



HAL
open science

**Synthèse et caractérisation physico-chimique de
matériaux géopolymères. Application : cinétique de
minéralisation de géopolymères et du biomatériau
CaCO₃ synthétique**

Anne-Cécile Derrien

► **To cite this version:**

Anne-Cécile Derrien. Synthèse et caractérisation physico-chimique de matériaux géopolymères. Application : cinétique de minéralisation de géopolymères et du biomatériau CaCO₃ synthétique. Matériaux. Université Rennes 1, 2004. Français. NNT : . tel-00007911

HAL Id: tel-00007911

<https://theses.hal.science/tel-00007911>

Submitted on 5 Jan 2005

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.

N° d' Ordre 3042

THESE

Présentée devant

L'UNIVERSITE de RENNES 1

Pour obtenir

Le grade de Docteur de l'Université de Rennes 1
Mention CHIMIE

Par

Anne-Cécile DERRIEN

Equipe d'accueil : LCSIM UMR CNRS 6511- Bât. 10b
Ecole Doctorale : Sciences de la matière
Composante Universitaire : SPM

**Synthèse et caractérisation physico-chimique de géopolymères.
Application : cinétique de minéralisation de géopolymères et du
biomatériau CaCO₃ synthétique.**

Soutenue le 8 octobre 2004 devant la commission d'Examen

COMPOSITION DU JURY :

Rapporteurs	G. BLONDIAUX	Directeur de recherche, Directeur du CNRS-CERI Orléans
	Y. LEPETITCORPS	Professeur, ICMCB, Université de Bordeaux 1
Examineurs	J.C. FRICAIN	Maître de conférence, INSERM Bordeaux
	L. YAHIA	Professeur, GRBB, Ecole polytechnique de Montréal, Canada
	G. CATHELINÉAU	Professeur, co-directeur de thèse, Université de Rennes1
	H. OUDADESSE	Professeur, directeur de thèse, Université de Rennes1
Invité	J.C. SANGLEBOEUF	Maître de conférence, LARMAUR, Université de Rennes 1

*A Jérôme
A mes parents
et à ma famille*

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de Chimie du Solide et Inorganique Moléculaire de l'université de Rennes I. Je remercie J.F. Halet et L. Ouahab qui ont occupé les fonctions de directeur du laboratoire pendant la durée de ma thèse.

Messieurs Hassane Oudadesse et Guy Cathelineau ont assuré la direction conjointe de ma thèse. Je tiens à leur exprimer ici toute l'expression de ma gratitude et de mon profond respect pour leur disponibilité, leurs conseils et leurs encouragements pendant l'élaboration de ce travail.

Je remercie Messieurs Gilbert Blondiaux, Yann Lepetitcorps, L'Hocine Yahia et Jean-Christophe Fricain d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de faire partie des membres du jury.

J'exprime ma sincère reconnaissance à Thierry Sauvage et Yves Tessier pour leur disponibilité et leur aide lors de mes expérimentations au CNRS-CERI d'Orléans. Merci également à Olivier, Aurélien Marie-Noëlle et à tout le personnel du CERI pour leur gentillesse.

J'adresse mes vifs remerciements à Marie Lefloch du laboratoire verre et céramiques pour son aide et son entêtement face au spectro de RMN. Merci également à Jean-Christophe Sangleboeuf du LARMAUR pour son aide et sa disponibilité pour les études mécaniques.

Je tiens à remercier Maryline Guilloux-Viry pour son aide lors des essais de repérages par pulvérisation cathodique. Merci à Carole Daiguebonne et à Olivier Guilloux de l'INSA de Rennes qui ont rendu possible l'étude par ICP et à Jean Rocherullé pour son aide lors des premiers essais de frittage.

Mes remerciements vont également aux membres de l'équipe biomatériaux en site osseux. A Sophie Martin pour son aide lors de l'étude biologique des géopolymères et des carbonates de calcium et nos bons moments durant nos travaux ainsi qu'à Dominique Chauvel-Lebret grâce à qui l'évaluation de la cytotoxicité des matériaux géopolymères a pu être réalisée.

J'adresse encore mes vifs remerciements à Joseph Davidovits et à Pierrette Briard pour leur contribution à l'étude des géopolymères.

Je remercie David Bec de l'équipe Biomatériaux en site osseux de s'être aussi bien occupé de nos animaux et d'avoir été aussi disponible.

Je remercie Joseph Lelannic et Olivier Rastoix du CMEBA pour les examens au microscope Electronique à Balayage. Je leur dois les nombreux clichés qui figurent dans cette thèse.

Ce travail a été réalisé avec le soutien technique de Mélanie Dubois, Yann Legal, Christophe Derouet, Thierry Pain, Laurence Burel et Henri Gehanno. Je remercie également Géraldine Olivier pour son aide administrative et son amabilité.

J'exprime mon amitié à Anita Lucas-Girot et à l'ensemble des chercheurs et enseignant-chercheurs de l'UMR 6511.

Je ne saurais oublier dans ces remerciements les stagiaires qui ont rejoint notre équipe au cours de ces trois années : Sophie, Ronan, Olivier, Caroline, Raphaël, Aurélie, Frédéric et Sébastien.

Introduction	5
Chapitre 1 : Biomatériaux et tissus osseux	7
I Les biomatériaux de comblement osseux	9
I.1 Définitions générales sur les biomatériaux	9
I.2 Différents biomatériaux de comblement osseux	10
II La physiologie osseuse	14
II.1 Structure et fonction des tissus osseux	14
II.2 Histologie de la matrice osseuse.....	16
II.3 Le mécanisme de remodelage osseux.....	17
III Intérêts de certains éléments chimiques constitutifs de la partie minérale de la matrice osseuse ou des géopolymères.....	18
III.1 Calcium, phosphore, magnésium, strontium et zinc : éléments constitutifs de la trame osseuse minérale.....	18
III.2 L'aluminium, le silicium et le potassium : composants du géopolymère.	20
Références	22

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation physico-chimique de géopolymères et composites géopolymères/ phosphates de calcium avant et après traitement thermique.....	27
---	-----------

I Synthèse de géopolymères et composites géopolymères/ phosphates de calcium	29
I.1 Introduction sur les géopolymères	29
I.2 Synthèse des géopolymères (GPS) et des composites	31
II Caractérisation physico-chimique et morphologique des géopolymères purs et des composites géopolymères/ phosphates de calcium	37
II.1 Morphologie des géopolymères purs et des composites	37
II.2 Etude du pH des géopolymères purs et des composites géopolymères/ phosphates de calcium.	38
II.3 Caractérisation par DRX	39
II.4 Caractérisation par Transformée de Fourier Infra Rouge	43
II.5 Etude par RMN du solide des géopolymères purs et des composites	47
II.6 Discussion.....	56
III Caractérisation physico-chimique des géopolymères et composites géopolymères/ phosphates de calcium après traitement thermique.	58
III.1 Détermination des conditions de traitement thermique.....	58

III.2 Structure des géopolymères purs et des composites géopolymères/ phosphates de calcium après traitement thermique.	62
IV Conclusion	83
Références	84

Chapitre 3 Géopolymères et composites après traitement thermique : morphologie, propriétés mécaniques et comportement *in vitro*..... 89

I Porosité, morphologies et propriétés mécaniques des géopolymères purs et des composites géopolymères/ phosphates de calcium après traitement thermique	91
I.1 Mesure du pourcentage de porosité et morphologie des échantillons	91
I.2 Mesure de la contrainte maximale à la rupture en compression.....	96
I.3 Influence des paramètres de synthèse sur le pourcentage de porosité et sur la contrainte à la rupture en compression.....	99
I.4 Discussion	109
II Evaluation <i>in vitro</i> des échantillons géopolymères purs (G54_500) et des composites géopolymères/ phosphates de calcium (G54H_500, G54T_500 et G54HT_500).....	110
II.1 Choix des matériaux à analyser	110
II.2 Analyse des matériaux immergés dans une solution SBF	111
II.3 Analyse des matériaux en présence de cellules (tests MTT et MEB).....	128
III Conclusion	134
Références	135

Chapitre 4 Etudes d'implants géopolymères et CaCO₃ synthétique : analyse par PIXE et NAA..... 137

I Cartographie de la composition minérale des implants CaCO₃, TCP, G54_500 et G54HT_500 par PIXE	139
I.1 Principe et Intérêt de la méthode d'analyse PIXE	139
I.2 Application : étude des cinétiques de minéralisation des matériaux CaCO ₃ et TCP implantés chez la brebis.	143
I.3 Application : étude des cinétiques de minéralisation des matériaux G54_500 et G54HT_500 implantés chez le lapin.....	168
II Analyse de matériaux CaCO₃ et TCP par activation neutronique (N.A.A)..	179
II.1 Principe et intérêt de la méthode d'Analyse par Activation Neutronique	179
II.2 Application à l'étude des teneurs en Ca, P, Sr et Mg des matériaux TCP	

et CaCO ₃ implantés chez la brebis	180
III Conclusion	189
Références.....	190
Chapitre 5 Etudes biologiques	193
I Etude des implants CaCO₃ et TCP par histologie	195
I.1 Préparation des échantillons	195
I.2 Résultats.....	196
I.3 Discussion	198
II Etudes biologiques des implants G54_500 et G54HT_500	199
II.1 Aspect macroscopique des implants	199
II.2 Etude histologique	205
III Analyse par ICP de Ca, P, Mg et Al dans le sang	207
III.1 Préparation des échantillons.....	207
III.2 Résultats obtenus par ICP	208
IV Discussion sur les matériaux géopolymères.....	209
V Conclusion	209
Références.....	210
Conclusion générale	211
Annexes	213

Introduction générale

Introduction

Les chirurgiens sont confrontés depuis toujours à des pertes de substances osseuses suite à des fractures ou des dégénérescences. Le processus de réparation osseuse est suffisamment efficace pour que l'intervention humaine reste souvent limitée (réduction de fractures par exemple). Cependant, lorsque les pertes de substance dépassent la taille du défaut critique, il devient nécessaire d'avoir recours à des matériaux de comblement osseux. Le choix se portera préférentiellement sur une autogreffe osseuse mais cette option n'est pas toujours envisageable : la quantité d'os disponible est limitée et engendre une morbidité non nulle du greffon.

Les biomatériaux de comblement osseux offrent une alternative intéressante aux différentes greffes osseuses (présentées au chapitre 1) car ils sont disponibles dans des dimensions variées, en quantité importante et n'induisent pas de rejet par réponse immunitaire (pour les matériaux synthétiques). Ces matériaux ostéoconducteurs « biologiquement muets » sont utilisés comme support de la formation osseuse. Différents matériaux ont été employés comme par exemple le plâtre de Paris (qui est apparu au début du XX^{ème} siècle) comme matériau de reconstruction osseuse dans les sites où la greffe était impossible. De nos jours, les recherches tentent de repousser les limites de ces matériaux pour obtenir des substituts ayant un pouvoir ostéogène conféré par l'ajout aux matériaux de facteurs de croissance ou de cellules souches. En parallèle de ce déficit biologique, les chimistes doivent sans cesse améliorer ces matériaux, utilisés seuls ou comme support de molécules. Chirurgiens orthopédiques et chirurgiens dentistes, chimistes, biologistes et physiciens travaillent de concert sur différents types de matériaux de comblement tels que les céramiques phosphocalciques poreuses (ostéoconductives et généralement non résorbables), les bioverres (bioactifs et non résorbables) par exemple.

Nous présentons ici les résultats d'un travail pluridisciplinaire portant sur différents matériaux : des biomatériaux potentiels à matrice géopolymère et des carbonates de calcium synthétique.

Le carbonate de calcium fait partie de la catégorie des substituts osseux ostéoconducteurs résorbables, toutefois ses propriétés mécaniques limitent ses zones d'application à des zones hors charges. En parallèle, nous avons tenté de développer une nouvelle catégorie de composites avec un bon compromis entre pourcentage de porosité et propriétés mécaniques. L'objectif étant de réaliser des implants ostéoconducteurs à matrice géopolymère qui seraient capables de posséder des propriétés d'ostéocoalescence *in vivo*.

Avant d'étudier le comportement de ces matériaux *in vitro* et *in vivo*, il a fallu s'intéresser à la synthèse et à la caractérisation de nouveaux matériaux pour lesquels nous avons cherché à optimiser les propriétés mécaniques et le pourcentage de porosité. Nous avons choisi de nous intéresser à des aluminosilicates de la famille des géopolymères, zéolithes amorphes définies par le rapport molaire Si/Al. Ces matériaux présentent de bonnes propriétés mécaniques et peuvent être poreux. Nous avons

associé ces aluminosilicates à des phosphates de calcium (HA, TCP et mélange entre HA et TCP), couramment utilisés en tant que biomatériaux. Le chapitre 2 regroupe une présentation de la synthèse et des propriétés physico-chimiques des matériaux synthétisés. Cette étape nous a permis de sélectionner (parmi l'ensemble des matériaux synthétisés) les échantillons qui présentent le meilleur compromis entre pourcentage de porosité et comportement mécanique en compression et des valeurs de pH voisines de 7.

Les matériaux obtenus ont été testés *in vitro* et *in vivo* pour déterminer leur efficacité en tant que biomatériau potentiel. Les études *in vitro* des matériaux à matrice géopolymère seront présentées dans le chapitre 3. Ce chapitre regroupe les caractérisations physico-chimiques des matériaux immergés dans des solutions de SBF et l'étude par ICP des solutions SBF.

Les carbonates de calcium sont reconnus et utilisés comme biomatériaux depuis de nombreuses années. Notre équipe développe les recherches sur le carbonate de calcium synthétique depuis plusieurs années. Une étude de ces matériaux par PIXE et NAA a été entreprise dans le cadre d'un projet ANVAR. Ce type d'études est complémentaire des évaluations biologiques qui s'intéressent à la présence de cellules dans les implants. L'étude des profils de minéralisation des matériaux a été réalisée par PIXE. L'analyse des implants CaCO_3 et TCP (matériau de référence) par activation neutronique a permis de comparer les minéralisations des différents implants. Cette analyse physique par deux méthodes (la PIXE et l'activation neutronique) a permis de quantifier les éléments caractéristiques de la matrice osseuse (site d'implantation des matériaux) et de définir les vitesses auxquelles les matériaux sont colonisés et remplacés par de l'os. Les résultats de ces études (par PIXE et NAA) de carbonates de calcium implantés constituent des résultats importants. Ces techniques s'intéressent au devenir d'implants *in vivo* : en fin de chaîne d'un point de vue du physico-chimiste, ils seront développés au chapitre 4.

Le chapitre 5 regroupe les résultats biologiques de l'étude *in vivo* des biomatériaux CaCO_3 synthétique et des matériaux géopolymères. L'étude ICP des échantillons de sang montre que l'aluminium présent dans la matrice géopolymère (essentiellement en coordinance IV) n'est pas relargué après implantation. Les résultats des expérimentations *in vivo* mettent en évidence la biointégration des implants. Cette biointégration est observée par des méthodes biologiques (Histologie, analyse de textures), ces résultats sont confortés par les études par PIXE des implants géopolymère et composites inclus en résine.

Ce travail a été l'objet d'une collaboration des équipes cristalchimie et biomatériaux et de biomatériaux en site osseux. Les laboratoires du CNRS-CERI et le LARMAUR, les équipes couches minces et chimie des matériaux inorganiques (INSA) du LCSIM et le CMEBA ont contribué au bon déroulement de nos expériences.

Chapitre 1

Biomatériaux et comblement osseux

Chapitre 1 : Biomatériaux et tissus osseux

I	Les biomatériaux de comblement osseux	9
I.1	Définitions générales sur les biomatériaux	9
I.2	Différents biomatériaux de comblement osseux	10
I.2.1	Les greffes osseuses	11
I.2.2	Les céramiques phosphocalciques	12
I.2.3	Les bioverres	13
I.2.4	Le carbonate de calcium naturel (corail) et synthétique	14
II	La physiologie osseuse	14
II.1	Structure et fonction des tissus osseux	14
II.2	Histologie de la matrice osseuse	16
II.2.1	Les cellules de la matrice osseuse	16
II.2.2	La matrice extra-cellulaire (MEC)	17
II.3	Le mécanisme de remodelage osseux	17
III	Intérêts de certains éléments chimiques constitutifs de la partie minérale de la matrice osseuse ou des géopolymères.	18
III.1	Calcium, phosphore, magnésium, strontium et zinc : éléments constitutifs de la trame osseuse minérale	18
III.2	L'aluminium, le silicium et le potassium : composants du géopolymère.	20
	Références	22

I Les biomatériaux de comblement osseux

I.1 Définitions générales sur les biomatériaux

Il existe de nombreuses définitions de ces matériaux, voici celle qui a été proposée lors du congrès de la société européenne des biomatériaux en 1986 à Chester : « BIOMATERIAUX : matériaux non vivants conçus et utilisés dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques ». Cette définition peut être complétée par les actes de transplantation d'organes et de greffes de tissus vivants.

L'intérêt croissant pour ces matériaux s'explique par le vieillissement régulier de la population, la fréquence des accidents de travail ou du trafic dans une société où la qualité de vie est un critère dominant. Les interventions orthopédiques thérapeutiques (traitement de tumeurs, de kystes par exemple) empêchent la réparation osseuse naturelle. Pour des défauts osseux de taille importante, l'utilisation de matériaux de remplacement s'avère nécessaire. Ils doivent répondre aux critères fonctionnels de la partie qu'ils suppléent sans induire de rejets. De nombreux matériaux synthétiques correspondent à la définition donnée à Chester. Il est possible de différencier plusieurs catégories :

- les biomatériaux ayant essentiellement un rôle fonctionnel au sein de l'organisme : cœur artificiel, appareils auditifs, prothèses (partie métallique)... Ces dispositifs présentent les propriétés spécifiques des organes qu'ils remplacent. Ils doivent être biocompatibles mais n'ont pas vocation à disparaître de l'organisme à long terme.

- les biomatériaux de comblement osseux (céramiques phosphocalciques, bioverres, corail...). Ces substituts, comme les précédents doivent être parfaitement tolérés par l'organisme hôte. Dans les zones sous charges, ils doivent répondre à des critères mécaniques afin de permettre au squelette de continuer à jouer son rôle de charpente. Les matériaux de comblement osseux sont en contact intime avec des tissus calcifiés qui se régénèrent spontanément. Ces matériaux devront être aptes à présenter des liaisons avec l'os environnant et favoriser sa croissance. A terme, l'idéal serait de disparaître en étant remplacé par de l'os.

Les matériaux utilisés comme biomatériaux doivent satisfaire à un ensemble de critères comme la biocompatibilité. Cette biocompatibilité peut se définir comme la propriété d'un matériau étranger à l'organisme d'être toléré *in situ* par celui-ci, sans engendrer de réactions inflammatoires ou de rejets. Les biomatériaux sont classés suivant des critères biologiques plus que fonctionnels. Le classement proposé par Hench L.L. suivant les différents phénomènes observés à l'interface os/implant [1] est le suivant :

- **Biomatériaux biotolérés** : c'est le degré minimal de la biocompatibilité. Ces matériaux jouent

essentiellement un rôle fonctionnel. Ils sont biocompatibles et n'induisent pas de réactions inflammatoires. Cependant l'organisme hôte se contente de les tolérer. Une capsule fibreuse les sépare des tissus environnants et limite les échanges de la matrice biologique vers l'implant. Ces matériaux sont utilisés dans les domaines dentaires et orthopédiques (inlays chrome cobalt, ciments polyacryliques, prothèses en carbone vitreux, zircone, alumine dense).

- **Biomatériaux inertes** : leur introduction dans l'organisme n'induit pas de réaction inflammatoire, mais aucune liaison avec les tissus hôtes ne se développe. Ces matériaux sont ostéointégrés [2], ils se caractérisent par une interface fonctionnelle entre le matériau et le tissu hôte. Cette interface peut se caractériser par une fixation morphologique : la matrice osseuse « s'accroche » aux irrégularités de surface du matériau. On peut retrouver dans cette classe des métaux, des alliages à base de titane, d'aluminium pour des prothèses orthopédiques, ainsi que l'alumine comme matériau de cale.

- **Biomatériaux bioactifs** : ces matériaux ont la propriété d'accélérer la réparation tissulaire. Le contact entre l'organisme et le matériau est intime, l'interface est également fonctionnelle, la fixation est bioactive. Ces matériaux se caractérisent par des interactions chimiques entre le biomatériau et la matrice. Le contact avec l'os (tissu hôte) s'effectue par des ponts ostéogéniques. La définition donnée par L.L. Hench en 1972 [3] définit un biomatériau bioactif comme un état intermédiaire entre les matériaux bioinertes et les matériaux résorbables.

- **Biomatériaux résorbables** : ces matériaux ont pour objectif de permettre la régénération des tissus osseux. Ils assurent une fonction mécanique en comblant le défaut osseux et permettent la croissance de la matrice osseuse pour des tailles de défauts supérieures à une taille critique (taille de défaut que l'os ne peut combler). La fixation de l'implant à la matrice est biologique, elle nécessite une porosité du substitut de plusieurs centaines de microns afin de permettre sa vascularisation. La cinétique de résorption de ces matériaux doit être voisine de la cinétique d'ossification. Les phosphates de calcium de type Tri phosphate de calcium β , les ciments, les carbonates de calcium... font partie de cette catégorie [4].

I.2 Différents biomatériaux de comblement osseux

L'os est le meilleur substitut de comblement osseux. Il est le seul à présenter des propriétés d'ostéoinduction, d'ostéointégration, d'ostéogénèse et d'ostéonconduction. Cependant la quantité disponible d'os est très limitée et les matériaux de substitution osseuse présentent une alternative intéressante aux greffes osseuses.

Le matériau peut être **ostéoconducteur** : ces matériaux sont envahis par l'ensemble des cellules générant la croissance de tissus. Cette invasion s'effectue par les pores des matériaux. Ce phénomène est tridimensionnel et conduit à la production d'une matrice osseuse comblant les porosités de l'implant [5].

Le matériau peut être **ostéoinducteur** : ces matériaux sont capables de générer la différenciation et la croissance de cellules osseuses en site extra-osseux [6]. De nombreuses recherches tentent de développer ce type de matériaux en associant des facteurs de croissance tels que les B M P (Bone Morphogenetic Proteins) au biomatériau [6,7].

Le matériau peut être **biorésorbable** : Les biomatériaux placés dans l'organisme sont altérés suite à des activités enzymatique, cellulaire, bactérienne, virale. Leur disparition s'effectue au profit d'un remplacement à terme par les tissus osseux dont ils favorisent la croissance par ostéoconduction ou ostéoinduction. La biorésorption implique une biodégradation du matériau (perte des propriétés physiques du matériau par phagocytose par les macrophages et résorption par les cellules ostéoclastiques) et une biodissolution (perte des propriétés chimiques). Les produits de dégradation du matériau sont évacués par voie rénale ou métabolisée [2, 8]. Ces réactions dépendent des critères physico-chimiques des implants (porosité, état de surface, cristallinité, composition).

Parmi les matériaux de comblement osseux existants, nous citerons : les greffes, les céramiques phosphocalcique, les bioverres et les carbonates de calcium.

L'os étant le meilleur substitut osseux, nous présentons brièvement les différents types de greffes osseuses avant d'introduire les matériaux synthétiques de comblement osseux qui sont liés à notre étude.

I.2.1 Les greffes osseuses

Les autogreffes

Les substituts sont directement prélevés sur le patient, ce qui élimine les problèmes d'antigénicité qui peuvent conduire au rejet. Le substitut osseux présente des propriétés ostéogénétiques (production d'ostéoblastes) semblables à la zone d'implant. Il contient des facteurs de croissance lui conférant un pouvoir ostéoinducteur [9]. L'autogreffe n'entraîne aucune réaction inflammatoire mais implique la réalisation d'un second site opératoire et la quantité d'os disponible reste limitée.

Les allogreffes

Ces greffes sont régies par les lois bioéthiques de 1994 et impliquent le respect du corps humain (consentement et anonymat du donneur). Dans ce type de greffes, le substitut est d'origine

humaine. L'existence d'une réponse immunologique peut retarder voir inhiber la vascularisation du greffon ou sa colonisation par des cellules osseuses. Les greffons sont traités afin d'éliminer tout virus éventuel et de réduire cette réponse immunologique [10].

Les xénogreffes

La plupart des substituts osseux d'origine animale proviennent des bovins. Le greffon subit une série de traitements afin d'éliminer toute trace d'agent infectieux. Depuis l'apparition de cas de plus en plus fréquents de l'E.S.B., l'emploi de ces substituts est modéré.

I.2.2 Les céramiques phosphocalciques

Les céramiques utilisées comme matériau de comblement osseux sont constituées de Phosphate tri-calcique (TCP, Ca/P = 1,5) de formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ de structure α ou β , d'hydroxyapatite (HA, Ca/P = 1,67) de formule $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ou d'association entre HA et β TCP [11]. Ces phosphates de calcium nous intéressent ici car ils ont été utilisés lors des synthèses des composites à matrice géopolymères afin de bénéficier des propriétés décrites ci-après.

L'hydroxyapatite peut être d'origine biologique, issues de structures phospho-calciques existantes dans l'organisme : l'os ou de corail traité [2]. Le traitement thermique appliqué à ces tissus permet de consolider la trame phospho-calcique tout en détruisant les éléments organiques [2, 12, 13].

Qu'elles soient d'origine biologique ou synthétique, les céramiques poreuses à base de phosphate de calcium présentent une microporosité ($< 5 \mu\text{m}$) et une macroporosité ($>100 \mu\text{m}$) permettant l'invasion du matériau par les fluides et cellules biologiques. Ces céramiques sont biocompatibles, bioactives et ostéoconductrices.

Après implantation, ces substituts font l'objet de dégradations d'origine cellulaire et de dissolution extracellulaire. Ce comportement biologique est influencé par de nombreux critères physico-chimiques (le type et le pourcentage de porosité, la cristallinité et la composition élémentaire par exemple). A l'interface, il y a dissolution des macrocristaux de phosphate de calcium au contact des fluides biologiques. Dans un second temps il y a nucléation de cristaux d'hydroxyapatite et croissance hétéroépitaxiale. La substitution du matériaux est liée au remodelage osseux, l'interface entre l'implant et la matrice est ostéocoalescente. La vitesse de résorption des substituts doit être similaire à la vitesse de colonisation des pores du matériau par les cellules macrophages et mésenchymateuses afin de permettre l'apposition osseuse [14, 15].

L'HA est peu soluble, son taux de dégradation *in vivo* est bas et varie en fonction du pH du milieu.

Le β TCP présente une cinétique de dissolution plus rapide et une dégradation *in vivo* plus importante que l'hydroxyapatite.

Les céramiques biphasiques présentent des vitesses de résorption comprises entre celle du β

TCP et celle de l'HA, fonction du pourcentage respectif des deux phosphates de calcium [16].

Le pourcentage de porosité de ces matériaux favorise leur pouvoir ostéoconducteur au détriment de leurs propriétés mécaniques, limitant leurs intérêt aux zones à faibles charges mécaniques. Ceci constitue leur principal inconvénient [17].

I.2.3 Les bioverres

Les études sur les bioverres nous ont influencés dans le choix de la famille des géopolymères comme nouveaux matériaux de comblement. Bien que les modes de synthèses des bioverres et des géopolymères soient différentes, ces deux catégories de matériaux présentent des structures amorphes : succession de tétraèdres de silicium et d'autres oxydes. C'est pour cette raison que les propriétés des bioverres sont présentées ci-dessous.

Les substituts de comblement vitreux résultent du mélange et de la fusion des oxydes suivants : SiO_2 , Na_2O , CaO et P_2O_5 . Les proportions relatives des différents éléments et l'ajout d'autres éléments (F, Sr, Mg) déterminent la bioactivité du verre obtenu. Ces matériaux peuvent se regrouper en deux catégories [18] :

- La classe A : regroupe les verres et vitrocéramiques capables d'établir des liaisons avec à la fois la matrice osseuse et les tissus moux.
- La classe B : regroupe les matériaux vitreux ostéoconducteurs, cette propriété est observée lorsque l'interface entre l'implant et l'organisme permet la migration de la matrice osseuse.

Une fois l'implant placé dans son site, le milieu s'acidifie, cette diminution de pH est due à des facteurs biologiques (activité cellulaire et enzymatique) l'hydroxyapatite se dissout dans le milieu et précipite en surface du substitut sous forme d'une hydroxyapatite carbonatée.

Cette étape favorise l'apparition de liaisons entre la matrice osseuse et l'implant [19]. Cependant leurs propriétés mécaniques et leur faible résorption limitent leur champ d'applications potentielles.

Dans ce travail, nous nous sommes inspirés des expériences *in vitro* réalisées sur les bioverres pour étudier la bioactivité des composites à matrice géopolymère.

I.2.4 Le carbonate de calcium naturel (corail) et synthétique

Le corail est un substitut osseux d'origine biologique provenant d'exosquelettes de polypes (invertébrés marins). Les recherches menées sur ce matériau [20-22] ont mis en évidence que les coraux résultent de la formation de cristaux de CaCO_3 de structure aragonite. Ces coraux présentent des structures poreuses régulières et des propriétés mécaniques proches de l'os spongieux (coraux de Porites, de Goniopora et d'Acropora) ou une paroi externe compacte rappelant l'architecture et les propriétés mécaniques de l'os compact (coraux de Favites, de Lobophylia) [2].

Des études de biodégradation chez l'animal ont montré une vascularisation rapide du substitut suivie d'une phase de résorption de ce dernier au profit du tissu osseux [23, 24].

La cinétique de résorption du corail dépend du site d'implantation et du type de corail utilisé [25]. Des études physico-chimiques ont permis de mettre en évidence les modifications structurales de l'implant : 5 mois après implantation la structure cristalline de l'implant est analogue à celle d'une apatite et la composition minérale de l'implant est alors semblable à celle de la matrice osseuse [26].

Le carbonate de calcium synthétique présente la même structure cristallographique que le corail naturel, il est synthétisé au sein de l'équipe cristallographie et biomatériaux du laboratoire LCSIM de l'Université de Rennes1.

Ce composé est obtenu par double précipitation de sels de chlorure de calcium (CaCl_2) et d'hydrogencarbonate de potassium (KHCO_3). Après filtration et séchage, le matériau obtenu présente une granulométrie d'environ 20 μm . La réalisation de matériaux de comblement est obtenue par compactage isostatique. Ces matériaux présentent des pourcentages de porosité variables, fonction du pourcentage de porogène introduit avant compactage [26]. Ce matériau de comblement peut être utilisé comme vecteur d'antibiotiques.

Un financement pour l'aide au développement et à l'industrialisation attribué par l'ANVAR a permis de réaliser des études préliminaires à une commercialisation comme substitut osseux [27]. C'est dans le cadre de ce projet que nous avons étudié les cinétiques de minéralisations de carbonates de calcium. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre 4.

II La physiologie osseuse

II.1 Structure et fonction des tissus osseux

Les os des individus adultes sont lamellaires, ils contiennent une majorité de tissus osseux mais également des tissus adipeux, hématopoiétiques, des vaisseaux, des nerfs, du tissu

cartilagineux et du tissu conjonctif. Il est possible de distinguer 3 variétés anatomiques d'os : les os long (tibia, fémur...), les os courts (os du carpe) et les os plats (sternum...).

Quelle que soit leur nature, les os sont entourés par le périoste (couche externe de tissu conjonctif fibreux et couche interne de cellules ostéoprogénitrices). Les os longs sont également formés de l'endoste (tissu conjonctif contenant les cellules ostéoprogénitrices et les cellules bordantes) qui tapisse la cavité centrale.

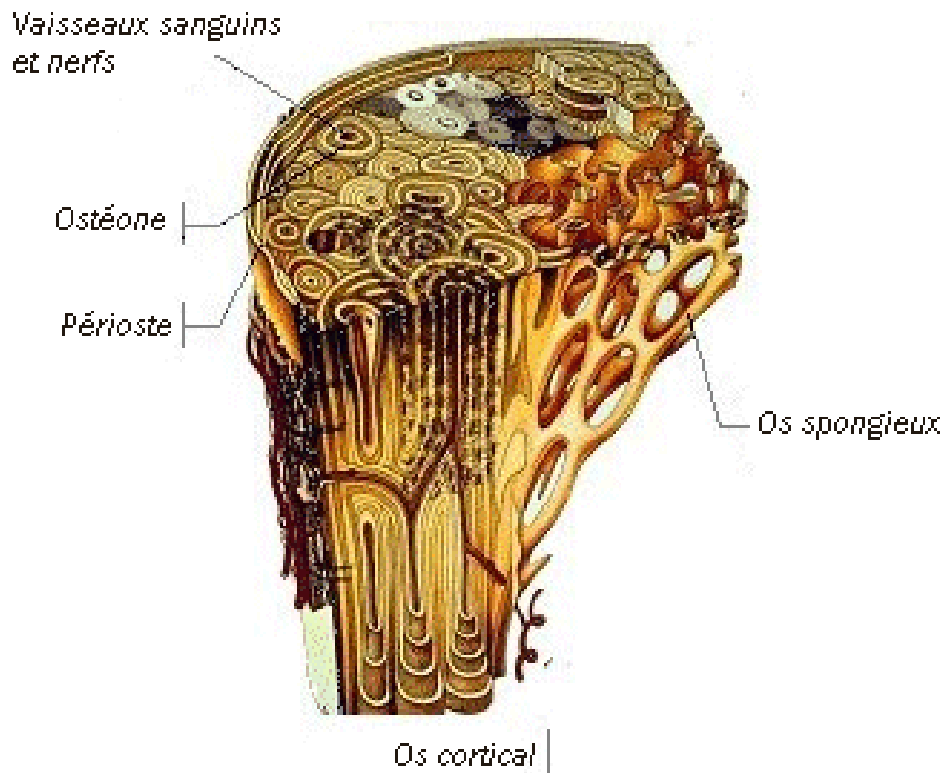


Figure 1.1 Schéma d'un os [28]

Les os peuvent se définir en 2 zones (figure 1.1) :

- **L'os cortical** est mécaniquement dur. Il entoure le canal de Havers (contenant les vaisseaux sanguins et des filets nerveux amyéliniques). Les ostéones constituent le motif formateur : des lamelles osseuses cylindriques entre lesquelles s'intercalent les ostéoblastes contenant les ostéocytes.
- **L'os spongieux** siège essentiellement dans les os courts et plats et dans les épiphyses des os longs. Il est constitué de trabécules et de spicules de tissus osseux formant un labyrinthe intercommunicant comblé par la moelle osseuse et les vaisseaux. Cet os est beaucoup plus poreux que l'os cortical, ce qui lui confère des propriétés mécaniques moindres.

Le squelette a trois fonctions :

- **Une fonction mécanique** : il joue le rôle d'armature et de protection des organes.
- **Une fonction métabolique** : les tissus osseux sont en constant renouvellement, cette propriété dynamique est engendrée par le remodelage continu des tissus sous la pression mécanique. Ce remodelage osseux provoque le stockage ou la libération de sels minéraux. Cette fonction permet aux tissus osseux d'assurer le contrôle du métabolisme phosphocalcique (conjointement avec les reins et l'intestin).
- **Une fonction hématopoïétique** : l'espace médullaire des os renferme la moelle hématopoïétique (précurseur des cellules sanguines). Ce sont les cellules de cette moelle qui sont à l'origine de 3 lignées de globules du sang. Ces cellules souches sont susceptibles de se différencier dans de multiples lignages différents (fibroblastes, chondrocytes (cellule cartilagineuse), adipocytes, ostéoblastes...).

II.2 Histologie de la matrice osseuse

II.2.1 Les cellules de la matrice osseuse

La matrice osseuse est constituée de 2 catégories de cellules différentes :

Les cellules en surface des tissus osseux

- **Les ostéoblastes** : ce sont des cellules ostéoformatrices qui permettent la croissance de la matrice osseuse.
- **Les ostéoclastes** : ce sont de grosses cellules ostéorésorbantes plurinucléées (20 à 100 μm) très mobiles.
- **Les cellules bordantes** : ce sont des cellules ostéoblastiques au repos qui tapissent la surface osseuse quand celle-ci n'est soumise ni à une résorption, ni à une croissance. Ces cellules sont capables de redevenir des cellules ostéoblastiques actives si elles sont sollicitées.

Les cellules à l'intérieur des tissus

- **Les ostéocytes** : ces cellules sont incapables de se diviser (contrairement aux ostéoblastes), elles sont petites et filiformes. Ces cellules qui ont des potentialités de synthèse et de résorption limitées participent au maintien de la matrice osseuse et à l'homéostasie de la calcémie.

II.2.2 La matrice extra-cellulaire (MEC)

La matrice extra-cellulaire des tissus osseux est totalement calcifiée, cette propriété lui confère une opacité aux rayons X et de bonnes propriétés mécaniques. Cette matrice extra-cellulaire comprend une partie minérale et une partie organique.

La partie organique de la MEC contient du collagène de type 1, et de nombreuses protéines comme l'ostéopontine (qui permet l'adhésion de l'hydroxyapatite aux cellules), l'ostéonectine et de l'ostéocalcine (protéine non collagénique, marqueur biologique du remodelage osseux permettant la minéralisation des tissus). La MEC contient également des facteurs de croissance qui vont permettre le remodelage osseux par l'activation des cellules ostéoblastiques.

La partie minérale de la MEC est constituée de différents minéraux dont les proportions varient en fonction de l'âge de l'individu. Avec la croissance des tissus, le rapport phosphocalcique augmente.

L'os jeune est constitué par du phosphate de calcium amorphe et de la brushite $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sur lesquelles les cristaux d'hydroxyapatite ont une croissance épitaxiale [29]. La présence de phosphate octocalcique $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ serait précurseur d'hydroxyapatite. Les multiples hypothèses sur la phase minérale de la matrice osseuse sont liées à la mauvaise cristallinité de cette phase minérale. Des études de caractérisation se sont intéressées à l'affinement de cette structure [30, 31].

II.3 Le mécanisme de remodelage osseux

Les os compacts ou spongieux sont le siège de renouvellement constant, lié à la croissance et à la résorption des tissus osseux. Chez l'adulte, la phase de remodelage dure 4 mois, la phase de croissance étant plus longue que celle de résorption.

Les unités de remodelage (Bone Modeling Units) ont un diamètre d'environ 100 μm . Ces BMU ne sont pas activées simultanément et sont indépendantes les unes des autres.

Ce mécanisme de remodelage (annexe 1) se déroule suivant 5 étapes :

- Une phase de quiescence
- Une phase d'activation
- une phase de résorption du tissu osseux (1 à 2 semaines)
- une phase d'inversion
- une phase de production du tissu osseux (3 mois)

Le capital osseux augmente jusqu'à 20 ans (phase de croissance > phase de résorption), ce capital reste stable durant plusieurs années puis les phénomènes de résorption prennent le pas sur ceux de croissance. La diminution du capital osseux augmente avec l'âge, notamment chez la femme lors de la ménopause (avec le déficit en oestrogènes).

Le remodelage osseux entre également en jeu après une fracture (ou autre défaut). L'apparition d'un défaut est suivi de la prolifération de vaisseaux qui permettent le développement de tissus conjonctifs puis cartilagineux qui forment un cal. Ce cal sera remplacé par un tissu ostéoïde qui pourra subir le remodelage osseux décrit précédemment.

La matrice osseuse peut ainsi combler des défauts sans l'apposition de biomatériaux lorsqu'ils sont de taille inférieure à une taille critique [32, 33]. L'usage des biomatériaux de comblement devient nécessaire pour des défauts osseux plus importants.

III Intérêts de certains éléments chimiques constitutifs de la partie minérale de la matrice osseuse ou des geopolymères.

III.1 Calcium, phosphore, magnésium, strontium et zinc : éléments constitutifs de la trame osseuse minérale

La matrice osseuse est constituée essentiellement de cristaux d'hydroxyapatite pour sa partie minérale. Cependant, de nombreux éléments tels que le strontium ou le zinc y sont présents à l'état de traces.

Les éléments constitutifs de la matrice osseuse (Ca, P, Sr, Mg et Zn entre autre) jouent chacun

un rôle particulier dans l'organisme et présentent un grand intérêt dans les mécanismes de calcification et de minéralisation.

Le calcium

Le calcium joue un rôle polyvalent dans l'organisme. Il permet le fonctionnement de nombreux mécanismes extra-cellulaires comme la contraction musculaire, la conduction nerveuse, la sécrétion d'hormones et la coagulation sanguine. Il joue également un rôle intra cellulaire important dans la régulation enzymatique. 99% du calcium contenu dans l'organisme se trouve dans la matrice osseuse sous forme de cristaux d'hydroxyapatite. La quantité restante de calcium (1%) permet la régulation des mécanismes présentés ci-dessus.

Les teneurs en calcium dans la matrice osseuse sont voisines de 250 mg/g [34].

Le phosphore

Tout comme le calcium, le phosphore est un élément essentiel de l'organisme où il se présente sous la forme d'ions phosphates PO_4^{3-} . 85% des ions phosphates se trouvent dans la matrice osseuse, principalement sous la forme de cristaux d'hydroxyapatite. Les 15% restant se trouvent principalement dans le milieu intra-cellulaire sous forme de composés organiques comprenant les acides nucléiques et les membranes phospholipidiques.

Les teneurs en phosphore dans la matrice osseuse sont voisines de 130 mg/g [34].

Le magnésium

Une grande partie du magnésium est stockée dans la matrice osseuse de l'organisme. Cet élément joue un rôle important lors de la phase de croissance de l'organisme (de la naissance à l'âge adulte). Il est présent dans la matrice osseuse dans les cristaux d'hydroxyapatite $\text{Ca}_{3-x}\text{Mg}_x(\text{PO}_4)_2$ [31]. Le magnésium est fourni par l'alimentation et l'équilibre de concentration entre les différents tissus est assuré par les reins et le système intestinal. De nombreuses enzymes sont dépendantes du magnésium (constitution ou activation). Le magnésium est utilisé en présence d'ATP et permet la stabilisation de l'ADN et de l'ARN. Son métabolisme est intimement lié à ceux du calcium et du potassium mais les mécanismes sont à ce jour incompris.

Les teneurs en magnésium dans la matrice osseuse sont voisines de 5 mg/g [34].

Le strontium

Le rôle du strontium dans le métabolisme osseux est intimement lié à celui du calcium. Comme les autres éléments présentés ici, le strontium peut être stocké dans les os, les tissus mous et

le sang. Le strontium joue un rôle important au niveau de la matrice osseuse. Des concentrations trop élevées en strontium (8,75 mmol/ kg/ jour chez le rat [35]) dans l'organisme peuvent conduire à des défauts de minéralisation osseuse et réduire l'activité de protéines (25-hydroxyvitamin D3-hydroxylase) [36]. Cependant, pour des doses plus faibles, la présence de strontium a mis en évidence chez les rongeurs et les singes une diminution de la résorption de la matrice par un ralentissement du turn-over (remodelage osseux) [37].

Au sein de la matrice osseuse, le strontium se substitue au calcium de manière aléatoire, les cristaux d'hydroxyapatite enrichie en strontium sont des espèces plus stables ce qui défavorise leur résorption [38]. Au niveau de l'émail dentaire, la substitution du calcium par du strontium améliore la résistance aux attaques chimiques [39] (cet effet est encore plus nette lorsque le calcium est substitué par du strontium et du fluor).

Les teneurs en strontium dans la matrice osseuse sont voisines de 140 µg/g [34].

Le zinc

Le zinc est l'un des éléments traces les plus importants de l'organisme. Il est présent dans de nombreux organes et essentiellement au niveau des muscles et du squelette (85%). L'élément zinc est utile à de nombreuses macromolécules et participe à plus de 300 réactions enzymatiques [40].

Au niveau du comblement osseux le zinc augmente la prolifération des ostéoblastes et la repousse osseuse et accélère la cicatrisation [41]. Cet élément a également été associé à l'augmentation *in vitro* de l'activité de la phosphatase alcaline et à la diminution de la résorption ostéoclastique [42].

Le zinc est un élément intéressant dans le domaine du comblement osseux. Associé à des biomatériaux de comblement osseux comme le TCP il joue un rôle favorable à la substitution osseuse [41].

Les teneurs en zinc dans la matrice osseuse sont voisines de 117 µg/g [34].

III.2 L'aluminium, le silicium et le potassium : composants du géopolymère.

Les éléments aluminium et silicium n'ont pas de fonction biologique au sein de l'organisme. Pour cette raison ils sont considérés comme des éléments non essentiels [43]. Ces éléments constituent la matrice du matériau géopolymère que nous allons décrire dans ce travail, pour cette raison nous nous intéressons ici à l'influence qu'ils peuvent avoir sur l'organisme. Nous nous intéressons également au potassium, présent dans l'organisme et constitutif des géopolymères.

L'aluminium

D'un point de vue physico-chimique, l'aluminium permet de renforcer les structures des verres et des matériaux amorphes.

Depuis le début des années soixante, des biologistes se sont intéressés à la toxicité de l'aluminium que l'on trouvait en quantité importante chez des patients dialysés. Il est difficile de chiffrer les quantités d'aluminium tolérées par l'organisme car cet élément est stocké dans différents tissus ce qui rend sa quantification difficile. Chez un individu adulte sain, l'aluminium contenue par l'organisme est réparti entre les poumons, les muscles, le foie et le squelette. L'aluminium présent dans la matrice osseuse se localise dans les frontières ostéoïdes [44] rendant difficile la minéralisation de la matrice osseuse.

La toxicité de l'aluminium est prouvée, que se soit pour les plantes, les animaux ou les hommes mais la preuve du lien entre l'aluminium et la maladie d'Alzheimer n'est pas certaine à ce jour (voir annexe 2).

Cependant, l'aluminium est constitutif de certains biomatériaux (prothèses de hanche en alliage d'aluminium, substituts osseux à base d'aluminium) car cet élément présente certains intérêts physico-chimiques tels qu'une faible corrosion des alliages à base d'aluminium ; les céramiques ou vitro-céramiques contenant de l'aluminium présentent de bonnes propriétés mécaniques.

Le critère important est alors la quantité et la structure de l'aluminium relargué dans l'organisme lors de la dégradation (par usure, par dissolution ou par processus cellulaires) du biomatériau puisque c'est cet aluminium qui s'avère toxique lorsqu'il est stocké dans divers tissus.

Dans le domaine des matériaux de comblement osseux, l'aluminium peut inhiber la bioactivité du matériau et le rendre inerte. Ici encore la structure de l'aluminium est primordiale : des ciments contenant de l'aluminium présentent une interface os/ implant [45,46].

Le silicium

Les mécanismes mettant en jeu le silicium sont mal compris et aucune molécule organique contenant du silicium n'a pu être mise en évidence [47]. Les fluides biologiques d'individus sains peuvent présenter des concentrations en silicium de 100 µg/L [48].

Bien que les mécanismes d'actions du silicium dans l'organisme soient encore mal compris, cet élément joue un rôle bénéfique à de nombreux niveaux. De nombreuses études sont menées conjointement sur le silicium et l'aluminium. Le silicium contrôlerait l'activité biologique de l'aluminium dans l'organisme et diminuerait sa toxicité [47].

Au sein de l'organisme, silicium et aluminium seraient liés (annexe 2) et bien que l'aluminium

soit toxique, la coexistence du silicium permet d'espérer une minimisation des effets toxiques de matériaux de type aluminosilicate de la famille des géopolymères où le rapport Si/ Al =21.

Le potassium

Le potassium est constitutif des géopolymère, il est également présent dans l'organisme, essentiellement dans le milieu intra-cellulaire (98%). La teneur en potassium au sein de la matrice osseuse est d'environ 1ppm [34]. Il est cependant difficile de donner des concentrations en potassium dans l'organisme car elle seront fonction de la masse corporelle de l'individu. Un des rôles du potassium est de permettre la régulation des échanges intra et extra cellulaires. La migration du potassium du plasma vers le milieu intra cellulaire est fonction du taux d'insuline présent dans le milieu extra cellulaire. Comme pour les autres éléments présent dans l'organisme, des carences en potassium ou des excès en potassium peuvent conduire à des problèmes musculaires et cardiaques. Les matériaux à matrice géopolymère présentent des teneurs non négligeable en potassium et un relargage important de cet élément pourrait alors s'avérer toxique.

Références

- [1] CAO W. and HENCH L.L., **Bioactive Materials**, Ceramics International (22), 1996, 493
- [2] MAINARD D., GOUIN F., CHAUVEAUX D. et LOTY B., **Les substituts osseux en 2001**, Ed. Romillat, 2001
- [3] HENCH L.L., SPLINTER R.J., ALLEN W.C. and GREENLEE T.K. Jr., **Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials**, J. Biomed. Mater. Res. (2), 1972, 117
- [4] HENCH L.L., **Bioactive ceramics**, in **Bioceramics : materials characteristics versus in vivo behaviour**, Ed. P. Ducheyne & J. Lemons Annals of NY Academy of science, 1988, 54
- [5] CHARLES N. et CORNELL M.D., **Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts**, Orthopedic Clinic North America (4), 1999, 591
- [6] EID K., ZELICOF S., PERONA B.P., SLEDGE C.B. and GLOWACKI J., **Tissue reaction to particles of bone-substitute materials in intraosseous and heterotopic sites in rats : discrimination of osteoinduction, osteocompatibility, and inflammation**, J. of Orthopaedic Research (19), 2001, 962

- [7] PETITE H., **La bio-ingénierie de la régénération osseuse**, MEDECINE/ Science (18), 2002, 995
- [8] LOTY C., LOTY S. et SAUTIER J.M., **Interfaces os/biomatériaux bioactifs implantables**, Implant (4), 1998, 101
- [9] GOLDBERG V.M., STEVENSON S., **The biology of Bone Grafts**, Seminars in Arthroplasty (4), 1993, 58
- [10] FEIGHAN J.E., DAVY D., PREWETT A.B. and STEVESON S., **Induction of bone by demineralized bone matrix gel : a study in a rate femoral defect model**, J. of Orthopaedic Research (13), 1995, 88
- [11] CLEMENT D., **Synthèse et caractérisation de biomatériaux à base de phosphates de calcium**, thèse de doctorat, INP Toulouse, 1990
- [12] BAUER H.J., BAUER M. et DINGELDEIN E., **Composition et structure d'une céramique d'hydroxyapatite d'origine biologique**, Osteosynthèse Inter. (2), 1994, 106
- [13] SCHNETTLER R., DINGELDEIN E., WAHLIG H. and TAUSCH W., **Potential of demineralized bone matrix alone and in combination with porous hydroxyapatite on bone repair in cancellous bone in mini pigs**, Abs. IV World Biomaterials Congress, 1992, 100
- [14] EGLI P.S., MULLER W. and SCHENCK R.K., **The role of pore size on bone ingrowth and implant substitution in hydroxyapatite and tricalciumphosphate ceramics**, **Advances in Biomaterials : Biomaterials and clinical applications**, Ed. Pizzoferrato and al., Elsevier Publisher, 1987, 53
- [15] MAINARD D., GALOIS L., BORDJI K., MEMBRE H., MARCHAL L., FOLIGUET B., CLEMENT D. et DELAGOUTTE J.P., **Influence de la taille des pores sur la réhabilitation osseuse de 2 céramiques phospho-calciques : l'hydroxyapatite et le phosphate tri-calcique β** , **Actualité en Biomatériaux Volume III**, Ed. Romillat, 1996, 361
- [16] YAMADA S., HEYMAN D., BOULER J.M. and DACULSI G., **Osteoblastic resorption of calcium phosphate ceramics with various hydroxyapatite/ β -TCP ratio**, Biomaterials (18), 1997, 1037

- [17] LE HUEC J.C., SCHAEVERBEKE T., CLEMENT D., FABER J. and LE REBELLER A., **Influence of the porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite under compressive strenght**, *Biomaterials* (16), 1995, 113
- [18] HENCH L.L., **Biomaterials : a forecast for the future**, *Biomaterials* (19), 1998, 1419
- [19] HENCH L.L. and WILSON J., **Biocompatibility of silicates for medical use**, *Ciba Found. Symp.*, 1986, 231
- [20] CHIROFF R.T., WHITE E.W., WEBER J.N. and ROY D.M., **Tissue ingrowth of replamineform implants**, *J. Biomed. Mat.* (6), 1975, 29
- [21] PATAT J.L., **Réhabilitation osseuse de matériaux poreux à surface irrégulière**, Thèse de doctorat en médecine Paris, 1976
- [22] PATEL A., HONNART F., GUILLEMIN G., PATAT J.L., CHETAÏL M. et FOURNIE J., **Colonisation osseuse de matériaux minéraux**, *Rev. Chir. Ortho.* (66), 1980, 64
- [23] GUILLEMIN G., **Les matériaux madrépores en chirurgie orthopédique**, *Cahiers d'enseignement de la SOFCOT* (25), 1986, 91
- [24] GUILLEMIN G. and PATAT J.L., **The sue of coral as bone graft substitute**, *J. of Biomed. Mat. Res.* (21), 1987, 557
- [25] IRIGARAY J.L., OUDADESSE H., BLONDIAUX G. and COLLANGETTES D., **Kinetics of the diffusion of some elements evaluated by neutron activation in a coral implanted in vivo**, *J. of Radioanalytical and nuclear chemistry* (169 : 2), 1993, 339
- [26] LUCAS-GIROT A., LANGLOIS P., SANGLEBOEUF J.C., OUAMMOU A., ROUXEL T. and GAUDE J., **A synthetic aragonite-based bioceramic : influence of process parameters on porosity and compressive strength**, *Biomaterials* (23), 2002, 503
- [27] LUCAS A., MICHEL J.F., GAUDE J. and CAREL C., **Macroporous composite for carrying one or more medicinal substances and for use as a bone reconstruction material, and method for making same**, PATENT WO 97/ 26024, 1997

- [28] GRAY H., **Bone physiology Courtesy Gray's anatomy**, 35th edit longman Edinburgh 1973
- [29] LEGROS R., **Apport de la physico-chimie à l'étude de la phase minérale des tissus calcifiés**, Thèse d'université Toulouse, 1984
- [30] MILLER L.M., VAIRAVAMURTHY V., CHANCE M.R., MENDELSON R., PASCHALIS E.P., BETTS F. and BOSKEY A.L., **In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the ν_4 PO_4^{3-} vibration**, Biochimica et Biophysica Acta (1527), 2001, 11
- [31] RAVAGLIONI A., KRAJEWSKI A., CELOTTI G.C., PIANCASTELLI A., BACCHINI B., MONTANARI L., ZAMA G. and PIOMBI L., **Mineral evolution of bone**, Biomaterials (17), 1996, 617
- [32] SCHMITZ J.P., HOLLIGER J.O., **The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions**, Clin. Orthop. Rel. Res. (205), 1986, 299
- [33] HOLLIGER J.O., KLEINSCHMIDT J.C., **The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials**, J. Craniofac. Surg. (1), 1990, 60
- [34] IYENGAR G.V., KOLLMER W.E. and BOWEN H.J.M., **The elemental composition of human tissues and fluids**, Verlay Chemie Weinheim, 1976
- [35] MOROHASHI T., SANO T., YAMADA S., **Effects of strontium on calcium metabolism in rats; A distinction between the pharmacological and toxic doses**, Jpn J. Pharmacol (64), 1994, 155
- [36] CORRADINO R.A., EBEL J.G., CRAIG P.H., TAYLOR A.N., WASSERMAN R.H., **Calcium absorption and the vitamin D3 dependent calcium binding protein. Inhibition by dietary strontium**, Calcif. Tissue Res. (7), 1971, 81
- [37] MOROHASHI T., SANO T., HARAI K., YAMADA S., **Effects on strontium on calcium metabolism in rats. II. Strontium prevent the increased rate of bone turnover in ovariectomized rats**, jpn J. Pharmacol. (68), 1995, 153
- [38] BOIVIN G., DELOFFRE P., PERRAT B., PANCZER G., BOUDEULLE M., TSOUDEROS Y., MEUNIER P.J., **Strontium distribution and interactions with the bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S12911) administration**, J. Bone Miner. Res. (11), 1996, 1302

- [39] CURZON M.E.J, **Effects of a combination of strontium and fluoride on dental caries in the rat**, Nutrition Res. (8), 1988, 321
- [40] IOT A., KAWAMURA H., OTSUKA M., IKEUCHI M., OHGUSHI H., ISHIKAWA K., ONUMA K., KANZAKI N., SOGO Y., ICHINOSE N., **Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation**, Mat. Sci. And Ing. C (22), 2002, 21
- [41] YAMAGISHI M., OISHI H., SUKETA Y., **Zinc Stimulation of bone protein synthesis in tissue culture**, Biochem. Pharmacol. (37), 1988, 4075
- [42] MOONGA B.S., DEMPSTER D.W., **Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro**, J. Bone Miner. Res. (10), 1995, 453
- [43] COTZIAS G.C., **Importance of traces substances in environmental health as exemplified by manganese, in trace substance in environmental health I**, Hemphill D.D. Ed., University of Missouri, Columbia, 1967
- [44] FAUGERE M.C., MALLUCHE H.H., **Stainable aluminium and not aluminium content reflect to bone histology in dyalised patients**, Kidney Int. (30), 1986, 717
- [45] SHINZATO S., KOBAYASHI M., CHOJU K., KOKUBO T., NAKAMURA T., **Bone-bonding behavior of alumina bead composite**, J. Biomed. Mater. Res. (46), 1999, 287
- [46] KOBAYASHI M., KIKUTANI T., KOKUBO T. and NAKAMURA T, **Direct bone formation on alumina bead composite**, J. Biomed. Mat. Res. (37), 1997, 554
- [47] EXLEY C., **Silicon in life : a bioinorganic solution to bioorganic essentiality**, J. Inorg. Biocem. (69), 1998, 139
- [48] VAN LANDEGHEM G.F., DE BROE M.E., D'HAESE P.C., **Al and Si : their speciation distribution and toxicity**, Clin. Biochem. (31), 1998, 385

Chapitre 2

Synthèse et caractérisation physico-chimique de géopolymères et de composites géopolymères/ phosphates de calcium.

