'un implant avec une porosité de 50 %, pores interconnectés.



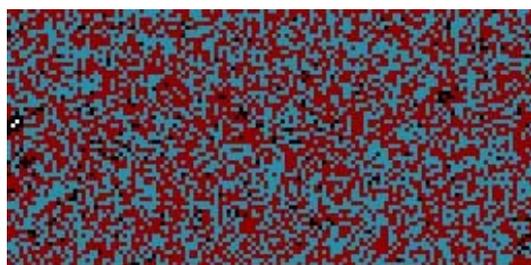
(g)

(h)



(i)

(j)



(k)

FIG. 10.2 – Exemple (suite) de simulation de la résorption d'un implant avec une porosité de 50 %, pores interconnectés.

discussion

Dans ce modèle, la probabilité r est nulle lorsque le temps d'implantation $t < t_p$, et non nulle lorsque l'amas percolant est formé².

Nous avons envisagé le cas où cette probabilité est non nulle quel que soit le temps d'implantation, mais change de valeur après la vascularisation de l'implant.

Ce cas de figure est important pour les implants lentement résorbables comme les céramiques dont la porosité n'est pas continue (pores non connectés). Une valeur non nulle de r est nécessaire pour expliquer la résorption des bords des implants (avec ossification partielle) et la création de pores interconnectés pour assurer la progression de la vascularisation.

Cependant, nos implants sont de petite taille et l'effet d'une valeur de r non nulle durant la simulation des premières semaines d'implantation n'a pas d'effet important sur les résultats. En revanche, prendre la valeur de r nulle durant la vascularisation permet de définir un temps caractéristique, comparable entre les différents implants. Ce temps est défini comme la durée nécessaire à résorber la moitié de l'implant : il est noté τ .

10.1.4 Effet de la porosité de l'implant

Nous avons simulé la résorption d'un matériau avec différentes porosités pour déterminer la valeur seuil de la porosité au-dessous de laquelle la création d'un amas percolant est impossible.

La taille du réseau est 40×100 , p est variable de 0 à 1, $q=1$ et r est indéfini. Nous avons effectué 100 simulations pour chaque valeur de p . Pour chacune d'entre-elles, nous avons noté le taux de simulation où il y avait la création d'un amas percolant. Les résultats sont portés sur la figure 10.3. Malgré la taille finie du réseau, le seuil de percolation est visible : pour une porosité supérieure à 40 %, la création d'un amas percolant est possible, pour une porosité inférieure à 30 %, la vascularisation de l'implant est impossible, entre ces deux valeurs, le graphique donne la probabilité d'obtenir un amas percolant.

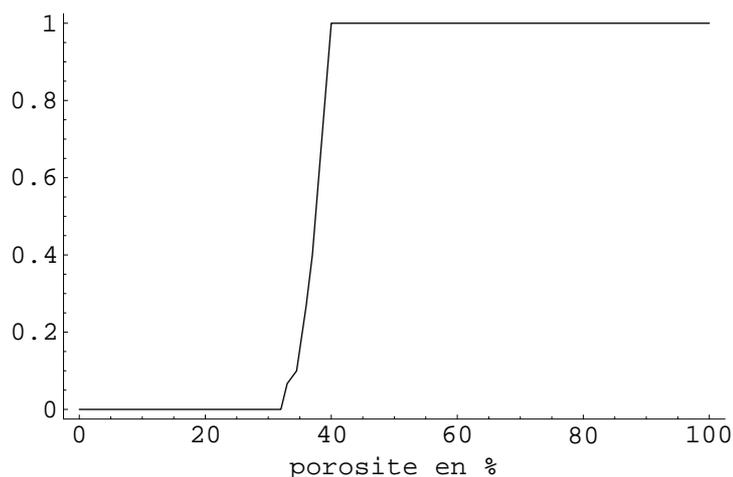


FIG. 10.3 – Probabilité d'obtenir un amas percolant dans un réseau de 40×100 , en fonction de la porosité.

²sauf dans le cas où l'implant est un matériau poreux non résorbable (ex : implant métallique poreux)

10.1.5 Confrontation des simulations aux résultats expérimentaux

Nous allons comparer certains des résultats expérimentaux, obtenus pour le corail, l'HAp et l'HA,Zn, aux simulations.

le corail

Les données expérimentales [94] concernent un cylindre de corail (Porites de porosité 50 %), de diamètre 6 mm et de longueur 14 mm. Ces cylindres ont été implantés en milieu cortical chez le porc. Les résultats présentés dans le tableau 10.1 ont été obtenus grâce à un traceur radioactif $^{85}\text{Sr}^*$.

Durée d'implantation en semaines	corail restant en %
1	99 ± 4
2	79 ± 12
3	48 ± 10
4	28 ± 6
6	12 ± 2
10	2 ± 2
24	0

TAB. 10.1 – Résorption du corail en milieu cortical chez le porc, en fonction de la durée d'implantation (en semaines).

Nous avons simulé les cylindres par des réseaux rectangulaires de 40×100 avec les caractéristiques suivantes : $p=0.5$, $q=1$ et $r=0.07$. Sur la figure 10.4, la courbe est issue de la moyenne de 30 simulations.

La courbe de simulation est en adéquation avec les points expérimentaux.

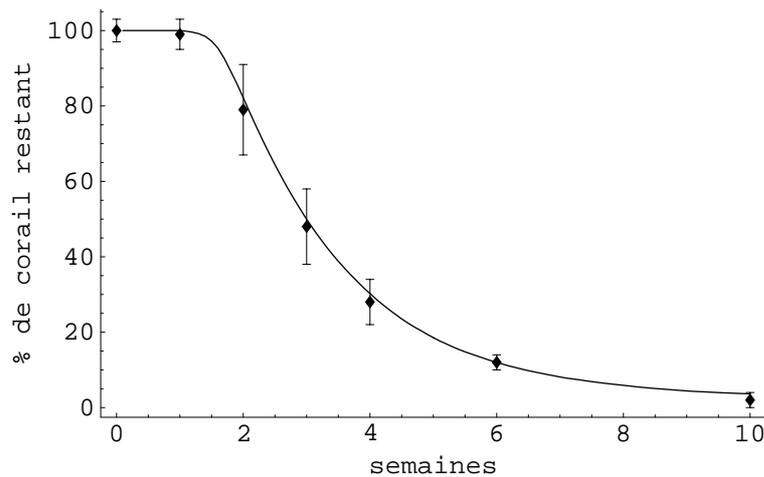


FIG. 10.4 – Simulation (2D) de la résorption d'un cylindre de corail.

les hydroxyapatites

Les données expérimentales [102] sont celles de cylindres d'hydroxyapatite pure ou dopée en zinc. Les cylindres ont un diamètre de 6 mm et une longueur de 10 mm. La porosité des implants est de 50 %. Ils ont été implantés en milieu cortical chez des ovins. Les résultats dans les tableaux 10.2 et 10.3 ont été obtenus par la méthode PIXE. Les taux d'hydroxyapatite restante ont été calculés à partir des concentrations en phosphore.

Durée d'implantation en semaines	HAp restante en %
2	98 ± 8
4	92 ± 8
8	77 ± 7
12	88 ± 8
16	72 ± 7
20	55 ± 6
28	46 ± 4
36	34 ± 3
48	24 ± 3

TAB. 10.2 – Résorption de l'HAp en milieu cortical chez l'ovine, en fonction de la durée d'implantation (en semaines).

Durée d'implantation en semaines	HA,Zn restant en %
2	97 ± 8
4	91 ± 8
8	76 ± 7
12	58 ± 7
16	47 ± 6
20	39 ± 6
28	29 ± 3
36	14 ± 3
48	0

TAB. 10.3 – Résorption de l'HA,Zn en milieu cortical chez l'ovine, en fonction de la durée d'implantation (en semaines).

Nous avons simulé les cylindres par des réseaux rectangulaires de 40×70 . Les valeurs des paramètres sont présentées dans le tableau 10.4. Sur les figures 10.5 et 10.6, les courbes sont déduites de la moyenne de 30 simulations.

Pour ces deux céramiques, les simulations sont aussi en bon accord avec les résultats expérimentaux.

caractéristiques	corail	HAp	HA,Zn
taille réseau	40×100	40×70	40×70
p	0.5	0.5	0.5
q	1	0.14	0.4
r	0.07	0.0035	0.005
n	$3.5 \cdot 10^4$	$3.5 \cdot 10^4$	$3.5 \cdot 10^4$

TAB. 10.4 – Caractéristiques des simulations 2D.

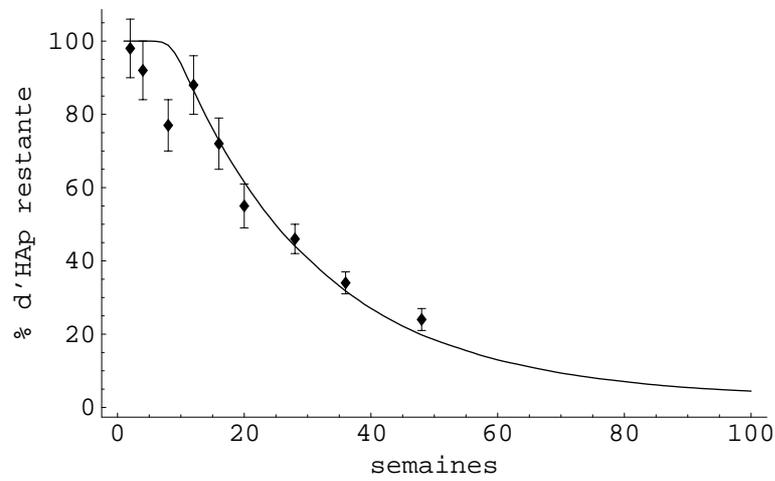


FIG. 10.5 – Simulation (2D) de la résorption d'un cylindre d'HAp.

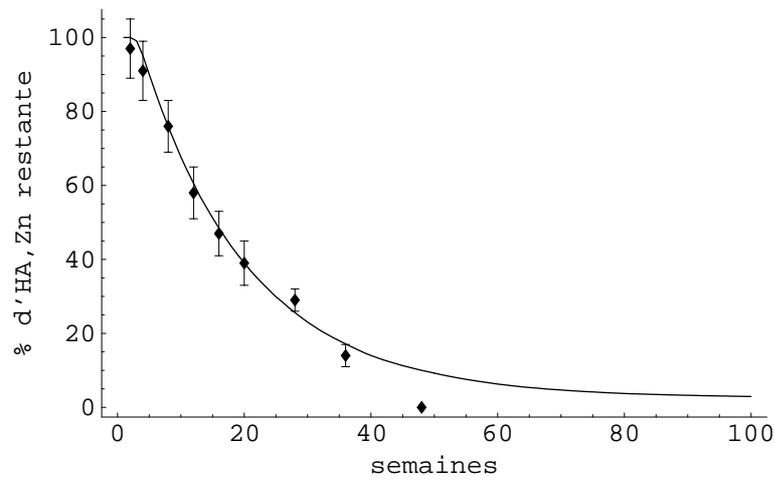


FIG. 10.6 – Simulation (2D) de la résorption d'un cylindre d'HA,Zn.

valeurs des temps caractéristiques

Les temps caractéristiques sont déduits des simulations 2D précédentes (tableau 10.5).

	t_p		τ	
corail	1.6	\pm 0.3	3.0	\pm 0.3
HAp	8.9	\pm 1.5	27.2	\pm 1.8
HA,Zn	3.2	\pm 0.7	15.9	\pm 0.9

TAB. 10.5 – Temps caractéristiques (en semaines) des simulations 2D.

10.2 Modèle à trois dimensions (3D)

10.2.1 Le modèle

Nous simulons les mêmes implants que précédemment ; les cylindres sont représentés par des parallélépipèdes rectangles à base carré.

Les règles sont pratiquement les mêmes qu'en 2D. Les différences sont liées au critère de percolation. Nous avons changé la définition de l'amas percolant car nous avons choisi, cette fois-ci, de faire débiter la vascularisation sur toutes les faces du parallélépipède. Le nouveau critère de vascularisation est le suivant : l'implant est vascularisé lorsqu'au moins 50 % des sites vides sont liés et qu'un lien passe par le barycentre du parallélépipède³. Le reste du modèle est inchangé.

