



**HAL**  
open science

**Etude par des méthodes nucléaires et physico-chimiques  
de la contamination des tissus situés autour de  
biomatériaux métalliques implantés. Mesure de la  
contribution à la toxicité par la radioactivité résiduelle  
de plusieurs biomatériaux**

Geoffroy Guibert

► **To cite this version:**

Geoffroy Guibert. Etude par des méthodes nucléaires et physico-chimiques de la contamination des tissus situés autour de biomatériaux métalliques implantés. Mesure de la contribution à la toxicité par la radioactivité résiduelle de plusieurs biomatériaux. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2004. Français. NNT : . tel-00007082

**HAL Id: tel-00007082**

**<https://theses.hal.science/tel-00007082>**

Submitted on 11 Oct 2004

**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.

**UNIVERSITE BLAISE PASCAL**  
(U.F.R de Recherche Scientifique et Technique)

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES**

**THESE**

présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**  
(SPECIALITE : PHYSIQUE NUCLEAIRE APPLIQUEE)

par

**Geoffroy GUIBERT**  
Maître ès-Sciences, Diplômé d'Etudes Approfondies

**ETUDE PAR DES METHODES NUCLEAIRES ET  
PHYSICO-CHIMIQUES DE LA CONTAMINATION DES TISSUS  
SITUES AUTOUR DE BIOMATERIAUX METALLIQUES IMPLANTES.  
MESURE DE LA CONTRIBUTION A LA TOXICITE PAR LA  
RADIOACTIVITE RESIDUELLE DE PLUSIEURS BIOMATERIAUX.**

Thèse soutenue le 11 juin 2004, devant la commission d'examen :

Président :	M. A. BALDIT
Examineurs :	M. E. JALLOT M. J.L. KEMENY
Rapporteurs :	M. K. ISHII M. Ph. MORETTO
Directeur de thèse :	M. J.L. IRIGARAY



A Lussane,  
A mes parents,  
A mon frère,  
A ma famille,  
Et à tous ceux qui m'ont soutenu.

Felix qui potuit rerum cognoscere causas  
Virgile



# Remerciements

Je remercie Monsieur B. MICHEL, Directeur de Recherches au CNRS et précédent Directeur du Laboratoire de Physique Corpusculaire de m'avoir accueilli. Je remercie également Monsieur A. BALDIT, Professeur à l'Université Blaise Pascal et actuel Directeur du Laboratoire de Physique Corpusculaire de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Physique Corpusculaire de Clermont-Ferrand, UMR 6533, dirigé par Monsieur J.L IRIGARAY, Professeur Emérite. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour avoir accepté de diriger et d'encadrer ce travail. Qu'il soit remercié pour sa rigueur scientifique, ses remarques pertinentes et ses qualités professionnelles, dont j'ai pu bénéficier.

Je suis très reconnaissant envers 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 pour son accueil chaleureux et sa disponibilité lors des expériences réalisées au CENBG.

Je suis très honoré que Monsieur K. ISHII, Professeur à l'Université de Tohoku au Japon, ait accepté de participer à ce jury. Je tiens à le remercier de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteur.

Je remercie Monsieur le Professeur J.L. KEMENY, responsable du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU de Clermont-Ferrand, de sa participation en tant que membre du jury, mais également pour son aide précieuse concernant la partie histologie. Qu'il reçoive ici ma profonde gratitude pour les nombreuses réponses apportées aux questions lors de nos séances d'observations tissulaires.

Je remercie également l'ensemble du laboratoire d'Anatomie et Cytologie pour son accueil et plus particulièrement Mesdames A. QUINSAT et L. PERE pour leur disponibilité et l'élaboration des échantillons.

Je remercie Monsieur E. JALLOT, Professeur à l'Université Blaise Pascal et Directeur de l'équipe Physique Nucléaire Appliquée aux biomatériaux du L.P.C. pour avoir examiné en profondeur ce travail. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour les discussions fructueuses que nous avons eues, pour les nombreux conseils apportés ainsi que pour l'intérêt qu'il a porté à l'avancement des travaux de recherches.

Je remercie Monsieur G. BLONDIAUX, Directeur du Centre d'Etudes et de Recherches par Irradiation d'Orléans, pour avoir accepté la réalisation des expériences auprès du Van de Graaff. Je remercie également Monsieur T. SAUVAGE pour son aide et les nombreux conseils délivrés lors des analyses microsondes. Je remercie aussi Y. TESSIER et O. WENDLING pour leur disponibilité et leur participation au bon déroulement des expériences. J'adresse à l'ensemble du CERI mes remerciements pour la disponibilité et la cordialité accordées aux "visiteurs".



Je remercie Monsieur Ph. HUBERT, Directeur de Recherches au Centre d'Etude Nucléaire de Bordeaux Gradigan, pour la réalisation des mesures de faible radioactivité, nous avons pu bénéficier de ses équipements de mesure, de ses nombreux conseils et de son expérience. Je remercie aussi R. BELLO DOUA et L. BIADALA pour le temps consacré à la réalisation des mesures et des expériences.

Je remercie aussi Y. BARBOTTEAU ainsi que l'ensemble des membres du CENBG pour leur sympathie et leur accueil.

Je tiens aussi à exprimer mes remerciements à Mesdames V. COXAM, B. GAILLARD-MARTINIE et Monsieur P. LEBECQUE de l'INRA de Theix ainsi que Madame VES-CHAMBRE du Laboratoire des Magmas et des Volcans de Clermont-Ferrand.

Je remercie A.M. GELINAUD et Messieurs V. RAVEL et G. FORCE de CASIMIR de Clermont-Ferrand ainsi que Messieurs J.P. CHERRE et B. LAVEISSIERE du laboratoire LIMA/CUST de Clermont-Ferrand pour l'ensemble des conseils et l'ensemble des expériences réalisées.

Je remercie Monsieur A. CAZENAVE, chirurgien à l'institut CALOT de Berck sur Mer, pour la mise à disposition des échantillons, pour sa disponibilité, ses conseils et les réponses apportées.

Je remercie Madame M. RENARD et Monsieur J.C. FRICAIN du laboratoire INSERM, de l'Université Bordeaux 2, pour leurs conseils et leur accueil lors des expériences.

Je remercie Messieurs les Professeurs S. TERVER du CHRU de Clermont-Ferrand et G. VANNEUVILLE et G. ESCANDE du Laboratoire d'Anatomie pour leur participation, leur aide et leurs conseils.

Je remercie Messieurs L. MERITET, J.L. LAPORTE et M. ABBAOUI de l'I.U.T, Mesures Physiques, pour leur aide et leurs conseils. J'exprime ma gratitude à Madame A. LAPORTE, ma tutrice de monitorat, pour sa sympathie, mais aussi pour ses conseils et ses qualités humaines, qui ont fait de mon enseignement une expérience très enrichissante.

Je remercie également J.F. MATHIOT, Directeur de Recherches au CNRS et G. ROCHE, Professeur Emérite pour leur aide et leurs conseils.

Je tiens à remercier tous les membres du Laboratoire de Physique Corpusculaire, tout particulièrement J. PELLET, C. BLISSON et M. FOURNIER pour leur sympathie et leur disponibilité.

Enfin, je remercie Messieurs les doctorants S. GADRAT, M. PETIT, X. LOPEZ pour leur amitié et leur solidarité. Je leur souhaite bonne chance pour leur soutenance prochaine. Je souhaite bonne chance également à Messieurs F. YERMIA et B. FORESTIER. Je souhaite beaucoup de réussite à J. LAO, nouveau doctorant de l'équipe à la rentrée prochaine.





# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>7</b>
<b>I Les biomatériaux</b>	<b>11</b>
<b>1 Les matériaux employés comme substituts orthopédiques</b>	<b>13</b>
1.1 Les apatites biologiques et autres greffes . . . . .	13
1.2 Les substituts non osseux . . . . .	15
1.2.1 Les céramiques . . . . .	15
1.2.2 Le polyéthylène . . . . .	15
1.2.3 Les métaux . . . . .	16
1.3 Phénomènes d'usure des implants . . . . .	23
1.3.1 La corrosion . . . . .	23
1.3.2 Les frottements . . . . .	25
1.3.3 La tribocorrosion et la production de débris . . . . .	25
<b>2 Description des implants de l'articulation du genou</b>	<b>27</b>
2.1 La prothèse unicompartmentale . . . . .	27
2.2 Composition des prothèses explantées . . . . .	29
<b>II Les méthodes expérimentales</b>	<b>31</b>
<b>3 Caractérisation par faisceau de protons</b>	<b>33</b>
3.1 Pouvoir d'arrêt . . . . .	33
3.2 La méthode P.I.X.E . . . . .	34
3.2.1 Principe . . . . .	34
3.2.2 Analyse quantitative . . . . .	39
3.2.3 Calcul des concentrations avec le logiciel GUPIX . . . . .	42
3.3 Dispositif expérimental . . . . .	46
3.3.1 Microsonde nucléaire du C.E.N.B.G . . . . .	46
3.3.2 Millisonde nucléaire du C.E.R.I . . . . .	47
3.4 Caractérisation par rétrodiffusion R.B.S . . . . .	47
3.4.1 Considérations générales . . . . .	47
3.4.2 Principe . . . . .	48
3.4.3 Code de simulation . . . . .	49
3.4.4 Les dégâts d'irradiation . . . . .	51

<b>4</b>	<b>Caractérisation par faisceau d'électrons</b>	<b>55</b>
4.1	Microscope électronique-Généralités . . . . .	55
4.1.1	Principe et fonctionnement . . . . .	55
4.1.2	Formation du contraste en transmission . . . . .	56
4.2	Microscope électronique à balayage en transmission : STEM . . . . .	58
4.2.1	EDXS couplé au STEM . . . . .	58
4.2.2	Caractéristiques du microscope . . . . .	59
4.2.3	Méthode de quantification . . . . .	59
<b>5</b>	<b>Mesure de radioactivité résiduelle</b>	<b>65</b>
5.1	Les objectifs . . . . .	65
5.2	Les familles radioactives . . . . .	65
5.3	Ultra bas bruit de fond . . . . .	66
5.3.1	Mesures au C.E.N.B.G . . . . .	66
5.3.2	Mesures au L.S.M . . . . .	68
<b>III</b>	<b>Résultats et interprétations</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Contamination du tissu capsulaire par les prothèses de genou</b>	<b>73</b>
6.1	Protocole d'échantillonnages . . . . .	73
6.1.1	Le tissu capsulaire . . . . .	73
6.1.2	Tissu lyophilisé . . . . .	74
6.1.3	Tissu inclus en résine . . . . .	76
6.2	Degré de la contamination . . . . .	76
<b>7</b>	<b>Caractérisation des échantillons biologiques en éléments majeurs</b>	<b>79</b>
7.1	Comportement du faisceau de protons dans les cibles . . . . .	79
7.1.1	Dépôt d'énergie sur cible mince . . . . .	80
7.1.2	Dépôt d'énergie sur cible épaisse . . . . .	80
7.2	Les dégâts d'irradiation . . . . .	81
7.2.1	Cible épaisse . . . . .	81
7.2.2	Cible mince . . . . .	84
7.3	Evolution de la stoechiométrie de la matrice organique en fonction de la teneur en débris métalliques . . . . .	85
7.4	Calcul de la charge déposée . . . . .	87
7.5	Composition du tissu capsulaire . . . . .	87
7.5.1	Cible mince lyophilisée . . . . .	87
7.5.2	Conclusion . . . . .	89
<b>8</b>	<b>Localisation et migration des débris dans le tissu</b>	<b>91</b>
8.1	Migration en profondeur . . . . .	91
8.1.1	Cible mince . . . . .	91
8.1.2	Cible épaisse . . . . .	96
8.2	Répartition en surface . . . . .	96
8.2.1	Couple TA6V/TA6V . . . . .	96
8.2.2	Couple Cr-Co-Mo/TA6V . . . . .	98
8.3	Comportement bio-chimique . . . . .	98
8.3.1	En surface . . . . .	98

8.3.2	En profondeur . . . . .	99
8.3.3	Le paramètre d'homogénéité . . . . .	101
<b>9</b>	<b>Nature des débris</b>	<b>105</b>
9.1	Cartographies PIXE et clichés histologiques . . . . .	105
9.2	Caractérisation des débris à l'échelle nanométrique : STEM-EDXS . . . . .	107
9.2.1	Phénomènes d'absorption liés aux débris métalliques . . . . .	107
9.2.2	Estimation qualitative de l'absorption des rayons X des éléments métalliques dans nos échantillons . . . . .	109
9.2.3	Variation de l'absorption le long des profils de concentration . . . . .	110
9.2.4	Localisation du grain d'alliage dans la coupe . . . . .	113
9.3	Taille et morphologie des débris . . . . .	114
9.4	Composition des débris . . . . .	117
<b>10</b>	<b>Combinaison des analyses PIXE et histologique</b>	<b>121</b>
10.1	Corrélation sur des coupes adjacentes . . . . .	121
10.2	Corrélation sur la même coupe . . . . .	123
<b>11</b>	<b>Bilan et interprétations de la contamination métallique</b>	<b>129</b>
11.1	Echantillons $E_1$ et $E_5$ : couple TA6V/TA6V . . . . .	129
11.2	Echantillons $E_2$ , $E_3$ et $E_4$ : couple Cr-Co-Mo/TA6V . . . . .	130
11.2.1	Débris UHMWPE . . . . .	130
11.2.2	Comportement migratoire . . . . .	130
11.2.3	Les grains de TA6V . . . . .	131
11.2.4	Les grains de Cr-Co-Mo . . . . .	132
11.2.5	Métallose au titane . . . . .	133
11.3	Les réactions de l'organisme vis à vis des corps étrangers . . . . .	134
11.4	Conclusion . . . . .	134
<b>12</b>	<b>Radioactivité des biomatériaux</b>	<b>137</b>
12.1	Protocole d'échantillonnage . . . . .	137
12.2	Résultats de références constituées avec des fémurs humains . . . . .	138
12.3	Mesures sur des os d'animaux . . . . .	140
12.3.1	Fémurs de bovins . . . . .	140
12.3.2	Fémurs de porc . . . . .	140
12.3.3	Fémurs d'ovins . . . . .	141
12.4	Prothèses métalliques . . . . .	142
12.5	Corail . . . . .	142
12.6	Hydroxyapatite et bioverre . . . . .	143
12.7	Comparaisons des radioactivités . . . . .	143
12.7.1	Comparaison des populations fémorales . . . . .	144
12.7.2	Comparaison avec les matériaux de synthèse et le corail . . . . .	146
12.7.3	Bilan de toxicologie radioactive . . . . .	147
	<b>Conclusion générale</b>	<b>151</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>154</b>



# Introduction



Les biomatériaux ont été développés pour préserver l'intégrité physique et le confort de vie des personnes souffrant de déficiences fonctionnelles ou bien victimes de blessures. Ils doivent suppléer les fonctions des organes lésés. Les biomatériaux se définissent généralement par l'usage auquel on les destine. Ils regroupent aussi bien des matériaux artificiels (métaux, alliages métalliques, céramiques, matières plastiques) que des matériaux d'origine naturelle (corail, nacre, cellulose, autogreffes, allogreffes, hétérogreffes . . .) La chirurgie en charge de la réparation et de la restitution de l'intégrité fonctionnelle constitue le domaine d'application le plus important des biomatériaux. Elle les place dans une situation d'implantation sous contraintes biologiques, le milieu vivant étant particulièrement corrosif.

Un biomatériau est défini comme "un matériau non vivant utilisé et conçu pour interagir avec des systèmes biologiques <sup>1</sup>" [1]. Les biomatériaux interviennent essentiellement en orthopédie, en odontologie, en ophtalmologie et dans les systèmes cardio-vasculaires. Leur propriété est désignée sous le terme générique de biocompatibilité. Celle-ci est évaluée à l'aide d'essais *in vitro* et *in vivo*. Les notions de biotolérance, de biofonctionnalité, de bioactivité, d'ostéo-formation, d'ostéo-induction et d'ostéo-conduction précisent certaines caractéristiques des matériaux biocompatibles. Ils ne doivent pas introduire de toxicité ni de réactions néfastes.

Les biomatériaux de comblement et de remplacement osseux représentent l'alternative aux autogreffes et allogreffes. De nombreuses contraintes sont liées à l'utilisation des greffes, du fait de la transmission des virus. L'équipe de physique nucléaire appliquée aux biomatériaux du Laboratoire de Physique Corpusculaire de Clermont Ferrand réalise, depuis plusieurs années, des études sur les biomatériaux à usage orthopédique et participe à leur caractérisation *in vitro* et *in vivo* à l'interface implant-tissu. Pour ce faire, elle utilise des techniques issues de la physique nucléaire comme le marquage radioactif, l'activation neutronique, la fluorescence X induite par faisceau de protons [2]. La sensibilité, la sélectivité et la spécificité de ces méthodes en font des outils complémentaires.

Notre équipe de recherche s'est d'abord intéressée à la cinétique d'ossification d'un biomatériau naturel : le corail, et d'un biomatériau synthétique : l'hydroxyapatite, par l'intermédiaire des éléments Ca, P, Sr, Zn [3]. Le transfert de ces éléments, présents parfois à l'état de traces, de l'os vers l'implant est lié à la cinétique d'ossification de cet implant. D'autres études complémentaires sur des hydroxyapatites dopées et sur des céramiques de phosphates de calcium biphasiques (75% hydroxyapatite, 25% phosphate de calcium tricalcique) ont montré que la cinétique de résorption d'un matériau pouvait être influencée par des dopages [4]. Plus récemment, dans le cadre d'un contrat européen, l'étude de différents bioverres, matériaux de recouvrement de prothèses métalliques, a montré l'ancrage et la résistance à la corrosion de celles-ci [5][6]. Ces travaux ont été élargis à l'analyse des tissus environnant les prothèses implantées, en particulier par une étude de la contamination et par la modélisation à l'aide de la théorie de la percolation de la résorption osseuse de biomatériaux poreux [6][7].

Nous complétons ici les travaux précédents en nous intéressant aux biomatériaux métalliques, utilisés comme implants articulaires et à la contamination des tissus voisins, ainsi qu'à la structure des débris.

---

<sup>1</sup>selon la conférence de consensus, réunie à Chester (Grande Bretagne) en mars 1986, à l'initiative de la Société Européenne des Biomateriaux



Grâce à leur couche protectrice d'oxyde métallique en surface, les métaux biocompatibles ont la faculté de résister à la corrosion *in vitro*, dans un environnement statique. Toutefois, immergés dans un milieu biologique, la couche de passivation peut se briser sous l'effet de différents facteurs [8][9]. Une présence importante de particules métalliques dans le tissu provoque une coloration caractéristique de ce dernier, appelée métallose [10][11]. La nature, la taille, la morphologie, l'état de surface et la quantité de débris sont autant de paramètres qui influencent les réponses de l'organisme vis à vis des corps étrangers. Ils peuvent aboutir à un échec thérapeutique. L'ostéolyse "macrophagique" est le facteur principal du descellement [12].

La caractérisation des débris relatifs aux prothèses totales de hanche est désormais bien établie [13]. La prothèse de genou, dispositif prothétique plus récent, réclame encore un certain nombre d'études [14][15][16]. La prothèse de genou génère de plus gros débris et en plus grande quantité. Ces constats sont liés probablement à la différence de conformation entre l'articulation du genou et celle de la hanche [16][13]. Une description des débris particuliers des prothèses de genou améliore la compréhension de l'ostéolyse et des pertes aseptiques [15]. Leur migration dans l'articulation surtout entre l'implant et l'os favoriserait ce phénomène [17]. De plus, leur caractérisation au niveau de cette articulation est le meilleur moyen de confronter les débris *in vivo* avec ceux obtenus *in vitro*, qui sont parfois en désaccord avec les résultats expérimentaux [18].

Il existe plusieurs prothèses correspondant à différentes situations. Le type d'implant concernant nos travaux est la prothèse de genou unicompartmentale. Elle s'insère dans le traitement des arthroses limitées, lorsqu'un seul compartiment de l'articulation est atteint. Ce type d'implant est caractérisé par une grande conservation du capital osseux, un faible taux de complication et de morbidité, et une grande préservation des ligaments. Au bout de 10 ans, 80% à 90% des prothèses sont toujours en place [19].

Notre travail de recherche contribue à caractériser les débris d'usure des prothèses de genou, lors de reprise des implants, et plus particulièrement ceux des prothèses unicompartmentales dont les études sont peu nombreuses. Notre approche est de spécifier les débris métalliques présents dans les tissus périprothétiques per-opératoires métallosés à la fois d'un point de vue quantitatif et qualitatif, mais aussi de déterminer dans la mesure du possible la dimension, la forme, la nature des débris, ainsi que leur comportement migratoire. La méthode P.I.X.E, associée aux protocoles d'échantillonnages adéquats, autorise l'analyse de zones étendues. L'ensemble des informations récoltées associe les teneurs obtenues aux réponses biologiques par la mise en place d'un protocole combinant P.I.X.E et histologie sur la même zone. En mettant en oeuvre des techniques nucléaires, nous avons voulu nous assurer de l'innocuité des divers implants vis à vis de la radioactivité résiduelle à l'aide d'un système de détection à ultra bas bruit de fond.

Pour la réalisation de ces travaux pluridisciplinaires, l'équipe travaille en collaboration avec des chirurgiens, des biologistes et des histologistes.

Par conséquent ce travail est constitué par :

- une première partie introductive où l'état actuel des biomatériaux est passé en revue, comme leurs principales propriétés mécaniques, physiques, chimiques et les

phénomènes d'usure. Dans cette partie, on décrit la particularité de la prothèse unicompartimentale.

- une deuxième partie où les méthodes expérimentales sont présentées.
- une troisième partie consacrée aux résultats et à leur interprétation. Nous établissons les degrés de contamination, la composition en éléments majeurs organiques de nos cibles afin de réaliser l'analyse quantitative par le logiciel GUPIX. La localisation et la profondeur de migration des débris sont établies. Des informations sont fournies sur le type de débris majoritairement rencontrés, leur nature, leur dégradation et leurs dimensions. Nous présenterons une méthode couplant l'analyse PIXE à une analyse histologique sur une même zone, corrélant les réactions biologiques aux teneurs métalliques. Un dernier chapitre porte sur la mesure de la radioactivité résiduelle de plusieurs sortes de biomatériaux utilisés en site osseux avec des références de fémurs humains.



Première partie  
Les biomatériaux



# Chapitre 1

## Les matériaux employés comme substituts orthopédiques

Plusieurs thérapies chirurgicales font appel aux biomatériaux. La Société Européenne des Biomatériaux a retenu la définition consensuelle suivante : “un biomatériau est un matériau non vivant utilisé dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques”. Cependant, ces biomatériaux implantés doivent répondre à un certain nombre de critères pour pouvoir être intégrés et perdurer dans l’organisme vivant. Ils doivent être biotolérants, biocompatibles et biofonctionnels. De nombreux mécanismes d’interactions ont lieu entre ces matériaux implantés et les tissus du corps vivant, ils peuvent se situer au niveau chimique, mécanique ou biologique, faisant de l’étude des biomatériaux un domaine pluridisciplinaire. Il est possible de les classer en quatre catégories [1] :

Les métaux et alliages métalliques

Les céramiques au sens large

Les polymères et la matière molle

Les matériaux d’origine naturelle

Notre équipe travaille plus particulièrement sur la caractérisation des biomatériaux liés à l’orthopédie (prothèses ou substituts osseux, matériau de comblement, de recouvrement, d’ancrage ...).

### 1.1 Les apatites biologiques et autres greffes

Les cristaux d’apatites biologiques sont les principaux constituants des os et des dents. Ces apatites biologiques appartiennent à la grande famille chimique des phosphates de calcium qui constituent la phase minérale majeure des tissus durs des vertébrés. La formule chimique générale des apatites est représentée par :



dans laquelle M est un cation bivalent (Ca, Sr ...),  $XO_4$  un anion trivalent ( $PO_4$ ,  $AsO_4$  ...) et Y un anion monovalent (F, Cl, Br, I, OH ...).

Les apatites cristallisent généralement dans le système hexagonal. La caractéristique essentielle de cette structure est de former des solutions solides et d’accepter un grand

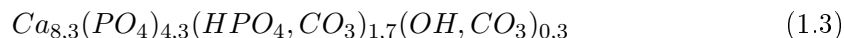
nombre de substituants. Le calcium de l'os peut ainsi être remplacé par d'autres ions bivalents mais aussi par des ions monovalents ( $Na^+$ ,  $K^+$ ), trivalent (La, Eu, Ga) ou par des lacunes.  $XO_4$  se voit substitué par des ions bivalents ( $CO_3$ ,  $SO_4$ , ...). Le second site anionique Y peut être substitué par des ions bivalents ( $CO_3$ , O ...).

Les apatites carbonatées ont comme formule chimique :



Le apatites biologiques sont définies dans la plupart des cas comme des apatites phosphocalciques carbonatées plus ou moins lacunaires. De nombreux éléments mineurs ou traces complètent sa formule chimique. Ces apatites osseuses contiennent 99% des réserves de calcium de l'organisme et 85% de celle du phosphore. Elles permettent le stockage de nombreux éléments minéraux essentiels comme Mg, Na, et K. Elles ont la particularité de fixer certains éléments toxiques et/ou radioactifs parfois difficilement éliminés (Pb, Ba,  $^{90}Sr$ ). Les phosphates de calcium apatitiques s'adaptent aux différents tissus grâce à une grande flexibilité et une capacité à accepter de grands écarts à la stoechiométrie (émail dentaire, os minéral ...). La composition chimique des apatites biologiques varie selon les espèces, les tissus considérés, l'âge des individus et le régime alimentaire. Dans l'os, l'apatite est associée à une matrice organique (fibres serrées de collagène) qui en fait un matériau aux propriétés mécaniques remarquables de faible masse volumique 2,3  $g/cm^3$ .

Un phénomène de maturation de la matrice osseuse est lié à une matrice de plus en plus carbonatée et de mieux en mieux cristallisée. Cette maturation est régulièrement interrompue par une dissolution du tissu et de sa reformation (ostéoclastes et ostéoblastes). Un minéral trop bien cristallisé et peu réactif ne serait plus à même de remplir ses fonctions. Le minéral osseux peut être décrit par une formule unique :



Le minéral reste très lacunaire avec l'âge, bien que le rapport  $CO_3/HPO_4$  augmente. La maturation de l'émail se traduit par une amélioration de l'état cristallin et ces apatites perdent une grande partie des anions bivalents.

Un grand nombre d'apatites biologiques prélevées au niveau des fémurs, ont fait l'objet de mesure de faible radioactivité, afin d'évaluer la pollution radioactive résiduelle. Il faut distinguer les autogreffes, allogreffes et xéno-greffes. L'autogreffe, dans les cas de réparation osseuse, est un os provenant du patient lui même, assurant une parfaite tolérance immunologique et une ostéo-induction. L'inconvénient de ce type de greffe est la présence d'un deuxième site opératoire et une morbidité non négligeable. Les allogreffes proviennent d'un autre sujet humain. Ce genre de produit nécessite des critères de sélection et de contrôle importants au niveau des maladies susceptibles d'être transmises. Les os humains de banque subissent des traitements avant implantation. Les xéno-greffes, greffes d'origine animale, peuvent présenter un facteur de transmission de maladie (ESB pour les xéno-greffes d'origine bovine par exemple). Le corail et la nacre sont principalement constitués de carbonate de calcium et ne sont pas des phosphates de calcium.

## 1.2 Les substituts non osseux

### 1.2.1 Les céramiques

Les céramiques sont des solides plus ou moins cristallisés contenant des phases amorphes. Ces matériaux se situent entre les polymères et les métaux. Les céramiques de synthèse se déclinent selon plusieurs produits (hydroxyapatite HA, phosphate tricalcique bêta B-TCP et les biphasés BCP). Elles constituent des biomatériaux directement utilisables après leur mise en forme. Elles sont aussi bien utilisées en chirurgie osseuse que pour réaliser des traitements de surface afin d'améliorer la cinétique de croissance osseuse au contact de l'implant [20]. Les biomatériaux en phosphate de calcium sont des céramiques bioactives et biocompatibles. La bioactivité est définie comme l'établissement de liaisons chimiques entre l'implant et l'os avoisinant, caractéristique dépendant directement des propriétés chimiques et physico-chimiques du matériau. Ce comportement s'oppose aux céramiques bio-inertes comme l'alumine. L'hydroxyapatite (HA) est très proche des apatites biologiques :



Le rapport atomique Ca/P (1,67) est moins élevé que celui de la poudre d'os en raison de la non stoechiométrie des apatites biologiques. L'HA pure est le phosphate de calcium le moins soluble. Les phosphates tricalciques bêta (B-TCP) ont la particularité de substituer certains atomes de calcium par du magnésium modifiant ses propriétés de dissolution. Les principales impuretés dans les HA sont la présence de phase de B-TCP à hauteur de quelques pourcents. La formule chimique du B-TCP est :



Des mélanges volontaires de HA et de B-TCP formant des céramiques bi-phasiques (BCP) offrent l'avantage de créer des biomatériaux dont la résorption et la substitution osseuse sont contrôlées. L'ostéoconduction est la migration des cellules osseuses de voisinage favorisant la formation de matrice osseuse dans le biomatériau.

Les bioverres sont des céramiques bioactives dues à la présence de calcium, de silice et d'ions phosphates. Ils sont utilisés comme matériau de recouvrement et de comblement. Ils aboutissent à la formation de cristaux d'apatites à la surface du matériau. Le polyéthylène et les métaux sont aussi des substituts non osseux et entrent dans la fabrication des prothèses.

### 1.2.2 Le polyéthylène

Le polyéthylène fait partie de la famille des polymères vinyliques issus de la polymérisation de l'éthylène. Les matériaux varient en fonction du poids moléculaire, de la cristallinité, de la ramification . . . Le polyéthylène PEBD (polyéthylène basse densité) possède une molécule ramifiée tandis que pour le polyéthylène PEHD (polyéthylène de haute densité) les molécules sont arrangées de façon linéaire. Le poids moléculaire du PEBD et du PEHD est généralement de l'ordre de 200 000 à 500 000 Da. L'UHMWPE (Ultra High Molecular Weight Polyethylene) est caractérisé par un poids moléculaire de



l'ordre de 1 à 10 millions. Le module d'élasticité (tableau 1.1) est difficile à mesurer car le domaine élastique est influencé par la forme de la pièce.

Les trois mécanismes d'usure sont l'abrasion (surface rugueuse, processus à trois corps avec des particules dures ...), l'adhésion avec la création d'un film de transfert sur la surface de frottement (remplissage des cavités et des aspérités, les chaînes sont orientées suivant la direction du glissement) et la fatigue. Lorsque les charges dépassent la limite de fatigue des fissures apparaissent. Les contraintes dans les prothèses de genou sont plus importantes que dans les prothèses de hanches [21]. D'autres facteurs tels que le lubrifiant et l'état de surface influencent l'usure. Les surfaces articulaires en titane (TA6V) possèdent une résistance faible à l'abrasion. Ce matériau est sujet aux rayures et devient abrasif vis à vis de l'UHMWPE. L'efficacité des prothèses de genou est directement reliée à la durabilité du composant tibial en UHMWPE. Le problème d'usure de cette partie de la prothèse est multi-factoriel (géométrie, caractéristiques mécaniques, stockage, stérilisation, réticulation ...)

### 1.2.3 Les métaux

#### Propriétés

Les premiers biomatériaux employés furent les métaux. Ils n'ont cessé d'évoluer au gré des problèmes liés à leur utilisation dans un organisme vivant. Souvent, le rajout d'un autre élément métallique dans un métal pur améliore ses propriétés. Aujourd'hui, il existe trois grandes familles d'alliages employées comme implants ou prothèses :

Les alliages inoxydables, les plus utilisés en quantité.

Les alliages à base de cobalt.

Les alliages à base de titane.

Les métaux sont des matériaux qui cristallisent généralement sous une structure hexagonale compacte (h.c) ou cubique face centrée (c.f.c). Les cristaux métalliques possèdent des propriétés spécifiques définies à l'aide de paramètres, fonction de la résistance, de la ductilité, de la conductivité ... Ces propriétés sont liées au nombre et au type d'imperfections : la vacance, l'imperfection interstitielle, les atomes de substitution (alliage), les dislocations ... La résistance mécanique définit l'aptitude d'un matériau à supporter des charges sans déformations inacceptables ni déficiences. Cette résistance mécanique globale dépend à la fois des propriétés mécaniques intrinsèques et de la mise en forme du métal ou de l'alliage.

L'élasticité est une déformation réversible du métal, lors du relâchement de la contrainte exercée, les atomes reprennent leur position initiale. Le domaine élastique d'un métal est décrit par la loi de Hooke :

$$\sigma = E \epsilon \quad (1.6)$$

Cette équation relie la contrainte  $\sigma$  ( $N/m^2$ ) à la déformation  $\epsilon$  (en %) par l'intermédiaire du module d'Young  $E$ . Le module d'élasticité  $E$  mesure la rigidité de la matière. Suivant le contexte médical (patient jeune, fonction de l'implant ...), des matériaux plus ou moins rigides seront employés.

Des phénomènes irréversibles apparaissent lorsque la contrainte augmente au-delà du domaine élastique. Les matériaux fragiles se rompent dans le domaine élastique tandis que les matériaux ductiles se déforment définitivement. Le mécanisme responsable de la plasticité est le glissement d'un plan réticulaire d'atomes par rapport à un autre. Au-delà d'une certaine contrainte, les matériaux ductiles se rompent à leur tour. L'écroutissage est un changement des propriétés mécaniques lorsqu'ils sont déformés après le domaine élastique. Un matériau plastique ou ductile présente une certaine malléabilité. La résistance à la traction est la contrainte maximale supportée par le matériau en traction. La ductilité des matériaux est décrite par l'allongement en pour cent à la rupture et la diminution en pour cent de la section transversale la plus petite au moment de la rupture.

Biomatériaux	Module d'Young E (MPa)	Limite d'élasticité (MPa)	Charge de rupture (MPa)	Limite de fatigue (MPa)	Ductilité (along.en %)	Potentiel de rupture (Volt)	Densité
Titane pur	105	692	785	430	10-23	9	4,5
Ti-6Al-4V	100-110	850-900	860-970	330-610	10	25	4,5
CoCrMo	200-230	275-1585	600-1795	400-580	8-65	0,87	8,3-9,2
Acier inox 316L	200	170-750	465-950	400-500	12 -40	0,2	7,9
UHMWPE	0,5	20	30	-	200-350	-	-
Os	10-40	-	90-140	-	-	-	2,3
Cartilage osseux	0,001-0,17	-	-	-	-	-	-

TAB. 1.1 – Propriétés mécaniques et électriques de certains biomatériaux utilisés en orthopédie [22][23][24][25].

D'autres notions liées à l'utilisation des matériaux tiennent compte du facteur temps. Le fluage est la partie de la déformation supplémentaire due à une contrainte constante pendant une durée permanente. La fatigue est liée à un phénomène de charge fluctuante ou bien répétée. Elle se caractérise par une perte de résistance, une perte de plasticité, une augmentation de l'incertitude sur la perte de la résistance et de la longévité. Elle se manifeste par la formation de fissures. La dureté est employée pour décrire le comportement en surface d'un matériau en mouvement. Elle résulte des interactions des forces interatomiques qui agissent sur la surface du matériau. Dans beaucoup de corps, la matière de la surface est différente de celle de l'intérieur. La mesure de la dureté est faite en surface ou bien à proximité. Une définition adéquate de la dureté est la résistance à une déformation permanente de sa surface (en forme de rayure, de pénétration ou d'empreintes). Une matière qui en raye une autre est plus dure. Le diamant est le matériau le plus dur. Une autre mesure de la dureté est le rapport de la profondeur de pénétration du pénétrateur dans la surface sur la force nécessaire.

Il est évident que l'élasticité, la plasticité, la zone de rupture, le fluage, la fatigue et la dureté sont des grandeurs dont il faut tenir compte pour réaliser des implants. Le dispositif prothétique, sa fonction, son emplacement, sa géométrie et le matériau de contact orientent le choix du métal. En outre, les biomatériaux implantés et immergés dans un milieu physiologique sont soumis à des phénomènes de corrosion.

## Les métaux employés comme biomatériaux

Meyrueis [23] et Gotman [25] résument les caractéristiques et les propriétés que doivent posséder les métaux ou leurs alliages, afin de répondre aux critères de biocompatibilité, de résistance à la corrosion et de qualité mécanique suffisante pour se substituer aux organes défaillants. De nombreux métaux purs ont été utilisés par les chirurgiens mais leurs propriétés étaient parfois insuffisantes : le fer ne résiste guère à la corrosion, le plomb est toxique, le cuivre est peu biocompatible et peu résistant mécaniquement, comme le platine ou l'or. Le seul métal utilisé pur est le titane. Aujourd'hui, trois grandes familles d'alliage se dégagent et répondent aux critères évoqués précédemment : les aciers inoxydables, les alliages à base de cobalt et les alliages à base de titane. Le corps étant un milieu très corrosif, les alliages utilisés devront posséder une couche de passivation régénérative, mais la combinaison de deux types d'alliages pour réaliser un dispositif prothétique devra prendre en compte la corrosion galvanique. La rigidité (propriété à s'opposer à une déformation), la flexibilité (déformation facile du métal) viennent compléter les critères de choix. L'érouissage d'un métal, déformation dans sa zone plastique par forgeage, par étirage, par laminage à froid modifie les propriétés mécaniques. Le réchauffement ou recuit dans une certaine gamme de température permet de restaurer certaines des qualités initiales désirées.

La limite de fatigue appelée aussi limite d'endurance correspond souvent à 50 % de la charge de rupture. La réalisation de prothèses articulaires exige des implants une charge de rupture élevée car les contraintes qu'ils supportent sont considérables. La rigidité élevée des alliages chrome-cobalt et des aciers inox ne propage pas une grande partie des contraintes exercées par l'os. Le TA6V, deux fois plus élastique, paraît la meilleure solution pour la réalisation de prothèses articulaires [23].

### Les aciers inoxydables

Les aciers inox sont les plus couramment utilisés comme biomatériaux, dans le cas de prothèses définitives internes. Les propriétés mécaniques et corrosives de cet implant sont standardisées par la norme ISO 5832-1 et ASTM. Le meilleur acier orthopédique est le 316L, norme française NF S90 401. Ces implants ne présentent aucun inconvénient durant l'analyse par résonance magnétique du fait de leur amagnétisme [26]. La densité de l'acier (tableau 1.1) correspond à deux fois celle du titane. A dimensions similaires, les prothèses en acier inox sont plus rigides et plus dures que celles en titane. Les alliages à base de titane remplacent les prothèses en aciers inox pour les personnes allergiques au nickel. De ce fait, de nouveaux alliages acier inox contenant de l'azote à la place du nickel sont en cours d'évaluation : ils possèdent des propriétés mécaniques renforcées et une bonne résistance à la corrosion [26].

### Les alliages à base de cobalt

Les alliages à base de cobalt sont très durs et peu déformables. Il faut distinguer les alliages à couler (NF S90 402), cas de nos prothèses, caractérisés par une forte proportion de cobalt, de chrome et de carbone, de ceux à forger et mis en forme à froid (NF S 90 403, 406, 407).

Ils sont amagnétiques, de grande résistance, biocompatibles et destinés à la fabrication de prothèses de genou, de hanche, d'épaule. Ils sont implantés sur le long terme. Les deux alliages les plus utilisés aujourd'hui sont ISO 5832-4 et ISO 5832-12 [27]. Les teneurs en Cr, Mo, Ni, Mn, Fe sont indiquées dans le tableau 2.2. De nombreuses propriétés découlent de la structure cristallographique du cobalt, dans laquelle la solution solide du chrome et du molybdène a des effets de renforcement. Le chrome augmente la résistance à la corrosion et la dureté. Les propriétés mécaniques dépendent directement de la microstructure : plus les grains sont fins et homogènes, plus les propriétés mécaniques sont bonnes [27]. De façon générale, les alliages forgés possèdent de meilleures propriétés mécaniques que les alliages moulés [27]. L'érosion peut détruire la couche de passivation d'oxydes de chrome mais elle a la faculté de se reconstituer. L'emploi d'alliage à base de cobalt avec de l'acier inox est déconseillé tandis que l'association avec des alliages à base de titane n'engendre pas de corrosion galvanique.

Globalement ces alliages présentent de bonnes propriétés mécaniques, une bonne résistance à la corrosion et un bon comportement vis à vis de la détérioration, c'est un alliage idéal pour des prothèses destinées au long terme.

## Les alliages à base de titane

### Le titane pur

Le titane est un matériau léger (tableau 1.1), son point de fusion se situe à  $\theta = 1670^\circ C$ . C'est un élément qui entre dans la composition d'alliages légers, caractérisés par une résistance à la fatigue élevée, une bonne stabilité thermique et une résistance à la corrosion intrinsèque remarquable. Le titane non allié possède une structure hexagonale compacte pour une température inférieure à  $882^\circ C$  appelée phase  $\alpha$  et une structure cubique face centrée, phase  $\beta$ , au dessus de cette température. L'ajout d'impuretés comme l'azote, le carbone ou l'oxygène augmente la dureté et la résistance mécanique en général, au détriment de la ductilité.

### Les alliages à base de titane

L'addition d'éléments métalliques à une matrice de titane permet d'élargir et de stabiliser plus ou moins les domaines des phases  $\alpha$  ou  $\beta$  à température ambiante. La proportion de ces phases est liée aux différents processus de fabrication et de traitement thermo-mécaniques [28]. Les éléments métalliques d'addition influencent la température de transformation ou de transition de phase  $\alpha \rightleftharpoons \beta$ . Ils se substituent aux atomes de titane. Les éléments alphagènes favorisent la présence de phase  $\alpha$  et les bétagènes la phase  $\beta$ . Un troisième type d'élément est considéré comme neutre (Zr et Sn). Au gré des associations d'éléments alphagènes et bétagènes, il est possible de fabriquer trois catégories d'alliages à base de titane, à température ambiante.

**Les alliages alpha :** Ils contiennent une grande quantité d'éléments alphagènes, et parfois une petite quantité d'éléments bétagènes renforçant la phase beta (cas des alliages super alpha). Ils sont quasiment constitués de phase alpha. La phase alpha est une solution solide de substitution ou les atomes alphagènes, voir bétagènes, se substituent à certains atomes de titane aux sites normaux du réseau. L'aluminium

est le principal élément alphagène. Plus sa teneur augmente plus la plasticité de l'alliage diminue.

**Les alliages alpha-beta :** Ils contiennent les deux phases en équilibre au sein de l'alliage. Leur proportion est liée à la quantité d'éléments d'addition et au processus de fabrication thermo-mécanique (figure 1.1). Le vanadium particulièrement soluble dans la phase  $\beta$  présente la particularité d'être partiellement soluble aussi dans la phase  $\alpha$ , sa solubilité maximale dans cette phase étant de 4 % à  $650^{\circ}C$  environ [29].

**Les alliages beta :** Ils sont constitués principalement de phase beta stable ou métastable.

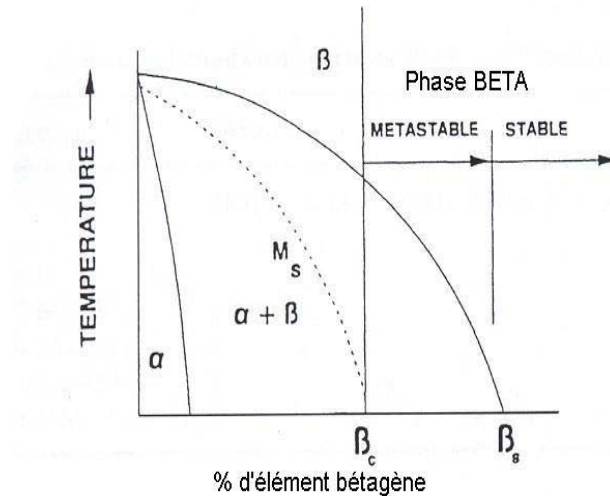


FIG. 1.1 – Pseudo diagramme de phase binaire des alliages en titane pour les éléments bêtagènes [22].

### Le TA6V

La teneur en éléments métalliques du TA6V est rappelée dans le tableau 2.2. La présence de phase  $\alpha$  à hauteur de 30 à 80 % et donc d'une phase  $\beta$  est liée au forgeage à chaud. Plus la température de forgeage est élevée, plus il est facile de le forger, mais alors intervient le problème des phases. La température de transition  $\alpha + \beta \rightleftharpoons \beta$  est située vers les  $995^{\circ}C$ . Le forgeage en phase  $\beta$ , c'est à dire à une température supérieure à  $995^{\circ}C$ , implique que la seule phase présente est la phase  $\beta$ . Un forgeage en  $\alpha + \beta$ , se situant en dessous de cette température de  $995^{\circ}C$  permet aux deux phases  $\alpha$  et  $\beta$  d'exister, sous certaines conditions de recuit.

**forgeage en  $\beta$  :** Ce type de traitement du TA6V est caractérisé par une résistance mécanique et une ductilité médiocres. Lors du refroidissement, la phase  $\beta$  se décompose en phase  $\alpha$  en prenant une forme de structure en forme d'aiguilles [28].

**forgeage en  $\alpha + \beta$  :** Plusieurs types de phases peuvent être présents à température ambiante. La phase  $\alpha$  primaire, initialement présente lors du forgeage à chaud, est souvent présente sous forme de grain équiaxe ; la phase  $\beta$  transformée, issue de la transformation de la phase  $\beta$  présente à l'origine en phase  $\alpha$ , a un aspect aciculaire ou globulaire. Cette forme dépend de la température du recuit et du traitement mécanique associé, par exemple laminage. Enfin, il peut exister une phase  $\beta$  à température ambiante à condition que le recuit se fasse à partir de  $700^{\circ}\text{C}$ , elle se présente sous forme de petits globules souvent dispersés dans une matrice de phase  $\alpha$ , la proportion de phase  $\beta$  est d'autant plus élevée que la température est supérieure à cette température seuil de  $700^{\circ}\text{C}$ . Une telle structure est caractérisée par une bonne ductilité. Le matricage des alliages de type  $\alpha + \beta$  par un forgeage en  $\beta$  est exclu pour cette raison et l'opération de forgeage doit donc se situer en dessous de la température de transition, aux alentours de  $930^{\circ}\text{C}$ .

Lorsque le TA6V est traité en mode  $\beta$ , il est impossible de régénérer par un traitement thermique dans le domaine de température  $\alpha + \beta$ , une structure fine équiaxe. Les structures aciculaires possèdent une ductilité médiocre comparées aux structures équiaxes.

Les caractéristiques mécaniques à température ambiante de l'alliage TA6V sont étroitement dépendantes de son état microstructural. Lorsque les recuits sont effectués dans la gamme  $700\text{-}1000^{\circ}\text{C}$ , il y a apparition de la phase  $\beta$  qui est d'autant plus forte que cette température est élevée. La structure de l'alliage TA6V correspond alors à un agrégat de cristaux de phase  $\alpha$  primaire, relativement ductile, et d'ex grains de phases  $\beta$  décomposés plus ou moins complètement et de résistance beaucoup plus élevée.

L'augmentation de la proportion de ces grains  $\beta$  avec la température de recuit se traduit par une augmentation de la dureté, de la limite d'élasticité, de la résistance à la rupture ainsi qu'à une diminution de la ductilité. De ces deux effets antagonistes, il résulte une température de recuit qui confère à l'alliage le maximum de ductilité et le minimum de résistance. Une autre phase nommée  $\alpha'$  de structure hexagonale compacte résulte de la décomposition très rapide de la phase  $\beta$  consécutivement à un excès d'éléments alphasènes (super saturation) [30]. La composition de la phase  $\alpha'$  est très proche de la phase  $\beta$  et ses paramètres très peu différents de la phase  $\alpha$ . Une autre phase appelée  $\beta$  métastable est issue d'un déséquilibre local en élément bêtagène [31]. Lors du refroidissement, les plages  $\alpha$  s'enrichissent en aluminium et s'appauvrissent en vanadium, la situation étant inversée pour les plages  $\beta$  transformées.

La température de recuit influence le type de phase à température ambiante, leur forme et leur dimension. Le processus de refroidissement contribue aussi à l'aspect microstructural final dont dépendent les propriétés mécaniques [31]. Il peut y avoir des imperfections de fabrication se traduisant par des zones fortement enrichies en aluminium (assez molles) ou bien en vanadium, problème rejoignant les modifications de phases. Une trop grande quantité d'oxygène ou d'azote favorise l'apparition de la phase  $\alpha$  provoquant une fragilisation de l'alliage [30]. Par exemple lors d'un recuit à  $1230^{\circ}\text{C}$ , un refroidissement par trempage à l'eau fera apparaître des phases  $\beta$  métastables alors qu'un refroidissement sous vide favorise une structure de phase alpha équiaxe avec des phases beta intergranulaires [31].

## Les implants en alliage à base de titane

Pohler [15] décrit les atouts principaux des implants à base de titane. Ils ont prouvé leur excellente biocompatibilité et leur résistance à la corrosion, leurs caractéristiques principales sont un faible poids ainsi qu'une grande résistance mécanique. La principale forme du titane dans la nature est sous forme d'oxyde  $TiO_2$ , mais il possède une grande affinité avec l'hydrogène, l'azote et le carbone. Les propriétés du titane pur dépendent de la teneur en éléments traces en azote, carbone, hydrogène, fer et oxygène [15]. Plus le titane est pur, plus il est plastique.

Certains implants doivent avoir une déformation plastique suffisante pour entourer l'os, par exemple dans le cas de plaque. Le titane pur ainsi que ses alliages ont en général un faible module élastique, offrant une plus grande flexibilité que les autres métaux, les polymères mis à part. Ses propriétés peuvent être modifiées dans une certaine mesure grâce aux alliages [15].

Les alliages à base de titane existent généralement sous forme  $\alpha + \beta$  mais certains alliages  $\beta$  auraient un module élastique encore plus faible, une meilleure résistance à la corrosion et une plus grande ductilité, ainsi qu'une meilleure résistance mécanique par rapport aux alliages  $\alpha + \beta$ .

Les alliages  $\alpha + \beta$  fréquemment employés sont  $Ti-6Al-7Nb$  et le  $Ti-6Al-4V$ . Les alliages  $Ti-15Mo$  et  $Ti-15Mo-5Zr-3Al$  de phases  $\beta$  sont en cours d'homologation, le molybdène stabilise cette phase  $\beta$  à température ambiante. La présence d'irrégularités dans la structure de l'alliage dues aux instruments peut être à l'origine de contraintes ou de cisaillements. En général, les alliages de titane de phases  $\alpha + \beta$  sont plus sensibles aux entailles que les phases  $\beta$ . De nombreux processus de fabrication tiennent compte de cette sensibilité aux entailles afin de diminuer les changements abruptes de forme et les contraintes localisées.

Les alliages de titane sont utilisés dans la fabrication des vis pour les os, des plaques stabilisatrices et dans tous les systèmes demandant une grande résistance aux contraintes de charge. Leur faible module d'élasticité est idéal pour les prothèses destinées aux enfants. La corrosion galvanique n'apparaît pas entre un élément en titane pur et un alliage à base de titane. De nouvelles classes d'alliages stables  $\beta$  qui améliorent certaines propriétés mécaniques vont étendre à l'avenir la gamme d'alliage à base de titane [32].

## Conclusion sur les biomatériaux métalliques

Les matériaux utilisés en chirurgie tombent dans la catégorie des métaux passifs, qui se caractérisent par une couche d'oxyde en surface.

Les aciers et les alliages à base de cobalt se couvrent d'une couche d'oxyde de chrome  $Cr_2O_3$ . Les alliages à base de titane voient leur surface protégée par une couche d'oxydes de  $TiO_2$ . Le potentiel de rupture au repos (tableau 1.1) caractérise la résistance à la corrosion [25]. Il en résulte que le titane et ses alliages ne corrodent jamais, ceux à base de cobalt rarement. Le matériau 316L stainless est celui susceptible de se corroder le plus souvent. Les différentes corrosions et phénomènes d'usure rendent complexe l'interaction du milieu avec l'implant. Des ions issus de la couche de passivation peuvent se retrouver dans le tissu, le sérum ou l'urine en haute teneur. Pour le titane, cette contamination est bénigne car il est stable chimiquement [33].

Sous des conditions statiques, sans aucun frottement ni mouvement entre les métaux, l'association d'alliage à base de titane et de cobalt n'accélère pas la corrosion galvanique. Par contre, des couples acier inox-alliage à base de cobalt ou acier inox-alliage à base de titane ont un comportement très instable. Il est recommandé d'utiliser des couples appartenant à la même famille, car ces alliages possèdent un potentiel chimique proche voire identique.

La présence de mouvements et de frottements dégrade rapidement un implant, dans le cas où la couche d'oxyde est abrasée. La corrosion galvanique, entre la tige fémorale en TA6V et une tête fémorale en Co-Cr-Mo par exemple, est fréquente. Dans des alliages à base de cobalt, une usure par corrosion intergranulaire provoque une dissolution sélective du cobalt et la formation de particules riches en carbone et recouvertes d'oxyde.

Dans un objectif de prothèse à long terme et de survie de l'implant, l'intégrité mécanique de la couche d'oxyde est essentielle à cette stabilité. Tous les phénomènes qui peuvent se produire à l'interface métal-oxyde-solution, doivent être pris en compte. De nombreuses prothèses ont échoué à cause d'une mauvaise fabrication, de mauvais alliages sélectionnés ou d'une mauvaise combinaison de couple métal-métal.

Les tissus entourant des implants modernes peuvent inclure des zones de résorption osseuse et d'encapsulation fibreuse, avec des réponses aux corps étrangers. Jacobs [33] relate les effets systémiques à court et à long terme. Les implants, ainsi que leur débris d'usure, peuvent relarguer des ions métalliques chimiquement actifs dans le tissu. Bien que ces ions puissent rester dans le tissu localement, ils sont susceptibles d'être transportés dans le réseau sanguin ou lymphatique en se liant à des protéines ou en formant des composés organo-métalliques.

Il y a quatre facteurs importants dans le relargage d'ions métalliques :

La quantité d'ions largués,

L'endroit où les ions sont transportés et leur quantité,

La forme chimique : précipité inorganique, complexe organo-métallique,

Les conséquences physio-pathologiques.

A l'heure actuelle, il n'y a pas de corrélation entre les ions relargués et des effets métaboliques, bactériologiques, immunologiques, cancérigènes et toxiques constatés chez l'homme [33].

## 1.3 Phénomènes d'usure des implants

### 1.3.1 La corrosion

La corrosion uniforme est la destruction d'un métal par réaction chimique ou électrochimique. Cette dégradation peut entraîner la destruction de l'implant et le relargage de débris ou d'ions dans le tissu, provoquant des réactions biologiques néfastes. La corrosion est une réaction d'oxydo-réduction qui provoque la perte d'ions métalliques et laisse une charge négative au métal, connue sous le nom de potentiel. Ainsi deux métaux placés dans la même solution auront deux potentiels différents, propriété liée au métal



et à l'intensité de la liaison électron-ion métallique. La vitesse de corrosion s'exprime en micron/an de perte d'épaisseur. Les métaux employés comme biomatériaux ont la particularité de posséder une barrière cinétique à la corrosion grâce la constitution d'une couche d'oxyde métallique en surface [33][25][32][15][27]. Cette couche de passivation empêche la migration d'ions et d'électrons à l'interface implant milieu biologique.

La corrosion galvanique est un phénomène d'usure électrochimique qui se produit lorsque deux métaux constituent une pile. Ce phénomène peut se produire lorsque deux implants métalliques se trouvent en contact dans l'organisme. Deux implants de nature différente créent un couple d'électrodes. Les associations de couple de métal sont faites de telle manière que les métaux ne possèdent pas une différence de potentiel supérieure au potentiel électrique de rupture de l'anode [34][35]. Le contact entre un alliage à base de titane et de Cr-Co-Mo crée une différence de potentiel inférieure à ce potentiel de rupture de l'anode (Cr-Co-Mo) et ne constitue pas un couple galvanique en cas de contact [36]. Toutefois, une brisure de la couche d'oxyde modifie les conditions électrochimiques en augmentant la différence de potentiel entre les éléments du couple. Une corrosion galvanique libère une quantité d'ions importante dans l'organisme. Dans ce cas l'anode (Cr-Co-Mo) est amenée à se dissoudre continuellement. Ce genre de corrosion galvanique est liée à une usure mécanique supplémentaire, avec l'apparition de fissures ou de crevasses [37].

De nombreuses situations peuvent conduire à la création d'éléments galvaniques comme une prothèse constituée de plusieurs parties métalliques dans un même milieu physiologique. La différence de composition de grains d'un même alliage constitue un élément galvanique à leurs surfaces respectives . . .Ce phénomène de corrosion aux limites de grains, fait que ces régions deviennent rapidement anodiques.