Etude avant et après traitement thermique

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation physico-chimique de géopolymères et composites géopolymères/ phosphates de calcium avant et après traitement thermique.

I Synthèse de géopolymères et composites géopolymères/ phosphates de calcium 29

- I.1 Introduction sur les géopolymères 29
- I.2 Synthèse des géopolymères (GPS) et des composites 31
 - I.2.1 Synthèse des géopolymères 31
 - I.2.2 Synthèse des composites géopolymères/ phosphates de calcium 33

II Caractérisation physico-chimique et morphologique des géopolymères purs et des composites géopolymères/ phosphates de calcium 37

- II.1 Morphologie des géopolymères purs et des composites 37
 - II.1.1 Méthode d'analyse : la microscopie électronique à balayage (MEB) 37
 - II.1.2 Résultats..... 37
- II.2 Etude du pH des géopolymères purs et des composites géopolymères/ phosphates de calcium. 38
- II.3 Caractérisation par DRX 39
 - II.3.1 Diffraction des rayons X : principe et protocole expérimental 39
 - II.3.2 DRX des géopolymères purs 40
 - II.3.3 DRX des composites géopolymère/ phosphate de calcium 41
- II.4 Caractérisation par Transformée de Fourier Infra Rouge 43
 - II.4.1 Principe de la méthode et protocole expérimental..... 43
 - II.4.2 Etude FTIR des géopolymères purs G54, G67 et G80 43
 - II.4.3 Etude FTIR des composites géopolymères/ phosphates de calcium 44
- II.5 Etude par RMN du solide des géopolymères purs et des composites 47
 - II.5.1 Protocole expérimental 47

II.5.2	Caractérisation des géopolymères purs par RMN MAS	48
II.5.3	Composites GPS avec HA/TCP	52
II.5.4	Géopolymères purs et composites : résumé des principaux résultats expérimentaux	56
II.6	Discussion.....	56
III	Caractérisation physico-chimique des géopolymères et composites géopolymères/ phosphates de calcium après traitement thermique.	58
III.1	Détermination des conditions de traitement thermique.....	58
III.1.1	Choix des températures des traitements thermiques	58
III.1.2	pH des géopolymères purs et des composites après les traitements thermiques à 250°C (TTH 250) et à 500°C (TTH 500)	60
III.2	Structure des géopolymères purs et des composites géopolymères/ phosphates de calcium après traitement thermique.	62
III.2.1	Caractérisation par DRX sur poudre des géopolymères et des composites	62
III.2.2	Caractérisation de la structure des géopolymères et des composites en fonction du traitement thermique : étude par FTIR	65
III.2.3	Evolution de la structure en fonction du traitement thermique, étude par RMN MAS	69
IV	Conclusion	83
	Références	84

I Synthèse de géopolymères et composites géopolymères/ phosphates de calcium

I.1 Introduction sur les géopolymères

Les géopolymères [1] font partie de la famille des aluminosilicates. Ces matériaux résultent de la synthèse d'un silicate alcalin et d'oxydes pulvérulents d'aluminium et de silicium à une température inférieure à 100°C [2]. Les géopolymères peuvent être assimilés à des polymères minéraux qui présentent une bonne stabilité à la température, aux attaques acides et de bonnes propriétés mécaniques [3].

Les géopolymères sont de formule générale :



z : rapport molaire Si/Al

M⁺ : un cation monovalent

n : le degré de polymérisation

Les géopolymères sont caractérisés par une structure polymérique, succession de tétraèdres SiO₄ et AlO₄ (figure 2.1) [4]. Ce réseau est apparenté à celui de certaines zéolithes mais différent de ces dernières par une structure amorphe [5].

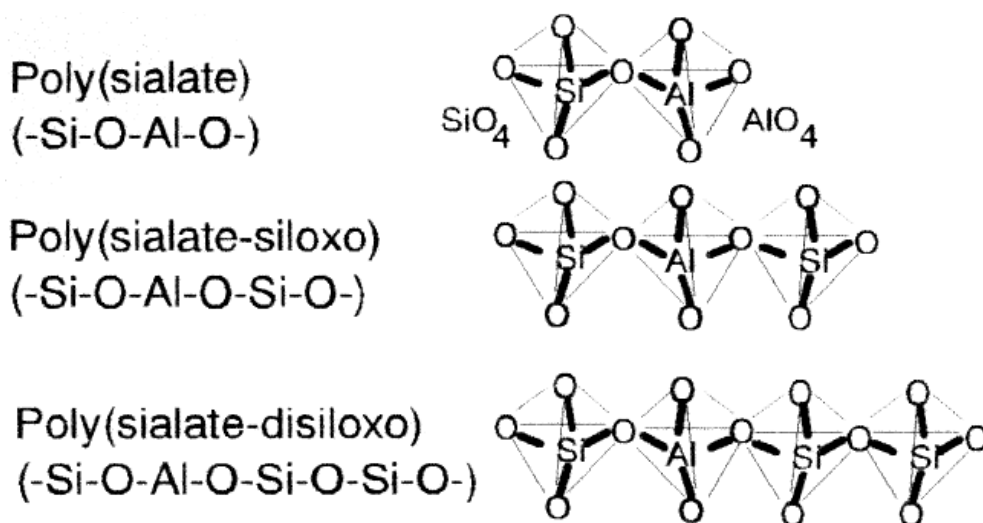


Figure 2.1 Le nom du géopolymère est fonction du rapport Si/ Al

La position de l'aluminium comme ion formateur du réseau provoque un déficit de charge qui est compensé par les ions M^+ (Na^+ ou K^+) dont la présence est essentielle au maintien de la neutralité de la matrice.

Les géopolymères se différencient par le rapport molaire Si/ Al. Ce rapport est à l'origine de leur nomenclature. La figure 2.1 présente quelques exemples de composés de la famille des géopolymères :

Si/ Al = 1 nommé le PolySialate (PS)

Si/ Al = 2 nommé le PolySialate Siloxo (PSS) [6]

Si/ Al = 3 nommé le PolySialate DiSiloxo (PSDS)

Dans ce travail nous nous sommes intéressés au GPS (géopolymère avec une haute teneur en silicate) nommé GPS et caractérisé par sa faible quantité d'aluminium : Si/ Al = 21.

La valeur du rapport Si/ Al influence la structure des géopolymères et leurs propriétés physico-chimiques. Ces matériaux sont actuellement étudiés et utilisés dans différents domaines. [7]

Les PS et PSS (Si/ Al = 1 et 2) sont à réseau tridimensionnel et sont utilisés pour le stockage de déchets, la production de ciments peu polluants, la réalisation de céramiques par exemple.

Le caractère polymérique de ces matériaux augmente avec le rapport Si/ Al (PSDS et GPS), les aluminiums réticulent les chaînes de SiO_4 . Ces géopolymères sont principalement utilisés comme revêtements.

Au sein du laboratoire, les premières recherches sur ces matériaux [6,8] se sont intéressées à l'utilisation du PSS associé avec divers phosphates et oxydes comme biomatériau potentiel. Ces travaux ont mis en évidence une biocompatibilité des composites à matrice PSS (Si/ Al = 2) comparable à un TCP [9].

D'un point de vue biologique, l'élément aluminium peut être toxique pour l'organisme, nous avons donc choisi de nous intéresser à un géopolymère, le GPS (GéoPolymère avec une forte teneur en silice) et une faible teneur en aluminium : Si/ Al = 21.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à plusieurs associations entre le GPS et des phosphates de calcium afin de poursuivre les travaux visant à déterminer la possibilité d'utiliser un géopolymère comme précurseur à un biomatériau [10].

I.2 Synthèse des géopolymères (GPS) et des composites

I.2.1 Synthèse des géopolymères

a - Mécanisme de synthèse

Il s'agit d'une polycondensation d'un silicate de potassium dépolymérisé avec des oxydes d'aluminium et de silicium.

La synthèse de la matrice géopolymère se déroule en 3 étapes :

- Dépolymérisation d'une solution de silicate de potassium (K_2O , $3SiO_2$, $21H_2O$) par ajout de KOH suivant le rapport $0,54 < K_2O / SiO_2 < 0,8$.
- Addition d'oxydes de silicium et d'aluminium suivant le rapport $Si / Al = 21$.
- Stockage à $-15^\circ C$ du géopolymère afin de permettre la polymérisation et d'éviter la polycondensation (durcissement).

b - Protocole de synthèse

Trois solutions dépolymérisées de silicate de potassium ont été synthétisées, avec pour différence la valeur du rapport K_2O / SiO_2 . Les quantités des différents réactifs sont récapitulées dans le tableau 2-1.

	solution 0,54	solution 0,67	solution 0,80
K_2O , 3 SiO_2 , 21 H_2O	100g	100g	100g
KOH	9,95g	16,51g	23,06g

Tableau 2-1 Proportion des différents réactifs pour la synthèse des solutions dépolymérisées

Pour obtenir le GPS, 74,1 g de la solution obtenue précédemment sont ajoutés à 100 g de silice thermique (composition analysée par EDX tableau 2-2) et 7,41 ml d'eau distillée.

Analyse EDX

Cette méthode d'analyse localisée permet de définir la composition ponctuelle d'un échantillon. Le matériau à étudier est métallisé s'il n'est pas déjà conducteur, cette métallisation évite l'accumulation de charges lors du bombardement de la surface.

Un faisceau d'électrons incident entre en contact avec la surface de l'échantillon, le diamètre du faisceau correspond à la surface analysée. Sous l'action de collisions électrons - matière, des photons X dont les énergies correspondent aux atomes dont ils sont issus sont analysés.

La précision relative de cette méthode est d'environ 1%. Les pourcentages de chaque élément sont obtenus après une calibration de l'appareil réalisée avec des standards des éléments à étudier (Al_2O_3 , SiO_2 , Phosphore métallique...). Les interférences liées aux éléments Au et Pt de la métallisation ne sont pas gênantes pour nos échantillons. Tous les éléments de numéro atomique supérieur à 4 peuvent être analysés par cette technique. Les études EDX ont été réalisées au CMEBA de l'université de Rennes sur un MEB JSM6400 couplé à un spectromètre de dispersion d'énergie Oxford link isis.

	% C	% O	% Na	% Al	% Si	% P
Dosage 1	7,4	72,9	0,2	1,0	18,5	0
Dosage 2	7,3	72,8	0,3	1,2	17,8	0,6

Tableau 2-2 Pourcentage massique de chaque élément de la poudre de silice thermique.

Les géopolymères visqueux obtenus par le mélange de la poudre de silice thermique et de la solution de silicate dépolymérisée sont coulés dans des cylindres de téflon et recouverts de capuchons en téflon afin d'éviter l'évaporation de l'eau.

Le durcissement des matériaux est obtenu par un traitement de 2h 30 à 60°C. Cette étape permet d'accélérer la polycondensation des échantillons. La température est choisie inférieure à 100°C afin d'éviter un gradient de température trop important entre le cœur et la surface des aluminosilicates. Une fois sortis de l'étuve, les échantillons sont stockés dans des sachets hermétiquement fermés afin d'éviter un départ d'eau.

Trois types de géopolymères ont été synthétisés. Les rapports molaires les caractérisants et leur nomenclature sont indiqués dans le tableau 2-3.

	$\text{K}_2\text{O}/ \text{SiO}_2$	$\text{SiO}_2/ \text{Al}_2\text{O}_3$	Nomenclature
GPS 0.54	0,54	15,5	G54
GPS 0.67	0,67	15,5	G67
GPS 0.80	0,80	15,5	G80

Tableau 2-3 Rapport molaires permettant la synthèse des GPS et nomenclature de ces matériaux

I.2.2 Synthèse des composites géopolymères/ phosphates de calcium

a - Objectif des ajouts de phosphates de calcium

L'ajout de charges (phosphates ou oxydes) à la matrice géopolymère a pour objectif de renforcer les propriétés mécaniques du matériau. Nous avons choisi d'utiliser des phosphates de calcium car dans le cadre d'une application potentielle de ces matériaux comme biomatériaux, ces phosphates présentent également un avantage biologique puisqu'ils font partie de la famille des céramiques ostéoconductrices et biocompatibles [11, 12].

Les céramiques de phosphates de calcium présentent des pourcentages de porosité qui augmentent l'ostéoconductivité mais diminuent leurs propriétés mécaniques [13, 14].

Les applications actuelles des géopolymères sont basées sur les bonnes propriétés mécaniques de ces matériaux quand ils sont utilisés à l'état massif.

Comme tous les matériaux poreux, les propriétés des géopolymères purs sont fonction du pourcentage de porosité. L'ajout d'une charge à la matrice géopolymère améliore le comportement mécanique sans nuire à la porosité. Cette étude sera présentée au chapitre 3.

Ce travail a pour objectif de synthétiser des matériaux composites géopolymères/ phosphates de calcium susceptibles d'associer les avantages des phosphates de calcium à ceux des géopolymères.

b - Protocole de synthèse

Les composites se définissent comme l'association des GPS présentés précédemment (tableau 2-3) avec les deux types de phosphates de calcium commerciaux suivants :

- Phosphate tricalcique (TCP $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) recta pur de chez Prolabo
- Hydroxyapatite (HA $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) de chez Sigma

La caractérisation des phosphates de calcium commerciaux utilisés dans ce travail a été effectuée au laboratoire par une mesure de la granulométrie et une étude de leur morphologie réalisée par Microscopie Electronique à Balayage (MEB).

Granulométrie laser

La granulométrie laser permet de définir la taille moyenne des particules élémentaires d'une poudre et de présenter sa distribution statistique.

La poudre à analyser est mélangée à un dispersant et passée aux ultrasons afin de casser les agglomérats. La suspension est alors placée dans la cuve d'analyse du granulomètre qui contient déjà de l'eau. La suspension contenant les particules à analyser est pompée vers une chambre d'analyse où un faisceau laser est dirigé vers les particules. Les particules diffusent le faisceau incident, et des lentilles de Fourier permettent la focalisation vers un même point du plan de détection du faisceau diffusé. Nous avons travaillé avec un granulomètre COULTER LS 130.

Rq : les particules n'étant pas sphériques, le diamètre moyen est obtenu grâce à la rotation des particules sur elles-mêmes.

Le traitement informatique des résultats permet d'obtenir la répartition du nombre de particules en fonction de leurs volumes occupés. Le logiciel assimile les grains à des sphères dont le diamètre est indiqué en abscisse. Les courbes obtenues présentent le volume occupé par chaque classe de particules noté (volume diff %) et le volume total occupé par la poudre noté (volume cum %).

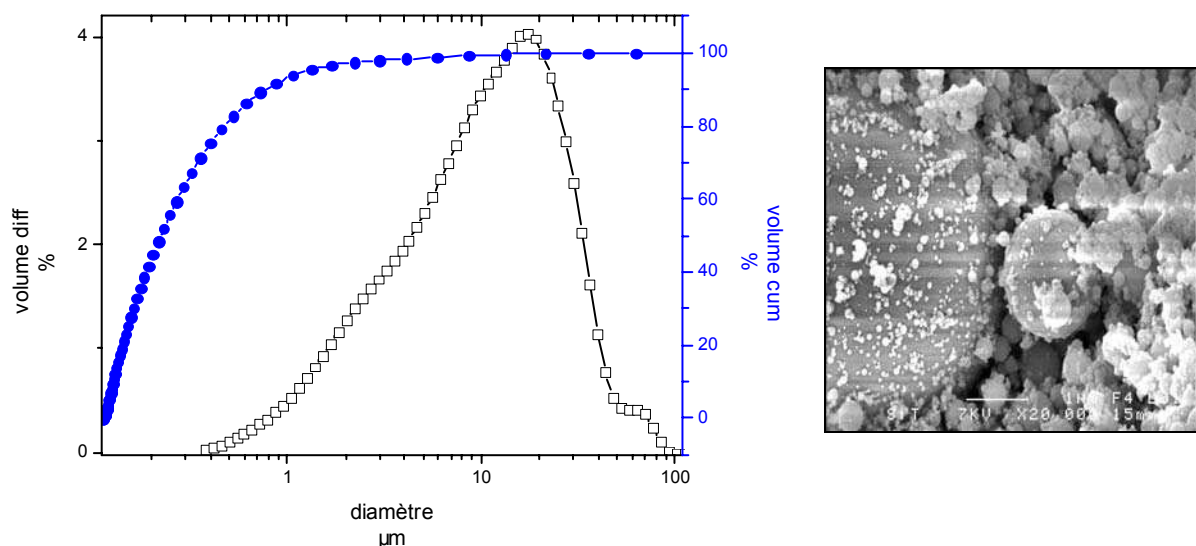


Figure 2.2 Granulométrie et morphologie (MEB x20000) de la silice thermique utilisée dans la synthèse des matrices géopolymères

La figure 2.2 (partie de gauche) présente la courbe des distributions en fonction de la taille de particules (noté volume diff %). Cette courbe présente une distribution qui s'étend sur une centaine de microns [0,3 - 100 μm]. Le diamètre des grains majoritairement représenté est d'une dizaine de microns. L'épaulement de la courbe vers 100 μm traduit la présence de grosses particules (visibles sur le cliché MEB).

Les figures 2.3 et 2.4 présentent des distributions moins larges que la silice thermique avec des diamètres (pour les volumes différenciés) allant de 0,3 à 40 μm. L'hydroxyapatite (HA) présente la

granulométrie la plus fine avec une majorité de particules de diamètre compris entre 3 et 4 μm . Des tailles de particules mesurées à environ 10 μm de diamètre subsistent après le passage aux ultrasons (figure 2.3).

Le TCP présente une granulométrie moyenne de 10 μm , la répartition des tailles de grains est plus régulière que l'hydroxyapatite.

L'ensemble des poudres utilisées ont des granulométries inférieures à la centaine de microns. La représentation des valeurs du volume cumulé en % (noté % volume cum) pour chacune des trois figures précédentes présente des allures similaires, la pente la moins forte est observée pour la silice thermique et traduit une population de particules moins importante pour les petits diamètres.

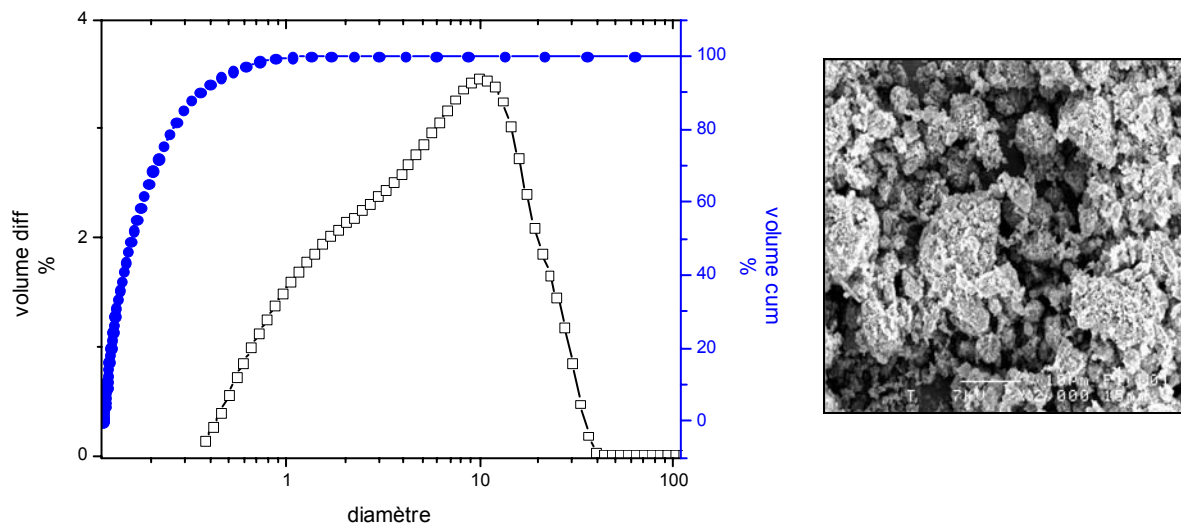


Figure 2.3 Granulométrie et morphologie (MEB x2000) du TCP utilisé comme ajout lors de la synthèse des composites

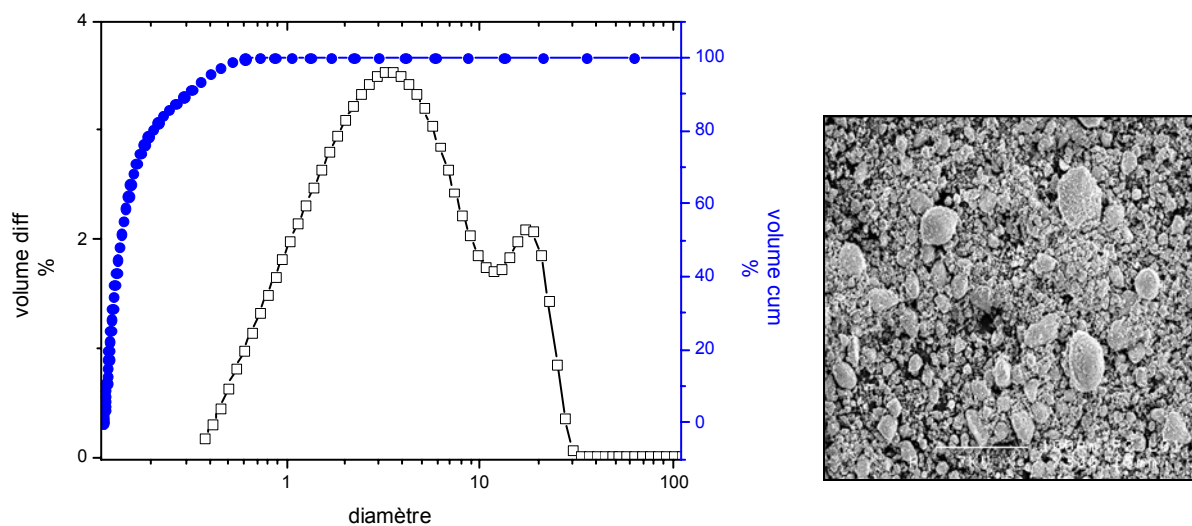


Figure 2.4 Granulométrie et morphologie (MEB x500) de l'HA utilisée comme ajout lors de la synthèse des composites

Pour favoriser un pourcentage de porosité important qui sera décrit par la suite, les composites ont été obtenus par mélange de 13% en masse de phosphate de calcium avec le géopolymère (préalablement stocké à -10°C pendant au moins 6 heures).

Remarque : des synthèses préliminaires non précisées ici ont permis de déterminer le pourcentage de phosphate de calcium à ajouter (compris entre 5% et 80%). Nous avons voulu inclure la quantité maximale de phosphate tout en conservant les propriétés de synthèse des composites (matériaux visqueux qui peuvent être moulés). Pour des pourcentages de phosphates de calcium supérieurs à 13%, les composites ne sont pas fluides et la matrice géopolymère ne joue plus son rôle.

Nous avons obtenu les composites suivant (tableau 2-4) :

Nom	Matrice géopolymère	Phosphate de calcium	Masse géopolymère	Masse TCP (g)	Masse HA (g)
G54H	GPS 0.54	HA	87 g	-	13 g
G54T	GPS 0.54	TCP	87 g	13 g	-
G54HT	GPS 0.54	HA & TCP	87 g	5,2 g	7,8 g
G67H	GPS 0.67	HA	87 g	-	13 g
G67T	GPS 0.67	TCP	87 g	13 g	-
G67HT	GPS 0.67	HA & TCP	87 g	5,2 g	7,8 g
G80H	GPS 0.8	HA	87 g	-	13 g
G80T	GPS 0.8	TCP	87 g	13 g	-
G80HT	GPS 0.8	HA & TCP	87 g	5,2 g	7,8 g

Tableau 2-4 Présentation des différents composites synthétisés

Afin d'étudier l'influence du type de phosphate de calcium, nous avons ajouté au géopolymère chaque phosphate individuellement ainsi qu'un mélange de deux des phosphates dans les proportions 60% HA et 40% TCP. Ce choix a été influencé par l'utilisation courante de l'association de ces deux phosphates comme biomatériaux [15] à des taux variables [16, 17].



Figure 2.5 géopolymère après chauffage à 60°C

Après un mélange intime de la poudre de phosphate de calcium avec le géopolymère, la pâte obtenue est coulée dans des moules (téflon) qui sont ensuite recouverts. Comme pour les géopolymères purs, les échantillons ont été chauffés à 60°C pendant 2 h 30 afin de permettre le durcissement de la matrice GPS. Les composites sont ensuite démoulés et stockés dans des sachets hermétiquement fermés (figure 2.5).

II Caractérisation physico-chimique et morphologique des géopolymères purs et des composites géopolymères/phosphates de calcium

II.1 Morphologie des géopolymères purs et des composites

II.1.1 Méthode d'analyse : la microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) permet d'observer des surfaces jusqu'à une échelle nanométrique. Cette méthode nous a permis d'étudier la morphologie de la surface des géopolymères et de leurs composites avant et après traitement thermique.

L'échantillon à analyser est métallisé par un mélange or-paladium avant son introduction dans la chambre d'analyse. Cette métallisation permet d'éviter une accumulation de charges importante à la surface de nos échantillons (qui sont isolants) et réduit la profondeur de pénétration du faisceau, améliorant ainsi la qualité de l'image.

Une fois l'échantillon placé dans l'enceinte, le vide secondaire est réalisé puis l'échantillon est balayé par un faisceau d'électrons. L'interaction électrons-matière provoque différentes réactions (diffraction, diffusion, émission d'électrons secondaires...). La réalisation d'images s'effectue par la collecte des électrons secondaires ou rétrodiffusés, émis par la surface du matériau.

Les études par MEB ont été réalisées sur un microscope JEOL JSM 6400 du CMEBA de l'université de Rennes 1.

II.1.2 Résultats

La figure 2.6 présente la surface des géopolymères purs à un grossissement de 100x. Les états de surface des trois matériaux sont très semblables : la surface est relativement lisse avec des arrêtes saillantes et des pores fermés. Ces trois matériaux présentent en surface des pores non communicants et des fissures qui sont dues à une perte d'eau.

L'aspect des composites est similaire, quel que soit le phosphate de calcium introduit, nous ne présentons sur la figure 2.7 que les clichés MEB obtenus pour les composites avec le mélange de phosphate de calcium (HT) associé aux trois différentes matrices géopolymères (G54, G67 et G80).

Par comparaison avec le géopolymère pur G54, la surface des composites présente le même aspect lisse agrémenté de pores et de fissures. L'observation du vieillissement de ces composites a montré qu'ils sèchent et deviennent cassants lorsqu'ils ne subissent pas de traitement thermique ni de séchage en moule.

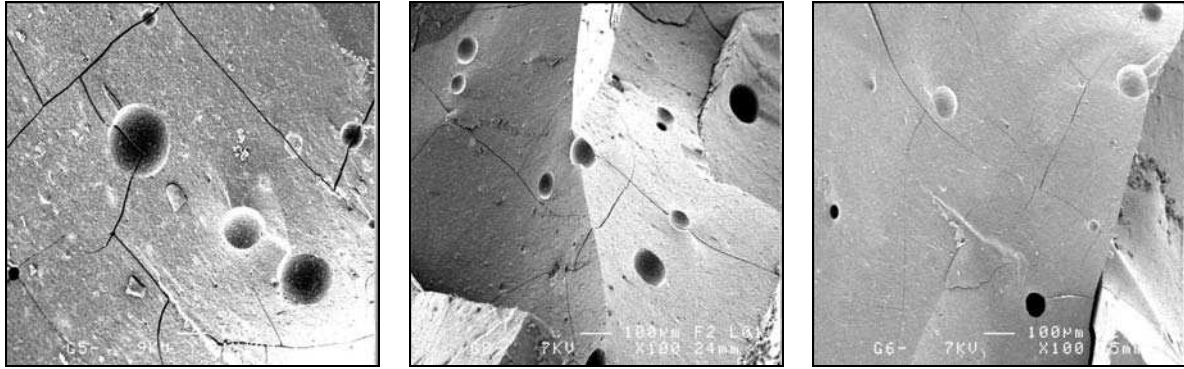


Figure 2.6 morphologie des géopolymères purs de gauche à droite G54, G67 et G80



Figure 2.7 morphologie des composites HT : de gauche à droite G54HT, G67HT et G80HT

Les surfaces des différents composites présentent toutes de petites tâches plus claires de diamètre inférieur à la centaine de microns. Ces tâches (bien visibles sur le cliché MEB du composite G54HT) ont été identifiées par EDX (les analyses EDX réalisées ne sont pas présentées ici) comme étant du phosphate de calcium pur. Cette mise en évidence qualitative de l'hétérogénéité des composites va être évaluée qualitativement par la caractérisation structurale de ces matériaux.

II.2 Etude du pH des géopolymères purs et des composites géopolymères/ phosphates de calcium.

Les composites géopolymères / phosphates de calcium sont destinés à des expérimentations en milieu vivant. Les matériaux en contact avec l'organisme doivent présenter des propriétés voisines de celles du milieu hôte, notamment des valeurs de pH proches de celles du pH physiologique (voisin de 7).

La synthèse du géopolymère se déroule en milieu basique (ajout de KOH) nécessaire à la

polymérisation et la polycondensation totale du matériau. Le milieu de réaction fortement alcalin induit des valeurs de pH élevées pour les géopolymères purs (G54, G67 et G80) (figure 2.8).

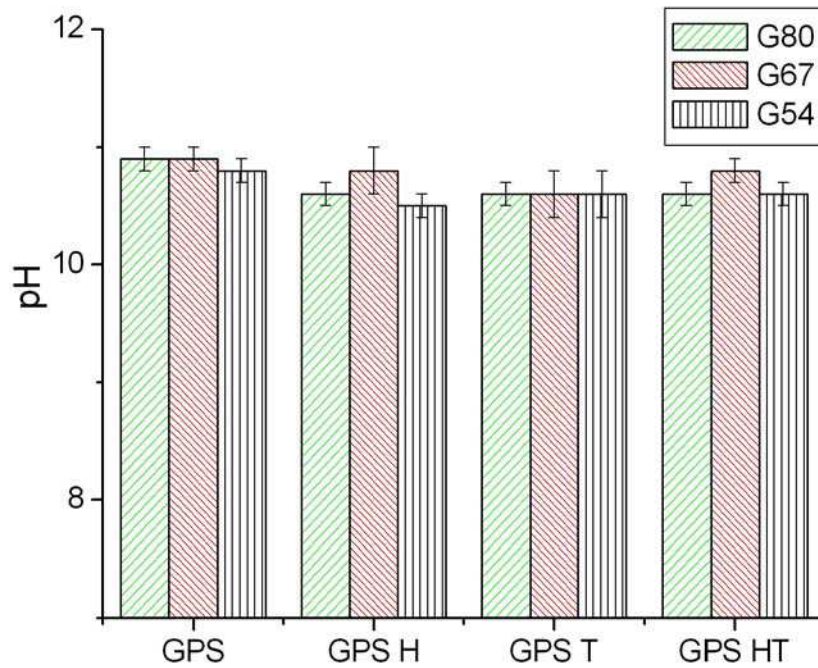


Figure 2.8 Mesure de pH des géopolymères purs et composites avant traitement thermique

La réduction de la quantité de potasse initiale de 0,80 à 0,54 ne modifie pas le pH des géopolymères, mais cette diminution est insuffisante pour réduire notablement les valeurs de pH. De plus, l'ajout de phosphates de calcium n'a pas d'influence significative sur la basicité des matériaux.

II.3 Caractérisation par DRX

II.3.1 Diffraction des rayons X : principe et protocole expérimental

La technique de diffraction par les rayons X permet de déterminer l'arrangement des atomes constitutifs d'une structure. Cette méthode permet d'obtenir des informations à des échelles de l'Angström. Lorsque la longueur d'onde λ d'un rayonnement incident est du même ordre de grandeur que les distances inter réticulaires (d) d'un cristal ou d'une poudre (dans notre cas), il y a interaction rayonnement -matière suivant la relation de Bragg :

$$2d_{hkl} \sin \theta = \lambda$$

Les diagrammes ont été obtenus sur l'appareil INEL CPS 120 du LCSIM, la géométrie INEL permet une acquisition simultanée suivant toutes les valeurs de θ comprises entre 10° et 120° (2θ). L'échantillon finement broyé est placé sur un porte échantillon en rotation.

Les matériaux de la famille des géopolymères présentent des diagrammes de diffraction caractéristiques de matériaux amorphes. Les pics de diffractions éventuellement visibles sont dus à la présence résiduelle du silicate de départ. [7]

Dans ce travail, cette technique d'investigation nous a permis de vérifier la structure des différents matériaux après synthèse, en fonction du rapport K_2O/SiO_2 . Par la suite, l'étude par diffraction sur poudre a permis de caractériser les modifications éventuelles de la structure de la matrice géopolymère et des composites en fonction de la température de traitement thermique.

II.3.2 DRX des géopolymères purs

Les diagrammes de diffraction des géopolymères purs présentés figure 2.9 mettent en évidence un halo de diffraction allant de 15° à 35° (2θ).

Ce halo est présent quel que soit le composé, il traduit l'absence d'ordre à longue distance. Les pics de diffraction de faible intensité observés ($14,13$; $21,12$ et $29,77$ $2\theta(^\circ)$) pour chacun des échantillons étudiés sont attribués à une impureté de SiO_2 (fiche JCPDS 82-1561) provenant de la silice thermique ajoutée à la solution de silicate dépolymérisée.

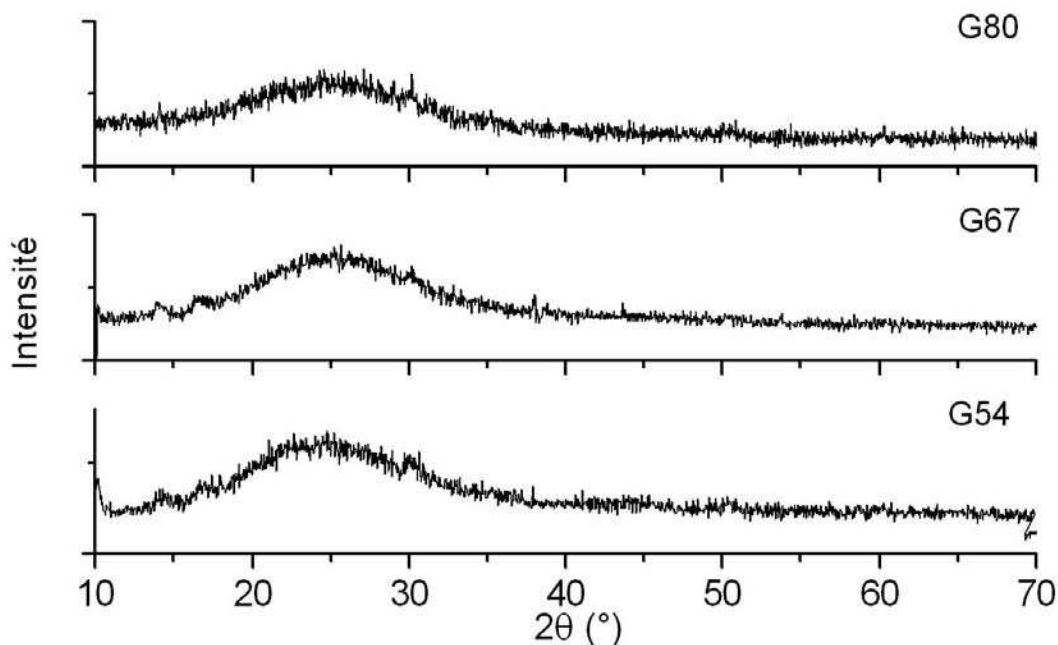


Figure 2.9 DRX des géopolymères purs en fonction du rapport K_2O/SiO_2

L'influence du rapport K_2O/SiO_2 ne modifie pas la structure du géopolymère obtenu. La comparaison entre les diagrammes des composés G80 ($K_2O/SiO_2=0,80$), G67 ($K_2O/SiO_2=0,67$) et G54 ($K_2O/SiO_2=0,54$) indique que la diminution de la quantité de potasse ajoutée lors de la synthèse n'influe pas sur la réaction de polycondensation entre la silice thermique et la solution de silicate de potassium enrichie en potasse.

II.3.3 DRX des composites géopolymère/ phosphate de calcium

Les figures 2.10 à 2.12 présentent les diffractogrammes des différentes associations entre géopolymère et phosphates de calcium (HA, TCP ou leur association). Pour chaque composite, le diagramme de diffraction présente un halo de 15 à 35° (2θ) ainsi qu'un ensemble de pics de diffraction. Le halo est la signature de la partie amorphe des composites : la matrice géopolymère et les pics de diffraction correspondent au diffractogramme obtenu pour les phosphates de calcium.

La variation du rapport K_2O/SiO_2 n'influence pas la structure des différents composites. A la température de synthèse, la structure de chaque composite se caractérise par une matrice polymérique amorphe dans laquelle sont inclus les différents phosphates de calcium.

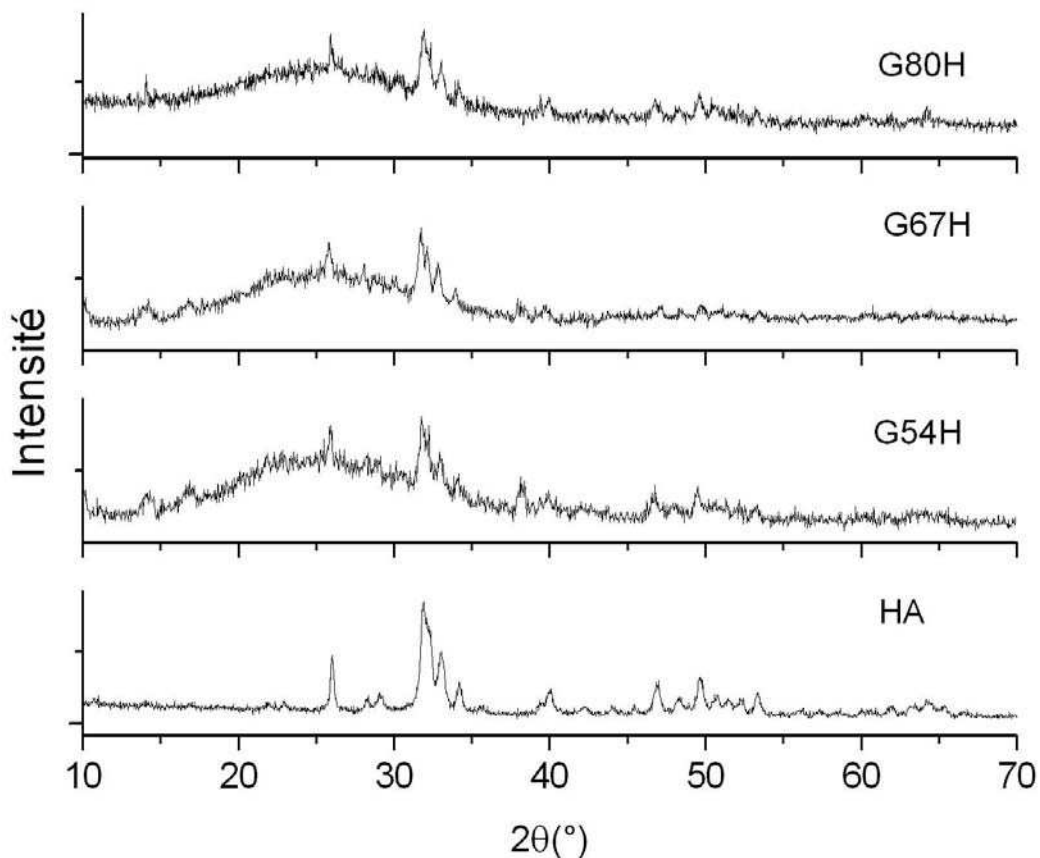


Figure 2.10 DRX des composites avec 13% d'hydroxyapatite. Diagrammes de diffraction des composites en fonction de K_2O/SiO_2

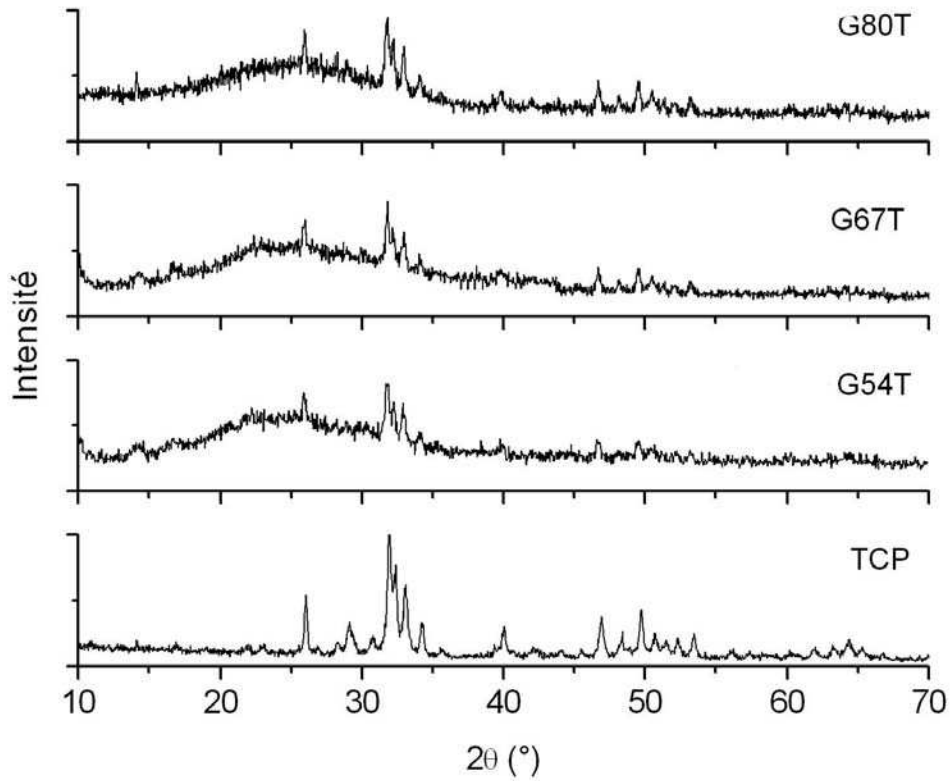


Figure 2.11 DRX des composites avec 13% de phosphate tricalcique. Diagrammes de diffraction des composites en fonction de K_2O/SiO_2

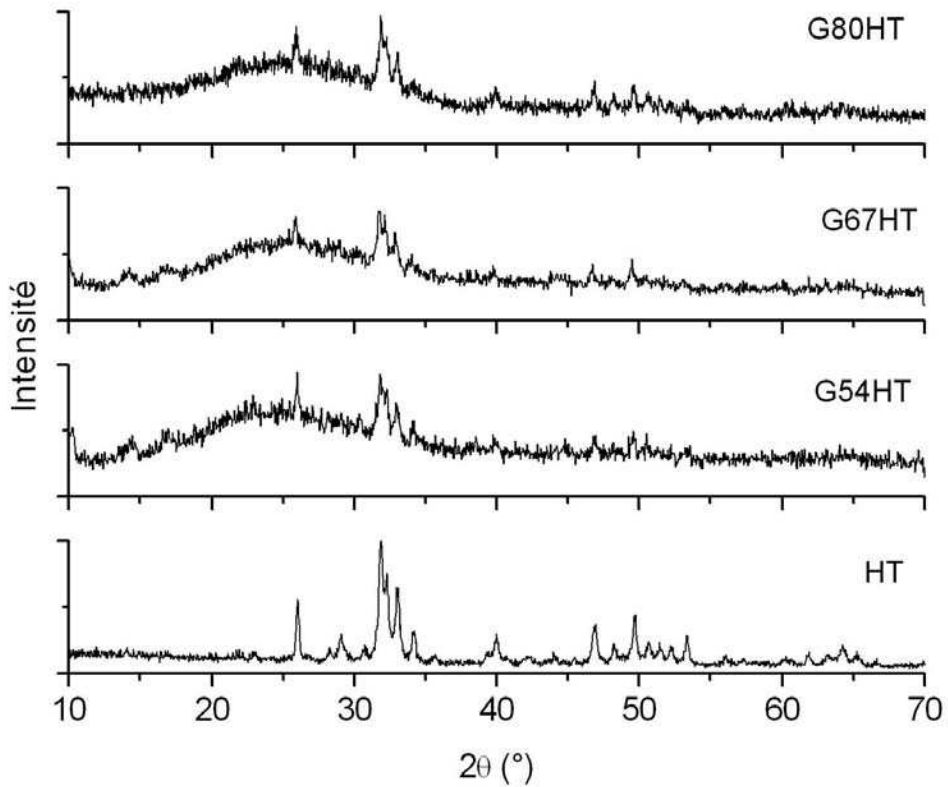


Figure 2.12 DRX des composites avec 13% du mélange : phosphate tricalcique et hydroxyapatite. Diagrammes de diffraction des composites en fonction de K_2O/SiO_2

II.4 Caractérisation par Transformée de Fourier Infra Rouge

II.4.1 Principe de la méthode et protocole expérimental

L'étude par transformée de Fourier Infra Rouge permet de définir les différents types de liaisons d'un échantillon. Les différentes molécules ou groupements constitutifs de la matière possèdent des niveaux de vibrations qui correspondent à des énergies précises. Lorsque l'on excite une molécule à son énergie de vibration propre, celle-ci absorbe l'énergie incidente. Ce phénomène physique est utilisé dans l'étude par transformée de Fourier Infra Rouge.

Les matériaux étudiés ont été finement broyés, mélangés à 90% en masse de KBr puis pressés afin d'obtenir des pastilles transparentes dans l'Infra Rouge. Un faisceau incident infra-rouge est envoyé à travers l'échantillon que l'on souhaite analyser, seules les longueurs d'ondes correspondant à une énergie égale aux niveaux de vibration des molécules de l'échantillon sont absorbées. Les spectres obtenus présentent des bandes d'intensités plus faibles que la ligne de base du signal reçu. Ces bandes correspondent aux bandes d'absorption caractéristiques des différentes liaisons présentes dans l'échantillon.

Les études Infra Rouge ont été réalisées sur un interféromètre à transmission de Fourier BOMEM-MICHELSON 100.

L'ensemble des composés synthétisés a été analysé par FTIR afin d'obtenir une étude systématique des liaisons présentes dans nos matériaux pour pouvoir déceler d'éventuelles modifications. Le choix du phosphate de calcium et le rapport K_2O/SiO_2 sont les paramètres que nous avons fait varier afin de définir leurs influences respectives.

II.4.2 Etude FTIR des géopolymères purs G54, G67 et G80

Ces matériaux appartiennent à la famille des aluminosilicates, ils sont caractérisés par des spectres présentant peu de bandes d'absorption. Les trois géopolymères purs (G54, G67 et G80) présentent les mêmes bandes d'absorption (figure 2.13).

Ces composés sont hydratés comme en témoignent les bandes d'absorption vers 3500 cm^{-1} et 1600 cm^{-1} .

Les autres bandes se situent dans la région des faibles nombres d'ondes [$1100-450\text{ cm}^{-1}$]. Les bandes de vibration vers 1040 cm^{-1} et 785 cm^{-1} sont attribuées respectivement aux vibrations asymétriques et symétriques (stretching mode) Si-O-(Si,Al) des tétraèdres AlO_4 et SiO_4 [18, 19].

La bande d'absorption observée pour chacun des géopolymères vers 470 cm^{-1} est attribuée

aux vibrations (bending mode) de Si-O-Si et Si-O-Al [19, 20].

La variation de la quantité de potasse ajoutée à la solution de silicate de départ (définie par K_2O/SiO_2) n'introduit pas de modification dans les échantillons.