10.2.2 Effet de la porosité de l'implant

L'existence d'une porosité seuil, au-dessus de laquelle la vascularisation de l'implant est sûre, est indépendante de la dimension de l'espace. Par contre, la valeur de ce seuil est dépendante à la fois de la dimension de l'espace, de la taille de l'implant⁴ et du critère de vascularisation.

Pour déterminer ce seuil de percolation, nous avons utilisé un réseau de 40x40x100 avec p variable de 0 à 1 et q=1 (r est fixé à 0.048 mais n'intervient pas pour l'instant). La figure 10.7 représente la probabilité d'obtenir un amas percolant dans le réseau, en fonction de la porosité (1-p).

En dessous de 30 % de porosité de l'implant, la vascularisation est impossible ; au dessus de 60 % de porosité, l'implant est toujours vascularisé. Entre ces deux valeurs, l'amas percolant est possible avec une certaine probabilité donnée par le graphique.

discussion

Le seuil de percolation est moins accentué que précédemment. Lors des simulations en 2D, nous avons tenu compte des premiers voisins, c'est-à-dire qu'un pore vascularisé peut se propager (avec une probabilité q) dans une des huit directions possibles (4 directions fondamentales et 4 directions en diagonale). La prise en compte des premiers voisins a permis d'augmenter le seuil de percolation. En effet, lors des premières simulations 2D, le seuil de percolation était inférieur à 50 %, ce qui signifie que les implants en corail ne se

³la configuration initiale du réseau est aléatoire, sauf le site représentant le barycentre du réseau qui est obligatoirement un pore.

⁴plus le réseau simulé est grand, moins cette dépendance est forte.

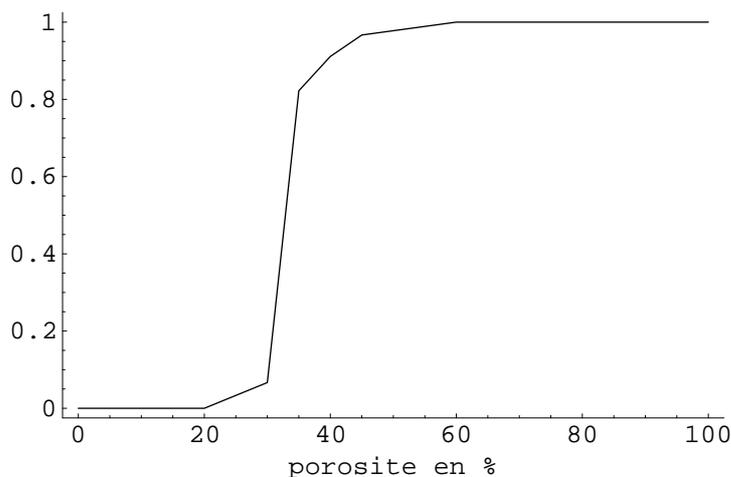


FIG. 10.7 – Probabilité d’obtenir un amas percolant dans un réseau $40 \times 40 \times 100$, en fonction de la porosité.

vasculariseraient jamais. Ce résultat est contraire aux observations et nous avons dû tenir compte des premiers voisins pour obtenir les résultats présentés précédemment.

Pour les simulations en 3D, nous n’avons pas tenu compte des premiers voisins et un pore vascularisé ne peut se propager que dans les six directions fondamentales. Cela assure une probabilité de 98 % d’avoir une vascularisation pour une porosité de l’implant simulée de 50 %. Si on tient compte des premiers voisins, le nombre de directions possibles devient $6 + 8 = 14$; nous n’avons pas encore testé ce modèle et l’augmentation de la valeur de seuil qui en découle devra être comparée à l’expérience pour déterminer quel est le bon modèle.

Le critère de percolation pour la modélisation en 3D est aussi responsable de l’élargissement du seuil de percolation. En effet, nous considérons que l’amas percolant n’existe que si le barycentre du réseau est vascularisé ; nous obligeons celui-ci à être un pore mais nous n’imposons aucune condition sur les sites voisins de ce pore et certaines configurations initiales sont telles que le barycentre ne peut être vascularisé. Ces configurations sont plus probables lorsque la porosité diminue. En 2D, ce problème n’existe pas.

calcul du seuil de percolation

A partir des simulations précédentes, nous avons essayé de calculer plus précisément la valeur seuil de la porosité pour laquelle il n’y a jamais vascularisation. Pour cela nous avons calculé la moyenne de t_p et τ en fonction de la porosité. Nous avons représenté les résultats sur les figures 10.8 et 10.9 ; les barres d’erreurs sont l’écart type. Le nombre de valeurs pris en compte pour le calcul des moyennes dépend de la porosité : 4 pour une porosité de 30 % à 30 pour une porosité de 60 % et au delà. Nous avons ajusté une fonction du type $\frac{A}{(p-p_0)^\alpha}$ sur les résultats : p_0 est la valeur seuil recherchée.

La détermination de p_0 à partir de τ est plus précise car la dispersion des valeurs de τ est environ deux fois moindre que pour t_p . La valeur seuil recherchée est 26 ± 2 % ; au-dessous de cette valeur, il n’y a jamais vascularisation.

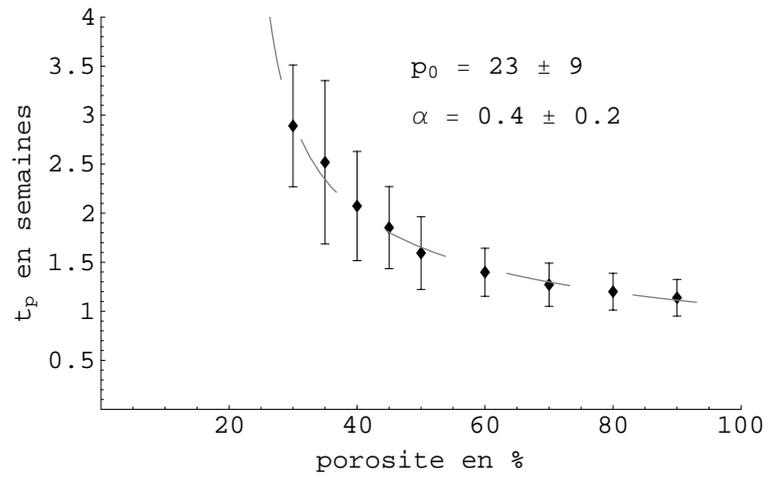


FIG. 10.8 – t_p (en semaines) en fonction de la porosité de l'implant (en %).

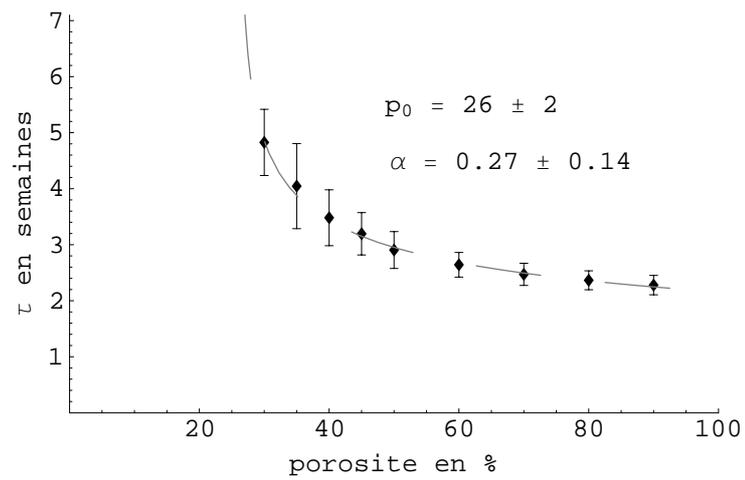


FIG. 10.9 – τ (en semaines) en fonction de la porosité de l'implant (en %).

10.2.3 Confrontation des simulations aux résultats expérimentaux

Nous allons confronter les simulations en 3D aux résultats expérimentaux décrits auparavant. Les caractéristiques des modèles sont données dans le tableau 10.6. On remarque dans celui-ci que le nombre de tirages nécessaire pour simuler une semaine d'implantation est environ 65 fois plus grand en 3D qu'en 2D, cela signifie que la durée des simulations est aussi 65 fois plus longue !

Sur les figures 10.10 à 10.12, nous avons présentés les simulations de la résorption et de l'ossification (l'ossification est simulée simultanément à la résorption de l'implant) des trois types d'implants. Les courbes sont issues de la moyenne de 30 simulations.

caractéristiques	corail	HAp	HA,Zn
taille réseau	$40 \times 40 \times 100$	$40 \times 40 \times 70$	$40 \times 40 \times 70$
p	0.5	0.5	0.5
q	1	0.12	0.38
r	0.048	0.0025	0.0036
n	$2.3 \cdot 10^6$	$2.3 \cdot 10^6$	$2.3 \cdot 10^6$

TAB. 10.6 – Caractéristiques des simulations 3D.

discussion

Comme en 2D, nous obtenons un bon accord entre les simulations de la résorption des implants et les points expérimentaux.

Les simulations de l'ossification des implants sont qualitativement corrects. Cependant, la correspondance entre les points expérimentaux et les simulations est moins bonne.

La mesure de l'ossification des implants est réalisée en dosant la quantité de magnésium [96][94] dans l'implant (corail ou céramiques). Cet élément est présent à la *surface* de l'os car il ne pénètre pas dans les interstices cristallins de l'apatite [103](il est situé dans l'enveloppe hydratante).

Pour le corail, on obtient une ossification plus rapide que dans la réalité. Cette différence s'explique par notre notion de site en général. Lorsque nous considérons un site représentant un matériau (corail, céramique ou os), nous définissons un site plein par opposition à un site vide. Un site vide ne contient plus d'éléments minéraux (sauf éventuellement à l'état de trace), un site plein en contient mais n'a pas forcément la composition exacte du matériau considéré. Cette notion de site tient compte de la cinétique de résorption ou d'ossification différente selon les éléments. Par exemple pour le corail, le strontium se résorbe plus lentement que le calcium ; dans les hydroxyapatites, le phosphore est relargué en dernier. En ce qui concerne les sites osseux, le magnésium suit la formation d'apatite mais n'est pas le premier élément minéral à être assimilé dans la matrice osseuse.

Dans le cas des l'hydroxyapatites, la simulation ne tient pas compte de l'ossification qui a lieu avant vascularisation de l'implant car nous considérons le paramètre r nul tant que $t < t_p$; ce qui explique la différence entre la simulation et les points expérimentaux dans les premières semaines. Pour les autres semaines, l'accord est meilleur entre simulation et expérience.