Il existe de nombreuses variantes de corrosion localisées ou associées à un autre phénomène d'usure [33] [38]. La corrosion par piqûre se propage en profondeur et affecte la résistance mécanique de l'implant, bien qu'elle ne représente qu'une faible surface. La corrosion intergranulaire, la corrosion érosion où la vitesse de corrosion est accélérée par le mouvement du liquide corrosif, la corrosion sous tension liée à une contrainte mécanique sont autant de déclinaison de corrosions susceptibles de se produire au niveau

Biomatériaux	Composition en % massique	Avantages	Inconvénients
Acier inoxydable	Fe(bal.),Cr(17 à 20%), Ni(12 à 17%), Mo(2 à 4%)	bon marché, facile à mettre en oeuvre, disponibilité	durée de vie faible, module d'Young grand
Alliage à base de cobalt	Co(bal.), Cr(19 à 30%), Mo(0 à 10%), Ni(0 à 37%)	résistance à l'usure, à la corrosion, à la fatigue	très grand module d'Young, moins bonne biocompatibilité
Alliage à base de titane	Ti(bal.), Al(6%),V(4%), Nb(7%)	bonne biocompatibilité, grande résistance à la corrosion et à la fatigue, faible module élastique	faible résistance à l'usure, au cisaillement

TAB. 1.2 – Propriétés générales des alliages métalliques utilisés comme biomatériaux

de l'implant. Les bactéries peuvent produire des composés corrosifs ou des acides organiques. L'hétérogénéité dans le liquide (gradients de concentrations d'ions) ou dans le métal favorise la corrosion galvanique.

La corrosion est réduite par la couche de passivation, dont l'épaisseur est de quelques atomes. La forme la plus connue est une couche d'oxyde, mais celle-ci peut être artificielle par l'application d'un revêtement de polymère ou de céramique. Ces couches de passivation doivent être non poreuses avec une structure atomique limitant la migration des ions, et être capables de se régénérer lors de phénomènes d'abrasion. La stabilité de la couche de passivation et la vitesse de repassivation sont des critères déterminants dans la performance des applications orthopédiques.

### **1.3.2 Les frottements**

Les frottements peuvent être la conséquence de micro-mouvements non désirés ou bien dus à un mouvement nécessaire de la prothèse qui se substitue aux parties défaillantes ; c'est le cas des prothèses de genou où la partie supérieure de la prothèse effectue un mouvement de rotation pour permettre à l'individu de se mouvoir. Les interactions entre les surfaces de l'implant ou entre l'implant et les tissus de soutien constituent un système tribologique en mouvement relatif. La rugosité, les aspérités, la présence d'une couche d'oxyde influencent le frottement et l'usure. La présence de débris entre les deux surfaces en mouvement peut participer à l'abrasion. Il arrive que les implants subissent une fracture incombant à la fatigue, dans le cas d'un nombre important de cycles. Les mécanismes de fatigue se traduisent par l'apparition de fissures à la surface, de sa propagation à travers l'implant et au final par une fracture de surcharge.

### **1.3.3 La tribocorrosion et la production de débris**

La tribocorrosion est la combinaison de l'usure par frottements et de la corrosion. La quantité de débris produite est supérieure à la somme des débris produits par l'un ou l'autre phénomène. Les frottements modifient l'état de surface du matériau qui devient plus sensible à la corrosion, et la corrosion influence les conditions de frottement. Concrètement, la corrosion modifie la rugosité du matériau. Les produits de corrosion peuvent adhérer au métal modifiant sa rugosité, sa dureté et donc sa résistance au frottement et intervenir en tant que troisième corps.

Ces phénomènes d'usure se traduisent par un largage de particules diverses et variées, qui dépendent du dispositif implanté, dans le tissu hôte. Il peut ainsi y avoir des molécules de polymères, des particules d'alliages métalliques, d'UHMWPE, de PMMA (Polyméthyl méthacrylate), de céramiques, d'ions métalliques . . .



## Chapitre 2

# Description des implants de l'articulation du genou

### 2.1 La prothèse unicompartmentale

Les causes d'arthrose sont variables : fractures, ruptures ligamentaires, lésions des ménisques, excès de poids, mauvaise orientation des membres inférieurs, maladies . . . Suivant le type et la localisation de l'arthrose, plusieurs modèles de prothèses totales ou unicompartmentales existent.

Notre étude porte exclusivement sur des reprises de prothèses unicompartmentales réalisées à l'institut CALOT de Berck sur Mer, au département d'orthopédie générale (Service du Dr Cazenave).

Les prothèses unicompartmentales sont composées de parties métalliques et de polyéthylène : couple métal-polyéthylène appelé "Metal-Back-polyéthylène" (MB-PE) . La partie implantée au niveau du fémur est une pièce métallique constituée d'alliage à base de cobalt et de chrome ou de TA6V. Le plateau tibial en TA6V est séparé du condyle par une plaque de polyéthylène fixée, pour trois de nos échantillons (tableau 2.1). L'épaisseur minimale d'un couple MB-PE est de 9 mm (3 mm pour la partie métallique et 6 mm pour la partie en polyéthylène). L'argument en faveur du plateau tibial métallique recouvert de polyéthylène est la diminution du fluage qui est une source d'usure, constatée lors de plateau tout polyéthylène. Cependant, ce fluage persiste malgré tout à l'interface MB-PE, au niveau des trous de vis et en périphérie de l'insert. Les prothèses à plateaux fixes voient la pièce en polyéthylène fixée sur le plateau tibial métallique tandis que celles à plateaux mobiles voient le polyéthylène posé sur ce même plateau. Le plateau mobile en polyéthylène recule lors des flexions augmentant le point de contact et diminuant par la même occasion les contraintes auxquelles il est soumis. Le taux d'usure d'un plateau mobile est de 1 mm pour 40 ans contre 1 mm pour 5,2 ans pour un plateau fixe [21]. L'inconvénient du plateau mobile est une luxation possible.

La figure 2.1 montre une prothèse unicompartmentale avant et après l'implantation. La pièce métallique de forme arrondie s'insère au niveau du fémur. Le plateau tibial est composé d'une pièce métallique recouverte de polyéthylène s'insérant au niveau du tibia. Le polyéthylène n'apparaît pas au niveau de la radiographie (image de gauche figure 2.1).

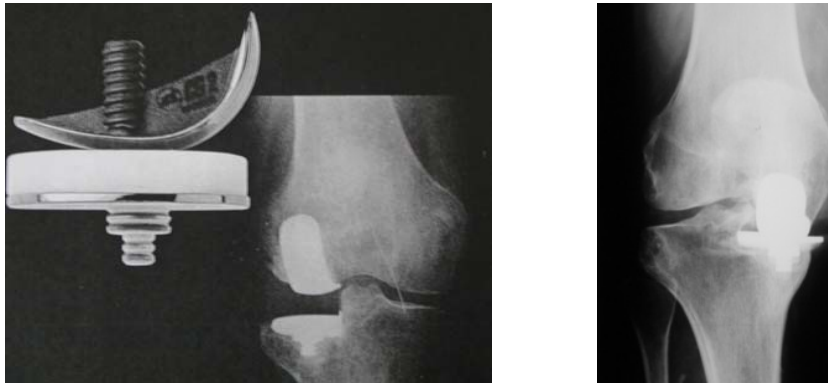


FIG. 2.1 – La prothèse de genou. A gauche : prothèse unicompartmentale avant implantation et implantée. A droite : radiographie d’une prothèse dont le plateau en polyéthylène est usé. Un contact entre le plateau tibial et le condyle est observable.

L’image de droite illustre un contact entre les deux pièces métalliques lorsque la plaque de UHMWPE est usée.

Le tableau 2.1 résume les caractéristiques des prothèses relatives aux différents échantillons prélevés ainsi que la nomenclature retenue pour cette étude. Toutes les prothèses unicompartmentales concernées par notre étude sont metal-back, elles possèdent un condyle en alliage à base de cobalt-chrome ( $P_2, P_3, P_4$ ) ou en alliage à base de titane TA6V ( $P_1, P_5$ ). Tous les plateaux tibiaux sont en alliage à base de titane TA6V, sur lesquels repose une pièce de polyéthylène. Les pièces fémorales de  $P_1$  et de  $P_5$  ont subi un traitement de surface, par implantation ionique d’azote, afin d’améliorer les caractéristiques mécaniques de l’implant [39]. La partie inférieure du plateau tibial de  $E_2$  est recouvert d’HA. Les biopsies sont prélevées préférentiellement au niveau de la poche

Echantillon	$E_1$	$E_2$	$E_3$	$E_4$	$E_5$
Prothèse	$P_1$	$P_2$	$P_3$	$P_4$	$P_5$
Tibia	TA6V cimenté sans vis	TA6V vissé sans ciment	TA6V cimenté	TA6V cimenté sans vis	TA6V cimenté sans vis
Plaque UHMWPE	fixe	-	-	fixe	fixe
Fémur	TA6V cimenté	Cr-Co-Mo cimenté	Cr-Co-Mo cimenté	Cr-Co-Mo cimenté	TA6V cimenté
Traitement surfaccique particulier	implanté à l’N (fémur)	HA face inférieure (tibia)	-	-	implanté à l’N (fémur)

TAB. 2.1 – Caractéristiques principales des cinq prothèses, relatives aux échantillons étudiés.

Ti6Al4V NF-S 90-405	Cr-Co-Mo NF-S 90-402	Cr-Co-Mo ISO 5832-12
Ti : base ~ 89%	Co : Base ~ 64%	Co : Base ~ 65%
Al : 5,5 à 6,75 %	Cr : 26,5 à 30%	Cr : 26 à 30%
V : 3,5 à 4,5 %	Mo : 4,5 à 7%	Mo : 5 à 7%
O : 0,2% max	Ni : <2,5%	Ni : <1%
N : 0,05% max	Fe : <1%	Fe : <0,75%
H : 0,015% max	C : <0,35%	C : <0,35%
Zr, Si, Mn, Cr, Mo, Fe : <0,03%	Mn : <1%	Mn : <1%
Cu,Zn : <0,05%	Si : <1%	Si : <1%

TAB. 2.2 – Composition des alliages des prothèses de genou selon les normes NF-S et ISO.

supérieure frontale de l’enveloppe synoviale. Cette zone est réputée pour accumuler l’ensemble des déchets produits au niveau de l’articulation.

## 2.2 Composition des prothèses explantées

Les prothèses de genou font l’objet d’une analyse par spectrometrie d’émission à étincelles afin de déterminer leur composition en éléments métalliques. Lors de la reprise, les implants explantés sont nettoyés et stérilisés. Ces mesures sont réalisées au laboratoire CASIMIR (Centre d’Appui et de Stimulation par les Moyens de l’Innovation et de la Recherche), à Clermont Ferrand. Le spectre d’étincelles contient les raies des différents ions métalliques de l’alliage tandis que le spectre d’arc contient celui des atomes neutres. Le tableau 2.2 donne les compositions des différents alliages concernés par notre étude pour les cinq prothèses confondues. Les teneurs moyennes en éléments métalliques sont élaborées sur cinq étincelages par implant.

Les analyses confirment que l’alliage à base de titane entrant dans la composition d’une partie des prothèses correspond à la norme NF-S 90-405. Pour des raisons de simplification, l’alliage à base de titane Ti6Al4V sera nommé TA6V tout au long de cette

TA6V	Cr-Co-Mo
$\frac{[Ti]}{[V]} = 22,5 \pm 0,5$	$\frac{[Co]}{[Cr]} = 2,45 \pm 0,35$

TAB. 2.3 – Rapports massiques des éléments majeurs des deux alliages TA6V et Cr-Co-Mo.

étude et ceux à base de cobalt Cr-Co-Mo. Les deux dernières lignes correspondent aux éléments ultra traces détectés, ces valeurs varient d'une prothèse à l'autre. Les alliages à base de cobalt et de chrome correspondent à deux normes différentes.

Les rapports massiques théoriques des alliages TA6V (Ti/V) et Cr-Co-Mo (Co/Cr) sont donnés dans le tableau 2.3. Les autres éléments, comme Al ou Mo, sont soumis à une forte absorption de la part de l'échantillon biologique et du système de détection ou ne sont pas détectés.

Deuxième partie

Les méthodes expérimentales





## Chapitre 3

# Caractérisation par faisceau de protons

L'analyse par faisceau d'ions définit l'ensemble des méthodes fondées sur l'interaction d'un faisceau de particules chargées au niveau nucléaire et atomique. La particule chargée (de l'ordre du MeV), lorsqu'elle pénètre dans la matière interagit avec les électrons et les noyaux des atomes de la cible. Les conséquences directes sont un ralentissement et une éventuelle modification de la trajectoire du faisceau. Ces interactions s'accompagnent généralement de l'émission secondaire de rayonnements caractéristiques ( $X, \gamma \dots$ ). Une analyse spectroscopique de ce rayonnement secondaire permet d'obtenir des informations sur le matériau bombardé :

- 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.

Les quatre méthodes les plus courantes sont la P.I.X.E (Particle Induced X-ray Emission), la R.B.S (Rutherford Backscattering Spectroscopy), la P.I.G.E (Particle Induced  $\gamma$ -ray Emission) et la N.R.A (Nuclear Reaction Analysis). La nature du rayonnement secondaire définit le type d'analyse. Les particules incidentes liées à ces méthodes d'analyse sont  $p, \alpha, d$ .

PIGE et NRA résultent de l'interaction des ions accélérés avec le noyau des atomes (réaction nucléaire). Les noyaux composés émettent des particules chargées (NRA) et/ou un rayonnement  $\gamma$  (PIGE). La méthode PIXE et la méthode RBS feront l'objet d'une description particulière puisque ces méthodes ont permis de caractériser nos échantillons biologiques.

### 3.1 Pouvoir d'arrêt

Une particule chargée de quelques MeV pénètre dans la matière et perd son énergie graduellement jusqu'à son arrêt complet si la cible est épaisse. La perte d'énergie est principalement due aux interactions coulombiennes inélastiques avec les électrons liés (ionisation). Le pouvoir d'arrêt  $S(E)$  ( $MeV.cm^2.g^{-1}$ ) d'un ion d'énergie  $E$  (MeV) est défini comme étant la perte d'énergie par unité de masse superficielle traversée :

$$S(E) = \frac{1}{\rho} \frac{dE}{dx} \quad (3.1)$$

avec  $\rho$  la densité de la matière traversée et  $x$  la profondeur (cm). La perte d'énergie totale est la somme de deux types de pertes : électronique et nucléaire,  $S(E) = S(E)_e + S(E)_n$ . Au dessus de 200 keV/uma, la contribution du pouvoir d'arrêt nucléaire est inférieure à 1% au pouvoir d'arrêt électronique. Les pouvoirs d'arrêt de la plupart des éléments sont disponibles à partir de mesures expérimentales ou bien par des relations semi-empiriques [40] [41].

La loi de Bragg donne le pouvoir d'arrêt total d'un matériau composé, à l'aide d'une simple loi d'additivité linéaire des pouvoirs d'arrêt élémentaires :

$$S_M(E) = \sum_{i=1}^n W_i S_i(E) \quad (3.2)$$

Où  $W_i$  est la stoechiométrie de l'élément  $i$ . Les déviations par rapport à la loi de Bragg peuvent correspondre à un écart de 10 à 20% lorsque l'on se trouve au pouvoir d'arrêt maximum. Pour tenir compte de cet effet et de l'influence de la nature physico-chimique du milieu, Ziegler et Manoyan ont développé un modèle [40].

Le parcours  $R$  d'un ion est obtenu en intégrant le pouvoir d'arrêt :

$$R = \int_{E_0}^0 \frac{dE}{S(E)} \quad (3.3)$$

$E_0$  est l'énergie de l'ion incident. Les ions sont très légèrement déviés par les électrons, on a alors une bonne estimation de leur profondeur d'arrêt. Les conditions d'analyse de nos échantillons ( $E_0 = 3$  MeV) font que le faisceau de protons peut pénétrer jusqu'à 250  $\mu m$  (tableau 7.2).

## 3.2 La méthode P.I.X.E

### 3.2.1 Principe

Cette méthode est fondée sur l'ionisation des couches internes (K, L ou M) de l'atome cible par la particule chargée. Un réarrangement électronique du cortège produit l'émission de rayonnements X, caractéristiques de l'élément ionisé (figure 3.1). Des informations sur la composition élémentaire de l'échantillon sont obtenues à partir du spectre X.

La majorité des faisceaux incidents de 1 à 4 MeV sont produits par des accélérateurs cyclotron ou Van de Graaff. Ce genre d'appareillage permet d'associer d'autres techniques (PIGE, RBS) souvent complémentaires. La méthode RBS fournit des informations relatives aux éléments légers indétectables par PIXE .

La méthode PIXE permet de récolter un grand nombre d'informations dans des domaines très variés. Des études dans le domaine de la biologie et du médical ont été

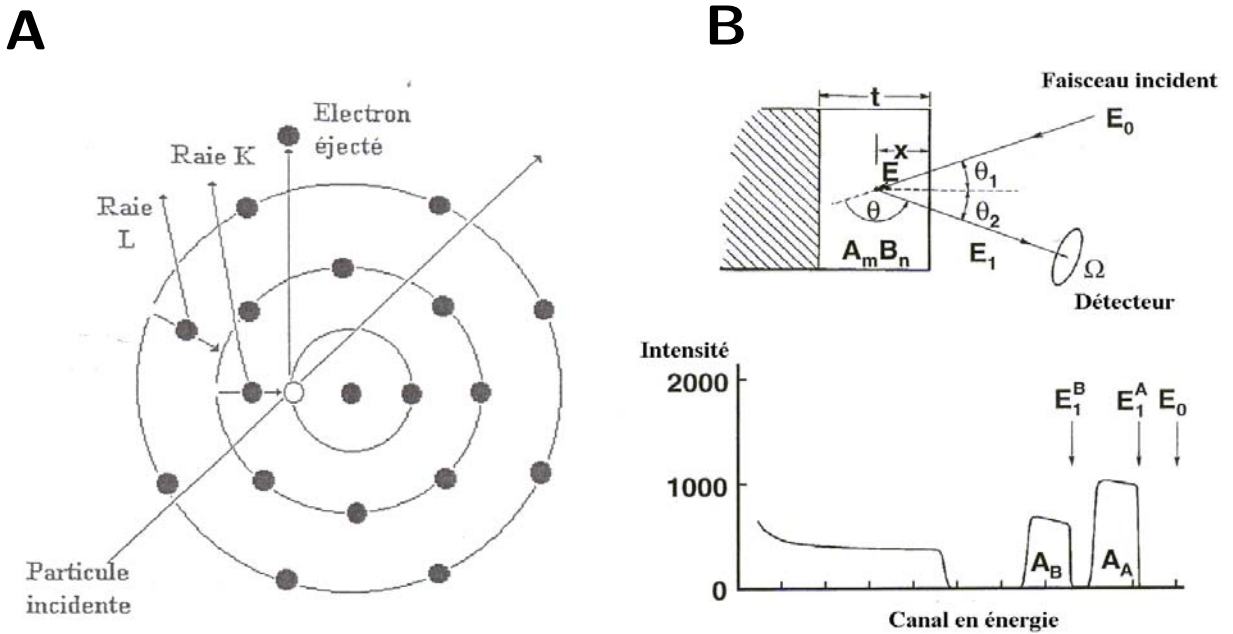


FIG. 3.1 – A : principe de la méthode P.I.X.E. B : Principe de la méthode R.B.S

réalisées [42][43] [44][45]. La méthode PIXE s'applique à toutes sortes d'échantillons [46][47][48]. La plus grande sensibilité est obtenue pour les éléments de numéro atomique compris entre 20 et 40 avec des limites de détection voisines du  $\mu g/g$ .

### Section efficace d'ionisation

L'éjection d'électrons appartenant aux couches électroniques internes (K, L, M) par la particule chargée crée une lacune électronique. Elle est comblée par un électron des couches externes et l'excédent d'énergie conduit à l'émission d'un rayonnement X (transition radiative) ou à l'émission d'un électron Auger.

Les modèles théoriques qui prédisent l'ionisation des couches atomiques profondes sont fondées sur l'interaction coulombienne entre un électron lié et un projectile chargé. Les deux particules qui interagissent sont considérées comme ponctuelles. Ces approches se limitent généralement aux protons et aux particules  $\alpha$  dans une gamme d'énergie 1 – 5 MeV. Les deux modèles les plus couramment employés sont l'approximation de Born en ondes planes PWBA (Plane Wave Born Approximation) ou l'approximation du choc binaire BEA (Binary Encounter Approximation).

La section efficace d'ionisation  $\sigma^{ion}$  décroît rapidement en fonction du numéro atomique de l'atome cible (figure 3.2). Pour une cible donnée, elle augmente en fonction de l'énergie de la particule incidente et atteint une valeur maximale lorsque la vitesse de l'ion incident est comparable à celle de l'électron sur sa couche.

La dépendance de  $\sigma^{ion}$  en  $(\frac{E}{A})^4$  en fonction de l'énergie par nucléon du projectile  $E/A$  justifie le choix des protons par rapport aux particules  $\alpha$ .

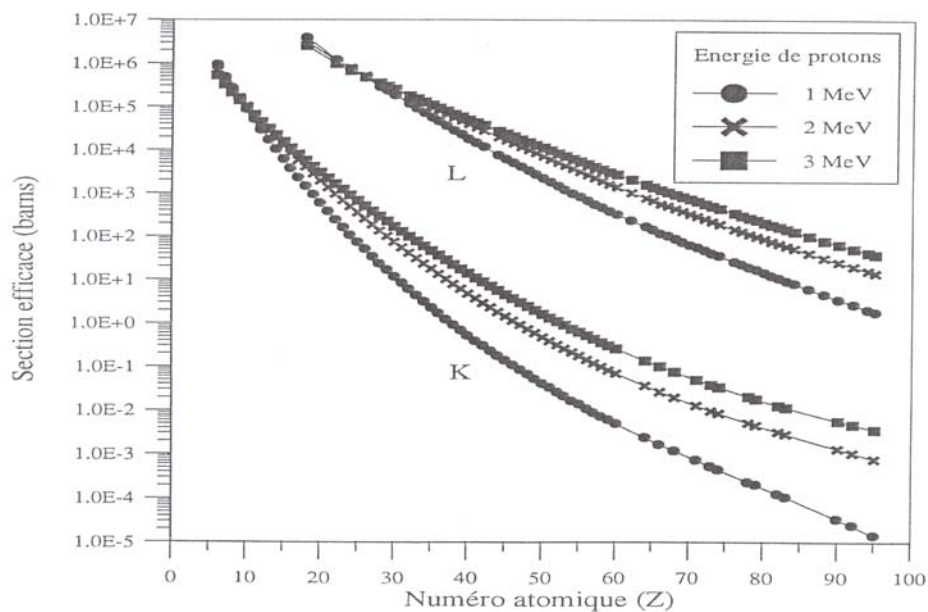


FIG. 3.2 – Sections efficaces d’ionisation (ECPSSR) des couches K et L pour des protons de 1, 2 et 3 MeV.

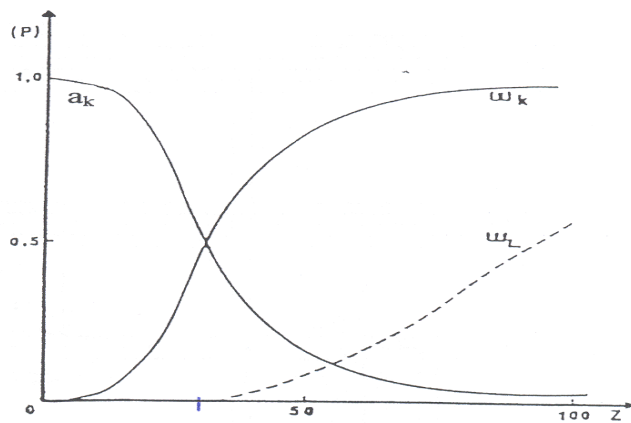


FIG. 3.3 – Variation du rendement de fluorescence  $W_k$  et  $W_L$  en fonction du numéro atomique  $Z$ . Variation du rendement de l’émission Auger  $a_K$  pour la couche K.

### Rendement de fluorescence et transitions radiatives

Le rendement de fluorescence  $\omega$  est la probabilité pour qu’une lacune créée dans une couche donne lieu à l’émission d’un rayon X. La figure 3.3 suivante montre la variation de  $\omega$  en fonction du numéro atomique  $Z$  pour les niveaux K et L, ainsi que la variation du rendement Auger pour les couches K. La probabilité d’avoir un effet Auger augmente avec la diminution de la différence entre les états d’énergie correspondants et est maximale pour les éléments de  $Z$  petits.

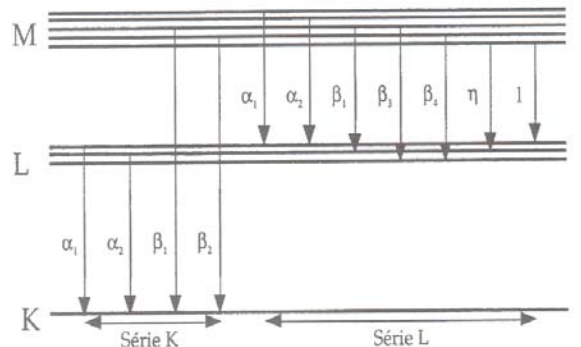


FIG. 3.4 – Diagramme d'énergie des transitions X

La figure 3.4 montre le diagramme de niveau avec les transitions permises.

### Sensibilité

La figure 3.5 représente les limites de détection de la méthode P.I.X.E dans un diagramme (Z,E) dans une matrice de carbone [49]. La plus grande sensibilité est obtenue pour des numéros atomiques  $20 < Z < 30$ , comprenant une majorité d'éléments métalliques (Ti, V, Cr, Fe, Co, Cu ...). L'énergie optimale de mesure simultanée des éléments légers et lourds se situe autour de 2 MeV. La sensibilité des mesures ne dépend pas uniquement des sections efficaces. L'efficacité de détection, la composition de la matrice en éléments majeurs et le bruit de fond influencent la sensibilité.

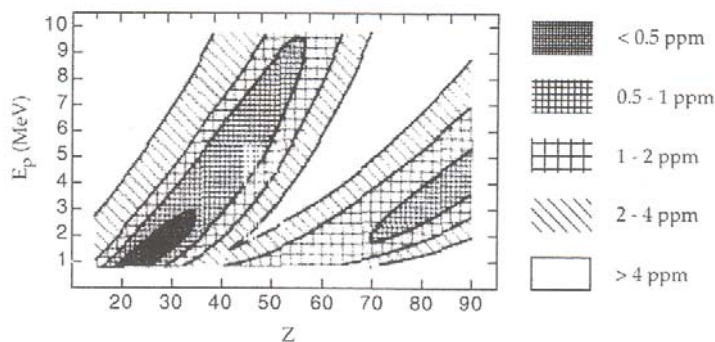


FIG. 3.5 – Limites de détection (ppm) en fonction de l'énergie incidente des protons et du numéro atomique des éléments analysés, pour une matrice de carbone cible mince [49].

## Le bruit de fond

La sensibilité de la méthode P.I.X.E est liée au bruit de fond. Il provient du Bremsstrahlung (rayonnement de freinage) des protons incidents, du Bremsstrahlung des électrons secondaires et des rayons gamma. Le bruit de fond prépondérant en P.I.X.E est dû au ralentissement des électrons secondaires dans la cible [50].

Ce rayonnement présente une distribution qui s'étale de zéro jusqu'à l'énergie cinétique initiale des projectiles incidents. L'intensité du rayonnement de freinage est proportionnelle au carré de l'accélération  $(\frac{F}{m})^2$  en termes classiques. F est la force électrique et m la masse du projectile. L'intensité du Bremsstrahlung produite par les protons est en première approximation  $(1836)^2$  fois moins intense que celle du Bremsstrahlung produit par les électrons.

Les électrons secondaires produisent un rayonnement continu de basse énergie, qui s'étend jusqu'au voisinage de l'énergie maximale transférée  $T_m$  par la particule chargée incidente d'énergie E à l'électron.

$$T_m = \frac{4 m E}{M} \quad (3.4)$$

avec m masse de l'électron et M masse du projectile. Pour une énergie de protons de 3 MeV la valeur de  $T_m$  est de 6,5 keV. Ce rayonnement diminue rapidement au delà de  $T_m$  mais reste la contribution prépondérante de l'émission continue aux énergies inférieures à  $T_m$  [51]. De plus, il a une distribution anisotrope. Lorsque le détecteur est placé à  $135^\circ$  au lieu de  $40^\circ$ , l'intensité du bremsstrahlung aux basses énergies est réduite de 40% [52].

Les protons de quelques MeV par nucléon provoquent des réactions nucléaires (réactions  $(p, \gamma)$ ) aussi bien le long du faisceau que dans la cible. Des collimateurs en éléments lourds minimisent la première source de  $\gamma$ , l'autre est intrinsèque à l'échantillon. Ces  $\gamma$  engendrent un fond continu dans le détecteur suite à leur diffusion Compton. Toutefois, pour des protons d'énergie supérieure à 3 MeV, cette émission devient plus importante que le rayonnement de freinage des électrons secondaires pour une énergie supérieure à 15 keV.

## Facteurs instrumentaux

Certains facteurs instrumentaux peuvent nuire à la qualité du spectre X :

- la collection incomplète des charges dans la zone morte du détecteur et la présence d'électrons Auger entraînent l'apparition d'un bruit de fond de quelques centaines d'eV avant les raies  $K_\alpha$  et  $K_\beta$  de chaque élément. Il est difficile de détecter des éléments traces dont le numéro atomique est inférieur à celui d'un élément majeur.
- des réactions nucléaires, avec émission de photons  $\gamma$ , entre les protons rétrodiffusés par la cible et les éléments du filtre ou de la fenêtre d'entrée créent un bruit de fond suite à la diffusion Compton des  $\gamma$  dans le détecteur. Des filtres en Al augmentent ce type de bruit avec la réaction  $Al(p, \gamma)$ . Les filtres en mylar sont alors préférés aux filtres en aluminium.

- les pics “somme” apparaissent pour des taux de comptage élevés. Le système de détection ne peut distinguer deux impulsions provenant de photons d’un même élément, en concentration importante. Ce phénomène d’empilement entraîne une augmentation du bruit de fond et une diminution de l’intensité du rayonnement caractéristique à l’origine de l’empilement. Les filtres en Al par exemple, permettent d’atténuer fortement la partie basse énergie du spectre de rayons X et de réduire les effets d’empilement. Les filtres Be permettent d’éviter que les protons rétro-diffusés atteignent le détecteur. Des filtres spéciaux en Al (“funny filter”) placés devant le détecteur réduisent le flux de photons X des éléments majeurs tout en permettant la détection des éléments traces dont les photons X sont transmis par le trou central du filtre. Ce type de filtre permet l’analyse simultanée des éléments lourds et légers.
- le pic d’échappement des rayons X du silicium et du germanium, suite aux interactions photoélectriques près de la surface du détecteur.

### Caractéristiques de la méthode nucléaire P.I.X.E

La technique d’analyse P.I.X.E possède de nombreux avantages :

- une bonne sensibilité avec les échantillons minces [49].
- c’est une méthode d’analyse multiélémentaire qui permet d’analyser simultanément les éléments de numéro atomique  $> 11$ .
- elle peut être associée à d’autres techniques (P.I.G.E, N.R.A, R.B.S . . .)
- la faible contribution au bruit de fond des particules incidentes améliore considérablement la sensibilité, en comparaison par exemple avec l’analyse en spectroscopie X à l’aide d’un faisceau d’électrons.
- elle est non destructive.
- les conditions expérimentales (taille, intensité du faisceau . . . , faisceau externe) permettent d’étudier différents types d’échantillons.

### 3.2.2 Analyse quantitative

#### Expression de l’intensité d’une raie caractéristique d’un élément

Si l’on considère qu’un échantillon est irradié par un faisceau de protons monochromatiques d’énergie  $E_0$ , que l’échantillon est homogène et de surface lisse, alors l’intensité d’une raie  $K_\alpha$  d’un élément  $i$  présent dans une couche d’épaisseur  $\rho \cdot dx$  ( $g/cm^2$ ) est donnée par :

$$dI_i = N_p \sigma_i(E) \frac{N_A}{M} c_i \rho dx \quad (3.5)$$

Où  $E$  est l’énergie des particules incidentes à la profondeur  $x$ ,  $N_p$  est le nombre de protons incidents,  $N_A$  est le nombre d’Avogadro,  $M$  la masse atomique (g),  $\rho$  la masse volumique ( $g/cm^3$ ),  $c_i$  la concentration massique de l’élément  $i$  dans l’échantillon.

$$\sigma_i(E) = \sigma_{ion}(E) \omega P_{K_\alpha} \quad (3.6)$$

$\sigma_{ion}(E)$  est la section efficace d’ionisation ( $cm^2$ ) du niveau K de l’élément  $i$  à l’énergie  $E$ ,  $\omega$  est le rendement de fluorescence de la couche K de l’élément  $i$  considéré et  $P_{K_\alpha}$  la



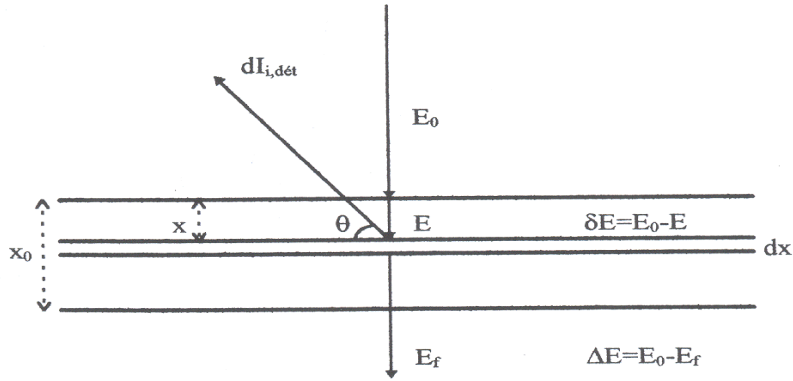


FIG. 3.6 – Représentation des paramètres intervenant pour le calcul de l'intensité mesurée.

probabilité de transition  $K_\alpha$ .

Le nombre de protons reçus par l'échantillon est déterminé par  $N_p = \frac{Q}{e}$  avec  $Q$  charge totale déposée sur l'échantillon et  $+e$  la charge du proton. Le nombre de photons X émis dans la couche d'épaisseur  $dx$  devient :

$$dI_i = \frac{\rho}{e} Q \sigma_i(E) \frac{N_A}{M} c_i dx \quad (3.7)$$

Seule une partie des rayons X émis sont récoltés par le détecteur et contribuent à l'intensité détectée à un angle  $\theta$  :

$$dI_{i,det} = dI_i \epsilon \eta \frac{d\Omega}{4\pi} \exp\left(\frac{-\mu x}{\sin\theta}\right) \quad (3.8)$$

Avec  $d\Omega$  angle solide de détection,  $\theta$  angle de détection des rayons X,  $\epsilon$  efficacité du détecteur,  $\eta$  facteur de transmission qui tient compte de l'absorption par le milieu situé entre la surface de l'échantillon et le détecteur (air, fenêtre ...), le terme exponentiel tient compte de l'atténuation des photons par la cible pour un angle  $\theta$  avec  $\mu$  le coefficient d'atténuation massique de l'échantillon pour l'énergie de la radiation caractéristique  $K_\alpha$  de l'élément (figure 3.6). En regroupant les équations 3.7 et 3.8, l'intensité détectée s'exprime de la manière suivante :

$$dI_{i,det} = A Q \sigma_i(E) c_i \exp\left(\frac{-\mu x}{\sin\theta}\right) dx$$

$$\text{avec } A = 6,242 \cdot 10^{12} \frac{d\Omega}{4\pi} \epsilon \eta \frac{N_A}{M} \quad (3.9)$$

$A$  est un facteur constant, pour la radiation détectée, tenant compte de la géométrie de détection, de l'efficacité du détecteur et de la masse atomique de la cible.

Par intégration de la relation 3.9, on obtient l'intensité mesurée

$$I_i = \int_0^{x_0} dI_{i,det} = A Q c_i \int_0^{x_0} \sigma_i(E) \exp\left(\frac{-\mu x}{\sin\theta}\right) dx$$

avec  $S(E) = -\frac{dE}{dx}$  et  $T(E) = \exp\left(-\frac{\mu \int_{E_0}^E \frac{dE}{S(E)}}{\sin\theta}\right)$  (3.10)

$$I = A Q c_i \int_{E_0}^{E_f} \frac{\sigma_i(E) T(E)}{S(E)} dE$$
 (3.11)

S(E) et T(E) sont respectivement le pouvoir d'arrêt en  $MeV.cm^2.g^{-1}$  et le terme de transmission des protons dans la cible. Les formules 3.10 et 3.11 montrent que l'intensité détectée est fortement influencée par l'épaisseur de l'échantillon.

### Comportement de l'intensité en fonction de l'épaisseur

La figure 3.7 présente les variations de l'intensité mesurée, des photons X d'un élément, en fonction de la masse superficielle de l'échantillon. Les trois principaux effets de matrice sont la perte d'énergie des particules lors du ralentissement dans la matrice avec une variation de la section efficace d'ionisation, l'auto absorption dans la cible du rayonnement X émis et les effets d'irrégularité de surface.

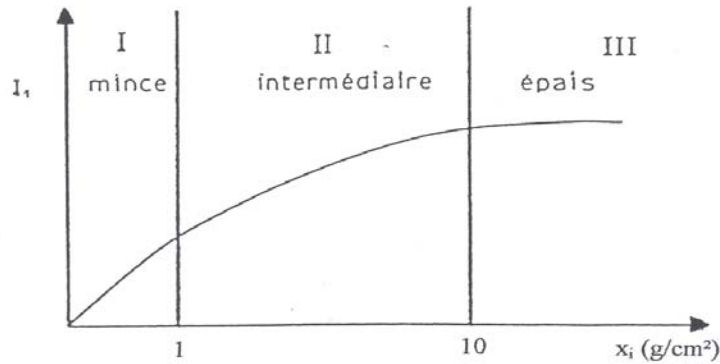


FIG. 3.7 – Variation de l'intensité mesurée suivant la masse superficielle de l'échantillon.

Lorsque la fluorescence X d'un élément  $i$  est proportionnelle à la masse superficielle  $x_i$  de l'échantillon, les effets de matrice sont négligeables et l'échantillon est considéré comme mince. Les effets d'absorption sont insignifiants et  $T(E)=1$ . Les effets du ralentissement des protons sont minimales :  $E_f=E_0$  et  $\sigma_i$  constante. L'équation de l'intensité devient :

$$I_i = A Q \sigma_i(E_0) c_i x_t \quad \text{avec} \quad c_i = \frac{x_i}{x_t}$$

$$I_i = A Q \sigma_i(E_0) x_i$$
 (3.12)

$x_t$  est la masse superficielle totale de l'échantillon et  $x_i$  la masse superficielle de l'élément  $i$  dans l'échantillon.

Un échantillon est mince quand sa masse superficielle est inférieure au  $mg/cm^2$ . Nos cibles biologiques (H, C, N, O) déposées sur formvar répondent à ce critère.

Un échantillon est considéré d'épaisseur intermédiaire si le faisceau de protons incident n'est pas totalement absorbé. L'intensité est croissante mais de façon non linéaire.

Les échantillons épais correspondent aux cibles où le faisceau de protons est totalement arrêté ( $E_f = 0$ ) par la matrice. Les corrections dues aux effets de matrice sont maximales. La perte d'énergie conduit à une variation de la section efficace d'ionisation et une partie du rayonnement est absorbée. L'équation de l'intensité est équivalente à l'équation 3.11 en remplaçant  $E_f$  par 0.

### 3.2.3 Calcul des concentrations avec le logiciel GUPIX

#### Procédure d'ajustement

Nous avons utilisé le logiciel GUPIX, développé à l'Université de Guelph, au Canada par Maxwell et Campbell [53]. Le principe de traitement des spectres X est fondé sur la comparaison entre un spectre théorique ( $M_j$ ) avec le spectre expérimental ( $Y_j$ ) contenant  $j$  pics, selon une procédure d'ajustement des moindres carrés non-linéaires développée par Marquardt [54].

$$\chi^2 = \sum_j (Y_j - M_j)^2 \cdot W_j \quad (3.13)$$

Le procédé d'ajustement consiste en la minimisation de la valeur  $\chi^2$  (degré de liberté) où  $W_j$  est le poids de chaque canal du spectre.

Une analyse qualitative du spectre expérimental fournit un certain nombre de renseignements nécessaires à l'élaboration du spectre théorique. Afin de limiter le nombre de variables dans la procédure d'ajustement, la calibration du spectre expérimental en énergie de chaque raie est décrite par la relation suivante :

$$c(E) = a_1 + a_2E + a_3E^2 \quad (3.14)$$

$c$  est le canal central du pic du spectre et  $E$  l'énergie du photon. Le paramètre  $a_3$  est mis par défaut à zéro. Pour de nombreux matériaux les éléments majeurs sont des éléments de faible numéro atomique (Si, Ca, P, ...) dont les spectres d'émission X présentent des raies intenses dans le domaine des faibles énergies. Les paramètres  $a_1$  et  $a_2$  sont déterminés principalement à partir des positions des pics intenses de la matrice afin de calibrer en énergie l'ensemble du spectre de raies d'émission. Toutefois, des phénomènes de distorsion au niveau de l'électronique du système d'acquisition peuvent induire une non linéarité entre le canal et l'énergie sur l'ensemble du spectre étudié. L'introduction du paramètre  $a_3$  non nul tient compte de cet effet et permet la calibration en énergie d'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 :

$$\sigma(E) = \sqrt{a_4 + a_5E} \quad (3.15)$$

Les paramètres  $a_4$  et  $a_5$  caractérisent la largeur des pics.

GUPIX introduit un filtre numérique qui élimine la contribution du fond continu. Il fonctionne comme un filtre passe-bande en filtrant les basses fréquences (continuum) au profit des hautes fréquences (les pics). C'est une fonction symétrique (n,m,n) où m correspond à la largeur à mi-hauteur des pics (Full-Width at Half-Maximum) et n à la moitié de m. Appliqué au spectre, ce filtre modifie la forme du pic gaussien et élimine le fond supposé linéaire de part et d'autre du pic [55].

L'analyse qualitative du spectre permet la construction d'un spectre théorique sur la base des énergies, des intensités relatives des raies K, L, et M. Il prend en compte les effets de matrice comme la fluorescence secondaire, l'absorption des filtres et l'efficacité du détecteur.

### Calcul des concentrations

L'intensité mesurée  $I_Z$  du rayonnement caractéristique est donnée par la formule suivante :

$$I_Z = \Omega Q C_Z \epsilon_Z T_Z M_Z \quad (3.16)$$

où  $M_Z$  est l'intensité théorique calculée par unité de concentration, par stéradian et par  $\mu C$ .  $Q$  est la charge mesurée.  $\epsilon_Z$  est l'efficacité de détection.  $T_Z$  est la transmission des filtres interposés entre la cible et le détecteur.  $\Omega$  est l'angle solide en stéradian.  $C_Z$  est la concentration de l'élément de numéro atomique Z. La relation 3.16 permet un calcul de la concentration, après avoir mesuré l'aire sous le pic et calculé l'intensité théorique à l'aide des bases de données.

L'indication des différents paramètres instrumentaux associée à la procédure d'ajustement donne les concentrations des éléments présents dans l'échantillon.

### Calcul des erreurs

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

$$\sigma_N^2 = \sigma_B^2 + \sigma_P^2 + \sigma_O^2 \quad (3.17)$$

P est le nombre d'impulsions sous le pic sans bruit de fond. B est le nombre d'impulsions du bruit de fond.  $N=P+B+O$  est le nombre d'impulsions totales. O est le nombre d'impulsions compris dans l'aire de la partie chevauchée par le pic considéré avec un pic voisin.

Le nombre d'impulsions reçues dans le détecteur suit une loi statistique de Poisson. L'erreur totale est estimée par  $\sqrt{N+B} = \sqrt{P+O+2B}$ . L'erreur statistique relative en % est :

$$\text{Erreur statistique en \%} = 100 \cdot \frac{\sqrt{P+O+2B}}{P} \quad (3.18)$$

GUPIX estime les erreurs associées aux paramètres physiques de la base de données ainsi que l'erreur de modélisation ou d'ajustement. L'utilisateur doit ajouter les erreurs sur la charge et sur l'angle solide qui ne sont pas prises en compte par le logiciel. Dans nos expériences, ces erreurs sont fixées à 5% chacune et additionnées de façon quadratique avec les erreurs de fit et de statistique.

### Limite de détection

Le critère pour que l'intensité d'un pic caractéristique  $N_P$  soit significative par rapport au bruit de fond est telle que :

$$N_P \geq 3 \sqrt{N_B} \quad (3.19)$$

soit trois fois supérieure à l'écart type de la moyenne estimée du fond continu. La limite de détection (notée LOD : Limit Of Detection) est définie par :

$$LOD = \frac{3\sqrt{N_B}}{N_{Tem}} \quad (3.20)$$

où  $N_{Tem}$  est l'intensité calculée de l'élément analysé, dans l'échantillon de référence. Cette intensité est calculée par GUPIX qui utilise l'équation suivante :

$$LOD (ppm) = \frac{3 \sigma}{Q H M_Z \epsilon_Z T_Z} \quad (3.21)$$

où  $\sigma$  est la déviation standard liée à B et O. La limite statistique de détection dépend de l'émission continue et du chevauchement des pics. L'application d'un filtre diminuant l'intensité du rayonnement analysé joue un rôle important dans la limite de détection. De manière générale, 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.

### Calibration instrumentale

La méthode analytique quantitative P.I.X.E est absolue [49]. Le logiciel GUPIX remplace l'angle solide de l'équation 3.16 par un paramètre instrumental H. Théoriquement, H correspond à  $\Omega$ , ( $H \sim \Omega = \frac{S}{d^2}$ ) avec S surface du détecteur et d distance cible détecteur. En pratique, ce paramètre dépend de l'énergie, à cause des incertitudes sur les bases de données, la calibration de la charge déposée et de la description, plus ou moins juste du détecteur et des filtres [56]. L'introduction de ce paramètre se traduit au niveau de l'équation du calcul de la concentration par l'apparition de l'efficacité intrinsèque du détecteur et non plus l'efficacité de détection. La mauvaise connaissance du filtre (diamètre du trou, épaisseur ...), de la distance cible-détecteur, et par conséquent la mauvaise simulation du filtre par le logiciel obligent l'utilisateur à analyser des standards pour tenir compte de ces effets qui sont inclus dans le paramètre H.  $T_Z$  étant le facteur de transmission nominale des filtres, H devient  $(S/d_r^2)(T_r/T_{nominal})$ , avec  $d_r$ ,  $T_r$  distance et transmission réelle en relation aux vraies caractéristiques du filtre [56].

$$I_Z = H Q C_Z \epsilon_Z^i T_Z M_Z \quad (3.22)$$

Les standards doivent rendre compte des énergies propres à l'étude des échantillons. A chaque nouvelle expérience, dans le cadre de nos mesures, un standard est analysé afin de tenir compte des modifications éventuelles des conditions expérimentales.

L'emploi de filtre est courant afin d'atténuer la contribution des éléments majeurs et du fond de faible énergie. Pour ce genre de filtre, le paramètre  $H$  est constant. Un filtre d'Al de  $100 \mu m$  absorbe les photons X caractéristiques des éléments les plus légers jusqu'au Ti [57].

L'analyse simultanée des éléments lourds et légers requiert un "funny filter". La variation de la constante instrumentale  $H$  avec l'emploi de "funny filter" selon l'énergie s'explique par une insuffisante connaissance des différents paramètres géométriques de la détection : distance entre le détecteur et la cible, épaisseur des filtres placés devant le détecteur et le diamètre du trou du "funny filter" [57].

S.Gama [56] a réalisé une étude sur l'influence de la variation des paramètres ( $d$ ,  $t_{be}$ ,  $t_{Al}$ ,  $\phi$ ) par rapport à leur valeur nominale, sur la valeur de  $H$ .  $d$  est la distance cible détecteur,  $t_{be}$  et  $t_{Al}$  sont respectivement l'épaisseur de béryllium et d'aluminium du filtre,  $\phi$  est le diamètre du trou des "funny filter" utilisés lors de nos expériences réalisées au CERI. Ainsi, une diminution de l'épaisseur de Be entraîne une augmentation de  $H$  pour des énergies inférieures à 3 keV. Une augmentation de l'épaisseur d'aluminium par rapport à la valeur nominale affecte le paramètre  $H$  seulement pour des énergies comprises entre 4 et 8 keV. L'augmentation du diamètre du trou influence  $H$  en dessous d'une énergie de 4 keV. La plupart des éléments métalliques de nos échantillons se trouvent entre 4 et 10 keV.

La calibration de  $H$  est réalisée pour tous les éléments que nous recherchons grâce à des standards : standard 620 du National Bureau of Standard (NBS) et standard 4732 conçu par Agar scientific pour les mesures réalisées au CENBG et au CERI. L'évolution du paramètre  $H$  est illustrée sur la figure 3.8, à partir d'une certaine énergie autour de 4 keV, la valeur de  $H$  est constante et proche de l'angle solide du détecteur.

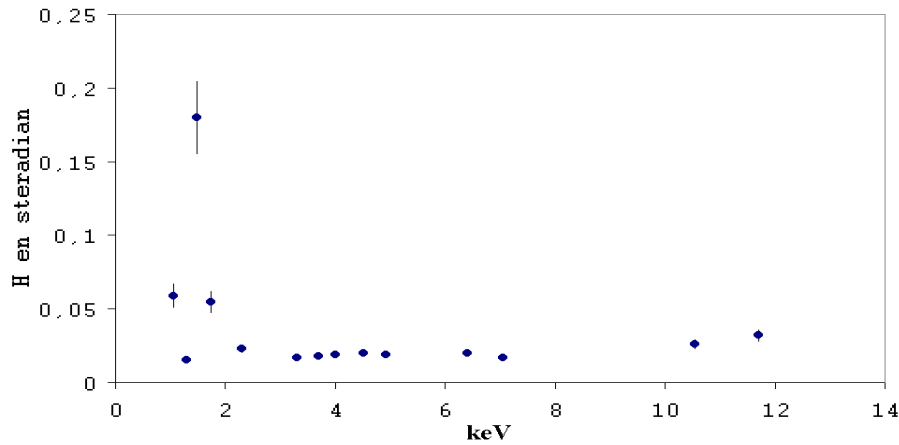


FIG. 3.8 – Valeur du paramètre expérimental  $H$  en fonction de l'énergie des photons X émis

## 3.3 Dispositif expérimental

### 3.3.1 Microsonde nucléaire du C.E.N.B.G : Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan

La ligne micro-faisceau est implantée auprès d'un accélérateur électrostatique de type Van de Graaff de 4 MV. C'est un accélérateur de type vertical et à simple étage.

Le diamètre du faisceau peut atteindre 5 à 1  $\mu m$  pour un diaphragme objet variant de 50 à 10  $\mu m$ . Un système de déflexion électrostatique, localisé après le système optique, permet au faisceau de balayer la surface de la cible. Chaque déviation horizontale ou verticale est obtenue à l'aide d'une paire de plaques.

Les photons X sont détectés à l'aide d'un détecteur Si(Li) placé dans la chambre à  $135^\circ$  du faisceau dans le plan horizontal. Le cristal présente une surface de 50  $mm^2$  et une épaisseur de 3 mm. Ce détecteur est équipé d'une fenêtre de béryllium de 8  $\mu m$  d'épaisseur. La détection des particules rétrodiffusées (RBS) est réalisée par un détecteur silicium de surface 20  $mm^2$  et disposé à  $135^\circ$  par rapport à l'axe du faisceau.

Le porte-échantillon est monté sur des platines à déplacement micrométrique de précision proche du  $\mu m$ . Il est orientable suivant les 3 axes Ox, Oy, Oz de manière à positionner, la cible sous le faisceau. Deux microscopes (Gx40 et Gx100) servent à visualiser l'échantillon et à régler la focalisation du faisceau.

Les données collectées sont les énergies détectées et la position du faisceau sur la cible.

Le balayage se fait point par point, de gauche à droite, à partir d'un point d'origine. Il est réalisé en une succession de lignes horizontales et en "zigzag". Deux lignes sont séparées par un pas en Y et deux points par un pas en X. Le nombre et la valeur des pas en X et Y définissent la taille de la zone balayée. Le nombre de pas est limité à 128 ou 256 selon la résolution requise. Chaque événement recensé pendant l'acquisition est associé à une énergie (E) et à une position (x,y) de manière à pouvoir construire le spectre en énergie ou les cartographies élémentaires.

Les événements (E,x,y) détectés sont sauvegardés régulièrement sous forme de fichier de 4 Mo sur le disque dur du système. Pendant l'analyse, chaque événement détecté est trié de manière à incrémenter le spectre en énergie et la cartographie correspondante.

Un logiciel développé par l'équipe microsonde du CENBG sélectionne une plage de canaux au niveau des spectres X et RBS et construit la cartographie correspondante. Il est possible d'extraire les spectres X et RBS d'une zone sélectionnée à partir d'une cartographie initiale. Les spectres X sont dépouillés à l'aide du logiciel GUPIX et les spectres RBS à l'aide des logiciels RUMP ou RUMPIN. La charge déposée sur la cible est déduite à partir des spectres RBS. La surface de balayage est choisie en fonction de la zone d'intérêt.

L'énergie du faisceau est de 3 MeV. Suivant le contexte d'analyse, l'intensité, le diamètre du faisceau ainsi que le filtre devant le détecteur changent. Un filtre de carbone de 500  $\mu m$  d'épaisseur réduit le taux de comptage des éléments légers et diminue le temps mort. Un "funny filter" carbone de 100  $\mu m$  assure la détection des éléments légers

comme l'aluminium par exemple. Le diamètre du faisceau est de l'ordre du  $\mu m$ . Dans le cadre des analyses des coupes dédiées à l'histologie, un courant d'intensité compris entre 100 et 200  $pA$  est employé.

### 3.3.2 Microsonde nucléaire du C.E.R.I : Centre d'Etudes et de Recherches par Irradiation d'Orléans

L'accélérateur du CERI est aussi de type Van de Graaff possédant plusieurs lignes d'analyse. La tension maximale est de l'ordre de 3200 kV. Une fente d'analyse sélectionne l'énergie des ions avec une précision de 1/1000. Sur la voie destinée à la micro-sonde, le faisceau traverse les fentes objets, les fentes collimatrices et le système quadripolaire.

La chambre d'analyse en dural possède huit entrées-sorties situées dans le même plan horizontal. Une entrée est consacrée à l'arrivée du faisceau, une au détecteur placé à  $45^\circ$  du faisceau incident, une pour le porte échantillons, une à l'éclairage en transmission de l'échantillon, les autres sont destinées au pompage, à la mise à l'air et à la mesure du vide. Le porte échantillon horizontal, peut recevoir cinq cibles et se déplacer dans les trois dimensions de l'espace à l'aide d'un moteur pas à pas. Un logiciel WINPIXE développé par l'équipe d'électroniciens du CERI assure le déplacement du porte échantillon et la mesure de la taille et de la position du faisceau. La cible est visualisée à l'aide d'un endoscope (Gx250).

Le détecteur Si(Li) possède une fenêtre de Be d'épaisseur 8  $\mu m$  environ, la surface active est de 30  $mm^2$  et sa résolution est de 145 eV à 6 keV. Un filtre sépare le détecteur de la cible. Il consiste en la superposition de deux filtres, un en béryllium d'épaisseur 135  $\mu m$  et un en aluminium dont l'épaisseur est variable (100, 200, 300  $\mu m$ ). La partie en aluminium peut posséder un trou de diamètre 0,5 mm ("funny filter") ou non.

Les conditions d'irradiations : un faisceau de proton défocalisé de 3 MeV dont le diamètre est proche de la centaine de microns et d'intensité voisine de 1 nA.

## 3.4 Caractérisation par rétrodiffusion R.B.S

### 3.4.1 Considérations générales

La méthode est fondée sur les interactions coulombiennes entre les noyaux atomiques. Elle consiste à mesurer le nombre et l'énergie des ions d'un faisceau qui sont rétrodiffusés après interaction avec les noyaux de l'échantillon (figure 3.1).

Cette méthode d'analyse, couplée à la P.I.X.E, détermine la charge déposée sur la cible. En outre, elle caractérise les éléments majeurs et légers constituant nos échantillons biologiques et évalue les dégâts d'irradiation.

La connaissance des pouvoirs d'arrêt des particules  $H^+$  et  $He^+$  avec une grande précision fournit une méthode puissante pour déterminer des profils d'éléments en profondeur [58]. La résolution typique est de l'ordre de 20  $nm$ . Elle offre une sensibilité de l'ordre du ppm pour certains éléments lourds dans des matrices légères. La résolution massique de 1 uma (unité de masse atomique) distingue des isotopes de masses moyennes (60 uma).