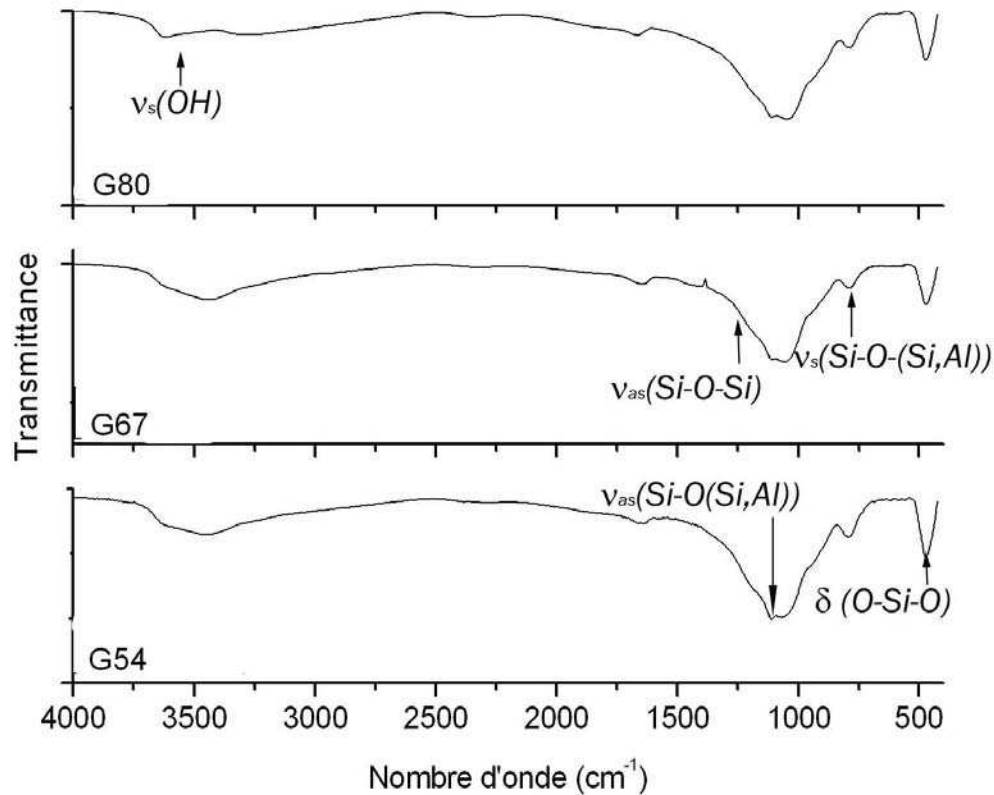


Figure 2.13 FTIR des géopolymères purs en fonction du rapport K_2O/SiO_2

II.4.3 Etude FTIR des composites géopolymères/ phosphates de calcium

Les figures 2.14 à 2.16 présentent les spectres d'absorption des différents composites géopolymères/ phosphates de calcium, pour chaque rapport molaire K_2O/SiO_2 . Quel que soit le type de phosphate de calcium ajouté au géopolymère (Ha, TCP ou leur association), les bandes d'absorption observées sont classées en plusieurs catégories :

- Les bandes d'absorption semblables à celles observées pour les géopolymères purs. Elles sont caractéristiques de la structure de l'aluminosilicate constitutif de la matrice. Il s'agit des bandes d'absorption à 1040 cm^{-1} , 800 cm^{-1} et 470 cm^{-1} .

- Les bandes d'absorption qui correspondent de l'hydratation des composés, à 3500 cm^{-1} [21] et 1600 cm^{-1} [18]. Ces bandes étaient déjà présentes sur les spectres d'absorption des géopolymères purs.
- Les bandes d'absorption caractéristiques des phosphates de calcium. La bande d'absorption à 1080 cm^{-1} caractéristique des liaisons (stretching mode) P-O des groupements PO_4^{3-} [22] se superpose avec la bande d'absorption vers 1040 cm^{-1} des géopolymères, l'élargissant. Les bandes d'absorption à 603 et 566 cm^{-1} apparaissent avec l'introduction des phosphates de calcium [22, 23].

L'étude par transformée de Fourier infrarouge conforte les résultats obtenus par DRX. La variation de la quantité de potasse n'influence pas la structure des géopolymères. L'ajout de différents phosphates de calcium à ces géopolymères a des effets similaires quel que soit le type de phosphate de calcium.

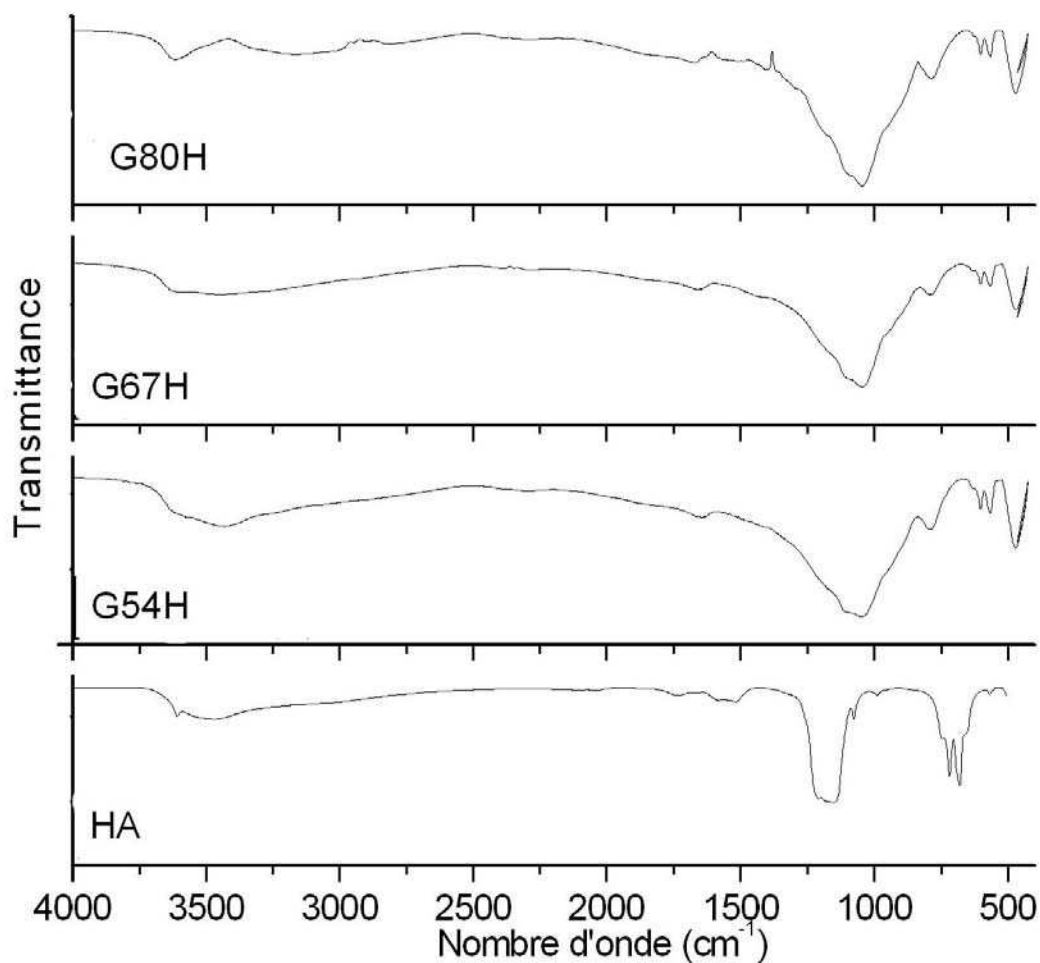


Figure 2.14 FTIR des composites avec 13% d'hydroxyapatite. Présentation des courbes en fonction de $\text{K}_2\text{O}/\text{SiO}_2$

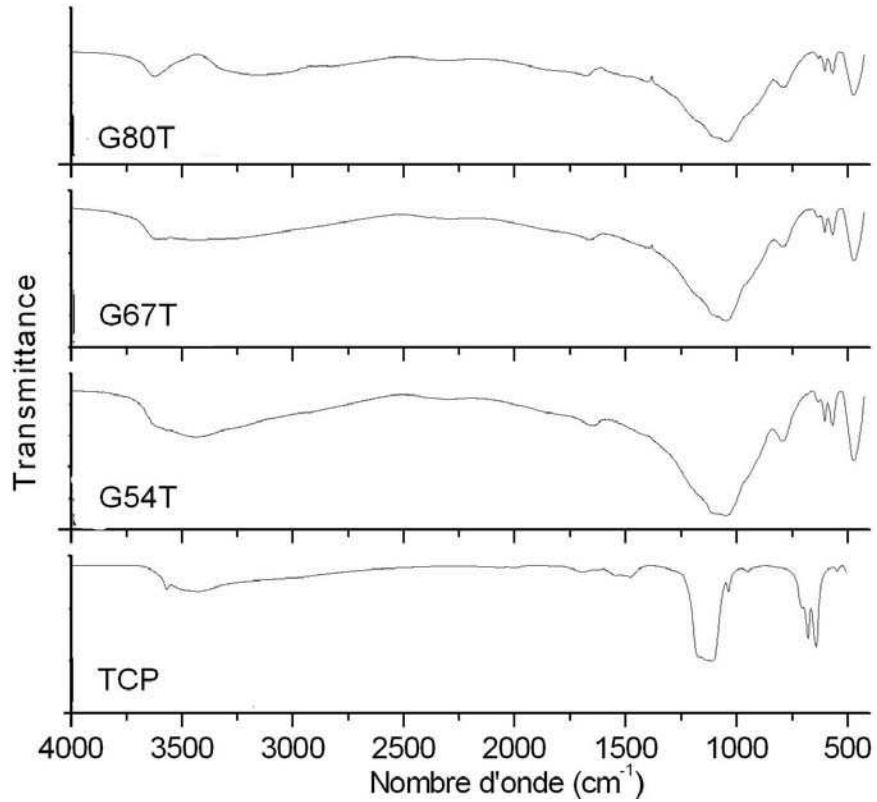


Figure 2.15 FTIR des composites avec 13% de phosphate tricalcique. Présentation des courbes en fonction du rapport K_2O/SiO_2

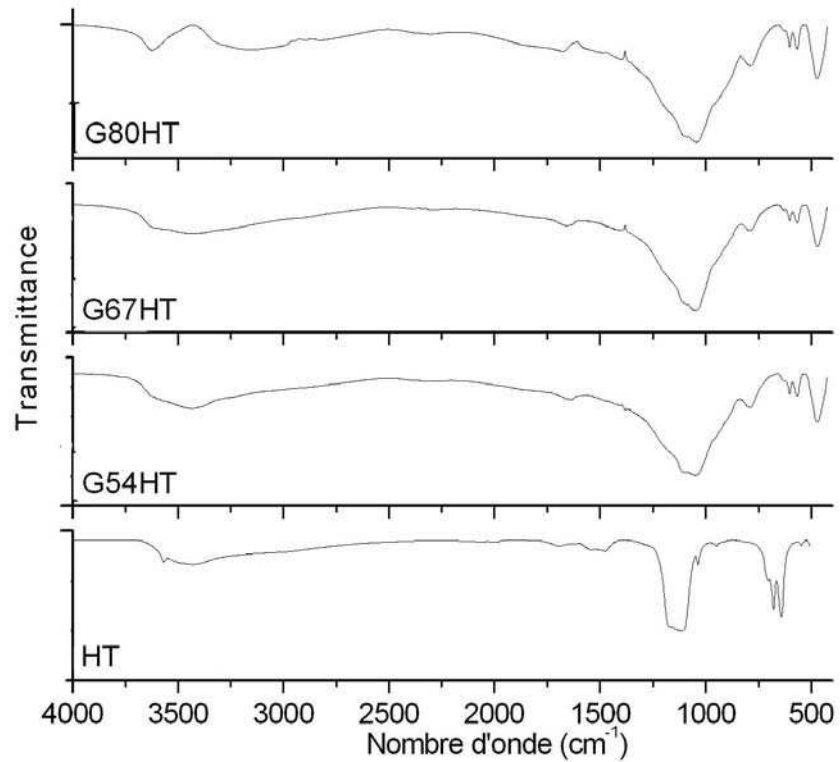


Figure 2.16 FTIR des composites avec 13% de phosphate tricalcique et d'hydroxyapatite. Présentation des courbes en fonction de K_2O/SiO_2

II.5 Etude par RMN du solide des géopolymères purs et des composites

II.5.1 Protocole expérimental

La spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire permet de déterminer l'environnement local d'un noyau dont le spin I est non nul. Cette technique est particulièrement adaptée à nos matériaux qui sont amorphes. Son principe est décrit dans l'annexe 3.

L'étude des géopolymères et des composites a été effectuée par RMN MAS (Magic Angle Spinning). La mise en rotation de l'échantillon à des vitesses comprises entre 8 KHz (pour le silicium) et 15 kHz (pour l'aluminium et le proton) à l'angle magique ($54,7^\circ$) a permis d'annuler les interactions du premier ordre et minimise celles du second ordre.

Les échantillons ont été finement broyés et placés dans des rotors. Les spectres ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker de haute résolution solide ASX300 (7T). Les paramètres caractéristiques de chaque noyau et des conditions expérimentales qui lui ont été appliquées sont indiquées dans le tableau 2-5 :

Noyaux	ν résonance (MHz)	Vitesse rotation (Hz)	Temps de pulse (μ s)	Temps d'attente (s)	référence
1 H	300	15000	3	1	H ₂ O
27 Al	78	14500	1	1	Al(NO ₃) ₃
29 Si	59.6	8000	2	2	TMS
31 P	121.5	8000	1.5	5	H ₃ PO ₄

Tableau 2-5 conditions expérimentales d'acquisition et noyaux de références

Les déplacements chimiques ont été référencés par rapport à une solution aqueuse 1M de Al(NO₃)₃ pour l'aluminium, par rapport au tétraméthylsilane (TMS) pour le silicium, par rapport à l'eau pour le proton et par rapport à une solution H₃PO₄ à 85% pour le phosphore.

Les spectres ont été traités avec le programme « dm20020918 », mis au point par D. Massiot du C.R.M.H.T à Orléans [24].

II.5.2 Caractérisation des géopolymères purs par RMN MAS

Nous nous sommes intéressés à trois noyaux pour les géopolymères purs : Si, Al et H. L'analyse quantitative des éléments silicium et aluminium nous a permis d'étudier les modifications structurales induites par la variation du rapport K_2O/SiO_2 sur la matrice géopolymère. L'étude du proton nous a permis d'examiner de manière qualitative l'influence du rapport ci-dessus sur l'hydratation des matériaux.

RMN MAS du silicium, étude des géopolymères purs

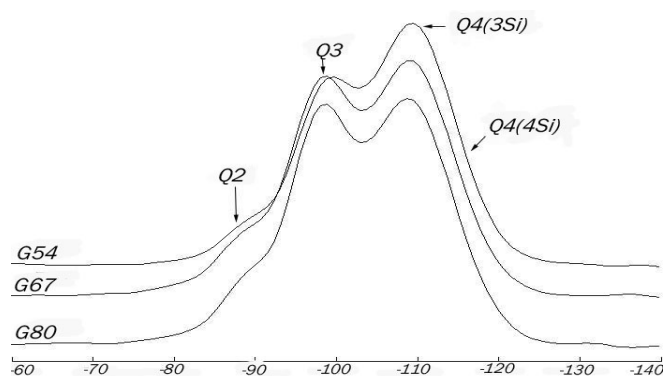


Figure 2.17 RMN MAS Si des géopolymères purs

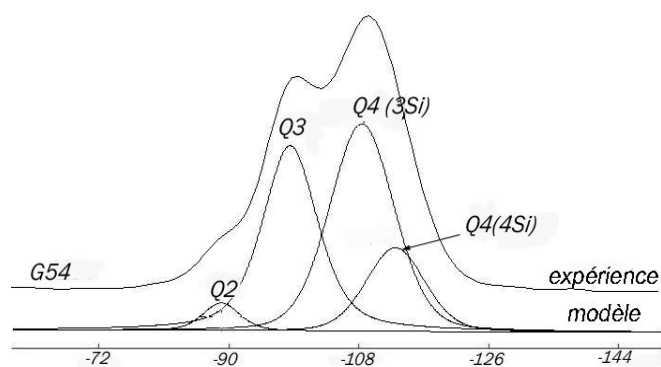


Figure 2.18 RMN MAS Si du géopolymère G54

Echantillon	Unités	$\delta(^{29}Si)$ ppm	Population (%)	$(Q^2+Q^3)/Q^4$
G54	Q ²	-89,0	3,6	0,68
	Q ³	-98,5	37	
	Q ⁴ (3Si)	-108,4	43,5	
	Q ⁴ (4Si)	-113,1	15,9	
G67	Q ²	-88,2	6	0,94
	Q ³	-98,1	42,6	
	Q ⁴ (3Si)	-109,1	46,7	
	Q ⁴ (4Si)	-115	4,7	
G80	Q ²	-88,6	5,7	0,91
	Q ³	-98,0	42	
	Q ⁴ (3Si)	-108,7	45,8	
	Q ⁴ (4Si)	-114,9	6,5	

Tableau 2-6 Résultats de la déconvolution des spectres RMN MAS Si des géopolymères G54, G67 et G80.

La figure 2.18 présente le spectre MAS ^{29}Si obtenu pour le géopolymère G54 ainsi que le résultat de sa déconvolution qui met en évidence quatre contributions distinctes comprises entre -88 et -115 ppm. Ces contributions sont caractéristiques de siliciums en environnement tétraédrique [25] qui sont (par ordre d'abondance) :

- **Les unités Q^4** [25, 26, 27] qui caractérisent un silicium en environnement tétraédrique où tous les oxygènes sont pontants. Cette contribution est divisée en deux catégories les unités Q^{4-4} qui se situent à -113,1 ppm et Q^{4-3} à -108,4 ppm (tableau 2-6). Ces deux contributions diffèrent par le second voisin des atomes de silicium, les unités Q^{4-4} correspondent aux siliciums entourés exclusivement de Si et les unités Q^{4-3} correspondent aux siliciums entourés par des silicium et un autre élément (K ou Al) [28]. Quel que soit le géopolymère étudié, les unités Q^4 constituent la contribution majoritaire (tableau 2-6 et figure 2.17).
- **Les unités Q^3** [27, 29] (-98,5 ppm) caractérisent des siliciums en environnement tétraédrique liés à un oxygène non pontant (ramification de chaînes). La contribution des unités Q^3 est importante pour les trois géopolymères étudiés (tableau 2-6 et figure 2.17)
- **Les unités Q^2** [27, 29] (-89 ppm). Quel que soit le géopolymère étudié, la contribution de ces unités caractéristiques de silicium en environnement tétraédrique à deux oxygènes non pontants (milieu de chaîne) est inférieure à 6%.

Lorsque le rapport $\text{K}_2\text{O}/\text{SiO}_2$ diminue, la proportion de $(Q^2+Q^3)/Q^4$ diminue, le nombre d'atomes de silicium en environnement tétraédrique où tous les oxygènes sont pontants (Q^4) augmente au détriment des siliciums avec des oxygènes non pontants. La diminution de la quantité de K_2O dans la composition des géopolymères (diminution du rapport) favorise la formation de Q^{4-4} au détriment des unités Q^3 , cette évolution a été décrite dans des verres $\text{K}_2\text{O}-\text{SiO}_2$ à forte teneur en SiO_2 [28]. L'évolution de ce rapport ne modifie pas l'ordre d'abondance ni la position des déplacements chimiques (déplacement inférieur à 2 ppm environ). La diminution du rapport déplace les valeurs δ des unités Q^4 vers les champs faibles [30].

RMN MAS de l'aluminium, étude des géopolymères purs

La figure 2.20 présente le spectre expérimental RMN MAS Al obtenu pour le géopolymère pur G54 (caractérisé par le rapport $\text{K}_2\text{O}/\text{SiO}_2 = 0,54$) ainsi que le modèle qui met en évidence 3 contributions qui sont, par ordre d'abondance :

- **AlO_4** (56 ppm) [29, 31, 32] caractéristique des aluminiums en environnement tétraédrique qui sont formateurs de réseau. Cette composante est largement majoritaire quel que soit le géopolymère étudié (tableau 2-7 et figure 2.19).
- **AlO_6** (15,4 ppm) [32, 33] caractéristique des aluminiums en site octaédrique, jouant le rôle de modificateurs de réseau.

- AlO_5 (34,3 ppm) [29, 31] : cette composante est minoritaire pour chacun des géopolymères purs étudiés (tableau 2-7 et figure 2.19)

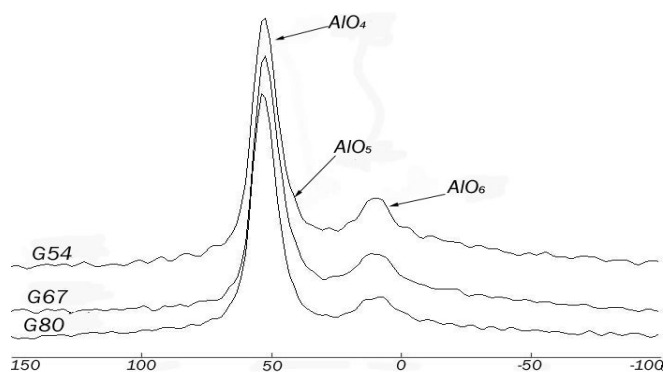


Figure 2.19 RMN MAS Al des géopolymères purs

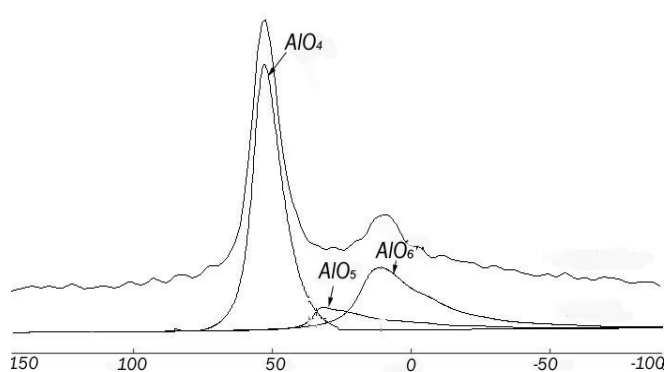


Figure 2.20 RMN MAS Al du géopolymère G54

Echantillon	Unités	$\delta(^{27}\text{Al})$ ppm	Population (%)
G54	(Al VI) AlO_6	15,4	31
	(Al V) AlO_5	34,3	13,6
	(Al IV) AlO_4	56	55,4
G67	(Al VI) AlO_6	16	27,3
	(Al V) AlO_5	34,3	12,4
	(Al IV) AlO_4	55,7	60,3
G80	((Al VI) AlO_6	15,2	23,9
	(Al V) AlO_5	34	9,6
	(Al IV) AlO_4	56,6	66,5

Tableau 2-7 Résultats de la déconvolution des spectres MAS RMN Al des géopolymères G54, G67 et G80

La diminution du rapport $\text{K}_2\text{O}/\text{SiO}_2$ favorise l'augmentation des contributions en AlO_5 et AlO_6 au détriment des AlO_4 . Cependant cette dernière reste majoritaire (55,4 % pour le géopolymère G54). De plus, les positions des déplacements chimiques ne sont pas influencées par la variation de ce rapport.

RMN MAS du proton, étude des géopolymères purs

Le spectre théorique correspondant au spectre expérimental de la figure 2.22 regroupe 5 contributions différentes. L'étude quantitative et l'identification de ces groupements étant délicate, nous nous intéresserons ici aux groupements majoritaires.

Quel que soit le géopolymère (figure 2.21), 80% des protons se situent à des valeurs de déplacements chimiques compris entre 5,7 et 7,3 ppm, ils peuvent être identifiés à des groupements hydroxyls, des acides de Bronsted [34]. La diminution du rapport K_2O/SiO_2 tend à diminuer l'intensité du signal, liée à la quantité de protons (tableau 2-8). Les déplacements situés entre 8 et 14 ppm correspondent à des OH [35].

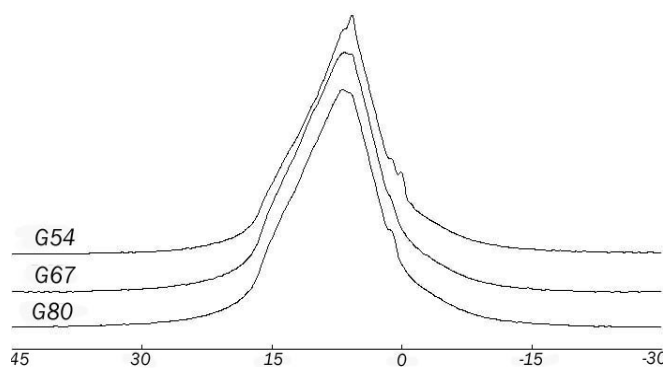


Figure 2.21 RMN MAS 1H des géopolymères purs

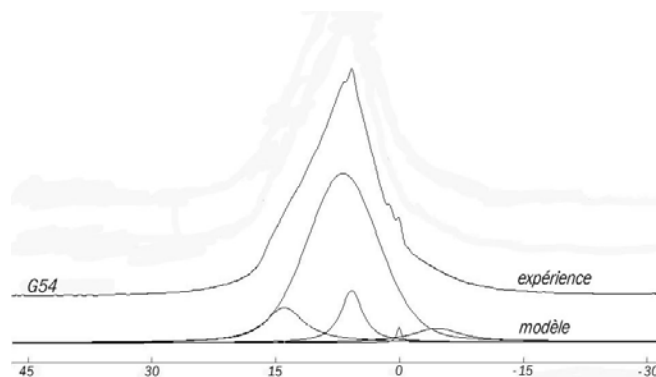


Figure 2.22 RMN MAS 1H du géopolymère G54

Echantillon	$\delta(^1H)$ ppm	Population (%)
G54	-4,5	5,4
	0,1	0,6
	5,8	9,1
	6,8	73,7
	14	11,2
G67	-4	5
	1,1	0,1
	5,7	10,8
	7,3	70,5
	13,9	13,6
G80	-3,9	5,6
	1	0,4
	5,8	10,3
	7,3	69,8
	14	13,9

Tableau 2-8 Résultats de la déconvolution des spectres RMN MAS H des géopolymères G54, G67 et G80

II.5.3 Composites GPS avec HA/TCP

RMN MAS du silicium, étude des composites

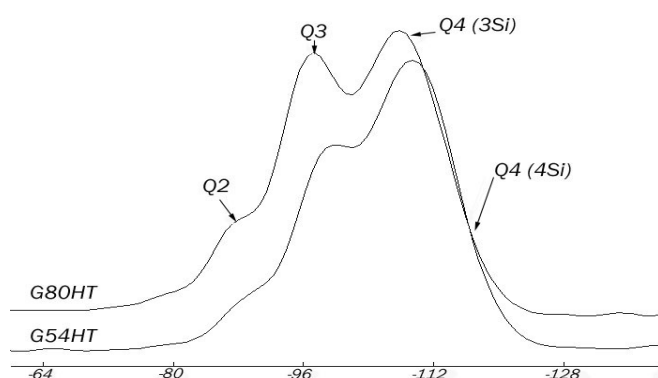


Figure 2.23 RMN MAS Si des composites G54HT et G80HT

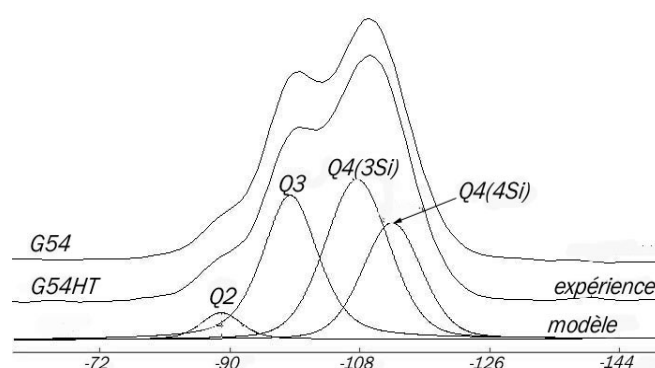


Figure 2.24 RMN MAS Si du composite G54HT

Echantillon	Unités	$\delta(^{29}\text{Si})$ ppm	Population (%)	$(\text{Q}^2+\text{Q}^3)/\text{Q}^4$
G54HT	Q ²	-88,8	4,3	0,59
	Q ³	-98,4	32,7	
	Q ⁴ (3Si)	-107,6	37,7	
	Q ⁴ (4Si)	-112,5	25,3	
G80HT	Q ²	-87,2	7,4	0,89
	Q ³	-96,7	39,8	
	Q ⁴ (3Si)	-107,3	42,9	
	Q ⁴ (4Si)	-112,9	9,9	

Tableau 2-9 Résultats de la déconvolution des spectres RMN MAS Si des composites G54HT et G80HT

La figure 2.24 représente le spectre obtenu pour le composite G54HT ainsi que le modèle établi grâce au logiciel winfit. Comme dans le cas de l'étude des géopolymères purs, les spectres de chacun des composites étudiés peuvent se déconvoluer en quatre contributions : Q², Q³, Q⁴⁻³ et Q⁴⁻⁴.

L'ajout de phosphate de calcium à la matrice géopolymère durant la synthèse n'a pas modifié les abondances relatives des différentes unités : Q⁴ (Q⁴⁻⁴ et Q⁴⁻³) > Q³ > Q² (tableau 2-9 et figure 2.23). L'adjonction de phosphates de calcium a permis d'augmenter le pourcentage relatif de l'unité Q⁴⁻⁴ (par comparaison au géopolymère pur) et ce pour chacun des rapports K₂O/ SiO₂ (15,9% pour G54 et 25,3% pour G54HT). Cette augmentation s'effectue au détriment des unités Q³ et Q⁴⁻³.

La diminution du rapport K₂O/SiO₂ met en évidence des variations des proportions des différentes contributions qui sont semblables à celles observées pour les géopolymères purs. Lorsque

le rapport K_2O/SiO_2 diminue (G80HT à G54HT), la proportion de Q^3+Q^2/Q^4 diminue, le nombre de silicium Q^4 augmente au détriment des siliciums Q^3 . Ici encore, la diminution de la quantité de K_2O dans la composition des composites (diminution du rapport) favorise la formation de Q^{4-4} au détriment des unités Q^3 . Les positions des différents déplacements chimiques sont quasiment identiques entre les géopolymères purs et les composites correspondants ($\delta(Q^3 \text{ G54}) = -98,5 \text{ ppm}$ et $\delta(Q^3 \text{ G54HT}) = -98,4 \text{ ppm}$).

RMN MAS de l'aluminium, étude des composites

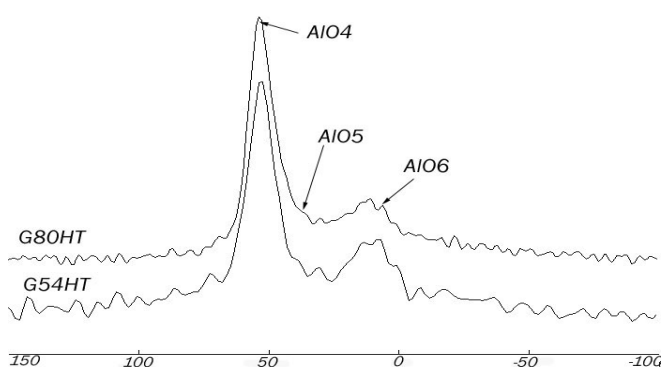


Figure 2.25 RMN MAS Al des composites G80HT et G54HT

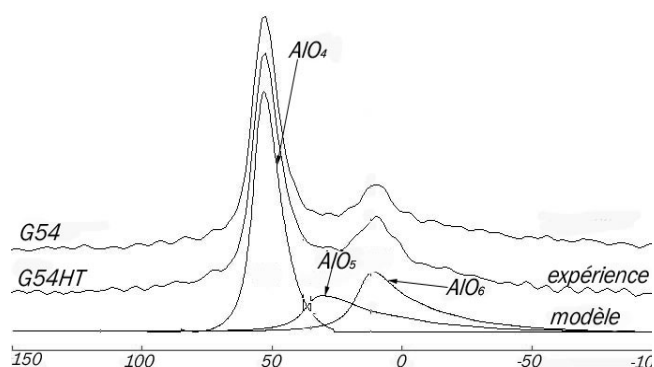


Figure 2.26 RMN MAS Al du composite G54HT

Echantillon	Unités	$\delta(^{27}Al)$ ppm	nuQ (KHz)	Sigma	Population (%)
G54HT	(Al VI) AlO_6	15,14	600	300	29,1
	(Al V) AlO_5	35,07	700	500	22
	(Al IV) AlO_4	55,76	300	120	48,9
G80HT	(Al VI) AlO_6	17,76	600	400	27,7
	(Al V) AlO_5	34,96	600	400	13,7
	(Al IV) AlO_4	56,88	300	100	58,6

Tableau 2-10 Résultats de la déconvolution des spectres MAS RMN Al des composites G54HT et G80HT

La figure 2.26 représente le spectre obtenu pour le composite G54HT ainsi que son modèle. Comme dans le cas de l'étude des géopolymères purs, les spectres de chacun des composites étudié peuvent être déconvolué en trois contributions : AlO_4 , AlO_6 et AlO_5 (figure 2.26).

L'ajout de phosphate de calcium à la matrice géopolymère durant la synthèse n'a pas modifié les abondances relatives des différentes unités : $AlO_4 > AlO_6 > AlO_5$ (tableau 2-10). Il a favorisé

l'augmentation du pourcentage relatif du groupement AlO_5 (par comparaison au géopolymère pur) et ce pour chacun des rapports $\text{K}_2\text{O}/\text{SiO}_2$ (13,6 % pour G54 et 22 % pour G54HT).

Cette augmentation s'effectue au détriment des unités AlO_4 , la proportion d'aluminium en site octaédrique restant sensiblement identique (9,6 % ($\delta = 34$ ppm) pour G80 et 13,7 % ($\delta = 35$ ppm) pour G80HT).

La diminution du rapport $\text{K}_2\text{O}/\text{SiO}_2$ met en évidence des variations des proportions des différentes contributions semblables à celles observées pour les géopolymères purs. Lorsque le rapport $\text{K}_2\text{O}/\text{SiO}_2$ diminue (G80HT à G54HT), la proportion de AlO_4 diminue, au profit des AlO_5 et AlO_6 . Les positions des différents déplacements chimiques sont quasiment identiques entre les géopolymères purs et les composites correspondants.

RMN MAS du phosphore, étude des composites

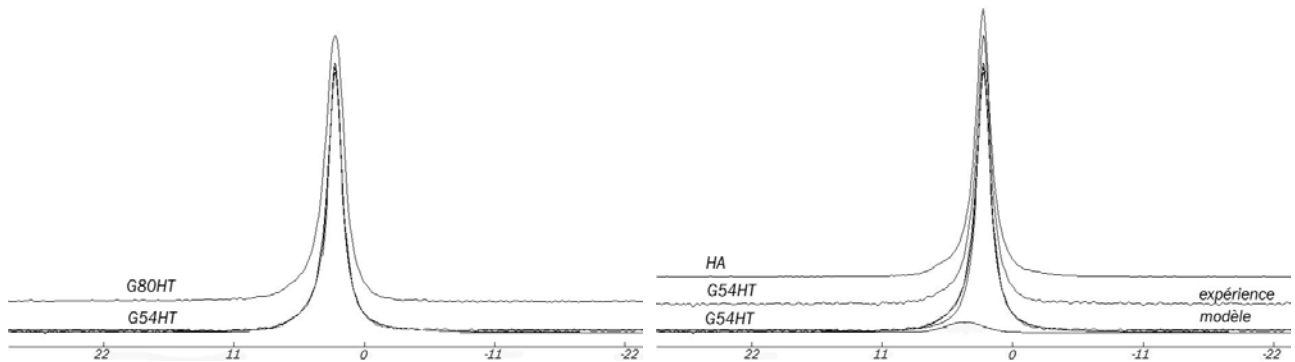


Figure 2.27 RMN MAS P des composites G54HTet **Figure 2.28** RMN MAS P G54HT G80HT

La figure 2.28 présente le spectre expérimental obtenu pour l'échantillon G54HT superposé à son modèle calculé et à un spectre expérimental de l'HA commerciale utilisée dans le mélange. Les spectres de chaque composite (figure 2.27) peuvent se déconvoluer en deux contributions (tableau 2-11) :

- Un groupement caractéristique du groupement PO_4 du phosphate introduit (vers 2,5 ppm). Dans la littérature, ce groupement est compris entre 3,4 ppm pour le β TCP [36] et 2,7 ppm pour HA [37].
- Le second pic aux environs de 4,3 ppm peut provenir du phosphate tri-calcique introduit dans le composite [36], cependant cette composante a été également observée pour les composites n'ayant pas de TCP, ce qui laisse supposer que cette contribution peut être également due à une partie amorphe des phosphates de calcium introduits [37].

La contribution majoritaire correspond aux groupements PO_4 et ce quel que soit le rapport $\text{K}_2\text{O}/\text{SiO}_2$.

Echantillon	Unités	$\delta(^{31}\text{P})$ ppm	Population (%)
G54HT	PO4	2,5	93,1
		4,1	6,9
G80HT	PO4	2,5	87,4
		4,3	12,6

Tableau 2-11 Résultats de la déconvolution des spectres RMN MAS P des composites G54HT et G80HT

RMN MAS du proton, étude des composites

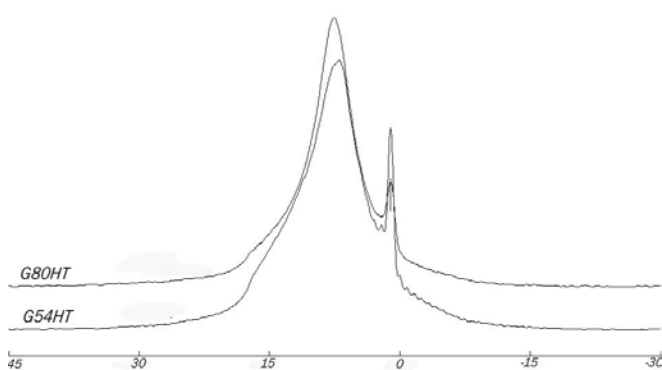


Figure 2.29 RMN MAS 1H des composites G54HT et G80HT

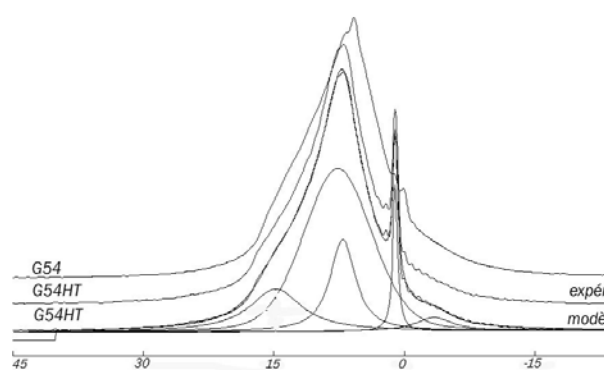


Figure 2.30 RMN MAS 1H du composite G54HT

Echantillon	$\delta(^1\text{H})$ ppm	Population (%)
G54HT	-3,41	3,7
	1,06	5,2
	7,08	16,4
	7,65	58,6
	14,78	16,1
G80HT	-3,36	2,0
	1,05	4,8
	7,5	34,5
	7,78	48,4
	15,25	10,3

Tableau 2-12 Résultats de la déconvolution des spectres RMN MAS H des composites G54HT et G80HT

La figure 2.30 présente le spectre théorique obtenu à partir du résultat expérimental pour le composite G54HT. On retrouve les mêmes contributions que pour les géopolymères purs mais la proportion groupement compris entre 0 et 1 ppm a augmenté. Ces protons sont apportés par les phosphates de calcium qui ont été introduit dans la matrice géopolymère. De la même manière que pour les géopolymères purs, la diminution du rapport K_2O/SiO_2 diminue le nombre de protons (figure 2.29 et tableau 2-12).

II.5.4 Géopolymères purs et composites : résumé des principaux résultats expérimentaux

Les géopolymères sont constitués majoritairement de silicium et d'aluminium en environnement tétraédrique avec des siliciums où toutes les liaisons sont pontantes (Q^{4-4} et Q^{4-3}).

La diminution du rapport K_2O/SiO_2 augmente la quantité de Si Q^4 au détriment des Si Q^3 . L'ajout de phosphate de calcium pour réaliser la synthèse de composites ne modifie pas la structure de la matrice géopolymère, favorise les unités Si Q^4 , mais cet ajout provoque une légère diminution de la quantité d'aluminium IV en coordinance tétraédrique qui reste cependant majoritaire.

L'étude RMN MAS du phosphore sur les composites n'a pas montré de modification notable de son environnement, par comparaison avec les phosphates purs.

L'étude qualitative menée sur l'environnement des protons dans les géopolymères purs et les composites a montré ici encore que l'ajout de phosphate ne perturbe pas l'environnement des protons de la matrice géopolymère, la contributions du groupement hydrogène des phosphates se superpose aux autres contributions.

Ces résultats ont été vérifiés pour les autres types de phosphates de calcium ajoutés (HA et TCP seuls). Cette étude RMN MAS a permis d'approfondir les résultats obtenus par DRX et FTIR : les échantillons composites sont constitués d'une matrice géopolymère amorphe enrichie de phosphates de calcium. Il n'y a pas de liaison forte entre les matériaux.

II.6 Discussion

Nous nous sommes intéressés à l'influence de la quantité de potasse caractérisée par le rapport K_2O/SiO_2 sur le pH et la structure des échantillons de géopolymère pur et des composites associés. Trois rapports ont été expérimentés.

La variation de la quantité de KOH ajoutée lors de la synthèse ne modifie pas la structure des géopolymères obtenus : les composés restent amorphes, l'étude quantitative réalisée par RMN MAS a permis de mettre en évidence l'augmentation des siliciums en site tétraédrique liée à la diminution du rapport K_2O/SiO_2 . Cette augmentation s'accompagne de la diminution des aluminiums en

coordinance IV.

La synthèse qui s'effectue en milieu fortement basique influence le caractère alcalin des géopolymères purs qui présentent des pH supérieurs à 10. Ces valeurs de pH ne sont pas influencées par le rapport K_2O/SiO_2 . L'étude RMN a mis en évidence une diversité de protons dans différents environnements : eau zéolithique, liaisons faibles, groupements OH.

Les analyses par DRX et FTIR ont montré que les géopolymères présentent une structure amorphe, quel que soit le rapport K_2O/SiO_2 . L'ajout des phosphates de calcium n'a pas modifié la structure polymérique : le géopolymère a un rôle de matrice où sont inclus les phosphates de calcium.

L'étude RMN a mis en évidence les mêmes groupements Si et Al pour les composites et les géopolymères purs, confirmant l'observation que les phosphates de calcium jouent exclusivement un rôle de charge.

Les valeurs de pH des composites sont très voisines de celles mesurées pour les géopolymères purs. Tous les composites sont basiques. Les spectres RMN MAS du proton mettent en évidence les mêmes groupements que les géopolymères purs.

Les morphologies des géopolymères purs et de leurs composites sont semblables : surfaces lisses avec des pores fermés. La majeure différence observée pour les composites provient des phosphates qui sont observables à fort grossissement sous la forme d'inclusions de tailles inférieures à la centaine de microns.

III Caractérisation physico-chimique des géopolymères et composites géopolymères/ phosphates de calcium après traitement thermique.

III.1 Détermination des conditions de traitement thermique

III.1.1 Choix des températures des traitements thermiques

Les composites géopolymères/ phosphates de calcium ont pour objectif une utilisation comme biomatériau et doivent présenter des propriétés les plus voisines possible de celles du milieu hôte. Nous avons observé dans le chapitre 2 que l'ensemble des composites étudiés présente des valeurs de pH supérieures à 10 après la synthèse.

Des travaux précédents [6] ont mis en évidence la diminution des valeurs de pH à des valeurs voisines de 7 pour des géopolymères de type PSS (Si/ Al = 2) associés à des phosphates de calcium et traités à 750°C. A cette température, il y a fusion partielle de la matrice géopolymère et apparition de nouvelles phases cristallines.

Nous avons réalisé une analyse thermogravimétrique afin d'étudier la perte en eau des matériaux en fonction de la température. Cette étude a permis d'affiner la recherche des températures de paliers de traitements thermiques.

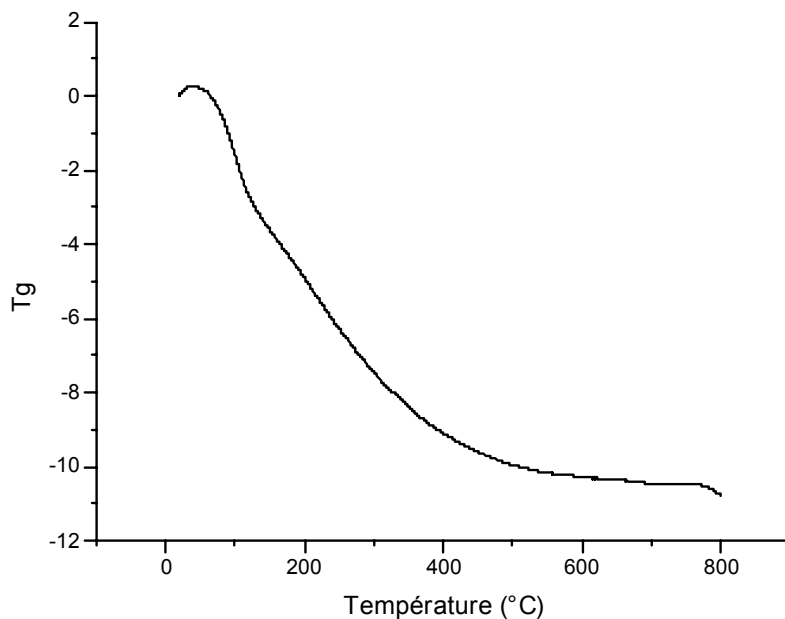


Figure 2.31 Analyse thermogravimétrique pour le géopolymère G80 entre 15 et 800°C

Les échantillons ont été pesés puis placés dans des nacelles en platine sous flux d'azote. Nous nous sommes intéressés à un intervalle de température compris entre la température ambiante et 800°C afin d'éviter la zone de vitrification des échantillons. La vitesse de montée en température a été choisie de 5°C par minute. Les mesures ont été effectuées sur une thermobalance SETARAM LABSYS TG-DSC.

La figure 2.31 représente l'évolution de la perte de masse liée à un départ d'eau en fonction de la température. Elle met en évidence différentes zones :

- De 25°C à 110°C, le géopolymère perd une première partie de son eau. Cette région ne sera pas étudiée plus en détail car il n'y a pas d'augmentation du pourcentage de porosité.
- De 110°C à 350°C environ, le matériau subi une nouvelle perte d'eau. Dans cette zone, nous observons l'expansion des matériaux.
- A partir de 350°C, le géopolymère subi de nouvelles modifications.

Des essais préliminaires ont mis en évidence que les géopolymères caractérisés par un rapport Si/ Al = 21 s'expansent sous l'action de la température pour donner des solides dont la porosité peut atteindre 90%. Cette expansion s'effectue à 250°C, elle diminue lors de l'ajout des phosphates de calcium HA et TCP. Un ajout supérieur ou égal à 20% en masse suffit pour perdre la fluidité du géopolymère.

La porosité de ces matériaux présente des avantages lors de leur utilisation en tant que biomatériaux. Pour cette étude, le choix du traitement thermique a été influencé par trois critères :

- Le pH des composites géopolymères/ phosphates de calcium
- Le maintien de la structure (matrice géopolymère amorphe enrichie en phosphates de calcium)
- La favorisation du pourcentage de porosité

Nous avons choisi deux températures de traitements thermiques qui permettent de conserver une matrice géopolymère de structure amorphe (identique à la structure des matériaux avant traitement thermique).

La première température de traitement a été fixée à 250°C, dans la seconde zone de la figure 2.31. Cette température permet l'expansion des matériaux.

La seconde température de traitement est 500°C. Cette température est assez basse pour permettre l'expansion des géopolymères sans cristallisation de la matrice.

Les deux traitements thermiques présentés dans ce travail (notés TTH 250 et TTH 500) sont décrits dans le tableau 2-13.

Nom	T° Départ	Rampe 1	Palier 1	Rampe 2	Palier 2	Rampe 3
TTH 250	25°C	2°C min ⁻¹	250°C 180 min	Libre Four fermé	–	–
TTH 500	25°C	2°C min ⁻¹	250°C 120 min	2°C min ⁻¹	500°C 180 min	Libre Four fermé

Tableau 2-13 Descriptif des traitements thermiques (TTH)

III.1.2 pH des géopolymères purs et des composites après les traitements thermiques à 250°C (TTH 250) et à 500°C (TTH 500)

a - Etude du pH des échantillons traités à 250°C

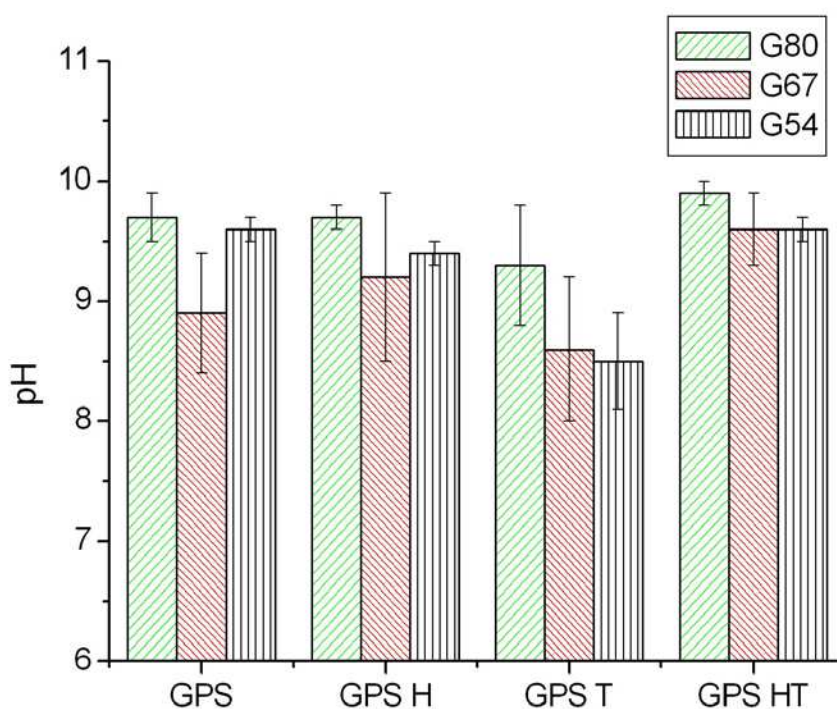


Figure 2.32 Mesure de pH des géopolymères purs et composites après traitement thermique à 250°C

Les valeurs de pH des géopolymères purs et des composites ont diminué mais les matériaux présentent toujours un fort caractère alcalin. Pour les géopolymères purs, l'influence du rapport K_2O/SiO_2 est faible (figure 2.32), exception faite du géopolymère G67 qui présente des barres d'erreurs importantes.

L'ajout des phosphates de calcium ne semble pas influencer la basicité, comme nous l'avions déjà observé pour les matériaux n'ayant pas subi de traitement thermique.

Le rapport K_2O/SiO_2 est un paramètre plus influent que l'ajout de phosphates de calcium sur les valeurs de pH.

b - Etude du pH des échantillons traités à 500°C

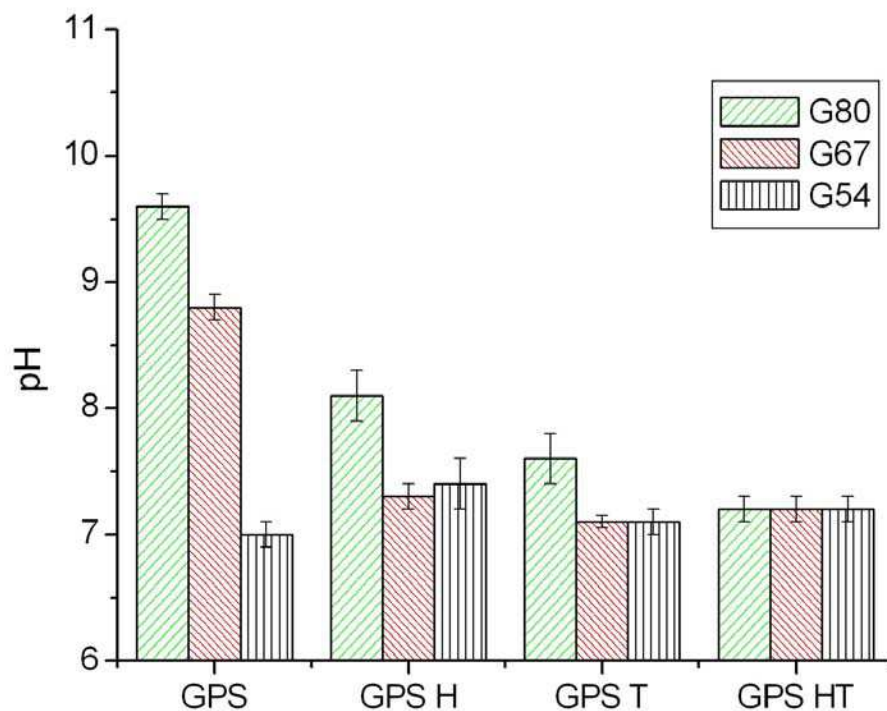


Figure 2.33 Mesure de pH des géopolymères purs et composites après traitement thermique à 500°C

Après le traitement thermique à 500°C (figure 2.33), les géopolymères purs G80, G67 et G54 présentent un degré de basicité qui diminue lorsque le rapport K_2O/SiO_2 diminue. Le géopolymère G54 présente un pH de $7(\pm 0,1)$.

Les composites géopolymères/ phosphates de calcium (H, T et HT) présentent les valeurs de pH les plus basses observées lors de l'étude. Quel que soit le phosphate ajouté au géopolymère, la diminution du rapport K_2O/SiO_2 s'accompagne de la diminution de la basicité.