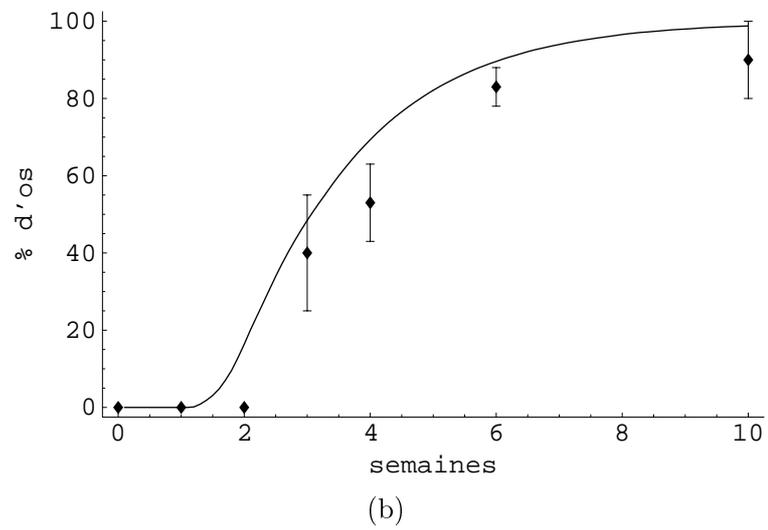
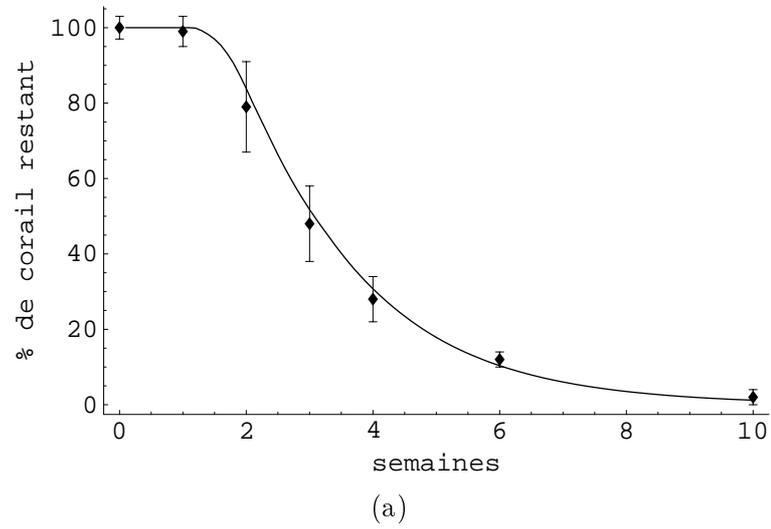


FIG. 10.10 – Simulation (3D) de la résorption (a) et de l'ossification (b) d'un cylindre de corail.

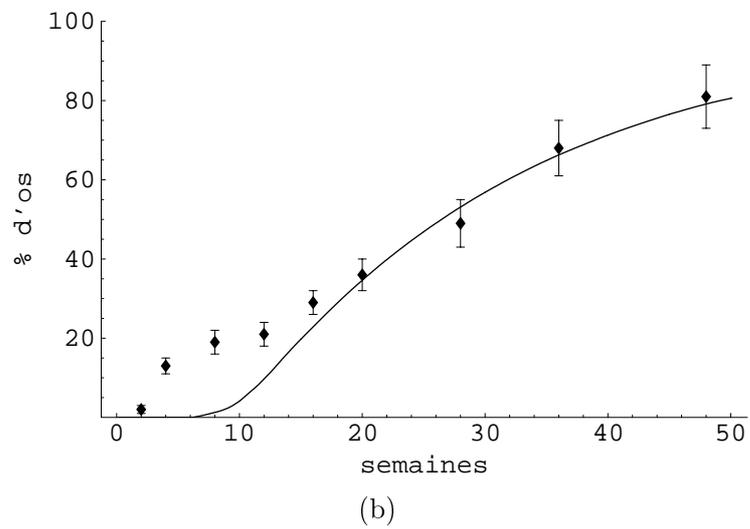
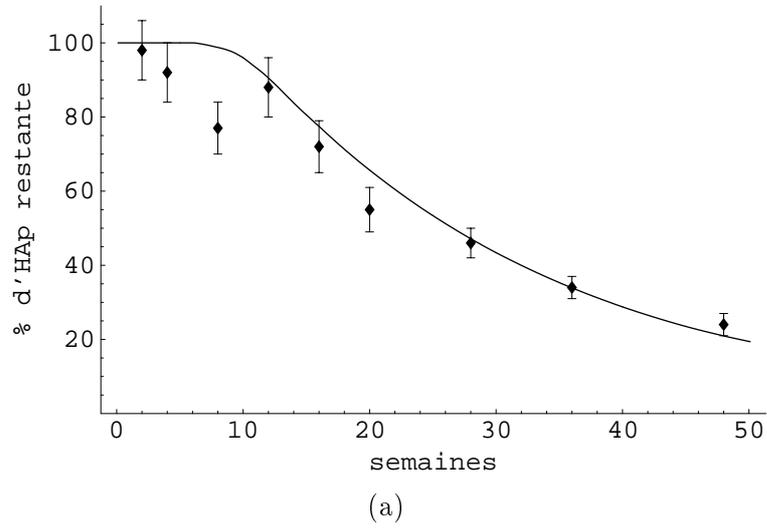


FIG. 10.11 – Simulation (3D) de la résorption (a) et de l'ossification (b) d'un cylindre d'HAp.

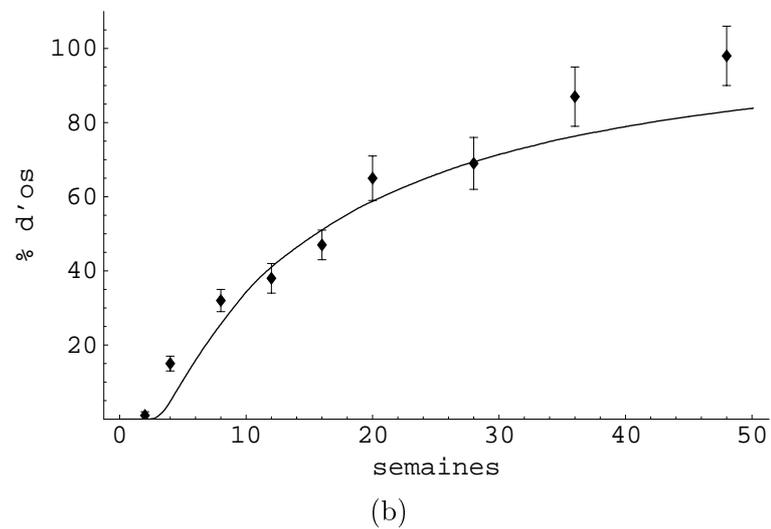
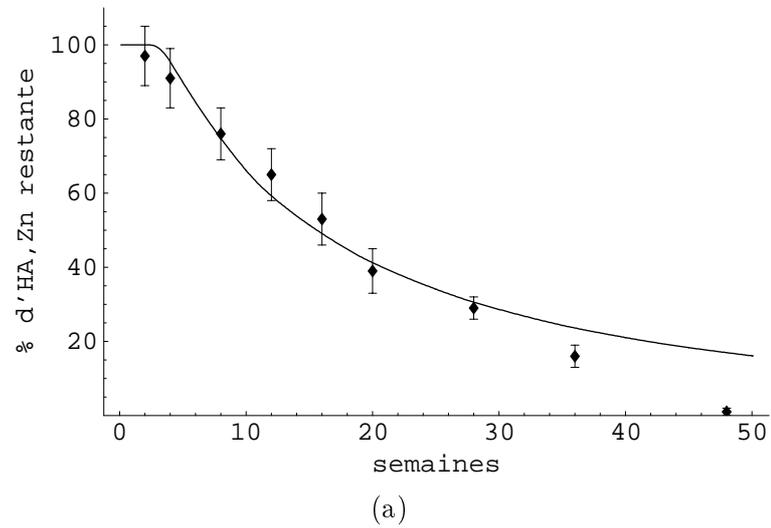


FIG. 10.12 – Simulation (3D) de la résorption (a) et de l'ossification (b) d'un cylindre d'HA,Zn.

valeurs des temps caractéristiques

Les temps caractéristiques sont déduits des simulations 3D précédentes (tableau 10.7). Les résultats sont compatibles avec ceux obtenus par les simulations en 2D.

	t_p	τ
corail	1.7 ± 0.4	3.0 ± 0.4
HAp	10 ± 2	26 ± 2
HA,Zn	3.1 ± 0.6	15.5 ± 0.6

TAB. 10.7 – Temps caractéristiques (en semaines) des simulations 3D.

10.2.4 Simulation de la concentration en fer

La vascularisation d'un implant est caractérisée par la présence de fer. Nous disposons de données expérimentales [102] sur la teneur en fer dans les implants en hydroxyapatite, en fonction de la durée d'implantation.

Les teneurs en fer pour les cylindres d'HAp ont été obtenues par PIXE et sont représentées sur la figure 10.13. Nous avons ajusté une exponentielle décroissante sur ces résultats expérimentaux : $[Fe] = A \cdot \exp(at) + B$, a en semaines⁻¹.

Dans les simulations, la vascularisation est liée la création d'un lien entre deux sites vides. Il apparaît alors naturel de relier la création de lien à la présence de fer. Nous avons effectué 30 simulations avec l'implant d'HAp et nous avons calculé (en moyenne) le nombre de liens créés Q pour chaque semaine d'implantation. Les résultats sont présentés sur la figure 10.14 (les barres d'erreur sont les écarts types sur Q). Nous avons ajusté une exponentielle décroissante sur les résultats de la simulation : $Q \propto \exp(bt)$, a en semaines⁻¹.

Pour rechercher une corrélation simple entre la teneur en fer et Q , nous avons calculé le rapport a/b pour les deux matériaux (tableau 10.8).

	a/b
HAp	0.44 ± 0.15
HA,Zn	0.23 ± 0.15

TAB. 10.8 – Rapport des paramètres a/b .

Les erreurs sur les rapports a/b sont de l'ordre de 35 % pour l'HAp et de 65 % pour l'HA,Zn. Il n'est pas possible, pour le moment, de proposer une relation simple entre la teneur en fer et Q .

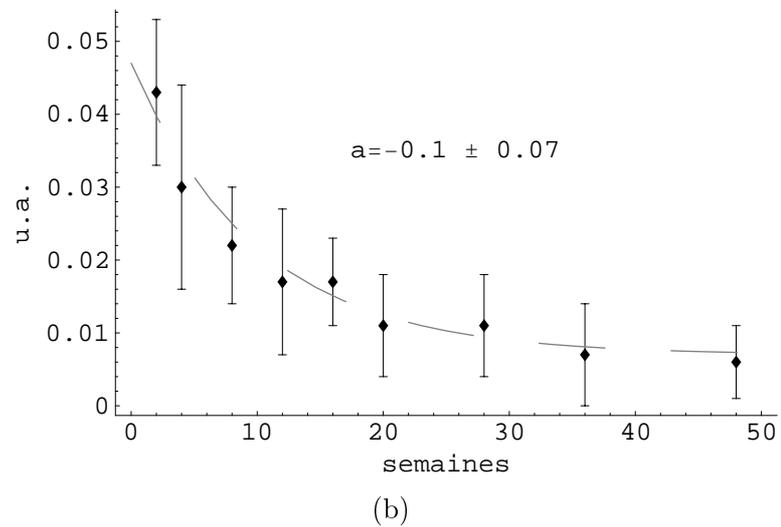
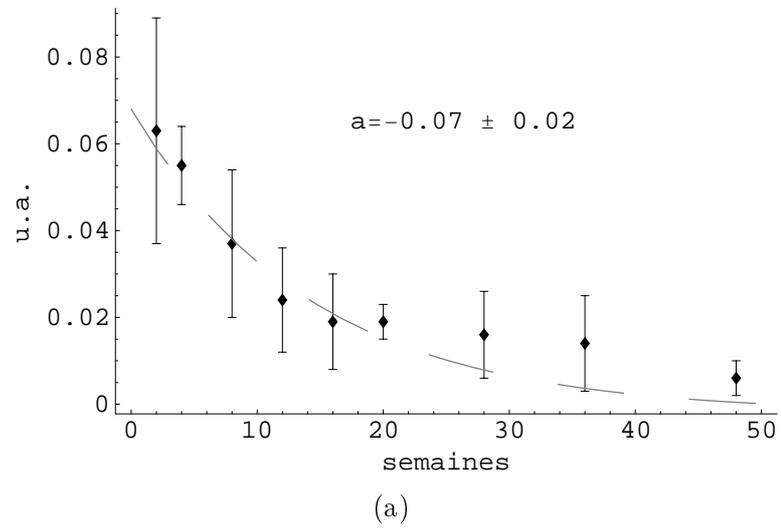


FIG. 10.13 – Evolution de la teneur en fer (en u.a) dans un implant cylindrique d’HAp (a) et d’HA,Zn (b) en fonction de la durée d’implantation (en semaines).