La méthode R.B.S peut être combinée à d'autres techniques d'analyse faisant appel aux faisceaux d'ions comme la P.I.X.E (Particule Induced X-Ray Emission) ou N.R.A (Nuclear Reaction Analysis) et à d'autres méthodes comme la diffraction des rayons X, la microscopie électronique . . . La meilleure résolution massique, une bonne sensibilité et une bonne résolution spatiale sont obtenues pour des ions lourds de l'ordre du MeV. La simulation des spectres à l'aide de logiciels rend les interprétations plus faciles [41].

### 3.4.2 Principe

#### Le facteur cinématique

La spectrométrie de rétrodiffusion utilisant des faisceaux d'énergie au voisinage du MeV est utilisée pour déterminer la composition stoechiométrique, la densité surfacique ou la distribution des impuretés des cibles. La détermination d'un élément  $i$  d'un échantillon se fait en mesurant l'énergie initiale de rétrodiffusion des particules incidentes.

$$K_i = \frac{E_i}{E_0} \quad (3.23)$$

$K_i$  représente le facteur cinématique pour le  $i^{eme}$  élément constituant la cible et  $E_0$  est l'énergie cinétique de la particule incidente dans le référentiel du laboratoire.

Le facteur cinématique est lié à la perte d'énergie de la particule incidente dans un choc classique entre particules qui échangent de l'énergie. L'expression du facteur cinématique est donnée par :

$$K = \left[ \frac{(M_2^2 - M_1^2 \sin^2 \theta)^{\frac{1}{2}} + M_1 \cos \theta}{M_1 + M_2} \right]^2 \quad (3.24)$$

$\theta$  représente l'angle de rétrodiffusion de la particule incidente,  $M_1$  et  $M_2$  sont respectivement la masse de la particule incidente et de la cible. Les paramètres  $E_0$ ,  $\theta$ ,  $M_1$  étant connus, on identifie les différents éléments constituant la cible.  $K$  dépend seulement de l'angle de diffusion et non 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  $180^\circ$ . Cette diffusion n'est possible que pour des ions incidents plus légers que les noyaux cibles.

La densité surfacique  $(Nt)_i$  en nombre d'atomes par unité de surface d'un élément  $i$ , nécessite la connaissance de l'angle solide  $\Omega$ , du nombre d'impulsions sous le pic  $A_i$ , du nombre d'ions incidents, de la section efficace de rétrodiffusion  $\sigma_i(E, \theta)$  et s'exprime sous incidence normale :

$$(Nt)_i = \frac{A_i}{Q \cdot \Omega \cdot \sigma_i(E, \theta)} \quad (3.25)$$

$N_i$  est la densité atomique (atome par unité de volume) de l'élément  $i$  et  $t$  l'épaisseur de la cible.

## Section efficace

La section efficace de diffusion élastique, lorsque  $M_1 \ll M_2$  et  $\theta$  est proche de  $180^\circ$ ,  $M_1$  et  $M_2$  sont les masses respectives du projectile et de la cible,  $\theta$  angle de diffusion montre qu'elle est :

- proportionnelle au carré du numéro atomique  $Z_1^2$  du projectile. La section efficace Rutherford est quatre fois plus intense avec une particule alpha qu'avec un proton.
- proportionnelle au carré du numéro atomique  $Z_2^2$  de l'atome cible. Quel que soit le projectile, les atomes lourds sont meilleurs diffuseurs que les légers.
- inversement proportionnelle au carré de l'énergie de la particule incidente. La section efficace Rutherford augmente rapidement lorsque l'énergie diminue.
- une fonction de  $\theta$  et inversement proportionnelle à  $\sin(\theta/2)^4$ . Lorsque l'angle de diffusion diminue, la section efficace Rutherford augmente.

Les mesures expérimentales indiquent que les sections efficaces s'écartent parfois à haute et basse énergies du comportement Rutherford décrit précédemment. Ces effets ont été estimés et corrigés afin d'établir des relations entre les sections efficaces Rutherford et non Rutherford. L'avantage des sections efficaces non Rutherford est leur utilisation dans l'amélioration de l'estimation des rapports stoechiométriques et l'augmentation de la sensibilité des éléments légers dans des matrices lourdes [59].

La stoechiométrie relative moyenne entre deux éléments A et B appartenant à la même cible est estimée de la manière suivante :

$$\frac{n}{m} = \frac{N_B}{N_A} = \frac{A_B}{A_A} \cdot \frac{\sigma_A(E, \theta)}{\sigma_B(E, \theta)} \quad (3.26)$$

### 3.4.3 Code de simulation

Une approche, en spectrométrie de rétrodiffusion, est de diviser la cible en couche mince pour faciliter son intégration numérique. Ce calcul implique un échantillon contenant plusieurs couches, chacune d'elles contenant plusieurs éléments. Les programmes de calcul des densités surfaciques tiennent compte des propagations des erreurs à partir des données expérimentales obtenues, afin d'obtenir une incertitude raisonnable sur les résultats des densités surfaciques et la stoechiométrie.

Les coupes de tissus biologiques présentent des distributions spatiales de masse surfacique très hétérogènes [60]. Cette hétérogénéité peut fausser le calcul des concentrations obtenues par la méthode P.I.X.E. La variation locale de l'épaisseur de la cible modifie l'intensité des rayons X émis par des phénomènes d'absorption de rayons X, surtout de faible énergie. Elle modifie aussi la section efficace de production des rayons X, phénomène directement lié au ralentissement des particules incidentes. La charge déposée sur la cible permet de normaliser le calcul des concentrations PIXE.

Les méthodes de rétrodiffusion R.B.S établissent la composition ainsi que l'épaisseur des éléments majeurs constituant la cible, notamment le carbone, l'oxygène et l'azote qui constituent les échantillons biologiques. Pour des raisons cinématiques, l'hydrogène ne contribue pas au spectre R.B.S. Le faisceau de particules chargées peut produire un spectre X et un spectre R.B.S simultanément. Les sections efficaces de rétrodiffusion

$^{12}C(p,p)$ ,  $^{14}N(p,p)$ ,  $^{16}O(p,p)$  pour un faisceau d'énergie de 3 MeV et un angle de détection de  $135^\circ$ , sont constantes jusqu'à une énergie de 2,7 MeV environ. Des résonances dans les sections efficaces de diffusion élastiques apparaissent pour une énergie inférieure à 2,7 MeV. Lorsque le proton de 3 MeV traverse une coupe biologique, il perd une partie de son énergie. Si la perte excède 0,3 MeV la dépendance linéaire entre l'intensité du spectre RBS des éléments C, N, O et l'épaisseur de la cible biologique traversée n'est plus garantie. Ces critères imposent une densité surfacique maximum en cible mince  $\rho.t$  de  $2 \text{ mg cm}^{-2}$ ; ce qui correspond à une épaisseur supérieure à  $8 \mu\text{m}$  dans le cadre de coupes de tissus lyophilisés [61].

Une approche de calcul des spectres en énergie est d'utiliser une composition et des paramètres spécifiés au départ. La procédure modifie ensuite la composition jusqu'à ce que les spectres simulés et expérimentaux se superposent. Les modifications peuvent être faites en changeant directement la composition de la cible pour chaque itération ou par le moyen d'une procédure de moindre carré.

### Code de simulation R.U.M.P

En présence d'échantillons homogènes et de composition peu complexe, la stoechiométrie, l'épaisseur de la cible ainsi que la localisation en profondeur d'éléments dopants ou naturels sont des informations rapidement accessibles. Doolittle [62] [63] propose un programme RUMP permettant de simuler des spectres de diffusion de particules chargées sur des cibles constituées de couches homogènes en composition et en épaisseur.

La philosophie du programme consiste à décrire de façon formelle l'échantillon : le nombre de couches, leur composition, et leur localisation au niveau de l'échantillon total. Chaque spectre simulé est fabriqué par la sommation des différents spectres élémentaires de chaque isotope de chaque sous-couche. Toutefois, les réactions nucléaires aux hautes énergies, les effets de canalisation, l'écrantage des électrons aux faibles énergies ... ne sont pas considérées. Un écart entre le spectre théorique et le spectre expérimental est estimé à l'aide d'une méthode des moindres carrés non linéaires.

### Code de simulation R.U.M.P.I.N

Les spectres RBS obtenus par balayage d'un microfaisceau sur une cible hétérogène en épaisseur présentent des formes très variées. Le spectre total obtenu sur la zone de balayage est issu de la contribution de tous les spectres obtenus sur chaque impact. Morretto [64] et Razafindrade [60] proposent une extension du code de simulation précédent RUMP en RUMPIN (Rump inhomogène) partant des constats suivants :

- le spectre total obtenu sur la zone de balayage par un microfaisceau est issu de la contribution de tous les spectres obtenus sur chaque impact. Chacun de ces spectres ayant été élaboré à partir d'une épaisseur différente.
- sur des cibles organiques composées de C, N, O, H, le front de montée de chaque pic de diffusion n'est pas réellement affecté par l'hétérogénéité de la cible. Ces fronts de montée permettent de déterminer la stoechiométrie moyenne de la cible ainsi que la charge totale collectée au cours de l'analyse avec une grande précision [64].
- les variations de stoechiométrie des éléments organiques C, N, O, H dans les tissus vivants sont limitées surtout au niveau de petites zones d'analyse permettant de

considérer les spectres élémentaires de même composition [64].

La reconstruction du spectre expérimental par un spectre théorique à l'aide de RUMPIN est réalisée en sommant un nombre de spectres élémentaires, afin d'obtenir l'épaisseur (masse surfacique) moyenne de la cible.

Dans une première étape, la stoechiométrie et la charge sont déterminées afin d'ajuster la hauteur des fronts de montée des pics, l'épaisseur maximale (masse surfacique) THICK est aussi déterminée à ce niveau. Cette stoechiométrie sert de référence à l'élaboration de spectres élémentaires (14 au total), et à estimer la charge collectée.

Chaque spectre possède au départ la même charge  $Q_i = Q_T/14$ . Les facteurs  $Q_i/Q_T$  servent de poids statistiques à chaque spectre élémentaire avec pour critère de conserver la charge totale initiale. Il est possible de modifier une de ces valeurs à l'aide du curseur sur un histogramme. Des affinements sont possibles à ce niveau de la simulation pour améliorer l'ajustement en modifiant la stoechiométrie moyenne ou la charge totale déposée.

La masse surfacique moyenne est finalement calculée grâce à ces poids statistiques :

$$THICK_{moyen} = \sum_{i=1}^{14} \left( \frac{Q_i}{Q_T} \right) \cdot \frac{(THICK)_i}{14} \quad (3.27)$$

Dans le cadre de l'utilisation d'un faisceau de proton, la diffusion élastique de ce type de projectiles sur des noyaux légers correspond à une section efficace plus élevée que la section efficace Rutherford pure.

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)[65].

Les sections efficaces avec leur pic de résonance des réactions  $^{12}C(p, p')^{12}C$ ,  $^{16}O(p, p')^{16}O$ ,  $^{14}N(p, p')^{14}N$  sont intégrées au logiciel RUMPIN pour une gamme d'énergie comprise entre 0,5 et 3 MeV [60][64].

### 3.4.4 Les dégâts d'irradiation

Lorsqu'un faisceau de particules pénètre un matériau une partie de son énergie est absorbée par la cible. Une cible épaisse reçoit la totalité de l'énergie. La particule chargée cède principalement son énergie par excitation électronique et par ionisation, surtout en fin de parcours [40]. Une partie de cette énergie peut être réémise sous forme de radiations, ou transformée en chaleur et provoquer une augmentation de la température de la cible.

L'équilibre thermique est atteint au bout de  $10^{-12}$  à  $10^{-9}$  seconde. Un équilibre physico-chimique se traduit par une réorganisation stoechiométrique de l'échantillon.

Les dégâts d'irradiation se manifestent par des effets de migration élémentaire au sein de la cible, par un échauffement, des rétrécissements et des déplacements atomiques [66]. L'altération élémentaire la plus communément observée est la perte de matière [67][68].

L'irradiation contribue à la création de radicaux libres, de cassure de liaisons intermoléculaires, de scission de chaînes de molécules et par conséquent à la création de molécules gazeuses.

## Elévation de température

La chaleur emmagasinée lors de l'irradiation est perdue par conduction thermique à travers l'échantillon, par émission de radiations, par évaporation de matières et par convection thermique [66]. Ces pertes n'empêchent pas l'élévation de température dans l'échantillon. Différentes prédictions d'amplitudes thermiques entre le centre de la surface d'impact sous le faisceau et le bord du support existent [66][69]. Elles dépendent de la conductivité thermique et du pouvoir d'arrêt du matériau, de sa température initiale, des conditions d'irradiation (intensité, taille du faisceau ...). Le dépôt d'une couche de carbone améliore la conductivité de la cible [69].

La prise en compte d'une perte de chaleur par radiation et une modification locale de la conductivité sous le faisceau abaissent l'estimation de la température de la cible [70]. Les pertes de chaleur par conduction sont généralement dominantes pour les micro-faisceaux. Suivant la nature du matériau irradié et des conditions expérimentales, l'élévation de température varie de plusieurs ordres de grandeur et aboutit rapidement à la fusion de l'échantillon. Toutefois l'estimation de la température exacte dans l'échantillon est difficile à prédire suivant les mécanismes de pertes des énergies considérées [70][69][66].

Certains de nos échantillons sont fortement contaminés en débris métalliques accentuant le dépôt d'énergie et l'élévation de température de l'échantillon. Une élévation importante de la température pourrait modifier la nature même des débris en provoquant un changement de phase. Bien que ce mécanisme soit peu probable, la détermination de phases associée à une analyse PIXE-histologie doit être réalisée avant toutes mesures par faisceau d'ions. Un faisceau de protons de 3 MeV d'intensité  $40 \text{ pA}/\mu\text{m}^2$  provoque une augmentation de  $90^\circ\text{C}$  à  $40 \mu\text{m}$  de l'impact (mesure réalisée à l'aide du changement de phase  $\alpha \rightarrow \beta$  du quartz ) [71].

## Les pertes d'éléments

L'évolution des éléments en relation aux pertes de matière sont observables à l'aide du spectre RBS pour les éléments majeurs légers et à l'aide de la PIXE pour les minéraux et autres éléments lourds.

Les ionisations abondantes le long de la trace de la particule incidente contribuent à casser un certain nombre de liens chimiques, ne conduisant pas nécessairement à une migration des éléments. La modification de la structure de l'échantillon biologique est observable sur nos coupes de tissus inclus en résine destinées à l'analyse PIXE-histologie. La zone irradiée devient plus imperméable à la coloration au Bleu de Toluidine que la zone non irradiée.

La perte ou fluctuation de matière concerne à la fois les éléments majeurs H, C, N, O de la matrice biologique ainsi que les minéraux. Ces déplacements peuvent nuire à la résolution spatiale comme à la quantification [70]. Les éléments minéraux ont des comportements variés. Certains sont stables, d'autres instables sous le faisceau. Ces comportements sont liés à des phénomènes de rétrécissement, de distorsion de l'échantillon ou de migration des éléments [68]. La détermination des concentrations des éléments métalliques présents dans nos cibles présentent une grande stabilité, les débris sont présents majoritairement sous forme de grains.

Des travaux ont décrit le comportement des pertes d'éléments organiques majeurs dans des cibles biologiques ou similaires sous faisceau d'ions de l'ordre du MeV. Les constatations suivantes sont observées :

- l'hydrogène ainsi que l'oxygène s'évaporent très rapidement sur l'ensemble du volume irradié [68]. L'oxygène décroît quelle que soit la dose délivrée. La température est indépendante de l'épaisseur, par contre la matière perdue est proportionnelle à cette température. La perte en H et en O, dans un échantillon mince de peau ayant reçu une dose de  $10^{10}$  Gy ( proton de 2,5 MeV), est de 60 % environ pour ces deux éléments [68].
- les conséquences immédiates de ces pertes de matière sont une modification de la stoechiométrie de la cible aussi bien en surface qu'en profondeur [72], le carbone est stable, la volatilisation de l'hydrogène entraîne une coloration foncée de la cible [73].
- des fluctuations de l'épaisseur sont constatées sur des cibles minces en mylar et en nylon d'épaisseur nominale  $2 \mu m$ , consécutivement aux pertes en H et O [70]. Le seul moyen d'estimer la composition initiale de la matrice est de mesurer rapidement à très faible courant ( $< 10$  pA) pendant un temps très court afin que les dommages soient faibles [74].

## Paramètres d'irradiation

D'un point de vue expérimental, les échantillons sont analysés dans des conditions telles que l'acquisition soit arrêtée une fois l'équilibre atteint. Les conditions expérimentales sont sélectionnées de manière à minimiser le dépôt d'énergie (intensité du faisceau, vitesse de balayage ...) [75][70][68].

Llabador et al. [75] ont établi que l'augmentation de la vitesse de balayage d'un faisceau de protons sur une cible plastique, similaire à des échantillons biologiques modifiait l'importance des dégâts. La vitesse de balayage la plus rapide ne préserve pas l'échantillon d'un rétrécissement en volume et des effets radiolytiques, mais limite la fusion, l'évaporation de matière, la carbonisation, ainsi que l'apparition de fissures. Cookson préconise une fréquence de balayage supérieure à 1 kHz [66]. La diminution de l'intensité du faisceau préserve l'échantillon au détriment de la sensibilité. L'augmentation de l'efficacité du détecteur, c'est à dire l'optimisation de sa surface, contribue indirectement à préserver la cible.



# Chapitre 4

## Caractérisation par faisceau d'électrons

Les principaux microscopes électroniques se scindent en plusieurs catégories : les microscopes électroniques à balayage (SEM, STEM), les microscopes électroniques à formation d'images stigmatiques (TEM) et ceux à effet tunnel.

Nous avons utilisé la microscopie électronique pour caractériser à l'échelle nanométrique les débris métalliques présents dans nos échantillons. Des informations concernant la dimension, la forme mais aussi la nature sont obtenues à l'aide de la STEM (microscopie électronique à balayage en transmission) associée à un EDXS (spectrométrie de dispersion d'énergie des photons X).

Le faisceau d'électrons interagit de façon élastique avec le champ de l'atome conduisant à un faible transfert d'énergie ; seule la vitesse change de direction. Il interagit de manière inélastique avec les électrons du milieu, ces interactions impliquent l'émission de particules : électrons secondaires (0 à 50 eV), électrons rétrodiffusés qui peuvent atteindre une énergie égale à l'énergie d'accélération, électrons Auger, photons visibles, UV, IR, RX. Le transfert d'énergie du faisceau vers la cible peut conduire également à des échauffements ou des dégâts d'irradiation.

### 4.1 Microscope électronique-Généralités

#### 4.1.1 Principe et fonctionnement

Le principe de fonctionnement d'un microscope électronique à balayage ou à transmission est proche d'un microscope optique. Il possède une source, un condenseur, un échantillon, une optique d'agrandissement et une visualisation (oeil) qui permet une perception globale de l'image dans le champ d'observation de l'image de Gauss ou de l'image pixélisée.

La source est un canon d'électrons de tension d'accélération  $V_0$ . Le système condenseur comprend de deux à quatre lentilles magnétiques, elles réalisent le réglage de la focalisation du faisceau d'électrons. L'objectif (lentille) fait la mise au point du faisceau sur l'objet, de ses qualités dépend la résolution. Les lentilles de projection réalisent un zoom ou un agrandissement de l'objet. Ce système de projection transfère l'image don-



née par l'objectif sur l'écran ou le film. Un diaphragme de champ dans l'objectif règle l'angle  $\alpha$  d'ouverture de la sonde. Des bobines défectrices font balayer le faisceau en mode STEM ou SEM (microscopie électronique à balayage). L'observation de l'image ou du signal lié à l'information recherchée est faite à l'aide d'un écran fluorescent, d'un film photographique, d'un écran cathodique ou de détecteurs de photons, particules chargées. Dans le cadre d'un balayage, l'image est reconstruite sur un écran cathodique ou mémorisée comme une matrice de nombres. Ce système est complété par un porte échantillon et un système de pompage. L'échantillon doit résister sous vide ( $10^{-4} Pa$ ), être bon conducteur d'électricité pour ne pas se charger et résister à l'irradiation.

Les lentilles électroniques, alimentées par un courant stabilisé, ont un comportement similaire aux lentilles optiques, elles seront caractérisées par des aberrations et des distances focales.

### 4.1.2 Formation du contraste en transmission

#### Interaction électron matière

La distance  $d$  qui sépare l'électron incident de l'atome cible détermine le type d'interaction auquel sera soumis l'électron. Un atome possède un noyau de charge  $Ze$  et de masse  $M$ , et un cortège électronique de charge  $-Ze$ , de rayon  $r$ .

Lorsque  $d > r$ , l'électron voit une cible de charge  $-Ze$  et de masse  $M$ . Un choc élastique entre un électron de masse  $m$  a lieu avec le nuage électronique de charge  $-Ze$  et de masse  $M$ . Lorsque l'écart de masse entre la cible et le projectile est grand, le transfert d'énergie est très faible.

Pour une distance  $d < r$ , une interaction élastique entre un noyau ( $+Ze$ ,  $M$ ) et l'électron est responsable de nombreuses diffusions élastiques à de grands angles de déviation (électrons rétrodiffusés).

Enfin quand  $d = r$ , l'interaction est inélastique : l'électron incident frappe les électrons du cortège de l'atome. Le transfert d'énergie est important car les masses entre la cible et la particule incidente sont égales. L'électron perd de l'énergie (diffusion incohérente ou inélastique).

L'interaction inélastique est responsable de la perte d'énergie du faisceau d'électrons incident et de la production de particules secondaires fournissant un grand nombre d'informations sur la cible : émission des électrons peu liés, appelés électrons secondaires, dont l'énergie cinétique est inférieure à 50 eV, ionisation des couches profondes qui provoque l'émission de rayons X caractéristiques de l'échantillon, d'autres électrons secondaires et de rayonnement de freinage.

Les interactions élastiques ou inélastiques produisent des déviations multiples du faisceau. Les éléments lourds seront responsables de nombreuses diffusions élastiques avec de grands angles de déviation et une faible pénétration, l'émission d'électrons rétrodiffusés est élevée. Les éléments légers ralentissent le faisceau qui pénètre plus la cible. Peu d'électrons rétrodiffusés sont émis et la diffusion élastique est faible.

## Le type de contraste

Une image est observable lorsqu'elle présente un contraste, qui correspond à un écart d'intensité du signal entre les différents points de l'image. Deux phénomènes peuvent modifier l'intensité du faisceau incident.

Effet dû à la préparation : dans le cas de cibles relativement épaisses, l'effet d'absorption des électrons permet de discriminer des zones de densités différentes. Généralement, les épaisseurs des échantillons sont très réduites afin de limiter les pertes d'énergie des électrons et de conserver une bonne résolution. L'épaisseur théorique de nos coupes de tissu inclus en résine est de 100 nm. Les différences d'absorption sont donc très faibles et rendent le contraste d'absorption inexistant. Dans le cas de cibles minces, les phénomènes de diffusion prédominent par rapport aux phénomènes d'absorption et ils constituent le contraste.

Effet d'instrumentation : l'ouverture de l'objectif doit être très faible afin de limiter les aberrations sphériques, de l'ordre de  $10^{-2}$  à  $10^{-3}$  rd, cet angle limite la résolution ponctuelle. Seul les rayons diffusés avec un angle inférieur à l'angle d'ouverture participent à la formation de l'image, les autres sont stoppés dans l'appareil. Le contraste est obtenu par soustraction des rayons diffusés ou des rayons diffractés provenant de la cible. On observe un contraste de diffusion ou de diffraction.

## Contraste de diffusion et de diffraction

Les phénomènes de diffusions élastique ou inélastique élaborent un contraste d'intensité du faisceau sur l'image. Les éléments lourds se caractérisent par de fortes diffusions élastiques à de grands angles et beaucoup d'électrons rétrodiffusés. Ces diffusions multiples contribuent à une pénétration moins importante du faisceau qu'avec les éléments légers. Ceux-ci sont responsables d'un ralentissement important à cause des nombreuses collisions inélastiques. Si l'épaisseur de la coupe est suffisamment faible pour que la majorité du faisceau la traverse, la nature des éléments est directement liée au contraste.

Deux cas sont à distinguer : les objets amorphes diffusants et les objets diffractants cristallisés.

### Image en champ clair :

Le diaphragme est centré sur le faisceau d'électrons transmis sans diffraction aucune. Seuls ces rayons contribuent à la formation de l'image. Toutes les parties cristallines apparaissent sombres sur fond clair. Une particule cristallisée apparaît d'autant plus sombre qu'elle est proche d'une zone de diffraction, un point de la préparation paraît d'autant plus clair qu'il diffuse moins d'électrons.

### Image en champ sombre :

Le diaphragme est centré sur le faisceau diffracté par le plan (hkl) du cristal. Seuls, les rayons qui correspondent à la réflexion sélective (hkl) contribuent à la formation de l'image. Le cristal apparaît clair sur fond sombre.

Il est possible d'obtenir une image en champ sombre à partir de chaque réflexion (hkl) en orientant l'échantillon de façon adéquate et en déplaçant le diaphragme de contraste sur la tache (hkl). Des images en champ sombre de particules amorphes ou mal cristallisées sont obtenues en disposant le diaphragme d'objectif sur un anneau de

diffusion (l'intensité est très faible). Les images STEM sont construites en champ sombre.

Le système de détection employé pour nos expériences comprend un détecteur axial (électrons transmis ou diffusés avec un angle petit) qui construit des images en champ clair et un détecteur annulaire (diffusions élastiques et diffractions) celles en champ sombre. Les débris métalliques éventuellement présents dans nos cibles minces ont un Z plus lourd que la matrice biologique. La matrice diffusant moins que les métaux, les débris apparaîtront sombres sur fond clair en champ clair.

## 4.2 Microscope électronique à balayage en transmission : STEM

Pour le TEM (Microscope Electronique en Transmission), l'image est construite au sens de l'optique géométrique avec enregistrement de l'image sur film ou caméra. L'échantillon doit être mince (10 à 500 nm). Le contraste provient de la diffusion du faisceau sur la cible. L'énergie est généralement choisie la plus élevée possible.

Il est possible de rajouter à un MET un système de balayage du faisceau. Le balayage d'un faisceau très fin en mode transmission réalise des observations analytiques de précision par STEM.

La partie transmise du faisceau incident focalisée sur l'échantillon mince est reçue dans un détecteur situé après l'échantillon. L'image est reproduite ligne par ligne sur l'écran du tube image associée. Le mode de formation de l'image s'effectue en champ clair ou en champ sombre. Ces différents modes sont obtenus à l'aide de deux types de détecteurs : axial et annulaire.

### 4.2.1 EDXS couplé au STEM

L'EDXS est une méthode d'analyse quantitative qui détermine les concentrations élémentaires d'une zone irradiée par un faisceau. Cette technique employée simultanément avec un système à balayage est un outil efficace de microanalyse. Le principe consiste à récupérer les rayons X émis lors de l'ionisation des atomes de la cible par le faisceau.

A ces rayons X caractéristiques émis, s'ajoute un bruit de fond continu. Le rayonnement de freinage provient de la décélération des électrons incidents en mouvement dans la matière et passant dans le champ électrostatique des noyaux atomiques. Il est distribué de façon continue d'une valeur nulle jusqu'à la valeur de l'énergie cinétique de l'électron incident. Sa forme dépend de l'énergie du faisceau et de la masse de l'échantillon. La grille de support peut contribuer aussi au fond continu. Les pics caractéristiques du cuivre (raies  $K_\alpha$ ,  $K_\beta$ ,  $L_\alpha$ ) se superposent au fond continu de la grille de support. Leur intensité évolue selon la position de la sonde par rapport aux barreaux du carreau de la grille, rendant la modélisation de ce fond parasite difficile. Le fond continu est composé de photons X générés dans l'échantillon et par des électrons non collimatés qui peuvent exciter les barreaux de la grille support et du porte objet. Afin de minimiser l'influence de ces effets, l'analyse est effectuée dans une zone éloignée du bord des barreaux de la grille.

## 4.2.2 Caractéristiques du microscope

Nous avons utilisé le microscope PHILIPS CM 30. L'image est visualisée soit sur un écran phosphorescent (mode TEM) soit sur un tube cathodique synchronisé avec le système de balayage (mode STEM). Le canon à électrons peut fonctionner jusqu'à une tension de 300 kV, elle est limitée en pratique à 250 kV. La source d'électrons est constituée par un filament d'héxaborure de lanthane (LaB6). 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 ultra-fine (épaisseur de 0,3  $\mu m$ ) afin de détecter les éléments légers à partir du bore ( $Z > 5$ ). Le détecteur Si(Li) est situé latéralement et forme un angle d'élévation de  $20^\circ$  par rapport à l'échantillon. Un système mécanique de rétraction protège la diode en cas de surexposition.

Le détecteur axial, un scintillateur de diamètre 7,5 mm relié à un photomultiplicateur, réceptionne les électrons transmis et diffusés uniquement à l'intérieur de l'angle de collection  $\alpha$  et forme une image similaire à celle obtenue en mode TEM. Le signal champ clair (BF : Bright Field) correspond à une grande proportion d'électrons diffusés inélastiquement et concentrés dans un domaine angulaire étroit. Avec une faible ouverture de collection et une cible mince le contraste est équivalent au contraste de diffraction en champ clair du TEM conventionnel. Le détecteur annulaire, constitué d'un cristal semi-conducteur de diamètre intérieur et extérieur 7,5 mm et 20 mm [76], construit l'image en champ sombre (DF : Dark Field), en récoltant les électrons diffusés et diffractés émis dans un angle supérieur à l'angle d'ouverture du détecteur axial. Dans ce signal annulaire, les électrons diffractés, diffusés élastiquement ou dispersés dans un large domaine angulaire dominant.

## 4.2.3 Méthode de quantification

### Méthode de Hall

La méthode de quantification des éléments utilise l'intensité des raies pour calculer les concentrations. La méthode de Hall est une méthode de quantification des éléments dans le cadre d'échantillons minces. L'intensité est donnée par :

$$I_x = I_0 \cdot N_x \cdot \sigma_x^{ion} \cdot \omega_x \cdot p_x \cdot t \quad (4.1)$$

ou  $N_x$ ,  $\sigma_x^{ion}$ ,  $\omega_x$ ,  $p_x$ , et  $t$  sont respectivement le nombre d'atomes de l'élément  $x$  par unité de volume, la section efficace d'ionisation, le rendement de fluorescence, le poids de la raie, l'épaisseur de l'échantillon et  $I_0$  l'intensité du faisceau incident.

L'intensité du fond continu dû à l'échantillon et à la grille support est estimée d'après la théorie simplifiée de Kramers [77] pour un échantillon constitué de  $c$  types d'atomes :

$$I_{fc} dE = I_0 \cdot \frac{k_1}{E_0} \cdot \frac{dE}{E} \cdot t \cdot \sum_c (N_c \cdot Z_c^2) \quad (4.2)$$

Avec  $E_0$  l'énergie des électrons incidents,  $Z$  numéro atomique,  $A$  le nombre de masse et  $k_1$  une constante.

En posant :

$$\overline{\left(\frac{Z^2}{A}\right)} = \sum_c \left[\left(\frac{Z_c^2}{A_c}\right) \cdot C_c\right] \quad (4.3)$$

avec :

$$C_c = \frac{N_c \cdot A_c}{\sum_c N_c \cdot A_c} \quad (4.4)$$

$C_c$  est la concentration massique de l'élément  $c$ . En intégrant sur un domaine d'énergie arbitraire, l'intensité du fond continu devient :

$$I_{fc} = \int I_{fc}(E) dE = I_0 \cdot k_2 \cdot \overline{\left(\frac{Z^2}{A}\right)} \cdot t \cdot \sum_c (N_c \cdot A_c) \quad (4.5)$$

$k_2$  est une constante.  $\overline{\left(\frac{Z^2}{A}\right)}$  est la valeur moyenne de  $\left(\frac{Z_c^2}{A_c}\right)$  pour l'ensemble des éléments  $c$  de l'échantillon. L'intensité du fond continu est proportionnelle à la masse totale du volume irradié.

La concentration massique  $C_x$  d'un élément  $x$  est définie par :

$$C_x = \frac{N_x \cdot A_x}{\sum_c N_c \cdot A_c} \quad (4.6)$$

En utilisant les relations 4.1 et 4.5 et en multipliant  $\frac{I_x}{I_{fc}}$  par  $A_x \cdot \overline{\left(\frac{Z^2}{A}\right)}$ , la concentration  $C_x$  s'exprime par :

$$C_x = \frac{k_2 \cdot A_x}{\sigma_x \cdot \omega_x \cdot Z_x} \cdot \overline{\left(\frac{Z^2}{A}\right)} \cdot \frac{I_x}{I_{fc}} = k_x \cdot \overline{\left(\frac{Z^2}{A}\right)} \cdot \frac{I_x}{I_{fc}} \quad (4.7)$$

La concentration  $C_x$  est proportionnelle au rapport raie sur fond continu de cet élément mesuré dans le spectre, ce rapport est indépendant de l'épaisseur dans le cas de cibles minces. En sélectionnant une large bande de bruit de fond continu, la précision est augmentée [78].

Pour déterminer la valeur exacte de  $C_x$ , l'utilisation de standards minces d'éléments de concentration connue  $C_x^{st}$  dans les mêmes conditions expérimentales permet de s'affranchir de la valeur de  $k_x$  et nous obtenons :

$$C_x = C_x^{st} \cdot \frac{\left(\frac{I_x}{I_{fc}}\right)}{\left(\frac{I_x}{I_{fc}}\right)^{st}} \cdot \frac{\overline{\left(\frac{Z^2}{A}\right)}}{\overline{\left(\frac{Z^2}{A}\right)}^{st}} \quad (4.8)$$

La valeur moyenne de  $\overline{\left(\frac{Z^2}{A}\right)}$  dépend de l'échantillon expérimental. Pour les échantillons biologiques, la composition moyenne est stable d'un échantillon à un autre [78].

L'équation 4.8 se met sous la forme :

$$C_x = C_x^{st} \cdot \frac{\left(\frac{I_x}{I_{fc}}\right)}{\left(\frac{I_x}{I_{fc}}\right)^{st}} = K_x \cdot \frac{I_x}{I_{fc}} \quad (4.9)$$

Cette équation exprime la relation fondamentale de la méthode de Hall donnant une concentration de l'élément considéré à partir du signal mesuré ( $I_x$  et  $I_{fc}$ ).

Le protocole de préparation des échantillons peut modifier sa composition. La lyophilisation modifie la distribution des éléments au niveau extracellulaire et provoque des déplacements d'ions à l'intérieur de la cellule. Les concentrations se classent, suivant le protocole retenu, par ordre croissant de la manière suivante : C(milieu hydraté) < C(milieu de montage) < C(tissu lyophilisé). Les dégâts d'irradiation affectent les concentrations avec des déplacements ou des pertes de matière organique sous la sonde. Le standard utilisé pour déterminer les concentrations exactes doit être de même nature que la cible, homogène, de faible épaisseur [78].

### Méthode des K facteurs

Considérons deux éléments 1 et 2 appartenant à la même cible mince, le rapport de leur intensité au niveau du détecteur s'écrit :

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{I_0 \cdot C_1 \cdot \sigma_1 \cdot \omega_1 \cdot p_1 \cdot t \cdot D_1 A_2 \cdot \rho}{I_0 \cdot C_2 \cdot \sigma_2 \cdot \omega_2 \cdot p_2 \cdot t \cdot D_2 A_1 \cdot \rho} \quad (4.10)$$

$D_i$  représente la fonction de transfert du système de détection (efficacité de détection) pour l'élément  $i$ ,  $A_i$  masse atomique de l'élément  $i$ ,  $\rho$  est la masse volumique de l'échantillon. Les autres paramètres ont été définis au niveau de l'équation 4.1.

Le rapport

$$K_{1,2} = \frac{\sigma_2 \cdot \omega_2 \cdot p_2 \cdot D_2 A_1}{\sigma_1 \cdot \omega_1 \cdot p_1 \cdot D_1 A_2} \quad (4.11)$$

est appelé K-facteur massique de l'élément 1 relatif à l'élément 2. L'équation devient 4.10 devient :

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{1}{K_{1,2}} \cdot \frac{I_0 \cdot C_1 \cdot t \cdot \rho}{I_0 \cdot C_2 \cdot t \cdot \rho} \quad (4.12)$$

Les éléments appartiennent au même échantillon et sont distribués de façon homogène,  $t$ ,  $\rho$ ,  $I_0$  se simplifient pour donner la relation des K-facteurs de Cliff et Lorimer [79] :

$$\frac{C_1}{C_2} = K_{1,2} \cdot \frac{I_1}{I_2} \quad (4.13)$$

Dans le cadre d'échantillons minces, le rapport des intensités des deux raies  $\frac{I_1}{I_2}$  est directement proportionnel aux concentrations des éléments 1 et 2. Si la teneur d'un élément présent dans l'échantillon est connu, alors il est possible de déterminer la concentration de tous les éléments.

Ce formalisme peut s'appliquer aussi dans le cas d'un standard externe. L'introduction du fond continu dans le calcul permet dans certaines conditions d'obtenir les concentrations des échantillons indépendamment des termes d'épaisseur et d'intensité

incidente. Si le standard et l'échantillon sont similaires (même densité volumique, même rapport  $\frac{Z^2}{A}$  ...), alors on obtient :

$$C_1 = C_2 \cdot K_{2,1} \cdot \frac{\left(\frac{I_1}{I_{fc}}\right)_{ech.}}{\left(\frac{I_2}{I_{fc}}\right)_{st}} \quad (4.14)$$

Le calcul de la concentration  $C_1$  nécessite la détermination des K-facteurs. Des incertitudes sur l'efficacité de détection, oblige l'utilisation de standards afin de déterminer les K-facteurs en vue de la quantification.

La courbe d'étalonnage des K-facteurs doit être effectuée à chaque changement de dispositif de mesure (détecteur, angle solide, filtre ...).

### Effets de matrice

L'interaction prépondérante des rayons X de faible énergie est l'effet photoélectrique. Il se traduit par une atténuation moyenne, du faisceau de photons X émis par une source, cette atténuation est décrite par une loi exponentielle :

$$I = I_0 \exp(-\mu \cdot \rho \cdot x) \quad (4.15)$$

avec  $\mu$  coefficient d'atténuation massique s'exprimant en  $cm^2/g$ ,  $\rho$  la masse volumique de la cible et  $x$  la distance parcourue. Globalement, l'absorption croît avec le numéro atomique de la cible et décroît avec l'énergie. Mais cette absorption présente des discontinuités coïncidant aux énergies de liaisons des atomes.

Dans le cas de matériaux composés, le coefficient d'atténuation massique moyen est obtenu par simple additivité des coefficients massiques des différents éléments présents dans la cible, pondérés par leur pourcentage massique :

$$\mu_{tot} = \sum_i \mu_i \cdot C_i \quad (4.16)$$

La concentration d'un élément dans un échantillon est obtenue à partir de l'intensité de son rayonnement X émis et mesuré. Les facteurs instrumentaux atténuent l'intensité initiale de cet élément, le facteur de transmission  $\tau$  corrige cet effet.

$$\tau = \epsilon \frac{\Omega}{4\pi} \quad (4.17)$$

avec  $\epsilon$  efficacité du détecteur et  $\Omega$  angle solide.

La matrice est l'ensemble des éléments de la cible en dehors de l'élément à analyser. Elle affecte la mesure de l'intensité du rayon X caractéristique de l'élément de deux façons : soit par affaiblissement, soit par renforcement.

- affaiblissement primaire, les autres éléments atténuent le faisceau incident ; affaiblissement secondaire, ils atténuent directement les rayons X de l'élément considéré. Ces deux effets constituent les effets d'absorption.

- si l'échantillon renferme des éléments de numéro atomique supérieur à l'élément considéré, leurs rayons X peuvent exciter à leur tour cet élément (phénomène de fluorescence secondaire). Ce phénomène diffère de l'échantillon au témoin. Un effet de micro-absorption peut intervenir dans le cas d'hétérogénéité du matériau. Un échantillon contenant des particules de phases différentes et de taille finie est considéré comme homogène vis à vis du faisceau lorsqu'un grand nombre de grains participent à l'absorption, créant un effet de moyenne. L'importance des effets de matrice dépend donc de la composition de la matrice et du rayonnement primaire incident. Dans le cadre de l'analyse, ces effets doivent être corrigés ou estimés.

### Correction des effets matrices

Il existe une région pour de très faibles épaisseurs où l'intensité de l'élément est proportionnelle à l'épaisseur (équation 4.1), les effets d'absorption sont négligeables. L'intensité est proportionnelle à la masse de l'élément considéré.

Pour les échantillons épais et homogènes, les effets d'absorption et de fluorescence secondaire sont à corriger. Une correction complète par le calcul est liée aux incertitudes sur les bases de données physiques et donnent parfois des précisions limitées. Les méthodes empiriques se déclinent selon trois axes. L'approximation linéaire ou les effets de matrice sont négligeables telle que l'intensité soit directement proportionnelle à la concentration (cible mince).

La deuxième approche est de corriger l'effet de matrice à l'aide de standards de propriétés de matrices voisines de l'échantillon, ou bien à l'aide de courbes d'étalonnage expérimentales, ou en déterminant les facteurs d'absorption à partir des éléments majeurs connus.

La méthode de l'étalon interne est fréquemment utilisée en spectroscopie optique, elle consiste à mesurer l'intensité d'une raie caractéristique d'un élément par rapport à l'intensité d'une autre raie prise comme étalon. L'étalon interne doit être affecté de la même façon par les effets de matrice que la raie mesurée.

### Simplification des corrections d'absorption

Pour nos expériences, nous utilisons un détecteur à fenêtre ultra-fine afin de détecter un grand nombre d'éléments légers. Bien que ce filtre réduise l'absorption, les éléments légers subissent une atténuation de la part du filtre et de l'échantillon.

L'analyse quantitative de cibles minces en microscopie électronique requiert des corrections d'absorption des rayons X surtout pour les éléments légers. Ces corrections nécessitent la connaissance de l'épaisseur de la cible dans la région de l'analyse. La mesure de l'épaisseur n'est pas chose aisée en pratique et introduit des aspects indésirables : erreur expérimentale supplémentaire, augmentation du coût et de la durée de l'expérience ainsi que des conditions expérimentales et du matériel spécifique.

Z. Horita [80] propose une méthode simple de correction d'absorption dans le cas où l'épaisseur de l'échantillon est inconnue. La quantification d'une micro-région dans une cible consiste à mesurer les intensités  $I_A$  et  $I_B$  des éléments A et B et de les convertir en poids fractionnaire  $C_A$ ,  $C_B$  à l'aide de  $C_A/C_B = K_{AB}(I_A/I_B)$  où  $K_{AB}$  est une constante pour une condition expérimentale donnée.



Les rayons X générés par la cible (A et B) sont différemment absorbés dans l'échantillon et cette absorption peut être corrigée à l'aide de l'équation suivante :

$$\frac{I_B}{I_A} = \left(\frac{I_B}{I_A}\right)_0 \cdot \left\{ \frac{(\mu/\rho)_{sp}^A}{(\mu/\rho)_{sp}^B} \right\} \cdot \left\{ \frac{1 - \exp[-(\mu/\rho)_{sp}^B \cdot \rho \cdot t \cdot \text{cosec } \alpha]}{1 - \exp[-(\mu/\rho)_{sp}^A \cdot \rho \cdot t \cdot \text{cosec } \alpha]} \right\} \quad (4.18)$$

$I_B/I_A$  et  $(I_B/I_A)_0$  sont respectivement les rapports des intensités mesurées et faisant l'objet d'une correction d'absorption.  $t$  est l'épaisseur de l'échantillon et  $\rho$  est sa densité.  $\alpha$  est l'angle de détection et  $(\mu/\rho)_{sp}^A$ ,  $(\mu/\rho)_{sp}^B$  coefficients d'absorptions massique de A et B dans l'échantillon. Si tous les rayons X sont générés par au moins la moitié de l'épaisseur de la cible, l'équation se simplifie de la manière suivante :

$$\frac{I_B}{I_A} = \left(\frac{I_B}{I_A}\right)_0 \cdot \exp \left\{ - [(\mu/\rho)_{sp}^B - (\mu/\rho)_{sp}^A] \cdot \rho \cdot \frac{t}{2} \cdot \text{cosec } \alpha \right\} \quad (4.19)$$

En prenant l'expression logarithmique de cette équation :

$$\ln\left(\frac{I_B}{I_A}\right) = \ln\left(\frac{I_B}{I_A}\right)_0 + \Delta_{AB} \cdot t \quad (4.20)$$

avec

$$\Delta_{AB} = 0,217 \cdot [(\mu/\rho)_{sp}^A - (\mu/\rho)_{sp}^B] \cdot \rho \cdot \text{cosec } \alpha \quad (4.21)$$

Le logarithme du rapport des intensités mesurées est relié de façon linéaire à l'épaisseur  $t$ . Une visualisation graphique de  $\ln(I_B/I_A)$  en fonction de  $t$  permet d'obtenir le rapport des intensités  $\ln(I_B/I_A)_0$  corrigé de l'absorption, en extrapolant graphiquement la courbe à  $t=0$ .  $\ln(I_B/I_A)_0$  représente le rapport des intensités sans phénomène d'absorption.

Considérons un troisième élément dans l'échantillon d'intensité  $I_x$ . D'après l'équation 4.1, son intensité est proportionnelle à l'épaisseur si l'échantillon est une cible mince et si son coefficient d'absorption massique est petit alors :

$$I_x = \Phi \cdot t \quad (4.22)$$

Avec  $\Phi$  constante lorsque l'échantillon est homogène et les conditions expérimentales sont identiques. En substituant l'équation 4.22 dans 4.23 :

$$\ln\left(\frac{I_B}{I_A}\right) = \ln\left(\frac{I_B}{I_A}\right)_0 + \frac{\Delta_{AB}}{\Phi} \cdot I_x \quad (4.23)$$

La visualisation de  $\ln(I_B/I_A)$  en fonction de l'intensité  $I_x$  et non plus de  $t$ , détermine à  $I_x = 0$  le rapport des intensités  $\ln(I_B/I_A)_0$  corrigé de l'absorption. L'utilisation de cette méthode nécessite que les photons d'un des éléments de l'échantillon ne soient pas soumis à l'atténuation, de telle manière à ce que leur intensité soit directement liée à l'épaisseur de la cible. L'utilisation de  $I_x$  est une alternative à la variable  $t$  et élimine le problème de la mesure de l'épaisseur.

Le tracé logarithmique  $\ln(I_B/I_A)$  en fonction de l'intensité  $I_x$  d'un élément dont les rayons X ne sont pas atténués permet d'extrapoler à  $I_x = 0$  le rapport corrigé de l'absorption.

# Chapitre 5

## Mesure de radioactivité résiduelle

### 5.1 Les objectifs

Dans le cadre d'implantation de prothèses, il est important de déterminer l'activité radioactive de ces produits afin de s'assurer de leur innocuité.

La détection des photons gamma autorise une analyse sur toute la masse volumique de l'échantillon. La nature et la quantité de nos échantillons induisent en général une radioactivité très faible. La mesure de cette activité exige des techniques ultra sensibles. La forte diminution du bruit de fond est le moyen d'améliorer cette sensibilité. Les dispositifs du CENBG et du LSM (Laboratoire Souterrain de Modane) où nos analyses ont été effectuées ont permis le développement d'une nouvelle génération de détecteur Ge (HP) à très bas bruit de fond. Ces moyens destinés aux expériences de physique des particules voient leur champ d'application s'élargir à des domaines comme l'océanographie, la datation, l'environnement, la géologie [81] [82]. Nous avons pu bénéficier des équipements du laboratoire de Ph. Hubert et de sa participation aux mesures [81].

### 5.2 Les familles radioactives

Tous les éléments qu'ils soient radioactifs ou stables étaient présents à l'apparition de la Terre, il y a 4,5 milliards d'années.

La radioactivité dite naturelle regroupe les familles de  $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$ ,  $^{232}\text{Th}$ . Ces noyaux ont des périodes de décroissance très longues ( $10^9$  ans) comparables à l'âge de la Terre. Le potassium  $^{40}\text{K}$  est aussi un radioisotope naturel. Le tableau 5.1 résume les principaux émetteurs  $\gamma$  des chaînes radioactives naturelles.

La radioactivité produite par l'homme (radioactivité artificielle) est principalement caractérisée par deux éléments :  $^{137}\text{Cs}$  issu des retombées nucléaires et  $^{60}\text{Co}$  lié à l'utilisation industrielle.

Une troisième composante à la radioactivité générale est la radioactivité cosmogénique créée par le rayonnement cosmique. Elle provient de l'activation des matériaux au niveau du sol, les éléments produits peuvent être  $^{54}\text{Mn}$ ,  $^{65}\text{Zn}$ ,  $^{60}\text{Co}$ ...

$^{238}\text{U}$	$^{235}\text{U}$	$^{232}\text{Th}$
$^{234}\text{Th}$ , $^{234}\text{Pa}$ , $^{226}\text{Ra}$ , $^{214}\text{Pb}$ , $^{214}\text{Bi}$	$^{235}\text{U}$	$^{228}\text{Ac}$ , $^{212}\text{Pb}$ , $^{212}\text{Bi}$ , $^{208}\text{Tl}$

TAB. 5.1 – Principaux éléments émetteurs  $\gamma$  des chaînes radioactives naturelles.

### 5.3 Amélioration de la sensibilité de détection : ultra bas bruit de fond

Le bruit de fond d'un spectromètre  $\gamma$  a plusieurs origines. La première composante de bruit de fond d'un spectromètre  $\gamma$  est induite par le rayonnement cosmique, la deuxième composante provient du flux de rayons  $\gamma$  de la radioactivité des matériaux environnants et la troisième est liée à la radioactivité des matériaux entrant dans la composition du détecteur.

Une partie des mesures a été effectuée au CENBG de Bordeaux et l'autre au LSM, Laboratoire Souterrain de Modane où des dispositifs de bas bruit de fond ont été mis en place pour diverses expériences de physique comme NEMO (Neutrino Experiment with MOlybdenum).

L'objectif des expériences est de déterminer par spectrométrie gamma les isotopes naturels ou artificiels présents dans différents biomatériaux. La spectrométrie gamma ultra bas bruit de fond permet de détecter des activités de l'ordre du mBq/kg pour nos échantillons.

#### 5.3.1 Mesures au C.E.N.B.G

La source dominante du bruit de fond dans un détecteur Ge, situé au niveau du sol, provient du rayonnement cosmique.

Les deux principales particules cosmiques sont les protons ( $\sim 86\%$ ) et les noyaux d'hélium  $\alpha$  ( $\sim 13\%$ ). Les protons peuvent atteindre des énergies de 100 TeV. Ils interagissent avec les noyaux d'azote et d'oxygène de l'atmosphère pour donner une cascade de particules : pions  $\pi^{\pm,0}$ , neutrons et protons de plus faibles énergies. Les pions créent à leur tour des muons  $\mu^{\pm}$ , des neutrinos  $\nu$ , des photons gamma  $\gamma$ , des électrons et des positons  $e^{\pm}$ .

Les pourcentages des particules qui arrivent au niveau du sol et qui sont d'origine cosmique sont donnés dans le tableau 5.2. Le flux de muons domine. Il nuit à la sensibilité du détecteur en ionisant le cristal, en produisant des particules secondaires  $e^{\pm}$ ,  $\gamma$ ,  $n$  et en créant des isotopes radioactifs cosmogéniques.

La figure 5.1 représente le dispositif mis en place au CENBG. Le détecteur est un germanium Ge, bas bruit de fond, de type p, de volume  $100\text{ cm}^3$ , de résolution en énergie de 1 à 2 keV selon l'énergie.

Le plomb a reçu un traitement spécial de fabrication qui lui confère une grande pureté radioactive. La présence, malgré tout, d'un isotope radioactif  $^{210}\text{Pb}$  de période

Particules	protons	pions	électrons	neutrons	muons
%	0,5	0,05	16,45	23	60

TAB. 5.2 – Composantes du rayonnement cosmique au niveau de la mer.

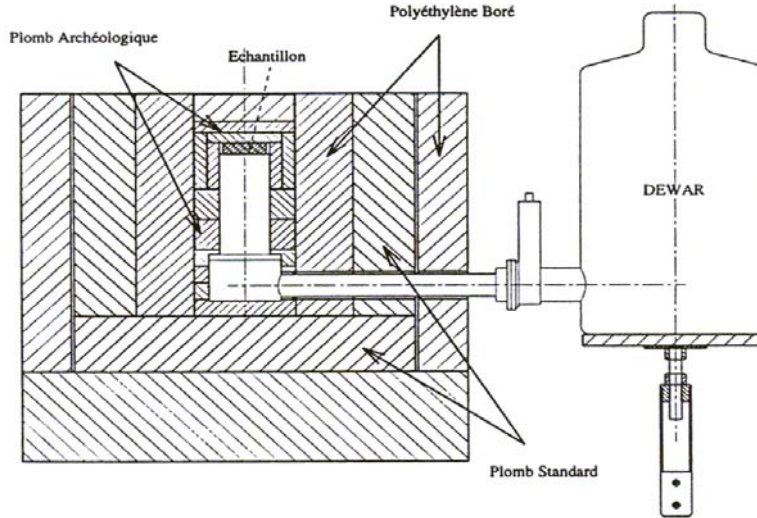


FIG. 5.1 – Vue transversale du système de détection optimisé (détecteur-blindage-dewar), du spectromètre  $\gamma$  du CENBG.

$T_{1/2} = 22,3 \text{ ans}$ , qui se désintègre par émission  $\beta$  génère du bruit de fond dans le détecteur. Une couche de plomb archéologique dont l'activité en  $^{210}\text{Pb}$  est devenue négligeable minimise cet effet. L'épaisseur optimale du plomb est de 15 cm (10 cm plomb standard + 4 cm plomb archéologique). 15 cm de plomb stoppent 99,4% des électrons d'origine cosmique [83]. Cette épaisseur diminue au maximum le bruit de fond au niveau du spectromètre  $\gamma$  pour une énergie inférieure à 2 MeV. Au-delà de 2 MeV, le taux de comptage est essentiellement dominé par l'interaction des muons cosmiques avec le cristal et dépend peu du blindage. Les sections efficaces d'interaction du plomb avec les neutrons sont faibles. Le flux de neutrons au niveau du Ge est quasi indépendant de l'épaisseur de plomb.

Le rajout d'un veto anticosmique (anticoïncidence) autour du système blindage-détecteur réduit le taux de comptage du bruit de fond total du spectre d'un facteur 5 à 6. Le bruit de fond est désormais dominé par l'interaction des neutrons avec les différents matériaux. L'installation d'un modérateur neutron PEB polyéthylène chargé de bore, entre les deux types de plomb, diminue de 20 % le taux de comptage.

Des mesures préliminaires sont effectuées au CENBG afin de déterminer un ordre de grandeur de l'activité. Lorsque celle-ci est très faible, des mesures au laboratoire

Souterrain de Modane sont réalisées.

### 5.3.2 Mesures au L.S.M : Laboratoire Souterrain de Modane

Nous avons vu qu'au niveau du sol la sensibilité de la spectrométrie  $\gamma$  est liée au bruit de fond du rayonnement cosmique. Le LSM réalise des dispositifs de mesure à ultra faible radioactivité. Il est enterré sous 1700 mètres de roches équivalent à 4400 m (mètre équivalent eau). Cette protection naturelle a l'avantage de réduire le flux de muons cosmiques d'un facteur  $10^6$  et par conséquent le flux de neutrons d'un facteur 5. Des dispositifs de mesures d'ultra faible radioactivité nécessitent en plus : une protection contre les rayonnements des parois du laboratoire, d'être isolé de l'air qui contient du radon et, une sélection poussée des matériaux entrant dans la composition du détecteur. Le tableau 5.3 donne l'ordre de grandeur des sensibilités atteintes avec des détecteurs placés au CENBG et LSM [83].

Site	blindage	Sensibilité mBq/kg
CENBG	Pb(14cm) + PEB(16cm)+veto	$\sim 10\text{-}20$
LSM	Pb(20cm)	$\sim 1$

TAB. 5.3 – Sensibilité atteinte dans des détecteurs germanium Ge de  $100\text{ cm}^3$  au CENBG et au LSM concernant les isotopes  $^{214}\text{Bi}$  et  $^{208}\text{Tl}$  [83].

Le dispositif de mesure comprend un détecteur Ge de haute pureté, un cryostat composé d'un alliage AlSi dont les taux d'U et de Th sont  $< 0,3 \cdot 10^{-12} \mu\text{g/g}$ . Aucune activité  $\gamma$  n'a pu être mise en évidence avec les limites suivantes  $< 2$  mBq/kg pour les éléments Ra, Th, Tl des chaînes naturelles et  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{137}\text{Cs}$  et  $< 30$  mBq/kg pour le  $^{40}\text{K}$  [84]. L'augmentation du volume du détecteur se traduit par un gain en efficacité d'un facteur 2 à 200 keV et 3,5 à 2700 keV [85].