Les valeurs de pH les plus élevées sont observées pour les composites à matrice G80, quelles que soient la température de traitement et la valeur du rapport K_2O/SiO_2 . Pour les composites à matrice G54 et G67 avec HA ou/ et TCP (H, T et HT), les valeurs de pH sont comprises entre 7,06 ($\pm 0,05$) et 7,39 ($\pm 0,06$).

III.2 Structure des géopolymères purs et des composites géopolymères/ phosphates de calcium après traitement thermique.

III.2.1 Caractérisation par DRX sur poudre des géopolymères et des composites

Les échantillons seront nommés GX PC Y

X correspond au géopolymère G80 caractérisé par $K_2O/SiO_2 = 0.8$

G67 caractérisé par $K_2O/SiO_2 = 0.67$

G54 caractérisé par $K_2O/SiO_2 = 0.54$

PC correspond au phosphate de calcium

H pour l'hydroxyapatite

T pour le TCP

HT pour le mélange HA/TCP

Y correspond à la température de traitement thermique 250 pour le TTH 250

500 pour le TTH 500

a - DRX des géopolymères purs

Les traitements thermiques à 250°C ou 500°C n'induisent pas de modification de la structure des géopolymères purs. Quel que soit le rapport K_2O/SiO_2 les spectres de diffraction des échantillons présentent un halo compris entre 15 et 35 °(2 θ) (figures 2.34 et 2.35).

Ce halo qui était déjà visible pour les géopolymères avant traitement thermique indique l'action des températures n'a pas modifié le caractère amorphe des matériaux. Les raies de diffraction de faibles intensités observées pour les différents matériaux ont pu être associées à la silice.

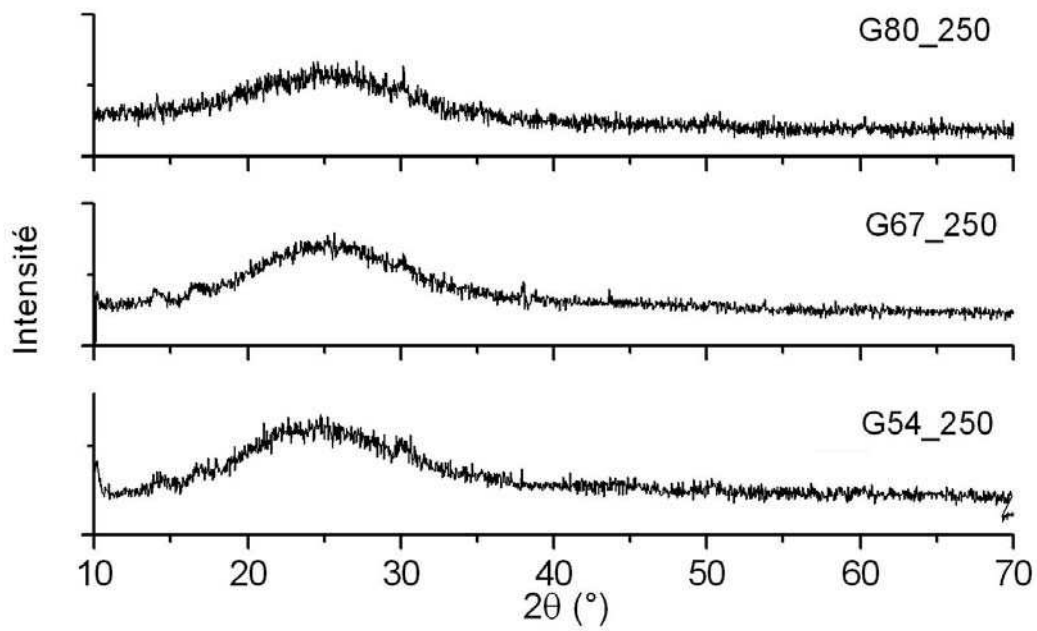


Figure 2.34 DRX des géopolymères purs après un traitement thermique à 250°C. Présentation pour les différents rapports K_2O/SiO_2

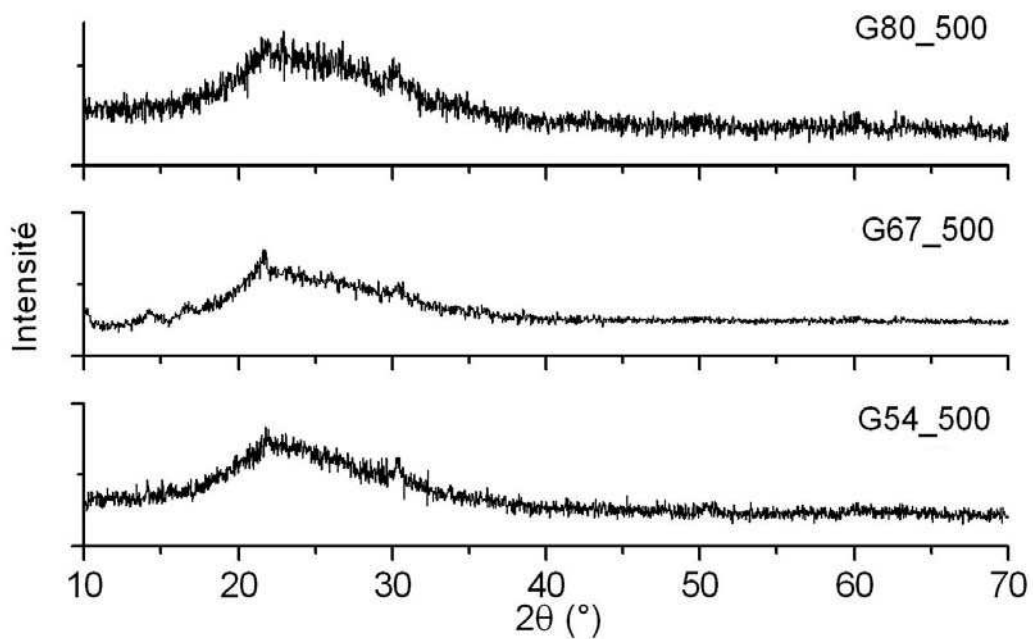


Figure 2.35 DRX des géopolymères purs après un traitement thermique à 500°C. Présentation pour les différents rapports K_2O/SiO_2

b - DRX des Composites

Après le traitement thermique à 250°C ou 500°C, les spectres de diffraction des différents composites sont très semblables (figures 2.36 à 2.38). Tous les échantillons présentent un halo de diffraction entre 15 et 35° (2θ) caractéristique de la matrice géopolymère où viennent se superposer les raies de diffraction propres au phosphate de calcium ajouté. Il n'y a pas de modification de la structure en fonction du rapport K_2O/SiO_2 , ni en fonction du traitement thermique. Les diagrammes DRX des composites traités à 250°C ou à 500°C sont similaires. Les diffractogrammes des composites traités à 500°C sont présentés ici, les diagrammes de diffraction des composites traités à 250°C sont rassemblés dans l'annexe 4.

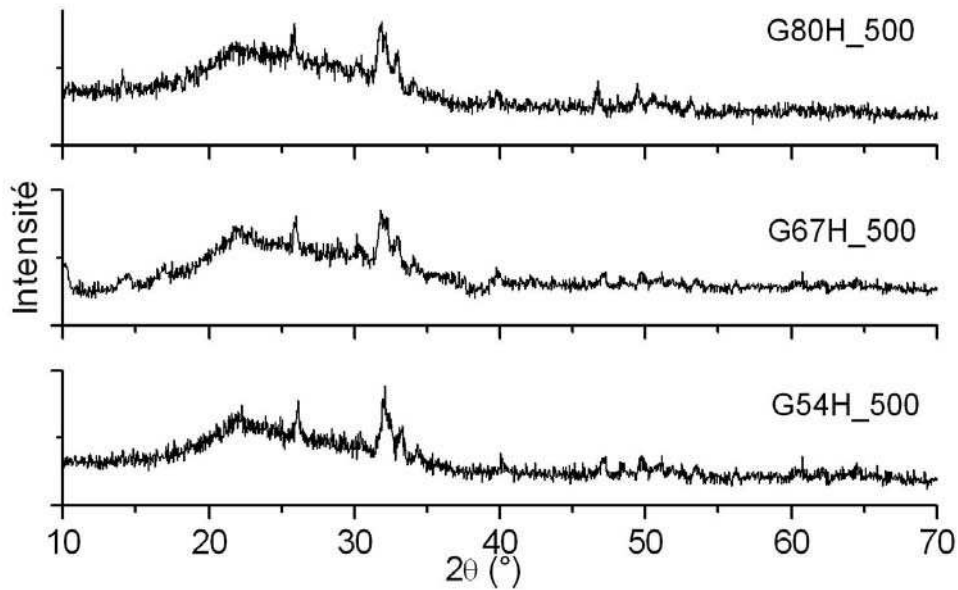


Figure 2.36 DRX des composites géopolymères/ HA après un traitement thermique à 500°C

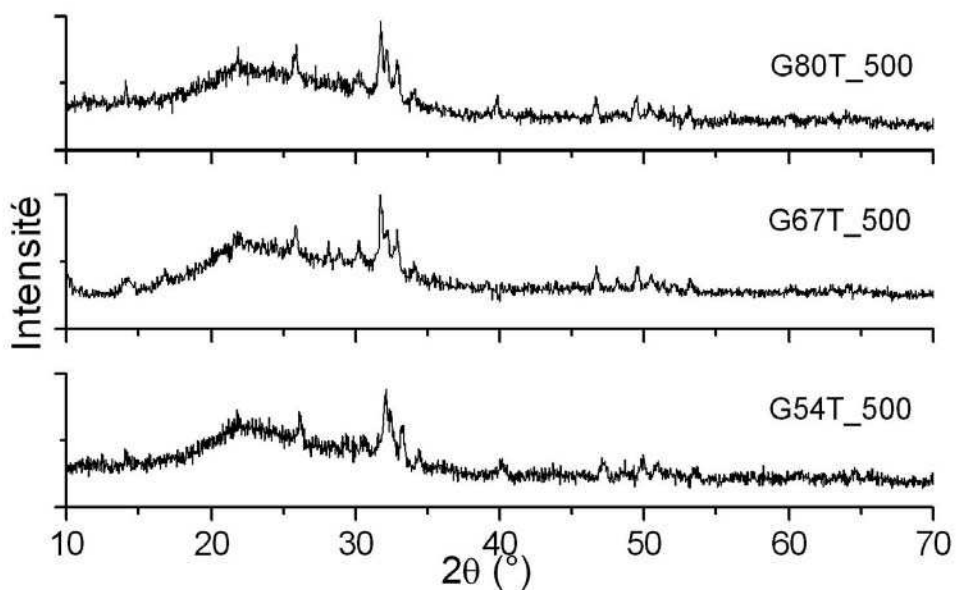


Figure 2.37 DRX des composites géopolymères/ TCP après un traitement thermique à 500°C

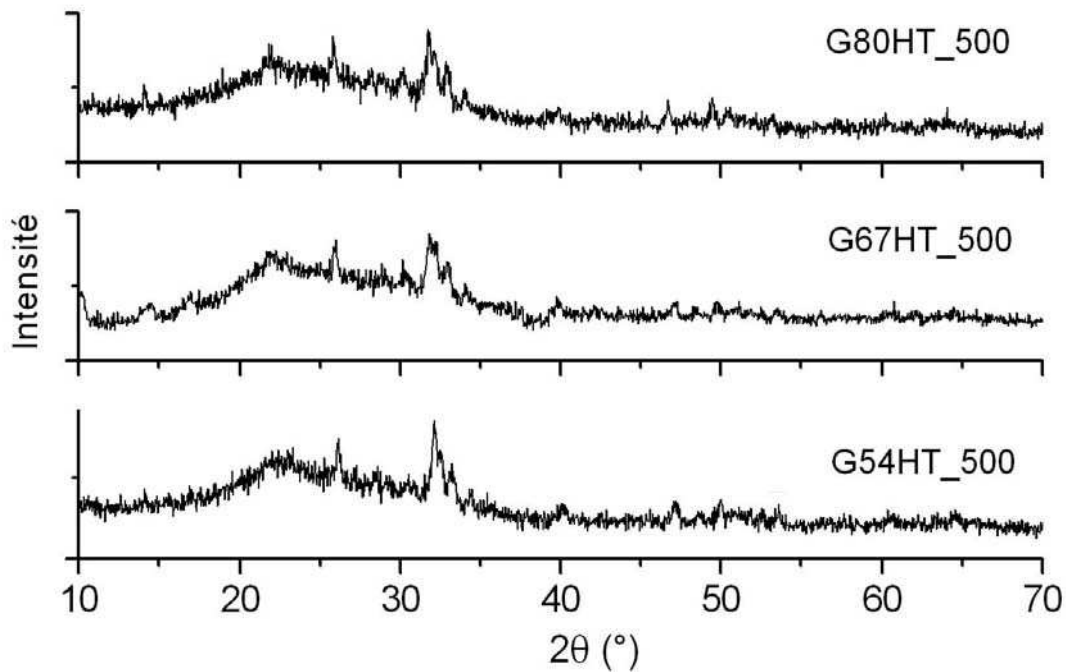


Figure 2.38 DRX des composites géopolymères/ HA TCP après un traitement thermique à 500°C

III.2.2 Caractérisation de la structure des géopolymères et des composites en fonction du traitement thermique : étude par FTIR.

a - Etude des géopolymères purs

Les spectres FTIR (analyse par transformée de Fourier Infra-Rouge) des géopolymères purs traités à 250°C ou 500°C sont présentés sur les figures 2.39 et 2.40. On observe les mêmes bandes d'absorption que les échantillons avant traitement thermique.

Les bandes d'absorption situées vers 1040 cm^{-1} et 785 cm^{-1} sont attribuées respectivement aux vibrations asymétriques et symétriques (stretching mode) Si-O-(Si,Al) des tétraèdres AlO_4 et SiO_4 .

La bande d'absorption observée pour chacun des géopolymères vers 470 cm^{-1} est attribuée aux vibrations (bending mode) de Si-O-Si et Si-O-Al.

Pour chaque température et quel que soit le phosphate de calcium ajouté, le rapport $\text{K}_2\text{O}/\text{SiO}_2$ n'influence pas la position ni l'intensité des bandes d'absorption. L'augmentation de la température de traitement thermique s'accompagne de la diminution des intensités des bandes vers 3500 cm^{-1} et 1600 cm^{-1} (groupements OH).

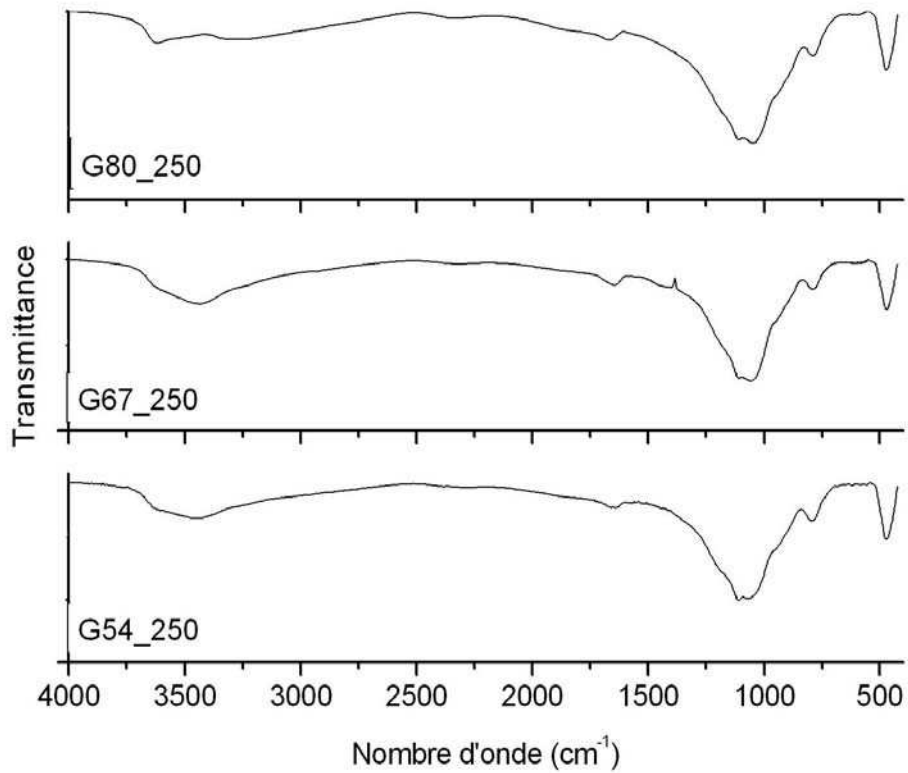


Figure 2.39 FTIR des géopolymères purs après un traitement thermique à 250°C. Présentation pour les différents rapports K_2O/SiO_2

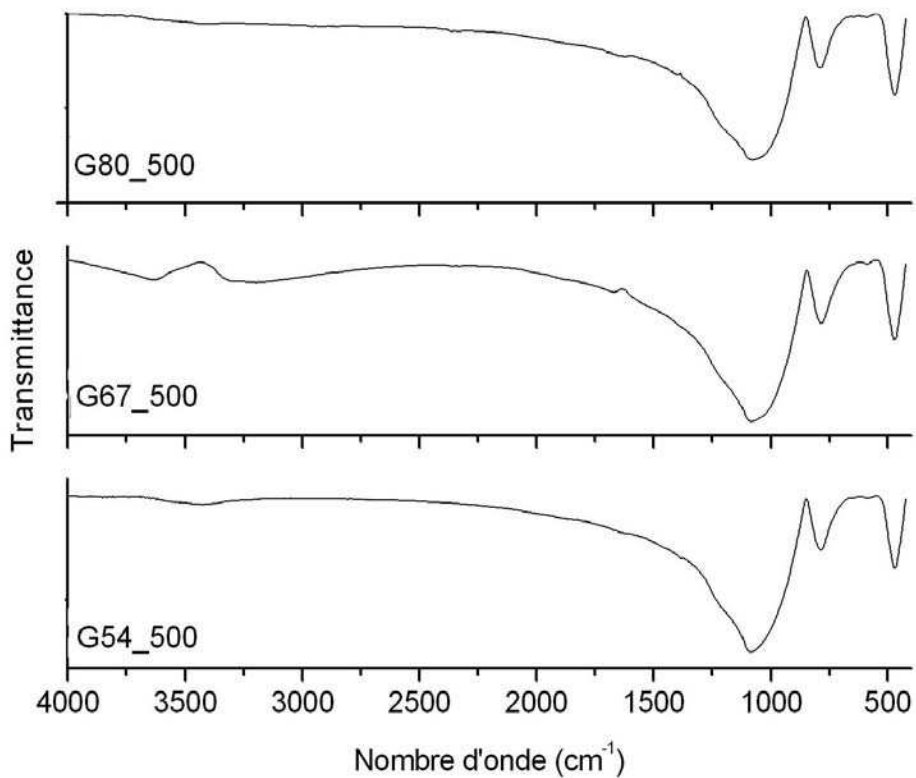


Figure 2.40 FTIR des géopolymères purs après un traitement thermique à 500°C. Présentation pour les différents rapports K_2O/SiO_2

b - Etudes des composites en fonction du traitement thermique

Comme pour l'étude FTIR des géopolymères purs après traitements thermiques, les spectres des composites présentent peu de bandes d'absorption (figures 3.41 à 2.43). Le type de phosphate de calcium ne modifie pas la structure, les remarques suivantes sur les spectres s'appliquent à tous les composites.

L'influence du traitement thermique est négligeable, les composites traités à 250°C ou 500°C présentent les mêmes bandes que les échantillons avant traitement thermique.

- Les bandes d'absorption à 1040 cm^{-1} , 800 cm^{-1} et 470 cm^{-1} sont caractéristiques de la structure de l'aluminosilicate.
- Les bandes d'absorption à 1080 cm^{-1} , 603 et 566 cm^{-1} apparaissent avec l'introduction des phosphates de calcium.

L'influence du traitement thermique se remarque sur l'intensité des bandes caractéristiques des groupements OH (3500 cm^{-1} et 1600 cm^{-1}), les intensités diminuent sensiblement lors de l'augmentation de la température de traitement. Les spectres FTIR des composites traités à 250°C ou à 500°C sont similaires. Les spectres des composites traités à 500°C sont présentés ici, les spectres des composites traités à 250°C sont rassemblés dans l'annexe 5.

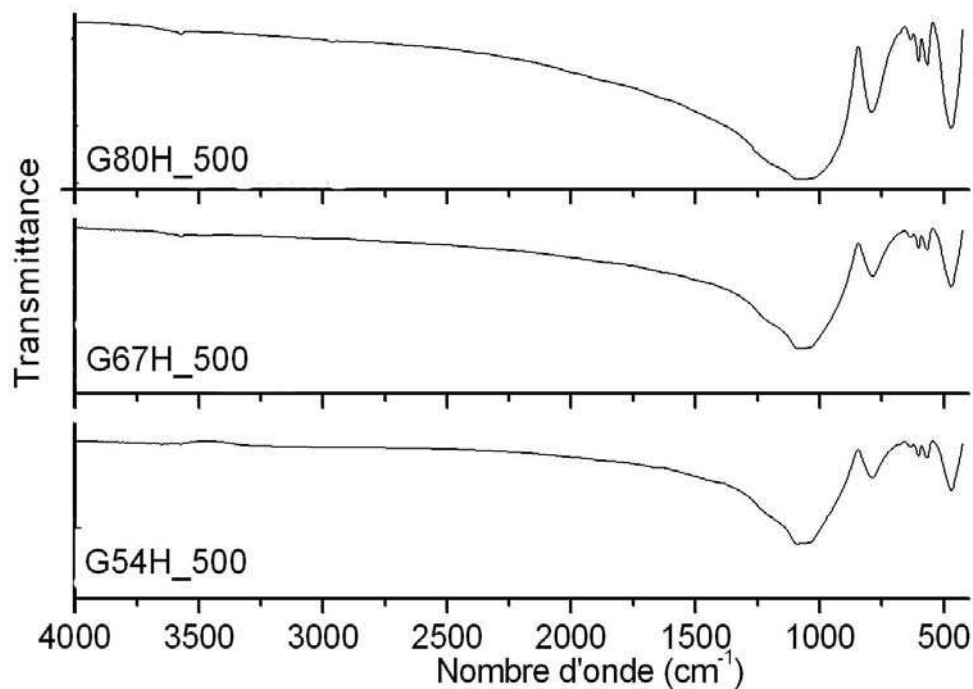


Figure 2.41 FTIR des composites géopolymères/ HA après un traitement thermique à 500°C

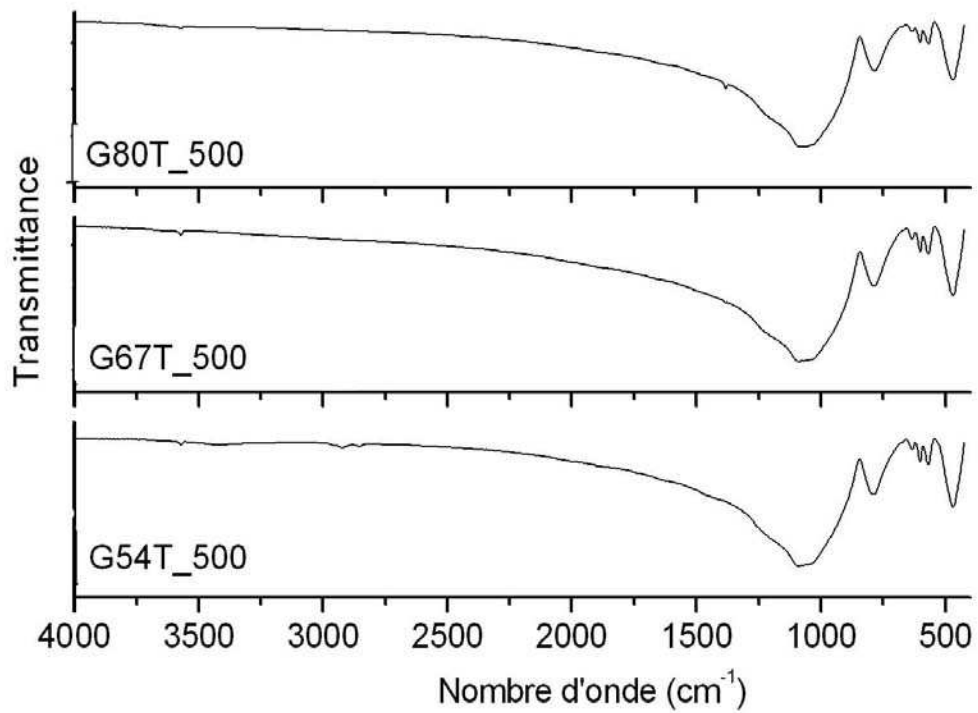


Figure 2.42 FTIR des composites géopolymères/ TCP après un traitement thermique à 500°C

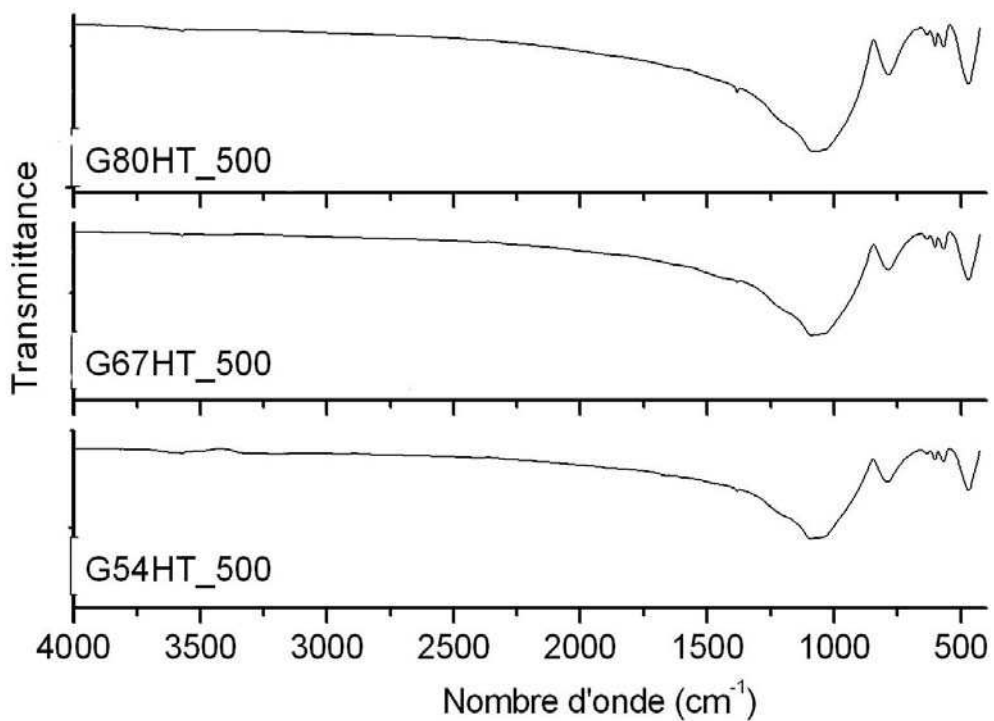


Figure 2.43 FTIR des composites géopolymères/ HA TCP après un traitement thermique à 500°C

III.2.3 Evolution de la structure en fonction du traitement thermique, étude par RMN MAS

a - Géopolymères purs

RMN MAS du silicium, étude des géopolymères purs après traitement thermique

L'augmentation de la température provoque une modification des pourcentages des différentes contributions : le pourcentage d'unités Q^{4-4} augmente quel que soit la valeur du rapport K_2O/SiO_2 (figures 2.44 et 2.45). Cette augmentation s'accompagne d'une nette diminution des unités Q^3 essentiellement lors du passage de $250^\circ C$ à $500^\circ C$ pour le géopolymère G54 ($Q^3(G54) = 37\%$, $Q^3(G54_{250}) = 34,7\%$, $Q^3(G54_{500}) = 6,9\%$) (tableaux 2-14 et 2-15). Cette diminution est visible pour l'aluminosilicate G80 bien qu'à $250^\circ C$, la proportion de Q^3 passe par un maximum. La proportion des chaînes de Si (Q^2) augmente pour les échantillons traités à $500^\circ C$, jusqu'à dépasser le pourcentage des groupements Q^3 (tableau 2-15).

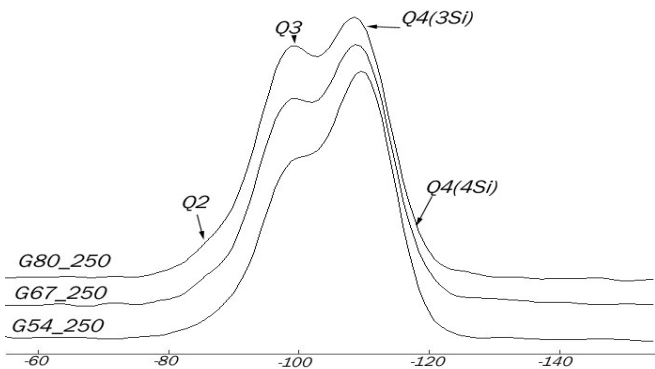


Figure 2.44 RMN MAS Si des géopolymères purs après traitement thermique à $250^\circ C$

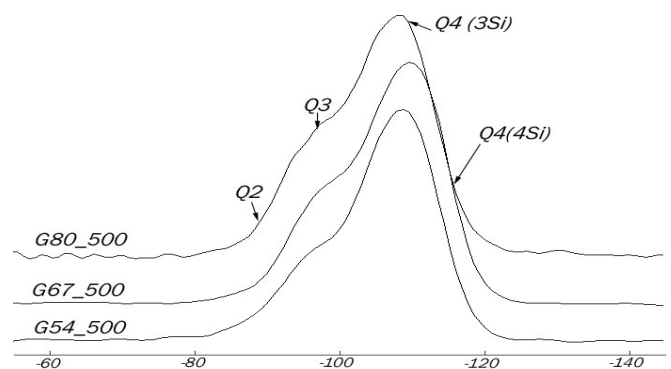


Figure 2.45 RMN MAS Si des géopolymères purs après traitement thermique à $500^\circ C$

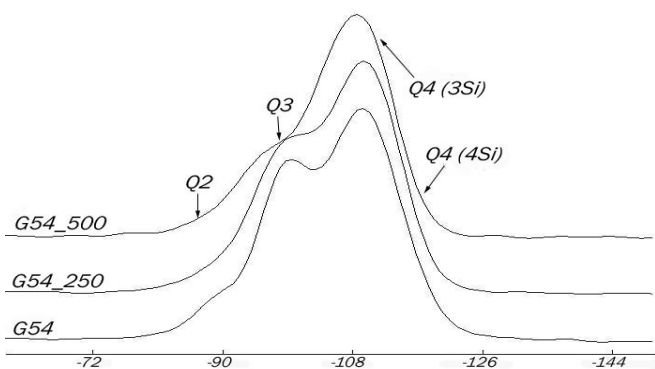


Figure 2.46 RMN MAS Si des géopolymères purs G54 en fonction du TTH

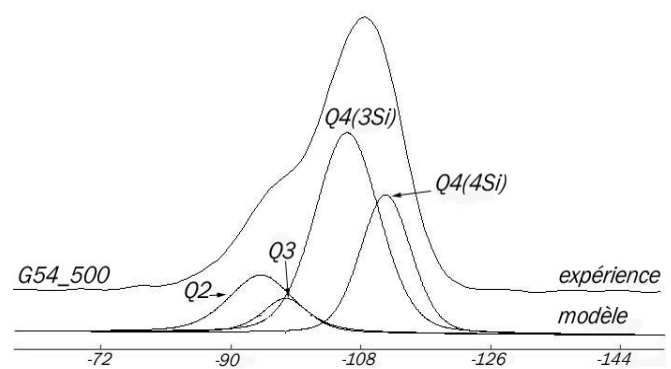


Figure 2.47 RMN MAS Si du géopolymère pur G54_500 Après traitement thermique à $500^\circ C$

La figure 2.47 représente le spectre obtenu pour le géopolymère pur G54 après un traitement thermique à 500°C (G54_500). Le modèle (présenté sur la même figure) se présente comme la somme de quatre contributions (Q², Q³, Q⁴⁻³ et Q⁴⁻⁴) déjà observées pour le matériau avant traitement thermique (figure 2.46).

A 250°C, lorsque le rapport K₂O/ SiO₂ diminue, la proportion de (Q²+Q³)/ Q⁴ diminue (tableau 2-14), le nombre de silicium Q⁴⁻⁴ augmente (figure 2.44) au détriment des siliciums Q³. Pour les géopolymères traités à 500°C (figure 2.45), la diminution du rapport K₂O/ SiO₂ s'accompagne d'une augmentation du rapport (Q²+Q³)/ Q⁴. Cette diminution du rapport (tableau 2-15), n'est pas linéaire et s'opère au détriment des siliciums Q⁴⁻³.

Les positions des différents déplacements chimiques pour les unités Q³, Q⁴⁻⁴ et Q⁴⁻³ sont quasiment identiques entre les deux températures de traitements thermiques mais la position de l'unité Q² se déplace vers les hauts champs (δ diminue), quel que soit le rapport K₂O/ SiO₂. En comparant avec les géopolymères n'ayant pas subi de traitement thermique, l'unité Q⁴⁻³ présente le plus grand déplacement de shift ($\delta(Q^{4-3} \text{ G80}) = -114,9$ ppm et $\delta(Q^{4-3} \text{ G80}_{250}) = -110,3$ ppm).

Echantillon	Unités	$\delta(^{29}\text{Si})$ ppm	Population (%)	(Q ² +Q ³)/ Q ⁴
G54_250	Q ²	-88,9	1,9	0,58
	Q ³	-98,1	34,7	
	Q ⁴ (3Si)	-107,3	36,4	
	Q ⁴ (4Si)	-112	27	
G67_250	Q ²	-86,2	1	0,77
	Q ³	-97,6	42,4	
	Q ⁴ (3Si)	-108	33,6	
	Q ⁴ (4Si)	-111,1	23	
G80_250	Q ²	-85,1	2,2	0,95
	Q ³	-96,4	46,5	
	Q ⁴ (3Si)	-106,7	35,9	
	Q ⁴ (4Si)	-110,3	15,4	

Tableau 2-14 Résultats de la déconvolution des spectres RMN MAS Si des géopolymères G54, G67 et G80 après traitement thermique à 250°C

Echantillon	Unités	$\delta(^{29}\text{Si})$ ppm	Population (%)	$(Q^2+Q^3)/Q^4$
G54_500	Q ²	-94,2	15,5	0,29
	Q ³	-97,6	6,9	
	Q ⁴ (3Si)	-106,1	50,1	
	Q ⁴ (4Si)	-111,5	27,5	
G67_500	Q ²	-95,4	17,2	0,35
	Q ³	-99,7	8,9	
	Q ⁴ (3Si)	-106,7	44,4	
	Q ⁴ (4Si)	112,5	29,5	
G80_500	Q ²	-93,6	14	0,22
	Q ³	-97,6	4,4	
	Q ⁴ (3Si)	-105,4	60,7	
	Q ⁴ (4Si)	-110,3	20,9	

Tableau 2-15 Résultats de la déconvolution des spectres RMN MAS Si des géopolymères G54, G67 et G80 après traitement thermique à 500°C

RMN MAS de l'aluminium, étude des géopolymères purs après traitement thermique (TTH)

Quels que soient la valeur du rapport $\text{K}_2\text{O}/\text{SiO}_2$ et la température de traitement thermique (figure 2.50), l'ordre d'abondance des trois groupements est analogue à celui observé pour les géopolymères avant traitement thermique (exception faite du G67_250 où les pourcentages en AlO_6 et AlO_5 sont égaux) (tableaux 2-16, 2-17).

La proportion d' AlO_4 augmente avec la température de traitement thermique :

$$\text{AlO}_4 (\text{G67}) = 60,3 \%$$

$$\text{AlO}_4 (\text{G67}_{250}) = 65,2 \%$$

$$\text{AlO}_4 (\text{G67}_{500}) = 90,2 \%$$

pendant que la quantité d' AlO_6 des matériaux diminue

$$\text{AlO}_6 (\text{G80}) = 23,9 \%$$

$$\text{AlO}_6 (\text{G80}_{250}) = 14,1 \%$$

$$\text{AlO}_6 (\text{G80}_{500}) = 10,9 \%$$

La diminution du rapport $\text{K}_2\text{O}/\text{SiO}_2$ entraîne une diminution globale de la quantité de AlO_4 à 250°C (figure 2.48) :

$$\text{AlO}_4 (\text{G80}_{250}) = 74,3 \%$$

AlO_4 (G67_250) = 65,2 %

AlO_4 (G54_250) = 72,2 %

et une augmentation de celle ci à 500°C (figure 2.49) :

AlO_4 (G80_500) = 81,4 %

AlO_4 (G67_500) = 90,2%

AlO_4 (G54_500) = 89,8%

La figure 2.51 représente le spectre obtenu pour le géopolymère pur G54 après un traitement thermique à 500°C (G54_500). Le modèle théorique présenté sur la même figure se présente comme la somme de 3 contributions (AlO_4 , AlO_5 et AlO_6) déjà observées pour le matériau avant traitement thermique.

D'une manière générale, les positions des déplacements chimiques diminuent vers les champs forts (faibles valeurs de δ) pour chaque température, lorsque le rapport $\text{K}_2\text{O}/\text{SiO}_2$ diminue.

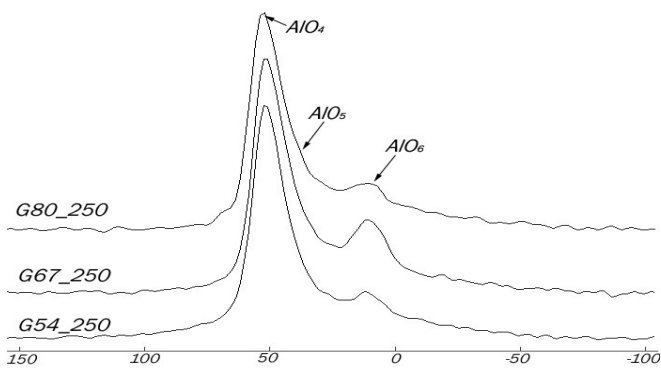


Figure 2.48 RMN MAS Al des géopolymères purs après traitement thermique à 250°C

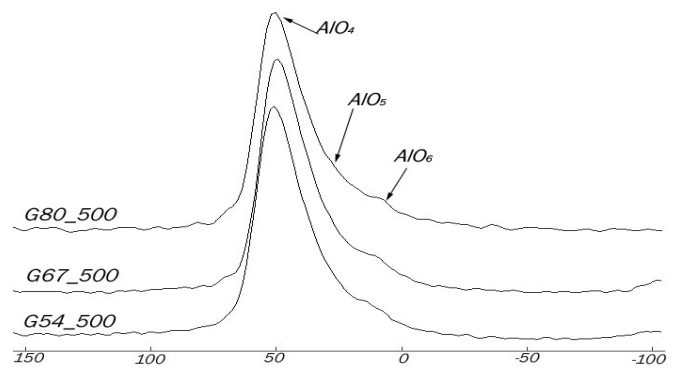


Figure 2.49 RMN MAS Al des géopolymères purs après traitement thermique à 500°C

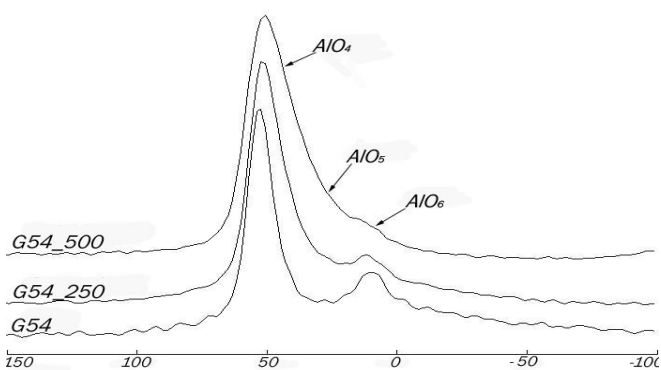


Figure 2.50 RMN MAS Al des géopolymères purs G54 en fonction du traitement thermique

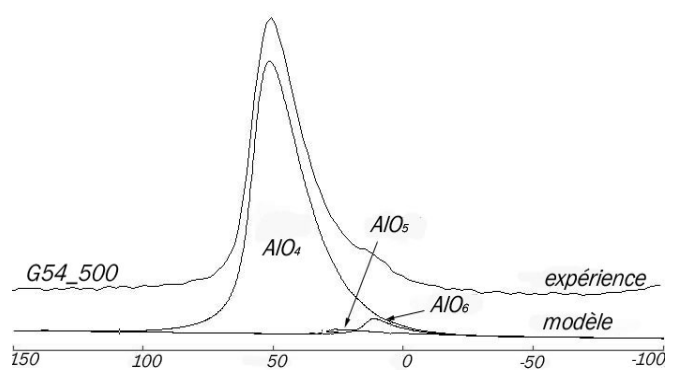


Figure 2.51 RMN MAS Al du géopolymère pur G54 après traitement thermique à 500°C

Echantillon	Unités	$\delta(^{27}\text{Al})$ ppm	Population (%)
G54_250	(Al VI) AlO_6	15,83	14,5
	(Al V) AlO_5	34,37	13,3
	(Al IV) AlO_4	56,92	72,2
G67_250	(Al VI) AlO_6	16,48	17,1
	(Al V) AlO_5	35,96	17,7
	(Al IV) AlO_4	56,91	65,2
G80_250	(Al VI) AlO_6	16,72	14,1
	(Al V) AlO_5	32,60	11,6
	(Al IV) AlO_4	57,15	74,3

Tableau 2-16 Résultats de la déconvolution des spectres RMN MAS Al des géopolymères G54, G67 et G80 après traitement thermique à 250°C

Echantillon	Unités	$\delta(^{27}\text{Al})$ ppm	Population (%)
G54_500	(Al VI) AlO_6	15,7	4,1
	(Al V) AlO_5	30,1	6,1
	(Al IV) AlO_4	58,6	89,8
G67_500	(Al VI) AlO_6	18,2	5,4
	(Al V) AlO_5	33	4,4
	(Al IV) AlO_4	56,6	90,2
G80_500	(Al VI) AlO_6	17,4	10,9
	(Al V) AlO_5	35,6	7,7
	(Al IV) AlO_4	58,5	81,4

Tableau 2-17 Résultats de la déconvolution des spectres RMN MAS Al des géopolymères G54, G67 et G80 après traitement thermique à 500°C

RMN MAS du proton, étude des géopolymères purs après traitement thermique (TTH)

Les spectres des géopolymères traités à 250°C et 500°C présentent 6 composantes (tableau 2-18) alors que les spectres des échantillons avant traitement n'étaient constitués que de 5 contributions. Par comparaison avec les géopolymères non chauffés, l'ordre d'abondance des différentes unités a changé. Les groupements qui étaient majoritaires pour les échantillons avant TTH (vers 4 à 7 ppm) ont complètement disparu (figure 2.54).

L'unité majoritaire se situe à un déplacement chimique d'environ 11 ppm.

La figure 2.54 présente trois spectres obtenus pour le géopolymère G54 en fonction du traitement thermique. La quantité de protons diminue fortement en fonction du traitement thermique. Plus la température de celui-ci est élevée et plus l'intensité du signal est faible. Ce phénomène s'observe quel que soit le rapport K_2O/SiO_2 . La diminution de ce rapport entraîne comme pour les géopolymères avant traitement thermique une diminution de la quantité de protons dans l'échantillon. Cette diminution est visible à 250°C et à 500°C (figures 2.52 et 2.53).

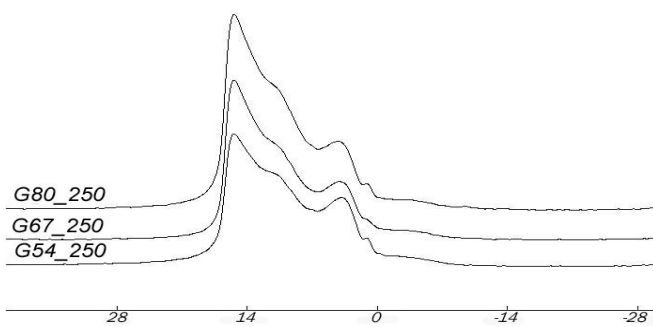


Figure 2.52 RMN MAS H des géopolymères purs après traitement thermique à 250°C

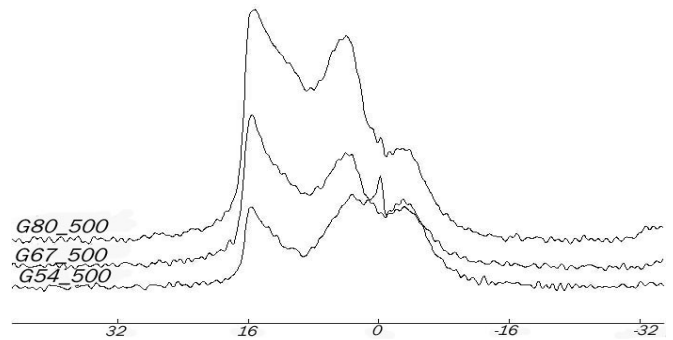


Figure 2.53 RMN MAS H des géopolymères purs après traitement thermique à 500°C

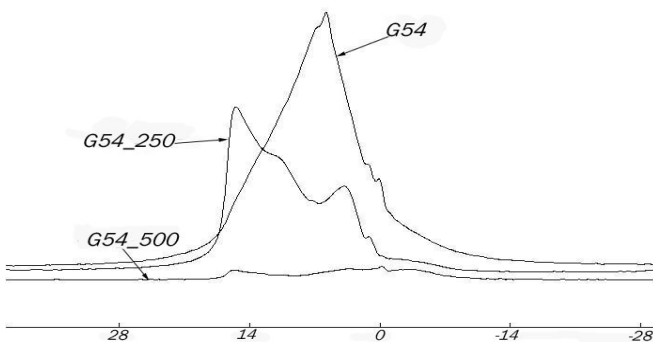


Figure 2.54 RMN MAS H du géopolymère pur G54 en fonction du traitement thermique

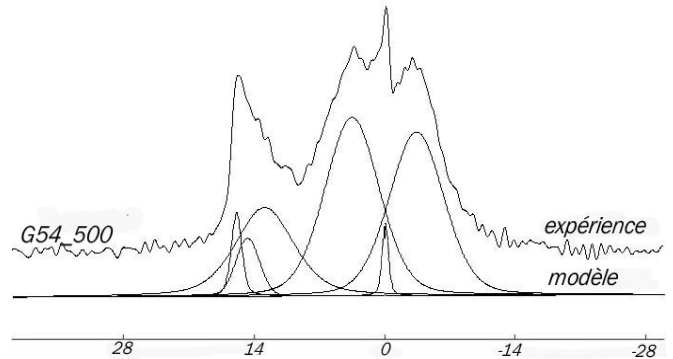


Figure 2.55 RMN MAS H du géopolymère pur G54_500 après traitement thermique à 500°C

Echantillon	$\delta(^1\text{H})$ ppm	Population (%)	Echantillon	$\delta(^1\text{H})$ ppm	Population (%)
G54_250	-3	2,5	G54_500	-3,4	33,3
	0,9	0,3		-0,1	1,9
	3,9	18,6		3,5	36
	11,3	59,6		12,9	20,4
	14,6	11,5		14,7	4,8
	15,8	7,5		15,9	3,6
G67_250	-3,1	3,2	G67_500	-3,2	19,7
	0,7	0,3		0,6	0,1
	4,1	16,7		3,8	15,3
	11,2	52,2		9,6	46,2
	14,5	17,2		14	10,5
	15,8	10,4		15,7	8,2
G80_250	-3,3	2,6	G80_500	-3	17,6
	0,9	0,3		0,6	0,1
	4,2	14,5		4,2	29
	11,3	57,2		11,6	42
	14,5	15,2		14,6	6,5
	15,8	10,2		15,88	4,8

Tableau 2-18 Résultats de la déconvolution des spectres RMN MAS H des géopolymères G54, G67 et G80 après traitement thermique à 250°C et à 500°C

b - Etude par RMN Mas du composite Géopolymère/ HA-TCP en fonction du TTH

RMN MAS du silicium, étude des composites après TTH

Après traitement thermique à 250°C (figure 2.56) l'ordre d'abondance des différentes contributions est identique à celui des composites non traités (Q^4 (Q^{4-4} et Q^{4-3}) > Q^3 > Q^2) (tableau 2-19) pour le composite G54HT. L'augmentation du rapport K_2O/SiO_2 est lié à une augmentation du nombre de groupements Q^3 qui s'est opéré au détriment des groupements Q^{4-4} et Q^{4-3} .

L'augmentation de la température de traitement à 500°C induit une modification importante de la structure (figure 2.57), avec une inversion de proportions : les groupements Q^3 deviennent minoritaires (tableau 2-20).

Cette modification des proportions s'accompagne d'une modification importante de la valeur de δ (ppm) des groupements : Q² (δ (G80HT)= -87,2 ppm, δ (G80HT_250)= -84,7 ppm et δ (G80HT_500)= -94,7 ppm).

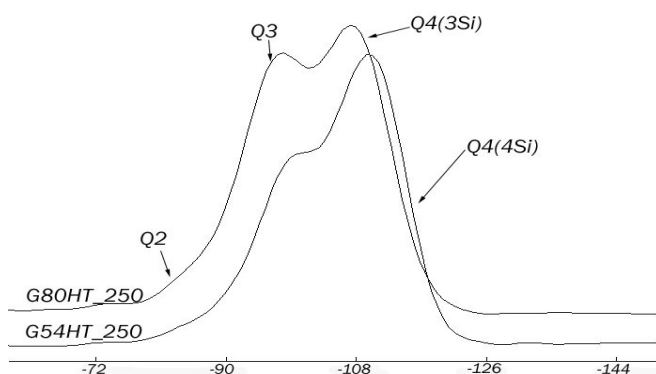


Figure 2.56 RMN MAS Si des composites G80HT_250 et G54HT_250

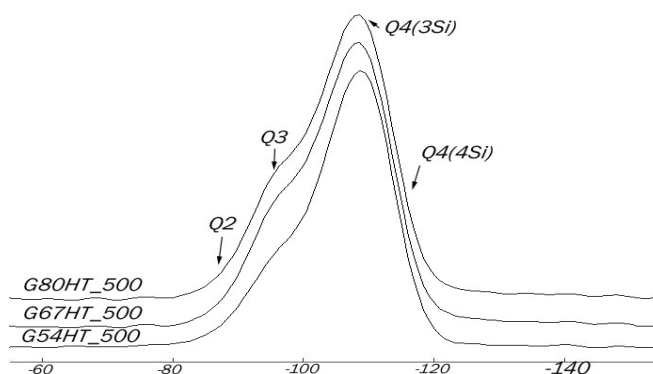


Figure 2.57 RMN MAS Si des composites GPS après traitement thermique à 500°C

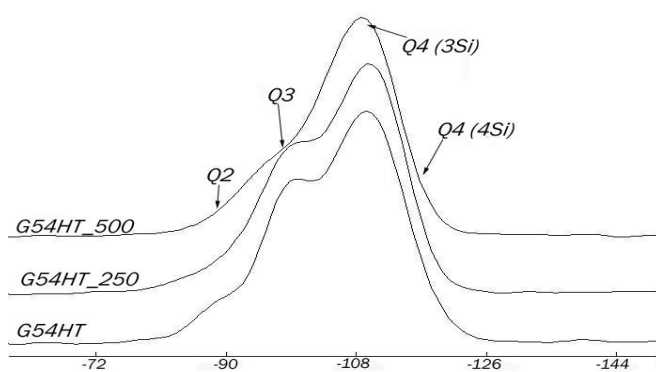


Figure 2.58 RMN MAS Si du composite G54HT en fonction du traitement thermique.

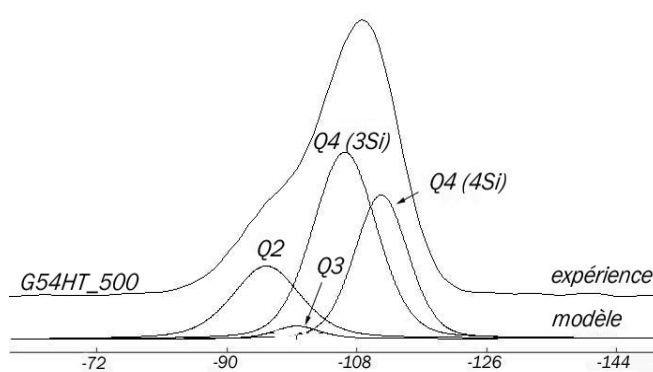


Figure 2.59 RMN MAS Si du composite G54HT après traitement thermique à 500°C

Echantillon	Unités	$\delta(^{29}\text{Si})$ ppm	Population (%)	$(\text{Q}^2+\text{Q}^3)/\text{Q}^4$
G54HT_250	Q ²	-93	9,8	0,60
	Q ³	-98,7	27,7	
	Q ⁴ (3Si)	-107,8	40,7	
	Q ⁴ (4Si)	-112,6	21,8	
G80HT_250	Q ²	-84,7	1,9	1,31
	Q ³	-97	54,8	
	Q ⁴ (3Si)	-107,3	33,5	
	Q ⁴ (4Si)	-111,6	9,8	

Tableau 2-19 Résultats de la déconvolution des spectres RMN MAS Si des composites G54HT_250 et G80HT_250 (après traitement thermique à 250°C)

La figure 2.59 présente le spectre MAS Si obtenu pour le composite G54HT_500 (traité à 500°C). Le modèle présenté sur la même figure est la somme de quatre contributions déjà observées pour les géopolymères composites avant traitement thermique.