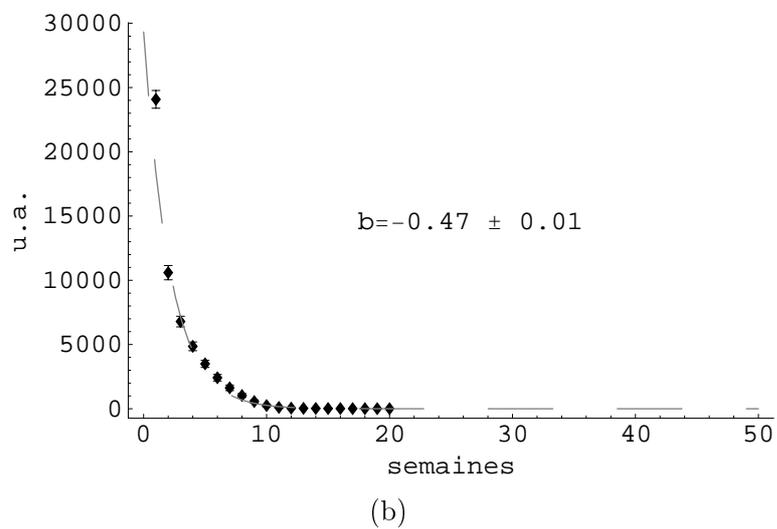
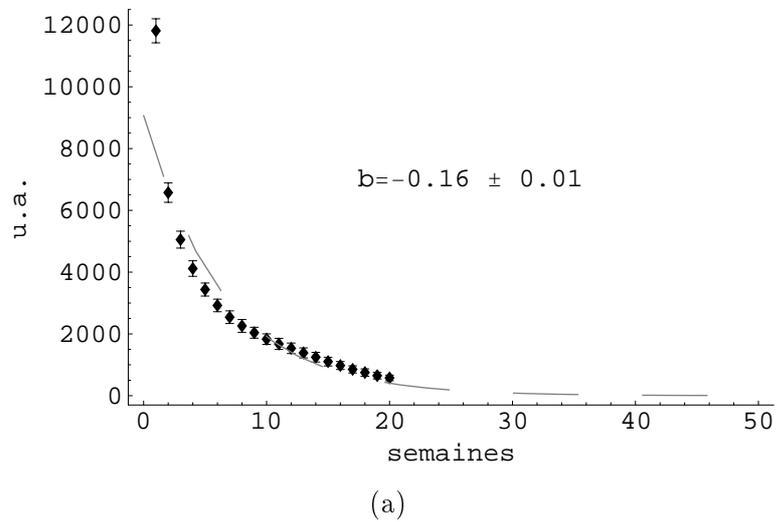


FIG. 10.14 – Nombre de liens créés par semaines d’implantation dans le cas d’un implant d’HAp (a) et d’HA,Zn (b).

10.2.5 Effet de la variation de la taille du réseau sur les temps caractéristiques t_p et τ

Nous avons simulé des implants de corail de taille différente pour étudier la variation des temps caractéristiques en fonction de la taille (les paramètres p , q et r ont les valeurs déterminées pour la simulation du corail). Les variations de la taille du réseau sont de plusieurs types :

variation de la longueur : Nous avons fait varier la longueur du parallélépipède rectangle de 40 à 350 sites, la base est toujours un carré de 40×40 sites ; cela correspond à simuler des implants cylindriques de 6 mm de diamètre et d'une longueur variant de 6 à 52.5 mm.

variation de la base carrée : Nous avons gardé la longueur du réseau constante (100 sites) et la taille de base carrée du parallélépipède varie de 10×10 à 100×100 sites ; cela correspond à simuler des implants cylindriques de longueur 15 mm et avec un diamètre variant de 1.5 à 15 mm.

variation cubique : Nous avons simulé un réseau cubique dont l'arête varie de 40 à 100 sites.

Nous avons décalé l'origine de τ , de manière à séparer la variation de τ de t_p , i.e $\tau = 0$ quand $t = t_p$.

Les résultats sont reportés sur les figures 10.15 à 10.20, où chaque point représente une moyenne de 30 simulations ; les barres d'erreur représentent l'écart type sur t_p et la somme des deux écarts types ($\sigma_{t_p} + \sigma_\tau$) sur τ .

Pour chaque type de variation de la taille du réseau, nous avons ajusté (méthode des moindres carrés) les temps caractéristiques par des courbes, avec : $t_p \propto t^\alpha$ et $\tau \propto t^\alpha$.

discussion

Les exposants α sont différents suivant le type de variation de la taille de l'implant. Nous remarquons que la durée de la phase latente de vascularisation est toujours plus longue que le temps nécessaire à résorber la moitié de l'implant ; plus la taille de l'implant est grande, plus cette différence entre les deux temps est importante.

D'après les courbes 10.15 (b), 10.19 (b) et 10.20 (b), nous remarquons que le temps τ est proportionnel au nombre de sites N du réseau. En effet, $N = L \times l^2$ avec L la longueur et l , l'arête de la base carrée :

- $N \propto L$ quand l est fixe ;
- $N \propto l^2$ quand L est fixe ;
- $N = l^3$ quand $L = l$.

Par contre, le temps t_p n'est pas proportionnel au nombre de sites N du réseau lorsque la variation de taille de celui-ci est effectuée en modifiant l'arête de la base carrée du parallélépipède ou l'arête du cube.

Les figures 10.18 à 10.20 montrent la variation des temps caractéristiques en fonction du nombre de sites N du réseau.

Les figures 10.18 (b), 10.19 (b) et 10.20 (b) confirment que le temps de résorption est proportionnel ($\alpha \approx 1$) au nombre de sites du réseau et donc à la taille de l'implant. Ce n'est pas le cas de la durée de la phase latente de vascularisation (figures 10.19 (a) et 10.20 (a)) qui n'est pas proportionnelle au volume de l'implant. Ce processus est plus long que la résorption proprement dite. Nous considérons que les deux exposants α sont, aux barres d'erreur près, identiques ($\alpha \approx 1.35$). Ce résultat est confirmé qualitativement sur la plupart

des matériaux ; une cavité est plus rapidement comblée par de l'os, lorsque le biomatériau est utilisé sous forme de poudre ou de fibre plutôt que sous forme massive.

En revanche, le résultat obtenu lorsque nous avons fait varier la longueur du réseau (figure 10.18) demande d'autres études.

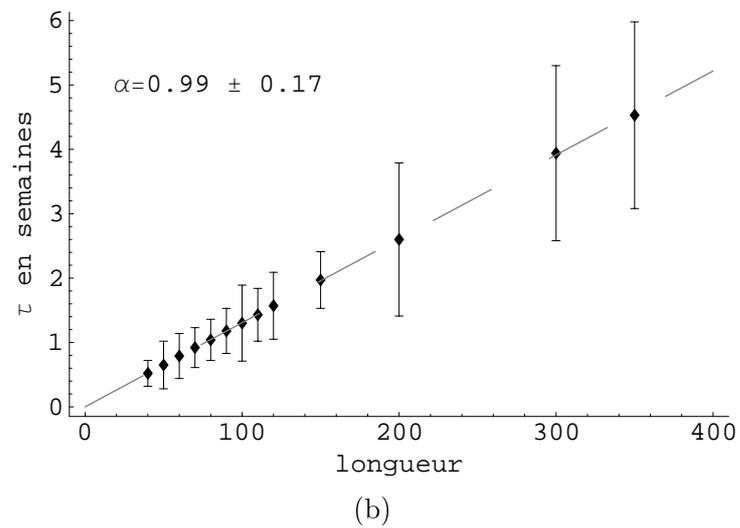
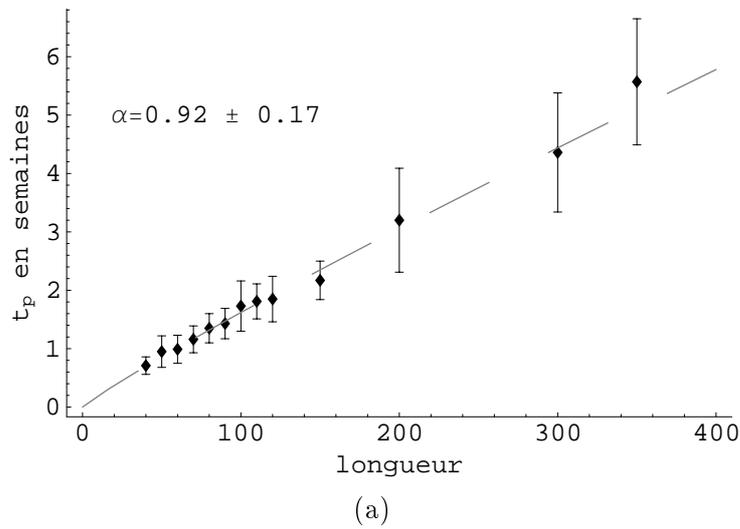


FIG. 10.15 – Variation (en semaines) de t_p (a) et de τ (b) en fonction de la longueur du parallélépipède (en nombre de sites).

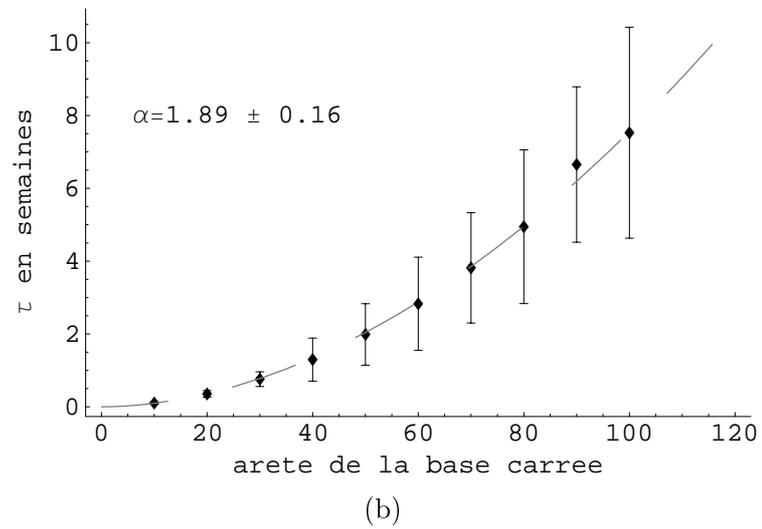
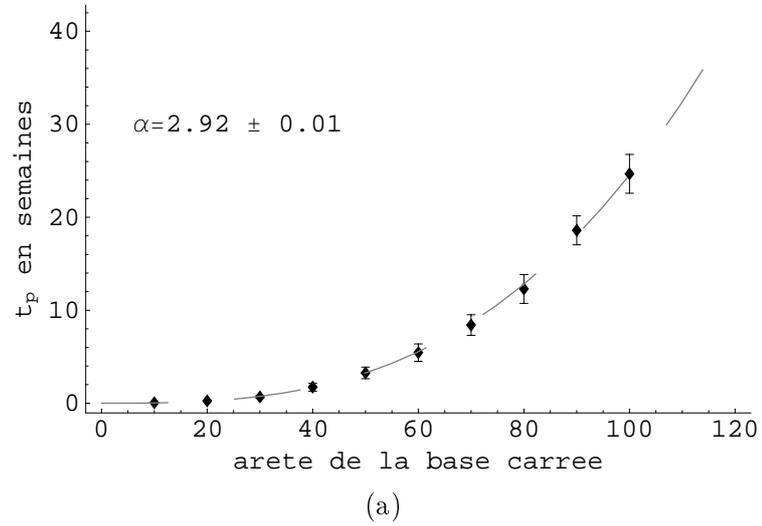


FIG. 10.16 – Variation (en semaines) de t_p (a) et τ (b) en fonction de l'arête de la base carrée du parallélépipède (en nombre de sites).