Pour estimer le bruit de fond du détecteur, il est nécessaire de remplacer l'échantillon par un matériau de même géométrie, de même numéro atomique et de même densité, contrôlé auparavant non radioactif. A titre d'exemple, l'activité d'un détecteur Ge de  $100\text{ cm}^3$  est de l'ordre de 10 mBq/kg pour quelques jours de comptage, géométrie normale [84].

Le radon apparaît dans les chaînes de décroissance naturelle  $^{238}\text{U}$ ,  $^{232}\text{Th}$ ,  $^{235}\text{U}$ . Les principaux isotopes dans l'air sont le  $^{222}\text{Rn}$  (radon) et le  $^{220}\text{Rn}$  (Thoron) de périodes très courtes (secondes). Leurs produits de décroissance  $^{218}\text{Po}$  et  $^{216}\text{Po}$  peuvent se déposer par effet électrostatique sur les surfaces des matériaux. Le LSM est équipé d'un système de ventilation et de détection du Rn provenant de la roche. Un espace de  $100\text{ cm}^3$  est disponible au dessus du capot du détecteur pour placer l'échantillon. Le problème lié au gaz radon est limité en minimisant le volume d'air dans l'enceinte. Le blindage est rendu étanche par une feuille d'Al de 2 mm d'épaisseur, et une légère surpression est maintenue

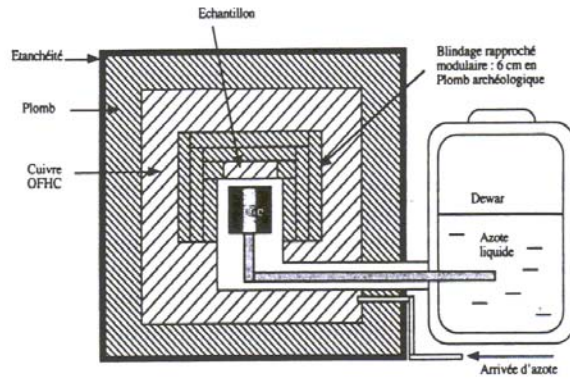


FIG. 5.2 – Description du détecteur Ge au LSM. De l'extérieur vers l'intérieur : 15 cm de plomb standard, 10 cm de cuivre de haute pureté et 6 cm de blindage rapproché soit en Pb archéologique, soit en Cu.

par un flux d'azote gazeux provenant d'une bouteille externe.

Les échantillons sont placés dans une boîte étanche, elle même placée dans un sachet en plastique étanche, il faut attendre la décroissance du radon piégé à l'intérieur, minimiser le dépôt de poussières sur la surface de la boîte et éventuellement rétablir l'équilibre entre le  $^{214}\text{Pb}/^{214}\text{Bi}$  et  $^{226}\text{Ra}$  si celui ci a été rompu lors de la préparation de l'échantillon.

Les trois premières heures de prise de données sont rarement exploitables à cause de la raie du  $^{214}\text{Pb}$  [85].

La figure 5.2 décrit le dispositif du LSM. Il est possible de placer une plaque de cuivre ultra pure entre le détecteur et le blindage plomb afin d'atténuer la pollution au  $^{210}\text{Pb}$  contenu dans le plomb standard.



Troisième partie

Résultats et interprétations





## Chapitre 6

# Contamination du tissu capsulaire par les prothèses de genou

L'objectif est de caractériser la contamination par les implants métalliques des tissus capsulaires voisins. Il s'agit d'estimer les teneurs des éléments métalliques et de localiser la contamination au niveau des tissus.

On constate que les concentrations des éléments métalliques varient d'un facteur 10 à 100 dans le tissu proche de l'implant. Elles sont déterminées à l'aide de la méthode d'analyse PIXE (Particle Induced X-Ray Emission) couplée à la méthode RBS (Rutherford Backscattering Spectroscopy). Cette dernière renseigne sur la charge déposée et caractérise les cibles en éléments majeurs C, N, O. Pour les échantillons les plus pollués, la méthode RBS indique que les débris métalliques modifient localement la teneur en éléments organiques majeurs C, N, O. L'association des méthodes PIXE-RBS et STEM-EDXS fournit des informations complémentaires sur les débris rencontrés.

Les cibles épaisses feront l'objet d'une détection sur une zone plus étendue, et permettront de suivre le comportement et la localisation des débris au sein du tissu capsulaire. Une tentative pour décrire l'homogénéité de la pollution en fonction de la profondeur de pénétration sera corrélée avec des clichés histologiques. Un autre chapitre dresse le bilan de la méthode corrélant une analyse PIXE et histologique sur la même zone.

## 6.1 Protocole d'échantillonnages

### 6.1.1 Le tissu capsulaire

L'articulation du genou est encapsulée par un tissu de maintien, appelé capsule articulaire (figure 6.1). La membrane synoviale tapisse l'intérieur de la capsule. Elle délimite la cavité articulaire et sécrète le liquide synovial. Les ligaments et les ménisques compartimentent l'articulation mais ces parties communiquent entre elles pour permettre au fluide articulaire de circuler [86].

La membrane synoviale intervient au niveau des propriétés mécaniques du genou, elle constitue une barrière d'échange et de filtration et gère la défense contre les agressions extérieures. Elle représente une véritable barrière active entre l'organisme et l'articulation. Le liquide synovial lubrifie les zones de contact et nourrit le cartilage. Deux types de cellules A et B, appelées synoviocytes, coexistent dans la membrane synoviale. Les

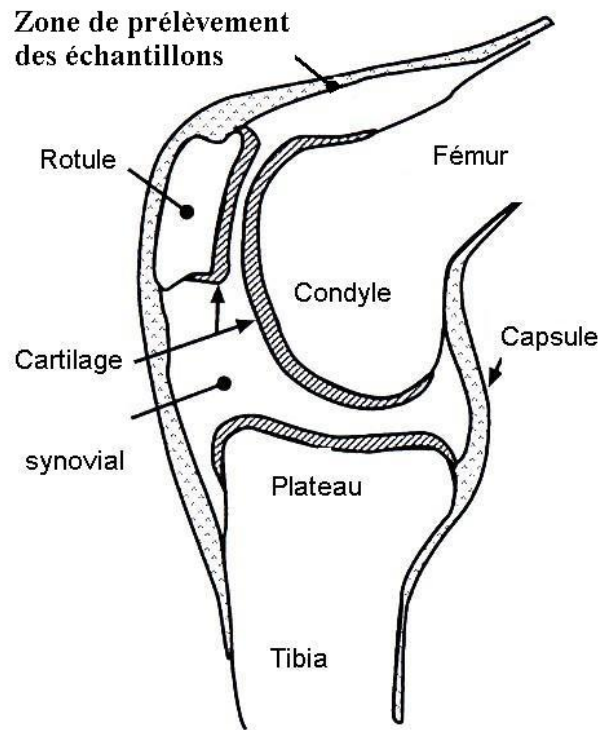


FIG. 6.1 – Articulation du genou humain, vue de profil. Les ménisques ne sont pas schématisés.

cellules de types A ont un caractère commun avec les cellules macrophages, lié à une activité macrophagique vis à vis des débris cellulaires ou petites particules [87].

### 6.1.2 Tissu lyophilisé

Les tissus per-opératoires sont stockés dans des boîtes plastiques hermétiques puis congelés. Suivant la méthode d'analyse, différentes préparations sont nécessaires. Le premier dessin de la figure 6.2 schématise les tissus au contact de la prothèse dans l'articulation. La partie supérieure de l'implant est fixée au fémur (os) et la partie inférieure au tibia (os). Le tissu synovial est séparé de Cr-Co-Mo, TA6V et UHMWPE par le liquide synovial, dans lequel baigne la prothèse. La membrane synoviale s'organise en replis et est non plane. Cette fine membrane repose sur le tissu capsulaire. Tissus synovial et capsulaire s'ancrent au niveau des os (fémur, tibia), au-delà de la prothèse. Le protocole cible mince et cible épaisse autorise l'analyse du tissu capsulaire et synovial (figure 6.2).

#### Cibles minces

Des blocs de tissu de  $1 \text{ cm}^3$  sont amenés à température de l'azote liquide afin de conférer au bloc une grande stabilité de coupe et obtenir des coupes fines. Une fois refroidis, les blocs sont fixés sur un porte objet à l'aide d'une colle spéciale et placés dans un cryomicrotome dont l'enceinte avoisine les  $-30^\circ \text{C}$ . Des coupes d'épaisseur de  $10 \mu\text{m}$  sont réalisées. Afin d'estimer la profondeur de pénétration de la contamination, des profils de coupes sont réalisées de la zone proche de l'implant vers l'extérieur du tissu.

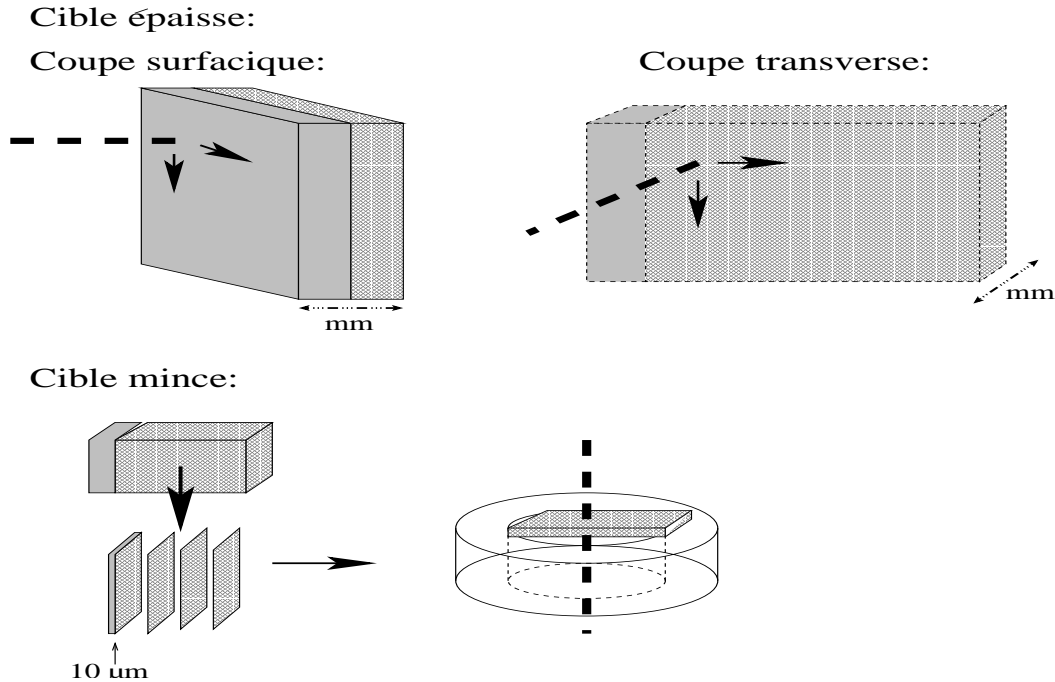
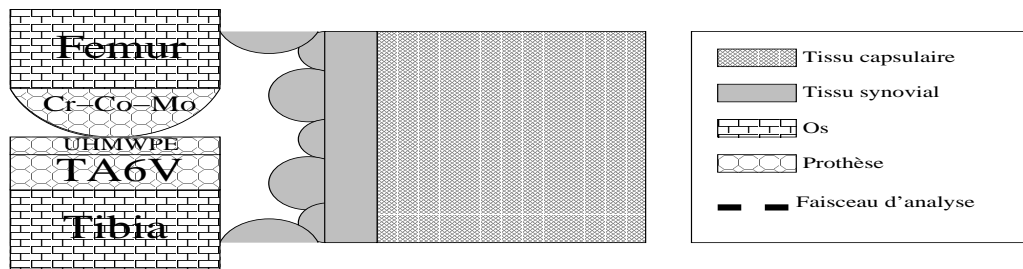


FIG. 6.2 – schéma transverse de la prothèse de genou au niveau de l'articulation. Type de tissu analysé selon le protocole de préparation des échantillons lyophilisés

La profondeur de la zone analysée, ainsi que le nombre de coupes réalisées varient en fonction de la concentration et de l'échantillon. Les échantillons les moins contaminés seront analysés sur une distance de  $600 \mu m$ , les autres sur des distances de  $1500 \mu m$  et  $3500 \mu m$ . Le tissu capsulaire est recouvert d'une membrane synoviale en surface, non plane, avec de nombreuses protubérances. L'obtention de coupes planes et stables mécaniquement s'avère impossible au niveau de cette zone. Un nettoyage préalable est nécessaire en éliminant une zone d'épaisseur de  $100 \mu m$  environ contenant la membrane synoviale, afin d'obtenir des coupes planes et stables. Les coupes sont déposées sur un support en aluminium en forme de couronne. Un film de formvar au centre du support maintient l'échantillon. Les échantillons sont lyophilisés dans l'enceinte du cryomicrotome pendant plusieurs heures.

### Cibles épaisses

Des cibles épaisses sont réalisées selon un protocole mis en place précédemment par l'équipe [7]. Les échantillons sont déshydratés afin d'éviter les problèmes lors de la mise

sous vide de la chambre d'analyse. Après lyophilisation, ces cibles sont recouvertes d'une couche de carbone autorisant l'écoulement des charges qui se créent en surface de la cible sous faisceau d'ions.

La lyophilisation entraîne une diminution importante de poids, mais le volume ne change pas. Cette perte de poids conduit à une surestimation des teneurs en débris métalliques.

Les cibles épaisses donnent les concentrations métalliques au niveau de la membrane synoviale par l'intermédiaire des coupes surfaciques (CS) (figure 6.2). Des coupes transverses (CT) épaisses localisent la migration des éléments métalliques dans le tissu sur des distances plus grandes qu'avec les cibles minces.

### 6.1.3 Tissu inclus en résine

Certains tissus sont inclus dans des résines. Cette préparation s'effectue en deux temps. Tout d'abord, la fixation chimique stabilise la matière vivante et bloque les systèmes enzymatiques. Un fixateur, solution tampon de cacodylate de sodium et de glutaraldéhyde, à pénétration et à action rapide associé à des volumes d'échantillons petits (quelques  $mm^3$ ) respecte au mieux les caractéristiques physico-chimiques des fluides cellulaires. Un rinçage dans la solution tampon seule est effectué. L'inclusion en résine proprement dite commence. Les échantillons doivent être auparavant déshydratés dans une série de bains d'alcool éthylique de degré croissant ( $70^\circ, 95^\circ, 100^\circ$ ). L'immersion des échantillons dans une solution d'oxyde de propylène et dans des mélanges graduels de résine epoxy et d'oxyde de propylène, favorise la pénétration de la résine. La résine est une solution mère (Taab) à laquelle est rajouté du NMA (Nadic Meyhyl Anhydride) du DDSA (Dodeceny Succenic Anhydride) et du DMP30 accélérateur de polymérisation (2-4-6 Tridiméthylaminométhyl Phenol). La résine epoxy confère une dureté nécessaire à la coupe du tissu et une grande stabilité sous le faisceau d'électrons. Les tissus inclus en résine sont mis en gélule et polymérisent pendant plusieurs jours.

Des coupes ultrafines de 100 nm d'épaisseur nominale sont faites à l'aide d'un ultramicrotome. Les coupes rendues conductrices par une couche de carbone sont déposées sur une grille en cuivre. Cette grille est placée sur un support transféré vers la chambre d'analyse du microscope électronique.

Des coupes d'épaisseur comprises entre 7  $\mu m$  et 10  $\mu m$  sont réalisées à partir des mêmes blocs. Ces coupes sont destinées à l'analyse par P.I.X.E et histologie. La gamme de coupe du microtome s'étend de 0,25  $\mu m$  à 60  $\mu m$ . Un porte objet, acceptant des échantillons de dimensions (50x60x40 mm), orientable, facilite la découpe. Les couteaux employés sont en carbure de tungstène.

## 6.2 Degré de la contamination

Nous disposons de 6 échantillons humains per-opératoires dont cinq échantillons au contact de la prothèse ainsi qu'un tissu témoin, repéré par la nomenclature suivante  $E_i$  et  $T_1$ . Un groupe concerne des implants à base de titane exclusivement ( $P_1, P_5$ ) et un autre groupe, des prothèses titane-Cr-Co-Mo ( $P_2, P_3, P_4$ ). Un échantillon  $E_i$  correspond

à une prothèse  $P_i$ .

Concentration en $\mu g/g$	titane Ti	vanadium V	cobalt Co	chrôme Cr
$E_1$	$1431 \pm 73$	$39 \pm 10$	$< LOD$	$< LOD$
$E_2$	$92982 \pm 4887$	$4000 \pm 263$	$676 \pm 38$	$313 \pm 26$
$E_3$	$127731 \pm 6770$	$5818 \pm 368$	$981 \pm 62$	$840 \pm 72$
$E_4$	$267316 \pm 10648$	$11144 \pm 546$	$2169 \pm 91$	$1112 \pm 7$
$E_5$	$257 \pm 14$	$9 \pm 4$	$< LOD$	$< LOD$
$T_1$	$32 \pm 22$	$67 \pm 14$	0	$< LOD$

TAB. 6.1 – Concentrations les plus élevées, des éléments Ti, V, Co, Cr détectés dans les 6 échantillons à partir des cibles minces. LOD : Limite de détection.

Les concentrations de  $T_1$  pour Ti, V, Co, Cr sont établies sur plusieurs zones d'analyse et moyennées. Le tissu témoin  $T_1$  contient du titane et du vanadium à hauteur de 32 ppm et 67 ppm ou  $\mu g/g$ . Les incertitudes concernant ces concentrations sont importantes, les teneurs étant faibles et proches de la limite de détection (LOD). Aucune présence de Co n'a été détectée. La membrane synoviale est connue pour ne pas contenir cet élément [87]. La limite de détection de la méthode PIXE est définie par le symbole LOD : dans le cas du Cr, cette limite de détection s'élève à 40 ppm environ. De façon générale, les éléments métalliques Ti, V, Cr sont de l'ordre de la dizaine de ppm dans un tissu sain lyophilisé.

La comparaison de Ti et de V pour les 5 échantillons avec  $T_1$  montre que l'ensemble des échantillons possède un excès de ces éléments lié à une contamination par les prothèses. Les teneurs en V de  $E_5$  et de  $E_1$  sont inférieures à celles de  $T_1$ . Nous ne disposons que d'un témoin, et les teneurs en éléments traces peuvent varier d'un tissu à un autre.

$E_2$ ,  $E_3$ ,  $E_4$  ont un excédent de Ti, V, Cr et de Co par rapport à  $T_1$ . Cependant, il existe un facteur 100 entre les contaminations par les deux types d'alliage : TA6V pollue plus que Cr-Co-Mo. Les teneurs en Co et Cr pour  $E_1$  et  $E_5$  sont inférieures à la limite de détection. L'association du TA6V/Cr-Co-Mo contamine plus qu'une prothèse en TA6V seul. Il est difficile de généraliser sur le comportement de ces implants à partir de 5 cas d'études. Une étude comportant un plus grand nombre d'échantillons pourrait confirmer ou non cette tendance.

Les contaminations maximales en titane représentent jusqu'à 26% de la masse totale sèche de la cible analysée de l'échantillon  $E_4$ . A ce degré de contamination, le titane n'est plus un élément trace. Nous sommes en présence d'une très forte pollution. Le chapitre suivant décrit les résultats obtenus à l'aide de la méthode RBS sur l'influence de cette pollution métallique dans la matrice biologique.



## Chapitre 7

# Caractérisation des échantillons biologiques en éléments majeurs

Les échantillons proviennent de tissus capsulaire et synovial. Ces tissus sont d'abord analysés par la méthode P.I.X.E afin de déterminer leur contamination en éléments ou débris métalliques. La composition en éléments majeurs C, N, O, H est nécessaire afin d'estimer les concentrations à l'aide du logiciel GUPIX en cible épaisse. La détermination d'une partie de la stoechiométrie et du pourcentage massique de trois éléments majeurs principaux C, N, O confirme la teneur de ces éléments, estimés auparavant par le calcul. La perte de 70% à 80% d'eau lors de la lyophilisation donne une estimation de la stoechiométrie des éléments constituant la matière sèche. L'hydrogène est observable uniquement par des collisions vers l'avant, non rétrodiffusés, pour des raisons cinématiques. La composition du tissu inclus en résine sera également évaluée.

La composition moyenne de la cible est retenue lorsqu'elle acquiert une certaine stabilité sous le faisceau vis à vis des pertes subies lors de l'irradiation. Pour les tissus inclus en résine, les pourcentages sont définis après les pertes dues aux différents traitements de l'échantillon et après les dégâts d'irradiation. Les spectres RBS sont analysés l'aide des programmes R.U.M.P et R.U.M.P.I.N. Ils renseignent sur la composition de la cible, sur la charge déposée, sur l'hétérogénéité des cibles, sur les dégâts provoqués par le faisceau, ainsi que sur l'influence de l'état de contamination sur la stoechiométrie. Les intensités sont normalisées par la charge déposée.

### 7.1 Comportement du faisceau de protons dans les cibles

L'énergie des faisceaux de protons est de 3 MeV. Suivant l'information recherchée, des cibles d'épaisseur et de densité différentes seront analysées. Afin de fixer les idées sur la quantité d'énergie déposée, des simulations à l'aide du programme SRIM-TRIM ont été effectuées [40]. La composition en éléments majeurs (C, N, O) est déterminée à partir des mesures R.B.S. Une base de données fixe la teneur en hydrogène par comparaison avec des composés plastiques proches du tissu capsulaire lyophilisé. Les densités volumiques retenues sont celles déterminées par R.B.S en considérant une épaisseur moyenne des coupes de 10  $\mu m$ , valeur nominale de nos coupes minces. Différentes teneurs de TA6V, exprimées en % massique, sont incluses à la matrice biologique. Les densités finales sont élaborées en fonction de la teneur du TA6V par pondération.



### 7.1.1 Dépôt d'énergie sur cible mince

Un proton de 3 MeV perd environ 3% de son énergie initiale dans une coupe lyophilisée d'épaisseur 10,5  $\mu\text{m}$  (tableau 7.1). A tissu et densité équivalentes, une augmentation de l'épaisseur de 4  $\mu\text{m}$  provoque une perte d'énergie de 1% en plus. Le même résultat est constaté sur des coupes de tissu inclus en résine.

Perte d'énergie en MeV	Epaisseur de coupe en $\mu\text{m}$	Tissu sans débris de TA6V	10% de TA6V	25 % de TA6V
Tissu lyophilisé avec support formvar	8,5	0,066	-	-
	10,5	0,089	0,12	0,166
	12,5	0,101	-	-
Tissu inclus en résine	10	0,12	0,16	0,31
	12	0,13	-	-
	14	0,15	-	-

TAB. 7.1 – Perte d'énergie en MeV, de protons de 3 MeV, dans des coupes minces à différents teneurs en débris de TA6V. Erreur statistique estimée à 5%.

La teneur en débris de TA6V influence aussi le dépôt d'énergie, le titane et les autres éléments présents dans l'alliage augmentent la densité de la cible. Une contamination de l'ordre de 25% de la masse totale des tissus fait passer la perte d'énergie du proton de 3% à 5,5% pour le tissu lyophilisé et de 4% à 10% pour le tissu inclus en résine.

La variation de l'épaisseur de quelques microns a peu d'influence sur la perte d'énergie, par contre une présence importante de débris augmente ce dépôt d'énergie.

### 7.1.2 Dépôt d'énergie sur cible épaisse

Lorsque les cibles sont épaisses, elle reçoivent la totalité de l'énergie de la particule. Nos coupes ont des épaisseurs de plusieurs mm, chaque proton dépose 3 MeV dans la cible. Cependant les courbes de Bragg indiquent que le dépôt d'énergie n'est pas uniforme tout au long du trajet, un maximum d'énergie est cédé en fin de parcours.

Le calcul de la perte d'énergie le long du trajet en fonction de la distance parcourue permet d'estimer le parcours moyen du proton. Le parcours moyen des protons est plus important pour le tissu lyophilisé que celui inclus en résine, qui est plus dense. La présence de TA6V diminue le parcours des particules chargées. En effet, 10% de TA6V, répartis de façon homogène dans la matrice biologique, réduisent de 35% environ le parcours du proton pour le tissu lyophilisé et de 25% pour le tissu inclus (tableau 7.2).

Le parcours d'un proton dans un échantillon de tissu lyophilisé, contenant 10% de TA6V est de 157  $\mu\text{m}$  environ. Il dépose 3 MeV sur cette profondeur. L'énergie moyenne déposée sur une épaisseur de 10  $\mu\text{m}$  est de 0.19 MeV ( $3/157 \times 10$ ).

La distribution en concentration des débris de TA6V et de Cr-Co-Mo est hétérogène dans les échantillons. Lors de l'analyse en cible épaisse, le volume d'analyse varie suivant

% de TA6V dans le tissu	Tissu lyophilisé	Tissu inclus en résine
0 %	241 ± 5,3	165 ± 3
1 %	224 ± 5,3	161 ± 2,6
5 %	190 ± 3,6	141 ± 2,5
10 %	157 ± 2,3	124 ± 2,3
15 %	137 ± 2,4	111 ± 2,7
25 %	108 ± 2	96 ± 2
50 %	76 ± 1,5	72 ± 1,9
100 %	59 ± 1,6	59 ± 1,6

TAB. 7.2 – Parcours moyen en  $\mu m$ , des protons de 3 MeV, dans des cibles épaisses et pour diverses teneurs en débris de TA6V.

la concentration de plusieurs dizaines de  $\mu m$ . Suivant l'énergie du photon X de l'élément présent, la différence de profondeur d'analyse affecte l'atténuation de ce photon, renforçant son hétérogénéité dans la cible.

Les fortes concentrations augmentent le dépôt d'énergie par unité de volume et par conséquent modifient les dégâts d'irradiation. Certains modèles de calcul de température de la cible sous la sonde prévoient des élévations supérieures aux températures de fusion de la matrice. La considération ou non de la perte d'énergie par rayonnement et de la détermination de la conductivité thermique du matériau est source d'erreur concernant ces températures. La détermination des différentes phases  $\alpha$  et  $\beta$  présentes dans les débris d'alliages *in vivo* doit s'effectuer avant toute analyse par faisceau, bien que ce phénomène soit peu probable en ce qui concerne le TA6V. Il possède une température de changement de phase avoisinant les 1000°C.

Au fur et à mesure que le faisceau pénètre dans la cible, il subit une multitude de déviations angulaires. Les impacts de faisceau ont été étudiés en fonction de plusieurs paramètres (figure 7.1). L'épaisseur de la cible, contrairement à la quantité de débris, dégrade la résolution en augmentant le diamètre du faisceau. Dans le cadre de la réalisation d'un protocole couplant une analyse P.I.X.E et histologique, les cibles minces seront privilégiées par rapport aux cibles épaisses car moins d'énergie est déposée et la résolution initiale du faisceau est conservée.

## 7.2 Les dégâts d'irradiation

Les analyses par P.I.X.E-R.B.S sont réalisées dans les mêmes conditions expérimentales suivant les cibles pour la reproductibilité. Il est nécessaire de vérifier que les éléments majeurs constituant la matrice biologique ne fluctuent pas au cours de l'analyse.

### 7.2.1 Cible épaisse

La figure 7.2 montre l'évolution de la teneur en carbone C et en oxygène O en fonction de la charge déposée sur des cibles épaisses de tissu lyophilisé. Le faisceau de protons de 3 MeV possède une résolution de l'ordre de 5  $\mu m$  et une intensité proche de 300 pA

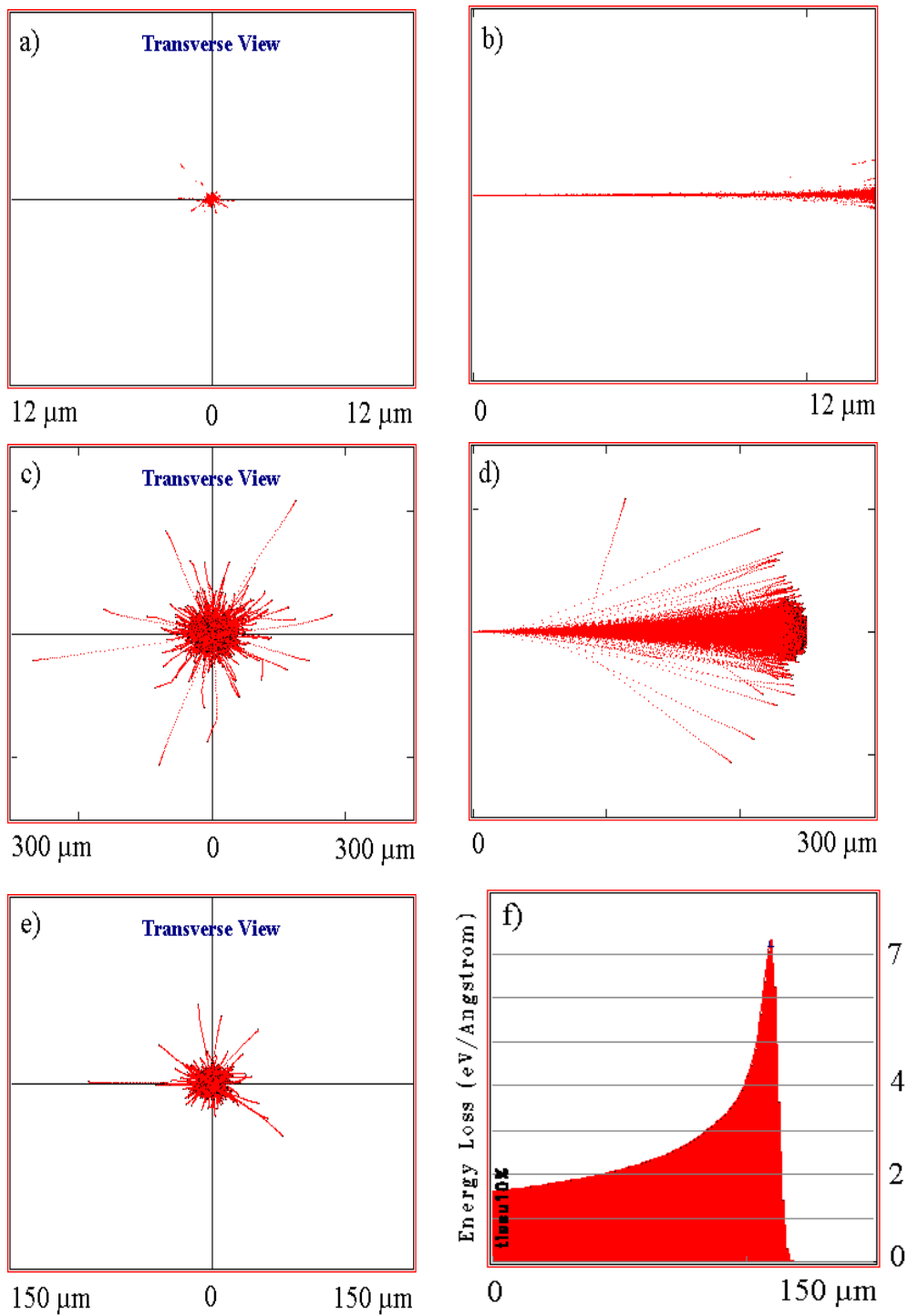


FIG. 7.1 – a)c)e) Vue transversale de la dispersion angulaire d'un faisceau de protons de 3 MeV, respectivement sur une cible mince de 10 μm sans débris (a), sur une cible épaisse sans débris (c) et sur cible épaisse contenant 10% de TA6V (e). b)d) Vue latérale de la même dispersion angulaire dans les cibles (a) et (c) en fonction de la distance parcourue. f) Evolution de la perte d'énergie de protons de 3 MeV dans une cible épaisse contenant 10% de débris de TA6V, en fonction de la distance parcourue. Simulation réalisée par SRIM-TRIM avec 10000 événements.

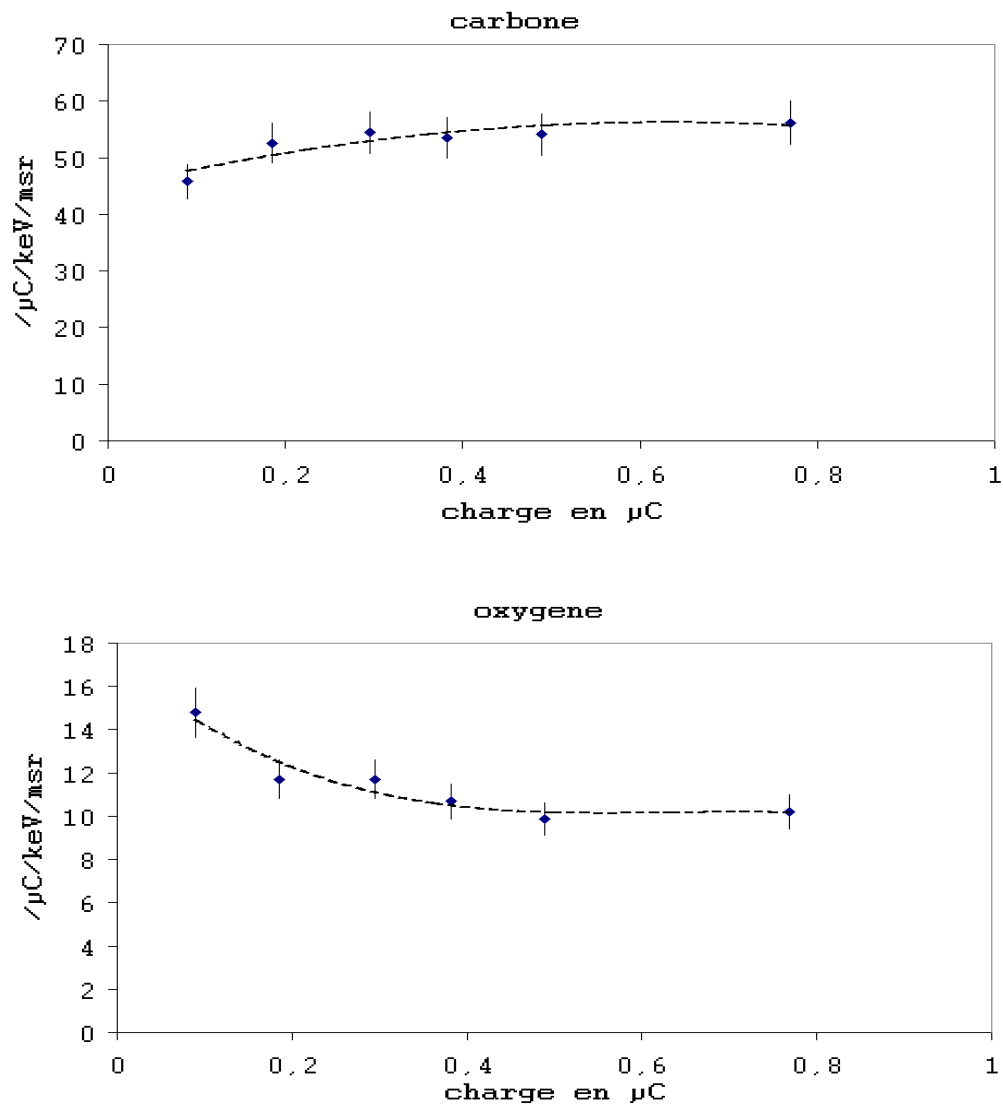


FIG. 7.2 – Evolution de l'intensité des éléments C et O sur des coupes épaisses de tissu lyophilisé, en fonction de la charge déposée en  $\mu\text{C}$  .

avec une fréquence de balayage de 20 *ms* par pixel.

Au fur et à mesure que la charge déposée augmente, l'évaporation de l'oxygène diminue de façon caractéristique. Le carbone ne se volatilise pas lors de l'irradiation. L'augmentation de l'intensité du C (figure 7.2) confirme sa stabilité lors de l'irradiation. L'échantillon lyophilisé perd une partie de son H et O mais conserve son C ; la teneur et par conséquent l'intensité du C augmentent au cours de l'irradiation.

Globalement, la décroissance de l'oxygène ressemble à celle constatée dans la littérature [73][70][74]. L'hydrogène et l'oxygène se stabilisent au bout d'une certaine charge déposée pour des conditions d'irradiation similaires aux nôtres. L'hydrogène, étant donné le dispositif expérimental, n'est pas observable, mais en relation avec le comportement de l'oxygène et les études réalisées, il décroît de la même manière que l'oxygène et souvent plus rapidement. La perte de matière sur des cibles plastiques indique une certaine stabilité de l'azote [70]. Le carbone est l'élément le plus stable parmi tous les éléments

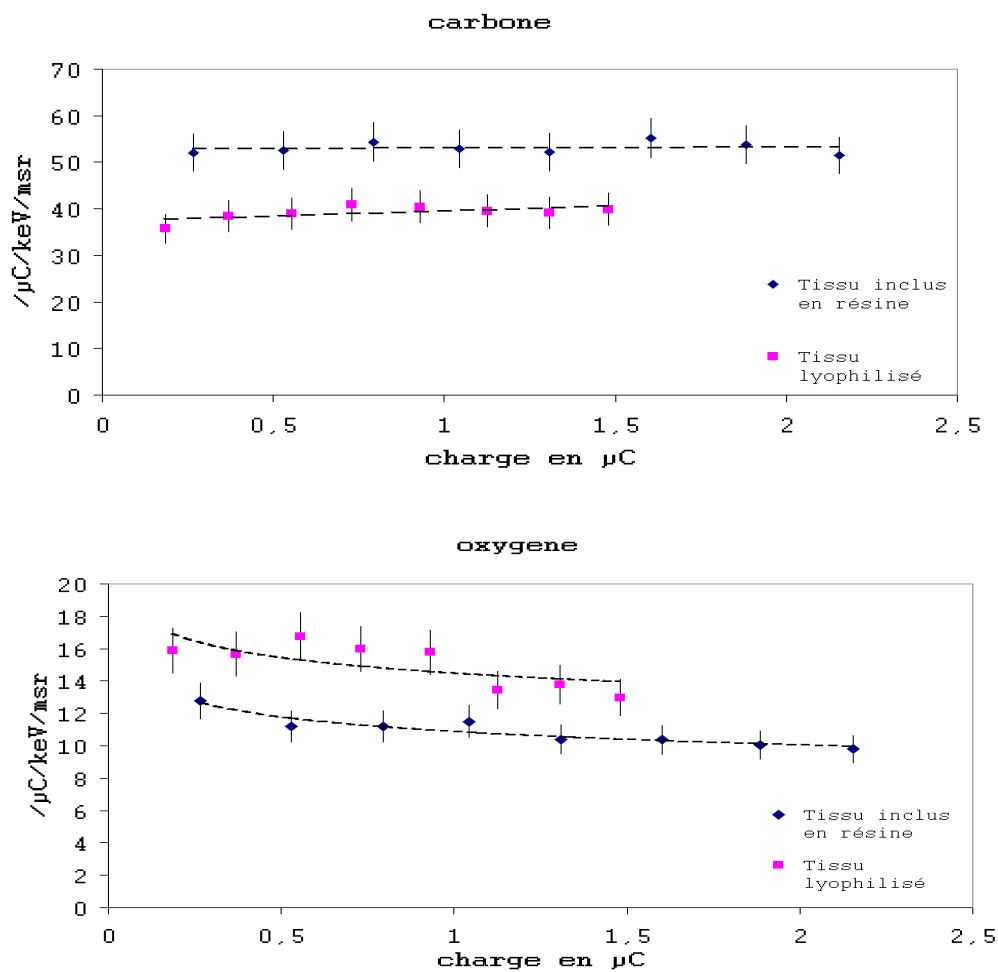


FIG. 7.3 – Comparaison de l'évolution de l'intensité des éléments C et O sur des coupes minces ( $10 \mu m$ ) de tissu inclus en résine et lyophilisé, en fonction de la charge déposée en  $\mu C$ .

majeurs. La matrice devient stable vis à vis des dégâts d'irradiation et des pertes de matière à partir d'une charge déposée de  $0,5 \mu C$  environ. Des charges plus importantes peuvent être déposées sur ce type de cible afin d'améliorer la statistique des spectres X. En cible épaisse, les pertes de matière sont continues mais, à partir d'un certain seuil, les augmentations d'éléments majeurs ou semi-traces non soumis à l'évaporation sont faibles et suivent un comportement de type logarithmique.

### 7.2.2 Cible mince

Globalement, les comportements de l'oxygène et du carbone en cible mince, sont similaires au comportement constaté pour les cibles épaisses (figure 7.3). La décroissance de l'hydrogène est identique à celle de l'oxygène dans des cibles plastiques de type nylon et mylar, sous les mêmes conditions d'irradiation [70]. La stabilité de l'hydrogène sera considérée comme atteinte lorsque les pertes de l'oxygène seront stabilisées soit pour des charges de  $1,5 \mu C$  à  $2 \mu C$ . Pour arriver à un dépôt d'énergie similaire entre ces deux types de cibles, il faut une charge plus grande. Malgré une charge seuil de stabilité matricielle plus importante, les acquisitions des spectres des cibles minces et épaisses

sont du même ordre. Le bruit de fond généré par la cible épaisse oblige à augmenter la durée d'acquisition. La résine augmente le pourcentage de carbone dans la cible, mais diminue celle de l'oxygène (figure 7.3).

### 7.3 Evolution de la stoechiométrie de la matrice organique en fonction de la teneur en débris métalliques

La figure 7.4 montre, à partir de coupes minces, l'évolution de l'intensité des éléments majeurs C, N, O en fonction de la distance à l'implant, pour un échantillon contaminé par les débris métalliques. Les intensités du carbone et de l'azote augmentent au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la prothèse. L'oxygène reste constant sur toute la distance d'analyse. La mesure des intensités est effectuée dans des conditions expérimentales strictement identiques. Toutefois, les conditions d'irradiation et d'analyses (densité, épaisseur de cible ...) peuvent varier d'une coupe à l'autre. Ces variations, si elles existent, modifient les pertes des éléments volatils O, N.

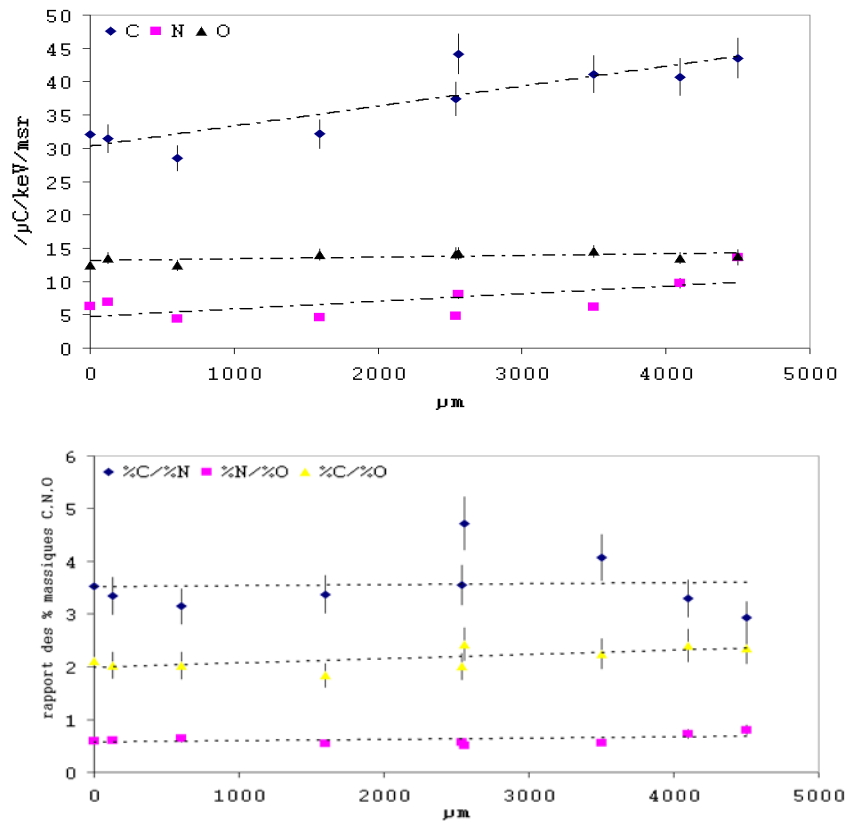


FIG. 7.4 – Haut : évolution de l'intensité de C, N, O en fonction de la distance à l'implant. Bas : évolution des rapports massiques de  $\frac{C}{N}$ ,  $\frac{C}{O}$ ,  $\frac{N}{O}$  en fonction de la distance à l'implant.

La figure 7.5 compare l'évolution de l'intensité du carbone en fonction de celle de la concentration du titane, lorsque l'on s'éloigne de la zone proche de l'implant, pour un échantillon ( $E_4$ ). L'intensité du carbone est directement corrélée à la teneur de débris métalliques, notamment du titane. Plus le titane diminue, plus l'intensité du carbone augmente.

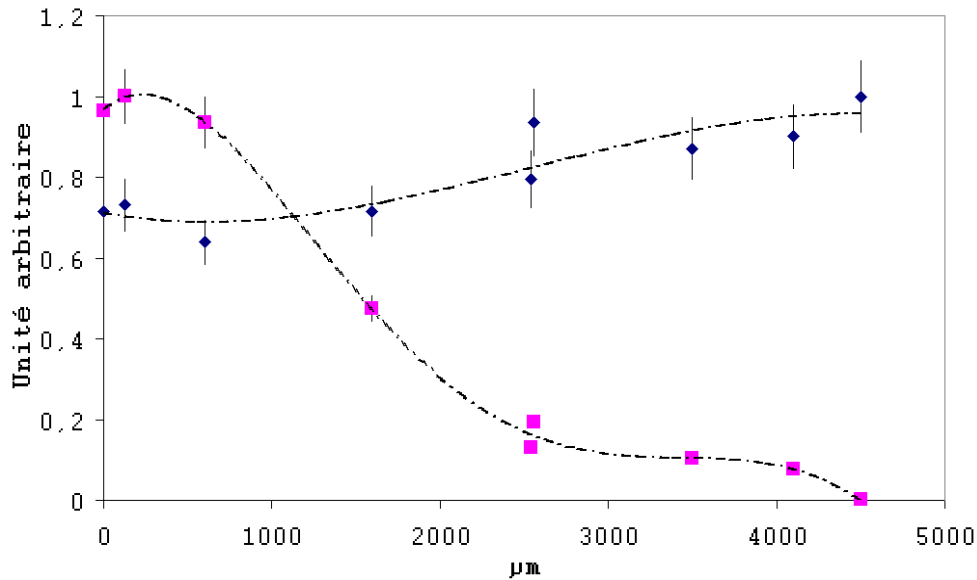


FIG. 7.5 – Evolution de l'intensité de carbone (losange) et de la concentration du titane (carré) en fonction de la distance à l'implant dans l'échantillon E4 (unité arbitraire).

Lorsque la teneur en débris métalliques atteint plusieurs % de la masse totale de la matrice, la concentration des éléments majeurs diminue en proportion et leur intensité sur les spectres R.B.S aussi. Finalement, le comportement du carbone et de l'azote sont en accord avec les concentrations des débris. L'oxygène reste constant, quelle que soit la distance d'analyse et la concentration de débris. Ce comportement de l'oxygène peut être lié aux débris présents dans le tissu. Une meilleure évacuation de la chaleur grâce aux débris métalliques diminuerait l'évaporation de l'oxygène.

Les variations des rapports massiques de C, N, O en fonction de la concentration du titane indiquent que les débris n'influencent pas la stoechiométrie de la cible (figures 7.4 et 7.5).

% massique	% C	% O	% N	% Ti
début de profil	38,5	18,66	11,63	15,7
fin de profil	50,88	21,78	15,12	-
moyen	45,57	21	13	1,6

TAB. 7.3 – Comparaison de l'évolution massique en fonction de la teneur en TA6V ( $E_4$ ), pourcentage déterminé au niveau du profil de la figure 7.5.

Bien que la stoechiométrie ne change pas, les pourcentages massiques de C, N, O varient selon la teneur de Ti. Le pourcentage du carbone peut chuter de 12 % lorsque le titane représente 16 % de la masse totale de la cible (tableau 7.3). La variation des autres éléments O et N est beaucoup moins franche et n'évolue que de 3 à 4 %.

## 7.4 Calcul de la charge déposée

Les spectres R.B.S, traités à l'aide du programme R.U.M.P, doivent être issus de cibles de composition homogène sur toute la surface ainsi que sur toute la profondeur d'analyse [62] [63]. L'hétérogénéité locale des cibles biologiques s'affaiblit sur des cibles épaisses en raison du parcours moyen effectué par le faisceau. L'hétérogénéité de nos échantillons est caractérisée à partir des coupes minces.

Densité surfacique $\mu g/cm^2$	E2	E3	E4	E5
zone 1	460	635	678	376
zone 2	523	720	412	259
zone 3	540	620	620	253
totale	463	650	631	320,2
conc. moy. Ti	26,4	20,8	107	0,073

TAB. 7.4 – Densité surfacique locale de trois zones sélectionnées sur une surface de  $700 \times 700 \mu m^2$ , cible mince ( $E_2$ ,  $E_3$ ,  $E_4$ ,  $E_5$ ). Concentration moyenne du titane de la coupe en  $\mu g/cm^2$ .

La densité surfacique est définie comme étant le produit de la densité volumique par l'épaisseur  $\rho \times t$ . Une variation de l'épaisseur de la cible ou de la densité volumique se traduit par une variation de la densité surfacique et provoque une modification de la largeur des pics R.B.S.

Le tableau 7.4 donne la densité surfacique en  $\mu g/cm^2$  de trois zones sélectionnées sur une cible mince, pour quatre échantillons. La concentration du titane en  $\mu g/cm^2$  est la concentration moyenne déterminée sur une surface de  $700 \times 700 \mu m^2$ . Les débris métalliques contribuent à augmenter la densité surfacique moyenne de chaque coupe.

La densité surfacique obtenue sur chacune des coupes montre des différences à la fois au sein d'une même coupe et entre les coupes. La teneur en débris accentue l'hétérogénéité intrinsèque du tissu biologique. Les écarts de densité moyenne sont reliés au type de tissu présent, plus ou moins fibreux, la présence de tissu fibreux étant fortement corrélée à la nature et à la quantité de débris. Finalement, les débris métalliques augmentent la densité moyenne de la coupe par leur simple présence et par les réactions biologiques qu'ils entraînent.

Le logiciel R.U.M.P.I.N ajuste un spectre R.B.S expérimental à un spectre théorique, en estimant les variations de densité surfacique liées à l'hétérogénéité des cibles biologiques. Dans des conditions stables d'irradiation, il estime la charge déposée sur la cible à quelques % près.

## 7.5 Composition du tissu capsulaire

### 7.5.1 Cible mince lyophilisée

La section efficace de diffusion augmente en fonction du numéro atomique de la cible. Bien que le titane soit plus lourd que les éléments constituant la matrice organique, la



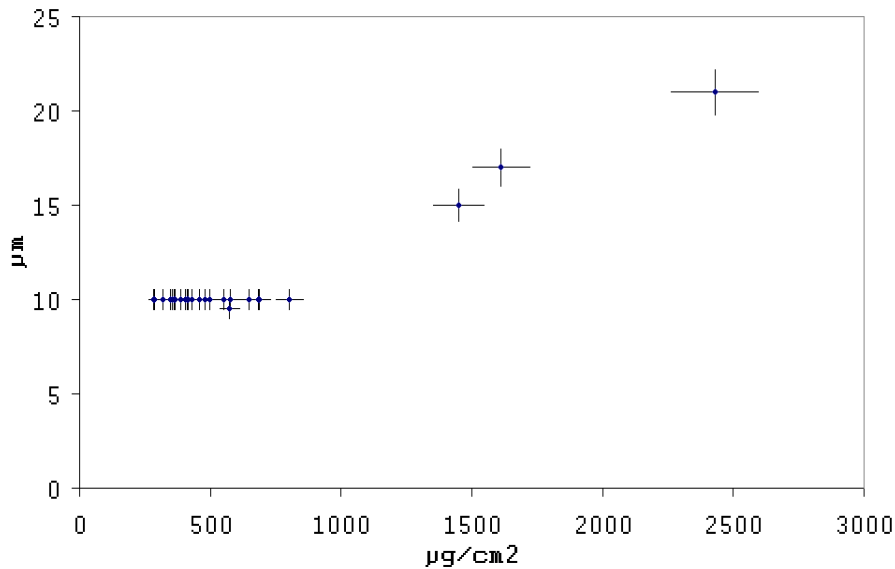


FIG. 7.6 – Tracé de l'épaisseur de la cible  $E_3$  en fonction de sa densité surfacique.

résolution en énergie entraîne une interférence avec certains éléments constituant le tissu biologique (Ca, Fe ...). L'observation de la largeur des pics du spectre R.B.S renseigne sur une modification de la densité surfacique de la cible. Les débris à base de titane sont présents majoritairement sous forme de grains solides et sont répartis de façon hétérogène au sein de la coupe.

Les fortes contaminations changent le pourcentage massique des éléments organiques mais pas la stoechiométrie. L'analyse des cibles minces est effectuée en réalisant des coupes d'épaisseur de  $10 \pm 1 \mu\text{m}$  à l'aide d'un cryomicrotome. Elles sont déposées sur un film de formvar d'épaisseur moyenne  $0,5 \mu\text{m}$  contenant 64% de C et 36% d'O. La largeur du pic de carbone est proportionnelle à l'épaisseur de la cible. La figure 7.6 montre l'évolution de l'épaisseur en fonction de la densité surfacique. A épaisseur constante déterminée à partir du carbone, la densité surfacique varie du simple au double. Seuls trois points présentent une plus grande densité surfacique proportionnelle à l'épaisseur. Cette corrélation entre  $t$  et  $(\rho \times t)$  est attribuable à une augmentation de l'épaisseur de la coupe.

Il est possible d'établir une base de données concernant nos échantillons lyophilisés à partir des études en cibles minces, profil de plusieurs mm et différents degrés de contamination. Les dégâts d'irradiation étant plus importants en cible épaisse qu'en cible mince, les résultats obtenus en cible mince se rapprochent mieux des tissus lyophilisés. Les éléments C, N, O et H représentent 96% de la matrice [88]. Partant de la composition d'un tissu conjonctif avant lyophilisation [40] et en calculant une perte d'eau de 70% à 80% lors de la lyophilisation, il est possible d'estimer ces éléments majeurs notamment l'hydrogène qui est inaccessible dans la configuration du dispositif expérimental. Les données expérimentales du C, N, O correspondent bien aux valeurs théoriques.

Le tableau 7.5 résume les caractéristiques moyennes accompagnées des écarts types,

Echantillon	E1	E2	E3	E4	E5
Degré de la contamination du Ti en $\mu g/g$	1000	100 000	125 000	200	250 000
Densité surfacique en $\mu g/cm^2$	$338 \pm 67$	$470 \pm 115$	$459 \pm 113$	$365 \pm 52$	$644 \pm 154$
Épaisseur moyenne des coupes en $\mu m$	$9,9 \pm 0,15$	$8,73 \pm 0,9$	$9,97 \pm 0,5$	$10 \pm 0,5$	$11,4 \pm 0,7$
Densité volumique $g/cm^3$	$0,34 \pm 0,16$	$0,57 \pm 0,1$	$0,46 \pm 0,18$	$0,36 \pm 1,6$	$0,56 \pm 0,12$
% massique du C	$46 \pm 1,5$	$46 \pm 1,5$	$48 \pm 3,5$	$49,9 \pm 1,6$	$45,5 \pm 5,4$
% massique du N	$15,8 \pm 0,9$	$14,2 \pm 0,9$	$11,2 \pm 1,6$	$13,6 \pm 1,1$	$13 \pm 1,6$
% massique du O	$22,5 \pm 2,2$	$20,4 \pm 1,2$	$20,5 \pm 1$	$22,01 \pm 0,7$	$21 \pm 1,6$

TAB. 7.5 – Caractéristiques moyennes relatives aux tissus biologiques des cinq échantillons.

pour les différents échantillons lyophilisés. Certains points sont supprimés en raison de coupes détériorées. Globalement, les données concernant les différents échantillons sont similaires. Les valeurs moyennes sont calculées sur une profondeur supérieure à la contamination. L'échantillon 4 possède une épaisseur moyenne de coupe de  $11,38 \mu m$  avec un grand écart type. Localement, certaines coupes présentent des épaisseurs de  $15 \mu m$  voir de  $20 \mu m$ . Le complément du pourcentage massique de N, C, O est constitué de H, Cl, K, Ca, S, Ti...

### 7.5.2 Conclusion

La composition du tissu conjonctif avant lyophilisation varie suivant la zone de prélèvement et peut parfois être assimilée à du tissu tendineux ou bien du muscle squelettique et parfois du tissu adipeux. Le tableau 7.6 indique la composition du tissu avant lyophilisation résultant d'une moyenne des différentes nuances possibles pour nos tissus de maintien.