Après traitement thermique à 250°C (figure 2.58), la diminution du rapport K_2O/SiO_2 favorise l'augmentation des proportions des groupements Q^2 , Q^{4-3} et Q^{4-4} au détriment des unités Q^3 . Cette observation se confirme pour les échantillons traités à 500°C à l'exception des unités Q^{4-3} dont le pourcentage diminue.

Echantillon	Unités	$\delta(^{29}Si)$ ppm	Population (%)	$(Q^2+Q^3)/Q^4$
G54HT_500	Q ²	95,5	20,8	0,30
	Q ³	99,7	2,6	
	Q ⁴ (3Si)	106,3	46,4	
	Q ⁴ (4Si)	111,4	30,2	
G67HT_500	Q ²	95,9	27,7	0,51
	Q ³	101,1	6	
	Q ⁴ (3Si)	106,9	44,4	
	Q ⁴ (4Si)	112	21,9	
G80HT_500	Q ²	94,7	18,6	0,29
	Q ³	98,8	4,2	
	Q ⁴ (3Si)	106,1	51,6	
	Q ⁴ (4Si)	111	25,6	

Tableau 2-20 Résultats de la déconvolution des spectres RMN MAS Si des composites G54HT_500, G67HT_500 et G80HT_500 (après traitement thermique à 500°C)

RMN MAS de l'aluminium, étude des composites après traitement thermique

(TTH)

Quels que soient la valeur du rapport K_2O/SiO_2 et la température de traitement thermique (figures 2.60, 2.61), l'ordre d'abondance des trois groupements est analogue à celui observé pour les géopolymères composites avant traitement thermique (tableau 2-21, 2-22).

Par comparaison avec les composites non traités thermiquement, la proportion d' AlO_4 augmente avec la température de traitement thermique (AlO_4 (G54HT)= 48,9%, AlO_4 (G54HT_250) = 73% et AlO_4 (G54HT_500)= 89,6%) (figure 2.62) pendant que la quantité d' AlO_5 et d' AlO_6 des matériaux diminue (AlO_6 (G80HT)= 27,7%, AlO_6 (G80HT_250) = 3,5% et AlO_6 (G80HT_500) = 3,5%).

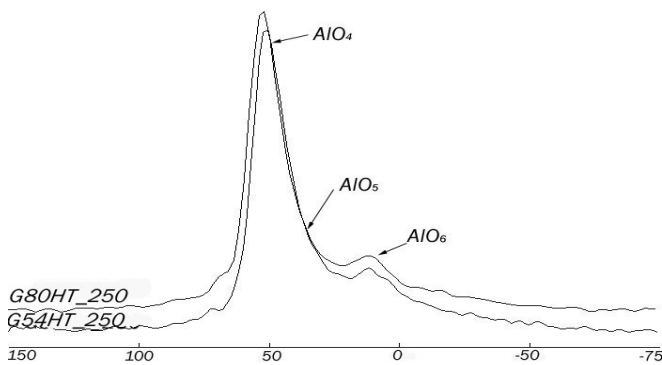


Figure 2.60 RMN MAS Al des composites G80HT_250 et G54HT_250

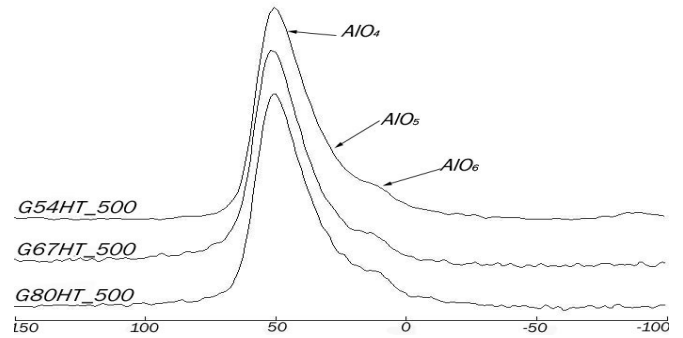


Figure 2.61 RMN MAS Al des composites après traitement thermique à 500°C

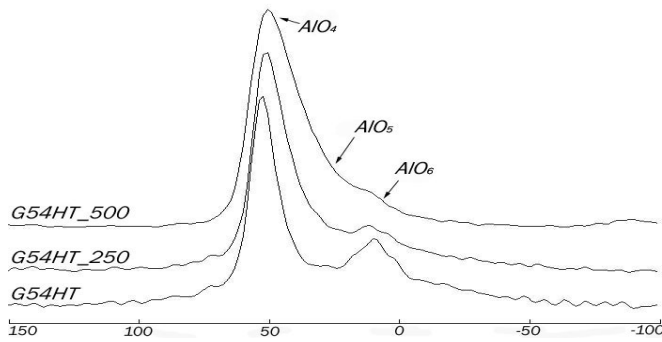


Figure 2.62 RMN Al des composites G54HT en fonction du traitement thermique

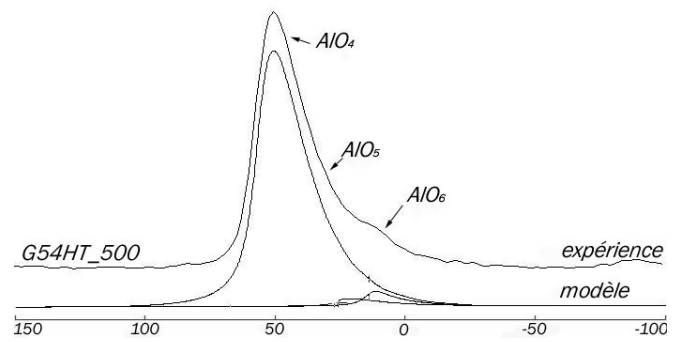


Figure 2.63 RMN Al du composite G54HT_500 après traitement thermique à 500°C

La diminution du rapport K_2O/SiO_2 entraîne une diminution globale de la quantité de AlO_4 à 250°C (AlO_4 (G80HT_250) = 88%, AlO_4 (G54HT_250) = 73%) et une augmentation de celle-ci à 500°C (AlO_4 (G80_500) = 88%, AlO_4 (G54_500) = 89,6%).

La figure 2.63 représente le spectre obtenu pour le composite G54HT après un traitement thermique à 500°C (G54HT_500). Trois contributions (AlO_4 , AlO_5 et AlO_6) déjà observées pour le matériau avant traitement thermique ont permis d'obtenir le modèle.

Par comparaison avec les géopolymères purs dans les mêmes conditions de traitement thermique, les composites présentent un nombre plus important d'unités AlO_4 et AlO_6 . D'une manière générale, les positions des déplacements chimiques tendent à diminuer vers les champs forts (faibles valeurs de δ) pour chaque température, lorsque le rapport K_2O/SiO_2 diminue.

Echantillon	Unités	$\delta(^{27}\text{Al})$ ppm	Population (%)
G54HT_250	(Al VI) AlO_6	18,1	17,2
	(Al V) AlO_5	31,4	9,8
	(Al IV) AlO_4	55,7	73
G80HT_250	(Al VI) AlO_6	18,3	3,5
	(Al V) AlO_5	35,1	8,5
	(Al IV) AlO_4	57,3	88

Tableau 2-21 Résultats de la déconvolution des spectres RMN MAS Al des composites G54HT_250 et G80HT_250 (après traitement thermique à 250°C)

Echantillon	Unités	$\delta(^{27}\text{Al})$ ppm	Population (%)
G54HT_500	(Al VI) AlO_6	16	6,4
	(Al V) AlO_5	31,4	4
	(Al IV) AlO_4	58	89,6
G67HT_500	(Al VI) AlO_6	15,1	3,3
	(Al V) AlO_5	34,5	4,9
	(Al IV) AlO_4	59,7	91,8
G80HT_500	(Al VI) AlO_6	12,8	3,5
	(Al V) AlO_5	34,8	8,5
	(Al IV) AlO_4	59,1	88

Tableau 2-22 Résultats de la déconvolution des spectres RMN MAS Al des composites G54HT_500, G67HT_500 et G80HT_500 (après traitement thermique à 500°C)

RMN MAS du phosphore, étude des composites après traitement thermique (TTH)

L'environnement des groupements phosphates n'est pas influencé par le traitement thermique (figure 2.66). Même après un traitement à 500°C, les proportions sont inchangées, seul une légère modification des positions des déplacements chimiques peut indiquer une distorsion des groupements PO_4 (figures 2.64 et 2.65).

La figure 2.67 présente le modèle théorique calculé pour le spectre G54HT_500 ainsi que le spectre expérimental du même composé et le spectre expérimental de HA. Comme pour les composites avant traitement thermique, les spectres RMN MAS P après traitement thermiques peuvent se modéliser avec 2 composantes dont la composante majoritaire se situe entre 2,5 et 3 ppm.

Les proportions des deux contributions sont quasiment égales quels que soient la température de traitement thermique et la valeur du rapport K_2O/SiO_2 (tableaux 2-23).

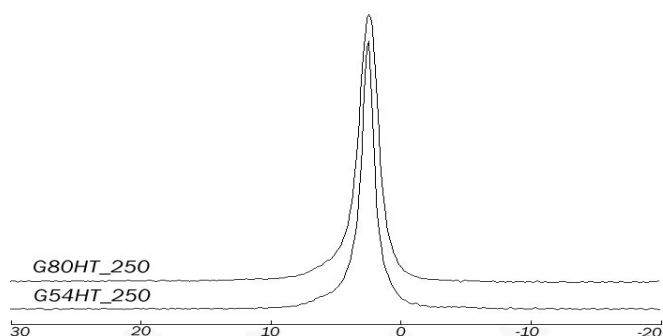


Figure 2.64 RMN MAS P des composites G54HT_250 et G80HT_250 (après traitement thermique à 250°C)

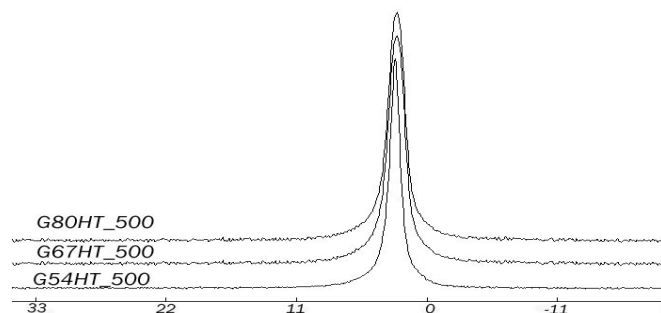


Figure 2.65 RMN MAS P des composites après traitement thermique à 500°C

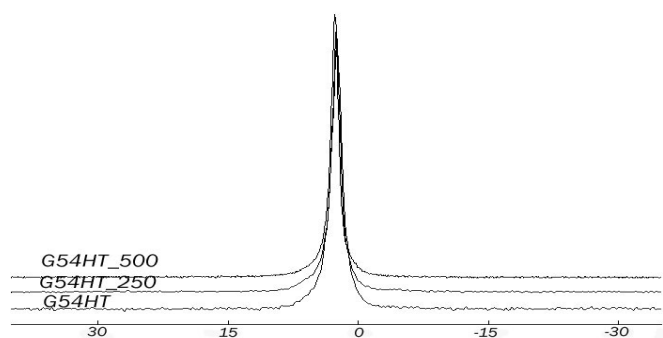


Figure 2.66 RMN MAS P des composites G54HT en fonction du TTH

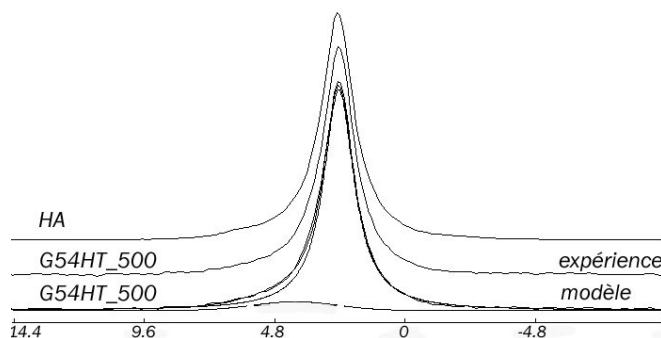


Figure 2.67 RMN MAS P du composite G54HT_500 (après traitement thermique à 500°C) et son modèle

Unités	$\delta(^{31}P)$ ppm	Population (%)
G54HT_250	2,5	88
	4,2	12
G80HT_250	2,5	91,6
	4,8	8,4

Echantillon	$\delta(^{31}P)$ ppm	Population (%)
G54HT_500	2,7	95,2
	4,7	4,8
G67HT_500	2,6	86,9
	3,6	13,1
G80HT_500	2,5	95
	5,2	5

Tableau 2-23 Résultats de la déconvolution des spectres RMN MAS P des composites après traitement thermique à 250°C et à 500°C

RMN MAS du proton, étude des composites après traitement thermique

(TTH)

La figure 2.70 présente trois spectres obtenus pour le composite G54HT en fonction du traitement thermique. Comme dans le cas des géopolymères purs, la quantité de protons diminue fortement en fonction du traitement thermique et plus la température de celui-ci est élevée et plus l'intensité du signal est faible.

Ce phénomène s'observe quel que soit le rapport K_2O/SiO_2 (figures 2.68 et 2.69). La diminution de ce rapport entraîne comme pour les composites avant traitement thermique une diminution de la quantité de protons dans l'échantillon. Cette diminution est visible à 250°C et à 500°C (tableau 2-24).

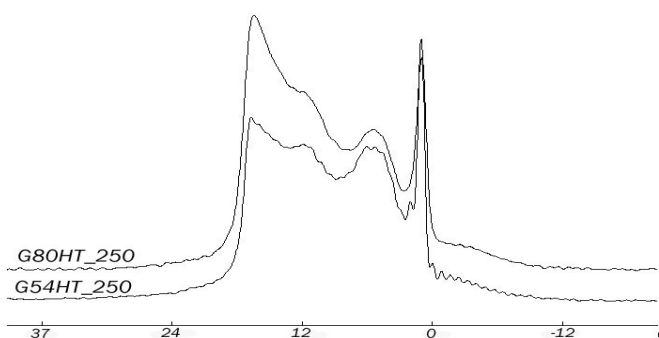


Figure 2.68 RMN MAS H des composites après traitement thermique à 250°C

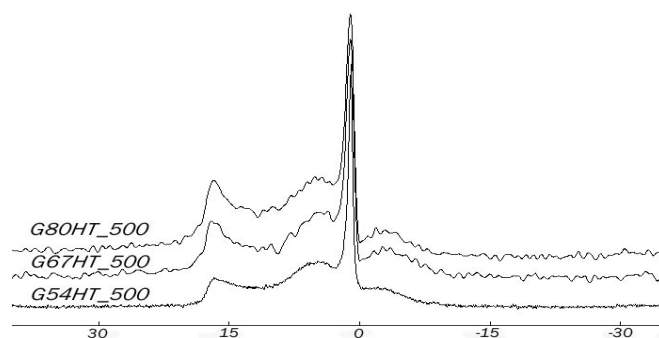


Figure 2.69 RMN MAS H du composite G54HT après traitement thermique à 500°C

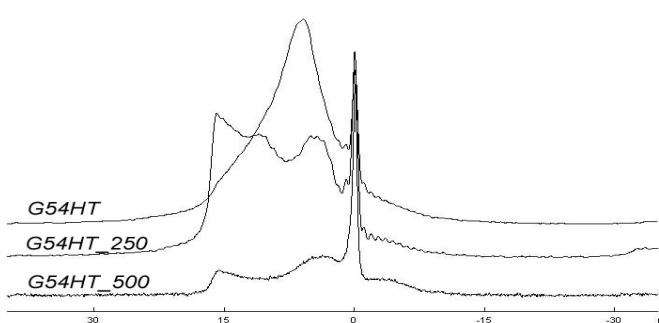


Figure 2.70 RMN MAS H du composite G54HT en fonction du traitement thermique

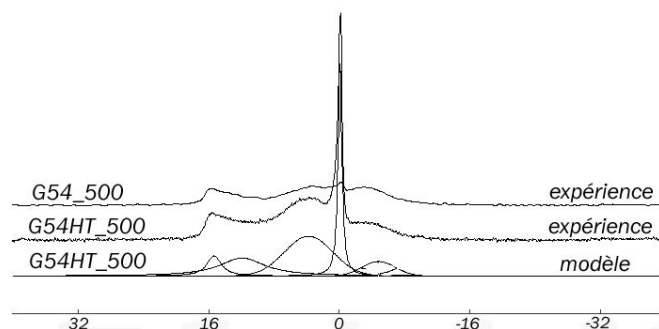


Figure 2.71 RMN MAS H du composite G54HT après traitement thermique à 500°C

De manière analogue aux géopolymères purs ayant subi des traitements thermiques, les échantillons traités à 250°C et 500°C présentent des spectres à 6 composantes (figure 2.71). Les spectres obtenus pour les composites après traitement thermique sont très proches de ceux des géopolymères purs aux mêmes températures. La principale différence provient de l'intensité du groupement OH situé à 0,5 ppm dû aux protons des phosphates de calcium introduits lors de la synthèse.

Echantillon	$\delta(^1\text{H})$ ppm	Population (%)	Echantillon	$\delta(^1\text{H})$ ppm	Population (%)
G54HT_250	1,1	7,3	G54HT_500	-3,7	9,3
	5,5	36,9		1,1	23,3
	11,9	38,9		4,9	36,1
	15,5	10,7		13	23,9
	17	6,2		16,4	7,4
G80HT_250	1	7,9	G67HT_500	-3,9	4,1
	5,5	29,4		-0,1	0,3
	11,5	35,3		1,1	9,8
	15,5	18,6		3,6	65
	17	8,8		16	20,8
G80HT_500	1	7,9	G80HT_500	-3,7	3,2
	5,5	29,4		1,1	21
	11,5	35,3		5	20,4
	15,5	18,6		12,9	46,8
	17	8,8		16,7	8,6

Tableau 2-24 Résultats de la déconvolution des spectres RMN MAS H des composites après traitements thermiques à 250°C et 500°C.

c - Influence des traitements thermiques sur la structure des géopolymères purs et composites : résumé des principaux résultats expérimentaux

Les deux traitements thermiques appliqués aux géopolymères ainsi qu'à leurs composites ne modifient pas de façon notable les environnements du silicium et de l'aluminium. Les Si Q⁴ et les AlO₄ restent majoritaires.

L'augmentation de la température de traitement provoque un réarrangement entre les ramifications et les chaînes (diminution des Si Q³ au profit des unités Q²). Cet effet de la température est visible pour les géopolymères purs et leurs composites.

L'étude RMN du phosphore des composites en fonction du traitement thermique n'a pas montré de modification notable de son environnement : les phosphates de calcium n'interagissent pas avec la matrice géopolymère.

L'étude qualitative menée sur l'environnement des protons dans les géopolymères purs et les composites a montré l'influence du traitement thermique sur la quantité de protons d'une part et sur les différents groupements d'autre part.

A 250°C les échantillons s'expansent pour présenter des pourcentages de porosités supérieurs à 60%. Ce phénomène s'accompagne en RMN d'une diminution notable de la quantité de protons présente dans les échantillons. Le groupement majoritaire ne correspond plus aux groupements OH de Brønsted mais à une autre unité située aux alentours de 11ppm.

Ce phénomène est encore accentué pour les échantillons ayant subi le traitement thermique à 500°C, la quantité de protons résiduels est très faible et présente les mêmes contributions qu'à 250°C.

Ces résultats ont été vérifiés pour les autres types de phosphate de calcium ajoutés (HA et TCP seuls).

Après le traitement thermique à 500°C, c'est le composite G54HT_500 qui présente la plus forte teneur en AlO_4 et Si Q^4 . Il présente également la plus faible proportion en AlO_5 et le signal lié aux protons est le plus faible.

IV Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la synthèse et à la caractérisation de matériaux géopolymères (caractérisés par un rapport molaire $\text{Si}/\text{Al} = 21$) et de composites à matrices géopolymère.

La modification du rapport $\text{K}_2\text{O}/\text{SiO}_2$ de 0,80 à 0,54 n'a pas modifié les principales propriétés des géopolymères obtenus : le pH des matériaux après synthèse est resté supérieur à 10 et aucune modification structurale n'est apparue (les géopolymères présentent une structure amorphe : association de tétraèdres SiO_4 en chaînes, réticulées par des aluminiums en coordinance IV).

Les composites synthétisés à partir de ces matrices géopolymères par association de géopolymère et de phosphate de calcium (hydroxyapatite, phosphate tri-calcique ou les deux) présentent des pH basiques. Les analyses structurales par DRX et FTIR ont montré qu'il n'y a pas de mélange entre le géopolymère et les phosphates : les composites se présentent sous la forme d'une matrice géopolymère où sont inclus des phosphates de calcium. Ce résultat n'est pas influencé par la variation du rapport $\text{K}_2\text{O}/\text{SiO}_2$.

L'ensemble des géopolymères purs et des composites a fait l'objet d'une étude de pH et de structure après traitement thermique. Les échantillons obtenus après des traitements thermiques à

250°C et 500°C ont été étudiés. Le traitement thermique diminue la basicité des géopolymères purs et des composites : après le traitement thermique à 500°C, les composites à matrice G54 présentent des valeurs de pH voisines de 7.

Suite aux traitements thermiques, la structure décrite et caractérisée par FTIR et DRX des matériaux avant traitement thermique n'a pas évolué : il n'y a pas de fusion entre les phosphates et l'aluminosilicate. Et ce quels que soient la température de traitement et la valeur du rapport K_2O/SiO_2 .

L'étude par RMN MAS des matériaux a confirmé le départ d'eau et a mis en évidence un réarrangement des atomes de silicium. Ces modifications observées par RMN MAS sont associées à une augmentation considérable du pourcentage de porosité de ces matériaux, lié au traitement thermique. Dans le chapitre suivant nous nous intéresserons à la porosité de ces matériaux, à leurs caractéristiques mécaniques et à leur comportement *in vitro*.

Références

- [1] DAVIDOVITS J., CORDI S.A., **Patent n° EP 0 066 571 B1**, 1985, 1
- [2] DAVIDOVITS J., DAVIDOVICS M., **Patent n° EP 0 815 064 B1**, 1996, 1
- [3] SWANEPOEL J.C., STRIDUM C.A., **Utilisation of Flash ash in a geopolymeric material**, App. Geochem. (17), 2002, 1143
- [4] DAVIDOVITS J., **Properties of Geopolymer cements**, Proceeding First International Conference on Alkaline Cements and Concretes, 1994, 131
- [5] VAN JAARVELD J.G.S., VAN DEVENTER J.S.J and LORENZEN L., **The potential use of geopolymeric materials to immobilise toxic metals : part 1 Theory and applications**, Mineral engineering (10), 1999, 659
- [6] ZOULGAMI M., **Nouvelles préparations pour biomatériaux ciment d'hydroxyapatite et associations de phosphates inorganiques avec un géopolymère de type polysialate-siloxo**, Thèse de doctorat n°2534, Université de Rennes 1, 2001
- [7] DAVIDOVITS J., **Chemistry of geopolymeric systems**, Terminology, Geopolymer 99', 1999, 9
- [8] DERRIEN A.C., OUDADESSE H., ZOUGLAMI M., BRIARD P., LUCAS-GIROT A., CHAUVET-LEBRET D. and CATHELINÉAU G., **Evaluations physico-chimiques et biologiques de biomatériaux composites (aluminosilicates/ phosphates de calcium)**, Actualité en

Biomatériaux, Ed. Romillat, 2003, in press.

- [9] CHAUVEL-LEBRET D.J., COLLET B., MAILLARD S., LUCAS-GIROT A., PELLEN-MUSSI P., AUROY P., OUDADESSE H. and CATHELINÉAU G., **Evaluation in vitro de la cytotoxicité de biomatériaux composites**, Actualité en Biomatériaux, Ed. Romillat, 2003, in press.
- [10] DERRIEN A.C., OUDADESSE H., SANGLEBOEUF J.C., BRIARD P., LUCAS-GIROT A., **Thermal Behaviour Of Composites Aluminosilicate-Calcium Phosphates**, J. Of Thermal Analysis (75), 2004, 937
- [11] M. Vallet Regi, **Ceramics for Medical Applications**, J. Chem. Soc., edited by Dalton Trans., 2001, 97
- [12] K. De Groot, **Medical Applications of Calcium Phosphate Bioceramics**, The centennial Memorial Issue of The Ceramic Society of Japan (99), 1991, 943
- [13] D.M. Liu, **Influence of Porosity and Pore Size on Compressive strength of Porous Hydroxyapatite Ceramic**, Ceramics Inter. (23), 1997, 135
- [14] J.C. Le Huec, T. Schaeveerbeke, D. Clement, J. Faber and A. Le Rebeller, **Influence of Porosity on the Mechanical Resistance of Hydroxyapatite Ceramics under Compressive stress**, Biomaterials (16), 1995, 113
- [15] DALCUSI G., **Biphasic Calcium Phosphate Concept Applied to Artificial Bone, Implant Coating and Injectable Bone Substitute**, Biomaterials (19), 1998, 1473
- [16] YAMADA S., HEYMAN D., BOULER J.M., DACULSI G., **Osteoclastic Resorption of Calcium Phosphate Ceramics with Different Hydroxyapatite/ B-tricalcium phosphate ratios**, Biomaterials (18), 1997, 1037
- [17] PIATTELLI A., MANGANO C., KRAJEWSKI A., RAVAGLIOLI A., MARTINETTI R., FABBRI M., **Correlation between clinico-histological results and the hydroxyapatite phosphate ratio of implanted ceramics granules**, Andersson OH, Yli-Urpo ed., Bioceramics (7), (Proc 7th Int. Symp. On ceramics in medicine), Turku, Finland, July 1994, 177
- [18] VIDEAU J.J., ETOURNEAU J., ROCHERULLE J., VERDIER P. and LAURENT Y., **Structural Approach of Sialon Glasses : M-Si-Al-O-N**, J. of the European Ceramic Society, 17 (1997), 1955

- [19] HWA L.G., HWANG S.L. and LIU L.C., **Infrared and Raman Spectra of Calcium Aluminosilicate Glasses**, J. of Non-Crystalline Solids (238), 1998, 193
- [20] FLANIGEN E.M., KHATAMI H. and SZIMANSKI H.A., **Infrared Structural Studies of Zeolite framework**, Advances in Chem. Series, R.F. Gould Ed., American Chemical Society (101), 1971, 201
- [21] EFIMOV A.M., POGAREVA V.G., **Water-related IR absorption spectra for some phosphate and silicate glasses**, J. Non crystalline Solids (275), 2000,189
- [22] TERNANE R., COHEN-ADAD M.Th., PANCZER G., GOUTAUDIER C., KBIR-ARIGUIB N., TRABELOI-AYEDI M., FLORIAN P. and MASSIOT D., **Introduction of boron in hydroxyapatite : synthesis and structural characterization**, J. of alloys and compounds (333), 2002, 62
- [23] A. BELKEBIR, J. ROCHA, A.P. ESCULCAS, P. BERTHET, B. GILBERT, Z. GABELICA, G. LLABRES, S. WIJZEN and A. RULMONT, **Structural characterization of glassy phases in the system $\text{Na}_2\text{O}-\text{Ga}_2\text{O}_3-\text{P}_2\text{O}_5$ by MAS and solution NMR and vibrational spectroscopy: II. Structure of the phosphate network**, Spectrochimica Acta, part A (56), 2000, 435
- [24] MASSIOT D., FAYON F., CAPRON M. KING I., LE CALVE S., ALONSO B., DURAND J-O., BUJOLI B., GAN Z. and HOATSON G., **Modelling one- and two- dimensional Solid State NMR spectra**, Mag. Res. Chem. (40), 2002, 70
- [25] DUPREE R., HOLLAND D., MORTUZA M.G., COLLINS J.A. and LOCKYER M.W.G., **Magic angle spinning NMR of alkali phospho alumino silicate glasses**, J. Of Non-Chrys. Solids (112), 1989, 111
- [26] DERIANO S., **Conception chimique de verres silicatés à hautes performances mécaniques**, Thèse de doctorat n° 2795, Université de Rennes 1, 2002
- [27] ENGELHARDT G. and MICHEL D., **High resolution solid state NMR of silicates and zeolites**, Publisher: Chichester [West Sussex] ; New York : Wiley 1987
- [28] SEN S. and YOUNGMAN R.E., **NMR study of Q speciation and connectivity of $\text{K}_2\text{O}-\text{SiO}_2$ glasses with high silicate content**, J. Of Non-Chrys. Solids (331), 2003, 100

- [29] BARBOSA V.F.F, MAC KENZIE K.J.D, THAUMATURGO C., **Synthesis and characterisation of materials based on inorganic polymers of alumina and silica : sodium polysialate polymers**, Inter. J. Of Inorg. Minerals (2), 2000, 309
- [30] MAGI M., LIPPMAA E., SAMOSON A., ENGELHARDT G. and GRIMMER A-R., **Solid state high-resolution silicon-29 chemical shifts in silicates**, J. Chem. Phys. (88), 1988, 1518
- [31] YASUI I., HAGIHARA H. And ARAI Y., **Glass formation in the system $\text{AlF}_3\text{-BaF}_2\text{-CaF}_2$ and properties of these glasses**, Mat. Sci. Forum (32), 1988, 173
- [32] BELKEBIR A., ROCHA J., ESCULAS A.P., BERTHET P., GILBERT B., GABELICA Z., LLABRES G., WIJZEN F. and RULMONT A., **Structural characterisation of glassy phases in the system $\text{Na}_2\text{O-Al}_2\text{O}_3\text{-P}_2\text{O}_5$ by MAS and solution NMR, EXAFS and vibrational spectroscopy**, Spec. Acta Part A (55), 1999, 1323
- [33] BARBOSA V.F.F, MAC KENZIE K.J.D, **Thermal behaviour of inorganic geopolymers and composites derivated from sodium polysialate**, Mat. Res. Bul. (38), 2003, 319
- [34] FREUDE D., **Enhanced resolution in the ^1H NMR spectra of zeolite H-ZSM-5 by heteronuclear dipolar-dephasing spin echo MAS**, Chem. Phys. Letters (235), 1995, 69
- [35] ROBERT E., WHITTINGTON A., FAYON F., PICHAVANT M. and MASSIOT D., **Structural characterization of water-bearing silicate and aluminosilicate glasses by high-resolution solid-state NMR**, Chem. Geology (174), 2001, 291
- [36] MARCHANDISE X., BELGRAND P., LAFFARGUE P., MIQUEL J.L., LEMAITRE J. and LEGRAND A.P., **Spectroscopie NMR des biomatériaux**, Innov. Tech. Biol. (16), 1995, 48
- [37] HAYAKAWA S. and OSAKA A., **Biomimetic deposition of calcium phosphates on oxides soaked in a simulated body fluid**, J. Of Non-Crys. Solids (263), 2000, 409

Chapitre 3

**Géopolymères et composites après
traitement thermique :
morphologie, propriétés mécaniques
et comportement *in vitro***

Chapitre 3 : Géopolymères et composites après traitement thermique : morphologie, propriétés mécaniques et comportement *in vitro*

I Porosité, morphologies et propriétés mécaniques des géopolymères purs et des composites géopolymères/ phosphates de calcium après traitement thermique..... 91

I.1 Mesure du pourcentage de porosité et morphologie des échantillons	91
I.1.1 Distribution des pourcentages de porosité	91
I.1.2 Morphologie des échantillons (MEB).....	93
I.2 Mesure de la contrainte maximale à la rupture en compression.....	96
I.2.1 Influence de la température de traitement thermique	99
I.2.2 Influence du rapport K_2O/ SiO_2	99
I.3 Influence des paramètres de synthèse sur le pourcentage de porosité et sur la contrainte à la rupture en compression.....	99
I.3.1 Mise en équation de la relation pour le pourcentage de porosité.....	103
I.3.2 Mise en équation de la relation pour la contrainte à la rupture.....	105
I.3.3 Validité des modèles	106
I.4 Discussion	109

II Evaluation *in vitro* des échantillons géopolymères purs (G54_500) et des composites géopolymères/ phosphates de calcium (G54H_500, G54T_500 et G54HT_500). 110

II.1 Choix des matériaux à analyser	110
II.2 Analyse des matériaux immergés dans une solution SBF	111
II.2.1 Protocole d'étude.....	112
II.2.2 Analyse des solutions en fonction du temps d'immersion et du type de matériau.	112
II.2.3 Analyse des matériaux après immersion dans le SBF.....	120
II.2.4 Discussion sur le comportement des matériaux immergés	

et les concentrations des solutions	127
II.3 Analyse des matériaux en présence de cellules (tests MTT et MEB).....	128
II.3.1 Protocole expérimental	128
II.3.2 Toxicité cellulaire test MTT	128
II.3.3 Morphologie cellulaire	131
II.3.4 Discussion sur les analyses in vitro en présence de cellules	134
 III Conclusion	 134
 Références	 135

I Porosité, morphologies et propriétés mécaniques des géopolymères purs et des composites géopolymères/phosphates de calcium après traitement thermique.

Le pourcentage de porosité, au même titre que le pH des échantillons est un critère important en vue d'une évaluation de l'utilisation potentielle de ces matériaux comme biomatériaux. Nous nous intéressons ici aux pourcentages de porosité des géopolymères purs et des composites en fonction du traitement thermique et du rapport K_2O/SiO_2 .

I.1 Mesure du pourcentage de porosité et morphologie des échantillons

Les pourcentages de porosités ont été déterminés par le rapport entre les densités géométriques (d_g) et réelles (d_r) suivant la relation :

$$\% \text{porosité} = 100 \times \left(1 - \frac{d_g}{d_r} \right)$$

où d_g correspond à la densité géométrique calculée pour des échantillons cylindriques de 6 mm de diamètre et de 12 mm de hauteur.

d_r correspond à la densité réelle du matériau mesurée à l'aide d'un pycnomètre à hélium ACCU PYC 1330. La variation d'un volume d'hélium calibré est mesurée par l'appareil, ce qui permet d'en déduire le volume réel occupé par l'échantillon et à sa densité.

I.1.1 Distribution des pourcentages de porosité

Les figures 3.1 et 3.2 représentent la répartition du nombre d'échantillons en fonction du pourcentage de porosité mesuré.

Après le traitement thermique à 250°C (figure 3.1), les géopolymères purs (G54_250, G67_250 et G80_250) présentent des pourcentages de porosité variant de 74% à 84%.

L'augmentation du rapport K_2O/SiO_2 favorise une augmentation de la porosité. La distribution des échantillons pour G54_250 et G67_250 est plus étroite que pour G80_250.

Pour un même rapport K_2O/SiO_2 , les composites présentent des pourcentages de porosités inférieurs aux valeurs des géopolymères purs. Quel que soit le type de phosphate de calcium ajouté à la matrice, les pourcentages de porosité sont du même ordre de grandeur.

Les distributions sont larges et s'étendent jusqu'à 10%. Ce phénomène est dû au faible nombre d'échantillons analysés ainsi qu'à la morphologie irrégulière des pores.

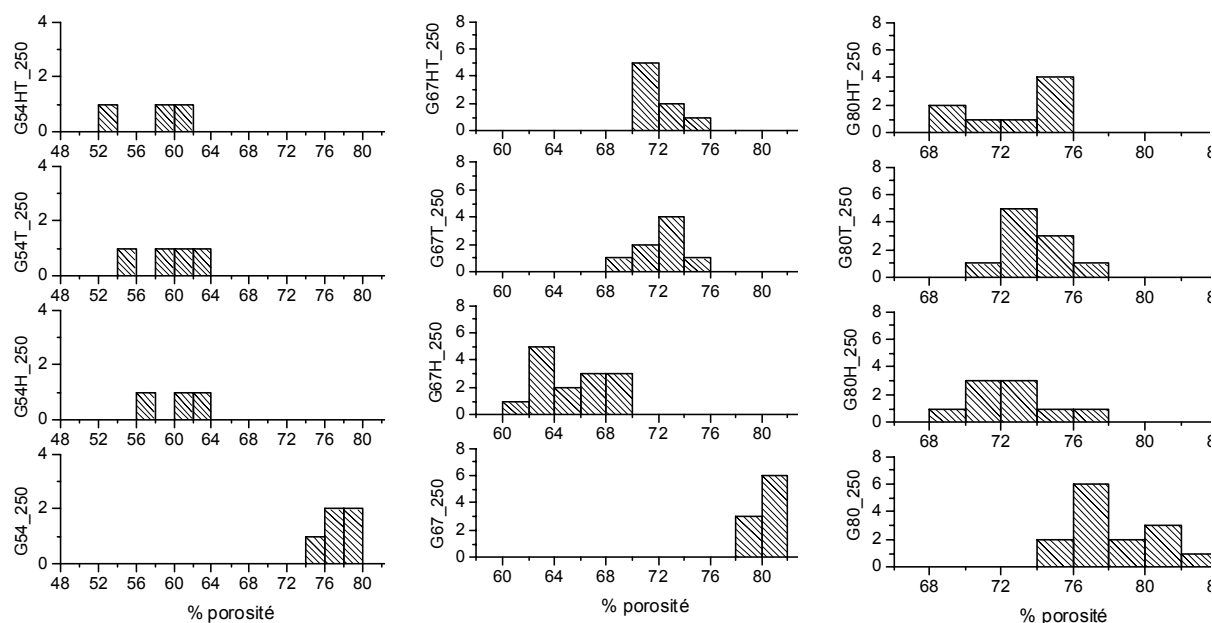


Figure 3.1 Répartition des échantillons en fonction du pourcentage de porosité, après traitement thermique à 250°C

Après avoir été traités à 500°C, les géopolymères purs présentent des pourcentages de porosité plus élevés que les composites (figure 3.2). L'élévation de la température de traitement thermique s'accompagne d'une augmentation des pourcentages de porosité, quel que soit le rapport K_2O/SiO_2 . Plus ce rapport augmente et plus le géopolymère présente un pourcentage de porosité important (77% pour G54_500 contre 87% pour G80_500). Les intervalles de porosité sont d'environ 6% pour chacun des matériaux.

Comme dans le cas de l'étude après traitement thermique à 250°C, les composites présentent des pourcentages de porosité inférieurs à ceux des géopolymères purs.

Pour les composites, l'élévation de la température de traitement thermique s'accompagne d'une augmentation des pourcentages de porosité, quel que soit le rapport K_2O/SiO_2 . De manière analogue aux géopolymères purs, les pourcentages de porosité des composites augmentent avec l'augmentation du rapport K_2O/SiO_2 .

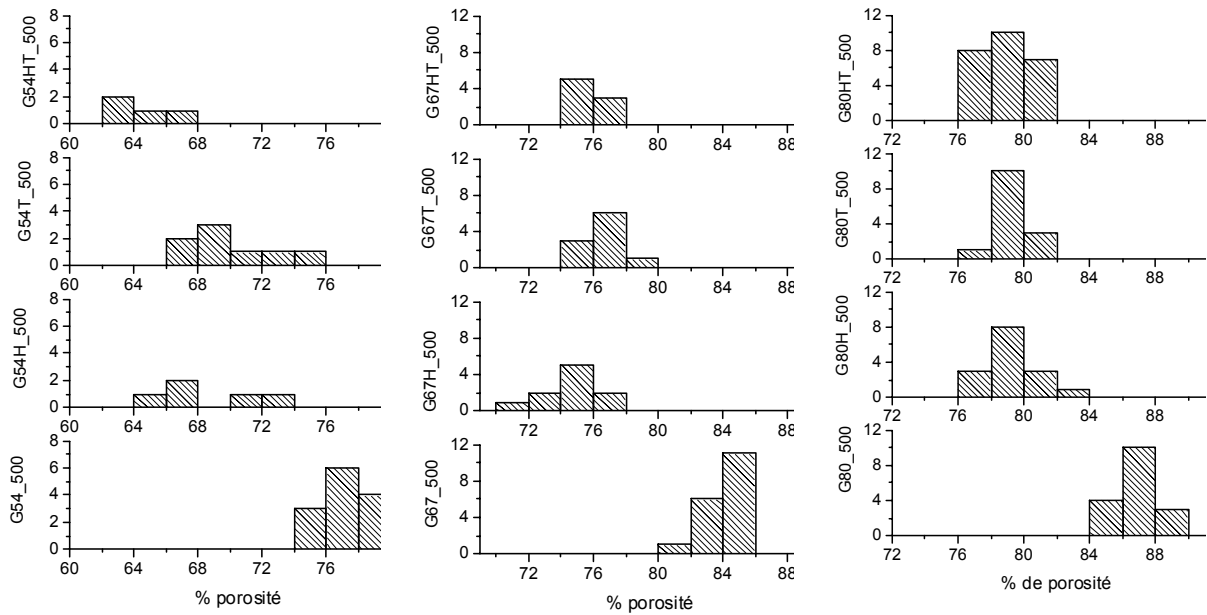


Figure 3.2 Répartition des échantillons en fonction du pourcentage de porosité après traitement thermique à 500°C.

I.1.2 Morphologie des échantillons (MEB)

Après le traitement thermique à 250°C, la morphologie des composites géopolymères/ phosphates de calcium est très proche de celle des géopolymères purs (figures 3.3-3.6).

Les échantillons de composites présentent de nombreuses cavités aux parois compactes. La taille de ces pores s'étend de quelques microns à plusieurs centaines de microns. La morphologie des matériaux est peu sensible au rapport K_2O/SiO_2 . La large gamme de tailles de pores ainsi que le faible nombre d'échantillons peuvent expliquer les largeurs de distributions de la figure 3.1.

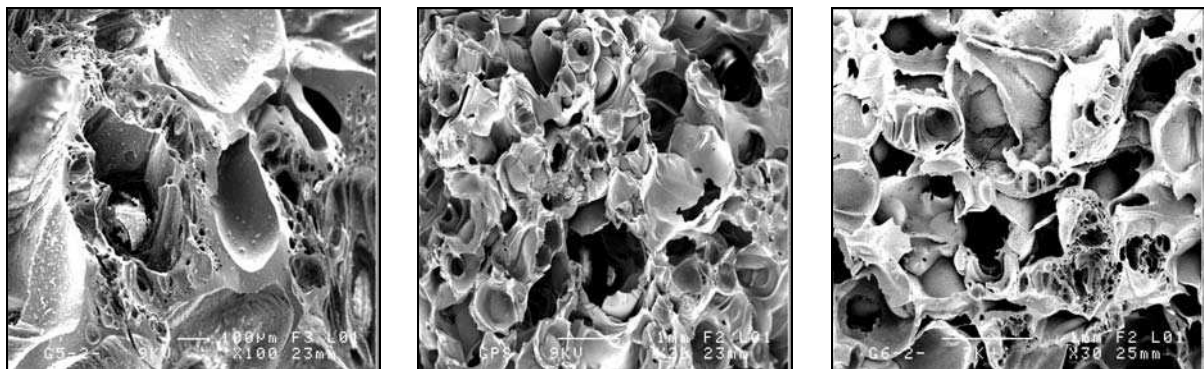


Figure 3.3 Morphologie des géopolymères : de gauche à droite G54_250, G67_250 et G80_250

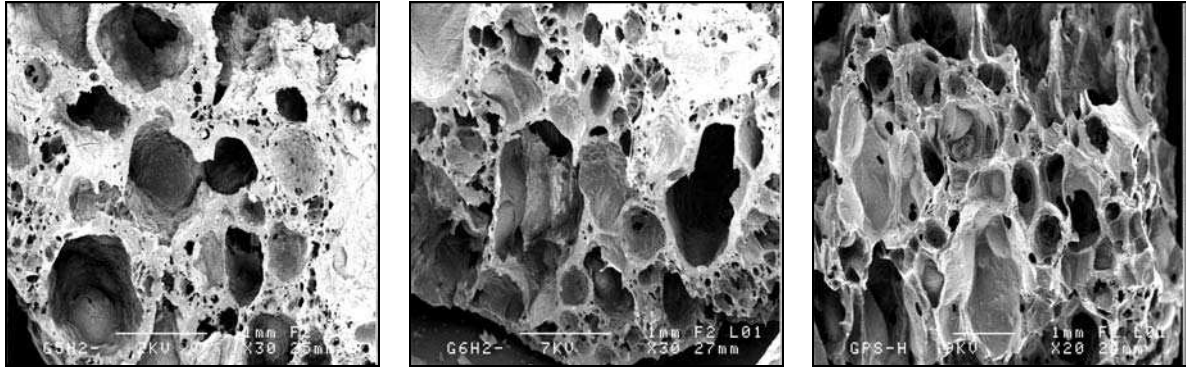


Figure 3.4 Morphologie des échantillons GH à 250°C, de gauche à droite : G54H_250, G67H_250 et G80H_250

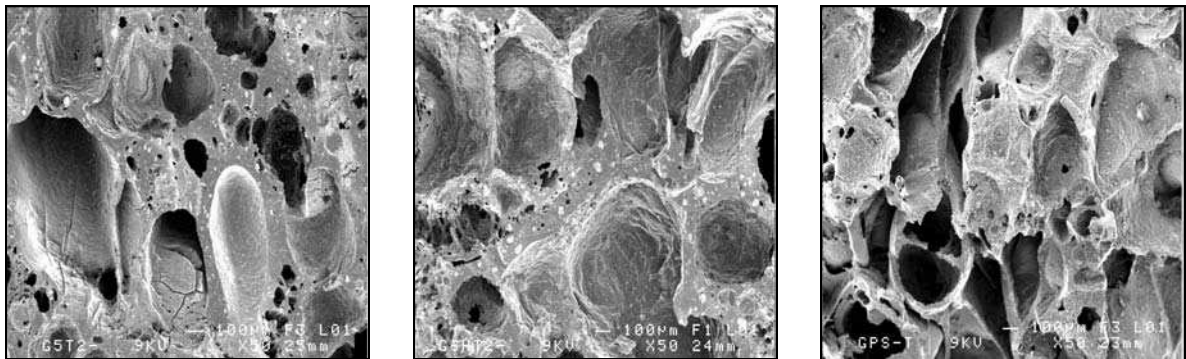


Figure 3.5 Morphologie des composites GT à 250°C de gauche à droite : G54T_250, G67T_250 et G80T_250

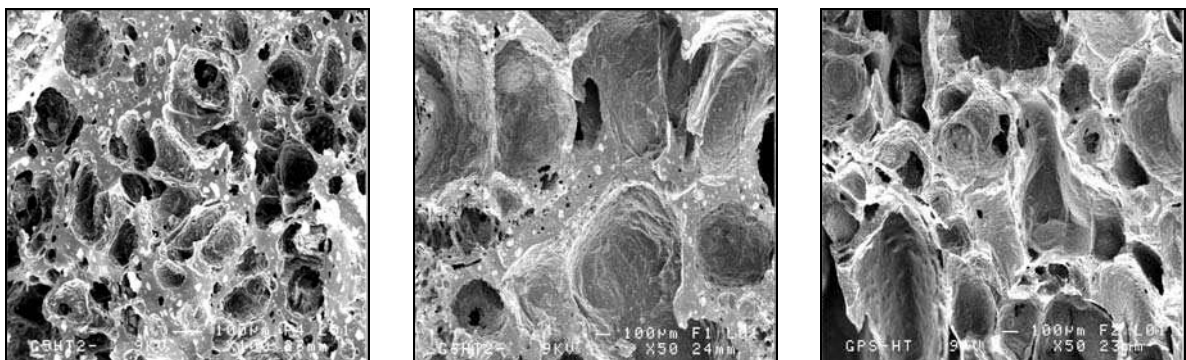


Figure 3.6 Morphologie des composites GHT à 250°C de gauche à droite : G54HT_250, G67HT_250 et G80HT_250

Après le traitement thermique à 500°C, les parois des géopolymères sont poreuses, les pores vont de quelques microns (pour les parois) à plusieurs centaines de microns (pour les cavités) (figure 3.7).

Comme s'était les cas après le traitement thermique à 250°C, la morphologie des composites géopolymères/ phosphates de calcium est très proche de celle des géopolymères purs. Les échantillons de composites présentent de nombreuses cavités aux parois devenues poreuses. Les tailles des pores s'étendent de quelques microns à plusieurs centaines de microns, les matériaux sont micro et macroporeux.

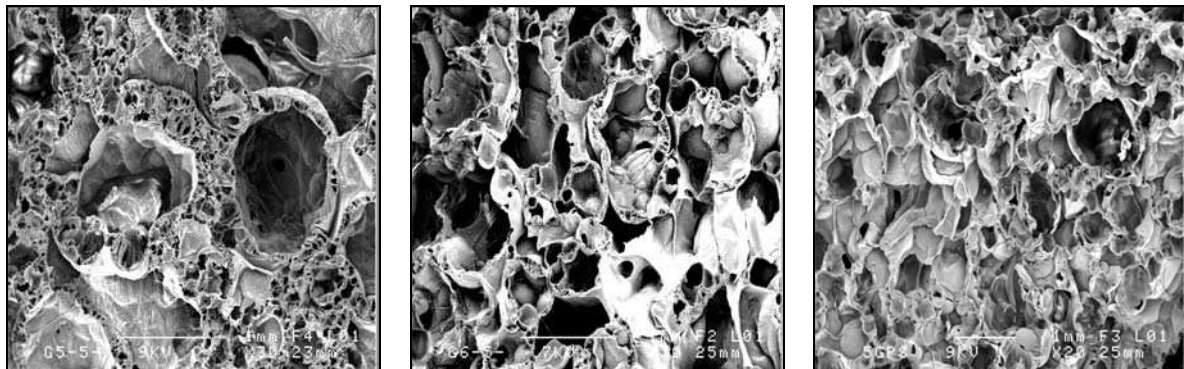


Figure 3.7 Morphologie des géopolymères purs à 500°C de gauche à droite : G54_500, G67_500 et G80_500

La morphologie des matériaux est peu sensible au rapport K_2O/SiO_2 . Le traitement à la température de 500°C a augmenté le pourcentage de porosité des géopolymères purs et des composites en favorisant la formation de pores d'environ 100 μm . La porosité est répartie de façon plus homogène (figures 3.7 à 3.10).

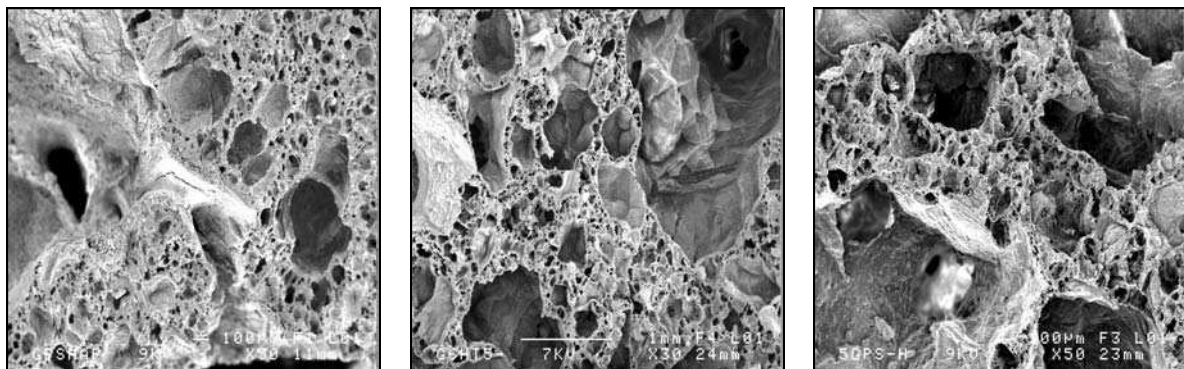


Figure 3.8 Morphologie des composites GH traités à 500°C de gauche à droite : G54H_500, G67H_500 et G80H_500

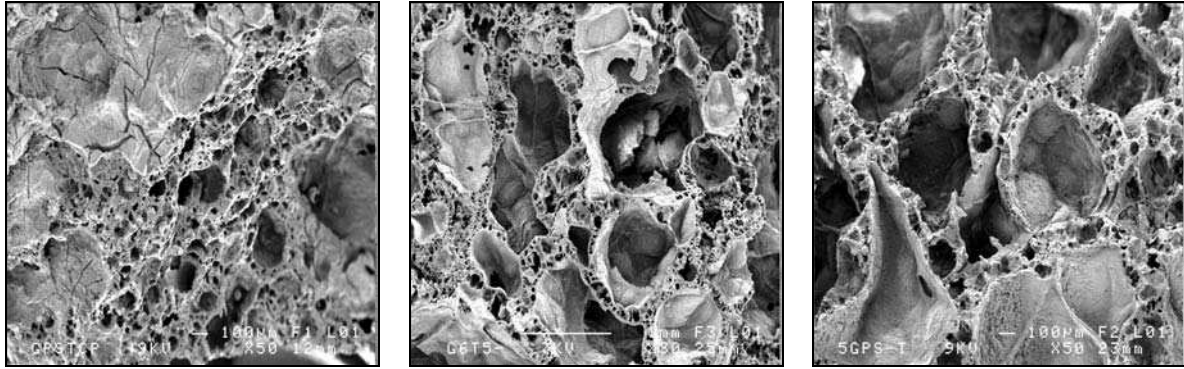


Figure 3.9 Morphologie des composites G T à 500°C de gauche à droite : G54T_500, G67T_500 et G80T_500

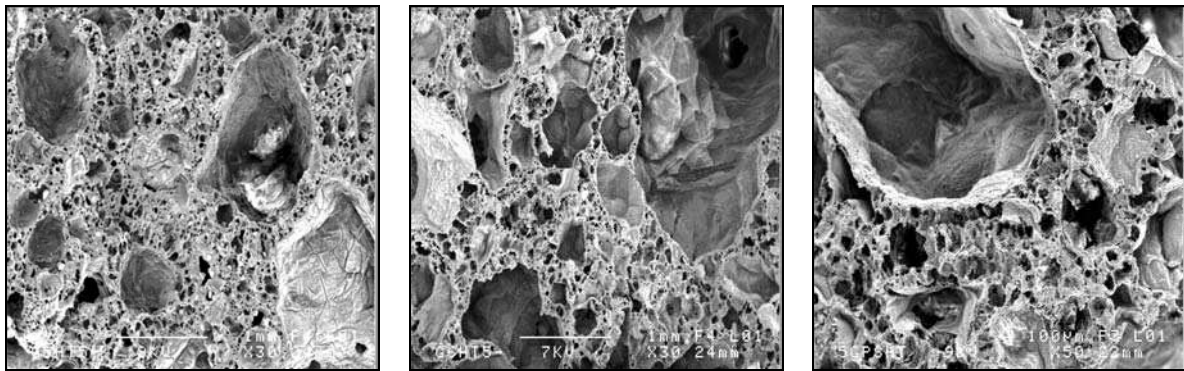


Figure 3.10 Morphologie des composites GHT chauffés à 500°C de gauche à droite : G54HT_500, G67HT_500 et G80HT_500

I.2 Mesure de la contrainte maximale à la rupture en compression

Des échantillons cylindriques ont été usinés à partir des matériaux de départ : géopolymères purs et composites. Le diamètre a été fixé à 6 mm (identique à celui des échantillons implantés). Afin d'éviter des effets de flambage, la longueur des éprouvettes est comprise entre 10 et 12 mm. L'essai de compression consiste à soumettre l'éprouvette à deux forces axiales. L'échantillon est placé entre les mors d'une presse, la vitesse du déplacement du piston a été fixée à 0,2 mm / min.