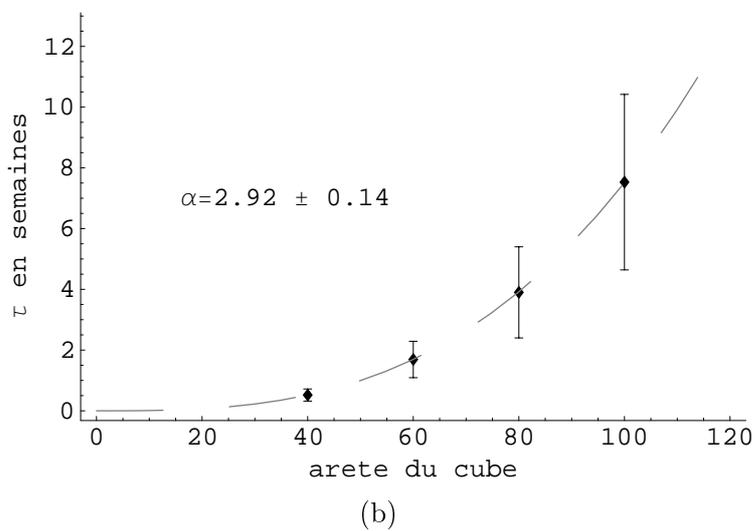
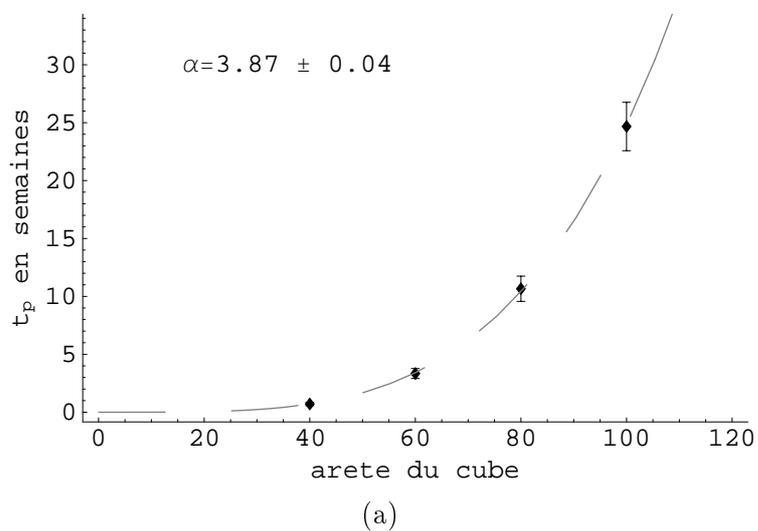


FIG. 10.17 – Variation (en semaines) de t_p (a) et de τ (b) en fonction de l'arête du cube (en nombre de sites).

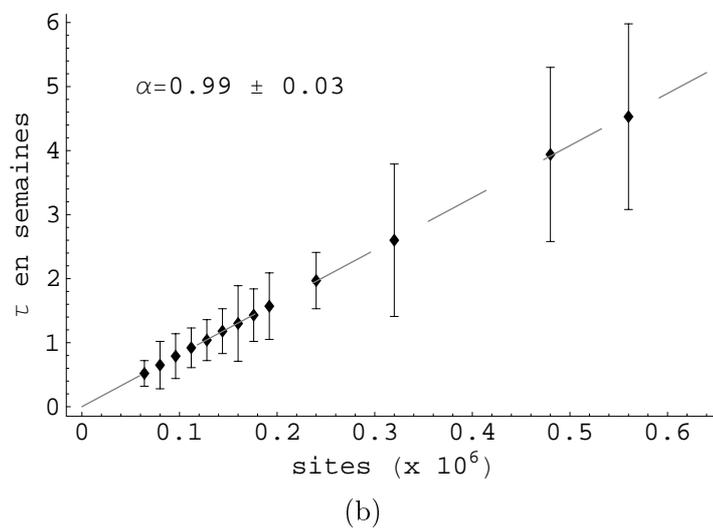
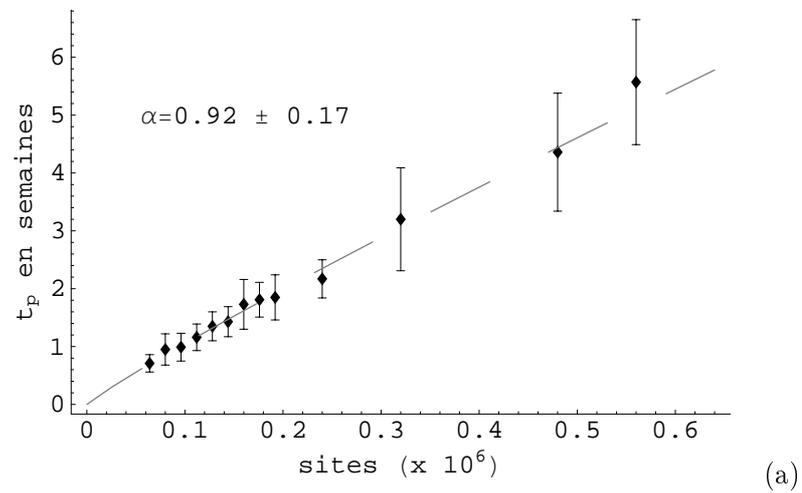


FIG. 10.18 – t_p (a) et τ (b) (en semaines) en fonction du nombre de sites lorsque la longueur du parallélépipède varie (en nombre de sites).

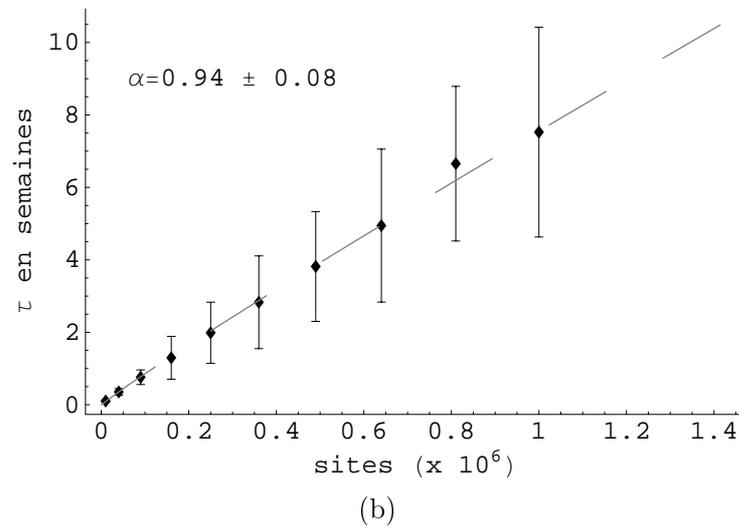
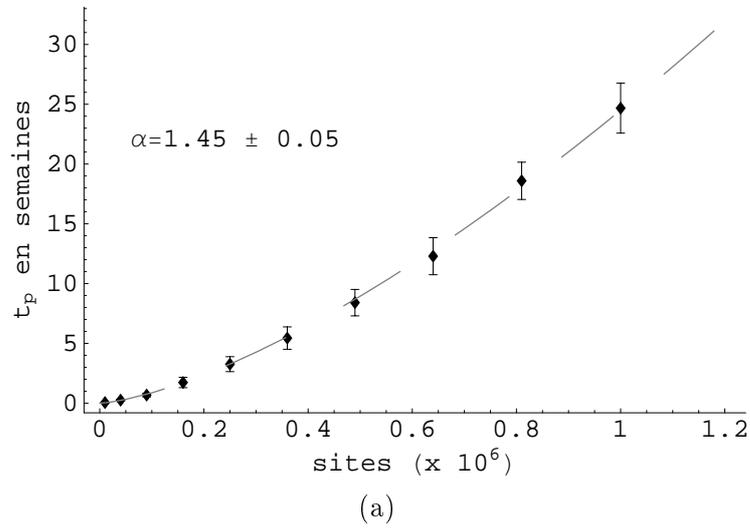


FIG. 10.19 – t_p (a) et τ (b) (en semaines) en fonction du nombre de sites lorsque l'arête de la base carrée du parallélépipède varie (en nombre de sites).

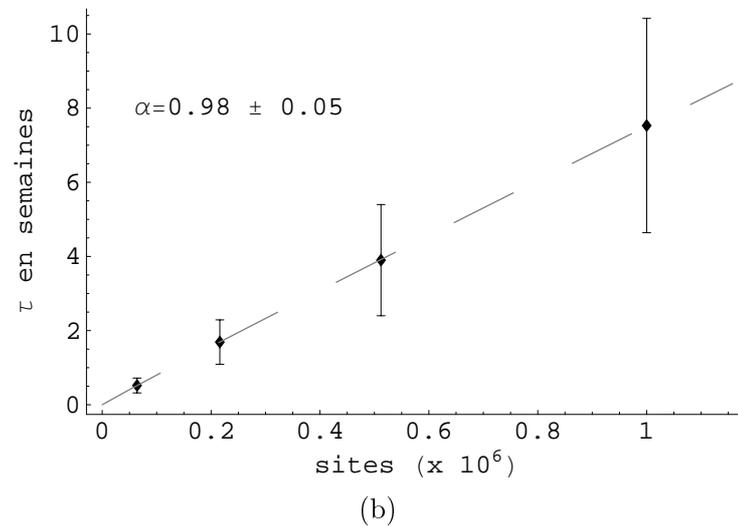
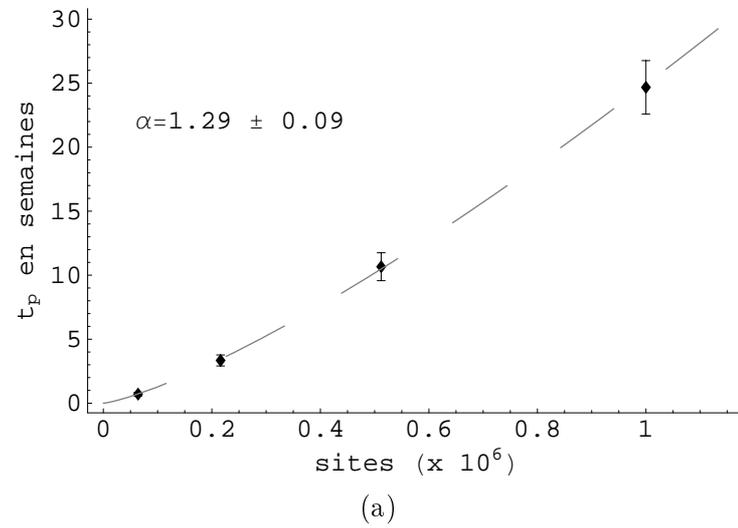


FIG. 10.20 – t_p (a) et τ (b) (en semaines) en fonction du nombre de sites lorsque l'arête du réseau cubique varie (en nombre de sites).

10.3 Conclusion

L'essai de modélisation, par la théorie de la percolation, de la résorption et de l'ossification d'implant de biomatériaux poreux donne des premiers résultats prometteurs : c'est l'avantage de la théorie de la percolation qui permet de s'affranchir d'une connaissance exacte des processus biologiques simulés grâce à un traitement probabiliste.

Le point important des modèles 2D et 3D est la prise en compte de deux régimes successifs (avant et après vascularisation) dans la résorption des implants ; elle se traduit par une valeur du paramètre r différente dans chacun des régimes. Le critère entraînant la transition d'un régime à un autre a été choisi arbitrairement. Il donne, ici, des résultats positifs mais la confrontation du modèle à d'autres résultats expérimentaux peut nécessiter un changement de critère.

Le programme informatique *BiomatSimul* que nous avons créé peut être complété. Pour l'instant, il utilise un réseau rectangulaire en 2D et parallélépipédique en 3D ; il faudrait l'étendre à des réseaux de forme quelconque. De même, nous pourrions inclure l'effet de la taille des pores dans les paramètres q et r .

Conclusion générale

L'apport de cette thèse s'est concrétisé dans plusieurs domaines.

Les différentes analyses effectuées par faisceaux d'électrons et de protons montrent un comportement différent entre les verres BVA et BVH.

Le verre BVA est bioactif. L'observation au STEM/EDXS montre qu'il s'est transformé en un hydrogel de silicium avec incorporation de minéraux (ions Ca et P) et de molécules organiques dès 3 mois après implantation. Ce changement de composition se déroule en plusieurs étapes ; les premières modifications ont été observées *in vitro*. Les cartographies PIXE ont confirmé ce résultat et ont permis d'identifier les éléments traces présents dans ce gel :

- du zinc et du strontium qui interviennent dans le remodelage osseux ;
- du titane provenant d'un relargage de la prothèse ;
- du fer dû à une contamination durant la préparation du verre.