La composition expérimentale de la résine dans le cadre de nos expériences confirme bien une résine PMMA (polyméthylmétacrylate) à quelques % près. La dispersion des concentrations du carbone et de l'oxygène est de l'ordre de 3%. Pour l'inclusion en résine, les bains successifs d'alcool et de résine ont pour but de substituer l'eau par de la résine. Les quantités d'oxygène et d'hydrogène sont modifiées. Le carbone est un mélange du carbone présent dans le tissu et du carbone présent dans la résine. Il est difficile de

Type de tissu Elément	tissu frais	tissu lyophilisé	résine	tissu inclus en résine
H	10%	7,5%	8%	9,5%
C	10%	47%	62%	62%
O	75,45%	21%	30%	24%
N	2,7%	13,5%	-	3,6%

TAB. 7.6 – Composition massique du tissu pur, du tissu lyophilisé, de la résine et du tissu inclus en résine. L'erreur est de 10% environ.

déterminer le pourcentage de résine pénétrant dans le tissu.

L'irradiation des cibles de tissu lyophilisé ou inclus en résine montre qu'elles acquièrent une certaine stabilité lorsque la charge déposée dépasse un seuil de l'ordre du  $\mu C$ . Afin de limiter les effets du faisceau de proton, les conditions d'irradiations seront choisies en conséquence. L'énergie est conservée à 3 MeV pour permettre une sensibilité importante pour un maximum d'éléments. Les pertes de matière existent pour les cibles minces ou épaisses. Les compositions moyennes après lyophilisation sont estimées à partir des cibles minces afin de limiter les dégâts d'irradiation. Le pourcentage massique des éléments majeurs comme le C, N, O est seulement modifié pour les zones les plus contaminées et peut présenter des écarts de quelques pourcents, bien que leur stoechiométrie soit conservée.

# Chapitre 8

## Localisation et migration des débris dans le tissu

### 8.1 Migration en profondeur

#### 8.1.1 Cible mince

Afin d'estimer la profondeur de pénétration de la contamination des éléments constituant les alliages, des profils de coupes, à partir des biopsies prélevées, sont réalisés de la zone proche de l'implant (tissu synovial) vers le tissu capsulaire (figures 6.1, 6.2). La distance de la zone analysée, ainsi que le nombre de coupes varient en fonction de la concentration et de l'échantillon. Les échantillons les moins contaminés  $E_1$ ,  $E_2$  seront analysés sur une distance de  $600 \mu m$ . Les autres  $E_2$ ,  $E_3$ ,  $E_4$  sur des distances de  $1500 \mu m$  et  $3500 \mu m$ . La concentration obtenue sur chaque coupe représente la moyenne des concentrations, concentrations estimées à partir des cartographies élémentaires  $700 \times 700 \mu m^2$ . Plusieurs cartographies sont réalisées par coupes.

Les graphes de la figure 8.1 montrent les profils de la concentration Ti et V pour  $E_1$  et  $E_5$ . La teneur en Ti ou en V, proche de l'implant, est du même ordre de grandeur que celle obtenue à la fin du profil sur  $600 \mu m$ .  $E_1$  possède une concentration plus élevée que  $E_5$ , cependant de fortes variations sont constatées au cours du profil.

La comparaison de Ti et V pour  $E_1$  indique un comportement différent en début de profil et une similitude en fin de parcours. Le rapport moyen  $\frac{[Ti]}{[V]} \sim 32 \pm 4$  supérieur au rapport théorique de l'alliage suggère que nous sommes en présence d'une contamination sous forme de débris ioniques plutôt que de débris solides. Le rapport  $\frac{[Ti]}{[V]} \sim 0,47$  du tissu témoin montre qu'il y a deux fois plus de V que de Ti présents naturellement dans le tissu (tableau 6.1). L'allure en dent de scie des profils Ti et V peut être corrélée à une mauvaise estimation de la charge déposée sur la cible. A noter qu'aucun débris solide n'a été repéré par STEM dans ces deux échantillons.

Le rapport moyen  $\frac{[Ti]}{[V]} \sim 37 \pm 15$  de  $E_5$  renseigne sur la pollution ionique majoritairement au sein du tissu. Les teneurs en V sont proches de la limite de détection qui avoisine la dizaine de ppm pour ce genre de cible.

Les graphes de la figure 8.2 décrivent l'évolution des concentrations de Ti et de Cr

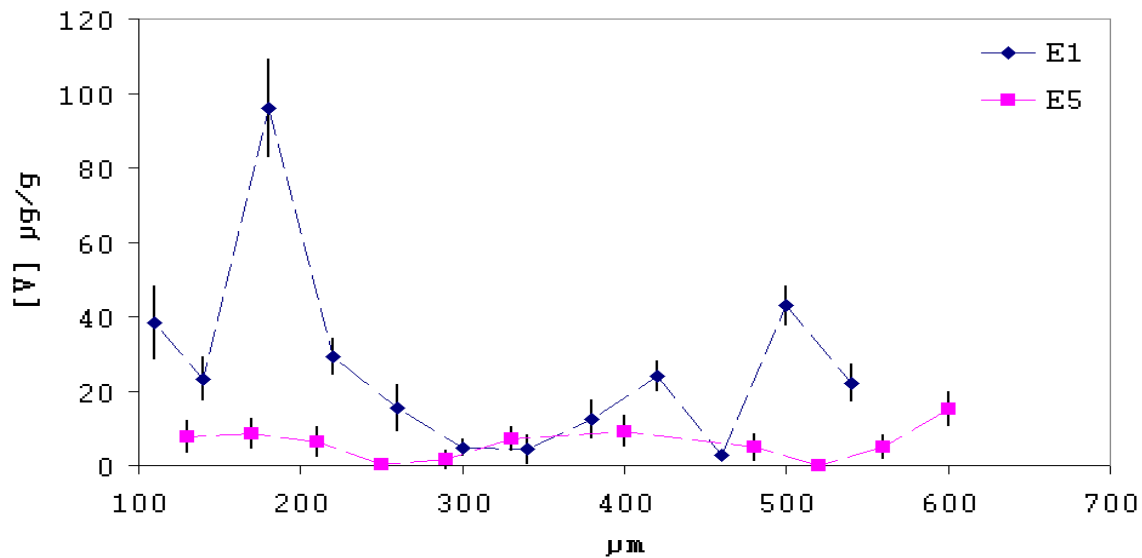
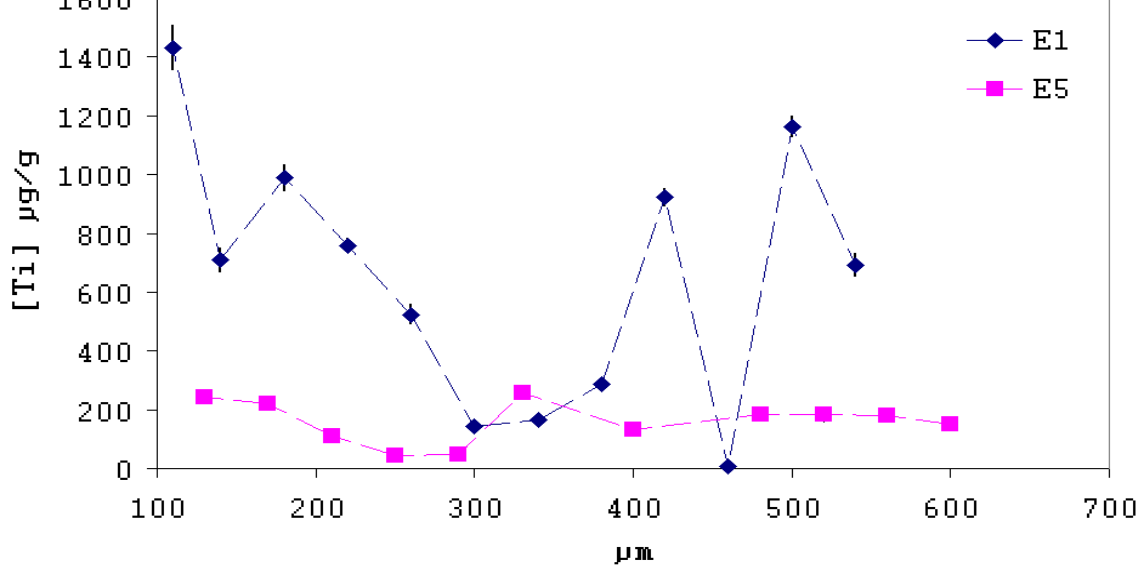


FIG. 8.1 – Profil des concentrations Ti et V de la zone proche de l’implant vers l’extérieur sur 600  $\mu\text{m}$  pour les échantillons E1, E5 .

pour les échantillons  $E_2$ ,  $E_3$ ,  $E_4$  sur 1500  $\mu\text{m}$  environ. Le comportement de ces trois profils pour les deux éléments métalliques semble similaire. Un plus grand nombre de coupes a été réalisé pour  $E_3$ , laissant apparaître une forte hétérogénéité de concentration. La comparaison du profil du Cr, un des deux éléments majeurs de l’alliage Cr-Co-Mo, avec celui du Ti montre des similitudes. Il en résulte que le tissu gère la migration de façon générale des débris ou polluants sans aucune discrimination selon la nature de l’alliage.

Pour une concentration proche de l’implant supérieure à 100 000 ppm, nous retrouvons entre 40% et 50% de cette concentration initiale à 1500  $\mu\text{m}$  (tableau 8.1).

Les figures 8.3 et 8.4 donnent les profils des éléments Ti, V, Co, Cr sur 3500  $\mu\text{m}$  pour les échantillons  $E_2$  et  $E_4$ . La migration de ces quatre éléments sur plusieurs mm est iden-

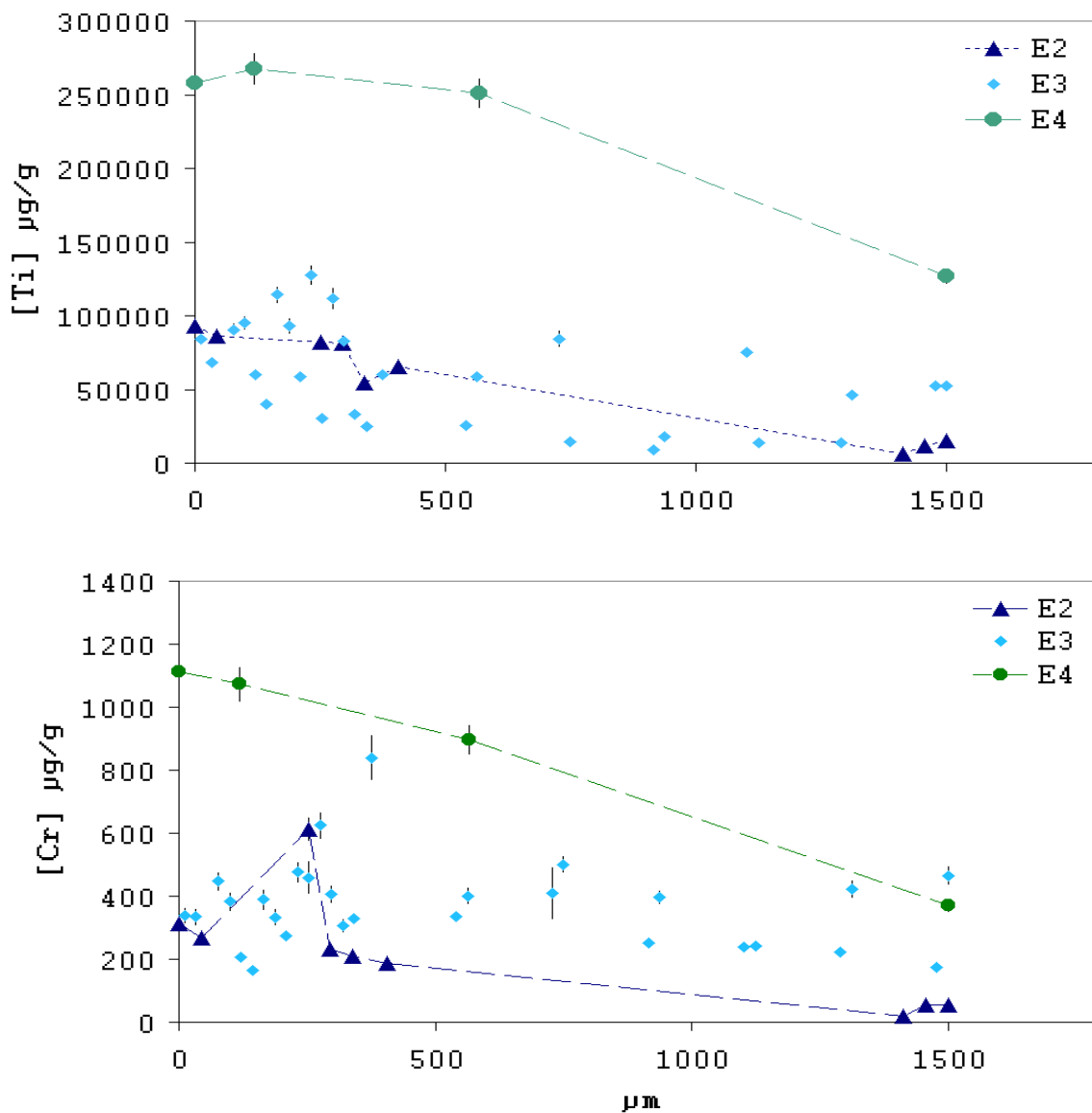


FIG. 8.2 – Profil des concentrations Ti et Cr de la zone proche de l’implant vers l’extérieur sur 1500  $\mu m$  pour les échantillons E2, E3, E4.

tique. Des nuances apparaissent entre les couples (Ti,V) d’une part et (Cr,Co) d’autre part. La fin de profil du Cr et du Co présente une légère augmentation par rapport à Ti et à V.

Pour l’échantillon  $E_4$ , la concentration de Ti à 3500  $\mu m$  représente environ 10% de la concentration proche de l’implant. Pour  $E_2$ , elle représente 4,5%. La pollution est contenue dans la zone située la plus proche de l’implant, en contact avec le fluide synovial.

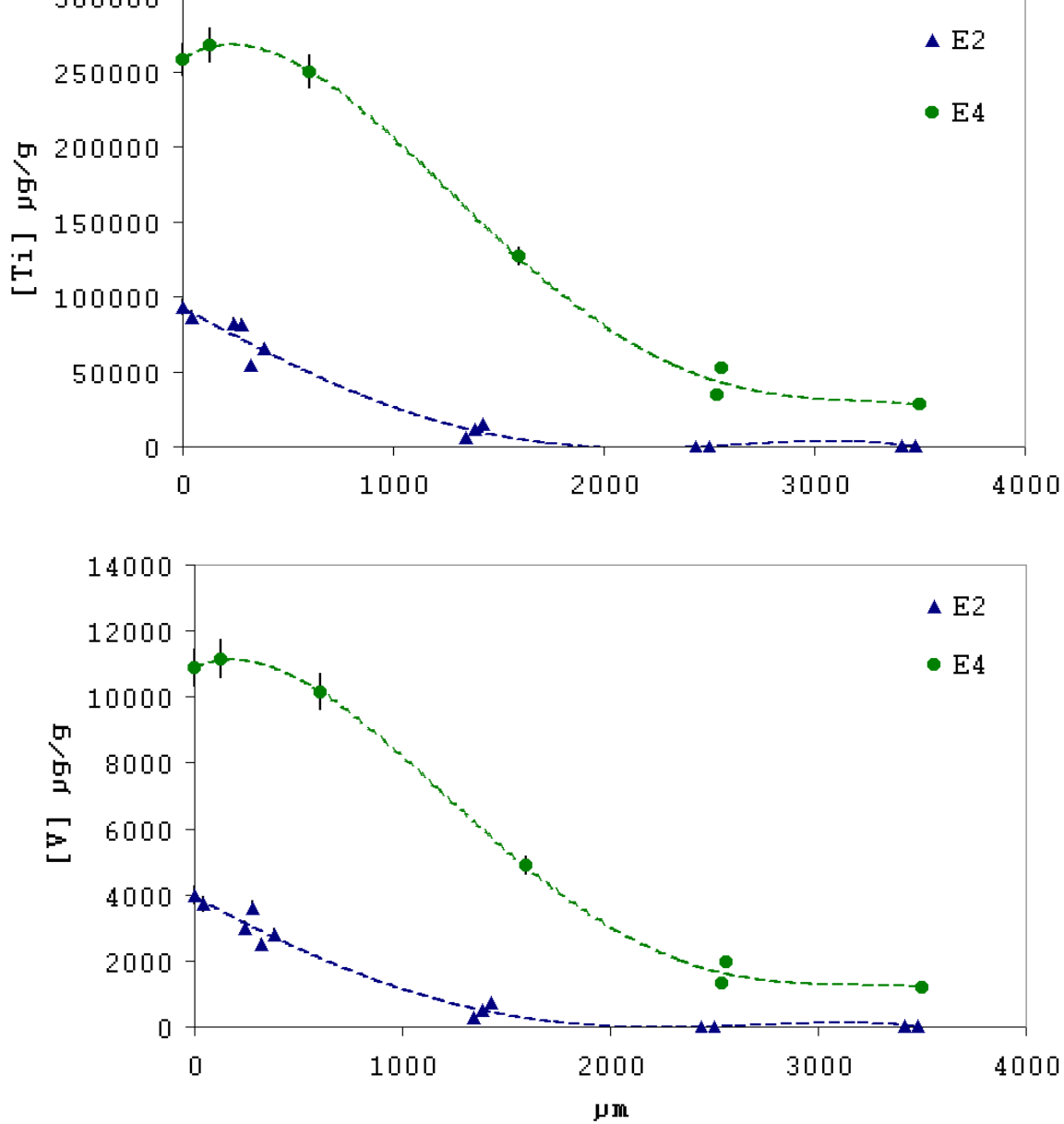


FIG. 8.3 – Profil des concentrations de Ti, V de la zone proche de l’implant vers l’extérieur sur 4000  $\mu\text{m}$  environ, pour les échantillons E2, E4.

Echantillon	[Ti] en $\mu\text{g/g}$ proche de l’implant	[Ti] en $\mu\text{g/g}$ à 1500 $\mu\text{m}$	% du [Ti] à 1500 $\mu\text{m}$ / [Ti] proche implant
$E_2$	267316	126917	47,47%
$E_3$	92982	15000	16%
$E_4$	127731	52268	41%

TAB. 8.1 – % de la concentration en Ti à 1500  $\mu\text{m}$  par rapport à celle proche de l’implant.

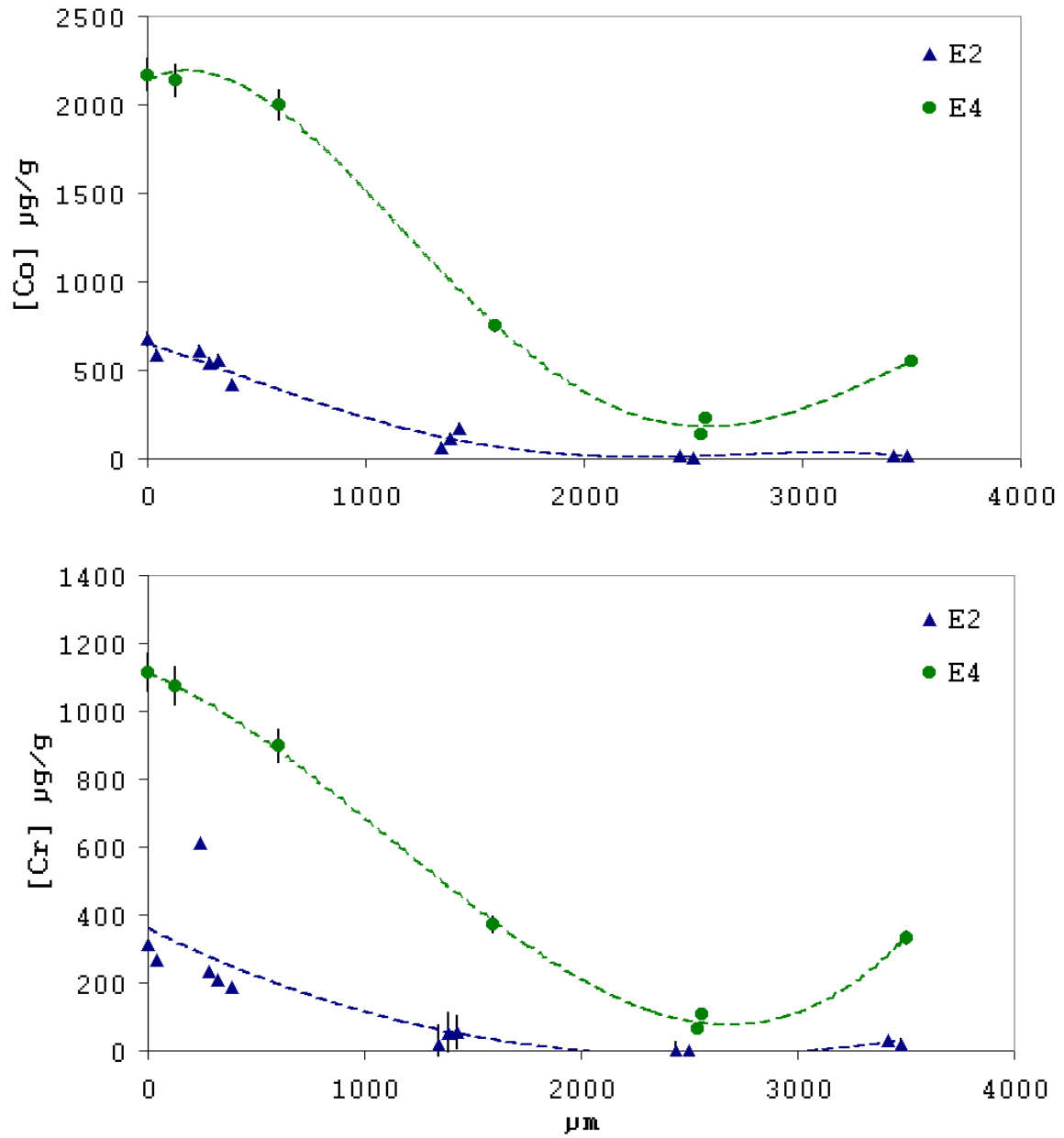


FIG. 8.4 – Profil des concentrations de Co, Cr de la zone proche de l'implant vers l'extérieur sur 4000  $\mu\text{m}$  environ, pour les échantillons E2, E4.



### 8.1.2 Cible épaisse

Nous avons réalisé des profils sur des coupes transverses épaisses (figure 6.2). D'après les profils précédents en cibles minces (figures 8.3, 8.4), la zone située à proximité de l'implant contient le plus de débris métalliques que la fin du profil. L'idée est de réaliser plusieurs profils de migration en profondeur, sur plusieurs biopsies pour un même échantillon. Les coupes épaisses transverses offrent une grande zone d'analyse par cible (figure 6.2). Les profils (nommés  $Pr_i$ ) s'effectuent toujours de la membrane synoviale vers le tissu capsulaire (figures 6.1, 6.2). Ils sont réalisés sur l'ensemble des coupes d'un même échantillon ( $E_4$ ) et sont regroupés ( $CT_i$ ) par niveau de pollution, afin de réaliser une moyenne (graphe haut figure 8.5).

La taille du faisceau de protons varie entre 100 et 250  $\mu m$ . Les points d'impact s'éspacent de plusieurs mm afin d'estimer la migration des métaux sur une dizaine de mm. La concentration moyenne de Ti est observée. Une fois que les profils sont regroupés par niveau de pollution, des intervalles sont sélectionnés de manière à calculer leur teneur moyenne en Ti (figure 8.5).

La concentration moyenne en Ti établie sur chaque intervalle et pour les trois regroupements de profils (CT1, CT2, CT3) est représentée sur la figure 8.5 (graphe du milieu). L'intervalle fortement contaminé, que l'on appellera "front de contamination" se situe en début de profil et confirme les observations faites à partir des cibles minces. Si l'on observe, pour les trois regroupements CT1, CT2 et CT3, la profondeur en mm de l'intervalle le plus contaminé et proche de la prothèse, en fonction de sa teneur moyenne en Ti en  $\mu g/g$  (graphe bas 8.5), il existe une corrélation entre ces deux paramètres. Les débris ne peuvent pas se concentrer indéfiniment et ils migrent dans le tissu.

## 8.2 Répartition en surface

### 8.2.1 Couple TA6V/TA6V

Concentration moyenne $\mu g/g$	$\langle [Ti] \rangle$	$\langle [V] \rangle$	$\langle LOD \rangle$ du V
$E_5$	$183 \pm 129$	0	$57 \pm 20$
$E_1$	$1825 \pm 1136$	0	$73 \pm 15$
$E_1$	$2529 \pm 177$	$94 \pm 34$	$73 \pm 15$

TAB. 8.2 – Concentrations moyennes, en surface, de Ti et de V, accompagnées de leur écart type.

Le tableau 8.2 recense les concentrations moyennes en Ti et V pour les échantillons  $E_1$ ,  $E_5$ . La comparaison des teneurs de Ti obtenues en surface sur cible épaisse avec celles obtenues au niveau des profils sur cible mince proche de la surface sont du même ordre de grandeur.

Pour les teneurs moyennes en titane dans les deux échantillons, dans le cas où le V

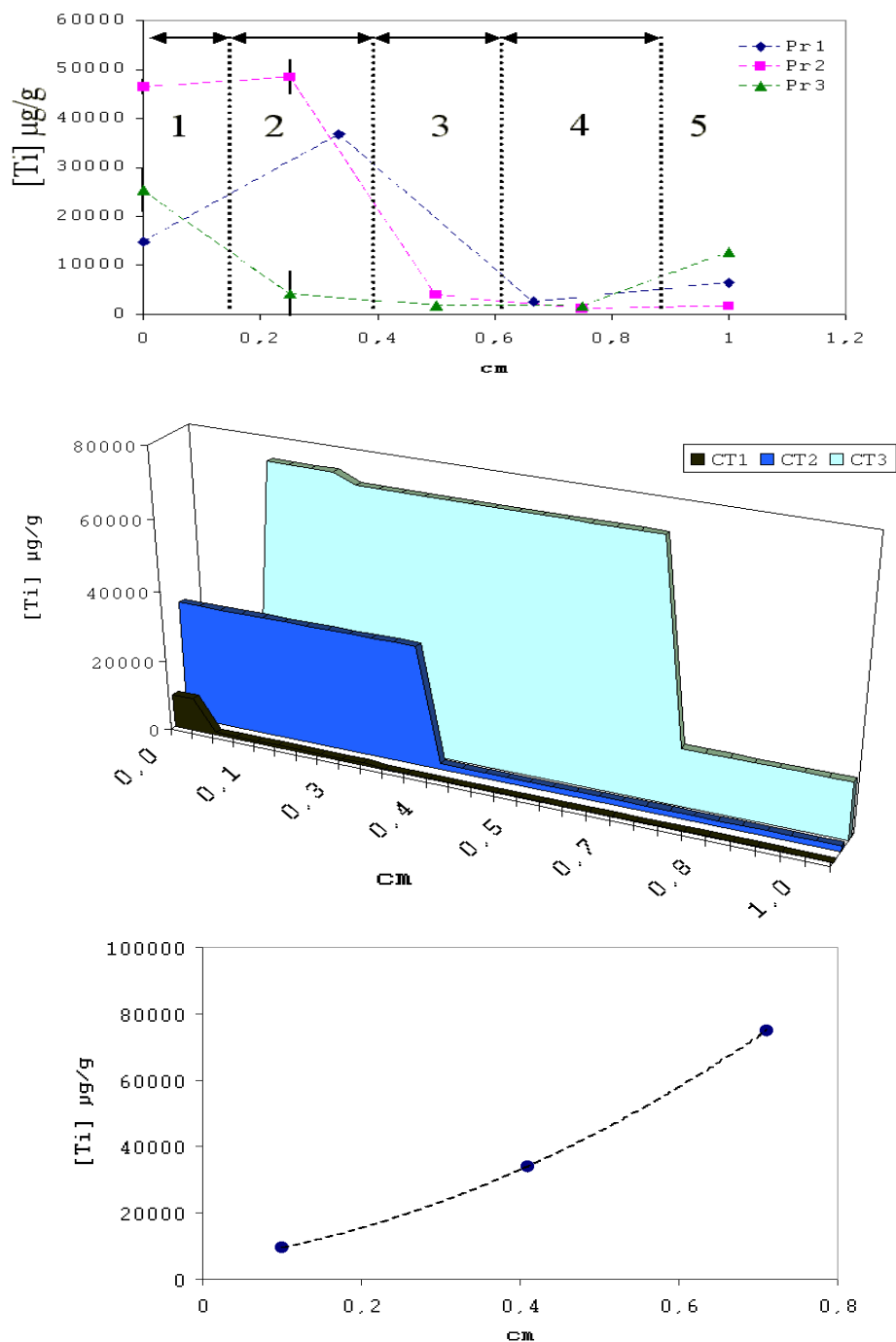


FIG. 8.5 – haut : regroupement des profils réalisés sur les coupes transverses par degré de pollution ( $CT_i$ ) et calcul des concentrations moyennes sur chaque intervalle sélectionné. Milieu : Profil de la teneur moyenne en Ti pour les trois regroupements  $CT_1$ ,  $CT_2$  et  $CT_3$  et observation des paliers de pollution. En bas : Corrélation entre la profondeur du premier palier de contamination de chaque regroupement  $CT_i$  en fonction de sa concentration moyenne

n'est pas présent, les écarts types représentent 35% à 63 % de la valeur moyenne. Pour deux concentrations appartenant à  $E_1$ , V est présent. L'écart type ne représente que 7% environ de la concentration moyenne. Ce constat renforce l'hypothèse que V n'est détecté que pour des contaminations suffisamment élevées et supérieures au LOD. La teneur élevée en Ti et en V ainsi que le faible écart type suggèrent la présence de débris solides pour au moins une des deux concentrations. Les rapports Ti/V individuels des deux points sont dispersés. L'un est égal à 20,9, valeur proche du rapport théorique 22,25 et indique un grain métallique. L'autre voisin de 42 est à corrélérer à une contamination ionique.

### 8.2.2 Couple Cr-Co-Mo/TA6V

Concentration moyenne $\mu g/g$	$\langle [Ti] \rangle$	$\langle [V] \rangle$	$\langle [Co] \rangle$	$\langle [Cr] \rangle$
$E_2$	$86881 \pm 34309$	$3508 \pm 1020$	$962 \pm 354$	$327 \pm 148$
$E_3$	$142220 \pm 45230$	$6102 \pm 2076$	$808 \pm 282$	$392 \pm 97$
$E_4$	$130800 \pm 43000$	$7005 \pm 2850$	$1101 \pm 250$	$839 \pm 250$

TAB. 8.3 – Concentrations moyennes, en surface, de Ti, de V, de Co et de Cr, accompagnées de leur écart type.

Le tableau 8.3 délivre les concentrations moyennes, des éléments métalliques Ti, V, Co, Cr, mesurées en surface sur plusieurs  $cm^2$ . Les éléments en grande quantité sont, comme pour les profils, Ti et V, débris originaires du plateau tibial en TA6V. La concentration moyenne en Ti est de l'ordre de la centaine de milliers de ppm pour les trois échantillons, celle de V et de Co du millier de ppm et Cr de la centaine de ppm.

L'erreur relative à chaque concentration est au plus de 10% dans les cas les plus défavorables. La figure 8.6 représente la répartition de Ti sur une surface d'un  $cm^2$  environ pour les deux échantillons les plus pollués  $E_3$ ,  $E_4$ . Chaque concentration matérialisée par un "échelon" est mesurée sur zone de 200  $\mu m$  de diamètre en moyenne.

Les concentrations de Ti de  $E_3$  (figure 8.6) avoisinent la centaine de milliers de ppm, sauf pour deux points fortement contaminés, atteignant 350 000  $\mu g/g$ . Du Ti est réparti de façon plus hétérogène dans  $E_4$  avec de grandes variations de concentrations. Les zones polluées par le Ti le sont aussi en ce qui concerne V. Ces constatations sont liées au type de débris (ion ou grain) et au comportement général de la migration de ces débris via le fluide synoviale.

## 8.3 Comportement bio-chimique

### 8.3.1 En surface

Dans les échantillons  $E_1$  et  $E_5$ , on détecte du Ti en surface du tissu. Un excès de Ti par rapport au V indique une contamination sous forme ionique. Pour les trois autres échantillons, un comportement différent est observé (tableau 8.4).

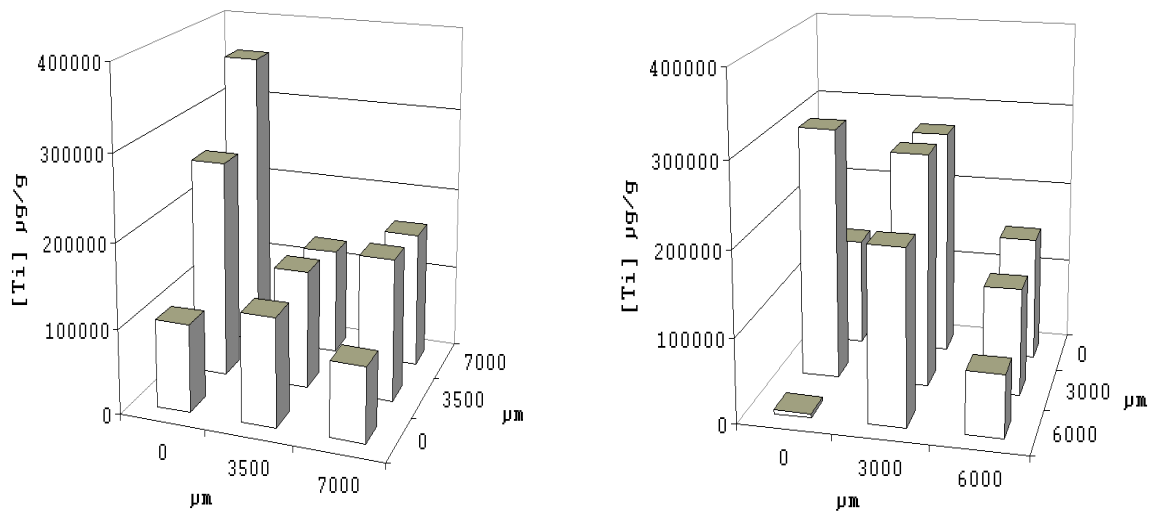


FIG. 8.6 – Répartition surfacique de la concentration du Ti, cible épaisse. Gauche : E3. Droite : E4.

Rapport moyen	$\langle \frac{[Ti]}{[V]} \rangle$	$\langle \frac{[Co]}{[Cr]} \rangle$	$\langle \frac{[Ti]}{[Cr]} \rangle$	$\langle \frac{[Ti]}{[Co]} \rangle$
$E_2$	$23,9 \pm 2,8$	$3 \pm 0,35$	$273 \pm 19$	$89 \pm 3$
$E_3$	$23,41 \pm 1$	$2 \pm 0,3$	$387 \pm 110$	$229 \pm 40$
$E_4$	$21,15 \pm 1$	$1,8 \pm 0,5$	$214 \pm 50$	$120 \pm 16$

TAB. 8.4 – Rapports moyens  $\frac{[Ti]}{[V]}$ ,  $\frac{[Co]}{[Cr]}$ ,  $\frac{[Ti]}{[Cr]}$ ,  $\frac{[Ti]}{[Co]}$  avec l'écart type, obtenus à partir des concentrations surfaciques.

Les rapports théoriques des deux types d'alliages sont  $\frac{[Ti]}{[V]} = 22,5 \pm 0,5$  pour le TA6V et  $\frac{[Co]}{[Cr]} = 2,45 \pm 0,4$  pour le Cr-Co-Mo. Les rapports  $\frac{[Ti]}{[V]}$  très proches du rapport théorique, indiquent que le type de débris majoritaire est une particule métallique solide et non ionique (tableau 8.4).

Les rapports expérimentaux et théoriques indiquent, comme pour TA6V, une présence majoritaire de grain de Cr-Co-Mo. Comme pour le comportement des ions Ti, un phénomène membranaire peut modifier les teneurs en ions.

Globalement, la teneur du Co reste liée à celle du Ti, mais varie d'un échantillon à l'autre. Il est nécessaire de regarder aussi le rapport  $\frac{[Ti]}{[Cr]}$  pour les raisons particulières de corrosion et de dissolution de cet alliage auxquelles peuvent être soumis séparément le Cr et le Co *in vivo*.

### 8.3.2 En profondeur

#### Le rapport massique

Les graphes A, C de la figure 8.7 décrivent le comportement du rapport  $\frac{[Ti]}{[V]}$  en fonction de la profondeur de migration dans le tissu pour 3500  $\mu m$  ( $E_4$ ) et 1500  $\mu m$  ( $E_3$ ).

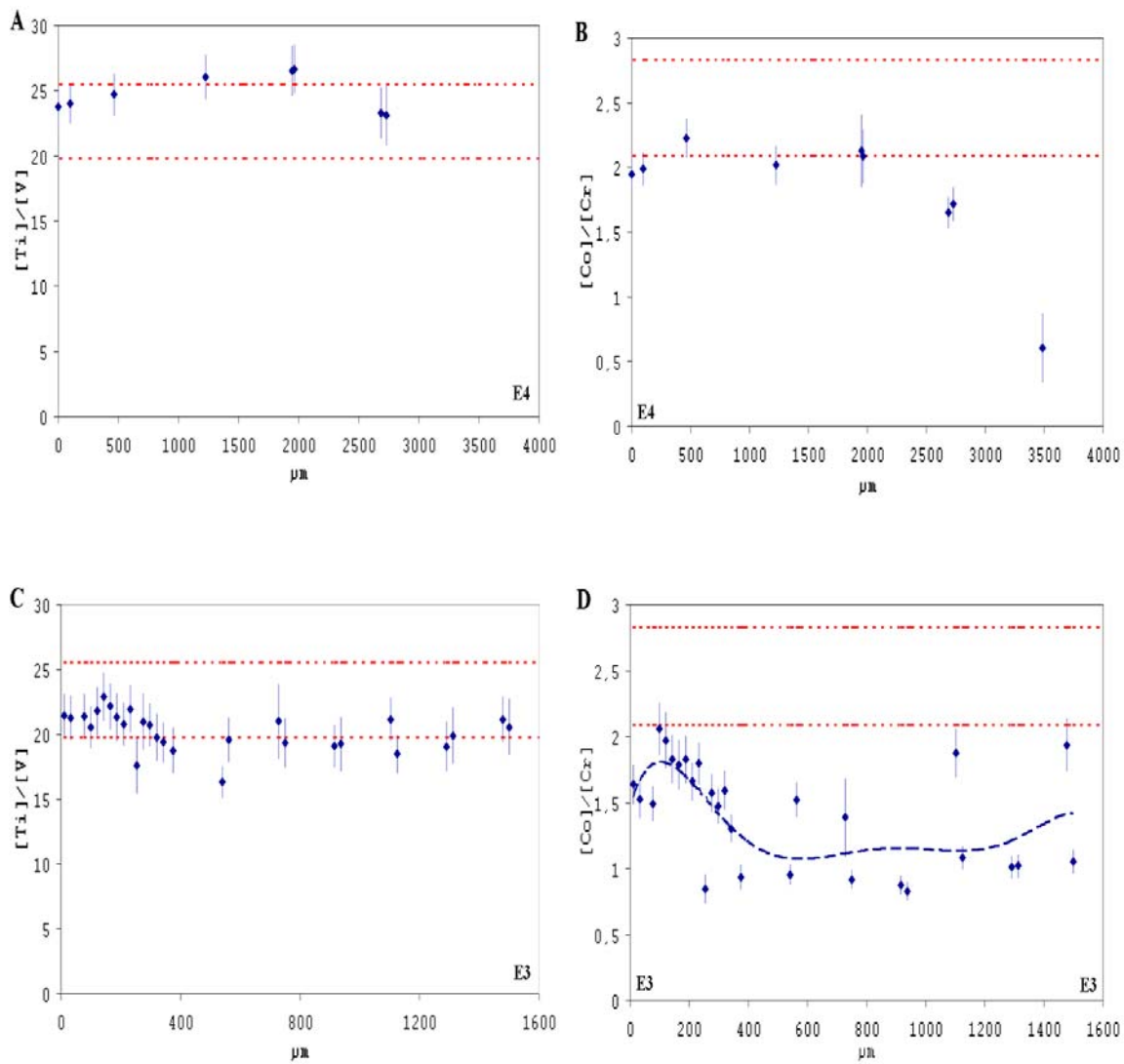


FIG. 8.7 – A, B : Comparaison des rapports expérimentaux  $\frac{[Ti]}{[V]}$ ,  $\frac{[Co]}{[Cr]}$  au rapport théorique de l’alliage (les lignes en pointillées) en fonction de la distance par rapport à l’implant, E4. C, D : même comparaison pour E3.

Ces rapports sont similaires au rapport théorique de l’alliage quelle que soit la teneur en TA6V et quelle que soit la profondeur de migration. Ces résultats confirment, comme pour les débris superficiels, la présence en grande majorité de grains métalliques plutôt que d’ions et la grande stabilité chimique des alliages de TA6V dans un milieu *in vivo* même sous forme de grains.

Les graphes B, D de la figure 8.7 indiquent que les débris de Cr-Co-Mo ont un comportement chimique différent de ceux issus de TA6V. Pour le rapport  $\frac{[Co]}{[Cr]}$ , deux zones se distinguent : une zone à proximité de la prothèse où le rapport est proche du rapport théorique de l’alliage, une zone plus lointaine où le rapport est inférieur au rapport théorique de l’alliage Cr-Co-Mo. Cette modification de la stœchiométrie des débris résulte d’une modification de la nature des grains (couche de passivation, dissolution ...) ou d’une présence ionique. Il est logique de considérer les débris plus

proches de l'implant comme les plus récents tandis que ceux qui ont migré plus en profondeur datent d'une période antérieure. Cet intervalle de temps permet à l'organisme d'interagir avec ces débris.

### 8.3.3 Le paramètre d'homogénéité

Chaque concentration exprimée sur un profil (cible mince) est issue de la moyenne arithmétique de trois ou quatre concentrations déterminées dans une zone de  $700 \times 700 \mu m^2$ , à laquelle correspond une cartographie. Il est ainsi possible de visualiser la répartition géographique de chaque élément séparément comme le Ti ou le Co ...

L'écart type  $\sigma_j$  associé à la population des différentes concentrations de chaque coupe est calculé. Il caractérise la dispersion des mesures  $\sigma_j = \sqrt{\frac{\sum_i^n (x_i - m)^2}{n}}$ , notamment celles des concentrations dans notre cas. Le rapport  $V_j = \frac{\sigma_j}{m_j}$  appelé coefficient de variation s'exprime souvent en pourcentage [89]. Ensuite sur chaque profil élémentaire, le rapport  $V_j$  est déterminé pour chaque élément métallique et pour chaque coordonnée (coupe mince). La détermination du rapport  $V_{max}$  sur chaque profil et la division de l'ensemble de ces rapports ( $V_j/V_{max}$ ) par le rapport maximum, permet de normaliser ce nouveau paramètre entre 0 et 1. Le paramètre d'homogénéité H est défini de la sorte :  $H_j = 1 - \frac{V_j}{V_{max}}$ .

La figure 8.8 renseigne sur l'homogénéité du Ti, V, Cr, Co de  $E_2$ ,  $E_4$  en fonction de l'épaisseur de migration dans le tissu capsulaire. L'homogénéité du Ti et du V est identique, phénomène lié aux grains de TA6V. Le Cr et le Co ont localement des différences d'homogénéité liés aux phénomènes de passivation. Les débris sont moins dispersés sur les  $2000 \mu m$  (figure 8.8).

La comparaison des graphes d'homogénéité sur  $3500 \mu m$  montre des similitudes. Une zone fortement hétérogène apparaît à des distances différentes ( $2800 \mu m$  et  $1300 \mu m$ ).

Après coloration histologique d'une coupe de tissu, trois zones se démarquent (figure 8.9). La première localisée en haut de la figure correspond à la partie du tissu la plus proche de la prothèse. Elle contient un certain nombre de débris métalliques (point noir sur le cliché) et de polyéthylène de formes caractéristiques. Des cellules macrophages et géantes sont présentes et phagocytent ces débris. La zone suivante qui apparaît en bleu sur le cliché représente un tissu fibreux très dense constitué de fibres de collagène et de fibroblastes. Dans de ce tissu, une multitude de particules noires, probablement de très petits débris, très peu visibles, se répartissent. La dernière zone, en bas du cliché, est du tissu adipeux.

La figure 8.10 réalise la comparaison de l'évolution de la concentration de Ti avec le paramètre d'homogénéité H de ce même élément, en fonction de la distance à l'implant. Une cartographie élémentaire de  $700 \times 700 \mu m^2$  donne la répartition de Ti. Au fur et à mesure que la teneur en titane diminue, sa répartition devient de plus en plus hétérogène.

Le schéma (figure 8.11) résume les résultats concernant l'homogénéité. Globalement en début de profil, les concentrations en éléments Ti, V, Cr, Co sont plus homogènes, comportement logique puisque la densité de débris est plus importante en cet endroit.

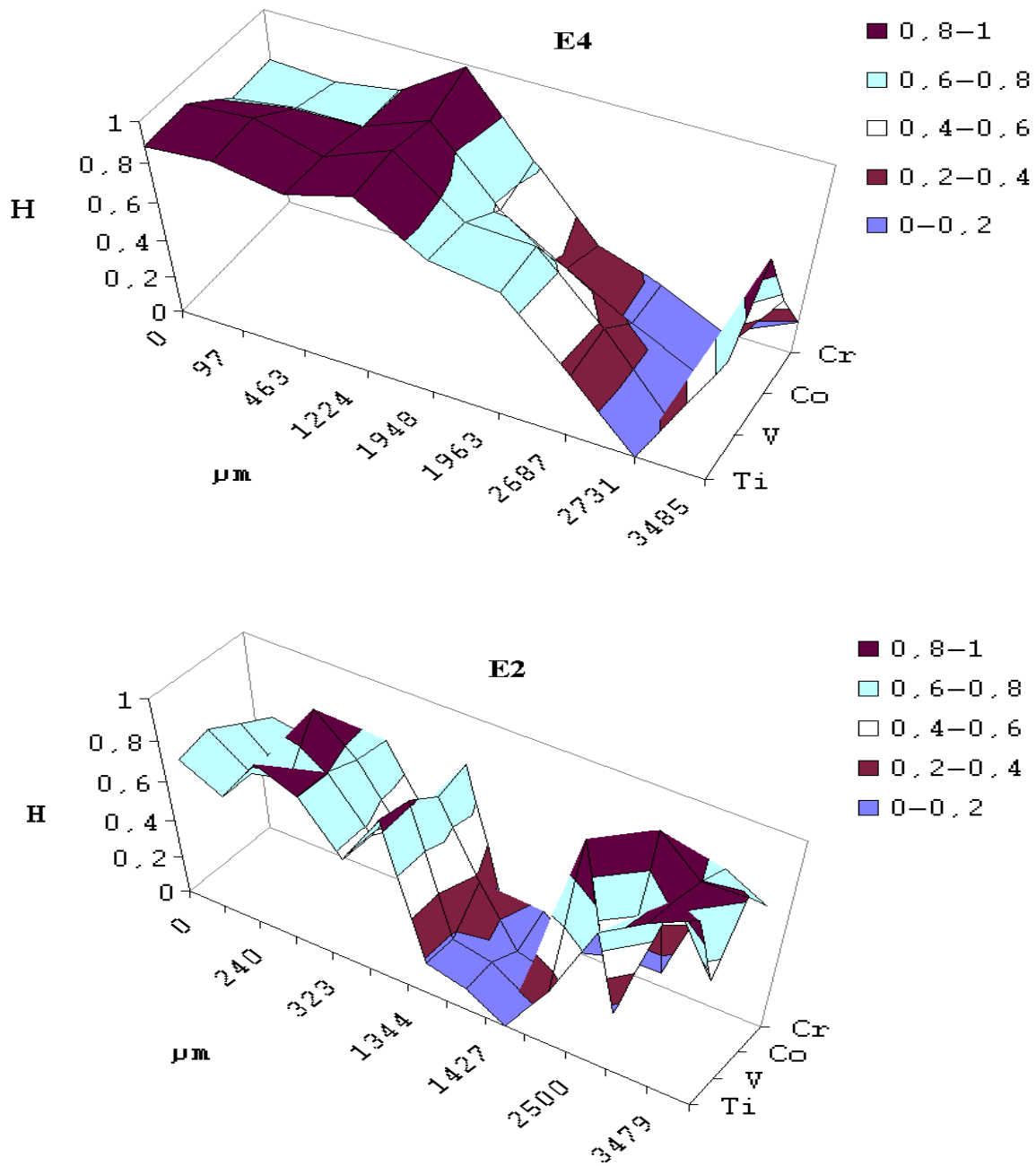


FIG. 8.8 – Evolution de l'homogénéité relative des éléments métalliques Ti, V, Cr, Co de la zone proche implant vers l'extérieur du tissu. Haut :  $E_4$ . Bas :  $E_2$ .

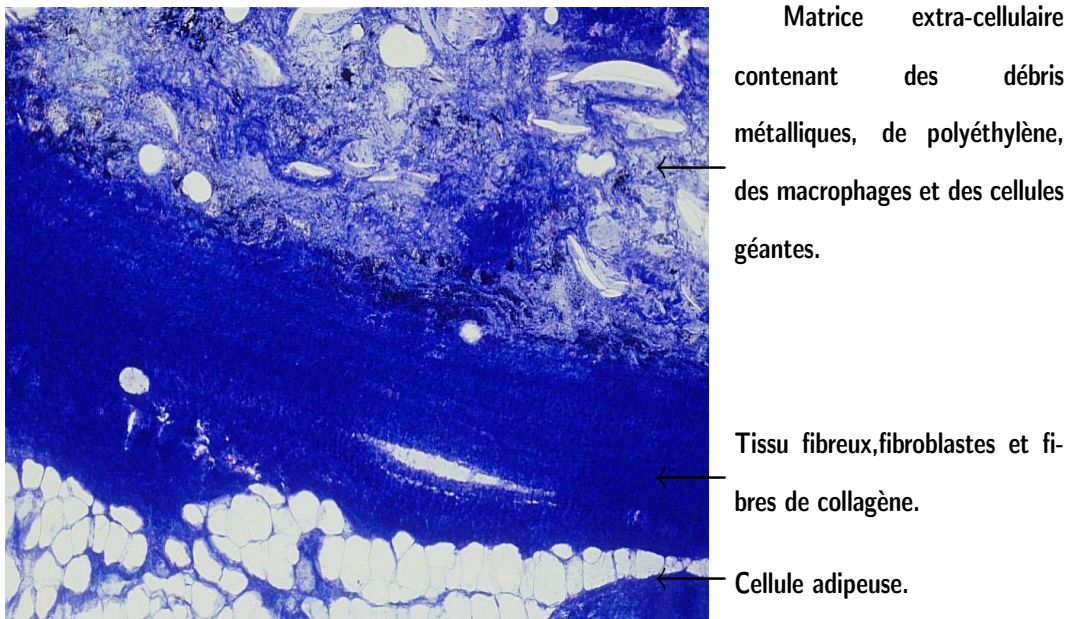


FIG. 8.9 – Observation au microscope optique d’une coupe de tissu capsulaire inclus en résine colorée au bleu de toluidine (X10).

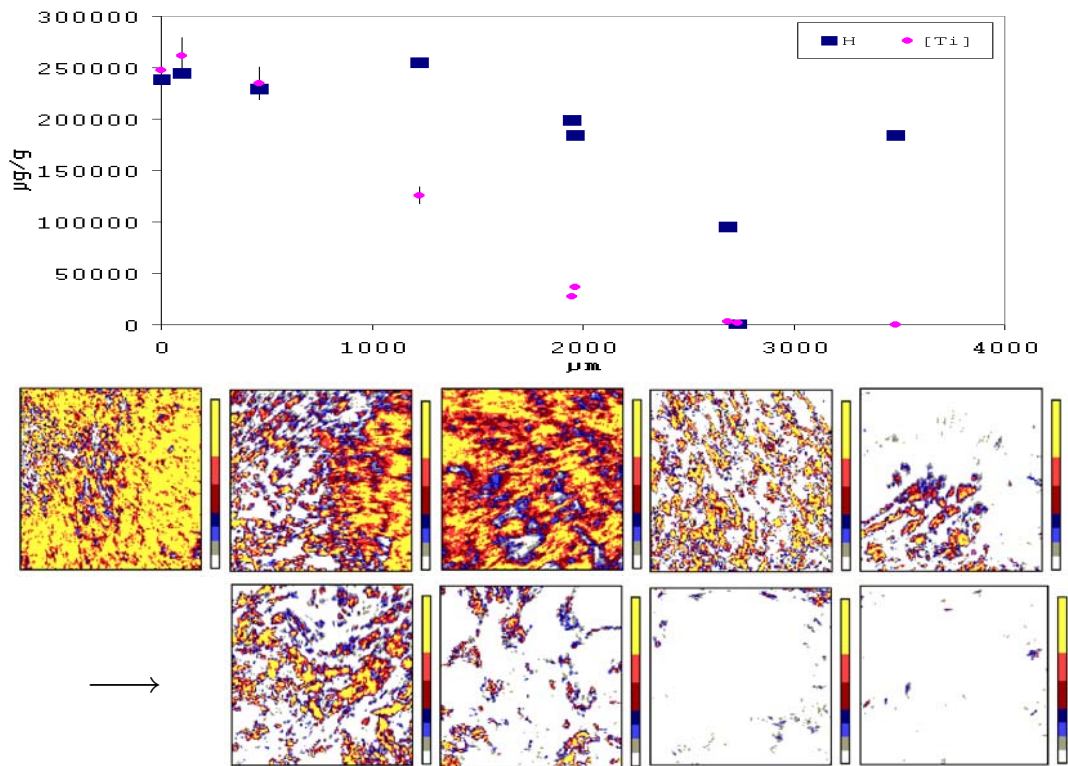


FIG. 8.10 – Comparaison de l’évolution de la concentration du Ti en  $\mu\text{g/g}$  avec son paramètre d’homogénéité H en fonction de la distance à l’implant. Les cartographies ( $700 \times 700 \mu\text{m}^2$ ) illustrent la répartition de Ti à chaque coordonnée ( $\mu\text{m}$ ).



<b>Concentration élevée</b>	<b>Concentration intermédiaire</b>	<b>Faible concentration</b>
<b>Homogène</b>	<b>Hétérogène</b>	<b>Homogène</b>

FIG. 8.11 – Bilan sur le comportement de la dispersion des concentrations en fonction de la concentration.

La partie interne du tissu contient logiquement plus de débris, répartis de façon homogène. Ensuite, quand ils migrent, leur homogénéité diminue. Certains débris sont phagocytés et le tissu fibreux dense bloque la migration des plus gros débris. Cet interface de tissu fibreux correspond à une zone de forte hétérogénéité. Cependant, les débris de plus petites tailles ou les ions franchissent ce tissu et migrent à leur tour.

## Chapitre 9

# Nature des débris

Des débris métalliques sont observés au niveau des cartographies PIXE, des clichés histologiques et des images STEM.

### 9.1 Cartographies PIXE et clichés histologiques

La photographie de la figure 9.1 illustre la répartition des morceaux de prothèses dans le tissu capsulaire du genou. La coupe de tissu est colorée au bleu de toluidine. Les zones noires ou sombres correspondent aux débris métalliques dans le tissu. Ce cliché renseigne de façon qualitative sur la répartition des grains d'alliage, leurs dimensions, leurs formes et les réactions biologiques associées.