La valeur de la contrainte maximale à la rupture est obtenue par l'équation suivante :

$$\sigma_{comp} (MPa) = \frac{F_{comp} (N)}{S (mm^2)}$$

Remarque : les échantillons étudiés étant très poreux, il a été impossible de remonter à la valeur du module d'Young. Leur pourcentage de porosité important empêche une rupture définitive. Après la première rupture, les matériaux s'écroulent sur eux-mêmes, la structure alvéolaire des pores jouant le

rôle de voûte. Nous avons pris comme contrainte à la rupture le premier maximum atteint.

Les propriétés mécaniques de rupture en compression de nos matériaux ont été étudiées en fonction du rapport K_2O/SiO_2 et de la température de traitement thermique. Les incertitudes ont été calculées en prenant un intervalle de confiance de 95% d'après la méthode du coefficient de Student. Les figures 3.11 à 3.13 représentent les valeurs de contraintes maximales à la rupture des géopolymères purs et de leurs composites associés, en fonction du traitement thermique, et ce pour chaque rapport K_2O/SiO_2 .

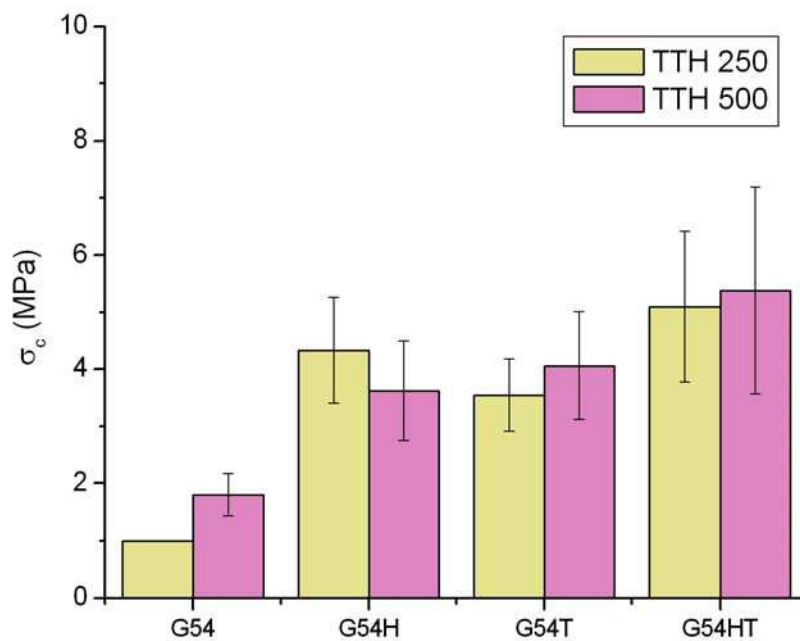


Figure 3.11 Valeurs des contraintes maximales à la rupture en compression pour les composites G54/ phosphates de calcium et géopolymère pur.

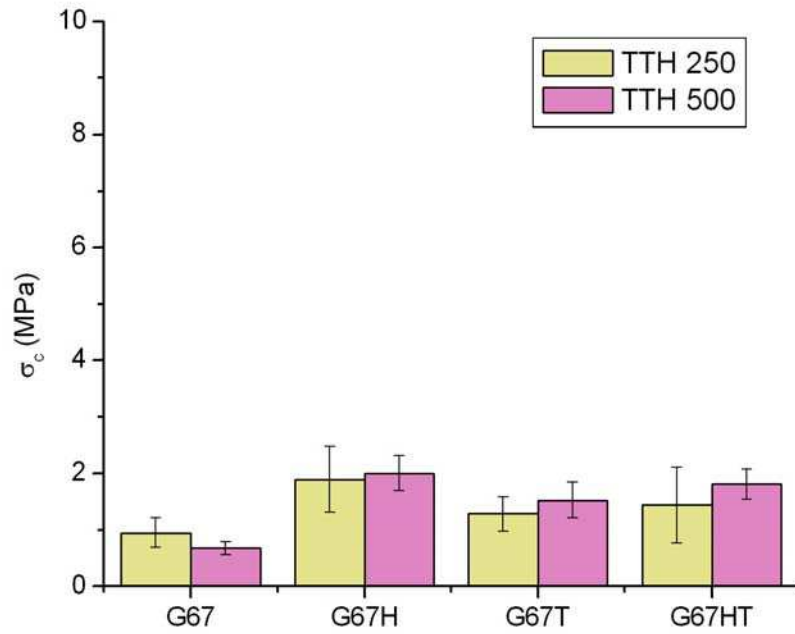


Figure 3.12 Valeurs des contraintes maximales à la rupture en compression pour les composites G67/ phosphates de calcium et géopolymère pur G67.

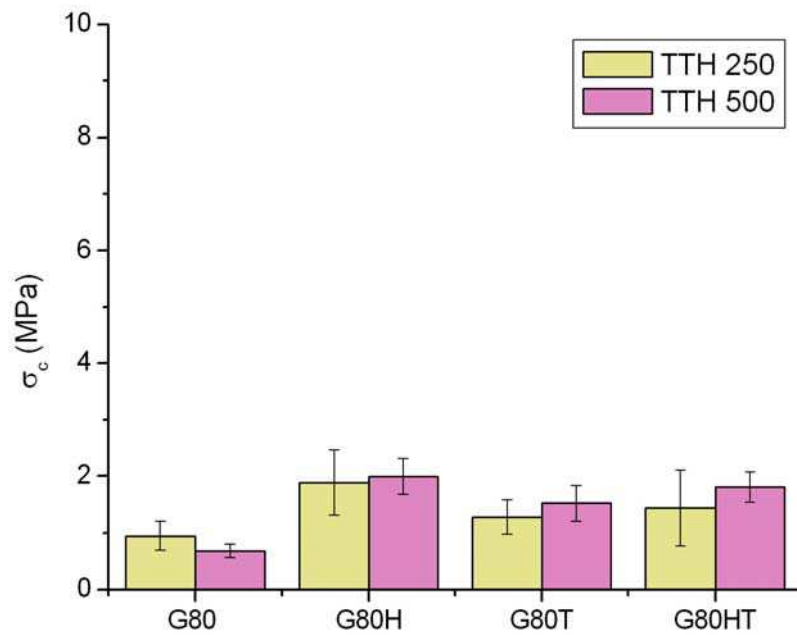


Figure 3.13 Valeurs des contraintes maximales à la rupture en compression pour les composites G80/ phosphates de calcium et géopolymère pur G80.

Les résultats discutés ci dessous sont présentés figures (figures 3.11 à 3.13)

I.2.1 Influence de la température de traitement thermique

Les propriétés mécaniques de rupture en compression de géopolymères purs diminuent avec l'élévation de la température de traitement thermique.

Pour les composites, l'augmentation de la température de traitement thermique tend à augmenter les valeurs moyennes de contraintes à la rupture en compression.

Après un traitement thermique à 500°C, les pourcentages de porosité des différents composites ont augmenté, la morphologie des composites se caractérise par une porosité plus homogène. Ces structures plus homogènes présentent moins de défauts de taille importante, ce qui peut expliquer l'augmentation des valeurs moyennes de contraintes à la rupture en compression qui sont supérieures à celles mesurées après TTH 250 (excepté pour le composite G54H).

Ces augmentations restent cependant modérées, les résultats mécaniques sont comparables après chacun des traitements thermiques.

I.2.2 Influence du rapport K_2O/ SiO_2

Quels que soient la température de traitement thermique et le type d'échantillon (géopolymère pur ou composite), l'augmentation du rapport K_2O/ SiO_2 s'accompagne d'une diminution des valeurs de contrainte à la rupture. Les composites ayant un rapport K_2O/ SiO_2 de 0,54 présentent les meilleurs caractéristiques mécaniques. Ce sont ces matériaux qui présentent également les pourcentages de porosité les moins importants (figures 3.1 et 3.2)..

I.3 Influence des paramètres de synthèse sur le pourcentage de porosité et sur la contrainte à la rupture en compression.

Dans le paragraphe précédent, nous avons présenté les mesures des pourcentages de porosité et de contraintes maximales à la rupture en compression des géopolymères purs et composites après traitement thermique.

Nous avons déterminé l'influence de deux paramètres d'élaboration sur les propriétés de nos matériaux (porosité et contrainte à la rupture en compression). Cette étude a été menée en utilisant la méthode des plans d'expérience pour surface de réponse [1].

Dans ce paragraphe, nous avons étudié l'influence du rapport K_2O/SiO_2 (noté X_1) et du pourcentage d'hydroxyapatite HA dans le mélange HA-TCP (HT noté X_2) sur le pourcentage de porosité et sur les valeurs de contrainte à la rupture en compression des composites ayant subi un traitement thermique à $500^\circ C$.

Cette étude a été réalisée sur les composites car ce sont les matériaux qui seront étudiés *in vitro* et *in vivo* (chapitres 3 et 4).

La température de traitement thermique retenue est $500^\circ C$ car ce sont les composites chauffés à $500^\circ C$ qui présentent les valeurs de pH les plus proches du pH physiologique.

L'élaboration d'une surface de réponse par la méthode des plans d'expériences a permis de caractériser la totalité d'un domaine d'étude, tout en limitant le nombre d'échantillons à réaliser. Pour notre étude, le modèle choisi a été inspiré d'un plan de Doehlert [2], où les six points expérimentaux forment un hexagone (figure 3.14).

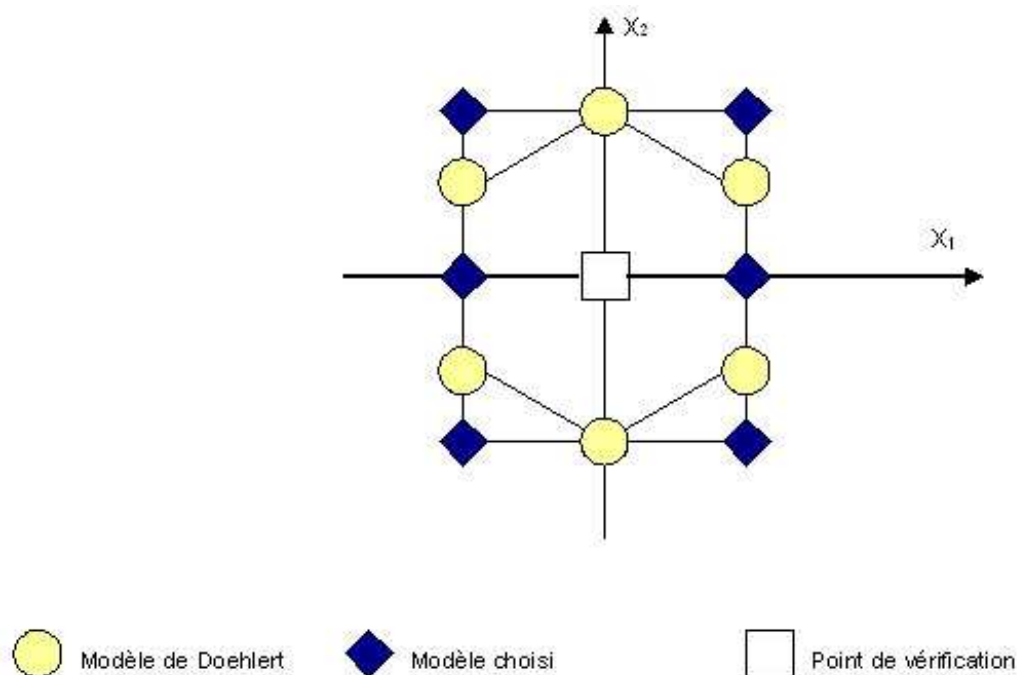


Figure 3.14 Schémas du plan de Doehlert et du plan retenu pour notre étude

Chaque sommet de la figure représente un point expérimental : des échantillons ont été synthétisés afin d'obtenir les valeurs qui permettent d'établir ce modèle. Ce modèle sera ensuite vérifié en comparant les valeurs théoriques calculées aux valeurs expérimentales pour le barycentre du domaine (point (0,0)).

Dans un premier temps, nous avons calculé les surfaces d'erreur qui ne dépendent que du modèle mathématique. Ces courbes correspondent au rapport entre l'erreur calculée ($\sigma_{y\text{ cal}}$) des résidus et l'erreur expérimentale ($\sigma_{y\text{ exp}}$) suivant l'équation (1) :

$$d\left(\hat{y}_p\right) = \frac{\sigma_{y\text{ cal}}}{\sigma_{y\text{ exp}}}$$

Equation 1

\hat{y}_p correspond au point p du domaine où l'on a calculé la valeur théorique de % de porosité (ou de contrainte à la rupture).

Si $d(\hat{y}_p)$ est inférieur à 1, l'erreur expérimentale est supérieure à l'erreur du modèle, donc les valeurs calculées au point p sont fiables.

Si $d(\hat{y}_p)$ est supérieur à 1, l'erreur expérimentale est inférieure à l'erreur du modèle, donc les valeurs calculées en p sont incertaines.

Pour notre étude, d'après la courbe d'erreur du plan de Doehlert (annexe 6, figure 1), l'erreur sur les composites contenant de l'hydroxyapatite pure ou du TCP pur est importante alors que ces matériaux nous intéressent. Pour contourner cette difficulté, nous avons adapté le plan de Doehlert en le transformant en plan carré (annexe 6 figure 2).

Les coordonnées X_1 et X_2 des points expérimentaux sont représentés par les valeurs y_1 à y_8 . Le barycentre ainsi que les points milieux correspondent à des composites ayant 50% de TCP et 50% d'HA ($X_2 = 0$).

Nous avons envisagé de déplacer ces valeurs de $X_2 = 0$ à $X_2 = -0,2$ afin d'obtenir des composites présentant 60% HA et 40% TCP, pour se rapprocher d'une céramique commercialisée pour le comblement osseux

Pour comparer notre modèle à celui proposé par Doehlert, nous avons calculé les matrices d'erreurs du modèle. Les courbes d'erreur pour le modèle carré centré (annexe 6, figure 2) ainsi que pour le modèle carré (figure 3.15) dont la matrice d'expérience est présentée en annexe (annexe 6, tableau 1).

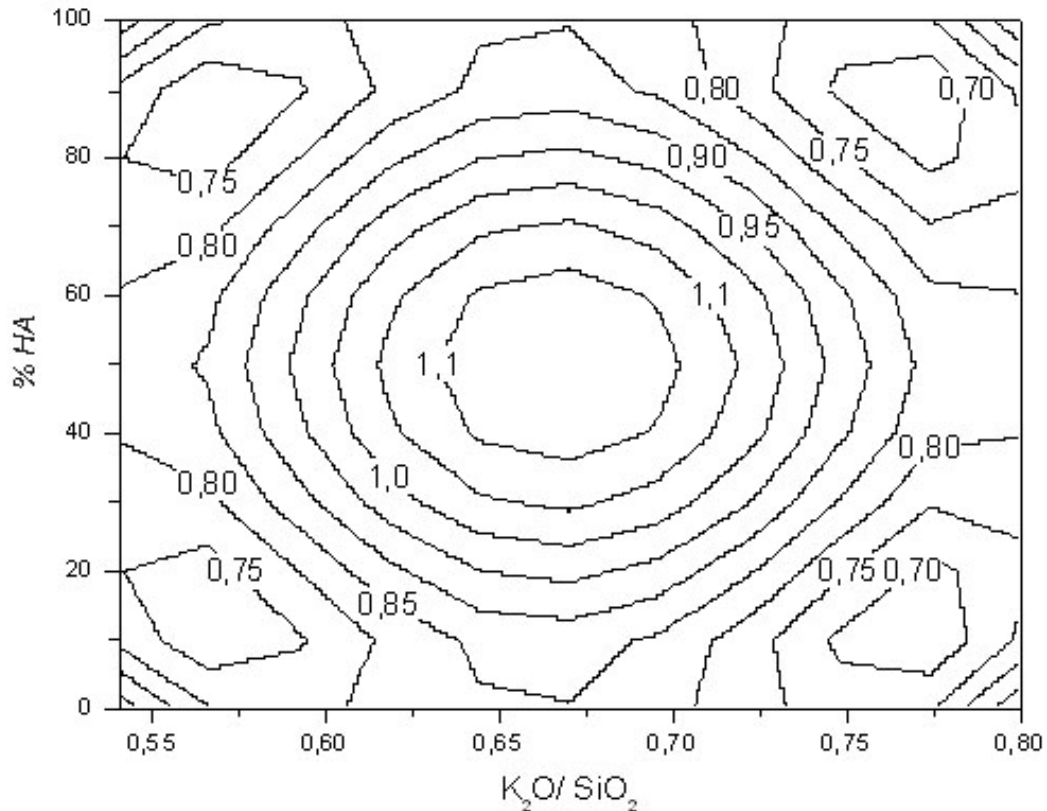


Figure 3.15 Courbe d'erreur calculée pour le modèle du plan carré non centré.

Le déplacement du point de validation de l'étude de $X_1 = 0$ $X_2 = 0$ à $X_1 = 0$ et $X_2 = -0,2$ ne modifie pas sensiblement les lignes d'erreurs égales (figure 3.15). La zone centrale où l'erreur expérimentale est inférieure à l'erreur du modèle est toujours présente. Cette contrainte n'empêche pas l'utilisation du plan carré car la validité du modèle sera déterminée dans cette zone. Les critères d'accords entre les valeurs calculées et les valeurs expérimentales en ce point seront plus exigeants : les écarts permis par le modèle par rapport à l'expérience seront plus faibles.

Les résultats expérimentaux des points y_i (i variant de 1 à 8) du domaine d'étude sont présentés dans le tableau 3-1. Pour établir l'équation reliant les paramètres de synthèse aux propriétés physiques que l'on détermine, il est nécessaire de calculer la matrice de coefficients a_i . La matrice des coefficients \hat{a} est obtenue à partir de la matrice d'expérience X et de la matrice des valeurs expérimentales y suivant la relation :

$$\hat{a} = (X^t X)^{-1} X^t y$$

X : la matrice d'expérience, X^t : la transposée de X et y : la matrice de résultats.

La matrice des valeurs calculées \hat{y} appliquée à tout le domaine est obtenu par l'équation suivante :

$$\hat{y} = X \hat{a}$$

Les incertitudes sur les mesures de porosité ($\Delta \% \text{poro}$) et de contrainte mécanique ($\Delta \sigma$) ont été calculées par la méthode statistique utilisant le coefficient de Student pour un intervalle à 95% de sûreté (détails en annexe 6).

N°	Nom	Rupture en compression		Pourcentage de porosité	
		$\sigma \text{ exp}$ ($\pm \Delta \sigma$) (MPa)	$\sigma \text{ cal}$ ($\pm \Delta \sigma$) (MPa)	porosité exp ($\pm \Delta \text{porosité}$) (%)	porosité cal ($\pm \Delta \text{porosité}$) (%)
y1	G54H_500	3,62 ($\pm 1,10$)	4,00 ($\pm 0,24$)	69 (± 4)	68 (± 1)
y2	G80H_500	1,88 ($\pm 0,30$)	1,87 ($\pm 0,24$)	79 (± 1)	80 (± 1)
y3	G54T_500	4,06 ($\pm 0,82$)	4,01 ($\pm 0,25$)	70 (± 3)	70 (± 1)
y4	G80T_500	1,60 ($\pm 0,23$)	1,47 ($\pm 0,25$)	79 (± 1)	80 (± 1)
y5	G67H_500	3,09 ($\pm 0,88$)	2,81 ($\pm 0,22$)	75 (± 1)	75 (± 1)
y6	G67T_500	2,28 ($\pm 0,57$)	2,50 ($\pm 0,22$)	77 (± 1)	76 (± 1)
y7	G54HT_500	5,38 ($\pm 2,88$)	4,93 ($\pm 0,22$)	64 (± 3)	66 (± 1)
y8	G80HT_500	1,92 ($\pm 0,20$)	2,09 ($\pm 0,22$)	79 (± 1)	77 (± 1)
y9	G67HT_500	2,91 ($\pm 0,61$)	3,3 ($\pm 0,30$)	75 (± 1)	73 (± 1)

Tableau 3-1 résultats des valeurs de contraintes à la rupture en compression et du pourcentage de porosité expérimentaux comparés aux valeurs théoriques obtenues par le plan d'expérience

Le point y9 permet de vérifier la validité du modèle, par comparaison entre les valeurs expérimentales obtenues en ce point et les valeurs théoriques calculées par le modèle.

I.3.1 Mise en équation de la relation pour le pourcentage de porosité

Le détail de la méthode est indiqué en annexe

Les pourcentages de porosité des échantillons choisis pour l'étude sont récapitulés dans le tableau 3-1. Ils définissent la matrice \hat{y} et permettent de déterminer la matrice de coefficient \hat{a} et les erreurs sur les coefficients $\sigma(\hat{a})$ (voir annexe 6).

L'équation du pourcentage de porosité (%poro) en fonction du rapport K_2O/SiO_2 (X_1) et de la proportion d'HA (X_2) est de la forme :

$$\%poro = 72,72 + 5,63 X_1 + 0,52 X_2 - 0,36 X_1^2 - 1,31 X_1^2 + 2,98 X_2^2$$

où X_1 et X_2 peuvent être directement reliés aux valeurs des rapports K_2O/SiO_2 et au % HA par les relations suivantes :

$$X_1 = \frac{K_2O/SiO_2 - 0,67}{0,13} \quad X_2 = \frac{50 - \%HA}{50}$$

Cette équation polynomiale du second degré correspond à une surface de réponse tridimensionnelle représentée sur la figure 3.16.

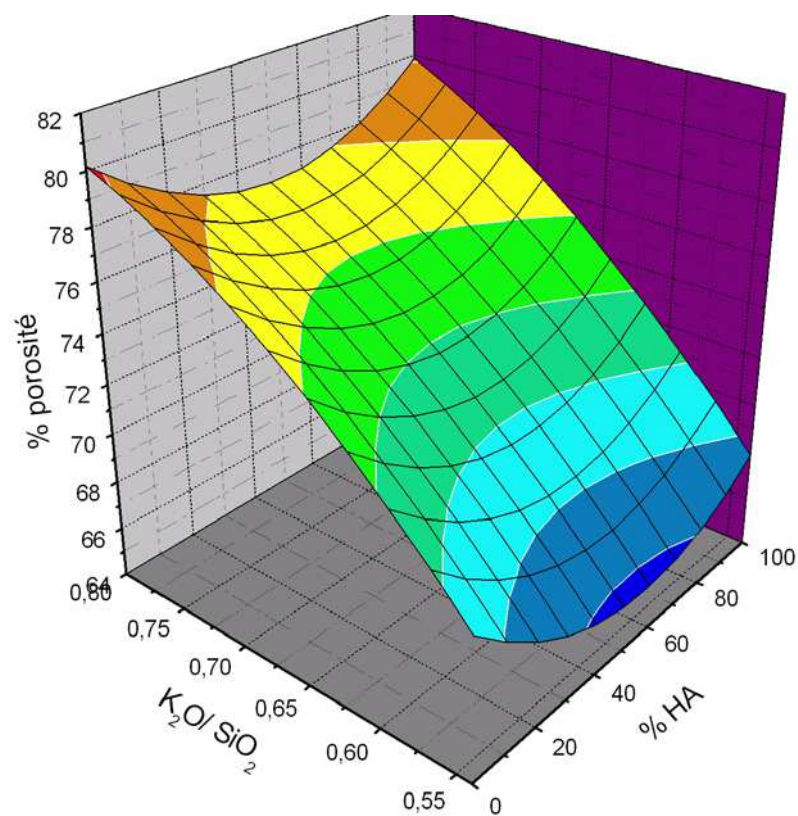


Figure 3.16 Surface de réponse du pourcentage de porosité en fonction du ratio K_2O/SiO_2 et du pourcentage massique d'hydroxyapatite (% HA).

I.3.2 Mise en équation de la relation pour la contrainte à la rupture

Les valeurs de contraintes à la rupture des échantillons choisis pour l'étude sont récapitulées dans le tableau 3-1. La comparaison d'un modèle linéaire et exponentiel a permis de définir la meilleure équation. Nous avons utilisé une équation exponentielle qui présente le meilleur accord avec l'expérience. L'équation de la contrainte maximale à la rupture en compression (σ (MPa)) en fonction du rapport K_2O/SiO_2 (X_1) et du la proportion d'hydroxyapatite (% HA) (X_2) est de la forme :

$$\sigma(\text{MPa}) = 3,298 \exp(-0,44 X_1 - 0,058 X_2 - 0,06 X_1^2 - 0,029 X_1^2 - 0,217 X_2^2)$$

Equation 3

De même que pour le pourcentage de porosité, X_1 et X_2 peuvent être directement reliés aux valeurs des rapports K_2O/SiO_2 et au % HA par les relations suivantes :

$$X_1 = \frac{K_2O/SiO_2 - 0,67}{0,13} \quad X_2 = \frac{50 - \%HA}{50}$$

Cette équation exponentielle correspond à une surface de réponse tridimensionnelle représentée sur la figure 3.17.

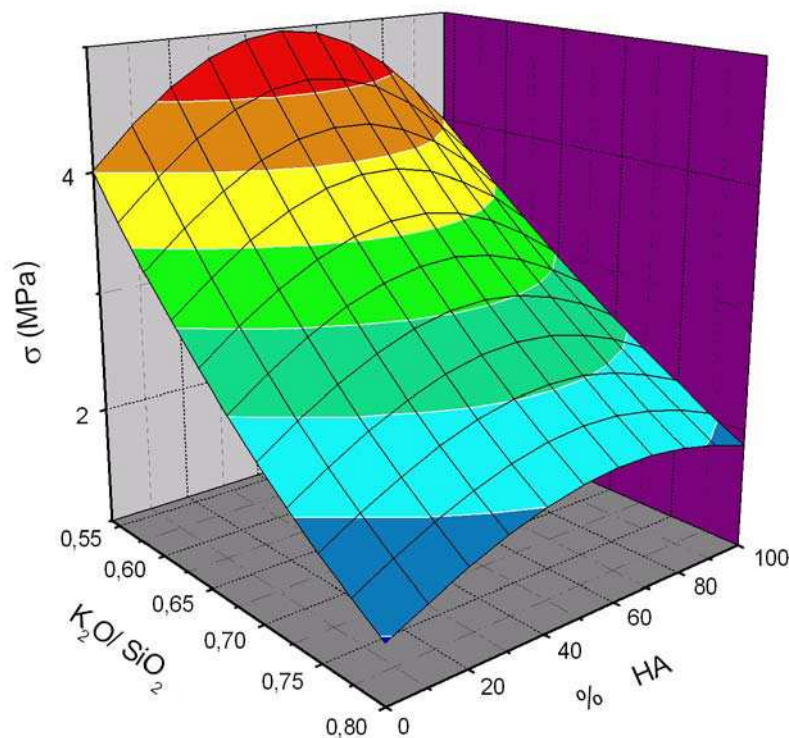


Figure 3.17 Surface de réponse de σ_c (MPa) en fonction du ratio K_2O/SiO_2 et du pourcentage massique d'Hydroxyapatite (%HA)

I.3.3 Validité des modèles

Chacun des modèles a été établi à partir de 8 points expérimentaux dans l'objectif de décrire l'ensemble du domaine d'étude. Le modèle obtenu est évalué par trois paramètres statistiques : le test de Fisher (F), le calcul du R^2 et le diagramme des résidus (les détails de ces méthodes sont donnés en annexe 6).

Le test de Fisher est le rapport de la variance expérimentale par la variance du modèle [1]. Plus F est faible et meilleur est l'accord entre le modèle et l'expérience. F correspond à la probabilité que la variance d'ajustement (du modèle) soit négligeable devant la variance expérimentale. Ce qui équivaut à dire que la variance d'ajustement du modèle est nulle si on la compare à l'erreur aléatoire des réponses mesurées. Des tables permettent d'encadrer les valeurs de F obtenues

R^2 permet d'évaluer le degré de compréhension des valeurs expérimentales, il est compris entre 0 et 1. Si $R^2=1$, le modèle explique tout le domaine, au contraire si $R^2 = 0$, le modèle ne reflète aucune réalité.

La courbe des résidus traduit la différence entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées, en fonction des valeurs expérimentales. Si les valeurs des ordonnées varient de manière non aléatoire, le modèle proposé n'est pas valide car il a omis des informations.

Si ces trois tests valident le modèle proposé, la dernière étape consiste à synthétiser des échantillons de composition $X_1 = 0$ et $X_2 = -0,2$ (échantillons G67HT_500) afin de comparer les valeurs calculées et théoriques au point situé au milieu du domaine.

a - Validité du modèle polynomial (%porosité)

Les valeurs de F et R^2 obtenues pour ce modèle (équation 2) sont

$$F^{98}_8 = 1,43$$

$$R^2 = 0,999$$

La courbe des résidus est présentée sur la figure 3.18. Le test de Fisher a été calculé en comparant les résultats expérimentaux (98 degrés de libertés) aux résultats théoriques (8 degrés de libertés) dont le détail du calcul est donné en annexe 6. D'après l'extrait de table de Fisher-Snedecor pour $P=0.95$ (annexe 6), F^{89}_8 est inférieur à $F^{60}_8= 2,1$ et même à $F^{120}_8= 2,02$ donc la différence de variance est négligeable et le modèle est validé.

La valeur de R^2 indique un bon accord en tout point du domaine entre les valeurs calculées et expérimentales. Le diagramme des résidus présente des valeurs de faible amplitude. Il n'y a pas de loi pour décrire leur variation, le modèle n'omet pas d'informations.

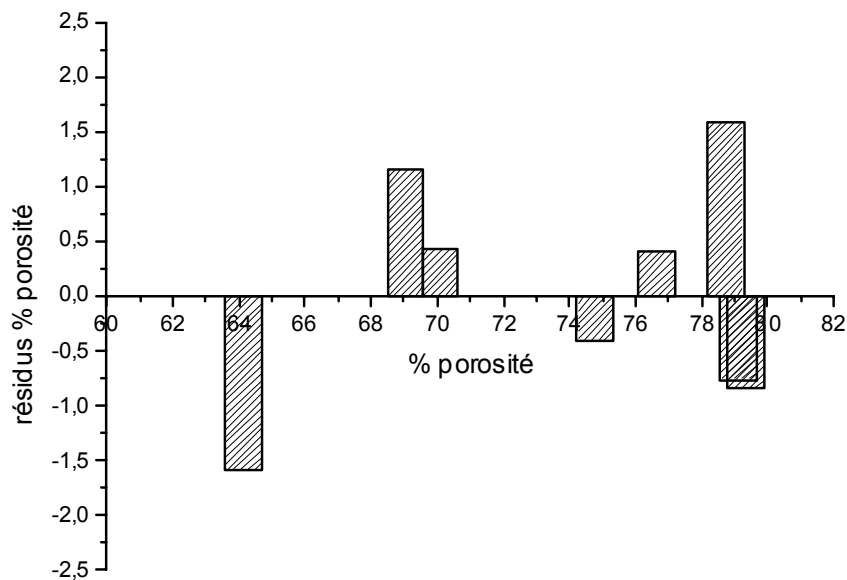


Figure 3.18 courbe des résidus. En abscisse les valeurs expérimentales du pourcentage de porosité

b - Validité du modèle exponentiel (contrainte à la rupture)

Les tests de Fisher (F) et R^2 calculés pour l'équation 3 donnent les résultats suivant :

$$F^{98}_8 = 0,92$$

$$R^2 = 0,994.$$

La courbe des résidus est présentée figure 3.19.

La valeur de R^2 indique un bon accord entre le modèle et l'expérience.

Comme précédemment, F^{98}_8 a été calculé avec toutes les valeurs obtenues pour chaque échantillon. Le détail du calcul est donné dans l'annexe 6. Les degrés de libertés sont toujours de 98 pour les valeurs expérimentales et 8 pour les valeurs théoriques, la valeur du test est inférieure à la limite indiquée dans la table : l'erreur du modèle est négligeable devant l'erreur aléatoire de l'expérience et le modèle est validé.

L'étude du diagramme de résidus montre une inhomogénéité des résidus, traduisant une absence de loi. Les valeurs des résidus augmentent avec l'augmentation des valeurs des contraintes.

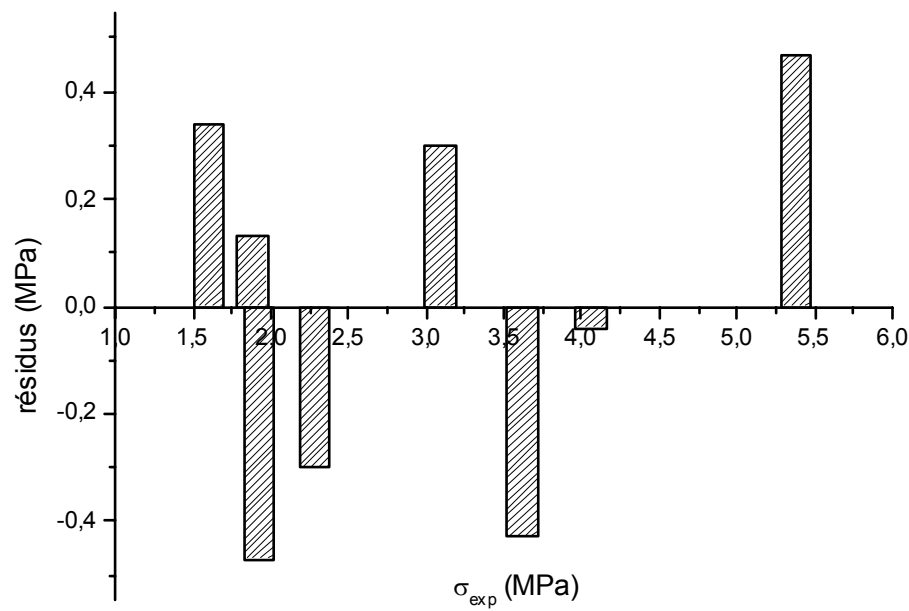


Figure 3.19 courbe des résidus. En abscisse les valeurs de la contrainte à le rupture en compression

c - Comparaison au centre du domaine

Les deux modèles que nous avons utilisés pour représenter l'influence de paramètres de synthèses sur les propriétés physiques des échantillons sont validés par les trois tests statistiques décrits en annexe.

Afin de vérifier le modèle, nous avons synthétisé 7 échantillons G67HT_500 (tableau 3-1 point y9) dont la composition correspond au centre du domaine d'étude : X_1 (K_2O/ SiO_2) = 0,67 et X_2 (60 % en masse d'hydroxyapatite) = - 0,2.

Aussi bien pour le pourcentage de porosité que pour la contrainte à la rupture, la différence entre les valeurs expérimentales et calculées est inférieure à l'incertitude sur la mesure.

$$|\sigma_{exp} - \sigma_{call}| = 0,39$$

$$\Delta \sigma_{exp} = 0,61$$

$$|\%poro_{exp} - \%poro_{call}| = 1$$

$$\Delta \%poro = 1$$

Les modèles peuvent décrire l'évolution se produisant dans le domaine d'étude.

I.4 Discussion

Les géopolymères purs G54, G67 et G80 ainsi que leurs composites avec HA et/ ou TCP (H, T ou HT) ont été étudiés en fonction de la température de traitement thermique.

Les géopolymères purs présentent les pourcentages de porosité les plus importants (de l'ensemble de ces matériaux), ce sont également les matériaux qui présentent les valeurs de ruptures en compression les plus faibles.

L'ajout des phosphates de calcium diminue le pourcentage de porosité de ces matériaux. Les résultats des essais de rupture en compression ont montré que ce sont les composites qui présentent les meilleurs résultats (par comparaison aux géopolymères purs) et ce quels que soient la température et le géopolymère utilisés (G54, G67 ou G80).

Quelle que soit la matrice géopolymère constitutive des composites, l'augmentation de la température de traitement thermique est liée à une augmentation du pourcentage de porosité de tous les matériaux.

Cette augmentation des pourcentages de porosités (fonction de la température de traitement) s'accompagne d'une diminution des propriétés mécaniques des géopolymères purs.

Les valeurs moyennes de contraintes à la rupture des composites sont plus élevées après le traitement à 500°C qu'après le traitement à 250°C. Ces matériaux (traités à 500°C) ont une porosité plus importante mais plus homogène ce qui peut expliquer les résultats mécaniques.

L'étude par la méthode des surfaces de réponse a permis de vérifier que dans l'ensemble du domaine d'étude, les matériaux qui présentent le meilleur compromis entre pourcentage de porosité et propriétés mécaniques sont les composites G54HT_500 : des associations entre un géopolymère défini par le rapport $K_2O/SiO_2 = 0,54$ et par l'ajout de 13% en masse d'un mélange d'hydroxyapatite et de phosphate tri-calcique.

L'ensemble des résultats obtenus (valeurs de pH, propriétés mécaniques et pourcentage de porosité) nous ont permis de sélectionner la meilleure série de matériaux : les composites à matrice G54. Une fois traités thermiquement à 500°, ces échantillons présentent les valeurs de pH les plus proches de celles du pH physiologique et le meilleur compromis entre le pourcentage de porosité et les propriétés mécaniques (récapitulés dans le tableau 3-2 page suivante).

II Evaluation *in vitro* des échantillons géopolymères purs (G54_500) et des composites géopolymères/ phosphates de calcium (G54H_500, G54T_500 et G54HT_500).

II.1 Choix des matériaux à analyser

Les différents matériaux que nous avons élaborés et décrits précédemment présentent des caractéristiques intéressantes (pH, porosité et propriétés mécaniques). Ces matériaux à matrice géopolymère présentent plusieurs avantages :

- Synthèse à température ambiante
- Porosité importante
- Une structure amorphe

Les synthèses et les caractérisations physico-chimiques et mécaniques des géopolymères purs et composites géopolymères/ phosphates de calcium nous ont permis de déterminer les matériaux présentant le meilleur compromis entre porosité et propriétés mécanique : les géopolymères G54 de rapport $K_2O/SiO_2 = 0.54$ traités à 500°C.

Dans cette partie, nous allons nous intéresser à la série de matériaux : G54_500, G54H_500, G54T_500, G54HT_500 dont les principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 3-2.

Nom	K_2O/SiO_2	Traitement Thermique	pH	Porosité (%)	σ_c (MPa)
G54_500	0,54	500	7,0 ($\pm 0,1$)	77 (± 2)	1,79 ($\pm 0,37$)
G54H_500	0,54	500	7,4 ($\pm 0,2$)	69 (± 4)	3,62 ($\pm 1,10$)
G54T_500	0,54	500	7,1 ($\pm 0,1$)	70 (± 3)	4,06 ($\pm 0,82$)
G54HT_500	0,54	500	7,2 ($\pm 0,1$)	64 (± 3)	5,38 ($\pm 2,88$)

Tableau 3-2 Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour les échantillons à matrice géopolymère

Cette partie de l'étude porte sur l'analyse du comportement *in vitro* de ces matériaux avec les études suivantes :

- Bioactivité des échantillons immergés dans une solution de SBF
- Relargage éventuels d'aluminium, de calcium et de phosphore des matériaux
- Toxicité cellulaire des matériaux (tests MTT et MEB).

II.2 Analyse des matériaux immergés dans une solution SBF

Les échantillons de géopolymère pur (G54_500) et les composites (G54H_500, G54T_500 et G54HT_500) ont été immergés dans une solution de SBF (Simulated Body Fluid) de composition ionique voisine de celle du plasma sanguin humain (tableau 3-3). Le protocole de synthèse du SBF est présenté en annexe 7.

Cette étude permet de recréer, en l'absence de cellules, des conditions favorables à la précipitation d'hydroxyapatite à la surface de matériaux bioactifs. Nous nous sommes intéressés à l'évolution de la surface de nos échantillons et des concentrations des ions en solution en fonction du temps [3,4].

	Concentration dans la solution de SBF (mM/L)	Concentration dans le plasma sanguin (mM/L)
Na ⁺	142	142
K ⁺	5	5
Mg ²⁺	1.5	1.5
Ca ²⁺	2.5	2.5
Cl ⁻	147.8	103
HNO ₃ ⁻	4.2	27
HPO ₄ ²⁻	1	1
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5

Tableau 3-3 Tableau récapitulatif des concentrations des différents éléments présents dans le SBF de synthèse et le plasma humain [4].

II.2.1 Protocole d'étude

Nous avons défini 11 délais allant de 2 heures à 30 jours afin d'observer des modifications éventuelles des matériaux à court et long termes [5,6].

Les échantillons à étudier ont été pesés et immergés dans la solution de SBF suivant la proportion de 1 mg de matière pour 1 mL de solution [7]. Nous avons utilisé des flacons en polyéthylène d'un volume de 60 mL contenant les matériaux dans le SBF qui ont été hermétiquement fermés avant d'être placés dans l'étuve à 37°C.

Pour chaque série de matériaux, des triplicatas ont été réalisés. Des flacons de SBF pur (sans échantillon immergé) ont également été placés dans l'étuve comme référence pour chacun des délais.

Afin de permettre une inter comparaison des matériaux étudiés (structures et états de surface), les échantillons ont tous été usinés. Après le traitement thermique à 500°C, les sphères de matériaux obtenues sont découpées en leur milieu afin d'obtenir une surface plane. Des cylindres de diamètre 15 mm ont été usinés. Des pastilles d'épaisseur 3 mm ont été découpées à partir de ces cylindres et séchées à l'étuve à 37°C.

Les matériaux (de masse 60 mg) ont été stockés sous la hotte à flux laminaire jusqu'à leur utilisation.

II.2.2 Analyse des solutions en fonction du temps d'immersion et du type de matériau.

a Variation du pH des solutions

Les pH des solutions de SBF ont été mesurés pour chaque durée d'immersion de l'échantillon.

Les résultats présentés figure 3.20 correspondent à la moyenne des valeurs de pH de chacune des trois solutions obtenues pour chaque délai avec chacun des matériaux.

Les valeurs de pH de l'ensemble des solutions sont comprises entre 6.9 et 7.5. A $t = 0$ (avant immersion) le pH des solutions est de 7.

L'ajout des différents matériaux a provoqué une légère augmentation du pH en fonction du temps. Cette augmentation est accentuée avec la durée d'immersion, elle est fonction de l'échantillon immergé. Même après 1 mois d'immersion, le pH de toutes les solutions reste voisin du pH physiologique.

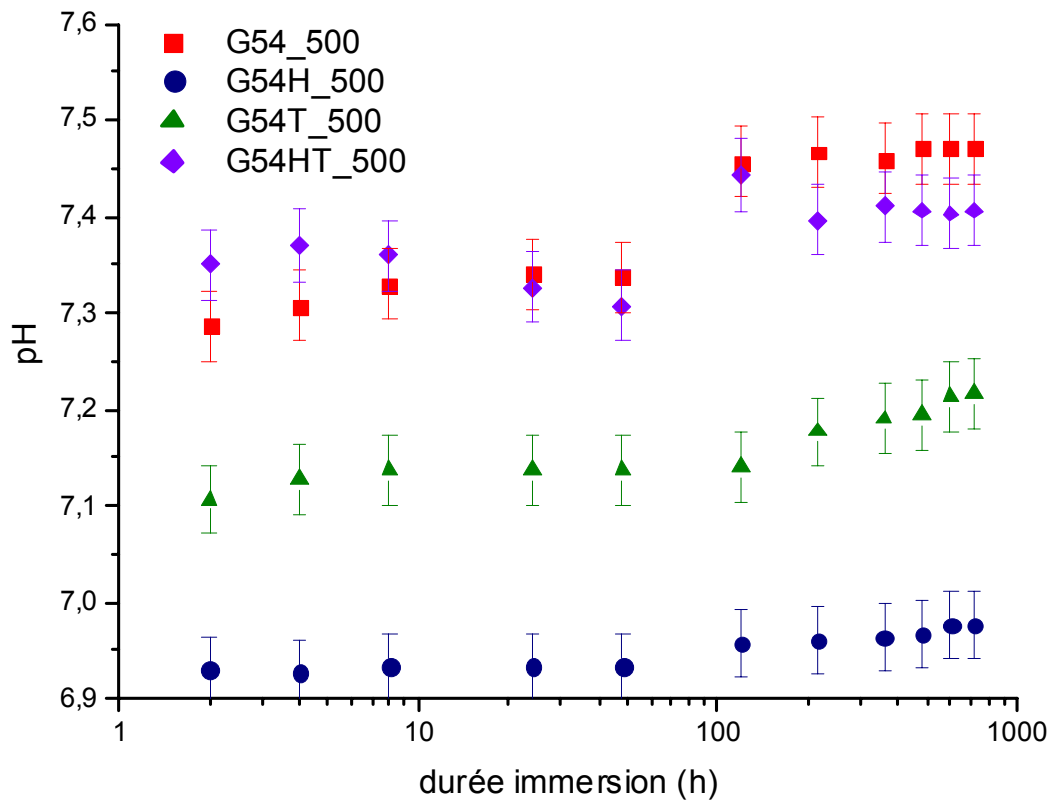


Figure 3.20 Evolution du pH de la solution de SBF en fonction du temps, après immersion des échantillons G54H_500, G54T_500 et G54HT_500.

b Analyse multi élémentaire des solutions SBF par ICP (Induced Coupled Plasma)

- **Principe de la méthode et protocole expérimental**

Lors de l'analyse par ICP, une source plasma permet d'exciter les atomes dont le cortège électronique absorbe de l'énergie et se désorganise. Le retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission d'un photon dont la longueur d'onde est caractéristique de l'élément excité.

Un flux d'argon est chauffé par une radiation radiofréquence ce qui génère un plasma dans une bobine à induction. La température est comprise entre 5000 et 10000 K suivant la zone du plasma. Un nébuliseur atomise la solution à étudier et la conduit jusqu'au plasma. Les atomes en contact avec le plasma s'excitent et émettent de l'énergie dont les longueurs d'onde sont caractéristiques de l'élément à étudier.

Dans notre étude, des phénomènes d'interférences ont rendu impossible l'étude des éléments silicium (la torche utilisée est en silicium) et potassium (rapport signal sur bruit de fond trop faible). Pour les autres éléments, les longueurs d'onde ont été choisies afin de minimiser les interférences. Ces longueurs d'ondes sont récapitulées dans le tableau 3-4.

Elément	λ (nm)	seuil détection
Al	396.152	28 ppb
Mg	279.553	0.2 ppb
P	213.618	76 ppb
Ca	393.366	0.2 ppb

Tableau 3-4 Tableau récapitulatif des éléments analysés de leurs longueurs d'onde et de leurs limites de détections respectives

Les solutions de SBF ayant contenu des échantillons sont diluées au 10^{ème} suivant le protocole suivant :

1 ml de solution à étudier est dilué dans 9 ml de HNO₃ 0,5 M. Nous nous sommes intéressés aux éléments Ca, P, Mg et Al. Les trois premiers éléments sont initialement présents dans le milieu alors que l'aluminium est exclusivement contenu dans les échantillons avant immersion.

Nous avons travaillé sur l'appareil Jobin Yvon JY24 de l'équipe « chimie des matériaux inorganiques » de l'INSA de Rennes. Cet appareil est muni d'un monochromateur qui a permis une étude en longueur d'onde élément par élément.

Pour chacun des éléments étudiés, une recherche de pics est réalisée au préalable sur une solution étalon. La calibration de l'appareil a été effectuée avec l'étalon le plus concentré.

Avant d'étudier les solutions de SBF, il a été nécessaire d'étalonner l'appareil pour obtenir la correspondance entre intensités mesurées et concentrations. Pour chacun des éléments, 5 solutions étalons ont été réalisées. La mesure de ces étalons a permis d'obtenir des droites d'étalonnages présentées figure 3.21 et les valeurs des limites détections. Pour chaque solution analysée, 5 mesures ont été effectuées successivement avec un temps de rinçage de 90 s avant la première mesure. Grâce à ces différents étalonnages, la valeur moyenne et l'erreur sur chaque solution a été calculée par le programme d'analyse.

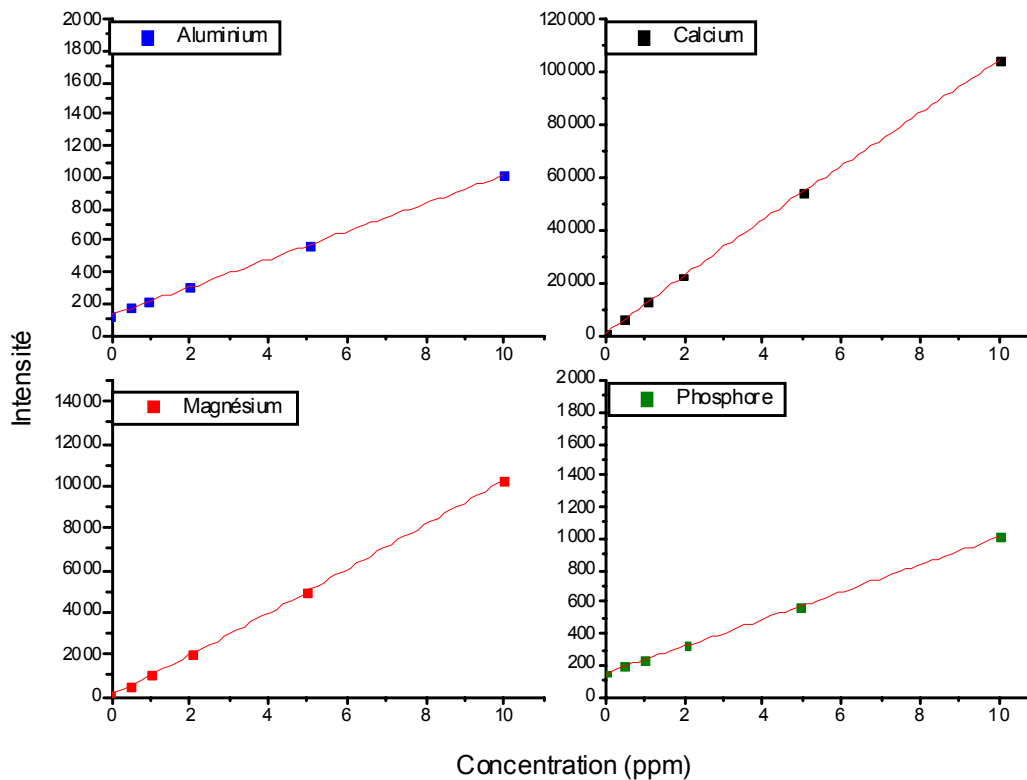


Figure 3.21 Droites d'étalonnages permettant la calibration et la correspondance Intensités/ concentrations

- **Résultats des analyses des éléments Ca, P et Mg**

Le calcium et le phosphore sont présents dans la solution et dans les échantillons composites G54HT_500, G54H_500 et G54T_500. Une première étude jusqu'à 30 jours a mis en évidence une diminution des teneurs en calcium et phosphore du composite G54HT_500 (figure 3.22 points noirs). Afin de vérifier cette tendance, une seconde série de mesure a été réalisée pour des délais allant de 2h à 60 jours avec les mêmes échantillons. Pour cette seconde étude, aucune évolution des concentrations n'a été observée (figures 3.22 et 3.23, points bleu clair). Ce qui permet de conclure que la diminution observée lors de la première série de mesures pour le phosphore n'est pas significative.