Après 6 mois d'implantation, le revêtement en verre BVA a pratiquement disparu. Il est remplacé par de l'os néoformé en contact direct avec la prothèse en alliage métallique. L'assimilation des éléments traces tels que le zinc et le strontium dans cet os néoformé s'effectue avec une cinétique différente. Ces éléments nous servent pour apprécier la qualité de l'os. A ce délai, les valeurs des rapports de concentration $[Zn]/[Ca]$ et $[Sr]/[Ca]$ ne sont pas identiques aux valeurs que l'on trouve dans un os mature.

Après 12 mois d'implantation, l'os remplaçant le revêtement, au vu de sa composition en éléments traces, peut être considéré comme mature. Ce n'est pas le cas dans les implants témoins où, selon les critères utilisés, l'os en contact avec la prothèse non revêtue n'est pas mature à ce délai.

Le verre BVH est bioinerte. Il ne se transforme pas en un hydrogel de silicium. Les grains de verre gardent une composition en éléments majeurs et mineurs constante au cours du temps d'implantation. Chaque grain développe par hydrolyse une interface d'une épaisseur de 2 μm . Cette couche pourrait fragiliser la liaison inter-granulaire et être la cause du détachement progressif du revêtement observé *in vivo*. La présence de zinc et de strontium n'a pas été détectée. Par contre, comme pour le verre BVA, du titane et du fer sont présents.

L'action de ces deux revêtements a pu être mesurée qualitativement et quantitativement. L'observation au microscope électronique à balayage et les mesures de périmètre et de densité osseuse faites par histomorphométrie prouvent que les prothèses revêtues de verre BVA sont mieux ostéointégrées que les implants témoins sans revêtement. Le verre BVA améliore l'ancrage de la prothèse. De plus, la mesure par PIXE de la contamination en éléments métalliques dans l'os indique que le revêtement en verre BVA protège le support métallique de la corrosion. Cependant, ce résultat n'est valable que durant les premiers mois d'implantation : au bout d'une année, la contamination en titane dans l'os est comparable aux témoins.

Le verre BVH n'améliore pas l'ostéointégration de l'implant. Le revêtement se détache progressivement de la prothèse et migre à travers le réseau lacunaire. Quel que soit le délai

d'implantation, le revêtement, s'il reste en place, protège la prothèse de la corrosion. En revanche, lorsqu'elle n'est plus revêtue, elle n'est plus protégée de la corrosion.

Au-delà de ces résultats physiologiques, nous avons posé les bases d'une nouvelle méthodologie : la combinaison des cartographies PIXE et de l'histopathologie. L'intérêt de développer une telle méthode est important : elle rend possible la corrélation de la répartition des éléments minéraux et métalliques avec les réactions tissulaires. Par exemple, la biocompatibilité des prothèses en titane (pur ou alliage) est connue lorsqu'elles sont sous forme massive. Ce n'est pas le cas lorsque ces éléments sont sous forme de particules ou d'ions ; à partir d'un certain seuil, le titane, dans le tissu osseux, peut entraîner une ostéolyse et donc un échec thérapeutique.

Pour compléter ce travail, nous avons développé un modèle basé sur la théorie de la percolation pour simuler la résorption de biomatériaux poreux. Le principe est de décomposer la résorption de l'implant en deux étapes successives : la vascularisation puis la résorption/ossification proprement dite. A notre connaissance, ce type de simulation est nouveau. Les premières simulations ont rendu compte des résultats expérimentaux sur les implants de corail et de céramiques étudiés antérieurement par notre équipe. Pour ces implants, nous avons simulé à la fois le taux de biomatériau restant et le taux d'os en formation au cours du temps d'implantation. ; nous avons proposé une interprétation des paramètres du modèle. Enfin, les premières études sur les effets de la variation de la taille des implants sur les temps caractéristiques des processus simulés montrent que la vascularisation n'est pas un phénomène linéaire ce qui corrobore certaines observations *in vivo*.

Sur un plan plus personnel, ce travail de thèse m'a initié à la recherche. Pour mener à bien ce travail, j'ai dû me familiariser avec le domaine des biomatériaux, ce qui représente un investissement important de travail préliminaire pour acquérir de nombreuses notions biologiques, inhérentes à ce domaine. La partie expérimentale de ce travail m'a ouvert au travail en équipe avec des chercheurs de plusieurs disciplines : physiciens, biologistes, médecins, laboratoires industriels du domaine public ou privé.

Ces travaux mériteraient d'être complétés par d'autres études :

1. La poursuite du développement de la méthode : combinaison des cartographies PIXE et histopathologie, pour les raisons évoquées précédemment. D'une part, nous devons améliorer la tenue des échantillons sous faisceau en augmentant la conductivité thermique et électrique des échantillons, en modifiant leur préparation. D'autre part, il faudrait connaître précisément la profondeur de pénétration du colorant utilisé en histologie pour étudier la possibilité de retailler les échantillons pour analyse par PIXE. Pour réaliser ces améliorations, nous allons accroître notre partenariat avec l'entreprise BIOMATECH.
2. La caractérisation du verre BVA *in vitro* devrait se poursuivre en prolongeant les délais d'immersion dans le milieu biologique artificiel DMEM. Nous envisageons de réaliser une étude interaction verre/cellules osseuses grâce à des cultures cellulaires. Ces deux types d'expériences, réalisées dans les mêmes conditions, autoriseraient la distinction des effets des cellules et des liquides sur les différentes étapes de la transformation du verre BVA en hydrogel.
3. Le détachement des grains de verre BVH est à reconsidérer. Certaines pistes nous font penser que la technique de vaporisation de torche à plasma est en cause. D'autres techniques existent telles que la déposition par laser pulsé ou le procédé sol-gel. Cette dernière technique est d'ailleurs en développement dans le Laboratoire des

Matériaux Inorganiques de Clermont-Ferrand, avec lequel nous avons des projets de collaboration.

4. Le développement du logiciel *BiomatSimul* devrait être étendu à des implants de forme quelconque. Nous pourrions ainsi tester le modèle en utilisant des résultats expérimentaux qui existent dans la littérature. De même, des réflexions, en collaboration avec l'équipe de physique théorique du Laboratoire, sont déjà en cours pour inclure la taille des pores dans les paramètres q et r .
5. L'extension du logiciel au verre bioactif serait intéressante pour développer de nouveaux types de revêtement. Il sera nécessaire de l'adapter pour interpréter le rôle particulier de l'hydrolyse dans ce matériau. Les verres BVA et BVH ont chacun leurs avantages et leurs inconvénients. Les simulations conduiraient à modéliser un matériau hybride qui serait une superposition de couches de verre de compositions différentes : la plus bioinerte en contact avec le métal et la plus bioactive en contact avec l'os. La composition, l'épaisseur, et, le nombre de couches seraient définis par le logiciel et testés pour une optimisation.

Annexe : Traitement des spectres X

A.1 Suppression du fond continu

Le filtrage de spectre est utilisé pour éliminer le fond continu. Etant donné que le fond continu varie lentement avec l'énergie, il se distingue des pics caractéristiques, qui varient rapidement avec l'énergie : un filtre de type passe bande peut l'éliminer.

Pour cela, on effectue une convolution du spectre expérimental avec la fonction h_i suivante :

$$\begin{aligned} h_i &= \frac{1}{2M+1} \text{ pour } |i| \leq M & (A.1) \\ h_i &= \frac{-1}{2N} \text{ pour } M < |i| \leq M+N \\ h_i &= 0 \text{ pour les autres valeurs de } i \end{aligned}$$

Ce filtre est nommé "Top Hat" en raison de sa forme. Il est représenté sur la figure ci-dessous.

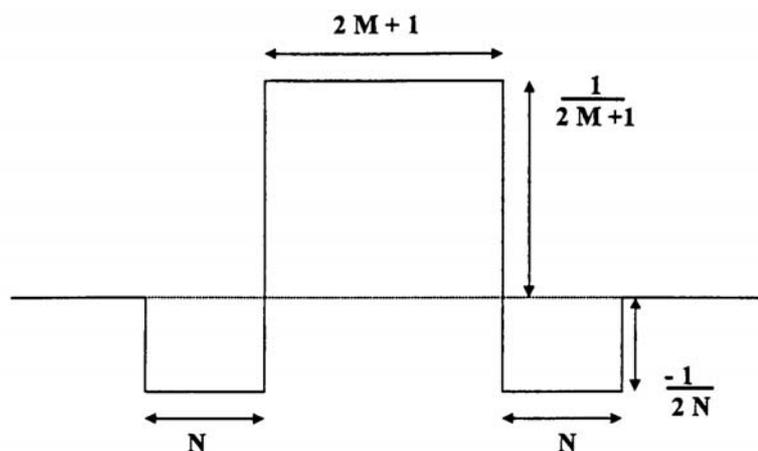


FIG. A.1 – Filtre "Top Hat"

Si nous définissons y_i comme la valeur du spectre enregistré au canal i de l'analyseur, c'est-à-dire le nombre de coups enregistré à l'énergie du i^{eme} canal et y'_i la valeur du spectre filtré au canal i , nous avons la relation suivante :

$$y'_i = \sum_k h_k y_k = \frac{1}{2M+1} \sum_{k=i-M}^{k=i+M} y_k - \frac{1}{2N} \left(\sum_{k=i-M-N}^{k=i-M-1} y_k + \sum_{k=i-M+1}^{k=i-M+N} y_k \right) \quad (A.2)$$

Les paramètres M et N du filtre sont déterminés en fonction de la largeur à mi-hauteur, L , des pics caractéristiques. Ces deux paramètres doivent vérifier deux équations, définies par Staham, les reliant à L :

$$\begin{aligned} L &= 2M + 1 \\ 2L &= 2M + 2N + 1 \end{aligned} \quad (\text{A.3})$$

Ceci revient à dire qu'il faut que la largeur de la partie centrale du filtre soit égale à la largeur à mi-hauteur du pic caractéristique.

Un spectre caractéristique est simulé par une gaussienne pour le pic caractéristique et une droite de faible pente pour le fond continu (a), puis est filtré par le "Top Hat" (figure ci-dessous). Le spectre obtenu (b), après filtrage, ne présente plus qu'une oscillation autour d'un niveau de base zéro, centrée énergétiquement sur le pic et dont l'amplitude est proportionnelle à l'intensité du pic.

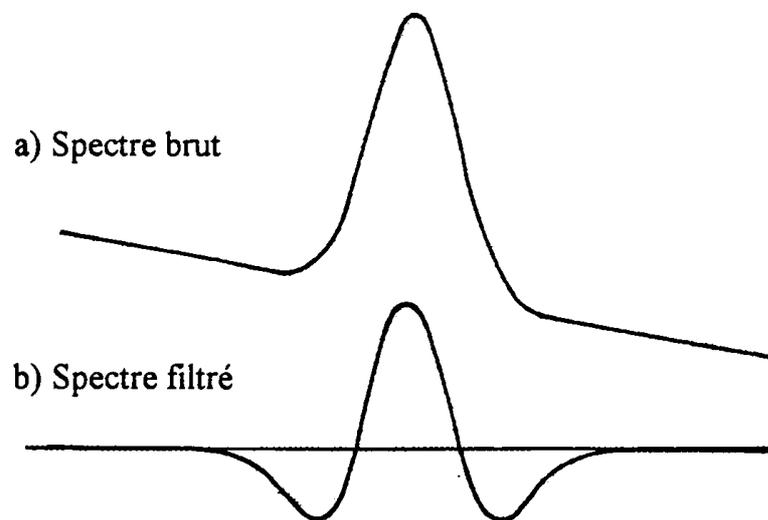


FIG. A.2 – Action du filtre sur un spectre simulé

A.2 Modélisation du spectre filtré

L'étape suivante consiste à modéliser le spectre expérimental filtré en utilisant une bibliothèque de spectres de référence. Pour chaque élément, nous disposons d'un spectre, dit de référence, composé uniquement d'une gaussienne centrée sur l'énergie caractéristique de l'élément. Ces spectres de référence permettent de créer un spectre théorique qui est ensuite filtré.