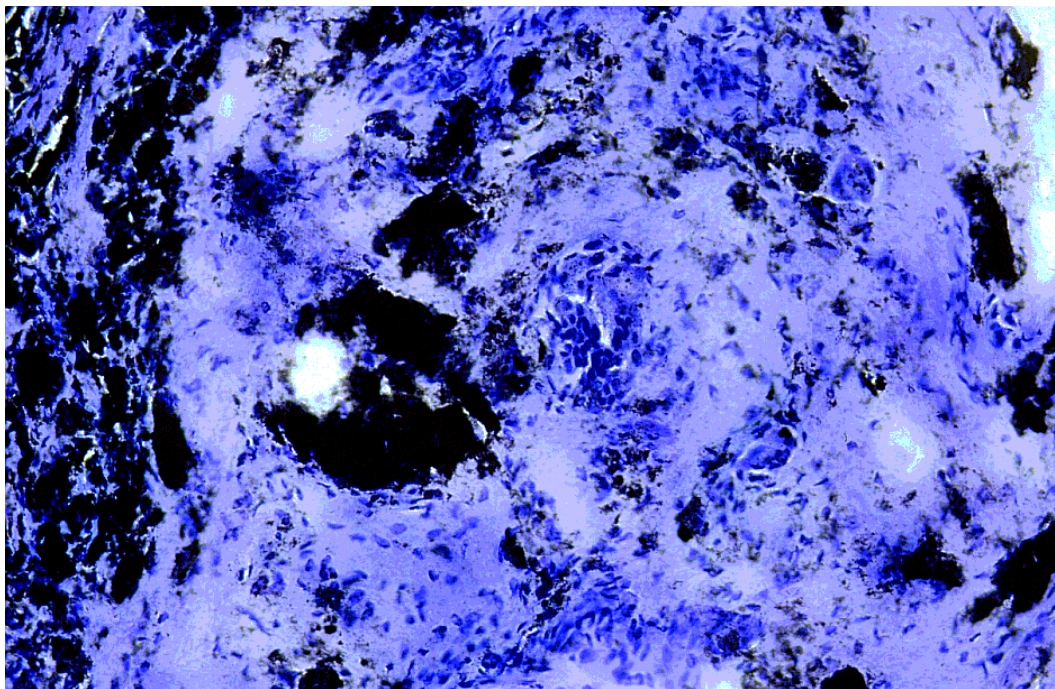


FIG. 9.1 – Observation au microscope optique d'une coupe de tissu capsulaire métallosé (X100).

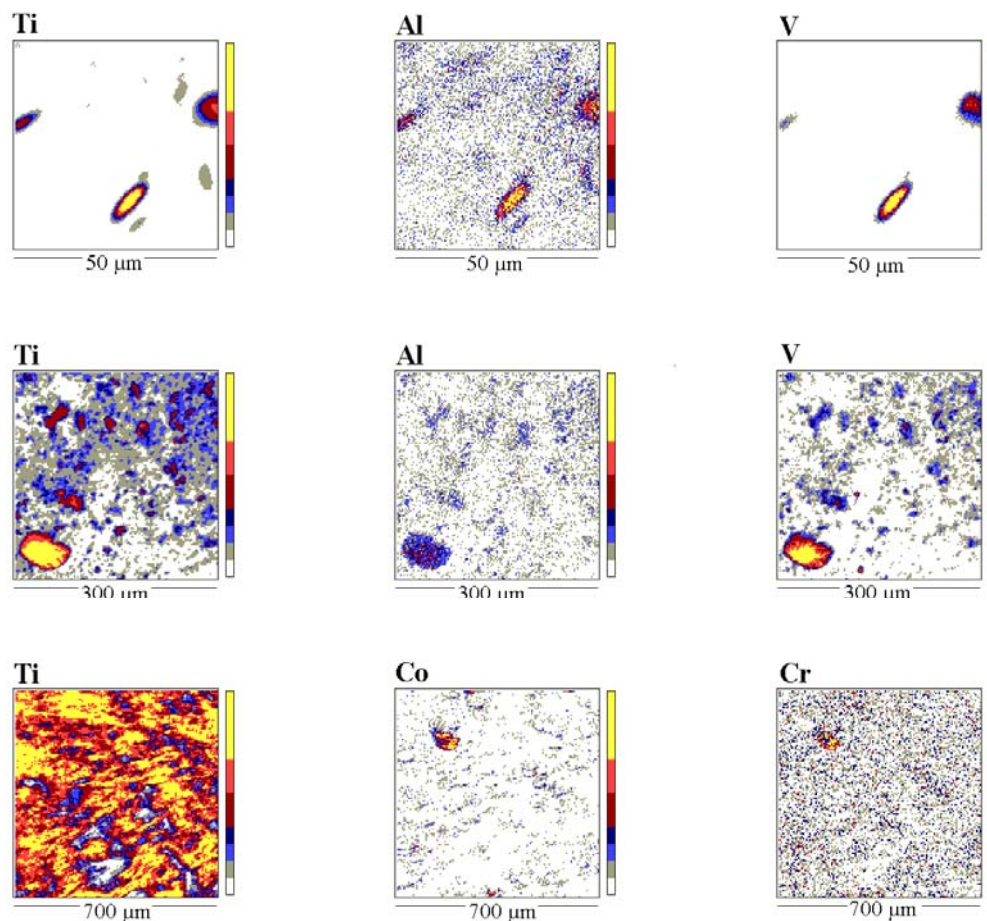


FIG. 9.2 – Cartographies des éléments métalliques Ti, Al, V, Co, Cr. Haut et bas  $E_4$ . Milieu :  $E_2$ .

Chaque ligne de la figure 9.2 donne la répartition des éléments métalliques sur une même coupe, notamment Ti, V, Al, Co et Cr. L'échelle des intensités des cartographies est donnée par une gamme de couleur allant du jaune très intense au blanc avec absence de l'élément. La corrélation géographique indique que nous sommes en présence de grains de TA6V de dimensions de l'ordre de la dizaine de  $\mu m$ . La détection de Al est plus difficile et rapidement noyée dans le bruit de fond ambiant. Cet élément léger émet des photons X de faible énergie soumis à l'atténuation par la cible, les filtres, les zones mortes des détecteurs. Les grains de TA6V présentent des formes arrondies et ovoïdes, rappelant les structures de phase de TA6V.

Les deux premières lignes donnent la répartition de Ti, Al et V sur une coupe de  $E_4$  et de  $E_2$  dans des cartographies de  $50 \times 50 \mu m^2$  et  $300 \times 300 \mu m^2$ . De nombreux grains de TA6V sont présents au sein du tissu.

La dernière ligne donne la répartition de Ti, de Co et de Cr sur une coupe de  $E_4$ . Comme pour l'ensemble des cartographies contenant du Ti, la répartition du V est identique à celle du Ti. La présence de taches de Cr et de Co indique un grain de Cr-Co-Mo de grande dimension. Le Cr en teneur plus faible est proche du bruit de fond et rend sa

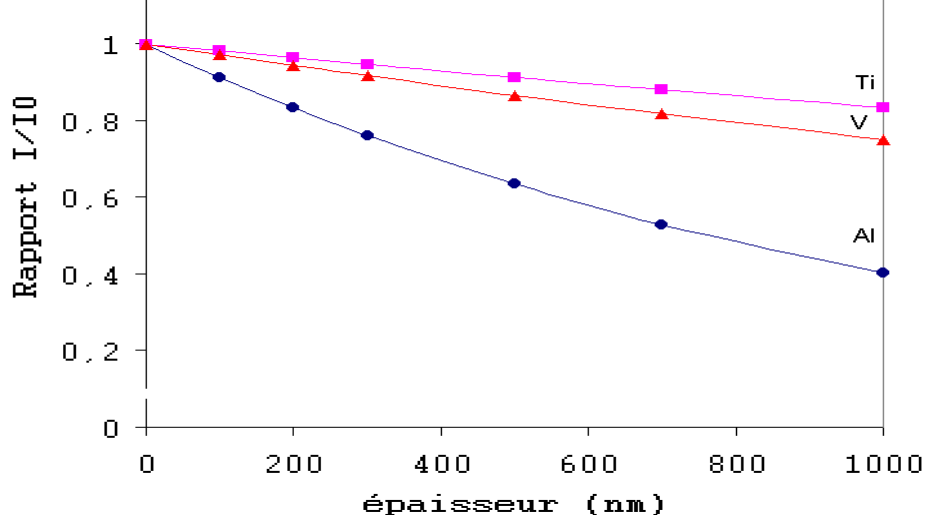


FIG. 9.3 – Rapport des intensités mesurée  $I$  et initiale  $I_0$  des raies  $K_{\alpha 1}$  de Ti, V, Al en fonction de l'épaisseur d'une cible de TA6V pur

détection moins facile. La cartographie de Ti caractérise un tissu fortement contaminé en TA6V et de façon homogène. Si les grains ont une dimension inférieure à la résolution de notre faisceau ( $5 \mu m$ ), il est impossible d'affirmer s'il s'agit d'un amas ou d'un grain.

## 9.2 Caractérisation des débris à l'échelle nanométrique : STEM-EDXS

### 9.2.1 Phénomènes d'absorption liés aux débris métalliques

La réalisation de profil et d'image (STEM-EDXS) sur des débris métalliques, présents dans les tissus inclus en résine, sur des coupes nominales à  $100 \text{ nm}$ , permet d'une part de déterminer la nature du débris et d'autre part d'estimer au nm près leurs dimensions. Les images STEM, en champ sombre inversé, obtenues à différents grossissements (image allant du  $\text{nm}^2$  au  $\mu\text{m}^2$ ), offrent une première vision des débris dans le tissu. Après repérage de grains, des profils linéaires sont réalisés du centre du grain vers l'extérieur. Les photons X caractéristiques sont récoltés simultanément pendant l'interaction du faisceau d'électrons avec la cible.

Cependant, toute comparaison entre les grains et les points d'analyse doit se faire en estimant l'atténuation des photons X des éléments présents dans la cible, phénomène prépondérant parmi les différents effets de matrice.

Des incertitudes demeurent en ce qui concerne la réalisation de cibles minces. L'épaisseur nominale est fixée à  $100 \text{ nm}$  sur l'ultramicrotome mais pour des raisons techniques (affûtage de la lame, composition du bloc de résine, nature et taille des grains ...) l'épaisseur de cette cible peut varier par rapport à l'épaisseur choisie. L'autre inconnue est la profondeur du grain dans la coupe, profondeur pouvant varier d'un grain à l'autre et d'un échantillon à l'autre. La comparaison des intensités des photons de Al, Ti, V, entre les différents profils de grain, doit tenir compte de leur atténuation. Lorsque l'épaisseur du grain est de  $100 \text{ nm}$ , la matrice est composée de métal uniquement. Elle peut être aussi inférieure à l'épaisseur de coupe, le métal et le tissu inclus en résine constituent

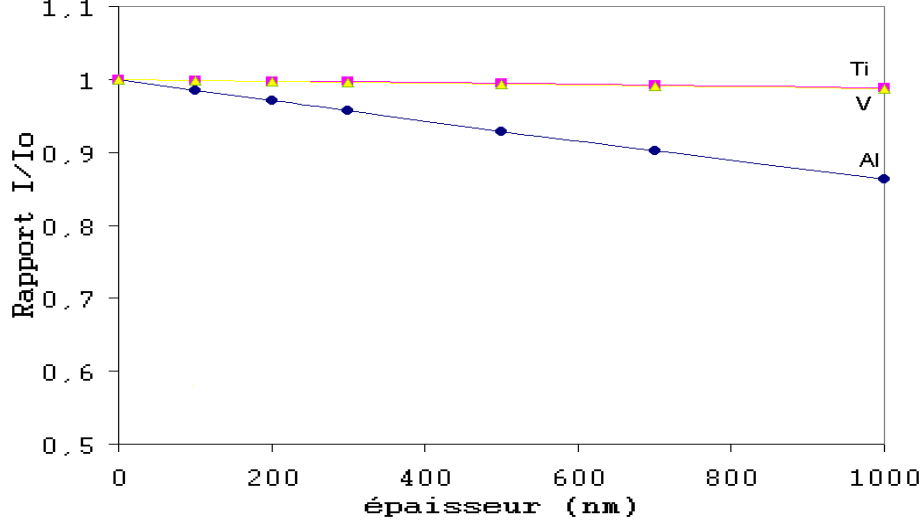


FIG. 9.4 – Rapport des intensités mesurée et initiale des éléments Al, Ti, V dans une cible de tissu inclus en résine contenant 10% de TA6V

alors la matrice.

Une mesure locale par perte d'énergie des électrons (EELS), dans un premier temps, donnerait l'épaisseur de la cible à chaque impact du faisceau ; la détermination, dans un deuxième temps, de la nature de la cible serait réalisée (EDXS). Les conditions d'irradiation différentes, suivant le type d'analyse, peuvent modifier la composition et l'épaisseur des cibles fragiles. La mesure par EELS nécessiterait une tension de  $300kV$  alors que l'analyse STEM-EDXS est effectuée à  $100kV$ .

Finalement, il résulte deux paramètres concernant nos cibles : l'épaisseur effective de la coupe et l'épaisseur du grain dans cette même coupe. Il s'agit de débris de TA6V principalement : Ti, V et Al sont présents dans le tissu. Nous nous intéressons uniquement aux raies  $K_{\alpha 1}$  de ces éléments (raies les plus probables) :  $Ti_{K_{\alpha 1}} = 4,51 keV$ ,  $V_{K_{\alpha 1}} = 4,95 keV$ ,  $Al_{K_{\alpha 1}} = 1,48 keV$  ; et à leur atténuation dans la cible. Le calcul de l'atténuation d'un photon par une matrice est obtenue à l'aide des formules 4.15 et 4.16.

La figure 9.3 montre que l'élément le plus sensible à l'atténuation est l'aluminium. Les éléments Ti et V ont un numéro atomique  $Z$  proche et donc des énergies similaires : leur atténuation est voisine. Pour une épaisseur de  $100 nm$ , l'intensité de la raie de l'aluminium, émise sur la face inférieure de la coupe, est atténuée de 9% dans un grain de TA6V pur, celles de Ti et de V de 1,8% et 3% environ. Pour une épaisseur de  $500 nm$ , les atténuations sont de 36%, 12%, 9% respectivement pour Al, V, Ti.

La composition du tissu inclus en résine est déterminée à partir des analyses R.B.S. Si l'on regarde l'atténuation des mêmes raies pour une cible de tissu inclus en résine contenant 10% de TA6V (figure 9.4), l'absorption de l'Al est de 1,5% à  $100 nm$  de 8% à  $500 nm$  et est inférieure à 1% quelque soit l'épaisseur pour les éléments Ti et V.

Si l'on compare l'absorption de la raie de l'aluminium pour un bloc d'alliage pur et un bloc de résine contenant 10% d'alliage distribué de façon homogène, alors pour une épaisseur de  $500 nm$ , l'alliage pur atténue le faisceau 4,5 fois plus que la résine (figure 9.5). A épaisseur constante, plus le pourcentage d'alliage augmente dans la matrice biologique plus l'atténuation est importante.

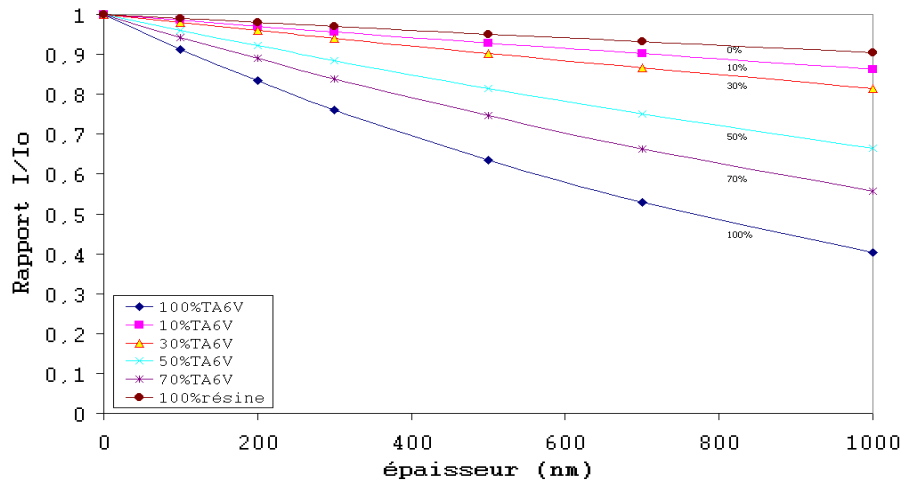


FIG. 9.5 – Rapport des intensités mesurée et initiale pour la raie de l’aluminium à différentes épaisseurs et à différents pourcentages d’alliage dans la matrice biologique, incluse en résine.

### 9.2.2 Estimation qualitative de l’absorption des rayons X des éléments métalliques dans nos échantillons

Les concentrations des éléments présents dans nos coupes de tissu inclus en résine sont estimées à partir de la méthode de Hall [78].

Les deux éléments titane et vanadium sont proches voisins dans le tableau périodique et interfèrent au niveau de la spectrométrie X : la raie  $\beta$  du titane chevauche la raie  $\alpha$  du vanadium. Afin d’estimer la concentration du vanadium, nous considérons la raie  $K_\alpha$  du titane, soustraite du bruit de fond, comme étant exclusivement liée à l’élément titane. Connaissant le rapport des intensités (probabilité de transition radiative)  $K_\alpha/K_\beta = 0.134$  du titane, nous déduisons l’intensité de la raie  $K_\alpha$  du vanadium [90].

Les intensités des éléments mesurées, après soustraction du bruit de fond continu voisin, sont divisées par le bruit de fond continu calculé sur une large bande, en dehors des raies caractéristiques des éléments présents dans la cible. Le bruit de fond continu du spectre X est relié à la masse globale de l’échantillon. Le rapport intensité caractéristique/bruit de fond continu est proportionnel à la concentration de l’élément dans l’échantillon, lorsque l’absorption est négligeable ou bien corrigée. Ces concentrations relatives sont exprimées en unité arbitraire (u.a).

Les paramètres inconnus sont l’épaisseur de coupe et la dimension du grain. Ils sont nécessaires afin d’estimer l’absorption et de pouvoir comparer les concentrations (u.a) entre elles. La méthode d’Horita [80] offre une approche qualitative dans le cas de nos échantillons et permet de visualiser l’évolution de l’absorption de l’aluminium ; sous certaines conditions : les photons X doivent être produits au moins par une des moitiés de l’épaisseur de la cible (cible mince) et il faut qu’un élément de l’échantillon, dont l’absorption est négligeable, possède une intensité proportionnelle à l’épaisseur de la cible.

La figure 9.6 décrit différentes situations que l’on peut rencontrer au niveau de nos

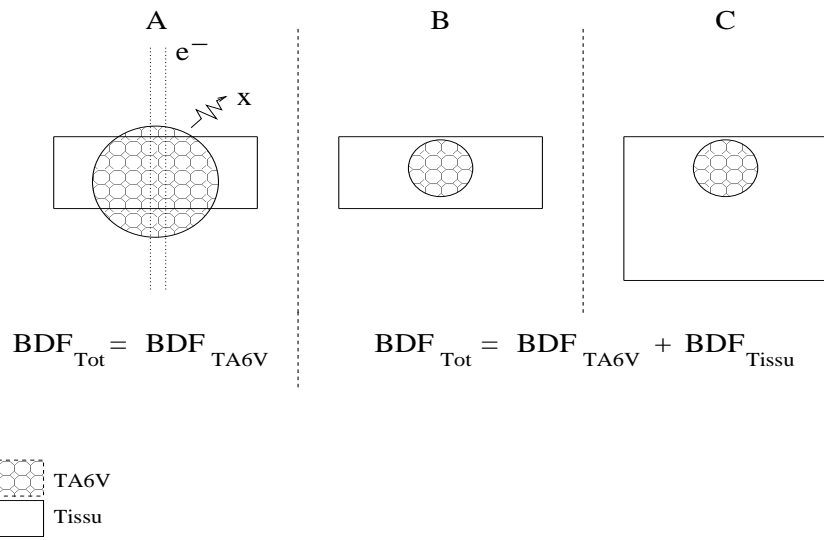


FIG. 9.6 – Schéma illustrant les différents contextes d’analyse des débris dans les coupes de tissu inclus en résine, épaisseur nominale 100 nm. A : le bruit de fond total est celui du débris de TA6V. B, C : Le bruit de fond total résulte de la contribution de celui de l’alliage et du tissu.

cibles minces. Le cas A correspond à un débris de TA6V dont l’épaisseur est supérieure ou égale à celle de la coupe. Le faisceau d’électrons traverse de part en part le grain. Le bruit de fond total ( $BDF_{Tot}$ ) est celui du grain.

Les cas B et C nous mettent en présence de deux grains d’épaisseurs identiques dans deux coupes d’épaisseur double l’une par rapport à l’autre. Si l’on se place au centre du grain lors de l’analyse, la contribution des grains au bruit de fond X est identique. En ce qui concerne la résine, leurs contributions sont doubles l’une par rapport à l’autre, à conditions que la dimension du grain soit très petite devant celle de la coupe. La coupe C étant plus épaisse que B sa concentration en TA6V est inférieure à celle de B.

Le bruit de fond généré par l’alliage est plus important que celui produit par la résine, à épaisseur égale. Supposons que nos coupes possèdent des épaisseurs de 200  $\mu m$  et 400  $\mu m$  avec des grains identiques dont l’épaisseur est petite devant celle des coupes : les concentrations sont doubles. Par exemple, si le grain présent dans la coupe la plus épaisse représente une teneur de 35 %, celle de la plus mince est de 70%. L’absorption du Ti pour les deux situations décrites s’élèvent à quelques % et est négligeable (figure 9.5). Compte tenu que ces deux situations sont proches de nos échantillons, l’intensité du Ti n’est pas ou peu soumise à l’absorption dans des coupes de l’ordre de la centaine de nm. L’intensité du Ti est bien proportionnelle à la quantité d’alliage dans la coupe considérée quel que soit l’endroit.

### 9.2.3 Variation de l’absorption le long des profils de concentration

Lors de la réalisation des profils sur des grains par STEM-EDXS, l’absorption la plus importante concerne l’élément léger Al. Une zone relativement constante en concentration au centre du grain est observée. Ensuite, les teneurs diminuent rapidement lorsque

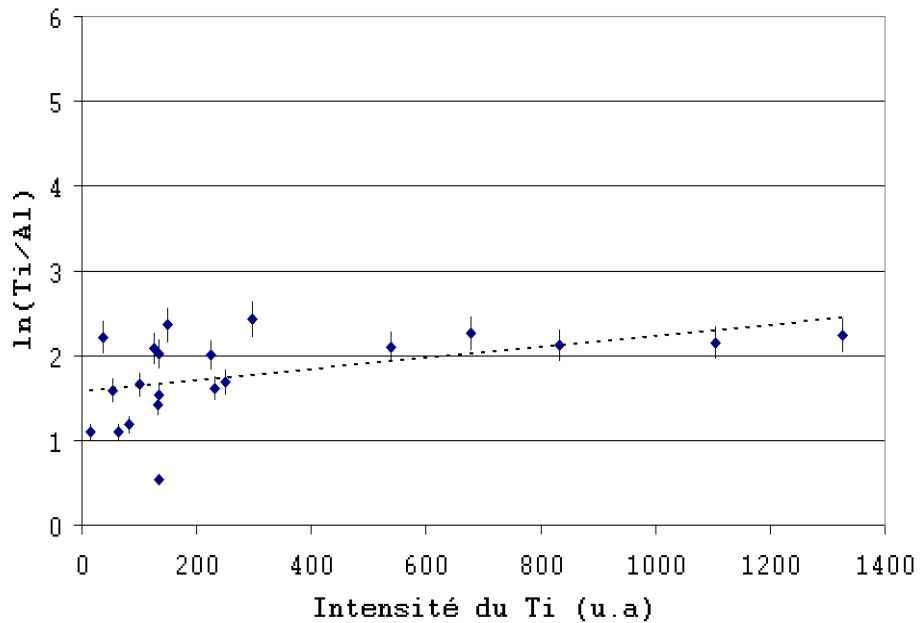
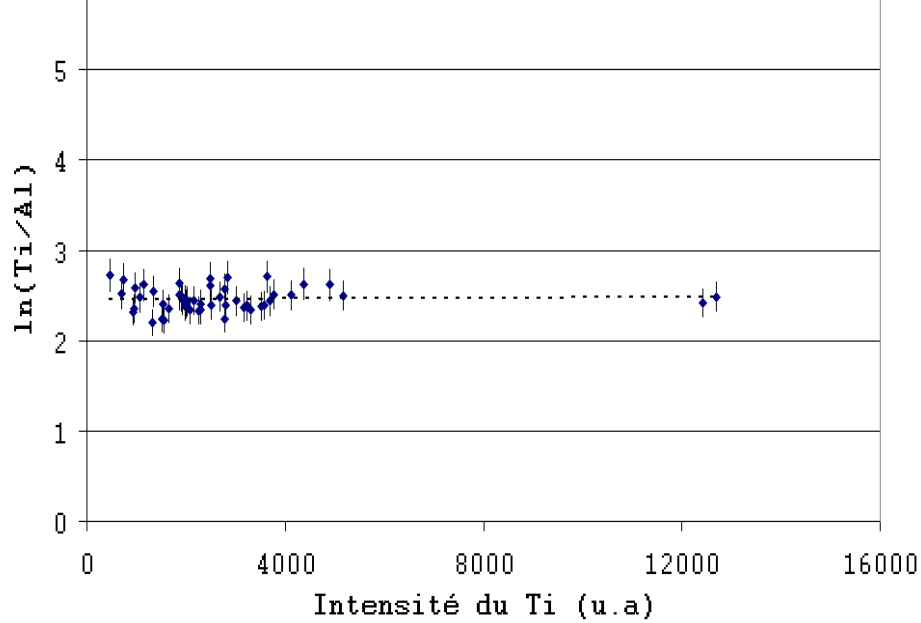


FIG. 9.7 – Logarithme du rapport des intensités Ti/Al en fonction de l'intensité du titane. Haut : centre du grain . Bas : bordure de grain .

l'on se rapproche vers le bord du grain.

Horita suppose que les échantillons sont homogènes et que seule l'épaisseur varie. L'intensité de l'élément majeur non soumise aux phénomènes d'absorption est proportionnelle à l'épaisseur. Nous avons vu, que pour nos échantillons, Ti n'est pas soumis à l'absorption. Son intensité est proportionnelle à l'épaisseur du grain. L'observation de  $\ln(\text{Ti}/\text{Al})$  logarithme du rapport des intensités de Ti et Al, avec Ti élément majeur, en fonction de l'intensité de Ti, indique si les photons de Al sont affectés par l'atténuation



dans la cible. Bien que l'épaisseur du grain varie, un rapport constant montre que celle-ci n'a aucune influence sur l'amplitude d'absorption. Afin de comparer les résultats relatifs aux trois éléments présents dans l'alliage, il est nécessaire que l'absorption de Al soit identique.

La figure 9.7 montre le comportement de  $\ln(\text{Ti}/\text{Al})$  en fonction de de l'intensité de Ti au centre et en bordure de grain. La variation de l'intensité de Ti est liée à une variation de l'épaisseur du grain. L'absorption de Al est constante quel que soit l'intensité de Ti. Les conditions d'analyses sont identiques. Il est possible de comparer les intensités ou les concentrations de ces grains afin de généraliser. Les constats établis concernent une zone englobant la majorité du grain, sauf la bordure.

On observe une grande dispersion des valeurs en bordure de grain (graphe du bas figure 9.7). Les teneurs en alliage sont plus faibles et l'épaisseur de résine est plus importante. Ces conditions propres à chaque grain rendent l'extraction d'information en bordure difficile, l'absorption n'étant pas constante. Finalement, la dispersion des mesures peut provenir d'une atténuation des photons de Al sur certaines coupes par rapport à d'autres (phénomènes d'épaisseur), d'une modification de la composition de l'alliage par le milieu ou bien d'un changement de phase.

Le tracé du bruit de fond pour différents échantillons en fonction de l'intensité de Ti en bordure de grain, montre que pour des intensités de Ti identiques le bruit de fond évolue (figure 9.8). L'absorption de Ti est toujours négligeable dans la cible et la densité du tissu inclus en résine est considérée comme constante. A intensité de Ti équivalente, il est possible d'observer que l'intensité du bruit de fond varie d'un facteur 2 à 4 indiquant des épaisseurs de coupes différentes.

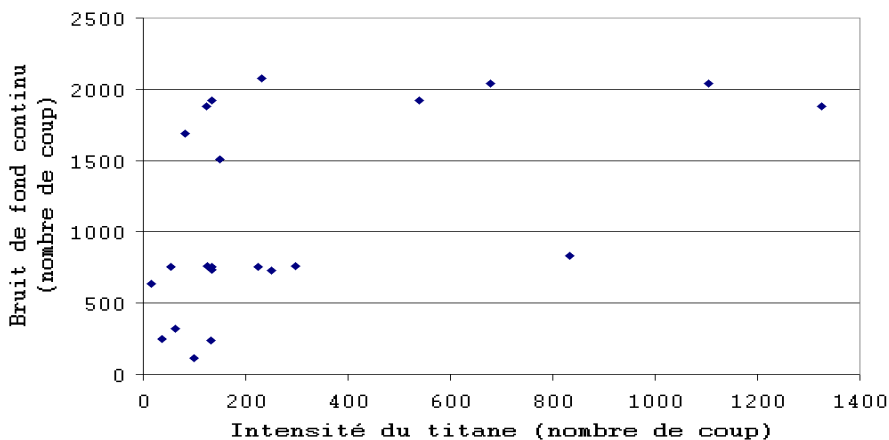


FIG. 9.8 – Tracé du bruit de fond continu en fonction de l'intensité du titane, zone fin de profil.

Le tracé des rapports des intensités en fonction de l'intensité de l'élément majeur de ce matériau indique si il y a une modification ou non de l'atténuation en fonction de l'épaisseur de la cible [80].

## 9.2.4 Localisation du grain d'alliage dans la coupe

Une épaisseur trop importante de tissu par rapport aux valeurs nominales de coupes, fausse l'épaisseur du grain par l'absorption qu'elle engendre.

La localisation du grain dans la coupe de tissu inclus en résine peut influencer l'atténuation de Al. Pour des intensités de Ti identiques, la concentration de cet élément d'après Hall [78] est liée au fond continu (équation 4.7). Le bruit de fond provenant de la résine est directement proportionnel à son épaisseur (équation 4.5).

Des photons de Al et Ti provenant de grains métalliques identiques (épaisseur) et pénétrant dans la résine située entre le grain et le détecteur subissent une atténuation. Le critère cible mince étant toujours respecté, le logarithme du rapport de leurs intensités  $\ln(Ti/Al)$  est proportionnel, à une constante près, à l'épaisseur de résine (équation 4.23). En considérant des zones d'analyses où l'intensité de Ti est la même, ainsi que des rapports Ti/Al en sortie de grain identiques, il est possible d'estimer la localisation du grain dans la coupe.

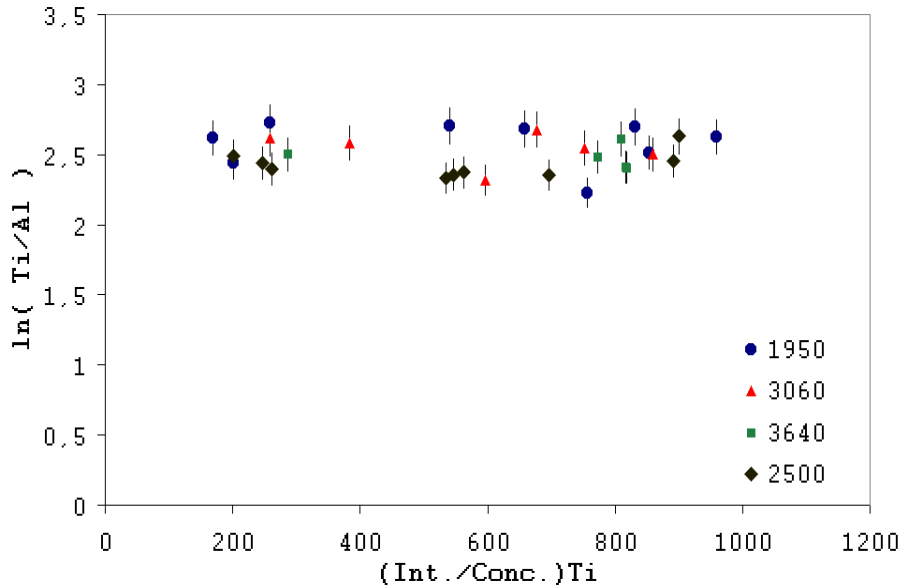


FIG. 9.9 – Logarithme du rapport des intensités Ti/Al en fonction du rapport (intensité/concentration) de Ti pour quatre valeurs d'intensité Ti.

Le logarithme du rapport des intensités  $\ln(Ti/Al)$  en fonction du fond continu de la résine est tracé sur la figure 9.9. Les intensités de Ti sont regroupées par valeur. Les intensités moyennes en (u.a) de chaque population sont  $3640 \pm 75$ ,  $3060 \pm 170$ ,  $2500 \pm 160$ ,  $1950 \pm 59$ . Le rapport intensité sur concentration de Ti (équation 4.7) est directement proportionnel au bruit de fond continu, et par conséquent à l'épaisseur de résine.

L'épaisseur de tissu inclus en résine n'influence pas le rapport  $\ln(Ti/Al)$ . L'épaisseur de résine recouvrant les grains est négligeable comparée aux dimensions des grains. L'excédent de résine contribuant à un bruit de fond plus important se localise sous le grain.

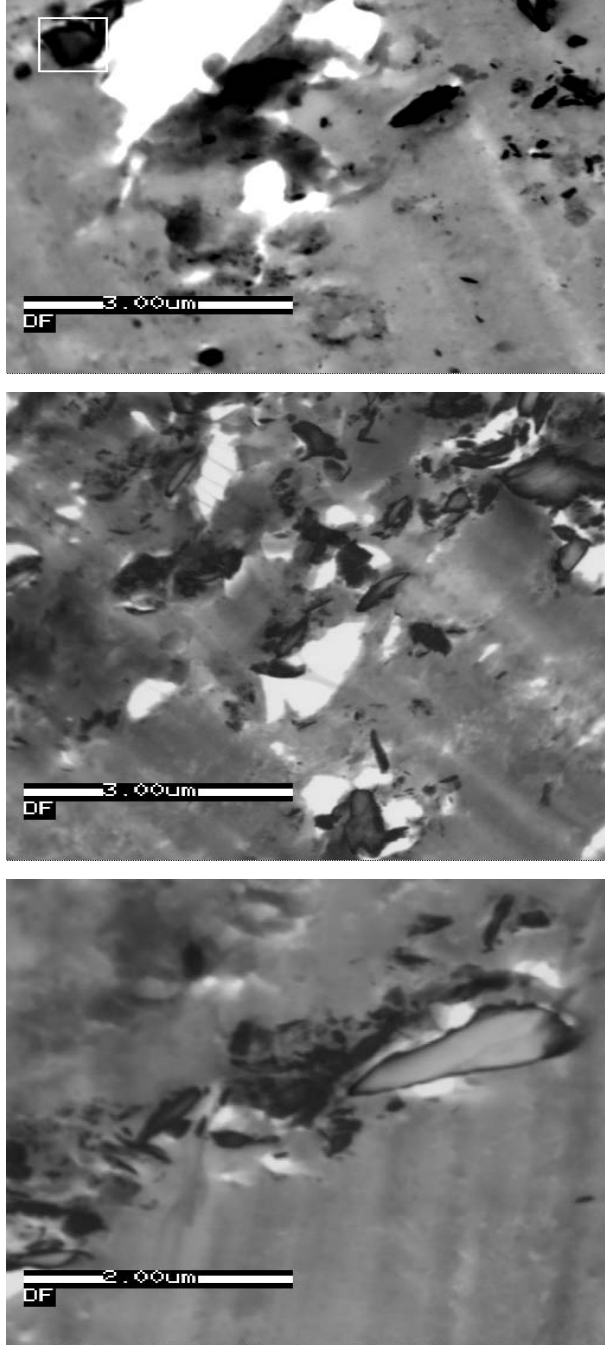


FIG. 9.10 – Images obtenues par STEM, en champ sombre inversé, des débris métalliques présents dans les tissus. Haut :  $E_4$ .  $E_3$  au centre et en bas.

### 9.3 Taille et morphologie des débris

L'observation des images (figure 9.10) montre que les débris ont des dimensions qui varient de quelques  $\mu m$  à la dizaine de nm. Suivant l'échantillon et la zone d'analyse, la densité de ces débris est plus ou moins importante. L'alliage TA6V est le métal responsable de la plus forte contamination en débris métalliques. Des formes de débris apparaissent régulièrement plus ou moins arrondies ou lamellaires rappelant la structure de phases  $\alpha - \beta$  de l'alliage TA6V.

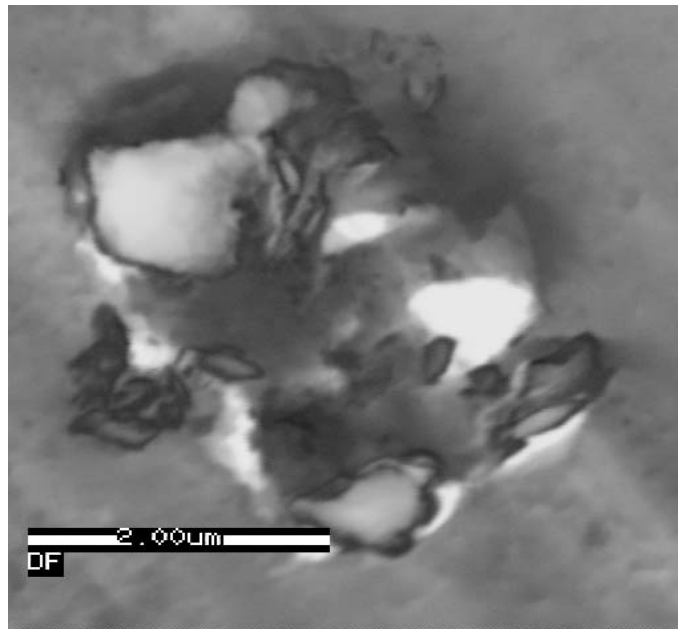


FIG. 9.11 – Images obtenues par STEM en champ sombre inversé, des débris métalliques ( $E_2$ ). L'image inférieure réalise un zoom des débris situés à gauche, sur l'image supérieure

Des zones très denses en débris sont observables avec formation d'amas de débris. Ces amas sont la conséquence d'une accumulation au cours du temps de débris dans des zones préférentielles ou de la dissolution d'un gros débris. Les images de la figure 9.11 montrent qu'un débris de plusieurs  $\mu m$  a pénétré le tissu en profondeur. Un agrandissement suggère une dissolution d'un grain de dimension micrométrique en plusieurs débris nanométrique.

La figure 9.12 illustre la détermination de la dimension précise des grains par STEM-EXDS. Les débris sont repérés à partir des images en champ sombre inversé par STEM.

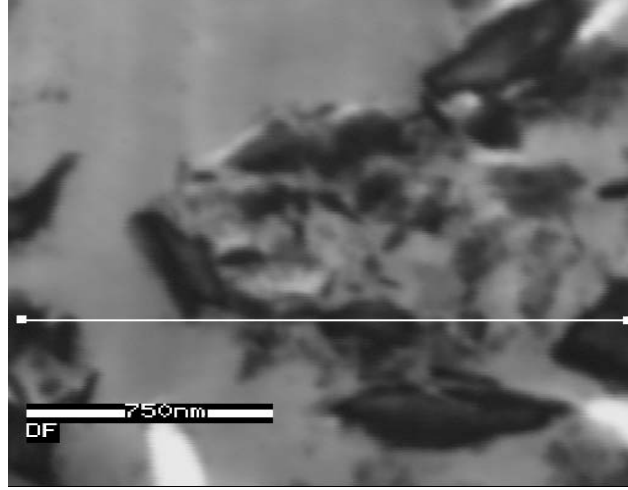
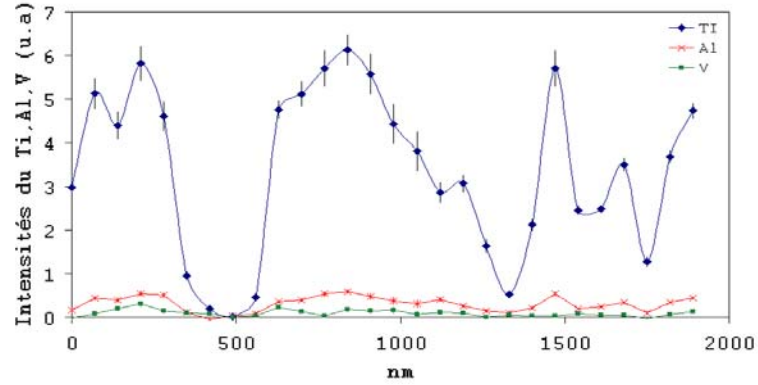
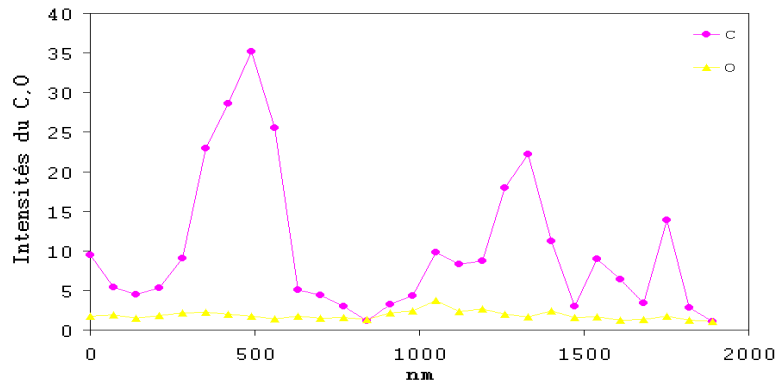
**A****B****C**

FIG. 9.12 – A : Réalisation de profils de concentration par balayage sur des débris métalliques, repérés suivant le trait blanc (image en champ sombre inversé, STEM). B : Intensité de Ti, Al, V depuis le début du balayage (coord. 0) jusqu'à la fin (coord. 2000). C : Intensité du C et O suivant le même balayage.

Ensuite un balayage du faisceau d'électrons est effectué suivant une ligne, choisie en fonction des débris (pixel de  $30 \times 30 \text{ nm}^2$ ). L'ensemble des photons émis par ce pixel est récolté par un détecteur Si(Li)(EDXS) à fenêtre ultra-fine. L'intensité du Ti, V, Al, C, O est tracé en fonction de la distance de balayage, balayage concrétisé par un trait blanc sur l'image de la figure 9.12.

Les analyses par STEM-EDXS montrent qu'il s'agit de débris de TA6V, car sur chaque impact sont récoltés les photons de Ti, Al et V et le profil des éléments est similaire. L'évolution du Ti, élément majeur, permet d'estimer, à 30 nm près, la taille des grains, qui d'après son profil (figure 9.12) sont de l'ordre de la centaine de nm. L'intensité du carbone représente le négatif du Ti. Quand le titane diminue, le carbone augmente et donc la couche de tissus inclus en résine augmente. Les phénomènes d'absorption de la raie du carbone ne sont pas pris en compte sur ces profils, mais l'épaisseur des grains varie au sein de la coupe. L'intensité du carbone est minimum pour une intensité du titane maximum. Le carbone est présent malgré tout en ces points extrêmes, il subsiste un peu de matière biologique et les grilles ont un dépôt de carbone. Les variations de l'intensité de Ti ou de C renseignent éventuellement sur la morphologie des grains. Ces morphologies peuvent être corrélées au type d'usure de l'implant, ou à la date d'arrivée des grains dans le tissu.

## 9.4 Composition des débris

Les images STEM obtenues en champ sombre permettent le repérage de débris de grande dimension. L'image supérieure de la figure 9.13 est un agrandissement du grain repéré en haut et à gauche de la figure 9.10. Un profil est réalisé par pas de  $30 \times 30 \text{ nm}^2$  du centre du grain vers l'extérieur.

La figure 9.14 montre l'évolution des concentrations des éléments présents dans le débris du centre du grain vers l'extérieur. Tous les débris analysés sont des grains de TA6V, aucun débris de Cr-Co-Mo n'a pu être détecté et sondé par ce protocole. Sur quatre profils, trois ont des concentrations en titane similaires. L'aluminium a le même comportement.

La comparaison des rapports de concentration Ti/Al et Ti/V (figure 9.15) dans les zones où les phénomènes d'absorption sont similaires, montre des rapports qui évoluent.

Le rapport des concentrations ou des intensités Ti/Al pour trois profils de grain ( $E_4$ ,  $E_3$ ) se situe au niveau du rapport moyen théorique de l'alliage ou bien légèrement en dessous (graphe B figure 9.15). Le rapport Ti/V ( $E_4$ ,  $E_3$ , graphe A figure 9.15), est supérieur au rapport théorique moyen de l'alliage. Ces deux constats impliquent une teneur proche ou excessive d'Al dans ces grains et un déficit en V. La détermination des teneurs théoriques massiques des éléments métalliques s'effectue sur un volume important de manière à obtenir une information moyenne et globale. Dans le cadre de l'analyse de nos échantillons sur une échelle nanométrique proche de la dimension des phases de l'alliage  $\alpha$  et  $\beta$ , ces résultats indiquent que ces grains sont principalement constitués en volume, de phase  $\alpha$  réputée riche en Al et pouvant contenir toutefois une certaine quantité de V à hauteur de 4%, au maximum.

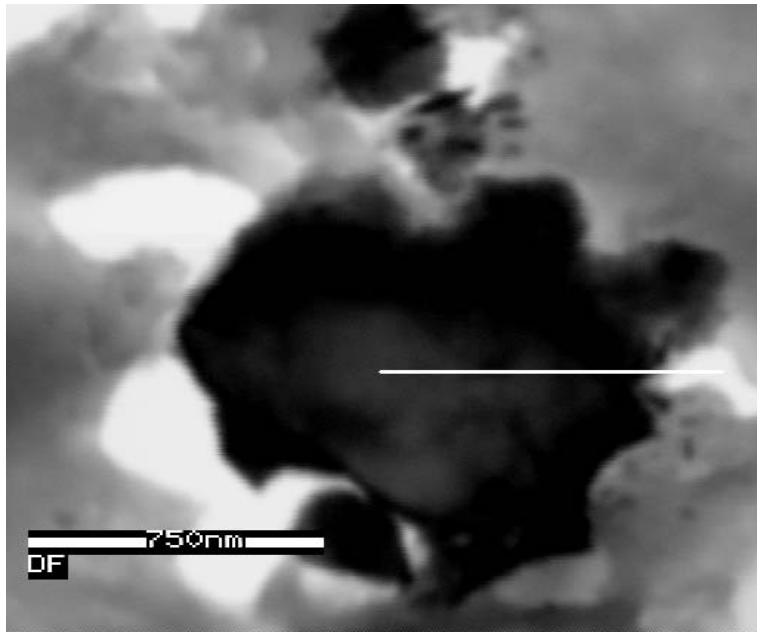
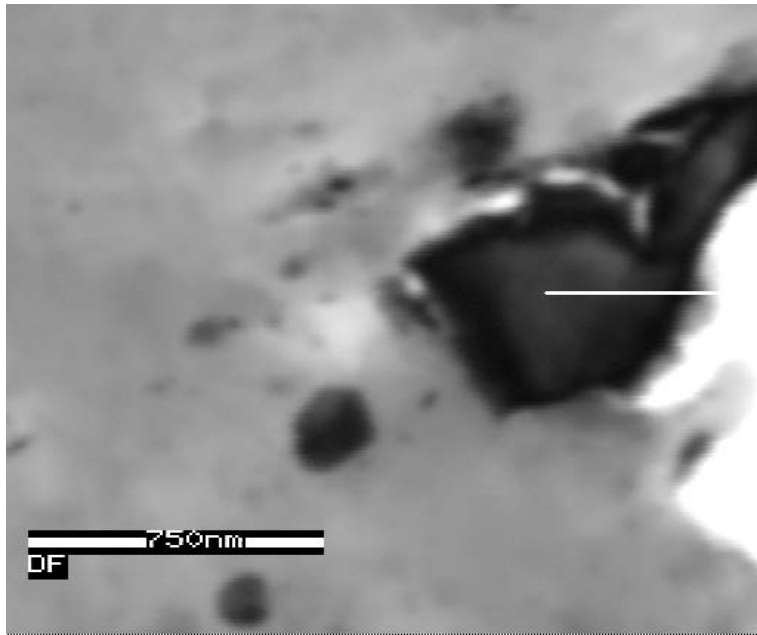


FIG. 9.13 – Images obtenues par STEM en champ sombre inversé sur des grains. Réalisation de profils de concentration par STEM-EDXS suivant le trait blanc ( $E_2$ ,  $E_3$ ,  $E_4$ ).

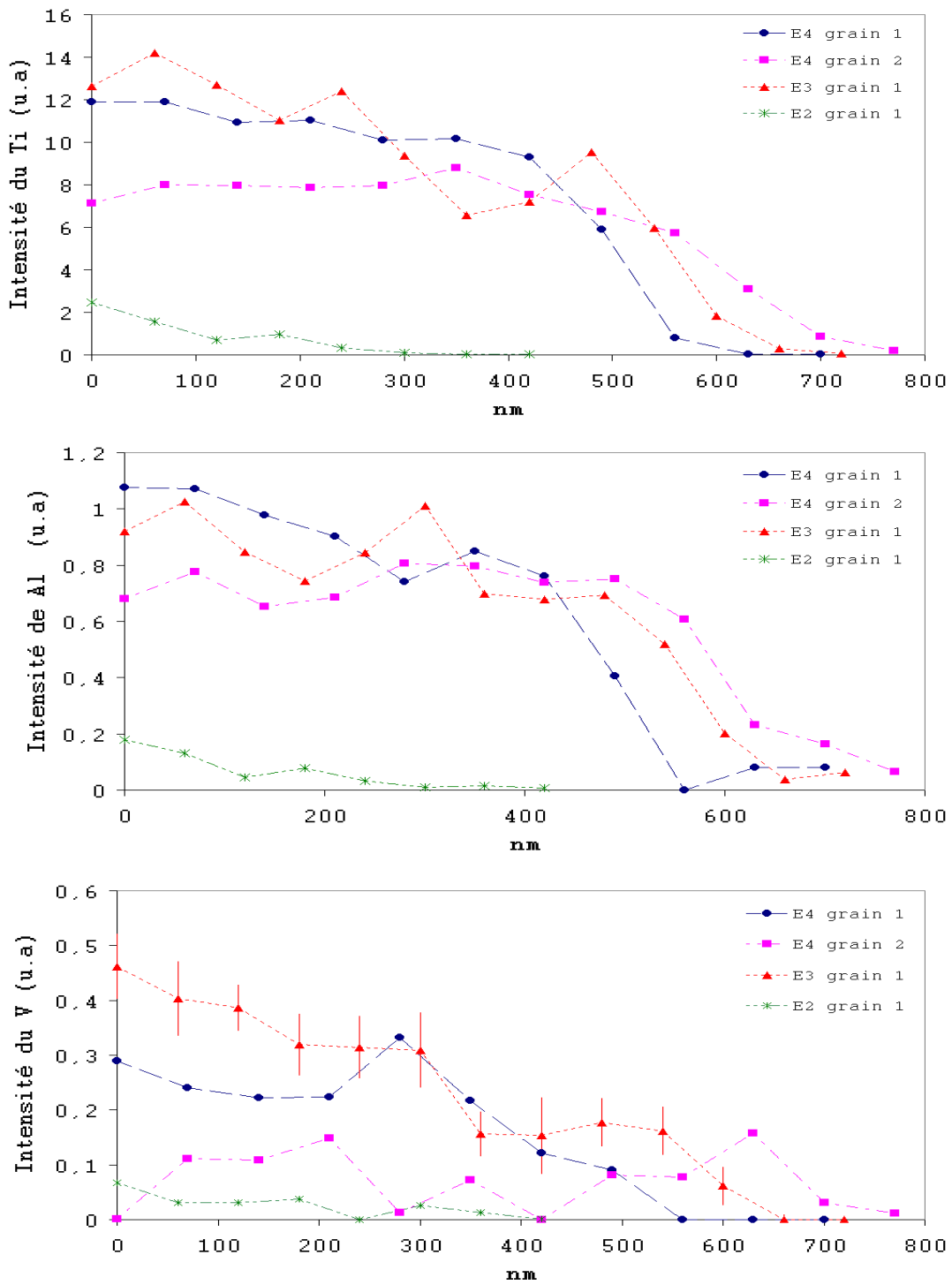


FIG. 9.14 – Concentrations de Ti, de Al et de V obtenues par STEM-EXDS sur des grains de TA6V du centre (coord. 0) vers l'extérieur du grain (coord.800), ( $E_2$ ,  $E_3$ ,  $E_4$ ).



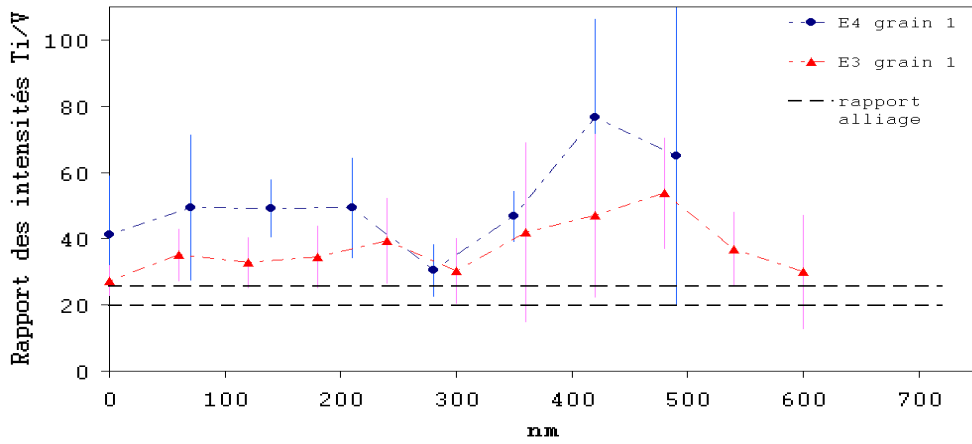
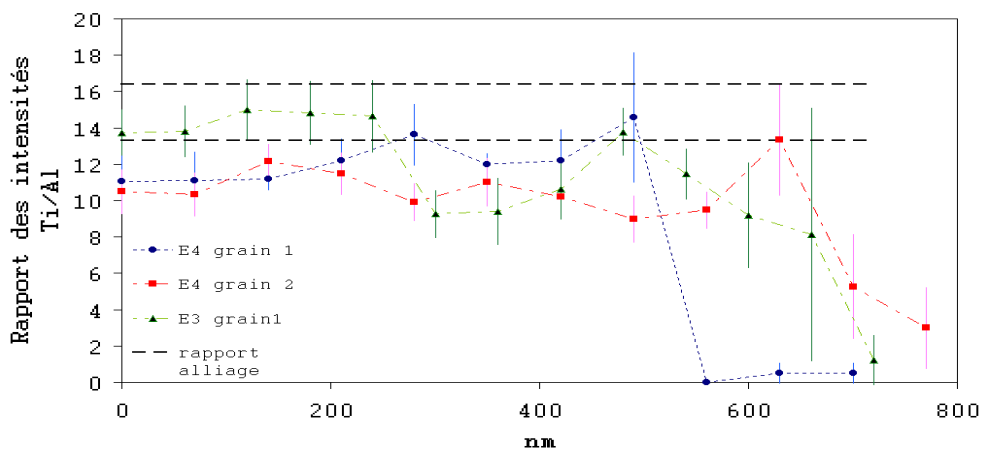
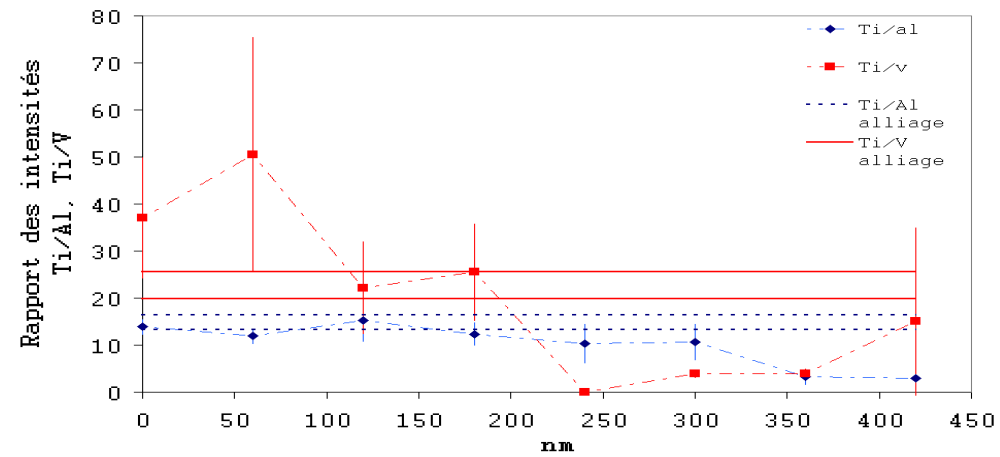
**A****B****C**

FIG. 9.15 – Comparaison des rapports des intensités. A : rapport Ti/V ( $E_4$  et  $E_3$ ). B : Ti/Al ( $E_4$  et  $E_3$ ). C : rapport Ti/Al et Ti/V ( $E_2$ ).

## Chapitre 10

# Combinaison des analyses PIXE et histologique

### 10.1 Corrélation sur des coupes adjacentes

L'analyse histologique est l'examen standard de recherche des corps étrangers. Elle distingue les différents types comme les débris de polyéthylène, de polyméthylmétacrylate ou métalliques. Cependant, elle ne peut discriminer des débris de nature différente. En réalisant les profils d'analyse par P.I.X.E, certaines coupes adjacentes sont consacrées à l'histologie dans le but de détecter les pathologies éventuelles liées aux débris. Le mode de conservation des tissus et le protocole liés à la PIXE, nous imposent une coloration des coupes au bleu de toluidine (BDT). La principale technique est l'inclusion en paraffine à partir de tissu frais.