Cette absence de variation des concentrations met en évidence l'absence de précipitation d'une couche de phosphate de calcium en surface et la non dissolution des phosphates inclus dans la matrice géopolymère.

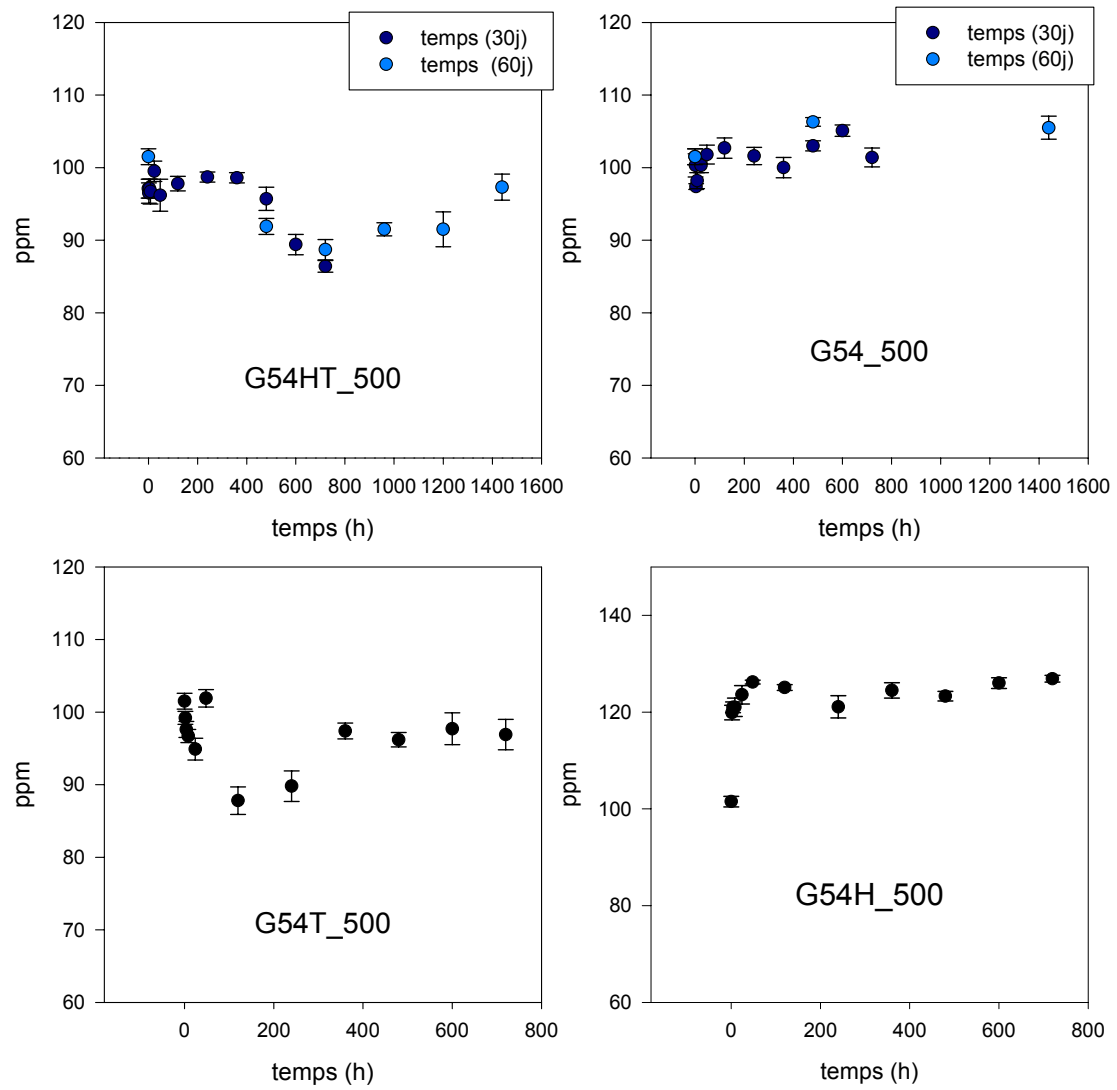


Figure 3.22 concentrations en calcium des solutions ayant contenues l'un des 4 échantillons

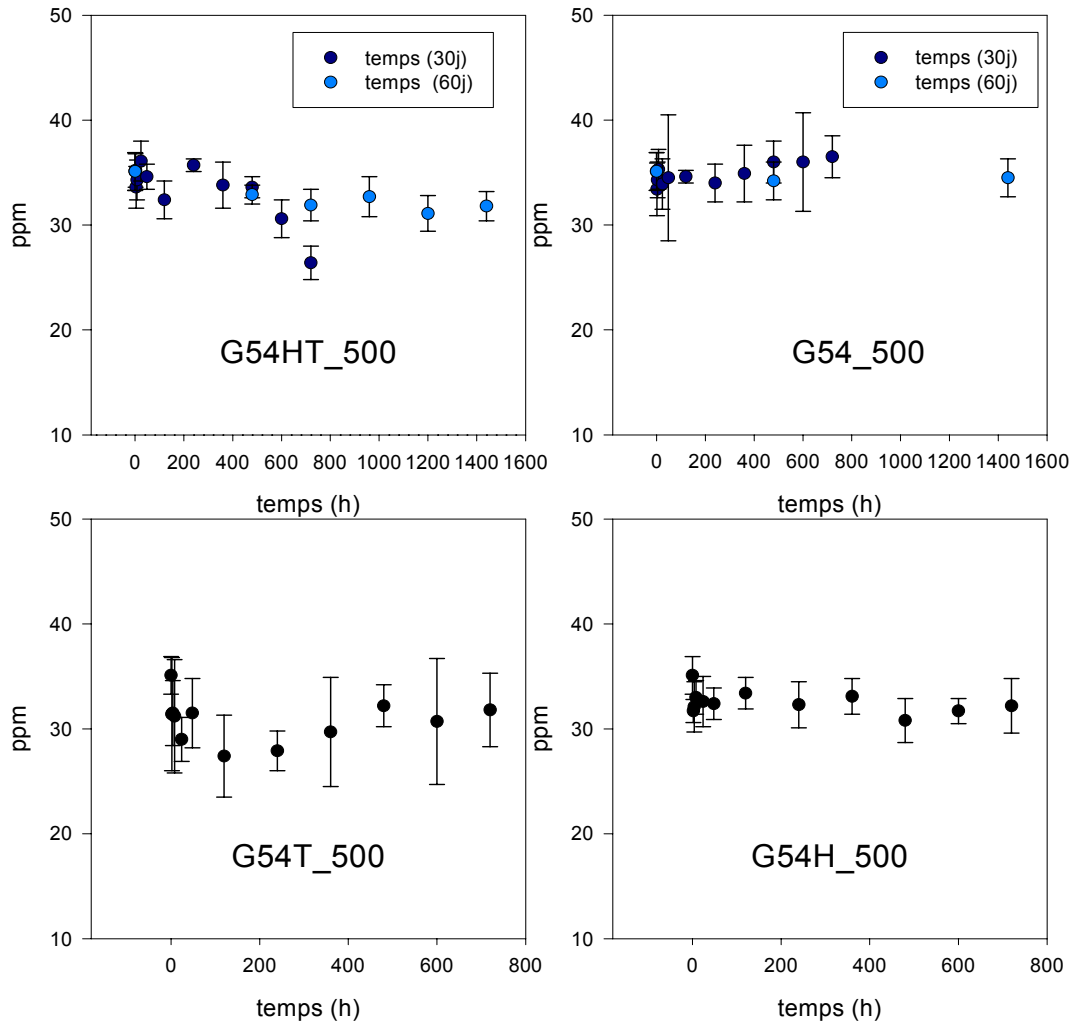


Figure 3.23 concentrations en phosphore des solutions ayant contenues l'un des 4 échantillons

L'étude des concentrations en magnésium des solutions de SBF (figure 3.24) ne montre aucune évolution au cours du temps, quel que soit l'échantillon immergé. Il n'y a aucune précipitation de sels contenant du magnésium. Cet élément n'étant présent que dans la solution de SBF, il n'est pas fixé par les différents matériaux immergés comme cela peut être le cas lors d'études de composés bioactifs [8].

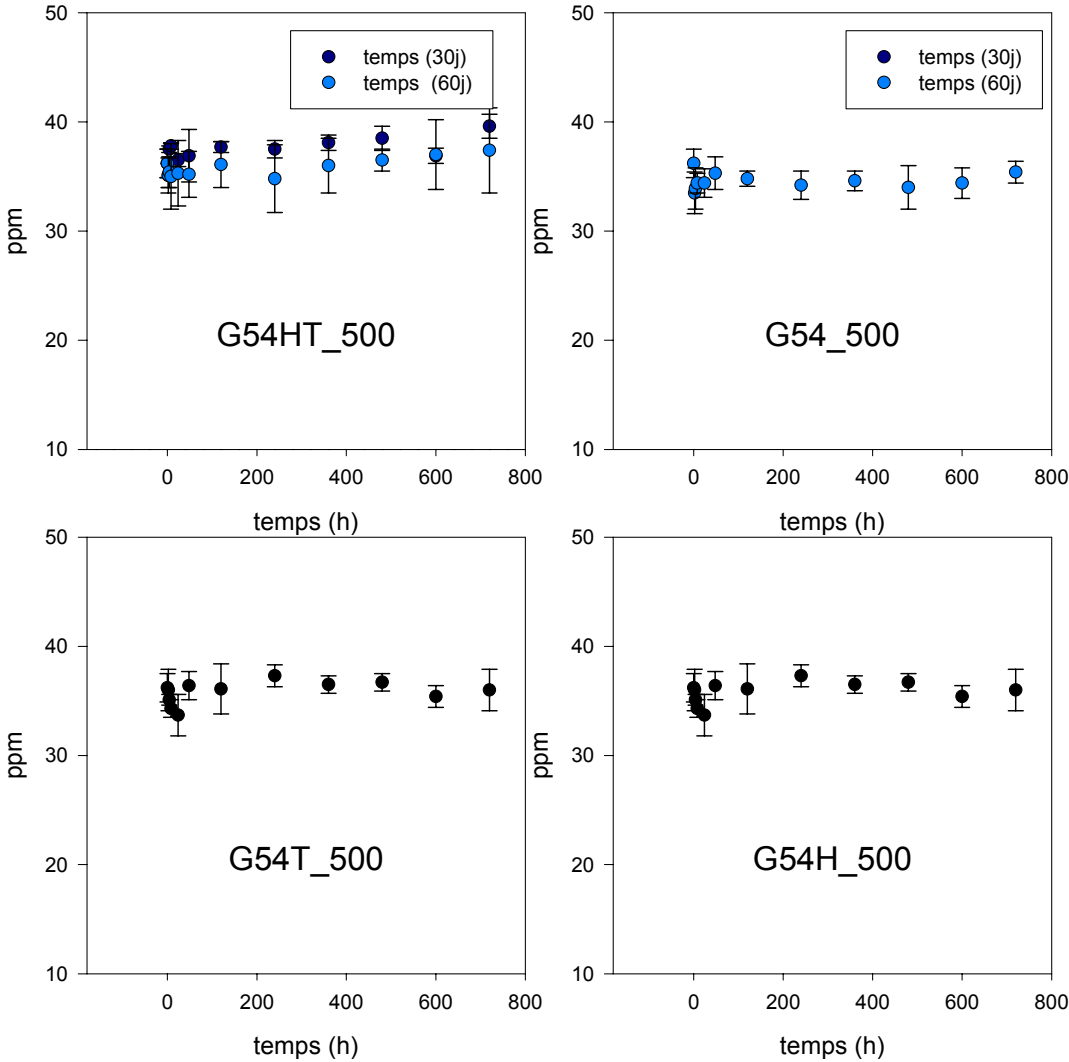


Figure 3.24 concentrations en magnésium des solutions ayant contenues l'un des 4 échantillons

- Résultats des analyses de l'élément aluminium (figure 3.25)

Cet élément n'est constitutif que de la matrice géopolymère. L'étude réalisée sur un délai d'immersion allant jusqu'à 2 mois (pour le G54_500 et le composite G54HT_500) ne montre aucune contamination des solutions par l'aluminium.

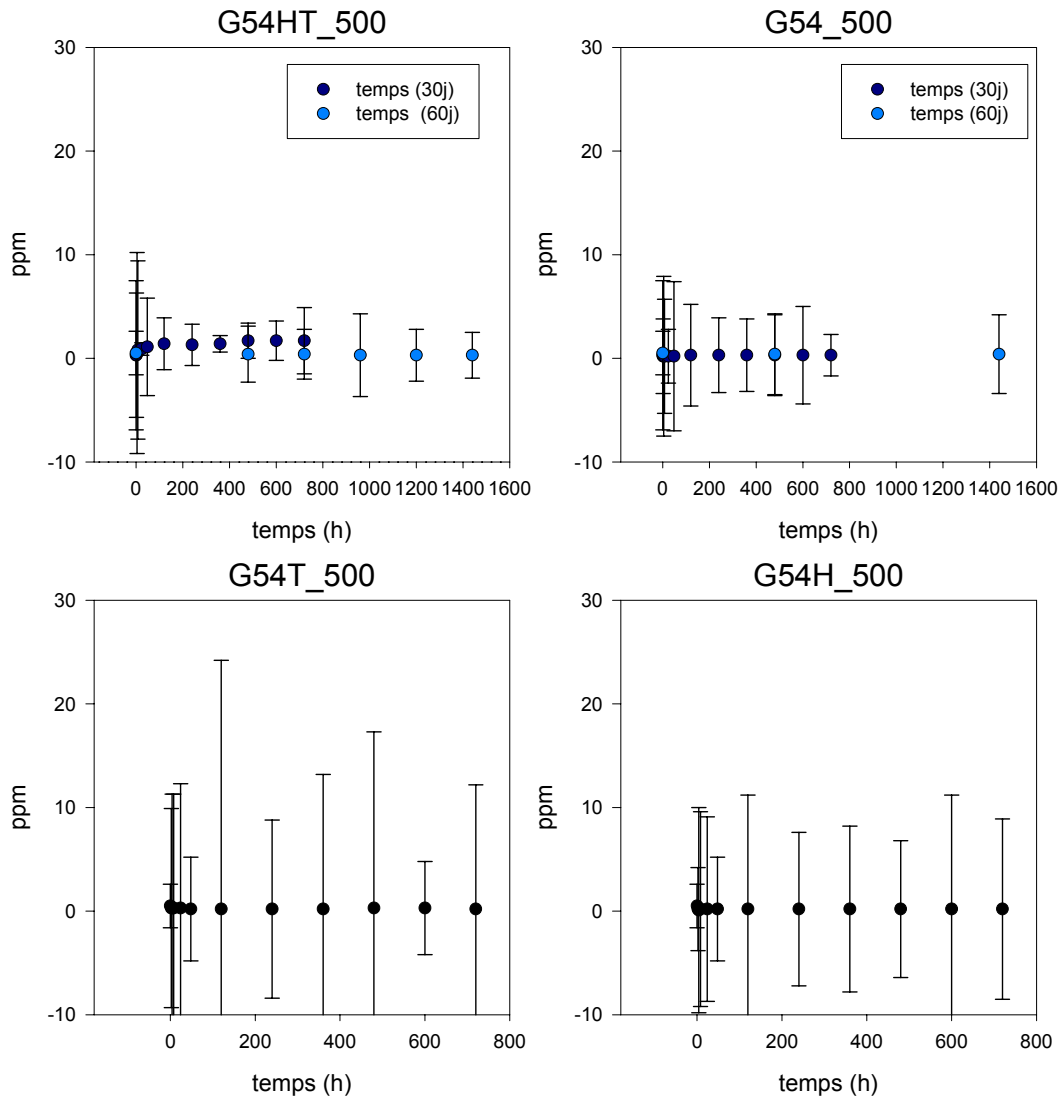


Figure 3.25 concentrations en aluminium des solutions ayant contenues l'un des 4 échantillons

II.2.3 Analyse des matériaux après immersion dans le SBF

Aucune perte de masse n'a été observée pour chacun des échantillons, quel que soit le délai d'immersion

a - Etude des modifications morphologiques en fonction du temps d'immersion.

- **Morphologie des échantillons avant immersion**

Avant immersion dans la solution de SBF, les images MEB des géopolymères purs G54_500 et des composites présentent une morphologie poreuse. Les cavités sont séparées par des parois poreuses (chapitre 3). Les figures 3.26 et 3.27 présentent des détails des échantillons avant immersion. Les parois ont un aspect vitreux où sont visibles des inclusions de silice. Ces inclusions de quelques microns de diamètre sont présentes sur les parois des géopolymères purs et des composites, à l'intérieur des cavités.

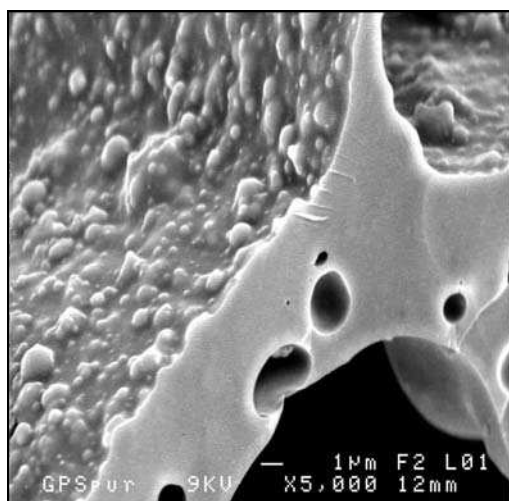


Figure 3.26 Morphologie du G54_500 avant immersion

Les figures des composites G54H_500, G54T_500 et G54HT_500 à fort grossissement (x 2000 et x 5000) permettent d'observer les inclusions de phosphates de calcium dans la matrice géopolymère (figure 3.27).

Les inclusions visibles sur les clichés MEB se différencient de l'aspect vitreux de la matrice géopolymère par leur aspect granuleux. Les zones de phosphate de calcium sont étendues sur quelques dizaines de microns.

Les seuls dépôts éventuellement visibles avant immersion dans la solution de SBF sont des débris de matériaux de petites tailles (quelques microns), ils sont présents à la surface des cavités (figure 3.27).

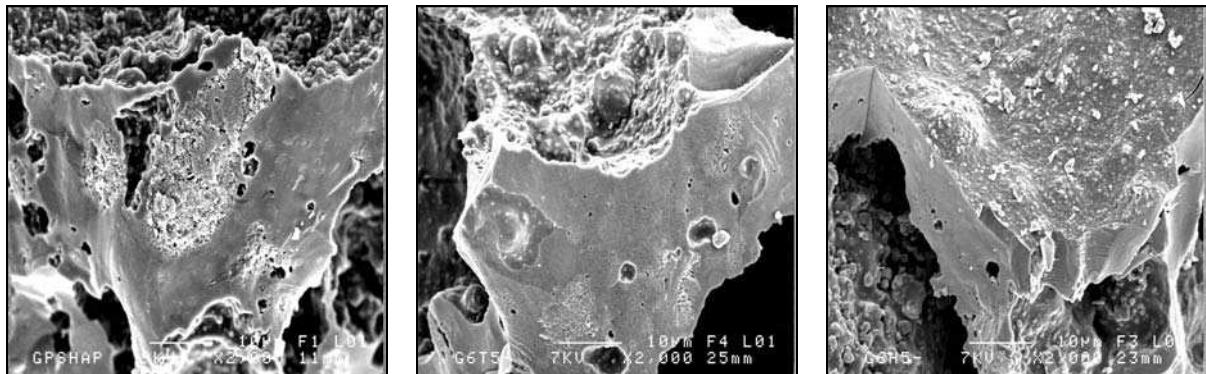


Figure 3.27 morphologies des composites G54H_500, G54T_500 et G54HT_500 avant immersion dans la solution de SBF.

- **Morphologie des échantillons après immersion**

Après une courte immersion des matériaux dans la solution de SBF (2h, 4h et 8h), aucune modification morphologique n'a été observée à la surface des géopolymères purs et des composites. La figure 3.28 présente quelques débris en surface, ces débris étaient déjà visibles avant l'immersion. Les matériaux ne sont pas altérés, les inclusions de phosphate de calcium sont toujours présentes. Il est impossible de différencier les composites entre eux et d'établir des différences en fonction du temps d'immersion. Après des temps d'immersions de 1 à 2 jours, les morphologies de composites sont similaires, les images MEB ne sont pas toutes présentées ici.

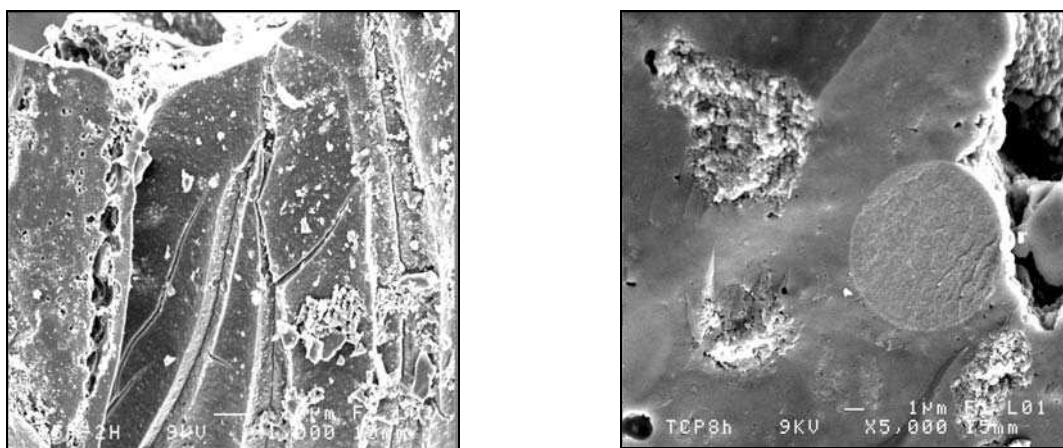


Figure 3.28 morphologies des échantillons G54_500 après 2 heures d'immersion et G54T_500 après 8 heures d'immersion dans la solution de SBF.

48 h après le début de l'étude, les échantillons ne présentent pas de modification morphologique, le géopolymère pur G54_500 (figure 3.29) se caractérise toujours par un grand nombre de billes de silice fortement incluses dans la matrice. Les composites présentent une morphologie superficielle similaire au G54T_500 (figure 3.29) : le phosphate de calcium est toujours présent sous forme d'inclusions dans la matrice géopolymère.

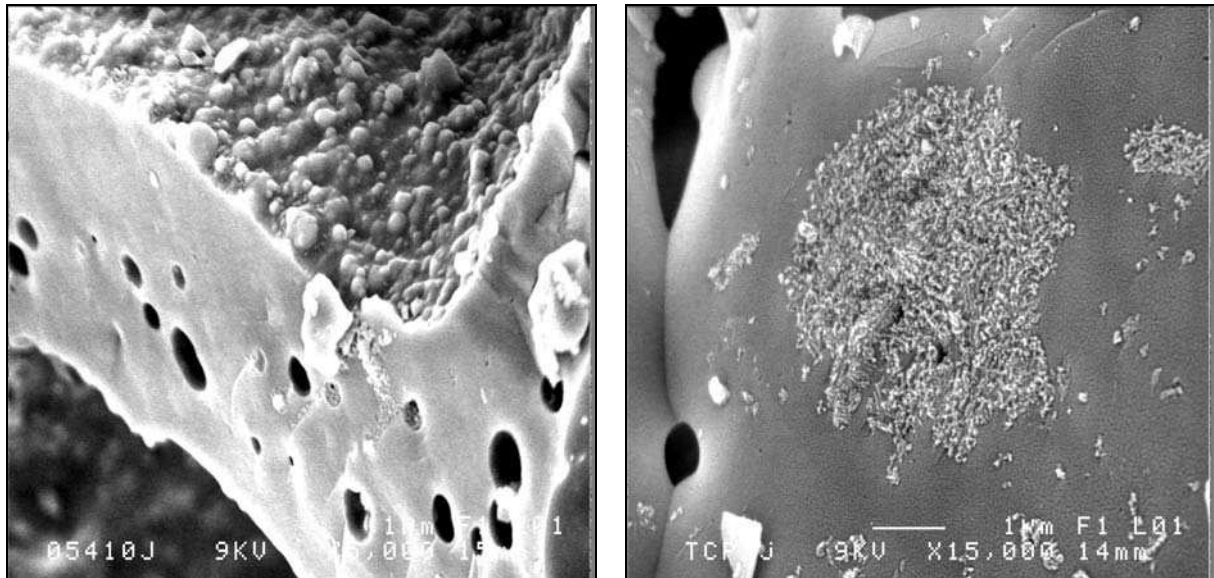


Figure 3.29 Morphologies des échantillons G54_500 après 2 jours d'immersion et G54T_500 après 2 jours d'immersion dans la solution de SBF.

La surface des composites est parsemée de cristaux de phosphates de calcium de taille submicronique. Ces cristaux peuvent provenir de l'inclusion de phosphate de calcium ou de la précipitation à partir de la solution de SBF.

Les matériaux bioactifs favorisent la précipitation de cristaux de phosphate de calcium sur leur surface lorsqu'ils sont immergés dans une solution de SBF. D'après la littérature, le dépôt d'hydroxyapatite est visible sur l'ensemble de la surface de l'échantillon immergé [7]. Les matériaux à matrice géopolymère (figure 3.29) ne présentent pas de zone de dépôt étendue. Il semblerait donc que les cristaux de phosphates calcium observés proviennent des inclusions plus que de la solution.

Après une immersion prolongée (entre 5 et 30 jours), les différences observées entre les composites en fonction des différents délais d'immersion ne sont pas significatives. La figure 3.30 présente des détails de surface du géopolymère pur G54_500 14 jours après immersion, ainsi que du composite G54HT_500 après 30 jours dans le SBF.

Pour le géopolymère pur, l'état de surface entre les délais 5 jours et 30 jours n'a pas évolué, de nombreux débris sont présents en surface du matériau, ils ne sont pas consécutifs à l'immersion prolongée mais à la manipulation du matériau. Les billes de silice sont toujours présentes même après 30 jours en solution, la dissolution du matériau ne permet pas leur relargage. Aucun dépôt n'a été observé sur la surface du matériau.

La morphologie générale des échantillons est similaire à celle des matériaux avant immersion : coexistence de la matrice géopolymère d'aspect vitreux et d'inclusions de phosphates de calcium.

Aucun des trois composites ne présente de dépôt d'hydroxyapatite sur une majorité de la surface. Des cristaux sont visibles sur certains matériaux (géopolymère pur et composites) à des délais variables. L'analyse EDS a indiqué qu'il s'agit de cristaux de NaCl, précipités à partir des ions en solutions. Ces précipités ne dépendent pas du temps d'immersion ni du type d'échantillon, leur quantité est fonction de la qualité de rinçage des matériaux à l'eau distillée avant séchage.

Ces observations confirment les résultats obtenus par ICP qui n'avaient mis en évidence aucune diminution des concentrations en Ca, P et Mg qui auraient pu traduire la précipitation en surface de ces éléments.

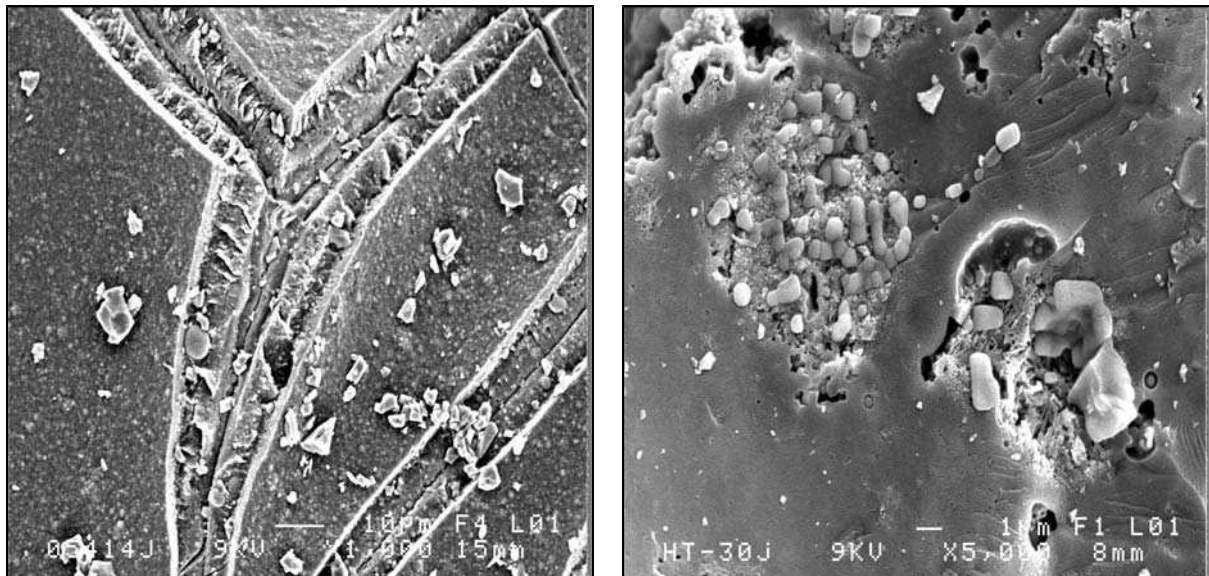


Figure 3.30 morphologies des échantillons G54_500 après 14 jours d'immersion et G54HT_500 après 30 jours d'immersion dans la solution de SBF.

b - Etude des modifications structurales en fonction du délais d'immersion.

La technique FTIR [8] permet de vérifier l'apparition de bandes d'absorption dues à la présence de groupements phosphates liés à la précipitation d'hydroxyapatite (HA) en surface. Dans ce travail, les composites présentent déjà les bandes d'absorption des groupements phosphates. Il a été impossible de différencier les groupements phosphates caractéristiques des inclusions constitutives des matériaux des éventuels dépôts en surface.

FTIR du géopolymère pur G54_500

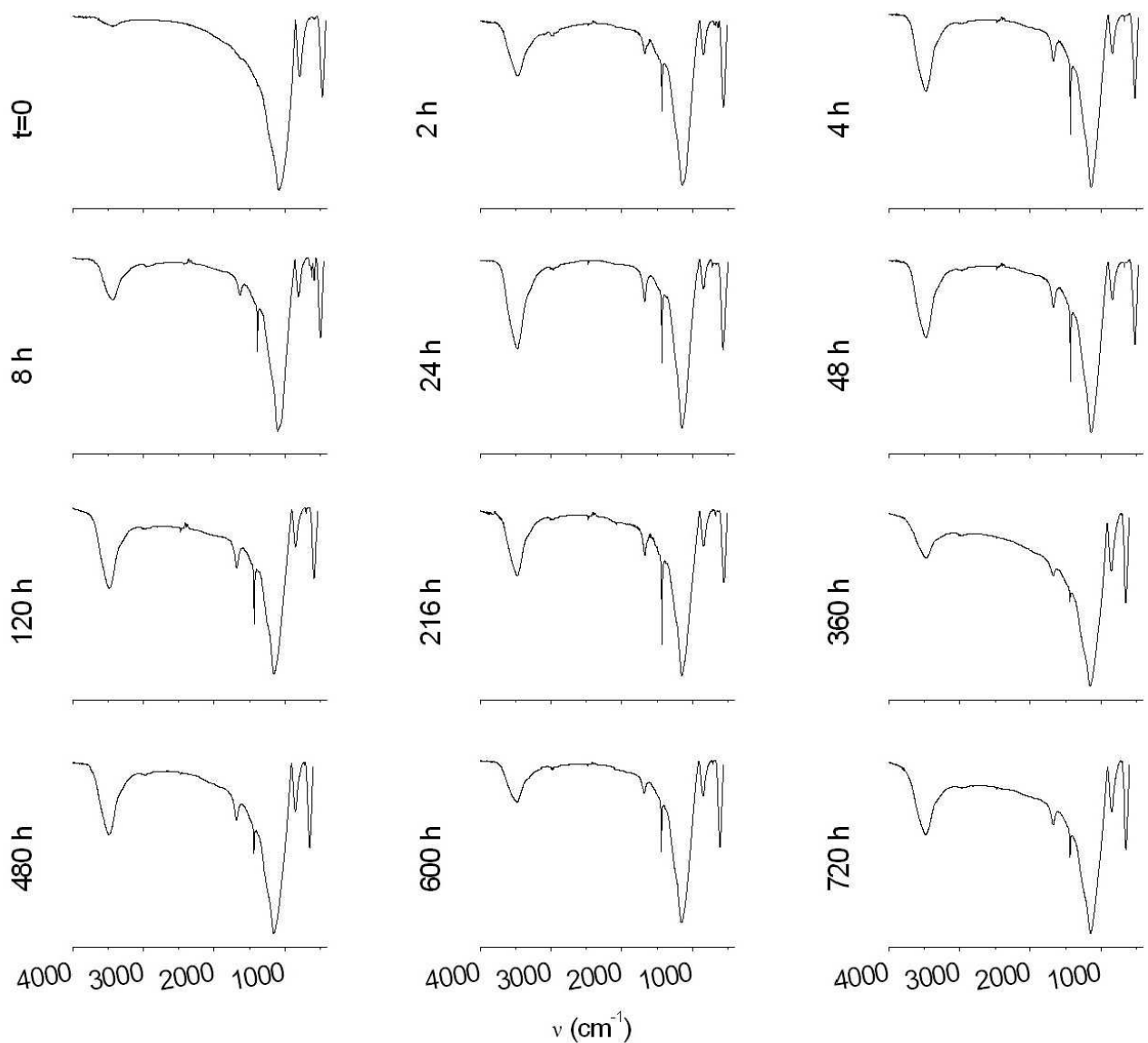


Figure 3.31 Spectres FTIR du G54_500 après différents délais d'immersion dans la solution de SBF

La figure 3.31 présente les spectres d'absorption pour chaque délai d'immersion. Le spectre initial (avant immersion) présente peu de bandes (déjà citées dans le chapitre 2). La bande d'absorption à 3500 cm^{-1} est de faible intensité mais augmente après immersion. Dès le délai de 2 heures d'immersion, l'intensité est maximale et n'augmentera pas en fonction du temps d'immersion.

L'immersion du matériau produit l'apparition de groupement OH dans la structure, alors que le traitement thermique avait permis leur départ. Ce phénomène n'augmente pas l'alcalinité du matériau, les valeurs de pH des solutions restent inférieures à 8. Les spectres des matériaux immergés montrent tous une bande d'absorption vers 1400 cm^{-1} caractéristique du groupement CO_3^{2-} [8]. Cette bande d'absorption apparaît dès une durée d'immersion de 2 heures. Les délais de 2 et 8 heures présentent des bandes d'absorption vers 600 cm^{-1} , mettant en évidence la présence de phosphate dans l'échantillon. Cette observation est à nuancer puisque les bandes d'absorption ne sont pas visibles pour tous les délais, et que le temps d'immersion n'influe pas sur leur apparition. De plus, les images MEB décrites dans la partie précédente n'ont pas mis en évidence de manière significative la présence d'un dépôt en surface des matériaux, quel que soit le délai d'immersion.

L'étude des spectres FTIR laisse penser qu'un précipité à base de phosphate (probablement de l'hydroxyapatite) peut se déposer à la surface de l'échantillon, mais dans l'ensemble, l'étude par FTIR corrobore les résultats observés par MEB et par ICP.

FTIR du composite G54HT_500 (figure 3.32)

Les composites présentent des spectres d'absorption semblables, quel que soit le phosphate de calcium introduit lors de la synthèse, c'est pourquoi nous ne présenterons que les spectres obtenus pour le composite G54HT_500. Comme dans le cas du géopolymère pur G54_500, les composites G54T_500, G54H_500 et G54HT_500 présentent des spectres avec peu de bandes.

La bande d'absorption caractéristique du groupement OH (3500 cm^{-1}) est peu intense avant immersion. Comme c'était le cas pour le géopolymère pur (G54_500), l'immersion même courte (2h) est caractérisée par l'augmentation de l'intensité de la bande d'absorption à 3500 cm^{-1} . La structure des différents composites absorbe une quantité finie d'eau de la solution, l'intensité des bandes d'absorption n'augmente pas proportionnellement en fonction du temps d'immersion, elle est maximale dès 2 heures d'immersion.

L'étude des spectres des différents composites en fonction du délai d'immersion montre l'apparition d'une bande d'absorption vers 1400 cm^{-1} . Comme dans le cas du géopolymère pur immergé, cette bande est caractéristique d'un groupement CO_3^{2-} .

Les spectres des composites avant immersion présentent les bandes d'absorption des groupements PO_4 , rendant impossible l'identification de l'apparition éventuelle d'un dépôt d'hydroxyapatite en surface des composites.

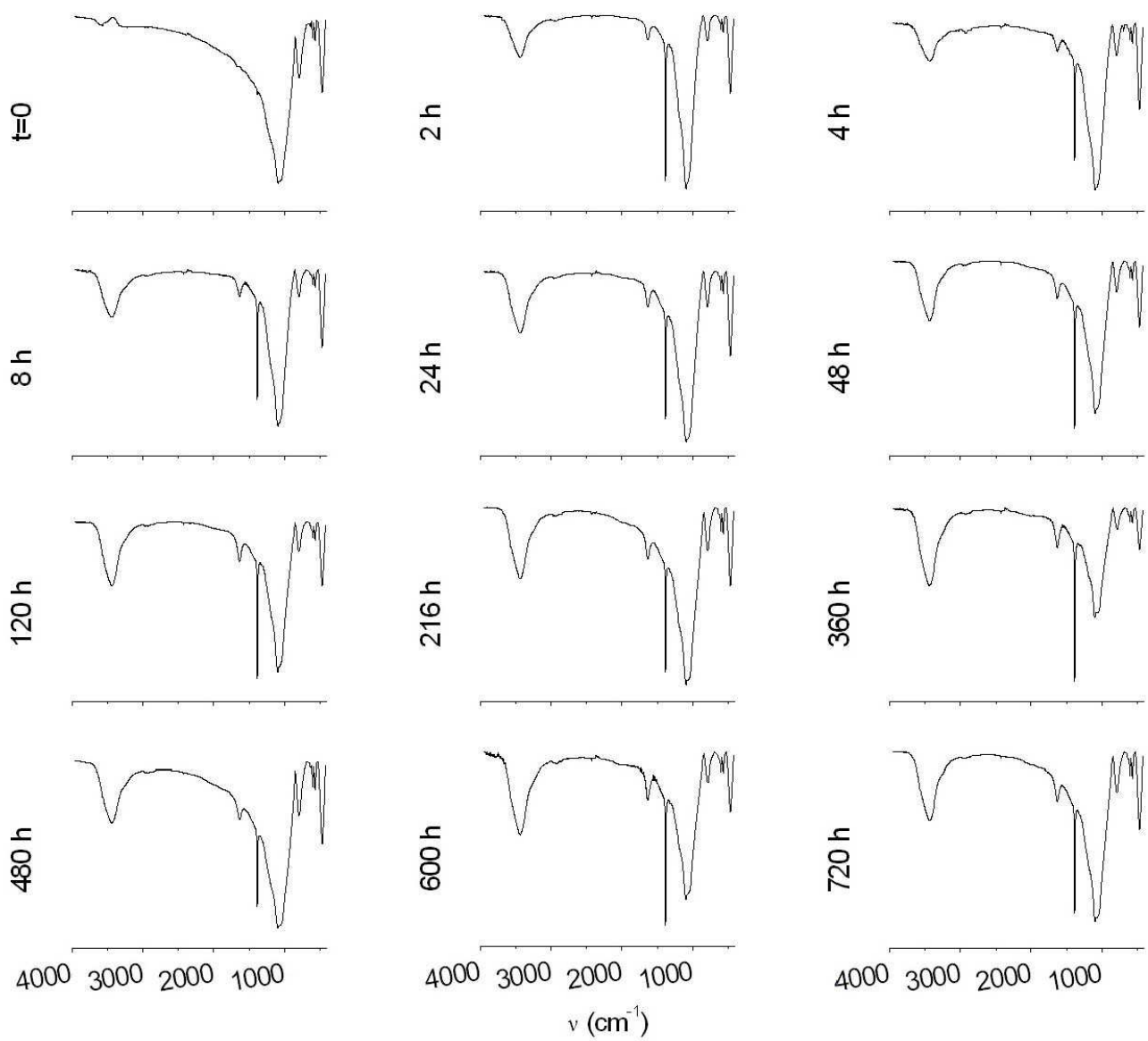


Figure 3.32 Spectres FTIR du G54HT_500 après différents délais d'immersion dans la solution de SBF

II.2.4 Discussion sur le comportement des matériaux immergés et les concentrations des solutions

Les échantillons immergés sont stables sur une durée allant de 30 jours jusqu'à 60 jours (durée de l'étude). La perte de masse des différents matériaux est inférieure au dixième de milligramme et le pH des solutions varie légèrement mais reste inférieur à 8.

La morphologie des composites et du géopolymère pur reste identique quelle que soit la durée de l'immersion, les phosphates de calcium inclus dans la matrice géopolymère ne se dissolvent pas comme l'ont montré les spectres infrarouge et les photos MEB.

L'étude du relargage de l'aluminium du matériau vers la solution a donné des résultats encourageants puisque la quantité d'aluminium présente en solution est nulle (aux barres d'erreur près) et n'augmente pas avec la durée d'immersion.

Cette étude a été réalisée dans des solutions de SBF préférentiellement à de l'eau distillée afin de s'intéresser à une propriété caractéristique de certains biomatériaux : la bioactivité.

L'étude de la surface par MEB des quatre séries de matériaux et l'étude par FTIR nous ont permis d'avoir une première idée quant à leur bioactivité. Quel que soit le type d'échantillon (géopolymère pur ou composite) aucune couche d'hydroxyapatite ne s'est formée en surface des matériaux. L'étude FTIR du géopolymère pur n'a pas mis en évidence de bande d'absorption caractéristique des groupements PO_4 , ce qui confirme l'inertie du matériau lorsqu'il est immergé dans le SBF. Dans la littérature, l'apparition d'une couche d'hydroxyapatite est visible pour des délais d'immersion inférieurs à 30 jours [7].

Une étude a montré [9] que ce sont les orthosilicates Q^0 qui s'hydrolysent le plus facilement et permettent l'activation d'une liaison avec l'os. Dans notre cas, l'étude RMN de nos matériaux a permis de définir un réseau composé de Si Q^2 , Q^3 et Q^4 , ce qui pourrait expliquer l'absence de bioactivité par l'absence de SiQ^0 .

Une autre hypothèse consiste à supposer que l'aluminium pourrait jouer le rôle d'inhibiteur dans ce phénomène de précipitation *in vitro*. Cependant, l'absence de bioactivité *in vitro* n'implique pas une absence de liaison avec l'os *in vivo* [10,11]. Les résultats observés à partir des modifications des échantillons immergés sont corroborés par les mesures des ions présents en solution.

II.3 Analyse des matériaux en présence de cellules (tests MTT et MEB)

L'étude de la toxicité *in vitro* constitue la première étape de l'évaluation de la biocompatibilité d'un biomatériau. La cytotoxicité peut être évaluée par la mesure de la viabilité cellulaire grâce au test MTT. Les modifications morphologiques des cellules au contact de matériau peuvent être observées par MEB. Ces tests ont été réalisés par l'équipe Biomatériaux en site osseux.

II.3.1 Protocole expérimental

Les tests de viabilité cellulaire ont été effectués sur 4 matériaux, précédemment caractérisés : G54_500, G54H_500, G54T_500 et G54HT_500.

Le géopolymère pur présente des propriétés mécaniques faibles. Il nous permettra d'établir une comparaison avec les composites qui ne se différencient que par l'ajout de phosphate de calcium.

Le polystyrène des boîtes de culture constitue le témoin négatif de cytotoxicité.

Les cellules utilisées pour ces tests sont les MC 3T3. Ce sont des cellules ostéoblastiques de calvariats de rats (référence ATCC CCL-7).

Les cellules ostéoblastiques ont été cultivées dans un milieu RPMI-1640 complété par 10% de sérum de veau fœtal, 1% L-glutamine et des antibiotiques (100 IU/mL en pénicilline et 100 µg/mL en streptomycine). Pendant la durée de l'étude, les cultures ont été placées dans un incubateur à 37°C, sous 5% CO₂, avec un taux d'humidité supérieur à 90%.

La croissance exponentielle de la lignée a été assurée par deux repiquages hebdomadaires.

Le décollement des cellules a été réalisé par l'action d'un mélange Trypsine (0,05%) / EDTA (0,02%).

II.3.2 Toxicité cellulaire test MTT

a - Protocole

Le test de viabilité cellulaire a été réalisé 3 fois de façon indépendantes pour chaque matériau et pour 2 temps de contact différents (24 heures et 72 heures) (contact direct entre l'échantillon et les cellules).

L'ensemencement des puits a été réalisé après comptage des cellules sur un hématimètre de Thomas. Il a été de :

- 2 10^5 cellules pour le temps de contact de 24h
- 4 10^4 cellules pour le temps de contact de 72h afin d'obtenir une culture non confluente à 24 et 72 heures.

L'étude est réalisée par mesure de densité optique de précipités bleus obtenus au virage du colorant [12-16]. Le colorant initialement jaune vire au bleu en présence d'enzymes secrétées par les cellules vivantes. La densité optique est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Pour chaque temps de contact matériau-cellules, le colorant MTT (diMethylThiazol diphenyltetrazolium bromide) a été ajouté au milieu de culture cellulaire à une concentration de 5 mg/mL. Quatre heures d'incubation sont nécessaires à l'apparition de cristaux bleu de formazan sous l'action des enzymes deshydrogénases mitochondriales.

Le surnageant présent dans les puits est prélevé et remplacé par 500 μ L de DMSO. L'agitation mécanique (10 minutes) des prélèvements permet d'obtenir une dissolution complète des cristaux de formazan.

La densité optique a été mesurée à 570 nm avec un lecteur Elisa (DYNATEK MR 5000).

Le logiciel Statview a été utilisé pour le calcul du coefficient de Student afin de comparer les résultats.

b - Résultats et discussion

Le bruit de fond a été mesuré pour chaque matériau et chaque délai afin d'être déduit des mesures de densités optiques obtenues. Les pourcentages de viabilités cellulaires ont été obtenus par comparaison avec les résultats du témoin négatif (le polystyrène), ces résultats sont présentés sur la figure 3.33.

Après 24 heures de contact entre le matériau et les cellules, les taux de viabilité les plus importants sont observés pour les matériaux G54T_500 et G54HT_500 qui présentent respectivement 56% et 65%. Les résultats de ces composites sont significativement différents de ceux observés pour les G54_500 et le G54H_500 (figure 3.33 tableau 3-5).

Après 72 heures de contact entre le matériau et les cellules, le taux de viabilité cellulaire est en diminution quel que soit le type d'échantillon testé (géopolymère pur et composites).

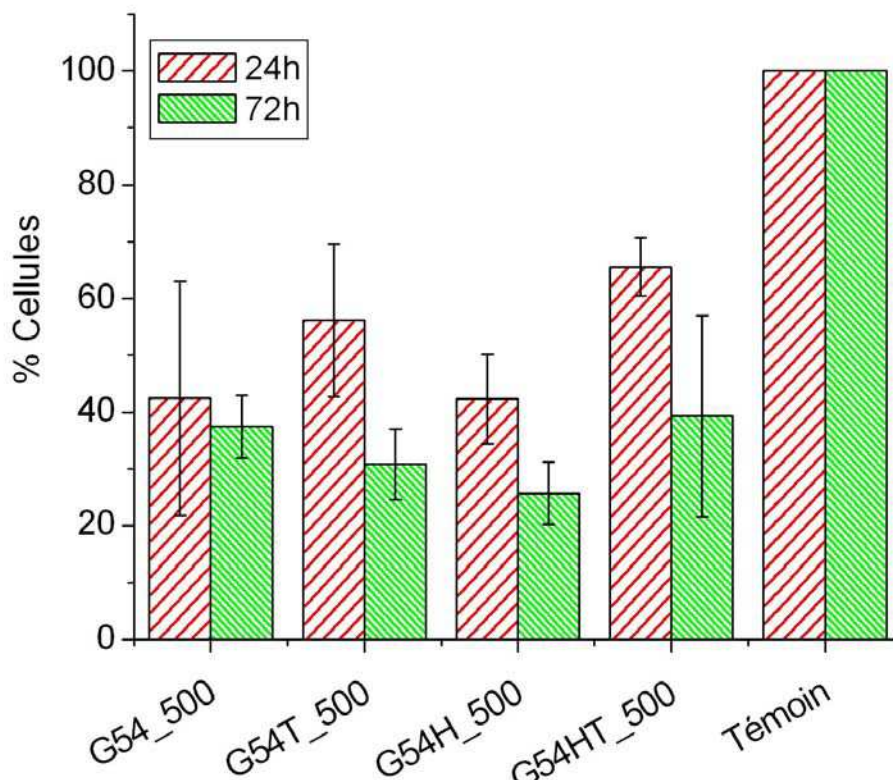


Figure 3.33 pourcentages de viabilités cellulaires du géopolymère pur et des composites, le matériau témoin est un échantillon de polystyrène.

Les matériaux qui présentent les pourcentages de viabilité les plus faibles (30% et 25%) sont le G54T_500 et le G54H_500. Les matériaux qui présentent les meilleurs pourcentages de viabilité cellulaire après 72h de contact sont le G54_500 et le G54HT_500 (37% et 39% respectivement) (figure 3.33 et tableau 3-6).

Quel que soit le temps de contact (24 ou 72 heures), la différence de chacun des échantillons avec le témoin négatif est significative ($p < 0,0001$) (tableaux 3-5 et 3-6).

	G54_500	G54T_500	G54H_500	G54HT_500	Témoin
G54_500		*	NS	*	***
G54T_500	0,035		*	NS	***
G54H_500	0,9212	0,0087		*	***
G54HT_500	0,0074	0,0952	0,003		***
Témoin	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001	

Tableau 3-5 résultats statistiques du test MTT après 24h de contact

	G54_500	G54T_500	G54H_500	G54HT_500	Témoin
G54_500		NS	*	NS	***
G54T_500	0,1422		NS	NS	***
G54H_500	0,0058	0,1032		*	***
G54HT_500	0,7496	0,1868	0,0224		***
Témoin	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001	

Tableau 3-6 statistiques du test MTT après 72h de contact

II.3.3 Morphologie cellulaire

a - Protocole

Le protocole de culture et d'ensemencement est identique à celui du test de viabilité cellulaire. Pour chaque temps de contact (24 et 72 heures), le surnageant des macro-puits est délicatement éliminé sans altérer la monocouche cellulaire en surface du matériau. Les échantillons (matériau et cellules à sa surface) sont lavés avec une solution de PBS (composition du plasma humain) enrichie en calcium et en magnésium. La fixation des cellules s'effectue grâce à une solution de glutaraldéhyde à 2,5% (2 heures à température ambiante). Après deux nouveaux rinçages au PBS, les échantillons sont déshydratés par immersion dans des bains de concentration croissante en alcool (éthanol). Cette déshydratation permet d'utiliser la méthode du séchage par point critique (Critical Point Dryer) décrite dans le chapitre suivant.

L'observation par microscopie électronique à balayage (MEB, SEM JEOL 6400) est alors réalisée sur les échantillons métallisés par le dépôt d'un mélange or-palladium.

b - Résultats

L'ensemble des matériaux étudiés présente à la surface et dans les porosités des tapis cellulaires (figures 3.34 et 3.35 parties gauches). Les cellules adhèrent à la surface grâce à de long prolongements cytoplasmiques (figures 3.34 et 3.35 parties droites).