En utilisant la méthode des moindres carrés pondérés, nous ajustons le spectre théorique filtré par rapport au spectre expérimental filtré. Nous obtenons, pour chaque élément, un coefficient déterminé par la méthode des moindres carrés pondérés. Le produit de ce coefficient par l'intégrale du pic caractéristique donne l'intensité du pic caractéristique de l'élément.

D'un point de vue mathématique, le rayonnement émis par l'échantillon lors de son irradiation se décompose sous la forme suivante :

$$y^{th}(E) = B(E) + \sum_{k=1}^m \alpha_k \cdot P_k(E_k) \quad (\text{A.4})$$

où $B(E)$ représente le rayonnement continu de freinage.

et $\sum_{k=1}^m \alpha_k P_k(E_k)$ représente les différents pics d'amplitude α_k d'énergie E_k .

Le signal réellement recueilli est différent car il a subi l'influence du système de détection. Pour le i ème canal de l'analyseur, le signal détecté est :

$$y_i^{th} = B_i + \sum_{k=1}^m \alpha_k \cdot P_{k,i} \quad (\text{A.5})$$

avec $P_{k,i}$, valeur de P_k au canal i .

En appliquant le filtre "Top Hat" à la relation A.5, nous obtenons :

$$y_i'^{th} = \sum_{k=1}^m \alpha_k \cdot P_{k,i}' \quad (\text{A.6})$$

avec $P_{k,i}'$, valeur du spectre théorique filtré de l'élément k au canal i .

Pour déterminer les coefficients des différents pics, nous appliquons la méthode des moindres carrés pondérés qui consiste à minimiser le critère χ^2 suivant :

$$\chi^2 = \sum_i \frac{1}{\sigma_i'} \cdot (y_i' - y_i'^{th})^2 \quad (\text{A.7})$$

La pondération par σ_i' , variance de y_i' du spectre expérimental filtré permet d'éviter que les parties les plus intenses du spectre n'influencent trop l'ajustement pour leur seul profil.

Bibliographie

- [1] AxE Biomed – Programme Inter-régional Biomatériaux.
Bulletin de veille BIOMATERIAUX No 3, Période 12/2001 à 01/2002.
- [2] Sedel L, Janot C
Biomatériaux
Cahier de synthèse du programme MATERIAUX du CNRS, 1995.
- [3] Parr GR, Gardner LK, Toth RW
Titanium : the mystery metal of implant dentistry. Dental materials aspects.
J Prosthet Dent, 1985, 54 : 410-414.
- [4] Breme J
Criteria for the bioinertness of metals for osseointegrated implants.
G Heimke ed. Osseo-integrated implants, CRC Press, Boca Raton, 1990, 31-80.
- [5] Ito A, Okazaki Y, Tateishi T, Ito Y
In vitro biocompatibility, mechanical properties, and corrosion resistance of Ti-Zr-Nb-Ta-Pd and Ti-Sn-Nb-Ta-Pd alloys.
J Biomed Mater Res, 1995, 29 : 893-902.
- [6] Kasemo B, Lausmaa J
Aspects of surface physics on titanium implants.
Swed Dent J Suppl, 1985, 28 : 19-36.
- [7] Steinemann SG
Corrosion of surgical implants – in vivo and in vitro tests.
GD Winter, Leray JL, de Groot, K.(eds.) Evaluation of biomaterials, John Wiley and Sons Ltd. 1980, 1-34.
- [8] Bessho K, Fujimura K, Iizuka T
Experimental long-term study of titanium ions eluted from pure titanium miniplates.
J Biomed Mater Res, 1995, 29 : 901-905.
- [9] Strehblow HH
Breakdown of passivity and localized corrosion - theoretical concepts and fundamental experimental results.
Werkstoffe und Korrosion, 1984, 35-437.
- [10] Williams DF, Williams RL
Degradative effects on the biological environment on metals and ceramics.
Rater, Hoffman, Schoen, Leons (ed.) Biomaterials Science, Academic Press, 1996, 260-267.
- [11] Albert K, Schledjewski R, Harbaugh M, Bleser S, Jamison R, Friedrich K
Characterization of wear in composite material orthopaedic implants. Part II : The implant/bone interface.
Biomed Mater Eng, 1994, 4 : 199-211

- [12] Bischoff UW, Freeman MA, Smith D, Tuke MA, Gregson PJ
Wear induced by motion between bone and titanium or cobalt-chrome alloys.
J Bone Joint Surg Br, 1994, 76 : 713-719.
- [13] Shahgaldi BF, Heatley FW, Dewar A, Corrin B
In Vivo corrosion of cobalt-chromium and titanium wear particles.
J Bone Joint Surg Br, 1995, 77 : 962-968.
- [14] Manley MT, Serekian P
Wear Débris. An environmental issue in total joint replacement.
Clin Orthop, 1994, 137-183.
- [15] Frayssinet P
Réactions cellulaires et tissulaires à l'implantation de matériaux à usage orthopédique en sites osseux et médullaire. Evolution des biomatériaux implantés en site osseux.
Laboratoire de génie biologique - Bioland - Toulouse - France, 1994.
- [16] Schmitz HJ, Strunz V, Kinne R, Fuhrmann G, Gross U
CRC Handbook Bioactive Ceramics.
CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990, Vol. 1, 303-310.
- [17] Matejka D, Benko B
Plasma spraying of metallic and ceramic materials.
John Wiley & Sons, 1989.
- [18] D'Antonio JA, Capello WN, Jaffe WL
Hydroxyapatite-coated hip implants. Multicenter three-year clinical and roentgenographic results.
Clin Orthop, 1992, 102-117.
- [19] Geesink RG, de Groot K, Klein CP
Bonding of bone to apatite-coated implants.
J Bone Joint Surg Br, 1988, 70 : 17-22.
- [20] Cook SD, Salkeld SL, Gaiser DM, Wagner WR
The effect of surface macrotecture on the mechanical and histologic characteristics of hydroxyapatite-coated dental implants.
J Oral Implantol, 1993, 19 : 288-294.
- [21] Hayashi K, Inadome T, Tsumura H, Nakashima Y, Sugioka Y
Effect of surface roughness of hydroxyapatite-coated titanium on the bone-implant interface shear strength.
Biomaterials, 1994, 15 : 1187-91.
- [22] Wong M, Eulenberger J, Schenk R, Hunziker E
Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone.
J Biomed Mater Res, 1995, 29 : 1567-75.
- [23] Kokubo T
Bioactive glass ceramics : properties and applications.
Biomaterials, 1991, 12 : 155-3.
- [24] Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK
Bonding mechanism at the interface of ceramic prosthetic materials.
J Biomed Mater Res, 1972, 5 : 117-141.
- [25] Andersson OH, Karisson KH, Gatti AM, Zaffe D, Miettinen J, Yli-Urpo A
Bioactive glass as a bone substitute.
New Trends in Bone Grafting, 1992, 40 : 127-131.

- [26] Andersson OH, Rosenqvist J, Karisson KH
Dissolution, leaching, and Al₂O₃ enrichment at the surface of bioactive glasses studied by solution analysis.
J Biomed Mater Res, 1993, 27 : 941-8.
- [27] Laager CM, Locardi B
Evolution of in vitro test methods to characterize bone implant materials with special emphasis on biocompatibility and long-term functionality.
12 monthly technical report, May 1997, 7-13.
- [28] Ducheyne P, el Ghannam A, Shapiro I
Effect of bioactive glass templates on osteoblast proliferation and in vitro synthesis of bone-like tissue
J Cell Biochem, 1994, 56 : 162-7.
- [29] Hench LL
CRC Handbook Bioactive Ceramics.
CRC Press, Boca Raton, 1990, 1 : 7-22.
- [30] Hench LL
Thermochimica Acta.
1996, 280/281, 1-13.
- [31] Construzione e Gestione Dati Bioingegneria
Viale dell'Industria 5 - 20070 Livraga (MI) - Italie.
- [32] Contract No BMH4-CT96-0013 *Final Report : Evolution of in-vitro test methods to characterise bone implant materials with special emphasis on biocompatibility and long-term functionality. Biocompatibility and long-term functionality of modified bioactive glasses coated on titanium alloys.* Technical Report , 1999.
- [33] Brun V
Application de méthodes nucléaires et physico-chimiques d'analyse à l'étude, après implantation, d'un dépôt de bioverre sur un alliage de titane, en vue d'une optimisation de la biocompatibilité et de la fonctionnalité à long terme.
Thèse No 1108, Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand II), 1999.
- [34] Cook SD, Thomas KA, Kay JF
Experimental coating defects in HA-coated implants.
Clin Orthop, 1991, 280-90.
- [35] Marieb EN
Le tissu osseux et les os.
Anatomie et Physiologie humaines, De BOECK Université, Editeurs du renouveau pédagogique INC, 1993, ch. 6.
- [36] Shuman H, Somlyo AV, Somlyo AP
Quantitative electron probe microanalysis of biological thin sections : method and validity.
Ultramicroscopy, 1976, 1 : 317-339.
- [37] Wagner D
Microanalyse par spectroscopie de pertes d'énergie des électrons et par spectroscopie X en dispersion d'énergie : Comparaison des sensibilité de détection du calcium dans le matériel biologique en microscopie électronique moyenne tension.
Thèse, Université de Reims Champagne-Ardenne, 1993.

- [38] Reed SJB
Electron probe analysis.
Cambridge University Press, 1979.
- [39] Hall TA
Biological X-ray microanalysis.
J of Micros, 1979, 117(1) : 145-163.
- [40] Morgan AJ
X-ray microanalysis in electron microscopy for biologist.
Oxford University Press, Royal microscopy Society, microscopy handbooks, 1985.
- [41] Kramers MA
On the theory of X-ray absorption and of the continuous X-ray spectrum.
Phil Mag, 1923, 46 : 836.
- [42] Hall, 1973.
- [43] Cliff G, Lorimer GW
The quantitative analysis of thin specimens.
J of Micros, 1975, 103 : 203-207.
- [44] Gedeon O, Jurek K, Hulinsky V
Fast migration of alkali ions in glass irradiated by electrons.
Journal of Non-Crystalline Solids, 1999, 246 : 1-8.
- [45] Ziegler JF, Chu WK
At Nucl Data Tables, 1974, 13 : 463.
- [46] Andersen HH, Ziegler JF
Hydrogen Stopping Powers and Ranges in All Elements.
The Stopping and Range of Ions in Solids, Pergamon, Oxford, 1977, vol. 2,3.
- [47] Johansson TB, Axelsson KR, Johansson SAE
X-ray analysis : Elemental trace analysis at the 10^{-12} g level.
Nucl Instr Meth, 1970, B84 : 141-143.
- [48] Johansson SAE, Campbell JL
PIXE : A Novel Technique for Elemental Analysis
Wiley, Chichester, 1988.
- [49] Johansson SAE, Campbell JL, Malmqvist KG
Particle Induced X-ray Emission Spectrometry (PIXE).
Wiley-Interscience, 1995.
- [50] Irigaray JL, Oudadesse H, Brun V
Nuclear methods to characterize biomaterials.
Biomaterials, 2001, 22 : 629-640.
- [51] Merzbacher E, Lewis HW
In dbuch der Physik 34, S. Flugge editor, Springer Verlag, Berlin, 1958,166.
- [52] Garcia JD
Inner-shell Ionizations by proton impact.
Phys Rev, 1970, A1 : 280.
- [53] Johansson SAE, Johnasson TB
Analytical application of PIXE.
Nucl Instr and Meth, 1976, B137 : 473-516.
- [54] Brandt W, Lapicki G
Phys Rev, 1979, A22 : 465.