Il existe deux types de coloration : celle standard faisant appel aux mêmes colorants que l'industrie textile et les colorations spéciales pour mettre en évidence les constituants enzymatiques (histochimie). Nos coupes de 5 à 10  $\mu m$  sont directement colorées dans un bain de BDT, sans immersion dans l'alcool ou autre solvant. Ensuite, un séchage et une différenciation dans 3 bains d'alcool successifs permettent de conserver la coupe dans du toluène.

Les analyses histologiques sont effectuées au laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique du CHU de Clermont-Ferrand (Professeur Kemeny), à l'aide d'un microscope Olympus Bx60 en lumière photonique, avec ou sans polarisation. Les échantillons les plus contaminés sont analysés ( $E_3$ ,  $E_4$ ). Il y a confirmation d'une métallose dans le tissu capsulaire pour ces deux échantillons. Sur les clichés obtenus en lumière polarisée, une grande quantité de débris de polyéthylène est aussi présente. De manière générale, les zones fortement contaminées en débris sont riches en noyaux de fibroblastes et en collagène : les réactions macrophagiques libèrent des hormones ou des médiateurs cellulaires et augmentent l'acidité du milieu, ces phénomènes sont responsables de l'apparition des fibroblastes.

Pour nos échantillons, des cellules géantes et macrophagiques ingèrent les débris dans les zones où la métallose est plus diffuse. La réponse lymphocytaire est négligeable. Le tissu n'est pas nécrosé. La présence de cellules endothéliales est liée à un drainage lym-

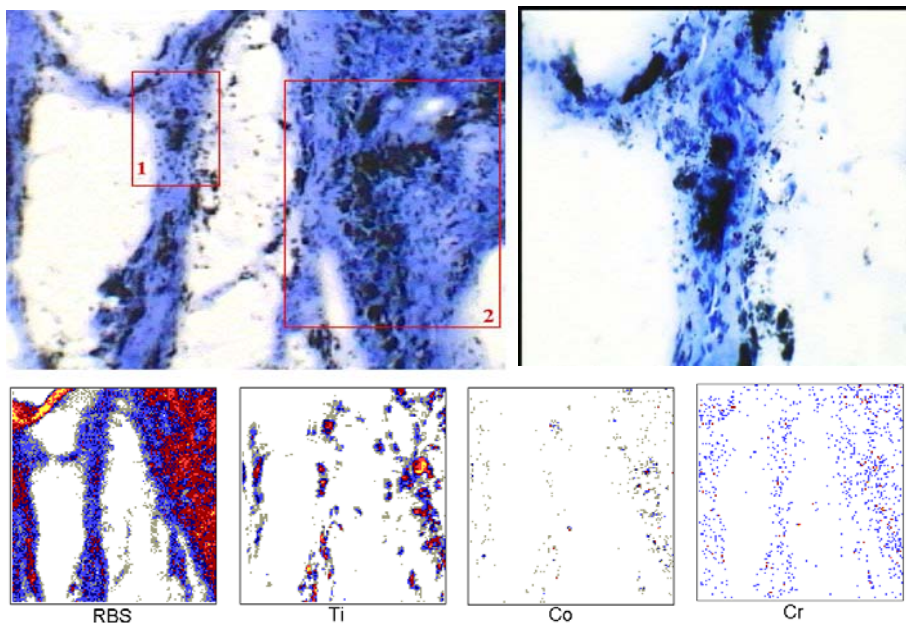


FIG. 10.1 – Analyse de coupes adjacentes. Haut : étude histologique avec réalisation d'un grossissement de la zone 1. Bas : Cartographies élémentaires ( $700 \times 700 \mu m^2$ ) de la matrice biologique (RBS), de Ti, de Co et de Cr sur une coupe adjacente à celle destinée à l'histologie,  $E_4$  .

phatique ou à une néovascularisation. Un tissu scléreux est provoqué par l'ingestion des débris par les macrophages qui augmentent l'acidité du milieu. Cette acidité provoque la fibrose. Le tissu conjonctif scléreux est dense, épais, d'aspect blanc et fortement acide à causes des débris ou pigments métalliques piégés au sein de ce tissu.

La corrélation entre les informations obtenues par P.I.X.E sur les débris métalliques dans les tissus capsulaires, avec celles obtenues par histologie sur des coupes proches ou bien adjacentes est possible en général sur une surface moyenne. Les tissus appartenant aux coupes adjacentes doivent être similaires. Les figures 10.1 et 10.2 illustrent ces constatations.

La figure 10.1 montre l'analyse par deux méthodes différentes (histologie et P.I.X.E-R.B.S) de deux zones en contact avant la découpe du tissu. Le repérage est effectué grâce aux formes similaires de l'image obtenue au microscope optique (image en haut à gauche) avec celles obtenues par R.B.S (image en bas à gauche).

Dans la mesure où les débris présents sur les deux coupes sont identiques, la cartographie donnant la répartition de Ti indique que la majorité des débris métalliques noirs sur le cliché histologique sont des grains de TA6V. Le tableau 10.1 donne les teneurs en Ti, V, Co et Cr sur les deux zones repérées (1 et 2) sur le cliché histologique de la figure 10.1, ainsi que la teneur totale de la surface analysée ( $700 \times 700 \mu m^2$ ). Comme pour les résultats obtenus précédemment, le TA6V représente la majorité des débris métalliques.

La comparaison des rapports  $[Ti]/[V]$  et  $[Co]/[Cr]$  sur la surface totale d'analyse sont de 23 et 2,8 respectivement indiquant une pollution sous forme de grains. Les teneurs

Concentration en $\mu\text{g/g}$	Surface 1	Surface 2	Surface totale
Ti	$9281 \pm 1481$	$54238 \pm 4096$	$43379 \pm 3215$
V	$515 \pm 152$	$2359 \pm 310$	$1881 \pm 198$
Cr	<LOD	$96 \pm 40$	$61 \pm 20$
Co	<LOD	$224 \pm 37$	$176 \pm 19$

TAB. 10.1 – Concentrations des éléments métalliques sur les différentes zones repérées à partir de la figure 10.1 .

relatives à la surface 1 indiquent qu'il n'y pas de grains de Cr-Co-Mo et seulement du TA6V en accord avec les cartographies élémentaires.

Le rapport  $[\text{Ti}]/[\text{V}]$  proche de 18 (surface 1) est différent du rapport précédent et du rapport théorique de l'alliage. Ce constat suggère une dissolution de ces grains de TA6V avec modification de leur stoechiométrie. Les teneurs en Co et Cr, proches du bruit de fond, rendent leur visualisation sur les cartographies moins aisée que pour Ti. Les teneurs moyennes sur de grandes surfaces indiquent une pollution particulière avec localement des dissolutions.

La figure 10.2 donne la répartition des débris métalliques sur un cliché histologique. La similitude des géométries sur les deux types images (histologiques et P.I.X.E) est sans équivoque concernant la proximité de ces coupes. Comme pour la figure précédente, les particules métalliques noires correspondent à des grains de TA6V.

Le tableau 10.2 délivre les concentrations du Ti, V, Co et Cr des différentes zones repérées et de la surface totale ( $700 \times 700 \mu\text{m}^2$ ). Les teneurs sont beaucoup plus élevées que dans le cas précédent. Les clichés histologiques des zones 1 et 2 fournissent une illustration de ce type de concentration au sein d'un tissu. Le rapport  $[\text{Ti}]/[\text{V}]$  des trois zones est égal au rapport de l'alliage tandis que  $[\text{Co}]/[\text{Cr}]$  est inférieur au rapport de l'alliage concerné et est voisin de 1,5. Un excès de Cr par rapport au Co est observable sur les cartographies élémentaires.

L'analyse de coupes adjacentes par les deux méthodes s'effectue sur des endroits proches. Nous avons mis au point un protocole permettant l'analyse d'une même zone à la fois par P.I.X.E-R.B.S et par histologie sur cible mince.

## 10.2 Corrélation sur la même coupe

L'inclusion des tissus en résine époxy permet d'obtenir des coupes fines et stables. Les échantillons sont soumis à un vide élevé. La plupart des colorants utilisés pour les inclusions en paraffine ou en résine acrylique ne pénètrent pas les inclusions en résine époxy. Le bleu de toluidine (BDT) pénètre et colore la résine époxy. Les blocs de tissu inclus sont découpés à l'aide d'un microtome. Des coupes inférieures au  $\mu\text{m}$  sont réalisables. Toutefois le contexte particulier des échantillons fortement pollués en débris métalliques

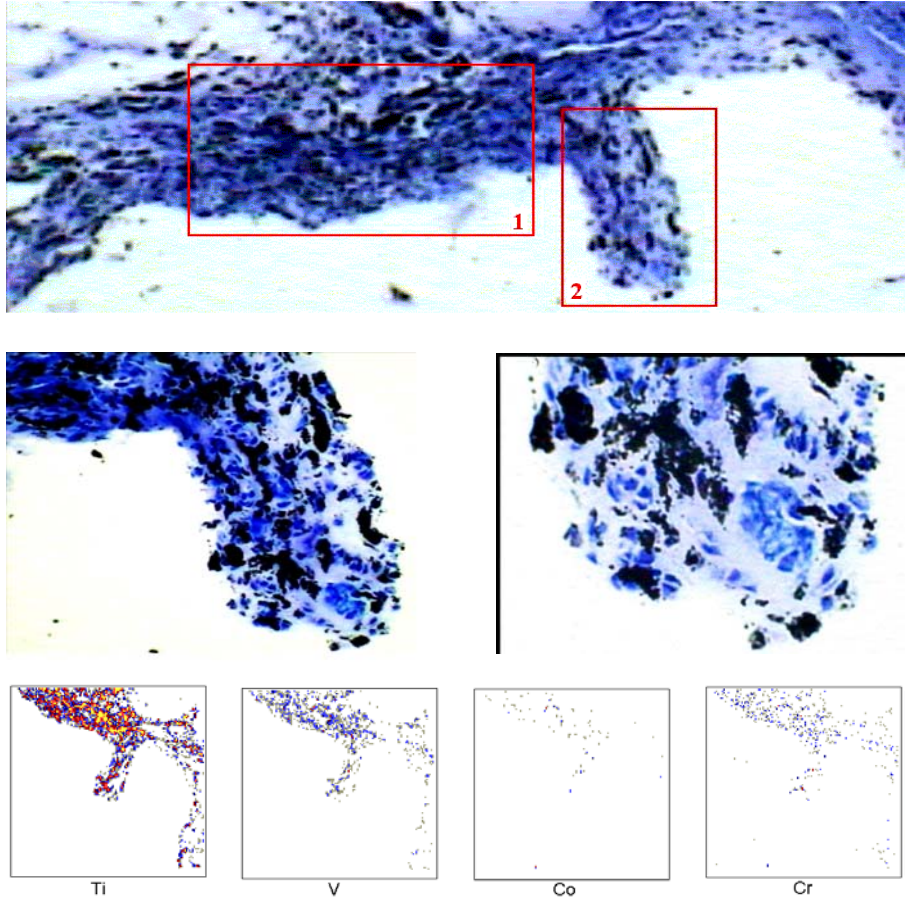


FIG. 10.2 – Analyse de coupes adjacentes. Haut : étude histologique. Milieu : Différents grossissement de la zone 2. Bas : Cartographies élémentaires P.I.X.E-R.B.S ( $700 \times 700 \mu m^2$ ) de Ti, de V de Co et de Cr sur une coupe adjacente,  $E_4$ .

Concentration en $\mu g/g$	Surface 1	Surface 2	Surface totale
Ti	$217893 \pm 15600$	$126422 \pm 8989$	$142047 \pm 10052$
V	$9511 \pm 916$	$5663 \pm 915$	$6069 \pm 559$
Cr	$1181 \pm 132$	$929 \pm 221$	$792 \pm 77$
Co	$2019 \pm 156$	$1301 \pm 111$	$1254 \pm 92$

TAB. 10.2 – Concentrations des éléments métalliques concernant les repérages de la figure 10.2.

donne des coupes de 7 à 10  $\mu m$  au minimum.

L'analyse par P.I.X.E du colorant révèle de nombreux éléments métalliques (Ti, Nd, Fe, Pb ...) susceptibles d'interférer avec les débris métalliques dans les tissus. Pour ces raisons, l'analyse par P.I.X.E-R.B.S sera réalisée avant la coloration au BDT. Les conditions expérimentales d'irradiation sont un faisceau de protons de 3 MeV (section efficace

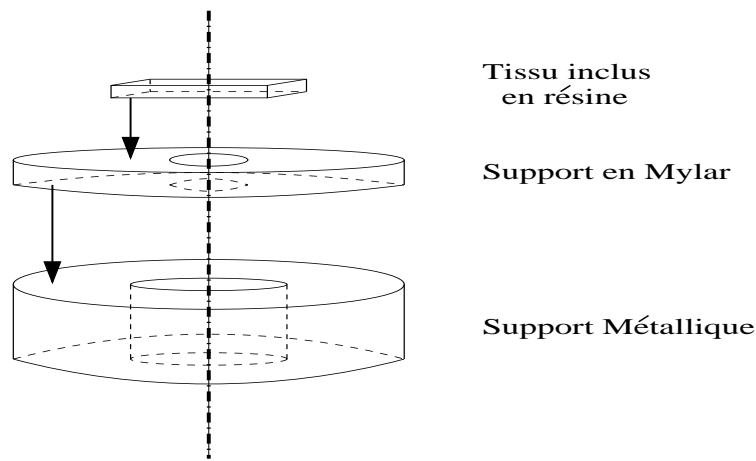


FIG. 10.3 – Description du porte échantillon pour l’analyse des cibles minces par P.I.X.E et histologie.

de production des rayons X optimum), de résolution  $5 \mu m$  avec un courant avoisinant 100-200 pA. Certains échantillons possèdent des teneurs métalliques, notamment en Ti, élevées autorisant un courant et un temps d’acquisition minimum.

La figure 10.3 montre les modifications apportées au support métallique pour le protocole P.I.X.E-histologie, destiné auparavant à recevoir les coupes de tissus lyophilisés et le formvar. Le diamètre du trou du support métallique est de 5 mm environ. Celui des supports mylar est compris entre 1 et 3,5 mm par pas de 0,5 mm. Cette superposition de trou permet l’analyse de cible mince. Les coupes ayant fait l’objet d’une analyse P.I.X.E sont récupérées et subissent une coloration classique au bleu de toluidine.

La figure 10.4 compare l’image provenant de la coloration au BDT à la cartographie élémentaire de Ti sur la même zone. La zone d’analyse par P.I.X.E est facilement repérable grâce à sa couleur bleu-clair. L’interaction du faisceau avec la coupe modifie les propriétés chimique et mécanique de la résine la rendant plus imperméable au colorant et plus fragile.

Concentration en $\mu g/g$	Surface 1	Surface 2	Surface 3
Ti	$28375 \pm 2000$	$2139 \pm 156$	$17472 \pm 1242$
V	$1336 \pm 137$	$90 \pm 18$	$774 \pm 81$
Cr	$128 \pm 18$	$42 \pm 7$	$100 \pm 12$
Co	$229 \pm 19$	$46 \pm 6$	$141 \pm 12$

TAB. 10.3 – Concentrations des éléments métalliques sur les différentes zones repérées à partir des figures 10.4 et 10.5 ainsi que pour la surface totale de l’analyse,  $E_3$ .

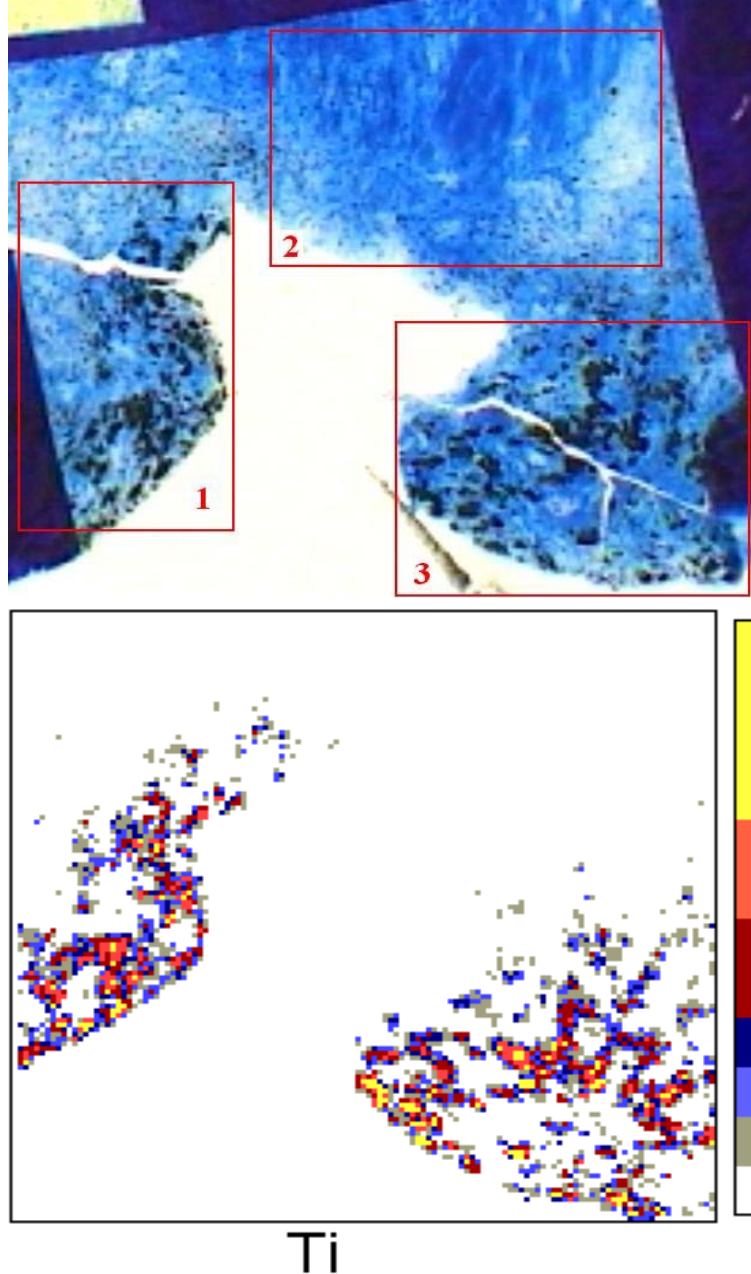


FIG. 10.4 – comparaison de l'analyse histologique au bleu de toluidine (en haut) et de l'analyse P.I.X.E (en bas) avec la répartition élémentaire du Ti,  $E_3$ .

Le tableau 10.3 donne les teneurs des zones 1, 2 et 3 en Ti, V, Co et Cr (figures 10.4 et 10.5). Les zones 1 et 3 sont plus contaminées que la zone 2 qui contient TA6V à hauteur de 2000 ppm. Cette teneur est insuffisante pour apparaître sur la cartographie élémentaire de Ti (figure 10.4). Bien que les concentrations soient très différentes, le rapport  $[Ti]/[V]$  est proche du rapport de l'alliage sur l'ensemble des zones. Les grains sont majoritaires. Les teneurs en Co et Cr sont très faibles avec un rapport compris entre 1 (zone 2) et 2 (zone 1 et 3).

Les zones 1 et 3 contiennent de gros débris de TA6V en présence de noyaux fusiformes (fibroblastes) et ronds (hystiocytes, plasmocytes, lymphocytes ...). Certains vaisseaux ca-

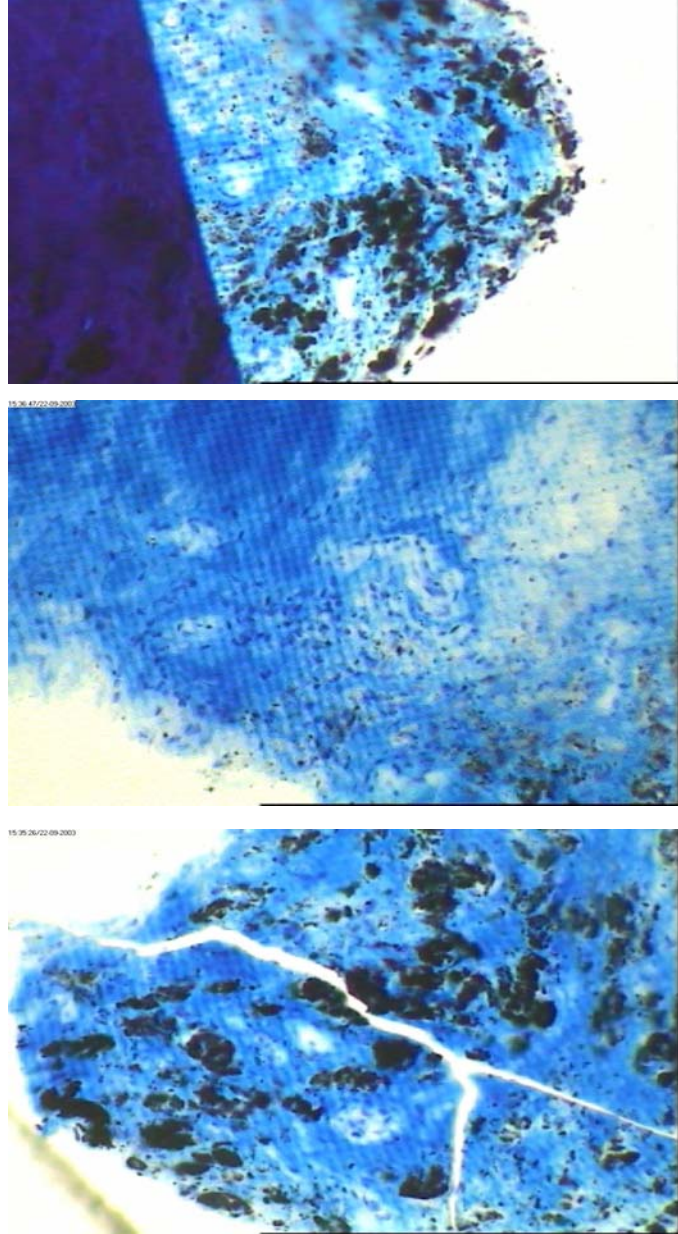


FIG. 10.5 – Grossissement des trois zones repérées sur le cliché histologique précédent de la figure 10.4,  $E_3$ .

pillaires ainsi que des fibres de collagène apparaissent. La zone 2 contient exclusivement du collagène et des muscles. Les macrophages, qui phagocytent les débris, meurent et libèrent des lysosomes acides à l'origine de l'apparition du collagène et des inflammations chroniques.

La combinaison PIXE-Histologie est le moyen de corrélérer directement la nature, la taille et la quantité des débris aux différentes réactions biologiques possibles. De nombreuses cibles ont été analysées par P.I.X.E mais le faisceau les rend plus fragiles. La diminution du dépôt d'énergie passe par la diminution de l'épaisseur de la cible et de l'intensité du faisceau.





# Chapitre 11

## Bilan et interprétations de la contamination métallique

La comparaison des teneurs en éléments métalliques Ti, V, Co et Cr dans les tissus et le témoin indique une contamination de la part des prothèses pour l'ensemble des échantillons. Il est possible de distinguer deux catégories directement liées à la nature du couple métal-métal employé. Le dispositif prothétique est le même, c'est à dire un condyle en métal séparé du plateau tibial en métal par une plaque de polyéthylène. Toutes les prothèses sont reprises après la même période.

### 11.1 Echantillons $E_1$ et $E_5$ : couple TA6V/TA6V

$E_1$  et  $E_5$  étaient en présence d'une prothèse métal-métal TA6V/TA6V dont le condyle avait subi une implantation ionique à l'azote afin de renforcer ses propriétés mécaniques. La teneur en Ti, évaluée sur  $600 \mu m$ , pour ces deux échantillons, avoisine 300 ppm ( $E_5$ ) et 1500 ppm ( $E_1$ ). Les teneurs en V sont souvent proches de la limite de détection. Le rapport de Ti et de V dans l'alliage est de 22,5. La comparaison de ce rapport à celui présent *in vivo* dans le tissu pour ces deux échantillons indique qu'il est plus faible.

Les mécanismes susceptibles de provoquer la migration de débris de l'implant vers les tissus sont l'usure par frottement, la corrosion, voire les deux associées (tribocorrosion). Dans l'hypothèse où la séparation en polyéthylène est totalement usée, un contact entre les pièces métalliques conduit rarement à une corrosion galvanique [37]. La présence d'une couche d'oxyde  $TiO_2$  à la surface de ce type d'implant les rend résistant à la corrosion. Cette couche possède en plus la faculté de se régénérer lorsqu'elle est détruite [15]. Dans des conditions de mesures identiques de corrosion *in vitro*, les alliages à base de titane rejettent 2 à 8 fois moins d'ions que les alliages Cr-Co-Mo [34].

Les débris présents dans  $E_1$  et  $E_5$  peuvent provenir d'une corrosion générale de l'implant avec migration des ions vers le tissu ou bien de débris d'usure ayant la forme de particules. Au regard du rapport des concentrations Ti/V (Echantillon  $E_5$ ) supérieur au rapport théorique de l'alliage, la contamination est de forme ionique. Pour  $E_5$ , la teneur en Ti résulte à priori d'une corrosion ou d'une dissolution globale de l'alliage. Braemer [34] constate sur des tests *in vitro* qu'un alliage à base de titane rejette 1 à 2  $\mu g/cm^2$  d'ions Ti sur 7 jours. Compte tenu de la surface de la prothèse et du mécanisme

migratoire propre au niveau de cette articulation, les valeurs dans  $E_5$  sont fortement corrélées à ce genre de corrosion. Les teneurs en Ti et V dans  $E_1$  sont plus élevées que dans  $E_5$  et les rapports Ti/V sont localement proches des rapports théoriques. L'écart des concentrations en titane entre ces deux échantillons est lié à l'amorçage d'une usure mécanique pour  $E_1$ , générant des particules solides en plus de la dissolution. Ces débris, en quantité peu élevée, peuvent subir à leur tour une dissolution.

Mu et al. [8] ont mis en évidence les phénomènes de corrosion *in vitro* lorsque les contraintes mécaniques d'usure et les frottements sont inexistantes. Les macrophages entourent l'implant et fabriquent  $O_2$  qui est transformé en  $H_2O_2$ . Cette molécule très oxydante traverse la paroi de la cellule et dissout la couche de passivation de l'implant. L'implant libère des ions métalliques. L'encapsulation provoquée par les cellules maintient une certaine acidité au voisinage de la prothèse qui ne peut reconstruire sa couche de passivation et libère encore plus d'ions. La quantité d'ions libérée par la prothèse augmente lorsque des débris solides métalliques ou de polyéthylène sont présents puisqu'ils stimulent les macrophages. La différence de contamination entre  $E_1$  et  $E_5$  peut être liée à la présence de débris de polyéthylène ou de TA6V, consécutifs à une usure mécanique plus avancée de la prothèse correspondante à  $E_1$ .

## 11.2 Echantillons $E_2$ , $E_3$ et $E_4$ : couple Cr-Co-Mo/TA6V

Ils sont plus contaminés que  $E_1$ ,  $E_5$ . Le condyle est un alliage Cr-Co-Mo séparé du plateau tibial en TA6V par une plaque de polyéthylène. L'observation, lors de la reprise prothétique, montre que la pièce de polyéthylène est usée et entraîne le frottement du condyle sur le plateau tibial.

### 11.2.1 Débris UHMWPE

Un modèle prédit que dans le cadre d'une usure par adhésion, la dimension des débris produits est inversement proportionnelle à la dureté du matériau [13]. Les particules de polymère possèdent la plus grande taille, suivies des débris métalliques et des particules de céramique. Les particules de UHMWPE sont transparentes vis à vis des méthodes P.I.X.E-R.B.S. Les analyses histologiques ont pu mettre en évidence une quantité importante de débris de UHMWPE dans les tissus. Certains sont phagocytés par des cellules géantes. Seules les particules de dimension inférieure à  $< 25 \mu m$  sont phagocytées [13]. Les autres particules observées restent dans le milieu extra cellulaire. La dimension et la forme sont révélatrices du processus d'usure. Les particules  $< 1 \mu m$  proviennent d'une usure par fatigue tandis que celles en forme d'écharde ou d'aiguille et de dimensions plus importantes sont liées à une usure par adhésion ou par un processus à 3 corps, qui provoquent des fissures en surface avec extraction de fragments. La présence de ce type de débris UHMWPE dans nos échantillons confirme une usure excessive de la plaque de polyéthylène entre les deux pièces métalliques.

### 11.2.2 Comportement migratoire

Pour des raisons techniques, seules les cibles épaisses ont permis de mesurer les teneurs en éléments métalliques proches de la surface et de la membrane synoviale. Les

cibles minces ont des profils de concentration à la dizaine de  $\mu m$  près.

L'analyse en surface du tissu capsulaire révèle une grande hétérogénéité des teneurs en Ti, V, Cr, Co. La migration dans le tissu de la zone proche de l'implant vers l'extérieur présente des écarts importants de contamination et de profondeur de migration (figure 8.5). Les zones les plus contaminées sont celles les plus proches de l'implant. En moyennant les teneurs sur certains intervalles de migration, des fronts de contamination se démarquent (zone très polluée) et leur profondeur est directement liée à la teneur en débris métallique.

Afin de déterminer la profondeur de migration dans le tissu, des profils en cible mince sont réalisés au niveau des zones les plus polluées. Les teneurs en Ti, V, Co et Cr diminuent de façon caractéristique lorsqu'on s'éloigne de l'implant (figures 8.3 8.4). Le comportement similaire de Ti et de V est lié à la nature granulaire des débris. Le même type de décroissance est observé pour Co et Cr, éléments majeurs de l'alliage Cr-Co-Mo. Ce phénomène indique que les deux types de débris migrent dans le tissu. Sur des zones d'analyses plus réduites, seuls les débris de TA6V sont présents (figure 10.1 et tableau 10.1).

### 11.2.3 Les grains de TA6V

Les cartographies P.I.X.E associées au rapport massique des éléments, aux images et profils réalisés par STEM-EDXS montrent que les débris relatifs au TA6V sont solides, aussi bien en surface qu'en profondeur. La dimension des grains évolue du nm au  $\mu m$  (figure 9.12). Des grains ou des amas (cartographie P.I.X.E) voisins de 100  $\mu m$  sont observés en surface (figure 9.2). Les images STEM de débris évoquent des grains de plusieurs  $\mu m$  en cours de dissolution qui génèrent des débris de l'ordre de la centaine de nm (figure 9.11).

Au sein d'un alliage de TA6V coexistent deux phases  $\alpha$  et  $\beta$ . La forme et la taille de ces phases dépendent directement du processus de fabrication thermo-mécanique. Ne possédant aucune information sur les conditions de fabrication des plateaux tibiaux, des analyses de ces paramètres sont en cours. L'aluminium est un élément alphagène et le vanadium bêtagène. La réalisation de profil par STEM-EDXS sur plusieurs grains montre un excès d'Al et un déficit de V (figures 9.14, 9.15). La présence de grains de structure  $\alpha$  plutôt que  $\beta$  suggère que la dissolution se fait par la phase  $\beta$  [13]. Les concentrations obtenues par PIXE sur de grandes surfaces indiquent par contre un rapport Ti et V non déséquilibré.

Nous avons vu que les débris de TA6V sont solides quelle que soit la zone d'analyse ou leur concentration (figures 8.7, 10.4 et tableau 10.3). Certaines images STEM suggèrent une dissolution de grains (figure 9.11). On corrèle ces résultats avec les clichés obtenus par P.I.X.E-Histologie. Des zones polluées présentent des grains noirs de métallose, d'autres zones plus faiblement polluées (<2000 ppm) ont des grains invisibles sur la cartographie P.I.X.E ainsi que sur le cliché histologique, le rapport Ti/V est égal au rapport de l'alliage dans les deux cas. Au début des profils, les débris sont denses, homogènes, de dimensions importantes. L'analyse histologique révèle que, pour les zones les plus denses, les débris baignent dans une matrice extracellulaire composée de collagène et de fibroblastes. Dans

la zone suivante, les débris sont moins denses et sont phagocytés par des macrophages. Au-delà existe un tissu fibreux (collagène + fibroblastes) très dense, puis un tissu adipeux (figure 8.9). L'acidité régnante dans la cellule dissout le grain qui se disperse dans le tissu. Les petits grains migrent plus facilement et plus rapidement que les débris phagocytés et se répartissent, de nouveau, de façon plus homogène (figures 8.8). Les grains de phases  $\alpha$ , pauvres en vanadium, sont réfractaires à la dissolution puisque ce sont les grains analysés.

#### 11.2.4 Les grains de Cr-Co-Mo

Haynes [91] a étudié le comportement *in vitro*, de débris provenant d'alliage de Cr-Co. Les paramètres qui influencent la libération d'ions sont : la taille des débris et la date d'arrivée dans le tissu. Le mécanisme de corrosion est le suivant : les cellules (monocytes) phagocytent les particules solides d'alliage récemment arrivées dans le tissu. L'acidité de la cellule dissout une partie du grain, et parfois sa totalité selon sa taille, provoquant une couche d'oxyde (passivation). Après la mort de la cellule, les débris solides restants et passivés sont de nouveau ingérés par d'autres cellules. Les cellules ne meurent plus mais déclenchent un processus de résorption osseuse par l'intermédiaire de médiateurs. Le Cr fabrique la couche de passivation ( $CrO_2$ ) tandis que le Co migre.

Des amas ou des grains de Cr-Co-Mo sont observés au niveau du tissu fibreux d'assez grande dimension (dizaine de  $\mu m$ ). Toutefois, dans la plupart des zones, la teneur en débris ne dépasse pas le millier de ppm, teneur souvent inférieure aux éléments qui interfèrent avec le Cr ou le Co et masquent leur visualisation cartographique. L'information contenue dans le rapport Co/Cr confirme des études sur les débris de Cr-Co-Mo et leur comportement *in vivo* [91] [92].

Ichinose [93] a étudié les débris de Cr-Co-Mo issus de prothèse de genou et contenus dans le tissu synovial. Il constate que les particules de l'ordre du  $\mu m$  phagocytées par les cellules macrophages voient leur teneur en éléments métalliques modifiée par rapport aux teneurs de l'alliage. La réalisation d'un profil sur un grain de Cr-Co-Mo dans une cellule indique que le Co est inférieur aux taux de l'alliage et est seulement contenu au coeur du grain et non en périphérie. Le Co situé en périphérie s'est donc dissout et le Cr reste pour passiver le grain. Haynes [91] constate le même phénomène *in vitro*. Le rapport Co/Cr relevé au niveau de nos échantillons est soit égal au rapport initial de l'alliage soit inférieur. Le premier cas correspond à des débris trop volumineux pour être phagocytés et le second cas à ceux digérés ou en cours de digestion par les cellules avec migration ou diffusion du Co, élément carcinogène [94].

L'évolution de ce rapport dans le tissu renseigne à la fois sur la localisation de l'activité cellulaire en fonction de la taille des débris. Bien que les rapports massiques soient établis sur des zones moyennes, en surface le rapport Co/Cr est inférieur au rapport massique de l'alliage avec parfois localement des rapports proches de l'alliage. Au cours des profils, les rapports Co/Cr sont similaires à ceux de l'alliage au niveau du tissu fibreux. Les débris volumineux sont encapsulés dans ce tissu sclérosé et les cellules peu nombreuses [33]. Ensuite, à l'extrémité de ce tissu, la chute du rapport témoigne d'une nouvelle activité cellulaire avec de petits débris. D'après Jacobs [33], la plupart des particules en alliage à base de Co-Cr ont des dimensions inférieures à 5  $\mu m$  et sont souvent trouvées à l'intérieur des macrophages.

Contrairement aux débris de TA6V relativement stables même après dissolution, le rapport Co/Cr indique que les débris évoluent d'un point de vue chimique (tableau 8.4, graphes B et D figure 8.7). Dans  $E_3$  et  $E_4$ , le rapport Co/Cr est inférieur au rapport initial de l'alliage. La diminution du rapport correspond aux phénomènes de passivation des débris récents. Une chute du rapport Co/Cr est observée au voisinage de la membrane synoviale (tableau 8.4, graphes B et D figure 8.7).

Tous les débris générés au niveau de la prothèse migrent vers la membrane synoviale. Le tissu fibreux retient les plus gros grains qui se meuvent moins facilement que les plus petits. Ces derniers atteignent les cellules macrophages qui les dissolvent et leur rapport chute. Pour le Ti, élément majeur de l'alliage, la stoechiométrie est conservée pour les débris. Pour l'alliage Cr-Co-Mo, le Cr contenu à hauteur de 30 % sert d'élément passivant, tandis que le Co migre ailleurs et la stoechiométrie est rompue.

### 11.2.5 Métallose au titane

De nombreux cas de métallose associés aux débris de Cr-Co et d'alliage à base de titane sont recensés, aussi bien au niveau des prothèses de genou que des prothèses de hanche [95][10][37]. Le titane génère souvent plus de débris que le Cr-Co. Bien que les alliages à base de titane présentent un grand nombre de qualités mécaniques, son usure est souvent associée à une grande quantité de débris [9]. Notre étude confirme une fois de plus ce constat. La cause exacte de l'usure du plateau tibial est difficile à déterminer. La raison de la reprise (douleur aiguë, descellement, rupture de l'implant, infection ...) ne nous est pas fournie. La grande quantité de titane est le résultat de l'abrasion du Cr-Co-Mo sur TA6V lorsque tout le polyéthylène est usé, mais elle peut s'amorcer avec un frottement du TA6V sur le UHMWP, ou bien sur l'os d'ancrage. Dans cette dernière situation, une partie des débris générés entre l'os et l'implant migre vers l'articulation et contribue à un processus abrasif à 3 corps entre le UHMWPE et le métal [95].

Des phénomènes de corrosion galvanique, de fissures et de crevasses après brisure de la couche de passivation, sont aussi responsables de relargage important d'ions dans le tissu [37]. L'étude de la corrosion dans un milieu statique d'un alliage à base de Cr-Co indique que dans le cas d'une corrosion générale, l'élément le plus relargué est le Co, en excès par rapport au ratio de l'alliage (2,5) avec un rapport 3,8 [34]. Au niveau de la surface de la membrane synoviale en contact direct avec l'implant, nos rapports Co/Cr sont inférieurs ou égaux au rapport de l'alliage excluant ainsi la corrosion dans notre situation. L'association du couple TA6V et Cr-Co-Mo est souvent choisie car ces deux alliages possèdent des potentiels électriques proches.

Dans le cas d'un contact, si la différence de potentiel reste inférieure au potentiel de rupture de l'anode (Cr-Co-Mo) aucune corrosion galvanique n'apparaît [36]. Toutefois, une étude de la corrosion entre un alliage à base de titane associé à deux nuances d'alliages Cr-Co-Mo dont la teneur en Mo varie de 2% seulement, montre deux comportements différents avec une corrosion galvanique 3 fois plus importante pour l'alliage contenant le plus de Mo [35].

## 11.3 Les réactions de l'organisme vis à vis des corps étrangers

Les réactions de l'organisme peuvent être locales ou générales. Il se forme autour de l'implant une membrane réactionnelle en présence de débris par l'apparition d'une réaction histiocytaire à corps étrangers [96].

Les débris dont la dimension est de l'ordre du  $\mu m$  sont phagocytés. Les plus gros débris de l'ordre de la dizaine de  $\mu m$  sont profondément enclavés dans des plans de collagène successifs. La phagocytose des corps étrangers stimulerait la sécrétion de cytokines par les macrophages actifs, cette hormone provoque la résorption osseuse, phénomène responsable du descellement à terme. La taille des particules influence le type de médiateurs libérés par les cellules [97]. Nos tissus ( $E_3$  et  $E_4$ ) présentent une structure sclérosée dans la zone fortement contaminée. De grosses particules de polyéthylène et métalliques sont enclavées dans des plans de collagène contenant des fibroblastes. Cette partie du tissu apparaît comme un tissu d'interposition mécanique où la coque fibreuse retient une certaine quantité de débris.

En plus des réactions immunitaires normales, les produits de corrosion ou d'usure créent parfois des problèmes de toxicité. Les éléments mis en cause selon un classement du plus toxique au moins toxique sont : Cr, Co, Ni mais aussi Mo, V, Al. Ils font de l'alliage Cr-Co-Mo un des alliages les plus toxiques [98] [99] alors que le TA6V l'est moins [100]. Une étude *in vitro* réalisée sur des débris obtenus par frottement de Cr-Co-Mo et de TA6V n'a pu révéler le caractère mutagène ou carcinogène de ces débris sur des cellules de mammifères (fibroblastes) [101]. Les éléments réputés les plus carcinogènes ou mutagéniques sont le Cr, le Co et le Ni [102].

Les produits de dégradation des implants métalliques interviennent aussi dans l'hypersensibilité métallique [103]. L'allergie ou réaction d'hypersensibilité est une réponse du système immunitaire à certaines substances comme les métaux. Bien que des signes cutanés de réponses allergiques soient apparus après l'implantation de prothèse métallique, l'échec prothétique dû à l'hypersensibilité aux métaux n'est pas bien établi [104].

Les patients porteurs de couple métal-métal sont exposés à des concentrations métalliques locales ou systémiques plus élevées qu'un couple métal-polyéthylène. Une étude réalisée en Finlande sur des porteurs de couple exclusivement Co-Cr-Mo ont un taux de leucémie 3,77 fois plus élevé que les porteurs métal-polyéthylène [94].

## 11.4 Conclusion

La forte contamination de 3 échantillons sur 5 résulte d'une usure de la plaque de polyéthylène (UHMWPE). Un contact et une usure mécanique des pièces métalliques génèrent une plus grande quantité de débris de TA6V. Le TA6V, matériau moins dur, produit une quantité de débris 100 à 200 fois plus importante que celui du Co-Cr-Mo. Ces débris se répartissent de façon inhomogène dans le tissu de l'articulation et migrent à l'intérieur de celui-ci.

Ces grains évoluent chimiquement au cours du temps et subissent une dissolution

avec possibilité de larguer certains ions de haute toxicité pouvant provoquer des allergies (Cr, Co, V, Al...).

La prothèse de genou est soumise à de fortes contraintes susceptibles de la détériorer. Les biomatériaux sont en perpétuelle évolution afin d'améliorer les implants et faire tendre les dispositifs prothétiques vers le degré zéro d'échec. Des études portent en effet sur le renforcement de la plaque de polyéthylène, pièce charnière, avec une implantation ionique en surface [105] ou par irradiation [106]. L'amélioration des propriétés des alliages à base de titane ou la création de nouveaux alliages s'orientent vers le matériau idéal sur tous les plans [25]. Deux de nos prothèses, avaient subi un renforcement de la résistance mécanique en surface du condyle en TA6V par implantation ionique : il s'avère que ces modifications sont liées à une contamination tissulaire moindre. Bien évidemment une étude sur une plus grande population initiale concernant les deux dispositifs est nécessaire pour confirmer ces observations.





## Chapitre 12

# Radioactivité des biomatériaux

### 12.1 Protocole d'échantillonnage

Les biomatériaux sont soit d'origine synthétique comme l'hydroxyapatite, les bioverres et les prothèses métalliques soit d'origine naturelle comme les coraux, les fémurs d'animaux. L'objectif est d'utiliser la même géométrie de mesure dans les détecteurs. Un maximum de volume doit être occupé par l'échantillon dans la boîte disposée dans le détecteur de germanium, afin d'éviter une pollution par le radon de l'air. Les biomatériaux se présentent sous forme de poudre ou sous forme de bloc solide. Les quantités de poudre doivent être suffisantes pour remplir entièrement la boîte. Les prothèses sont découpées en plusieurs pièces.

Les mesures concernant les biomatériaux de synthèse sont réalisées après leur élaboration finale avant une commercialisation. La quantité de matière disponible pour les mesures est calculée en mesurant chaque boîte vide puis remplie, à l'aide d'une balance de haute précision. Le corail, l'hydroxyapatite et les bioverres sont disponibles sous forme de poudre.

Seules les prothèses métalliques reprises ont fait l'objet de mesure. Elles ont subi un traitement classique de nettoyage et de stérilisation lors de l'explantation. Elles sont découpées en morceaux à l'aide de tronçonneuse ISOMET, de vitesse réglable de 0 à 300 tr/min, sur laquelle est montée une meule diamantée de dimension  $10,2 \text{ cm} \times 0,3 \text{ mm} \times 12,7 \text{ mm}$ .

Le protocole de préparation des différents fémurs est le même quelle que soit leur origine. Ils sont conservés au congélateur en attendant leur préparation. Certaines parties comme les cartilages ou les matières "molles" restantes (tendons, muscles ...) sont découpées à la scie à ruban, en acier HSS enrichi à 5% en Mo.

Les os sont dégraissés en les immergeant dans un bain de 500 ml de trichloréthylène R.P. NORMAPUR pour analyses pendant un mois. Ensuite, ils sont rincés à l'eau distillée. Un bain d'eau oxygénée 30% VLSI SELECTIPUR nettoie les os compacts haversiens et trabéculaires de toutes les substances qui ne seraient pas de l'os : résidus de graisse, de muscle, de moëlle osseuse ...

Le bain d'eau oxygénée, produit corrosif, doit être contrôlé et ne doit pas dépasser une certaine durée au risque de détruire la matrice osseuse. La durée réalisant le meilleur compromis entre l'élimination de tous les tissus non désirés et la préservation de l'os est de 48 heures. Les dimensions des os sélectionnés (taille, volume, poids ...) sont très

proches, le volume d'eau oxygénée est en moyenne de 250 ml. Les os nettoyés de toutes leurs impuretés biologiques sont plusieurs fois rincés à l'eau distillée.

Ils sont ensuite séchés à l'étuve pendant 6 heures à une température de  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ , température qui les stérilise par la même occasion. Une fois broyés, les os sont stockés dans les boîtes hermétiques. Il est nécessaire d'attendre la décroissance du radon provenant de l'air ambiant retenu dans les boîtes. Seule la matrice osseuse phospho-calcique fait l'objet de ces mesures de radioactivité, afin de pouvoir les comparer aux autres biomatériaux comme l'hydroxyapatite ou les coraux.

## 12.2 Résultats de références constituées avec des fémurs humains

Ils sont obtenus sur des fémurs humains n'ayant pas eu de contact avec des prothèses orthopédiques. Les échantillons proviennent du Laboratoire d'Anatomie de Clermont-Ferrand (Professeurs Vanneville et Escande). Les os fixent certains éléments radioactifs. La mesure de la radioactivité naturelle des différents biomatériaux sert à vérifier une toxicité radioactive éventuelle. La quantité de poudre d'os analysée (g) et le temps d'acquisition (h) sont indiqués pour chaque échantillon (dernière ligne du tableau).

Le tableau 12.2 montre des activités d'actinides dans des os. La colonne UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Atomic Radiation) donne les activités recensées par cet organisme international dans les os humains. Ces valeurs nous serviront de référence internationale. La colonne NIST-IRMM (National Institute of Standards and Technology-Institute for Reference Materials and Measurements) donne les activités d'un standard certifié, élaboré à partir de 5% d'os humain et 95% d'os de bovin. Les méthodes de mesures sont la spectrométrie  $\gamma$ ,  $\alpha$  et la scintillation liquide  $\beta$ . L'élaboration de ce standard suivant le radionucléide recherché nécessite des traitements radiochimiques afin d'extraire les éléments [107]. La spectrométrie  $\gamma$  est réalisée dans un laboratoire sous-terrain de profondeur 500 mee (mètre équivalent eau).

Humain	1	2	3	4
$^{40}\text{K}$	$9,3 \pm 0,9$	$3,7 \pm 0,6$	$2 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,6$
$^{137}\text{Cs}$	$< 0,05$	$< 0,03$	$< 0,04$	$< 0,04$
$^{238}\text{U}$	$< 0,6$	$1 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,4$	$0,7 \pm 0,2$
$^{226}\text{Ra}$	$0,15 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,05$
$^{228}\text{Ra}$	$< 0,03$	$< 0,1$	$< 0,1$	$< 0,15$
$^{228}\text{Th}$	$< 0,12$	$< 0,05$	$< 0,04$	$< 0,05$
Temps(h)	166,9	94,85	97,17	46,25
Poids(g)	14,4	24,73	24,73	22,1

TAB. 12.1 – Activités en Bq/kg des radio-isotopes dans divers échantillons de fémurs humains.

Activité des Os	UNSCEAR	NIST-IRMM
$^{238}\text{U}$	$0,1 \pm 0,05$	$0,64 \sim 0,09$
$^{230}\text{Th}$	$0,02 \sim 0,07$	$0,47 \pm 0,015$
$^{226}\text{Ra}$	$0,27 \pm 0,17$	$15,1 \pm 1$
$^{232}\text{Th}$	$0,006 \sim 0,024$	$0,99 \pm 0,055$
$^{228}\text{Ra}$	$0,1 \pm 0,05$	–
$^{228}\text{Th}$	–	$7,1 \pm 0,65$
$^{60}\text{Co}$	–	–
$^{40}\text{K}$	–	–

TAB. 12.2 – Activités en Bq/kg des radio-isotopes naturels dans des os humains d’après l’UNSCEAR [108] et dans un standard NIST [107]

En comparant nos teneurs (tableau 12.1) à celles de UNSCEAR, l’activité moyenne de  $^{238}\text{U}$  dans nos échantillons de fémurs humains est 8,8 fois plus importante mais celle de  $^{226}\text{Ra}$  est identique. Les activités des autres éléments sont soit inférieures aux limites de détection, soit non recensées. L’écart d’activité peut être lié au fait que notre étude porte sur des échantillons prélevés sur des personnes âgées et sur une région géographique.

La fabrication du standard NIST est fortement influencée par l’activité des os de bovins (95%). La comparaison des activités de  $^{226}\text{Ra}$  et  $^{228}\text{Th}$  entre le standard NIST et nos os de bovins indique qu’elles sont du même ordre de grandeur.

Parmi les nombreux actinides, la biocinétique de l’uranium chez l’animal et chez l’homme a été étudiée [109] [110]. L’uranium se présente sous forme d’oxyde  $\text{UO}_2^{++}$  et se substitue au  $\text{Ca}^{++}$  à la surface de l’os minéral. La structure microscopique de l’os pour les différentes espèces animales influence la diffusion en volume. Legget [109] distingue l’os en compartiment cortical et spongieux et le divise en zone surfacique et volumique. Dans nos échantillons, une analyse globale est réalisée sans distinction de types d’os et de zone. L’uranium piégé dans le volume migre moins facilement vers les réseaux sanguins et lymphatiques. Le rapport moyen entre  $^{238}\text{U}$  et  $^{226}\text{Ra}$  est 4. Ces deux éléments possèdent un comportement chimique différent. La consommation annuelle, tout continent confondu, de  $^{238}\text{U}$  et de  $^{226}\text{Ra}$  est 5,7 Bq et 22 Bq, par personne adulte. La quantité absorbée de  $^{226}\text{Ra}$  est environ quatre fois supérieure à  $^{238}\text{U}$  [108]. Ce rapport est inversé dans les os. Ce phénomène résulte d’un comportement physiologique différent lié à la nature chimique de l’élément [111]. La quantité restante de  $^{226}\text{Ra}$  est la conséquence d’une intégration dans la matrice osseuse d’une partie de  $^{226}\text{Ra}$  ingéré et emprisonné plus en volume lors de la constitution de la matrice osseuse.

## 12.3 Mesures sur des os d'animaux

### 12.3.1 Fémurs de bovins

Bovin	1	2	3	4	5
$^{40}K$	$16 \pm 2$	$15 \pm 2$	$14 \pm 2$	$11,5 \pm 1$	$11 \pm 2$
$^{137}Cs$	$< 0,15$	$< 0,08$	$0,16 \pm 0,08$	$< 0,06$	$< 0,1$
$^{238}U$	$< 7$	$< 4$	$< 5$	$< 3$	$< 6$
$^{226}Ra$	$9,8 \pm 0,4$	$6,6 \pm 0,3$	$6,8 \pm 0,3$	$7,5 \pm 0,2$	$9,1 \pm 0,4$
$^{228}Ra$	$12,2 \pm 0,07$	$4,6 \pm 0,3$	$9,7 \pm 0,5$	$10,2 \pm 0,4$	$13 \pm 1$
$^{228}Th$	$3,4 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,2$
Temps(h)	47,61	47,63	47,19	141,8	24,34
Poids(g)	15,18	21,84	23,66	21,91	16,33

TAB. 12.3 – Activités en Bq/kg des radio-isotopes dans divers échantillons de fémurs de bovins

$^{40}K$  dans les fémurs de bovins est constant avec une valeur moyenne de 13,6 Bq/kg. La présence de  $^{137}Cs$  n'est pas détectée sauf pour le bovin n°3.  $^{238}U$  est en dessous des limites de détection.

Les teneurs en  $^{226}Ra$  et  $^{228}Ra$  sont très proches et avoisinent la dizaine de Bq/kg. Les éléments  $^{228}Ra$  et  $^{228}Th$ , qui appartiennent à la famille du  $^{232}Th$ , possèdent des périodes radioactives respectives de 6,7 ans et 1,9 ans.  $^{228}Ac$  noyau père de  $^{228}Th$  est complètement désintégré au bout de quelques jours et  $^{228}Th$  se désintègre suivant sa propre loi.  $^{228}Ra$  et  $^{228}Th$  ont des périodes du même ordre de grandeur et leurs activités sont liées. Un équilibre de régime s'établit au sein des chaînes naturelles. Dans l'hypothèse où ces deux éléments ont un comportement identique, le rapport expérimental  $\frac{A^{228}Th}{A^{228}Ra} \sim 0,26$  confirme que les échantillons sont jeunes de l'ordre de 1 à 2 ans.

### 12.3.2 Fémurs de porc

$^{40}K$  a une valeur à peu près constante de 10 Bq/kg. Aucune présence de  $^{137}Cs$  et de  $^{238}U$  n'est constatée. Comme pour les bovins, les teneurs des deux isotopes  $^{226}Ra$  et  $^{228}Ra$  sont voisines. Ce phénomène est à relier au comportement chimique de ces isotopes qui possèdent le même numéro atomique. Le rapport des activités  $\frac{A^{228}Th}{A^{228}Ra} \sim 0,31$  signifie que les échantillons sont jeunes.

Mietelski [112] a mesuré l'activité d'actinides émetteurs alpha, notamment  $^{228}Th$  dans des os d'animaux sauvages herbivores en Pologne. Les teneurs de  $^{228}Th$  chez des sangliers sauvages sont très similaires aux valeurs que nous avons obtenues  $\sim 0,3$  Bq/kg. Le cochon domestique et le sanglier sont des animaux mammifères très proches. La base de leur régime alimentaire est cependant différente. La proximité des teneurs en  $^{228}Th$

Porc	1	2	3	4	5
$^{40}K$	$16 \pm 2$	$8 \pm 1$	$10 \pm 1$	$9 \pm 1$	$10 \pm 1$
$^{137}Cs$	$< 0,06$	$< 0,08$	$< 0,04$	$< 0,07$	$< 0,04$
$^{238}U$	$< 1$	$< 41$	$< 1,3$	$< 1,8$	$< 1$
$^{226}Ra$	$0,57 \pm 0,09$	$0,33 \pm 0,09$	$0,46 \pm 0,05$	$0,48 \pm 0,07$	$0,45 \pm 0,04$
$^{228}Ra$	$0,83 \pm 0,2$	$0,46 \pm 0,1$	$0,83 \pm 0,11$	$0,44 \pm 0,0,1$	$0,64 \pm 0,07$
$^{228}Th$	$0,23 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,07$	$0,17 \pm 0,04$	$0,21 \pm 0,03$
Temps(h)	47,17	46,57	47,01	70,14	70,33
Poids(g)	20	25,01	24,45	25,06	24,67

TAB. 12.4 – Activités en Bq/kg des radio-isotopes dans divers échantillons de fémurs de porcs

entre le porc domestique et le sanglier est peut être une caractéristique propre de la physiologie osseuse de ce type de mammifère, indépendamment de leur alimentation.

### 12.3.3 Fémurs d'ovins

Ovin	1
$^{40}K$	$32 \pm 2$
$^{137}Cs$	$0,017 \pm 0,04$
$^{238}U$	$< 1$
$^{226}Ra$	$2,6 \pm 0,2$
$^{228}Ra$	$1,4 \pm 0,2$
$^{228}Th$	$1,1 \pm 0,1$
Temps(h)	111,26
Poids(g)	14,4

TAB. 12.5 – Activités en Bq/kg des radio-isotopes dans un fémur d'ovine

La statistique concernant cet animal est faible, il est donc difficile de généraliser. Aucune présence d'uranium. Une forte quantité de  $^{40}K$  ( tableau 12.5) est présente, de l'ordre de 32 Bq/kg. Nous remarquons la présence de  $^{137}Cs$ . Les teneurs mesurées en  $^{228}Th$  dans des os de chevreuils polonais, animaux qui peuvent s'apparenter aux ovins, sont proches du Bq/kg [112].