- [55] Brandt W, Lapicki G
Energy-loss effect in inner-shell Coulomb ionization by heavy charged particles.
Phys Rev, 1981, A23 : 1717-1729.
- [56] Basbas G, Lapicki G, Lambert R
Phys Lett, 1971, 34A : 277.
- [57] Cohen DD, Harrigan M
Atom Data and Nucl Data Tables, 1985, 33 : 255.
- [58] Krause MO
Atomic radiative and radiationless yield for K and L shells.
J Phys Chem Ref Data, 1979, 8 : 307.
- [59] Maxwell JA, Teesdale WJ, Campbell JL
The Guelph PIXE software package II. Nucl Instr and Meth, 1995, B95 : 407-421.
- [60] Scamper FH
X-ray fluorescence of environmental samples.
Ed. TG Dzubay, Ann Arbor Science Publ., 1977, Michigan.
- [61] Bevington PR
Data reduction and error analysis for the physical sciences.
Mc Graw-Hill, 1969, New-York.
- [62] Chu WK, Mayer JW, Nicolet MA
Backscattering Spectrometry.
Academic Press, 1978, London.
- [63] Breese MH, Jamieson DN, King PJC
Materials Analysis Using A Nuclear Microprobe.
John Wiley and Sons, 1996.
- [64] Liu J, Xie T, Fishbeck HJ
Resonance effects in thin film proton backscattering spectrometry.
Nucl Inst and Meth, 1991, B56/57 : 744-748.
- [65] Razafindrabe L
Dosage des éléments de faible numéro atomique par microsonde nucléaire : application aux échanges ioniques cellulaires.
Thèse No 1345, Université de Bordeaux I, 1995.
- [66] Simpson JBC, Earwaker LG
Computer simulation program for nuclear reaction analysis.
Nucl Inst and Meth, 1986, B15 : 502.
- [67] Mayer JW, Rimini E
Ion beam handbook for materials analysis.
Academic Press, New York, 1977.
- [68] Borderie B
Present possibilities for bulk analysis in prompt gamma-ray spectrometry with charged particles.
Nucl Inst and Meth, 1980, 175 : 465.
- [69] Heinrich KFJ
Electron beam X-rays microanalysis.
Van Nostrand Reinold, N.Y., 1981.
- [70] Mazzoldi P
Modification induced by irradiation in glasses.
Ed. Elsevier Science Pub., 1992.

- [71] Talmon Y, Thomas EL
Beam heating of a thick cold stage specimen in the SEM/STM.
J Microsc, 1977, 111 : 151.
- [72] Cookson JA
The use of PIXE techniques with nuclear microprobes.
Nucl Inst and Meth, 1981, 181 : 115.
- [73] Cahill TA, McColm DW, Kusko BH
Control of temperature in thin samples during ion beam analysis.
Nucl Inst and Meth, 1986, B14 : 38
- [74] Cookson JA
Specimen damage by nuclear microbeams and its avoidance.
Nucl Inst and Meth, 1988, B30 : 324-330.
- [75] McColm DW, Cahill TA
The temperature profile of a microprobe.
Nucl Inst and Meth, 1991, B54 : 91.
- [76] Llabador Y, Moretto Ph
Applications of nuclear microprobes in the life science : an efficient analytical technique for research in biology and medicine.
World Scientific Publishing, Singapore, 1998.
- [77] Le Moel A, Duraud JP
Scanning Microc, 1987,1(2) : 535.
- [78] Cholewa M, Bench G, Kirby BJ, Legge GJF
Changes in organic materials with scanning particle microbeams.
Nucl Inst and Meth, 1991, B54 : 101-108.
- [79] Legge GJF, Mazzolini AP
Elemental microanalysis of biological and medical specimens with a scanning proton microprobe.
Nucl Inst and Meth, 1980, 168 : 563-569.
- [80] Kirby BJ, Legge GJF
Ion beam induced damage and element loss during a microanalysis of biological tissue.
Nucl Inst and Meth, 1991, B54 : 98-100.
- [81] Themner K
Elemental losses from organic material caused by proton irradiation.
Nucl Inst and Meth, 1991, B54 : 115-117.
- [82] Watt F, Grime JW, Perry CC
The damage effect of a 1 micron proton beam on a single pollen grain.
Nucl Inst and Meth, 1988, B30 : 331-336.
- [83] Slatkin DN, Shroy RE, Jones KW
Microscopic radiation damage to air-dried human blood cells caused by 1.7 MeV 1,2,3H and 4He beams.
Nucl Inst and Meth, 1985, B9 : 66-70.
- [84] Nobiling R, Civelejoglu Y, Povh B, Schwalm D, Traxel K
Collimation for ion beams to micrometer dimensions.
Nucl Inst and Meth, 1975, 130 : 325.
- [85] Cookson JA, Ferguson ATG, Pilling FD
Proton microbeams, their production and use.
J of Radioanal Chem, 1972, 12 :39-52.

- [86] Biomatech SA
Zone Industrielle de l'Islo - Rue Pasteur - 38670 Chasse sur Rhône - France.
- [87] Jallot E, Benhayoune H, Kilian L, Irigaray JL, Barbotteau Y, Balossier G, Bonhomme P
Dissolution kinetics, selective leaching, and interfacial reactions of a bioglass coating enriched in alumina.
Journal of Colloid and Interface Science, 2001, 233 : 83-90.
- [88] Kitsugi T, Nakamura T, Oka M, Senaha Y, Goto T, Shibuya T
Bone-bonding behavior of plasma sprayed coatings of Bioglass^R, AW-glass ceramic, and tricalcium phosphate on titanium alloy.
J Biomed Mater Res, 1996, 30 : 261.
- [89] Hench LL
Biomaterials : a forecast for the future.
Biomaterials, 1998, 19 : 1419-1423.
- [90] Agins H. J. et al.
Metallic wear in failed titanium-alloy total hip replacements.
J Bone and Joint Surg, 1988, 70-A : 347-356.
- [91] Solar RJ
Corrosion resistance of titanium surgical implant alloys : a review.
Corrosion and degradation of implant materials, Ed. Syrett BC and Acharya A. ASTM STP 684. Philadelphia, American society for testing and biomaterials, 1979, 259-273.
- [92] Solar RJ, Pollack SR, Korostoff E.
In vitro corrosion testing of titanium surgical implant alloys : an approach to understanding titanium release from implants.
J Biomed Mater Res, 1979, 13 : 217-250.
- [93] Ducheyne P, Willems G, Martens M, Helsen J
In vivo metal-ion release from porous titanium-fiber material. J Biomed Mater Res, 1984, 18 : 293-308.
- [94] Sauvage T
Etude par des méthodes nucléaires d'analyse des transformations physico-chimiques du corail implanté in vivo.
Thèse No 406, Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand II), 1992.
- [95] Braye F
Détermination de la cinétique de résorption de biomatériaux par des méthodes physiques globales et analyse ponctuelle des gradients par la méthode nucléaire PIXE.
Thèse No 637, Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand II), 1994.
- [96] Jallot E
Influence du dopage en zinc et en manganèse sur la cinétique de résorption d'un implant d'hydroxyapatite et étude des effets de matrice dans la méthode nucléaire PIXE utilisée.
Thèse No 880, Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand II), 1997.
- [97] Guillemin G
Etude comparative de l'évolution de différents carbonates de calcium après implantation en tissu osseux.
Rapport scientifique CNRS, 1987, AIP N6931/N110.

- [98] Guillemin G, Fournie J, Patat JL, Chetail M
Contribution à l'étude du devenir d'un fragment de corail madréporaire implanté dans la diaphyse des os longs chez le chien.
CR Acad Sci, Paris (1981), 293, 371-376.
- [99] Guillemin G, Meunier A, Christel P, Pouliquen JC, Sedel L
Résorption corallienne et remplacement osseux.
Biomat 87, Bordeaux, décembre 1987.
- [100] Egli PS, Mueller W, Schenk RK
The role of pore size on bone ingrowth and implant substitution in hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramics : a histologic and morphometric study in rabbit.
Biomaterials and clinical applications, 1987, 53-56.
- [101] Guillemin G, Meunier A, Dallnt P, Christel P
Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities.
J Biomed Mater Res, 1989,23 : 765-775.
- [102] Jallot E
Communication privée.
- [103] Pointillard A, Gueguen L
Relation physiologiques entre le magnésium et l'os.
Ann Biol Anim Bioch Biophy, 1978, 18 : 1247.

RESUME :

Les biomatériaux à usage orthopédique posent le problème de leur devenir dans l'organisme. Lorsqu'ils sont métalliques, ils posent le problème du relargage de métaux dans les tissus voisins. L'alliage de titane Ti6Al4V est utilisé pour ses bonnes propriétés mécaniques et pour sa résistance à la corrosion. L'usage d'un revêtement permet d'améliorer encore ses performances. J'ai étudié deux revêtements en verre référencés BVA et BVH. La caractérisation in vivo et in vitro a été menée grâce à plusieurs techniques complémentaires d'analyse : microscopies électroniques et méthodes nucléaires (PIXE, ...).

Le verre BVA s'est révélé être bioactif. Il se transforme en un gel de silicium avec incorporation de protéines et d'oligo-éléments (Zn et Sr), et ce, dès 3 mois après implantation. Ce gel disparaît peu à peu et est remplacé par un os néoformé. Cet os a été analysé comme mature après un an d'implantation ; il assure une meilleure ostéointégration de l'implant. Quant au verre BVH, il est bioinerte. Sa composition est constante au cours du temps. Cependant, la formation d'une interface de 2 μm d'épaisseur, induite par le processus de dépôt du revêtement, fragilise les liaisons intergranulaires. Cela se traduit par la fragmentation du revêtement et la migration de grains de verre à travers le réseau lacunaire de l'os environnant. Les deux verres sont une barrière efficace contre la corrosion de l'alliage, tant qu'ils restent en place.

J'ai proposé les bases d'une nouvelle méthodologie d'analyse : la combinaison de la cartographie PIXE et de l'histopathologie. Le principal intérêt est de corrélérer une éventuelle réponse tissulaire à la présence de certains éléments atomiques.

J'ai introduit pour la première fois la théorie de la percolation pour essayer de modéliser la résorption de biomatériaux poreux tel que le corail et les hydroxyapatites. Les premières simulations sont très prometteuses et rendent bien compte de plusieurs résultats expérimentaux observés.

Mots Clés : Alliage de titane, verre bioactif, gel, biomatériaux, corrosion, contamination, PIXE, RBS, PIGE, SEM, STEM, EDXS, dégât d'irradiation, histopathologie, modélisation, percolation.

ABSTRACT :

Biomaterials which are used in orthopaedic surgery, introduce the problem of their behaviour in body. When they are metallic it can happen a metal release. Ti6Al4V titanium alloy is used for its good mechanical properties and its corrosion resistance. The use of coating makes it possible to improve its performance. I studied two glasses coatings referred BVA and BVH. The characterisation in vivo and in vitro was performed with several techniques of analysis : electronic microscopies and nuclear methods (PIXE, ...).

The BVA glass proved to be bioactive. It is transformed into a silicon gel with incorporation of proteins and trace elements (Zn and Sr), after 3 months of implantation. This gel disappears gradually and is replaced by neoformed bone. This bone is regarded as mature after one year of implantation ; it ensures a better osseointegration of the implant. As for BVH glass, it is bioinert. Its composition is constant during time. However, the formation of an interface of 2 μm thickness, induced by the coating process, weakens the inter-granular connections. That results by the fragmentation of the coating and the migration of glass particles through the lacunar network of surrounding bone. Two glasses are an effective barrier against the corrosion of alloy, as long as they remain in place.

I have proposed the bases of a new methodology of analysis : the combination of PIXE cartography and histopathology. The main interest is to correlate the possible tissue response to the presence of some atomic elements.

I have introduced for the first time the percolation theory to model the resorption of porous biomaterials such as coral and hydroxyapatites. First simulations are very promising and are in good agreement with several experimental results observed.

Keywords : Titanium alloy, bioactive glass, gel, biomaterials, corrosion, contamination, PIXE, RBS, PIGE, SEM, STEM, EDXS, irradiation damage, histopathologie, modeling, percolation.