Echantillons Alliage	P2 Cr-Co-Mo	P3 Cr-Co-Mo	P1+P2+P3 TA6V
$^{40}K$	$0,14 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,06$	$< 0,35$
$^{60}Co$	$0,38 \pm 0,05$	$0,65 \pm 0,05$	$< 0,014$
$^{137}Cs$	$< 0,04$	$< 0,06$	$< 0,02$
$^{238}U$	$< 0,08$	$< 0,08$	$4,2 \pm 0,5$
$^{226}Ra$	$< 0,025$	$< 0,02$	$< 0,007$
$^{228}Ra$	$< 0,021$	$< 0,03$	$0,15 \pm 0,05$
$^{228}Th$	$< 0,008$	$< 0,015$	$0,12 \pm 0,03$
Temps(h)	139,4	190,1	191,1
Poids(g)	59,9	50	12,6

TAB. 12.6 – Activités en Bq/kg des radio-isotopes dans diverses prothèses métalliques

## 12.4 Prothèses métalliques

Le tableau 12.6 donne les radioactivités des émetteurs  $\gamma$  dans les prothèses de genou pour plusieurs alliages. Les activités sont partout très faibles. Les éléments radioactifs présents dans les prothèses en Cr-Co-Mo, aux limites de détection près, sont  $^{40}K$  et  $^{60}Co$ .  $^{60}Co$  de période  $T_{1/2} = 5,3$  ans est la conséquence de l'absorption d'un neutron par  $^{59}Co$  qui est un élément stable. Les teneurs de ces deux éléments sont de l'ordre de la centaine de mBq/kg. La teneur la plus élevée, celle de  $^{60}Co$ , atteint 650 mBq/kg pour la prothèse P3. L'uranium  $^{238}U$  est détecté avec une valeur de 4,2 Bq/Kg. Le titane étant très propre d'un point de vue radioactif, il est fort possible que l'uranium soit amené par l'aluminium qui lui, en contient toujours [81]. Le thorium est présent dans cet alliage au voisinage de la centaine de mBq/kg.

## 12.5 Corail

Le tableau 12.7 est le résultat de mesures d'activité de coraux de diverses provenances. Les éléments  $^{40}K$ ,  $^{60}Co$  et  $^{137}Cs$  ne sont pas détectés pour les trois coraux. L'activité la plus importante est celle des éléments de la chaîne de  $^{238}U$ , notamment celle de  $^{234}Th$  avec des activités comprises entre 20 et 50 Bq/kg. Les éléments  $^{214}Pb$  et  $^{214}Bi$  possèdent des activités identiques. Les périodes de ces éléments sont similaires et de l'ordre de la vingtaine de minutes. Le corail des Antilles présente une activité au niveau de la chaîne  $^{232}Th$  avec les éléments  $^{228}Ac$ ,  $^{212}Pb$ ,  $^{208}Tl$  de l'ordre du Bq/kg. On note que tous les coraux contiennent  $^{235}U$  d'activité comprise entre 1,3 Bq/kg et 1,6 Bq/kg.

La teneur en  $^{234}Th$  (Chaîne  $^{238}U$ ), non observée dans les fémurs humains est ici importante. Les activités des trois chaînes radioactives naturelles dans ces coraux sont identiques au moins pour  $^{238}U$  et  $^{235}U$ . Une comparaison des radionucléides  $^{234}Th$ ,  $^{235}U$  présents dans les coraux que nous avons étudiés, avec ceux contenus dans divers crustacés

Corail	Polynésie	Antilles	Inoteb
$^{40}K$	< 1,3	< 4,6	< 1,3
$^{60}Co$	0,13	< 0,2	< 0,1
$^{137}Cs$	< 0,05	< 0,2	< 0,12
$^{234}Th$	$22 \pm 4$	$33 \pm 5$	$48 \pm 4$
$^{214}Pb$	$0,4 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2$	$1 \pm 0,15$
$^{214}Bi$	$0,4 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2$	$1 \pm 0,15$
$^{228}Ac$	< 0,4	$1,3 \pm 0,4$	< 0,4
$^{212}Pb$	< 0,1	$0,9 \pm 0,2$	< 0,1
$^{208}Tl$	< 0,2	$0,3 \pm 0,05$	< 0,15
$^{235}U$	$1,3 \pm 0,12$	$1,5 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,1$
Temps(h)	22,5	10,5	71
Poids(g)	88	98	23,5

TAB. 12.7 – Activités en Bq/kg des radio-isotopes dans divers échantillons de corail

$^{238}U$ ,  $^{210}Pb$ ,  $^{228}Th$ ,  $^{228}Ra$  et du  $^{40}K$ , indique une différence au niveau des activités et des éléments présents (chaîne  $^{232}U$ ,  $^{40}K$  ...) [113]. Les coraux provenant de régions géographiques différentes, ces observations sont à relier au comportement biologique du corail. Ainsi les coraux ont la particularité de fixer des éléments radioactifs différents de ceux observés chez d'autres animaux marins [114].

## 12.6 Hydroxyapatite et bioverre

L'hydroxyapatite (HAP) et le bioverre sont des biomatériaux de synthèse. Concernant le bioverre, le seul élément radioactif détecté est  $^{40}K$  avec une activité de 1,4 Bq/kg environ (tableau 12.8).

L'HAP contient trois éléments de la chaîne de  $^{238}U$  :  $^{234}Th$ ,  $^{214}Pb$ ,  $^{214}Bi$ . L' $^{235}U$  possède une activité de 1 Bq/kg. Un aspect intéressant est la présence d'activités similaires de ces éléments, entre HAP et le corail.

## 12.7 Comparaisons des radioactivités

Les mesures de radioactivité réalisées sur les fémurs humains sont considérées comme référence afin d'examiner les possibilités de contamination radioactive par implantation de biomatériaux naturels ou de synthèse. Une comparaison est effectuée avec les fémurs d'origine animale dans un premier temps, puis avec les autres biomatériaux : implants métalliques, corail, hydroxyapatite et bioverre.



Echantillons	Hydroxyapatite HAP	Bioerre BVA9
$^{40}K$	$< 1,7$	$1,36 \pm 0,02$
$^{60}Co$	$< 0,16$	$< 0,5$
$^{137}Cs$	$< 0,14$	$< 0,15$
$^{234}Th$	$31 \pm 3$	$< 4,5$
$^{214}Pb$	$0,58 \pm 0,12$	$< 0,5$
$^{214}Bi$	$0,58 \pm 0,12$	$< 0,5$
$^{228}Ac$	$< 0,5$	$< 0,9$
$^{212}Pb$	$< 0,1$	$< 0,5$
$^{208}Tl$	$< 0,03$	$< 0,2$
$^{235}U$	$1 \pm 0,1$	$< 0,2$
Temps(h)	23	41,7
Poids(g)	66,6	39,4

TAB. 12.8 – Activités en Bq/kg des radio-isotopes dans un échantillon d'hydroxyapatite et de bioerre

### 12.7.1 Comparaison des populations fémorales

La figure 12.1 donne les activités de  $^{40}K$  pour l'ensemble des fémurs analysés, regroupés par population. Ce graphe montre que les teneurs en  $^{40}K$  sont très disparates dans les os. Les porcins et les bovins ont une activité du même ordre de grandeur en  $^{40}K$ . L'ovin présente une activité supérieure d'un facteur 6,5 par rapport à l'humain et un facteur 3 par rapport au porc et au bovin.

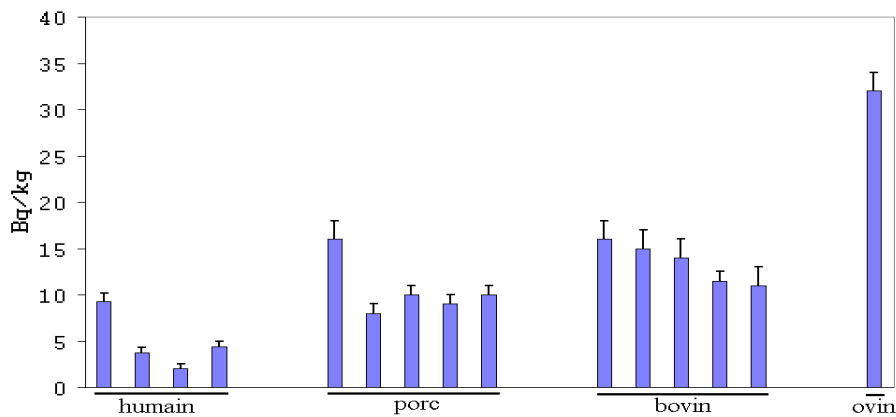


FIG. 12.1 – Activité de  $^{40}K$  en Bq/kg des fémurs humains, porcins, bovins et ovins

La figure 12.2 donne les activités de  $^{226}\text{Ra}$  (chaîne du  $^{238}\text{U}$  pour l'ensemble des fémurs analysés). Il n'y a aucune trace de  $^{226}\text{Ra}$  chez l'homme. Le porc a une activité constante en  $^{226}\text{Ra}$ , sa valeur moyenne est 0,45 Bq/kg. Le bovin présente de grandes variations d'activité en  $^{226}\text{Ra}$  : la valeur moyenne du bovin se situe autour de 8 Bq/kg.

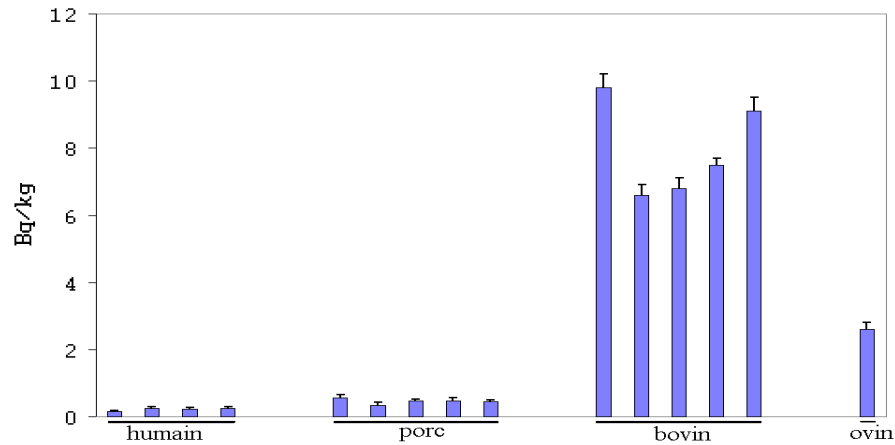


FIG. 12.2 – Activité de  $^{226}\text{Ra}$  en Bq/kg des fémurs humains, porcins, bovins et ovins

La figure 12.3 compare les activités de  $^{228}\text{Ra}$ . Comme pour  $^{226}\text{Ra}$ , les fémurs de bovins possèdent l'activité la plus élevée en  $^{228}\text{Ra}$  comparativement au porc et à l'humain.

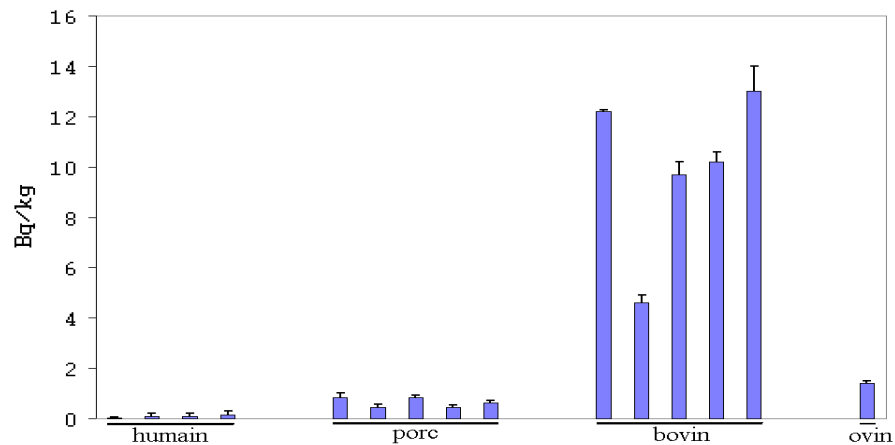


FIG. 12.3 – Activité du  $^{228}\text{Ra}$  en Bq/kg des fémurs humains, porcins, bovins et ovins

Certaines études ont été menées afin de comparer la radioactivité sur diverses populations animales [112] [115] [116] [114] [113]. Mieteslki [112] en étudiant la radioactivité contenue dans les os de cerf, d'élan, de chevreuil et de sanglier montre que des disparités d'activité d'un élément donné, existent au sein d'une même population. La présence de traces de  $^{230}\text{Th}$  et de  $^{232}\text{Th}$  chez certains sangliers ainsi que l'écart d'activité du  $^{228}\text{Th}$  par rapport aux ruminants (cerf, élan, chevreuil) apparaissent comme une différence de comportement alimentaire. Dans le cadre de notre étude, l'activité (figure 12.4) du  $^{228}\text{Th}$

est effectivement plus élevée chez le bovin que chez le porc ou l'humain.

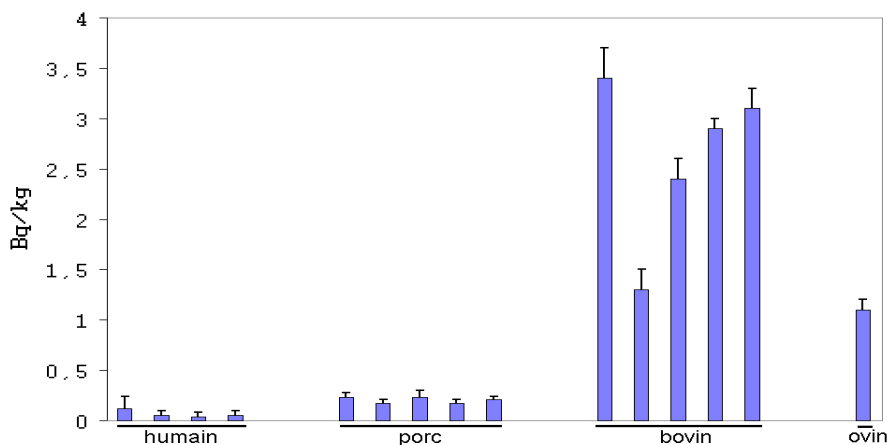


FIG. 12.4 – Activité du  $^{228}\text{Th}$  en Bq/kg des fémurs humains, porcins, bovins et ovins

Linsalata [115] a étudié l'activité de certains tissus chez des animaux de ferme dans un contexte de haute radioactivité naturelle au Brésil. Quelle que soit l'espèce, les plus grandes activités sont obtenues pour Ra, suivi de U, puis du Th. L'activité dans les os est trois fois supérieure à celle des muscles. Les activités sont difficilement comparables à nos activités car elles sont exprimées par quantité de matière fraîche et non sèche. L'os est effectivement un organe de rétention des éléments radioactifs et des terres rares.

En ce qui concerne les os d'animaux, on observe une radioactivité plus forte chez le bovin que chez l'humain pour  $^{226}\text{Ra}$  et  $^{228}\text{Ra}$ . Les teneurs de ces éléments sont voisines pour les porcins et les ovins. L'activité du  $^{40}\text{K}$  chez l'ovin est la plus élevée parmi les différentes populations. Elle est voisine pour les fémurs humains, porcins et bovins. La radioactivité générale est voisine entre les fémurs porcins et humains.

## 12.7.2 Comparaison avec les matériaux de synthèse et le corail

La comparaison du corail avec les fémurs humains indique que les éléments radioactifs présents ne sont pas les mêmes. Le corail contient du  $^{234}\text{Th}$  non détecté ou bien d'activité très faible chez l'humain. L'activité de cet élément est plus grande d'un facteur 2 à 10 par rapport à l'élément le plus radioactif dans l'os humain, le  $^{40}\text{K}$ . D'autres éléments comme  $^{214}\text{Pb}$ ,  $^{214}\text{Bi}$ ,  $^{235}\text{U}$  sont présents dans le corail mais pas chez l'humain, une pollution par le  $^{222}\text{Rn}$  n'est pas à exclure pour les deux premiers éléments. Leur activité est proche des actinides secondaires ( $^{238}\text{U}$ ,  $^{228}\text{Ra}$ ) contenus dans l'os humain. Le même comportement est constaté avec l'hydroxyapatite.

Le seul élément radioactif présent dans le bioverre est  $^{40}\text{K}$ . Son activité est plus faible que dans les fémurs humains.

La teneur moyenne de  $^{40}\text{K}$  pour les quatre fémurs analysés est de  $4,85 \pm 0,6$  Bq/Kg et celle des deux alliages en Cr-Co-Mo est de  $0,185 \pm 0,055$  Bq/Kg. L'activité de  $^{40}\text{K}$

représente 3,8 % de l'activité des fémurs humains. La teneur en  $^{60}\text{Co}$  dans l'alliage Cr-Co-Mo est plus importante que dans les fémurs humains puisque ces derniers n'en possèdent pas. Les activités moyennes de  $^{238}\text{U}$  et de  $^{226}\text{Ra}$  sont  $0,87 \pm 0,35$  Bq/kg et  $0,22 \pm 0,04$  dans les os humains. La teneur en  $^{238}\text{U}$  dans l'alliage titane est 4,5 fois plus importante mais l'élément fils  $^{226}\text{Ra}$  n'est pas détecté. Les teneurs, dans le même alliage, en  $^{228}\text{Ra}$  et  $^{228}\text{Th}$  sont supérieures à celles de l'homme puisque non détectées chez ce dernier.

### 12.7.3 Bilan de toxicologie radioactive

La comparaison des activités de  $^{40}\text{K}$ ,  $^{226}\text{Ra}$  et  $^{228}\text{Ra}$  au niveau des fémurs, montre des écarts liés aux comportements alimentaire, physiologique ou digestif des différents mammifères.

Le corail ne contient pas les mêmes radio isotopes détectés dans les fémurs. Les éléments détectés dans les coraux ( $^{235}\text{U}$ ,  $^{234}\text{Th}$ ) existent aussi dans HAP.  $^{40}\text{K}$  est le seul élément radioactif détecté dans le bioverre.

Une quantité de  $^{238}\text{U}$  de plusieurs Bq/kg est présente dans l'alliage à base de titane, teneur liée au processus de fabrication. Les alliages de Cr-Co-Mo ont des teneurs 10 fois inférieures aux fémurs humains en  $^{40}\text{K}$ . Le  $^{60}\text{Co}$  de l'alliage Cr-Co-Mo est d'origine cosmogénique.

Parmi tous nos biomatériaux de synthèse, le bioverre présente la plus faible activité, suivi des prothèses métalliques et de HAP. A titre d'exemple, nous avons vu que le TA6V présente une activité supérieure en  $^{238}\text{U}$  que dans les fémurs humains. La dose moyenne reçue par le corps humain, provenant des expositions naturelles (rayonnements cosmiques, éléments radioactifs naturels dans l'environnement et le corps) est de 2,5 mSv par an. La dose supplémentaire maximale admissible dans l'organisme en profondeur est 1 mSv par an pour le public. L'ingestion moyenne par an de  $^{238}\text{U}$  chez une personne adulte est de 5,7 Bq. Elle contribue à une dose effective de 0,25  $\mu\text{Sv}$  par an sur l'ensemble de la dose totale reçue [108]. La mise en place d'une prothèse de 12 g de TA6V d'activité 0,05 Bq, assimilée à une ingestion supplémentaire d'un point de vue de l'ensemble de l'organisme, apporte une dose effective supplémentaire de 0,0022  $\mu\text{Sv}$ . Cette valeur représente une augmentation de moins de 1% par rapport à la dose provenant de l'ingestion naturelle de  $^{238}\text{U}$ .

Parmi les biomatériaux naturels, les os de bovins présentent une activité supérieure à celles des humains. Le corail possède une activité plus élevée de manière générale par rapport aux fémurs de références bien que les éléments radioactifs soient différents. Dans l'hypothèse d'une assimilation supplémentaire répartie de façon homogène dans l'organisme, un implant de corail de 90 g d'activité 0,144 Bq en  $^{235}\text{U}$ , délivre une dose effective de  $6,8 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{Sv}$  supplémentaire, par rapport à la dose annuelle de  $^{235}\text{U}$ , voisine de 0,012  $\mu\text{Sv}$  [108]. Bien que les doses calculées à partir des coefficients de dose effective lors de l'ingestion, soient sous estimées, nous sommes loin des doses maximales admissibles sur l'ensemble du corps humain.



# Conclusion générale



Nos analyses donnent des informations sur le comportement migratoire et la nature des débris métalliques dans le tissu capsulaire du genou, en provenance de prothèses unicompartimentales. A ces travaux situés en aval dans la chaîne des biomatériaux implantés, s'ajoutent des mesures de radioactivité afin de détecter une nocivité possible des matériaux fabriqués en amont avant l'implantation.

Les tissus biologiques per-opératoires, métallisés, sont analysés à l'aide de méthodes complémentaires : PIXE et STEM-EDXS. La méthode nucléaire PIXE, de grande sensibilité, nous a permis d'obtenir des informations sur le comportement des débris métalliques à l'échelle micrométrique dans le tissu. La sonde électronique STEM-EDXS caractérise les grains d'alliage à l'échelle nanométrique. Les tissus sont prélevés au niveau supérieur de l'articulation du genou et se scindent en deux catégories.

La première reliée à des implants métalliques exclusivement en titane, et dont la partie fixée au fémur a subi un traitement surfacique avec implantation ionique à l'azote, présente la plus faible contamination par rapport à l'ensemble des échantillons. Un excès de Ti par rapport à V lorsque celui-ci est accessible à la mesure PIXE indique que les débris existent sous forme de produits de corrosion. Localement, des rapports de concentration Ti/V proches de l'alliage indiquent la présence de grains métalliques. Il est impossible d'affirmer si les débris sont le résultat d'une corrosion de l'implant, d'une usure mécanique ou bien d'une association des deux. Ils peuvent aussi résulter de leur dégradation par les cellules. Les macrophages et les cellules géantes peuvent phagocyter certains débris, l'acidité régnante à l'intérieur de la cellule dissout ces grains de métal et à la mort cellulaire les ions métalliques sont libérés dans le tissu.

Une corrélation entre le type de prothèse et la teneur en éléments métalliques est observable.

La seconde catégorie d'échantillons est associée à un couple métal-métal du type Cr-Co-Mo et TA6V, séparé par une plaque en polyéthylène. Une usure mécanique est visualisée sur certains implants, la teneur en débris dans le tissu est directement reliée aux propriétés mécaniques des différents matériaux de la prothèse. Une usure prématurée de la plaque UHMWPE provoque un contact et une usure mécanique entre les deux parties métalliques. Le TA6V, moins dur est plus friable. Il génère une plus grande quantité de débris que l'alliage Cr-Co-Mo, matériau encore plus dur et abrasif. Des débris de polyéthylène de grandes dimensions et en grande quantité sont présents sur les clichés histologiques. Un frottement entre les implants et l'os d'ancrage peut être aussi à l'origine de l'usure des matériaux. Ces débris d'usure migrent dans toute l'articulation et pénètrent à l'intérieur du tissu sur plusieurs mm.

La migration des débris dans le tissu capsulaire voisin de l'articulation est très hétérogène aussi bien en surface, qu'au voisinage de la membrane synoviale, et qu'en profondeur dans le tissu. La teneur d'un même élément métallique (Ti par exemple) varie souvent d'un facteur 10, voir 100 sur une zone d'un même tissu. Suivant la teneur initiale en surface, la profondeur de migration des débris évolue. Une forte contamination se propage sur plusieurs mm avec une décroissance au fur et à mesure que l'on pénètre le tissu. Au sein d'un échantillon, des écarts de migration sont constatés, les zones les plus polluées étant les plus profondes. Ces phénomènes sont dépendants des fonctions biologiques de la membrane capsulaire et synoviale.



Les débris présents majoritairement dans 3 échantillons les plus pollués sont en TA6V. Un rapport compris entre 100 et 200 existe entre les débris issus de cet alliage et ceux à base de Cr-Co-Mo, teneurs liées aux propriétés mécaniques et d'usure de ces matériaux. Au niveau des profils réalisés, les grains appartenant aux deux types d'alliages migrent de la même manière dans le tissu.

Le tissu fibreux, situé en surface du tissu capsulaire, remplit son rôle d'interposition mécanique en contenant les débris. Les plus gros grains sont encapsulés dans ce tissu fibreux, les plus petits migrent au travers pour atteindre des cellules géantes ou macrophages qui les phagocytent. Les produits acides, présents à l'intérieur de la cellule, détruisent la couche de passivation des grains métalliques, et dans certains cas une dissolution complète peut avoir lieu. Lorsque la cellule meurt, elle se brise et libère des ions ou des fragments de débris plus petits. Ces derniers se répartissent de manière plus homogène ou diffuse dans le tissu, du fait de leur taille réduite qui facilite leur mobilité à travers le tissu dense et scléreux.

Les débris de TA6V sont très stables chimiquement quelle que soit la zone moyenne d'analyse. Cependant, lorsqu'on s'intéresse à certains débris métalliques, un excès d'aluminium par rapport au vanadium indique la présence de la phase  $\alpha$  majoritairement. La phase  $\beta$  est soit inexistante initialement dans la prothèse, soit minoritaire et masquée par la phase  $\alpha$ . Elle peut aussi se dissoudre plus rapidement que la phase  $\alpha$ .

Le comportement des débris de Cr-Co-Mo confirme la dissolution et la passivation des grains par les cellules avec une modification de la stoechiométrie de l'alliage initial, le Cr crée une couche de passivation au niveau du débris.

Une combinaison d'analyse par PIXE et histologie sur des coupes adjacentes corrèle des informations entre les débris métalliques et les réponses biologiques sur le volume des coupes associées. La difficulté est un repérage précis correspondant aux zones similaires sur les deux coupes ; il nous est apparu nécessaire de réaliser les deux méthodes sur une seule et même coupe. La mise en place d'un protocole, associant ces deux méthodes directement sur cible mince, en respectant une chronologie d'analyse en vue d'éliminer les interférences, s'est avérée fructueuse. Il est possible de déterminer la nature, la taille, la quantité de débris métalliques et la réponse du tissu dans lequel ils se trouvent. Dans un premier temps, des cartographies élémentaires et des mesures de concentrations métalliques à l'aide de la méthode PIXE sont effectuées sur cible mince. Ensuite cette même cible est colorée au bleu de toluidine afin d'observer au microscope optique le tissu biologique. La principale réponse est la constitution d'un tissu scléreux dense, généralement induit par une activité macrophagique provoquée par les corps étrangers.

Le contexte de nos échantillons fortement métallosés en grains à base de titane, mais relativement bien tolérés et induisant des réponses favorables de l'organisme, peuvent engendrer des réactions inflammatoires, lorsque la quantité de débris est importante. Notre méthode indique que les fortes quantités de débris en TA6V sont liées à une matrice collagénique et macrophagique.

Les mesures de radioactivité résiduelle de biomatériaux naturels et synthétiques montrent qu'ils ne présentent pas de toxicité radioactive pour l'organisme. Au-delà de ces mesures, des informations supplémentaires sont obtenues. Des écarts d'activités entre les fémurs des différentes espèces sont liés aux comportements alimentaires

ou physiologiques des différents mammifères. Le corail ne contient pas les mêmes éléments radioactifs. En ce qui concerne les matériaux de synthèse, leur activité ainsi que les éléments détectés sont liés à leur processus de fabrication. La mesure des radioactivités résiduelles des biomatériaux nécessite une grande sensibilité. L'utilisation d'un spectromètre  $\gamma$  ultra bas bruit de fond (Laboratoire Souterrain de Modane) a permis de détecter les principaux éléments radioactifs des biomatériaux présents à l'état de traces :  $^{40}K$ ,  $^{226}Ra$ ,  $^{228}Ra$ ,  $^{238}Ra$ ,  $^{235}U$ ,  $^{234}Th$ ,  $^{60}Co$  . . .

De manière générale, il serait préférable d'améliorer la statistique mais la disponibilité des sites de mesure est limitée.

## Perspectives

La corrélation PIXE-Histologie peut connaître certaines améliorations. Une épaisseur de coupes des cibles encore plus mince peut être obtenue sur des tissus moins contaminés en débris métalliques. En effet, ces hautes teneurs fragilisent la coupe et provoquent sa détérioration. Une diminution de l'épaisseur entraîne une diminution du dépôt de l'énergie et favorise une meilleure pénétration du colorant. La PIXE atteint des sensibilités de l'ordre du ppm sur certaines matrices biologiques. Dans le cadre de contamination plus faible que nos échantillons, mais présentant de plus grandes pathologies, cette méthode peut corréler des informations entre les teneurs métalliques faibles et des réactions biologiques plus virulentes à l'échelle cellulaire. Une faible teneur contraint à des temps d'acquisition plus longs, il est donc nécessaire d'évaluer la tenue de la coupe et sa coloration selon les différentes conditions expérimentales et le contexte biologique de contamination.

Les observations qui découlent de nos travaux indiquent que les débris à base de titane sont constitués majoritairement de phase  $\alpha$ . Suivant le processus thermo-mécanique de fabrication et de traitement ou de conformation, la structure microscopique de l'alliage TA6V change. En raison de l'aspect microstructural des phases  $\alpha$  et  $\beta$ , les conditions de traitement modifient la forme des grains des deux phases mais aussi leur répartition, leur dimension et pour la phase  $\beta$  sa présence au sein de l'alliage. Des travaux en cours de réalisation sur l'alliage TA6V des plateaux tibiaux repris vont révéler les phases présentes et leur microstructure. Ces renseignements, associés à nos résultats, orienteront les interprétations sur la présence uniquement de la phase  $\alpha$  dans les tissus contaminés.

Dans le cas d'une coexistence au niveau de l'alliage des deux phases, la disparition de la phase  $\beta$  dans le tissu biologique (dissolution) discrédite les débris provenant de l'alliage TA6V et du titane réputés pour posséder une grande stabilité chimique. La dissolution de la phase  $\beta$  contenant du vanadium peut engendrer des problèmes de toxicité.

Les particules métalliques ne possèdent pas le même comportement vis à vis de la dissolution ou de leur stabilité chimique selon leur date d'arrivée dans le tissu et si elles ont déjà été corrodées. Une étude *in vitro* sur des débris artificiels et naturels en contact de cellules macrophages dans le but d'observer la dissolution remettrait en cause la stabilité apparente de cet alliage. Elle donnerait en outre une indication sur une dissolution préférentielle et sur une corrosion de grain ou de joint.

Nous avons mesuré et caractérisé l'état de contamination de 5 patients ayant subi une reprise de prothèse défailante. Certains échantillons sont excessivement pollués au niveau de l'articulation. Un suivi médical, à l'aide de mesures des teneurs en éléments métalliques dans le sang et l'urine, permettrait d'évaluer la contamination générale de l'organisme, directement corrélée à celle du genou.

# Bibliographie

- [1] L. Sedel and C. Janot. Biomatériaux. Cahier de synthèse du programme MATÉRIEAUX du CNRS, 1995.
- [2] J.L. Irigaray, H. Oudadesse, and V. Brun. Nuclear methods to characterize biomaterials, a review. *Biomaterials*, 22 :629–640, 2001.
- [3] F. Braye, J.L. Irigaray, E. Jallot, H. Oudadesse, G. Weber, N. Deschamps, C. Deschamps, O. Frayssinet, P. Tourenne, H. Tixier, S. Terver, J. Lefavre, and A. Amirabadi. Resorption kinetic of osseous substitute : natural coral and synthetic hydroxyapatite. *Biomaterials*, 17 :1345–1350, 1996.
- [4] E. Jallot. 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, 1997.
- [5] H. Oudadesse, J.L. Irigaray, Y. Barbotteau, V. Brun, and Ph. Moretto. Combined pixe and stem study of the behavior of trace elements in gel formed around implant coated with bioactive glass. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 190 :458–465, 2002.
- [6] Y. 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 biomatériaux. Thèse No 1360, Université Blaise Pascal, 2002.
- [7] E. Chassot. Mise en oeuvre de méthodes nucléaires et de diffraction pour l’analyse de la structure de l’hydroxyapatite dopée et des transferts d’éléments métalliques à partir de biomatériaux implantés. Thèse No 1292, Université Blaise Pascal, 2001.
- [8] Y. Mu, T. Kobayashi, M. Sumita, A. Yamamoto, and T. Hanawa. Metal ion release from titanium with active oxygen species generated by macrophages in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research*, 49 :238–243, 2000.
- [9] U.W. Bischoff, M.A.R. Freeman, D. Smith, M.A. Tuke, and P.J. Gregson. Wear induced by motion between bone and titanium or cobalt-chrome alloys. *The Journal of Bone and Joint surgery*, 76 :713–719, 1994.
- [10] D.J. Breen and D.J. Stoker. Titanium lines : A manifestation of metallosis and tissue response to titanium alloy megaprotheses at the knee. *Clinical Radiology*, 47 :274–277, 1993.
- [11] P.E. Beaulé, P. Campbell, and H. Amstutz. Metallosis and metal-on-metal bearings. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 82 :751–752, 2000.
- [12] F. Langlais. Prosthetic loosening after total hip arthroplasty diagnosis and management. *Rev. Rhum. [Ed. Fr.]*, 63 :773–785, 1996.

- [13] J.A. Savio, L.M. Overcamp, and J. Black. Size and shape of biomaterials wear debris, a review. *Clinical Materials*, 15 :101–147, 1994.
- [14] D.L. Wolfarth, D.W. Han, G. Bushar, and N.L. Parks. Separation and characterization of polyethylene wear debris from synovial fluid and tissue samples of revised knee replacements. *Journal of Biomedical Materials Research*, 34 :57–61, 1997.
- [15] O.E.M. Pohler. Unalloyed titanium for implants in bone surgery. *Injury, International Journal of the Care of the Injured*, 31 :7–13, 2000.
- [16] Arun S. Shanbhag, H.O. Bailey, D.-S. Hwang, C.W. Cha, N.G. Eror, and H.E. Rubash. Quantitative analysis of ultrahigh molecular weight polyethylene (uhmwpe) wear debris associated with total knee replacements. *Journal of Biomedical Materials Research*, 53 :100–110, 2000.
- [17] X. Yuan, L. Ryd, and R. Huiskes. Wear particle diffusion and tissue differentiation in total knee arthroplasty. *Journal of Biomedical Materials Research*, 33 :100–110, 2000.
- [18] P.E. Beaulé, P. Campell, P.S. Walker, T.P. Schmalzried, F.J. Dorey, G.W. Blunn, C.J. Bell, L.H. Yaha, and H. Amstutz. Polyethylene wear characteristic in vivo and in a knee simulator. *Journal of Biomedical Materials Research*, 60 :411–419, 2002.
- [19] L. Marmor. La prothèse unicompartimentale de genou. Cahiers d’enseignement de la SOFCOT, 65 :Prothèse unicompartimentale de genou, 1997.
- [20] G. Daculsi, J.M. Bouler, and C. Rey. Les matériaux de substitution des tissus calcifiés. Cahiers d’enseignement de la SOFCOT 57 : Biomatériaux de substitution de l’os et du cartilage, 1996.
- [21] Ph. Neyret, F. Chatain, and G. Deschamps. La prothèse unicompartimentale : options prothétiques et matériaux. Cahiers d’enseignement de la SOFCOT 65 : Prothèse Unicompartimentale de Genou, 1997.
- [22] M. Long and N.J. Rack. Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective, a review. *Biomaterials*, 19 :1621–1639, 1998.
- [23] J.-P. Meyrueis. Les métaux utilisés en chirurgie orthopédique. Cahiers d’enseignement de la SOFCOT 25 : Biomatériaux en chirurgie orthopédique, 1985.
- [24] M. Niinomi. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Materials Science and Engineering*, 243 :231–236, 1998.
- [25] I. Gotman. Characteristics of metal used in implants. *Journal of Endourology*, 11 :383–389, 1997.
- [26] J.A. Disegi and L. Eschbach. Stainless steel in bone surgery. *Injury, International Journal of the Care of the Injured*, 31 :2–6, 2000.
- [27] A. Marti. Cobalt-base alloys used in bone surgery. *Injury, International Journal of the Care of the Injured*, 31 :18–21, 2000.
- [28] B.H. Sassi and P. Lehr. Morphologies structurales de l’alliage de titane ta6v-incidences sur les propriétés mécaniques, le comportement à la fatigue et la tenue en fatigue. Rapport de recherche 080, ENSTA, 1977.
- [29] E. Barra Rosa and P. Lehr. Caractérisation général du titane et de ses alliages. Rapport de recherche 118, ENSTA, 1979.

- [30] Metallography and microstructures. *ASM HANBOOK, ASM desks Edition*, 9, 1985.
- [31] J.R. Wood and P.A. Russo. Heat treatment of titanium alloys. *Industrial Heating*, pages 51–57, 1997.
- [32] J.A. Disegi. Titanium alloys for fracture fixation implants. *Injury, International Journal of the Care of the Injured*, 31 :14–17, 2000.
- [33] J.J. Jacobs, J.L. Gilbert, and R.M. Urban. Corrosion of metal orthopaedic implants. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 80 :268–282, 1998.
- [34] W. Braemer. Biocompatibility of dental alloys. *Advanced Engineering Materials*, 3 :753–761, 2001.
- [35] M. Taher and A.S. Jabab. Galvanic corrosion behavior of implant suprastructure dental alloys. *Dental Materials*, 19 :54–59, 2003.
- [36] R. Venugopalan and L.C. Lucas. Evaluation of restorative and implant alloys galvanically coupled to titanium. *Dental Materials*, 14 :165–172, 1998.
- [37] J.P. Collier, V.A. Surprenant, R.E. Jensen, and M.B. Mayor. Corrosion at the interface of cobalt-alloy heads on titanium-alloy stems. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 271 :305–312, 1991.
- [38] D. Sharan. The problem of corrosion in orthopaedic implant materials. *Orthopaedic Update (India)*, 9 :1–5, 1999.
- [39] J Rieu, A. Pichat, and L.M. Rabbe. Deterioration mechanisms of joint prosthesis materials. several solutions by ion implantation surface treatments. *Biomaterials*, 11 :51–54, 1990.
- [40] J.F. Ziegler and J.M. Manoyan. The stopping of ions in compounds. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B35 :215–228, 1988.
- [41] W.K. Chu, J.W. Mayer, and M.-A Nicolet. Backscattering spectrometry. Academic Press, London, 1978.
- [42] W. Maenhaut. Applications of ion beam analysis in biology and medicine, a review. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B35 :388–403, 1988.
- [43] W.J. Przybylowicz, J. Mesjasz-Przybylowicz, C.A. Pineda, and C.L. Churms. Biological applications of the nac nuclear microprobe. *X-ray Spectrometry*, 28 :237–243, 1999.
- [44] Ph. Moretto, Y. Llabador, M. Simonoff, and L. Lazafindrade. Quantitative mapping of intracellular cations in the human amniotic membrane. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B77 :275–281, 1993.
- [45] K. Ishii, A. Sugimoto, A. Tanaka, S; Matsuyama, H. Yamazaki, C. Akama, T. Amartivan, H. Endoh, Y. Oishi, H. Yuki, S. Sugihara, M. Satoh, T. Kamiya, T. Sakai, K. Arakawa, M. Saidoh, and S. Oikawa. Elemental analysis of cellular samples by in-air micro-pixe. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B181 :448–453, 2001.
- [46] J.L. Campbell. Specimen preparation in pixe analysis. *Nuclear Instruments and Methods*, 142 :262–273, 1977.
- [47] J.L. Campbell, D. Higuchi, J.A. Maxwell, and W.J. Teesdale. Quantitative pixe microanalysis of thick specimens. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B77 :95–109, 1963.

- [48] J. Galuszka, L. Jarczyk, E. Rotika, A. Strzalkowski, and M. Sych. The influence of target preparation and mode of irradiation on pixe analysis of biological samples. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B3 :141–146, 1984.
- [49] S.A.E. Johansson and T.B. Johansson. Analytical application of particle induced x-ray emission. *Nuclear Instruments and Methods*, 137 :473–516, 1976.
- [50] K. Ishii and S. Morita. Continuous background in p.i.x.e. *International Journal of P.I.X.E.*, 3, 1990.
- [51] F. Folkmann, C. Gaarde, T. Huus, and K. Kemp. Proton induced x-ray emission as a tool for trace element analysis. *Nuclear Instruments and Methods*, 116 :487, 1974.
- [52] F. Folkmann, K.M. Cramon, and N. Hertel. Angular distribution of particules induced x-ray emission. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B3 :11, 1984.
- [53] J.A. Maxwell, W.J. Teesdale, and J.L. Campbell. The guelph pixe software package. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B95 :407–421, 1995.
- [54] P.R. Bevington. Data reduction and error analysis for the physical sciences. Mac Graw-Hil, New York, 1969.
- [55] J.A. Maxwell, R.G. Leigh, and J.L. Campbell. Least-squares fitting of pixe spectra with a digital filter treatment of the continuum. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B3 :301–304, 1984.
- [56] S. Gama, M. Volfinger, C. Ramboz, and O. Rouer. Accuracy of pixe analyses using a funny filter. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B181 :150–156, 2001.
- [57] S. Gama. Événements métallographies à w-bi (au) à 305 ma en châtaigneraie du cantal : apport d’une analyse multi-spectrométrique (micro pixe-pige et raman) des minéraux et des fluides occlus à l’identification des sources de fluides hydrothermaux. Thèse , Université d’orléans, 2000.
- [58] W.K. Chu and J.R. Liu. Rutherford backscattering spectrometry : reminiscences and progress. *Materials Chemistry and Physics*, 46 :183–188, 1996.
- [59] J.R. Tesmer and M. Nastasi. Handbook of modern ion beam materials analysis. MRS Material Research Society, Pittsburgh, Pennsylvania, 1995.
- [60] L. Razafindrade. Dosage des éléments de faible numéro atomique par microsonde nucléaire : application aux échanges ioniques cellulaires. Thèse No 1345, Université Bordeaux I, 1995.
- [61] D. Heck and E. Rokita. Local matrix mass thickness determination in scanned micro-pixe by proton backscattering. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B3 :259–262, 1984.
- [62] L.R. Doolittle. Algorithms for the rapid simulation of rutherford backscattering spectra. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B9 :344–351, 1985.
- [63] L.R. Doolittle. A semiautomatic algorithm for rutherford backscattering analysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B15 :277–231, 1986.
- [64] Ph. Moretto and L. Razafindrade. Simulation of rbs spectra for quantitative mapping of inhomogeneous biological tissue. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B104 :171–175, 1995.

- [65] J. Liu, T. Xie, and H.J. Fishbeck. Resonance effects in thin film proton backscattering spectrometry. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B56/57 :744–748, 1991.
- [66] J.A. Cookson. Specimen damage by nuclear microbeams and its avoidance. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B30 :324–330, 1988.
- [67] K. Themmer. Elemental losses from organic material caused by proton irradiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B54 :115–117, 1991.
- [68] K. Themmer, Spanne P., and K.W. Jones. Mass loss during x-ray microanalysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B49 :52–59, 1990.
- [69] T. Talmon and E.L. Thomas. Beam heating of a thick cold stage specimen in the sem/stm. *Journal of Microscopy*, pages 111–151, 1977.
- [70] M. Cholewa and G.J.F. Legge. Temperature estimation of organic foil for particule beams. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B40 :651–654, 1989.
- [71] M. Mosbah, J.P. Duraud, and R. Clocchiatti. Use of the  $\alpha$   $\rightarrow$   $\beta$  quart transition to monitor the temperature increase produced by a proton microbeam. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B130 :171–175, 1997.
- [72] R. Delto and R. Salenski. Mev microprobe analysis of polymer films : radiation damage aspects. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B190 :318–323, 2002.
- [73] F. Watt, G.W. Grime, and C.C. Perry. The damage effects of  $1\mu\text{m}$  beam on a single pollen grain. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B30 :331–336, 1988.
- [74] M. Maetz, W.J. Przybylowicz, J. Mesjasz-Przybylowicz, A. Schüßler, and K. Traxel. Low dose nuclear microscopy as a necessity for accurate quantitative microanalysis of biological samples. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B158 :292–298, 1999.
- [75] Y. Llabador, Bertault, Gouillaud, and Ph. Moretto. Advantages of high speed scanning for microprobe analysis of biological samples. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B49 :435–440, 1990.
- [76] V. Banchet. Nanocaractérisation par spectroscopies d’émission x et de pertes d’énergies des électrons des réactions physico-chimiques à l’interface verre bioactif/fluide biologique. Thèse , Université de Reims Champagne Ardenne, 2003.
- [77] M.A. Kramers. On the theory of x-ray absorption and of the continuous x-ray spectrum. *Phil. Mag.*, 46 :836, 1923.
- [78] T.A. Hall. Quantitative electron probe x-ray microanalysis in biology. *Scanning Microscopy*, 3 :461–466, 1989.
- [79] G. Cliff and G.W. Lorimer. The quantitative analysis of thin specimens. *Journal of Microscopy*, 103 :203–207, 1975.
- [80] Z. Horita, T. Sano, and M. Nemoto. Simplification of x-ray absorption correction in thin sample quantitative microanalysis. *Ultramicroscopy*, 21 :271–276, 1987.
- [81] Ph. Hubert. Nouvelles perspectives pour les ultra-faibles radioactivités dans un laboratoire souterrain. Le courrier du CNRS Centre National de la Recherche Scientifique, Images de la physique, 1991.



- [82] D. Mouchel and R. Wordel. Measurement of low-level radioactivity in environmental samples by gamma-ray spectrometry. *Applied Radiation and Isotopes*, 43 :49–59, 1992.
- [83] R. Torres. Développements et performances d'un spectromètre ge bas bruit de fond au niveau de la mer. Thèse No 1868, Université Bordeaux I, 1998.
- [84] F. Hubert, Ph. Hubert, and R. Gurriaran. Spectrométrie gamma ultra faibles radioactivités au laboratoire souterrain de modane. Journées de spectrométrie gamma et X93, note CEA N-2756, 1993.
- [85] R. Gurriarán. Développement de la spectrométrie  $\gamma$  ultra bas bruit de fond au laboratoire de modane, application aux décroissances double  $\beta$ . Thèse No 1521, Université Bordeaux I, 1996.
- [86] I.A. Kapandji. Physiologie articulaire : membre inférieur. 5<sup>ème</sup> édition, Maloine, 2000.
- [87] F. Flaisler and B. Combe. Histologie et physiologie de la synoviale normale. Encyclopédie médico-chirurgicale, Appareil locomoteur, Editions Techniques Paris, 1995.
- [88] D.N. Slatkin, R.E. Shroy, and K.W. Jones. Microscopic radiation to air-dried human blood cells caused by  $1.7\text{ mev}^{1,2,3h}$  and  $^4\text{he}$  beams. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B9 :66–70, 1985.
- [89] Statistique appliquée à l'exploitation des mesures. Commissariat à l'Energie Atomique, Masson, Paris, 1978.
- [90] Handbook of chemistry and physics. 56<sup>th</sup> Edition, CRC Press, 1975/1976.
- [91] D.R. Haynes, T.N. Crotti, and M.R. Haywood. Corrosion of and changes in biological effects of cobalt chrome alloy and 316l stainless steel particles with ages. *Journal of Biomedical Materials Research*, 49 :167–175, 2000.
- [92] N.C. Blumenthal, V. Cosma, W. Jaffe, and S. Stuchin. A new technique for quantification of metal particulates and metal reaction products in tissues near implants. *Journal of Applied Biomaterials*, 5 :191–193, 1994.
- [93] S. Ichinose, T. Muneta, I. Sekiya, S. Itoh, H. Aoki, and M. Tagami. The study of metal ion release and cytotoxicity in cr-co-mo and ti-al-v alloy in total knee prosthesis - scanning electron microscopic observation. *Journal of Materials Science : Materials in Medecine*, 14 :79–86, 2003.
- [94] T. Visuri, E. Pukkala, P. Paavolainen, Pulkkinen P., and Riska E.B. Cancer risk after metal on metal and polyethylene on metal total hip arthroplasty. *Clinical Orthopaedics*, 329 :280–289, 1996.
- [95] M.H. Huo, D.W. Romness, and S.M. Huo. Metallosis mimicking infection in a cemented total knee replacement. *Orthopaedics*, 20 :466–469, 1997.
- [96] M. Forest, J.P. Courpied, P. Lefloch, A. Carlioz, R. Abelanet, and M. Postel. La hanche opérée. *Annales de Pathologie, Masson Paris*, 5 :3–18, 1985.
- [97] C. Cordonnier, H. Sevestre, and M.-F. Gontier. Les corps étrangers après prothèse totale de hanche. *Annales de Pathologie, Masson Paris*, 17 :100–108, 1997.
- [98] M.G. Shettlemore and K.J. Bundy. Toxicity measurement of orthopedics implant products using a bioluminescent bacterial assay. *Journal of Biomedical Materials Research*, 45 :395–403, 1999.

- [99] M. Ermolli, C. Menné, G. Pozzi, M.-A. Serra, and L.A. Clerici. Nickel, cobalt and chromium-induced cytotoxicity and intracellular accumulation in human haca keratinocytes. *Toxicology*, 159 :23–31, 2001.
- [100] D.R. Haynes, S.D. Rogers, S. Hay, M.J. Pearcy, and D.W. and Howie. The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 75 :825–834, 1993.
- [101] A. Katzer, S. Hochertz, G.H. Buchhorn, and J.F. Loehr. In vitro toxicity and mutagenicity of co-cr-mo and ti6al wear particles. *Toxicology*, 190 :145–154, 2003.
- [102] K. Merrit and S.A. Brown. Distribution of cobalt chromium wear and corrosion products and biologic reactions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 329 :233–243, 1996.
- [103] N. Hallab, M. Katharine, J.J. Jacobs, and J. Black. Hypersensitivity to metallic biomaterials : a review of leukocyte migration inhibition assays. *Biomaterials*, 21 :1301–1314, 2001.
- [104] N. Hallab, K. Merrit, and J.J. Jacobs. Metal sensitivity in patients with orthopaedics implants. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 83 :428–436, 2001.
- [105] A. Pichat, L.-M. Rabbe, J. Rieu, A. Rambert, C. Chabrol, and M. Robelet. Effect of ion implantation on titanium alloy/polyethylene and 316l stainless steel/polyethylene friction couples running in joint prostheses. *Surface and Coatings Technology*, 45 :15–22, 1991.
- [106] R. Chiesa, M.C. Tanzi, S. Alfonsi, L. Paracchini, M. Moscatelli, and A. Cigada. Enhanced wear performances of highly crosslinked uhmwpe for artificial joints. *Journal of Biomedical Materials Research*, 50 :381–387, 2000.
- [107] R. Pilviö, J.J. Larosa, D. Mouchel, R. Wordel, M. Bickel, and T. Altizoglou. Measurement of low level radioactivity in bone ash. *Journal of Environmental Radioactivity*, 43 :343–356, 1999.
- [108] Sources and effects of ionizing radiations. UNSCEAR report vol.1, 2000.
- [109] R.W. Legget and T.C. Pellmar. The biokinetics of uranium migrating from embedded du fragments. *Journal of Environmental Radioactivity*, 64 :205–225, 2003.
- [110] D.S. Popplwell. Biokinetics and absorption of actinides in human volunteers : A review. *Applied Radiation and Isotopes*, 46 :279–286, 1995.
- [111] E.J. Bradley. The distribution of  $^{210}\text{po}$  in human bone. *The Science of the Total Environment*, 130/131 :85–93, 1993.
- [112] J.W. Mietelski, P. Gaca, and M. Jasińska. Plutonium and other alpha-emitters in bone of wild, herbivorous animals from north-eastern poland. *Applied Radiation and Isotopes*, 53 :251–257, 2000.
- [113] T. Altizoglou. Low level radioactivity measurements in an ocean shellfish matrix. *Applied Radiation and Isotopes*, 52 :539–544, 2000.
- [114] K.N. Yu, S.Y. Mao, E.C.M. Young, and M.J. Stokes. A study of radioactives in six types of fish consumed in hong kong. *Applied Radiation and Isotopes*, 48 :515–519, 1997.
- [115] P. Linsalata, R. Morse, H. Ford, and M. Eisenbud. Th, u, ra and rare earth element distribution in farm animal tissues from an elevated natural radiation background environment. *Journal of Environmental Radioactivity*, 14 :233–257, 1991.

- [116] E. Navarro, C. Roldàn, J. Cervera, and J.L. Ferrero. Radioactivity measurements on migrating birds (*turdus philomelos*) captured in the comunidad valenciana (spain). *The Science of the Total Environment*, 209 :143–147, 1998.

## RESUME :

Les implants utilisés comme biomatériaux sont fonctionnels, biocompatibles et certains bio-actifs. Il existe quatre familles de biomatériaux: les métaux et alliages, les céramiques, les polymères et les matériaux naturels. Des phénomènes d'usures (corrosion, frottement) génèrent des débris dans l'organisme. Ces débris engendrent différents problèmes: toxicité, réactions inflammatoires, descellements prothétiques par lyse osseuse. Nature, taille, morphologie, quantité des débris sont des paramètres qui influencent les réactions biologiques susceptibles de se produire.

Nous avons caractérisé la contamination métallique (migration, comportement *in vivo*, quantité, taille et nature des débris) provenant des prothèses de genou au niveau du tissu capsulaire voisin. Les méthodes PIXE-RBS et STEM-EDXS, principalement employées, sont des outils complémentaires.

Les débris sont répartis de façon hétérogène dans l'articulation du genou. Ils migrent sur plusieurs milliers de  $\mu\text{m}$  en profondeur. Pour les échantillons fortement pollués, les débris sont des grains d'alliages de dimension de l'ordre du  $\mu\text{m}$  (PIXE). Les rapports massiques *in vivo* confirment la stabilité chimique des grains de TA6V et l'évolution des grains de CrCoMo. Une étude à l'échelle nanométrique (STEM-EDXS) montre une dissolution de grains de TA6V ( $\mu\text{m}$ ) en de plus petits (nm). Localement la présence de grains de phase  $\alpha$  indiquerait une dissolution préférentielle de la phase  $\beta$  (joint de grain) avec largage de Al et de V éléments carcinogènes et toxiques.

Le développement d'un protocole PIXE-histologie en cible mince, corrèle une analyse PIXE et histologique sur une même zone. Ce protocole informe sur les pathologies liées aux contaminations métalliques, même si leur teneur est de l'ordre du  $\mu\text{g/g}$ , grâce à la sensibilité de la méthode PIXE.

De plus l'innocuité vis à vis de la radioactivité de plusieurs biomatériaux naturels ou synthétiques est établie, à l'aide de système de détection  $\gamma$  ultra bas bruit de fond.

*Mots clés* : prothèse, biomatériaux, alliage TA6V, alliage CrCoMo, usure, débris métalliques, ultra faible radioactivité, PIXE-RBS, STEM-EDXS.

## ABSTRACT:

Implants used as biomaterials fulfill conditions of functionality, compatibility and occasionally bio-activity. There are four main families of biomaterials: metals and metal alloys, polymers, bioceramics and natural materials. Because of corrosion and friction in the human body, implants generate debris. These debris develop different problems: toxicity, inflammatory reactions, prosthetic unsealing by osseous dissolution. Nature, size, morphology and amount of debris are the parameters which have an influence on tissue response.

We characterize metallic contamination coming from knee prosthesis into surrounding capsular tissue by depth migration, *in vivo* behaviours, content, size and nature of debris. The PIXE-RBS and STEM-EDXS methods, that we used, are complementary, especially about characterization scale.

Debris contamination distributed in the whole articulation is very heterogeneous. Debris migrate on several thousands  $\mu\text{m}$  in tissue. Solid metallic particles,  $\sim \mu\text{m}$ , are found in the most polluted samples, for both kinds of alloys TA6V and CrCoMo. In the mean volume analysed by PIXE, the *in vivo* mass ratios [Ti]/[V] and [Co]/[Cr] confirm the chemical stability of TA6V debris and chemical evolution of CrCoMo debris. Complementary measures of TA6V grains, on a nanometric scale by STEM-EDXS, show a dissolution of coarse grain ( $\sim \mu\text{m}$ ) in smaller grains ( $\sim \text{nm}$ ). Locally, TA6V grains of  $\alpha$  phase are detected and could indicate a preferential dissolution of  $\beta$  phase (grain boundaries) with dropping of Al and V, both toxic and carcinogenic elements.

A thin target protocol development correlates PIXE and histological analysis on the same zone. This protocol allows to locate other pathologies in relationship with weaker metal contamination,  $\sim \mu\text{g/g}$ , thanks to the great sensitivity of PIXE method.

Harmlessness with respect to the residual radioactivity of several natural or synthetic biomaterials is established, using ultra low background noise  $\gamma$  detection system.

*Keywords* : prostheses, biomaterials, TA6V alloy, CrCoMo alloy, wear, metallic debris, ultra low radioactivity, PIXE-RBS, STEM-EDXS