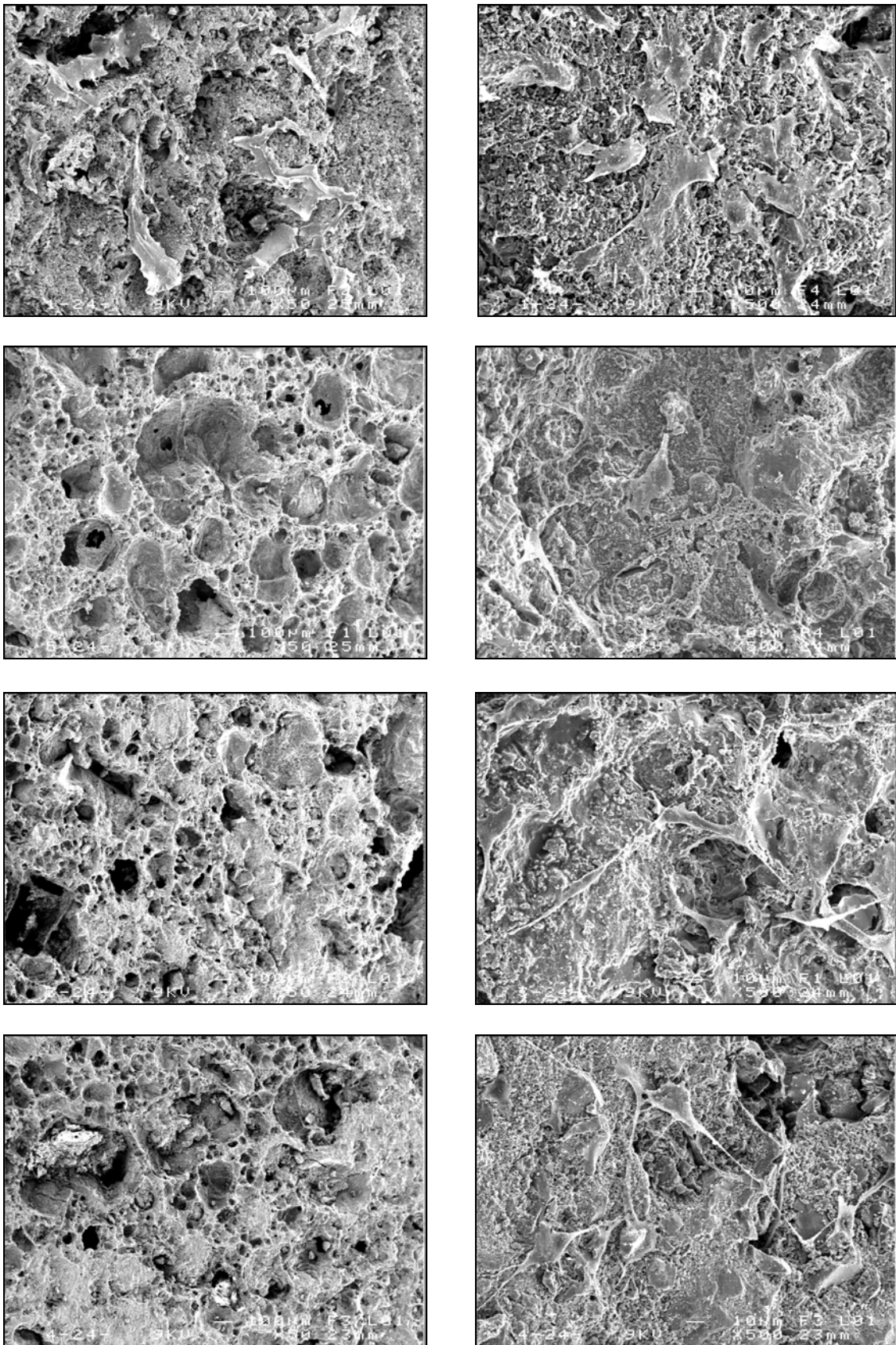


Figure 3.34 Clichés MEB des échantillons G54_500, G54H_500, G54T_500 et G54HT_500 (de haut en bas) après 24 h de culture cellulaire. A gauche grossissement x50 et à droite grossissement x500

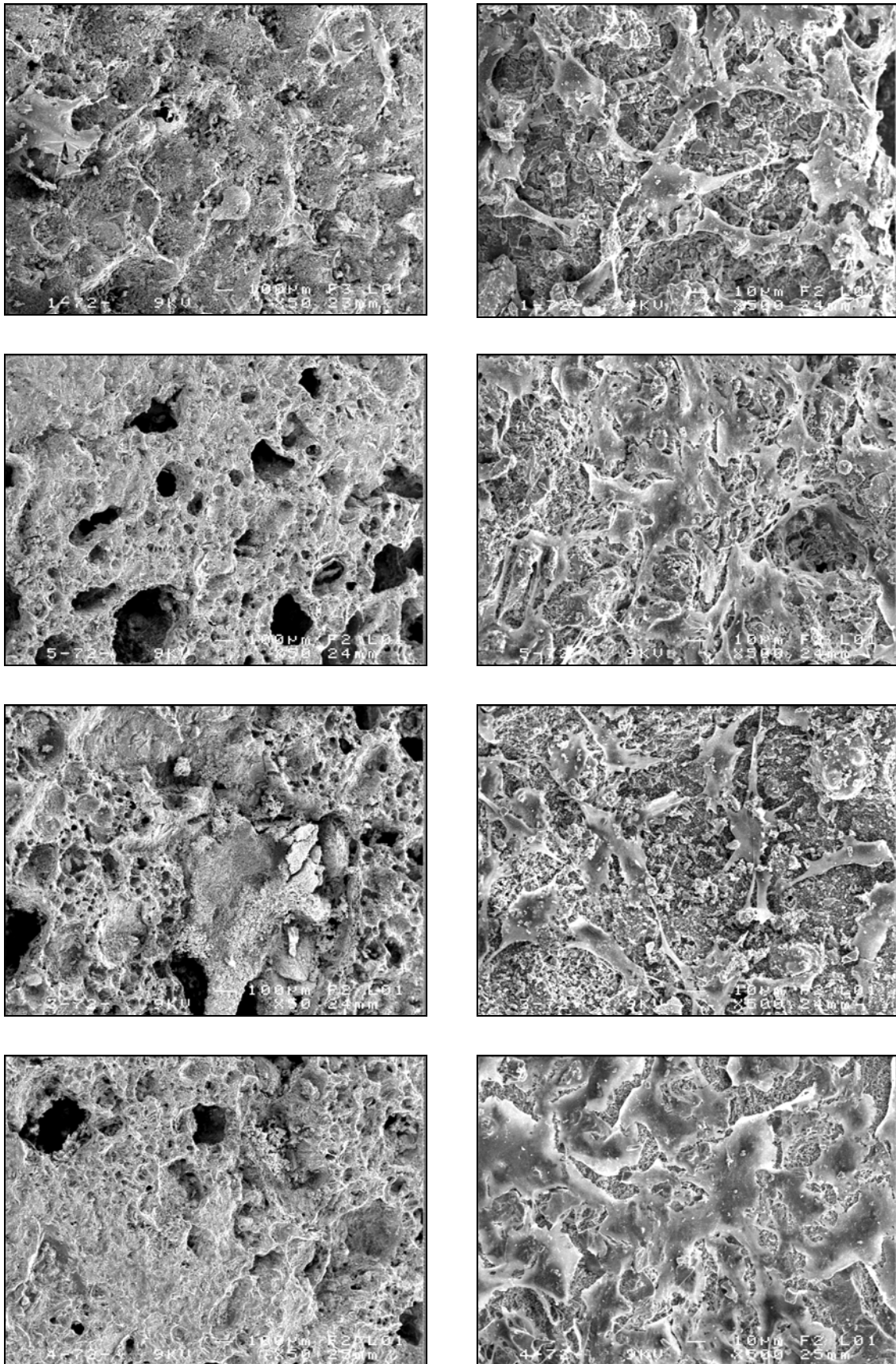


Figure 3.35 Clichés MEB des échantillons G54_500, G54H_500, G54T_500 et G54HT_500 après 72 h de culture cellulaire (de haut en bas). A gauche grossissement x50 et à droite grossissement x500

II.3.4 Discussion sur les analyses *in vitro* en présence de cellules

Les résultats obtenus par le test MTT pour les matériaux G54_500, G54H_500, G54T_500 et G54HT_500 montrent que le taux de viabilité cellulaire est supérieur à 50% du taux de viabilité sur le témoin négatif après 24 heures de contact. Après 72 heures de contact, le taux de viabilité ne représente plus (en fonction du matériau) que 20% à 40 % du taux de viabilité du témoin négatif. L'ajout de phosphates de calcium à la matrice géopolymère n'améliore pas significativement les pourcentages de viabilité cellulaire.

Les observations réalisées par MEB après les temps de contacts de 24 et 72h mettent en évidence la présence d'un tapis cellulaire à la surface des composites pour chacun des délais et chaque matériau testé. Des cellules sont visibles à la surface des matériaux ainsi qu'à l'intérieur des porosités. Les ostéoblastes présentent de long prolongements cytoplasmiques caractéristiques de l'adhérence des cellules sur les matériaux.

Les résultats obtenus pour chacun des échantillons sont semblables et ne permettent pas d'établir des différences de comportement cellulaire..

Ces deux tests nous ont permis d'étudier la toxicité cellulaire de nos échantillons. L'état de surface poreux donc irrégulier des matériaux testés influencent la viabilité cellulaire. Nous avons préféré une étude de toxicité cellulaire sur échantillon plutôt que sur extrait afin d'étudier les matériaux tels qu'ils ont été implantés. En fonction de la future utilisation de ce matériau, en particulier leur temps de contact et leur site d'implantation, d'autres tests devront être réalisés.

III Conclusion

Après traitement thermique, les géopolymères purs et les composites présentent des pourcentages de porosités compris entre 60 et 80%. Cette porosité est composée de macropores de tailles supérieures à la centaine de microns. Après le traitement thermique à 500°C, les parois des matériaux deviennent poreuses avec des tailles de pores inférieures à 10 µm.

Nous avons mesuré les valeurs de contraintes maximales à la rupture des géopolymères purs et des composites afin de sélectionner un ensemble de matériaux qui présentent les meilleurs compromis entre porosité et propriétés mécaniques.

Les géopolymères purs présentent les pourcentages de porosités les plus importants et les propriétés mécaniques les plus faibles.

Après le traitement thermique à 500°C, les composites présentent les valeurs de pH les plus basses et un bon compromis entre propriétés mécaniques et porosité. Afin d'étudier l'influence de deux paramètres de synthèse sur la contrainte à la rupture et le pourcentage de porosité, nous avons réalisé une étude par la méthode des plans d'expériences pour surface de réponse. Cette étude nous a permis de vérifier que dans l'ensemble du domaine sélectionné, les composites à matrice G54

présentent les meilleurs compromis entre pourcentage de porosité et propriétés mécaniques.

Grâce aux résultats décrits ci-dessus, nous avons poursuivi notre travail par une étude *in vitro* des matériaux qui répondent le mieux aux critères de pH, de porosité et de comportement mécanique en compression.

L'étude menée dans des solutions de SBF sur les échantillons G54_500 (et les composites associés) a mis en évidence une stabilité des matériaux immergés (absence de relargage de phosphore et de calcium). Pour des délais d'immersion allant jusqu'à 60 jours, aucun relargage d'aluminium n'a pu être mis en évidence.

Aucune précipitation d'hydroxyapatite à la surface des matériaux n'a pu être mise en évidence : il n'y a pas de trace de bioactivité *in vitro* dans les conditions expérimentales de ces premières études.

Les études MTT et MEB n'ont montré aucune toxicité cellulaire des matériaux à matrice géopolymère. Cette étude a permis de déterminer les deux échantillons qui présentent les meilleurs pourcentages de viabilité cellulaire.

Ces matériaux G54_500 et G54HT_500 ont fait l'objet de l'expérimentation *in vivo* qui sera décrite aux chapitres 4 et 5.

Références

- [1] GOUPY J., **Plan d'expériences pour surfaces de réponses**, Edition DUNOD, 1999
- [2] DOEHLERT D.H., **Uniform shell design**, Appl. Stat. (19), 1970, 231
- [3] NEO H., KOTANI S., NAKAMURA T., YAMAMURO T., OHTSUKI C., KOKUBO T., BANDO Y., **A comparative study of ultrastructure of the interface between 4 kinds of surface active ceramics and bone**, J. Biomed. Mater. Res. (26), 1992, 1419
- [4] KOKUBO T., KUSHITANI H., SAKKA S., **Solution able to produce in vivo surface structure changes in bioactive glass ceramic A-W**, J. Biomed. Mater. Res. (24), 1990, 721
- [5] YLANEN H., KARLSSON H., ATALA A., ARO H.T., **Effect of immersion in SBF on porous bioactive bodies made by sintering bioactive glass microspheres**, J. of Non-Cryst. Solids(275), 2000, 107
- [6] CLUPPER D.C., MECHOLSKY J.J., LATORRE G.P., GREENSPAN D.C., **Bioactivity of tape cast and sintered bioactive glass-ceramic in simulated body fluid**, Biomaterials (23) , 2002, 2599

- [7] SIRIPHANNON P., KAMESHIMA Y., YASUMORI A., OKADA K., HAYASHI S., **Formation of hydroxyapatite on CaSiO₃ powders in simulated body fluid**, J. of the Eur. Cer. Soc. (22), 2002, 511
- [8] OLIVEIRA J.M., CORREIA R.N., FERNANDES M.H., **Effects of Si speciation on the in vitro bioactivity of glasses**, Biomaterials (23), 2002, 371
- [9] KARLSSON K.H., **Bioactivity of glass and its relation to glass structure**, *Proceed. Of the tenth Conf. on the Vitreous state*, Glass Phys. Chem. (Fiz. Khim. Stekla) (24), 1998, 280
- [10] KOBAYASHI M., KIKUTANI T., KOKUBO T., NAKAMURA T., **Direct bone formation on alumina bead composites**, J. Biomed. Mater. Res. Symp. (37), 1997, 554
- [11] FUJIBAYASHI S., NEO M., HYUN-MIN K., KOKUBO T., NAKAMURA T., **Osteoinduction of porous bioactive titanium metal**, Biomaterials (25), 2004, 443
- [12] CHAUVEL-LEBRET D.J., PELLEN-MUSSI P., AUROY P., Bonnaure-Mallet M., **Evaluation of in vitro biocompatibility of various elastomers**, Biomaterials (20), 1999, 291
- [13] LI J., LIU Y., HERMANSSON L., SOREMARK R., **Evaluation of biocompatibility of various ceramic powders with human fibroblasts in vitro**, Clin. Mater (12), 1993, 197
- [14] LONNROTH E.C., DAHL J.E., **Cytotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests**, Acta. Odonto. (59), 2001, 34
- [15] LOTY C., LOTY S., SAUTIER J.M., **Interfaces os/ matériaux bioactifs implantables**, Implant (4), 1998, 101
- [16] MONCHAU F., LEFEVRE A., DESCAMPS M., BELQUIN6MYRDY CZ A., LAFFARGUE P., HILDEBRAND H., **In vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, beta tricalcium phosphate, calcium carbonate**, Biomol. Eng. (19), 2002, 143
- [17] KALMAN P.G., WARD C.A., MCKEOMN N.B., McCULLOUGH D., ROMASHIN A.D., **Improved biocompatibility of silicone rubber by removal of surface entrapped air nuclei**, J. Biomed. Mat. Res. (25), 1991, 199

Chapitre 4

**Etude d'implants géopolymères et
CaCO₃ synthétique : analyse par
PIXE et NAA**

Chapitre 4 : Etudes d'implants géopolymères et CaCO_3 synthétique : analyse par PIXE et NAA

I Cartographie de la composition minérale des implants CaCO_3 , TCP, G54_500 et G54HT_500 par PIXE..... 139

I.1 Principe et Intérêt de la méthode d'analyse PIXE	139
I.1.1 Principe	139
I.1.2 Intérêt	140
I.1.3 Dispositif expérimental	140
I.2 Application : étude des cinétiques de minéralisation des matériaux CaCO_3 et TCP implantés chez la brebis.	143
I.2.1 CaCO_3 synthétique, synthèse et propriétés	143
I.2.2 Implantation et prélèvement des CaCO_3 et TCP	144
I.2.3 Conditions expérimentales	146
I.2.4 Résultats obtenus par la méthode PIXE	149
I.2.5 Discussion	167
I.3 Application : étude des cinétiques de minéralisation des matériaux G54_500 et G54HT_500 implantés chez le lapin.	168
I.3.1 Implantation dans des tibias de lapins	168
I.3.2 Préparation des échantillons	169
I.3.3 Paramètres d'analyse	170
I.3.4 Résultats	171
I.3.5 Discussion	178

II Analyse de matériaux CaCO_3 et TCP par activation neutronique (N.A.A) 179

II.1 Principe et intérêt de la méthode d'Analyse par Activation Neutronique	179
II.1.1 Principe	179
II.1.2 Intérêt	179
II.1.3 Dispositif expérimental	180
II.2 Application à l'étude des teneurs en Ca, P, Sr et Mg des matériaux TCP et CaCO_3 implantés chez la brebis.	180

II.2.1 Préparation des échantillons	180
II.2.2 Paramètres d'analyse	181
II.2.3 Résultats obtenus par activation neutronique	183
II.2.4 Discussion.....	189
III Conclusion	189
Références.....	190

I Cartographie de la composition minérale des implants CaCO_3 , TCP, G54_500 et G54HT_500 par PIXE

I.1 Principe et Intérêt de la méthode d'analyse PIXE

I.1.1 Principe

Le principe de la PIXE (Proton Induced X-ray Electron) s'appuie sur une interaction ion-matière et peut être décomposé en deux étapes :

Le faisceau incident de protons excite les électrons de la couche profonde (niveau K) des atomes constitutifs de la cible, créant une vacance d'électron.

Il y a alors réarrangement du cortège électronique qui s'accompagne de l'émission d'un photon X, dont l'énergie est caractéristique de l'élément excité.

Le spectre obtenu est fonction de trois contributions :

- **l'émission continue** qui doit être minimisée pour améliorer la sensibilité de la méthode. Cette émission continue regroupe :

- * un rayonnement de freinage des projectiles dans la cible
- * un rayonnement de freinage des électrons secondaires dans la cible
- * la diffusion Compton
- * une accumulation de charges en surface des échantillons isolants
- * des facteurs instrumentaux (zone morte du détecteur par exemple)
- * la diffusion Rutherford
- * le bruit de fond naturel

- **des pics caractéristiques** des éléments présents dans la matrice.
- **des pics parasites** : les pics d'échappement (Si ou Ge) dus à des réactions parasites au niveau du détecteur et les pics sommes qui correspondent à la sommation de 2 photons de même énergie analysée comme un photon d'énergie double.

Des études de l'influence de ces différents paramètres [1] ont abouti à la détermination de critères expérimentaux qui permettent de diminuer le rapport signal sur bruit de fond. Les expérimentations que nous avons effectuées au CNRS-CERI d'Orléans prennent en compte l'optimisation de ces critères.

L'analyse quantitative des résultats est possible grâce au logiciel GUPIX développé par Campbell [2,3]. A partir du spectre, le logiciel permet de remonter aux concentrations respectives des différents éléments. Ce calcul détermine le nombre de photons X émis en prenant en compte des

paramètres expérimentaux (intensité du courant incident, nature de la cible...), instrumentaux (géométrie du détecteur ...) et physiques (section efficace des différents éléments, rendement de fluorescence, absorption de l'échantillon...).

I.1.2 Intérêt

La méthode d'analyse PIXE permet d'établir la concentration en éléments d'un échantillon avec une sensibilité allant jusqu'à quelques ppm selon la matrice analysée.

Cette méthode d'analyse permet :

une analyse de surface : la pénétration du faisceau incident n'est que d'une centaine de microns. La technique est relativement non destructive.

une analyse locale et localisée d'un échantillon : la taille du faisceau peut aller de 50 μm à plusieurs centaines de μm .

une analyse simultanée : au cours d'une même irradiation, les éléments dont le numéro atomique est compris entre 13 (Na) et 235 (U) sont détectés simultanément.

une analyse rapide : le temps d'acquisition varie en fonction du matériau à étudier mais d'une façon générale, l'analyse d'une surface égale à la taille du faisceau (pouvant atteindre plusieurs centaines de microns) s'effectue en quelques minutes.

une analyse quantitative : l'étalonnage et l'utilisation d'un logiciel de traitement (GUPIX dans notre cas) permettent de déterminer les concentrations (à $\pm 5\%$) des différents éléments constitutifs de la matrice. La sensibilité est de l'ordre de quelques dizaines de ppm pour les éléments compris entre $Z=20$ et $Z=30$ [1]. Ces valeurs peuvent varier en fonction des matrices étudiées.

I.1.3 Dispositif expérimental

La chambre d'analyse permettant l'étude par PIXE est présentée sur la figure 4.1.

La chambre d'analyse est mise à la pression atmosphérique en cassant le vide par introduction d'azote (14). Les échantillons sont placés sur le porte échantillon (3) pouvant contenir 3 échantillons à analyser (figure 4.3). Celui-ci est perpendiculaire au faisceau incident et peut se déplacer selon les axes (x,y,z) grâce à un système de moteurs (5).

La chambre d'analyse est refermée (un hublot permet d'observer l'intérieur (13) et placée sous vide secondaire grâce à un groupe de pompage (2) association d'une pompe primaire et d'une pompe à huile, la pression à l'intérieure est visualisée par une jauge (12).

Lorsque les conditions de pression sont suffisamment basses (vide secondaire), les fentes (fentes objet) bloquant le faisceau sont abaissées.

Le faisceau (9) de protons incident arrive en provenance du Van Der Graaff (VDG) par la fente objet. Ce faisceau peut être focalisé par un jeu de lentilles horizontales et verticales (8). En pénétrant dans la chambre d'analyse, le faisceau rencontre un doigt tournant (6) qui permet une mesure du courant incident notée I_d . Une seconde mesure de courant notée I_c réalisée au niveau de la cage de Faraday (1). Ces mesures permettent de calculer le rapport I_c/I_d qui est nécessaire à la détermination des concentrations des différents éléments constitutifs de l'échantillon.

Le faisceau interagit ensuite avec la surface de l'échantillon à analyser, la zone irradiée correspond à la taille du faisceau (choisie et paramétrée de manière expérimentale). Un endoscope (11) permet de visualiser la surface de l'échantillon et la zone à irradier.

La partie irradiée de l'échantillon est source de photons X, ces photons sont captés par un détecteur SiLi (7), protégé par un funny filter (composé d'une feuille de Béryllium d'épaisseur 165 μm et d'une feuille d'aluminium d'épaisseur 100 μm ayant un trou en son centre de 0,5 mm de diamètre).

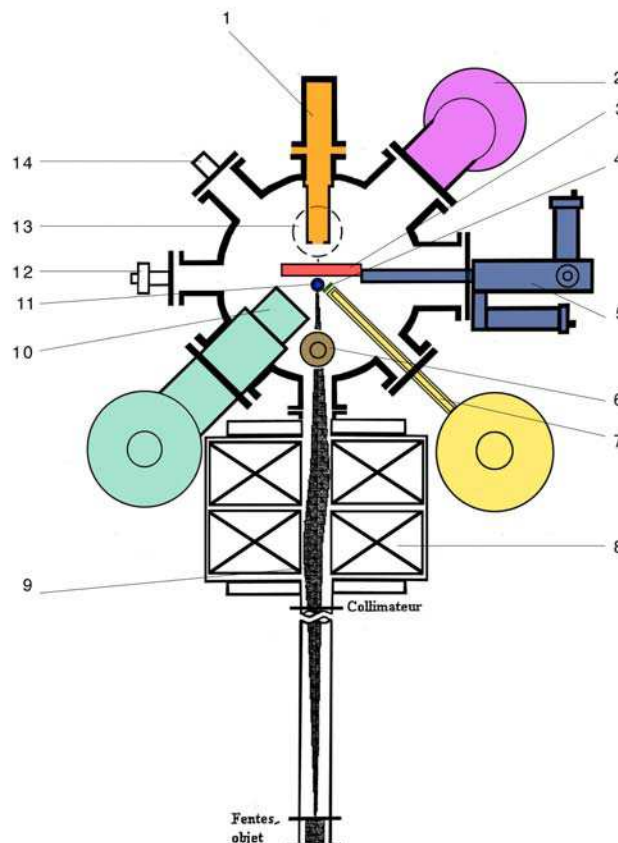


Figure 4.1 Schéma de la ligne de faisceau, du quadripôle et de la chambre d'analyse [1]

La géométrie du système faisceau/ échantillon/ détecteur et l'intensité du faisceau de protons incident (entre 2 et 3 MeV) permettent de minimiser l'intensité du bruit de fond. Le filtre permet de diminuer le bruit de fond pour les éléments Ca, P, Sr, Zn, Si et K de notre étude. Le dispositif expérimental mis en place au CNRS-CERI d'Orléans permet de coupler l'analyse PIXE à d'autres types d'analyse (PIGE...) grâce à un second détecteur (LEGe) (10) situé à 90° du SiLi.

Pour chacun des délais de prélèvements étudiés et chaque implant, trois zones distinctes sont mises en évidence (figure 4.2). Tous les profils présentés dans la partie résultats ont été différenciés comme suit : Zone (1) : implant, Zone (2) : Interface biomatériau-os, Zone (3) : matrice osseuse

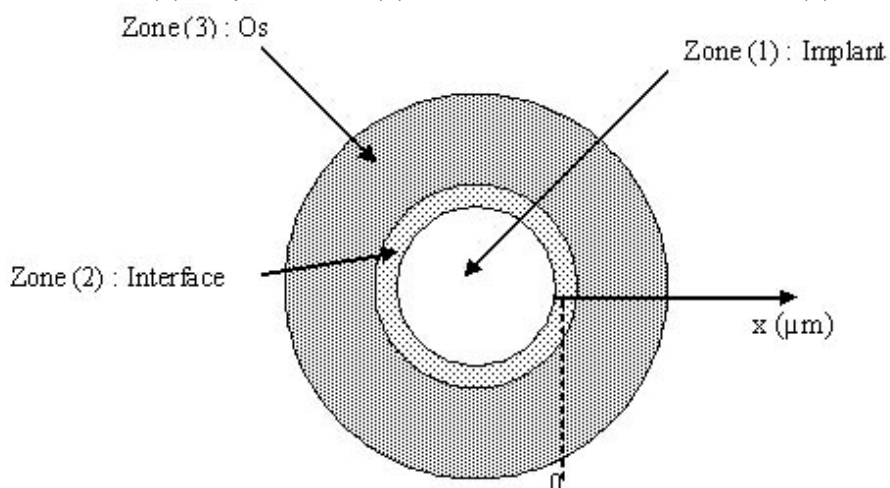


Figure 4.2 Echantillons CaCO₃, TCP, G54_500 et composite G54HT_500 analysés par PIXE.

La figure 4.3 représente le schéma du porte échantillons utilisé lors de nos irradiations. Les échantillons placés sur le porte échantillons sont constitués de l'implant au centre et de la matrice osseuse en périphérie. Les filaments de tungstène permettent d'obtenir l'étalonnage en énergie du logiciel d'acquisition et de rechercher la position du faisceau.

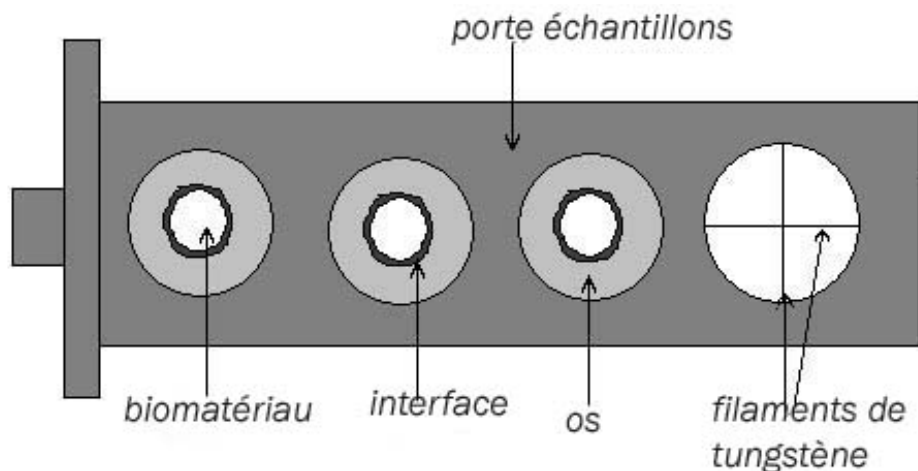


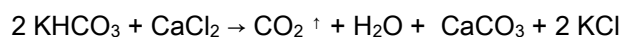
Figure 4.3 porte échantillon utilisé au CNRS CERI.

I.2 Application : étude des cinétiques de minéralisation des matériaux CaCO₃ et TCP implantés chez la brebis.

I.2.1 CaCO₃ synthétique, synthèse et propriétés

Le carbonate de calcium a été synthétisé et mis au point dans notre laboratoire. Il fait l'objet d'un dépôt de brevet (détenu par l'université de Rennes 1) et d'une collaboration avec la société CERAVER dans le cadre de l'ANVAR.

Le carbonate de calcium implanté a été obtenu par double précipitation de sels d'hydrogénocarbonate de potassium (KHCO₃) et de chlorure de calcium (CaCl₂) suivant la réaction :



Cette synthèse en milieu aqueux a permis d'obtenir un carbonate de calcium de type aragonite, pulvérulent, dont la granulométrie est comprise entre 1 et 9,5 µm.

Un mélange de particules de porogène (naphtalène C₁₀H₈) [4] avec les cristaux d'aragonite synthétique a été compacté sous pression isostatique à 600 MPa (vitesse de montée de 100 MPa/min, palier de 5min). Après vaporisation du porogène par chauffage, les échantillons de CaCO₃ présentent les caractéristiques suivantes (tableau 4-1).

Nom	Echantillon	% de porogène	Pourcentage de porosité	σ _c (MPa)
44%	CaCO ₃ 44% porosité	12 %	44%	9.5 (±0.8)
55%	CaCO ₃ 55% porosité	25 %	55%	2.9 (±0.3)

Tableau 4-1 pourcentage de porosité et contrainte à la rupture en compression des carbonates de calcium synthétiques [5]

I.2.2 Implantation et prélèvement des CaCO₃ et TCP

a - Implantation des échantillons

Des cylindres de 4 mm de diamètre et 12 mm de hauteur des 4 biomatériaux suivants ont été usinés puis stérilisés par irradiation aux rayons gamma à une dose minimale de 25 kGy.

- CaCO₃ à 44% de porosité
- CaCO₃ à 55% de porosité
- CaCO₃ à 55% de porosité enrichi en antibiotique (sulfate de gentamicine)
- TCP à 45 % de porosité (commercialisé par le société CERAVÉR®)

Les matériaux ont été implantés dans des épiphyses fémorales de 9 brebis post-gestantes (âgées de 7 à 9 ans), de race Lacaune et de poids moyen 70 kg. L'utilisation de guides a permis les repérages des différents biomatériaux (figure 4.4). Les CaCO₃ poreux à 44% et à 55% ont été placés dans les fémurs droits avec un TCP commercial. Le CaCO₃ additionné de gentamicine et un TCP ont été implantés dans les fémurs gauches. Un puit de diamètre 4 mm est resté sans comblement osseux dans ces fémurs (figure 4.5).

L'élevage, la bergerie et les conditions d'expérimentation sont conformes à la norme ISO 10993-22 et aux prescriptions nationales réglementaires relatives aux animaux de laboratoire. L'élevage et la bergerie sont dans les locaux de l'Institut National de recherche Agronomique de Rennes (Le Rheu 35).

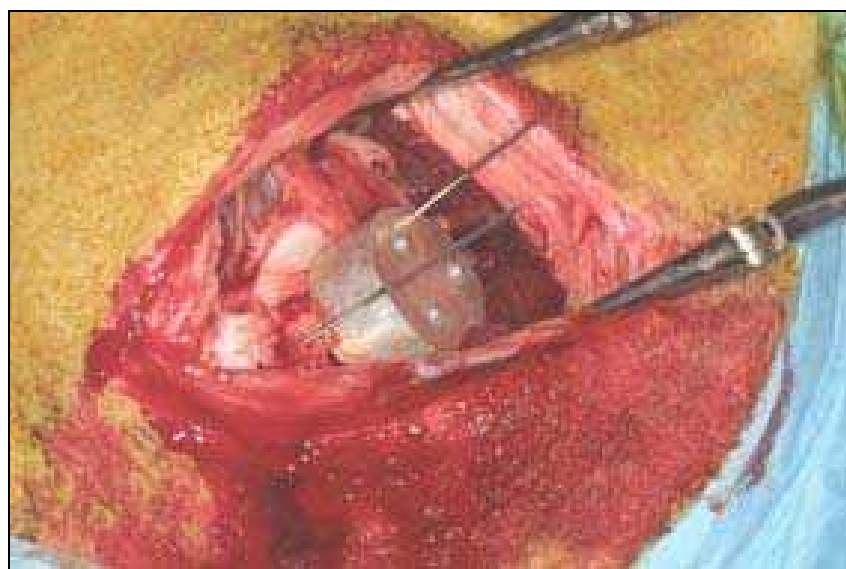


Figure 4.4 la position des matériaux implantés a été définie à l'aide de guides métalliques.

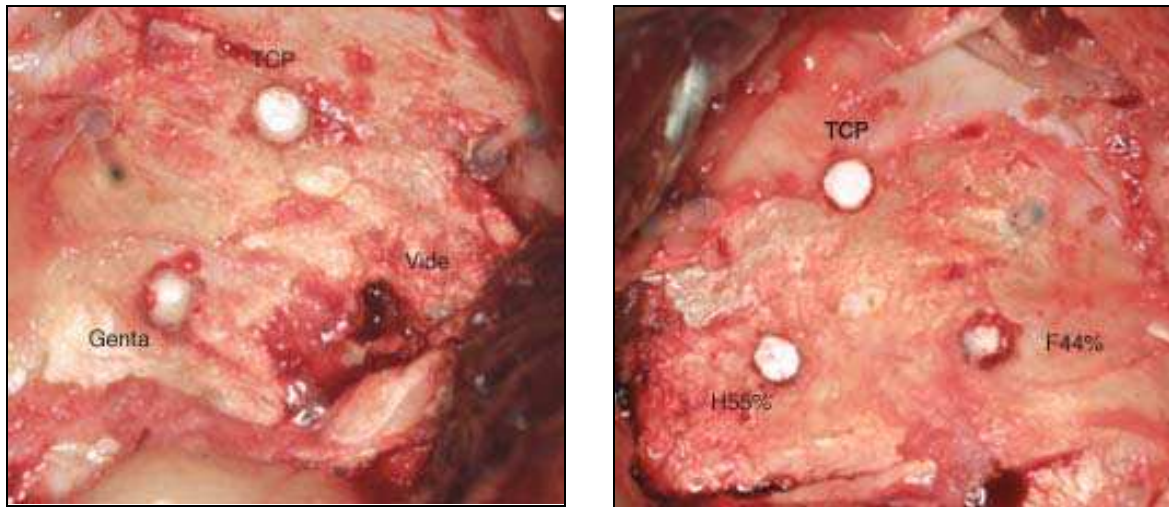


Figure 4.5 pièces anatomiques des fémurs gauche (TCP, trou et CaCO₃ avec antibiotique) et droit (TCP, CaCO₃ 55% et CaCO₃ 44%).

b - Prélèvement des implants

Les prélèvements ont été réalisés pour les délais de 1, 3, 6 et 12 mois. Pour chaque délai, deux brebis ont été sacrifiées (3 brebis pour le délai de 6 mois) afin d'avoir un nombre d'échantillons permettant d'effectuer les études multi-élémentaires par PIXE et NAA (cette méthode sera décrite dans la partie II de ce chapitre) et les évaluations biologiques. Après sacrifice, les biomatériaux implantés ont été extraits des fémurs et isolés sous forme d'échantillons de 3 mm d'épaisseur et d'environ 15 mm de diamètre. Les échantillons ont été conservés dans une solution à 10% en formol.

Les études des modifications des compositions minérales de carbonates de calcium synthétiques et TCP commercial (implantés dans des fémurs de brebis) ont été réalisées par PIXE et NAA au CNRS-CERI d'Orléans.

La technique PIXE a permis une analyse ponctuelle de nos échantillons. Des profils de concentration quantitatifs des éléments calcium, phosphore, strontium et zinc (présents dans la matrice osseuse et/ou le biomatériau) ont été obtenus pour chacun des matériaux implantés et pour chaque délai (délais de prélèvements de 1, 3, 6 et 12 mois). L'évolution de ces profils en fonction du temps a permis d'établir les cinétiques de résorption des biomatériaux et l'état de consolidation aux interfaces.

Cette technique d'analyse physique a été couplée à des études histologiques complémentaires [6].

Pour corréler les résultats obtenus par PIXE (et NAA) et par histologie, les principaux résultats biologiques seront présentés au chapitre 5.

I.2.3 Conditions expérimentales

Les profils de concentration des éléments calcium (Z=20), phosphore (Z=15), zinc (Z=30) et strontium (Z=38) des CaCO₃ purs (44%, 55% de porosité), du CaCO₃ avec antibiotique et du TCP ont été réalisés pour chaque délai de prélèvement.

Les échantillons ont été placés sous vide et irradiés avec un faisceau de protons en incidence normale. L'énergie de l'ordre de quelques MeV a été un bon compromis entre la section efficace des éléments Ca, P, Zn et Sr et la diminution du bruit de fond. L'intensité du courant a été fixée entre 1 et 2 nA pour éviter un échauffement trop important de l'échantillon.

Les profils du carbonate de calcium à 44% de porosité ont été obtenus avec un faisceau d'énergie 3 MeV et de diamètre 250 µm. Pour les implants CaCO₃ 55%, CaCO₃ avec antibiotique et TCP, nous avons travaillé avec un faisceau d'énergie 2,2 MeV et de diamètre 300 µm.

Le diamètre de balayage de l'ordre de 250 à 300 µm a permis de moyenniser l'influence de l'état de surface du matériau. Un détecteur Si(Li) associé à un « funny filter » (d'épaisseur 100 µm pour Al et 165 µm pour Be avec un trou de 500 µm pour l'aluminium seulement) a été utilisé pour détecter la raie K_α du phosphore tout en diminuant l'intensité du bruit de fond.

Les spectres de rayons X ont été collectés grâce à un analyseur multicanaux puis analysés par le logiciel GUPIX.

Les concentrations des éléments calcium, phosphore, strontium et zinc ont été déterminées par des mesures effectuées sur la matrice osseuse suivant l'équation :

$$C_z = \frac{I(Z)}{HQ\varepsilon_z^I T_z I_t(Z)}$$

C_z : la concentration de l'élément de n° atomique Z

I(Z) : intensité mesurée

I_t(Z) : intensité théorique calculée par stéradian et par micro-coulomb pour la matrice

Q : la charge mesurée

ε^I_z : efficacité intrinsèque du détecteur

T_z : transmission des RX par le filtre

H : constante instrumentale

Nous avons réalisé des spectres de la matrice osseuse. Les valeurs des teneurs en Ca, P, Sr et Zn dans l'os ont été utilisées comme référence afin de déterminer les valeurs de H.

L'échantillon analysé a été déplacé de manière horizontale, du biomatériau vers l'os, par pas de 250 μm pour le CaCO_3 44% et de 300 μm pour les autres biomatériaux. Ce type de repérage et d'étude ont été réalisés pour tous les délais (1, 3, 6 et 12 mois), ce qui nous a permis d'observer l'évolution des profils au cours du temps.

a - Préparation des échantillons

L'étude par la méthode PIXE s'effectue avec des échantillons biologiques qui doivent être totalement anhydres. Dans le cas de nos échantillons, la déshydratation a été effectuée par la méthode du point critique afin de conserver au mieux les échantillons

- **méthode du point critique et métallisation**

La méthode du séchage par point critique est couramment employée lors d'étude MEB d'échantillons biologiques [7]. Cette méthode permet de sécher les échantillons à étudier sans créer de tensions entre tissus.

Différents fluides peuvent être utilisés par cette méthode. Nous avons travaillé avec le CO_2 (valeurs du point critique : 31,1°C, 1072 p.s.i.).

Une fois les prélèvements des implants effectués, les échantillons biologiques ont été stockés dans des solutions de formol. La méthode de séchage par point critique nécessite de travailler sur des échantillons totalement dépourvus d'eau. Les échantillons ont donc été déshydratés par immersion dans des bains de concentration croissante en alcool (de 60% à 100%).

Nous avons réalisé le séchage de nos échantillons au CMEBA de l'université de RENNES à l'aide d'un appareil Balzers CPD 010.

b - Repérage des implants dans les échantillons

Lors de ce travail, nous avons étudié deux méthodes de repérage : le dépôt d'un repère d'argent par pulvérisation cathodique et l'utilisation de fils de cuivre et d'or. Ces deux méthodes ont eu pour objectif de permettre de visualiser à l'endoscope le centre des implants.

- **Pulvérisation cathodique (principe décrit en annexe 8)**

La technique d'analyse PIXE nécessite un repérage précis de l'échantillon à analyser afin de réaliser une cartographie la plus exacte possible. La technique de dépôt d'un métal par pulvérisation cathodique permet de réaliser un dépôt suivant une géométrie précise (utilisation d'un masque).

Les échantillons déshydratés par la méthode du point critique regroupaient les 3 implants de

chaque fémur.

La méthode de pulvérisation cathodique permet d'analyser 3 implants sur le même échantillon, grâce à un repérage précis.

Les essais de dépôt d'un repère ont été réalisés au LCSIM dans l'équipe couche mince. Le masque utilisé a été obtenu par électrophorèse, il s'agissait d'un repère orthonormé orienté par un triangle en (0, 0) suivant les axes x et y positifs (figure 4.6). Le masque a été placé sur l'os préalablement déshydraté. Les axes x et y avaient des épaisseurs respectives de 500 et 100 μm .

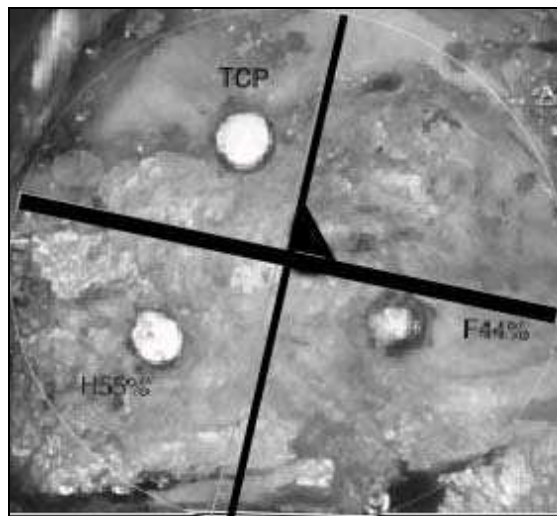


Figure 4.6 Représentation d'un échantillon contenant trois des implants à étudier et le tracé théoriquement obtenu (repère noir orienté par un triangle).

Nous avons utilisé une cible d'argent qui permet un dépôt rapide et abondant. Afin de limiter l'échauffement de l'échantillon, les paramètres de dépôt : pression, intensité et tension ont été de 0,15 mbar, 6,9 mA et 1,93 kV respectivement.

Il s'est avéré que cette méthode n'a pu être appliquée à nos échantillons car il était primordial que le repérage soit visible lors de la radiographie des échantillons. Le temps nécessaire de manipulation pour obtenir un dépôt visible est d'environ 3 heures dans les conditions précédemment décrites. Ce temps de dépôt trop long provoque l'échauffement et la calcination de sa surface. De plus, la rugosité de la surface l'os a limité le contact avec le masque, les traits déposés ont été plus larges que prévu (de l'ordre du millimètre).

Cette technique est cependant très intéressante et pourrait permettre des repérages très fins de matériaux non inclus dans résine, il faudrait alors élaborer un système de refroidissement de l'échantillon.

- **Guides métalliques**

Les frontières du biomatériau irradié ont été repérées par deux guides : un fil d'or et deux fils de cuivre, permettant de déterminer le centre et définir les différentes zones du biomatériau (figure 4.7).

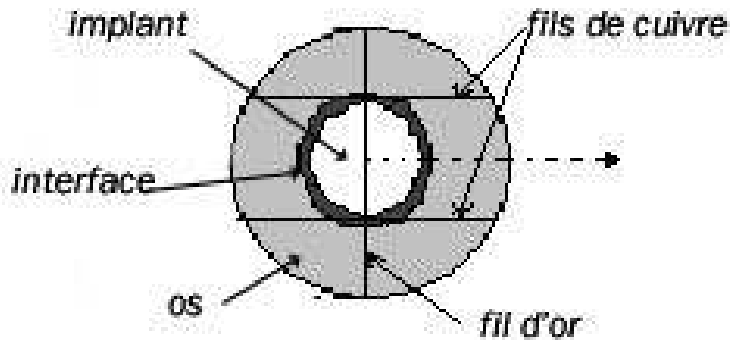


Figure 4.7 Fil d'or (vertical) et fils de cuivre (horizontaux) placés à la surface de l'échantillon.

Cette méthode de repérage nécessite de travailler sur chacun des implants séparément, ce qui augmente le temps de manipulation. Par contre il n'y a aucune altération de la surface à étudier.

Pour les analyses par PIXE des matériaux CaCO_3 et TCP nous avons préféré utiliser cette méthode. Les fils ont été placés manuellement sur le porte échantillon, ils ont été fixés sur la partie métallique du support avec du scotch en carbone.

I.2.4 Résultats obtenus par la méthode PIXE

a - Analyse des matériaux de référence : CaCO_3 et os

Nous avons réalisé les spectres des éléments Ca, P, Sr et Zn sur un échantillon d'os pur provenant d'une des brebis sacrifiées (figure 4.8).

Le protocole de préparation et de déplacement ont été identiques à celui suivi pour les implants CaCO_3 et TCP. Les profils ont été étalonnés en concentration avec les trois points situés respectivement à 0, 500 et 750 μm). Cet étalonnage a permis de vérifier l'erreur due aux irrégularités de surface d'un matériau de composition homogène et connue (l'os ovin).

Les fluctuations de concentrations varient en fonction des échantillons, les éléments majoritaires (Ca et P) présentent des valeurs de concentrations relativement stables avec une variation en fonction de la position du faisceau sur l'échantillon de 8% (tableau 4-2).

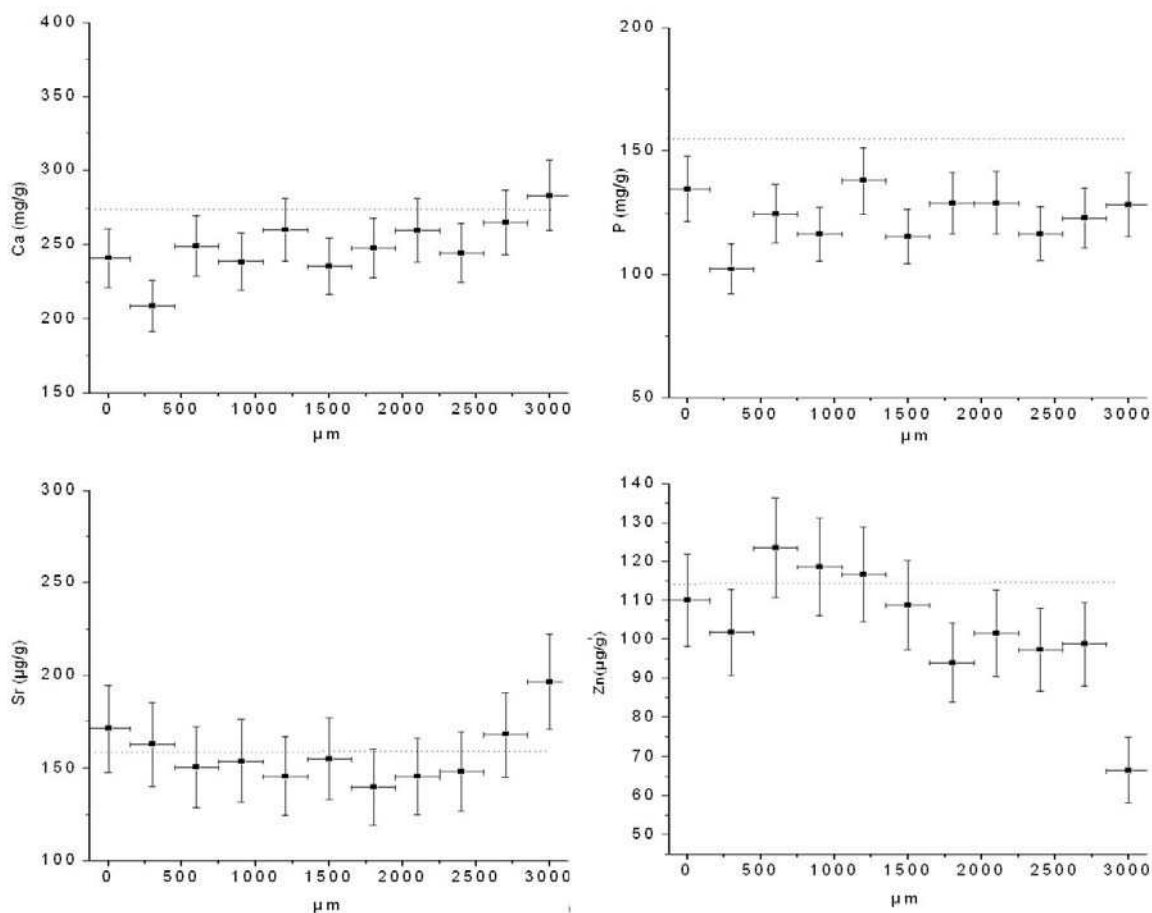


Figure 4.8 Profils de concentrations pour un échantillon d'os de brebis pris comme témoin.

Comme le montrent les courbes des éléments à l'état de traces Sr et Zn (figure 4.8) et les valeurs du tableau 4-2, plus la concentration théorique de l'élément étudié est faible et plus l'erreur due à la géométrie de l'échantillon est importante. Ces remarques seront prises en compte dans l'étude des profils de migration de ces éléments dans les implants.

Dans la suite de ce travail, pour chacun des échantillons étudiés, l'étalonnage en concentration a été réalisé à partir de points de l'échantillon correspondant à la matrice osseuse.

Ces cartographies réalisées par PIXE nous ont permis d'affiner des tendances de migration. La surface des échantillons étant irrégulière, nous nous sommes intéressés aux variations relatives des différents éléments.

Le carbonate de calcium pur a été étudié de façon similaire, nous avons pu vérifier que sur tous les éléments proposés à GUPIX, seul le calcium était détecté.

Elément	Concentration moyenne	Ecartype	Valeur théorique [8]
Calcium	248 mg/g	19 mg/g (8%)	247 mg/g
Phosphore	123 mg/g	10 mg/g (8%)	127,8 mg/g
Strontium	158µg/g	16 µg/g (10%)	154,7 µg/g
Zinc	103 µg/g	15 µg/g (15%)	117 µg/g

Tableau 4-2 tableau comparatif des concentrations expérimentales et de référence pour les éléments Ca, P, Sr et Zn

b - Résultats : implants TCP et CaCO_3

Afin d'améliorer la lisibilité des courbes, les zones correspondant à l'implant et à la matrice osseuse sont identifiés par des flèches horizontales qui partent de l'interface et pointe vers l'implant ou la matrice osseuse.

- **Implant CaCO_3 44%**

* Concentrations en calcium et en phosphore (figures 4.9 et 4.10)

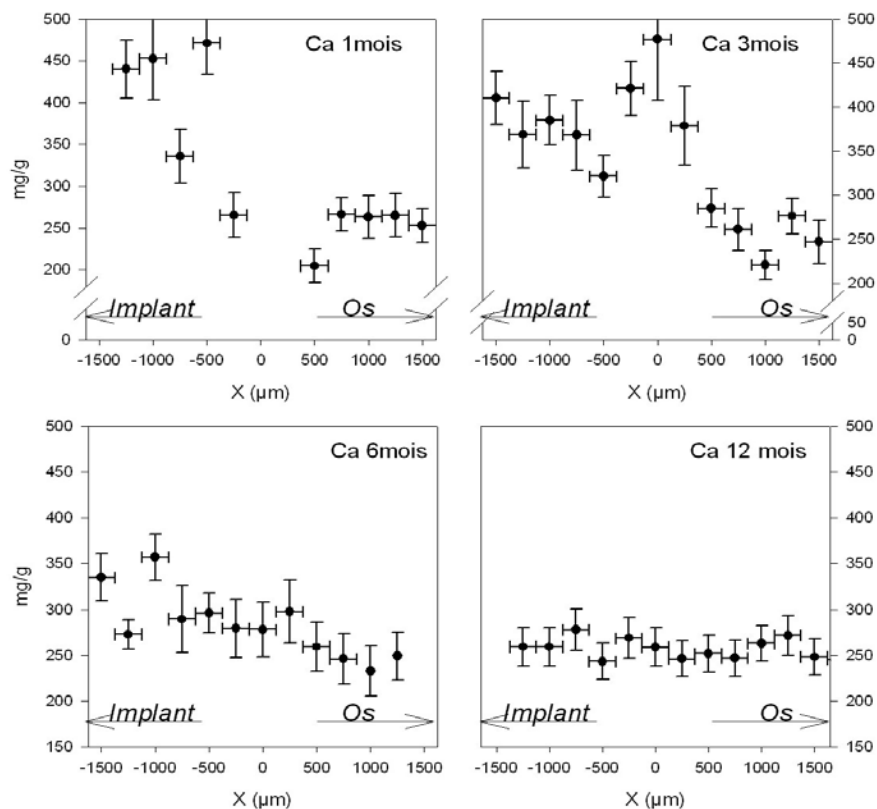


Figure 4.9 Profils de concentrations en calcium de l'implant CaCO_3 44%

1 mois après implantation, le CaCO_3 44% est le matériau dont la concentration en calcium dans l'implant est la plus proche de la valeur avant implantation (400 mg/g). Les teneurs en phosphore sont quasi nulles. L'interface biomatériau/ os présente une diminution importante en calcium et en phosphore, sur une distance de 1000 μm . En périphérie extérieure de cette interface (côté os), les valeurs de concentrations en calcium et phosphore atteignent des valeurs voisines de la matrice osseuse.

3 mois après implantation, le profil en calcium dans l'implant présente des concentrations en calcium comprises entre celles de l'implant et celles de la matrice osseuse. Au niveau de l'implant, les valeurs en phosphore sont également voisines de celles de cette matrice. Il n'y a plus de zone déminéralisée à l'interface. Le point de concentration très élevée en calcium ($x = -250\mu\text{m}$) est un artéfact dû à un grain ou à un défaut de surface.

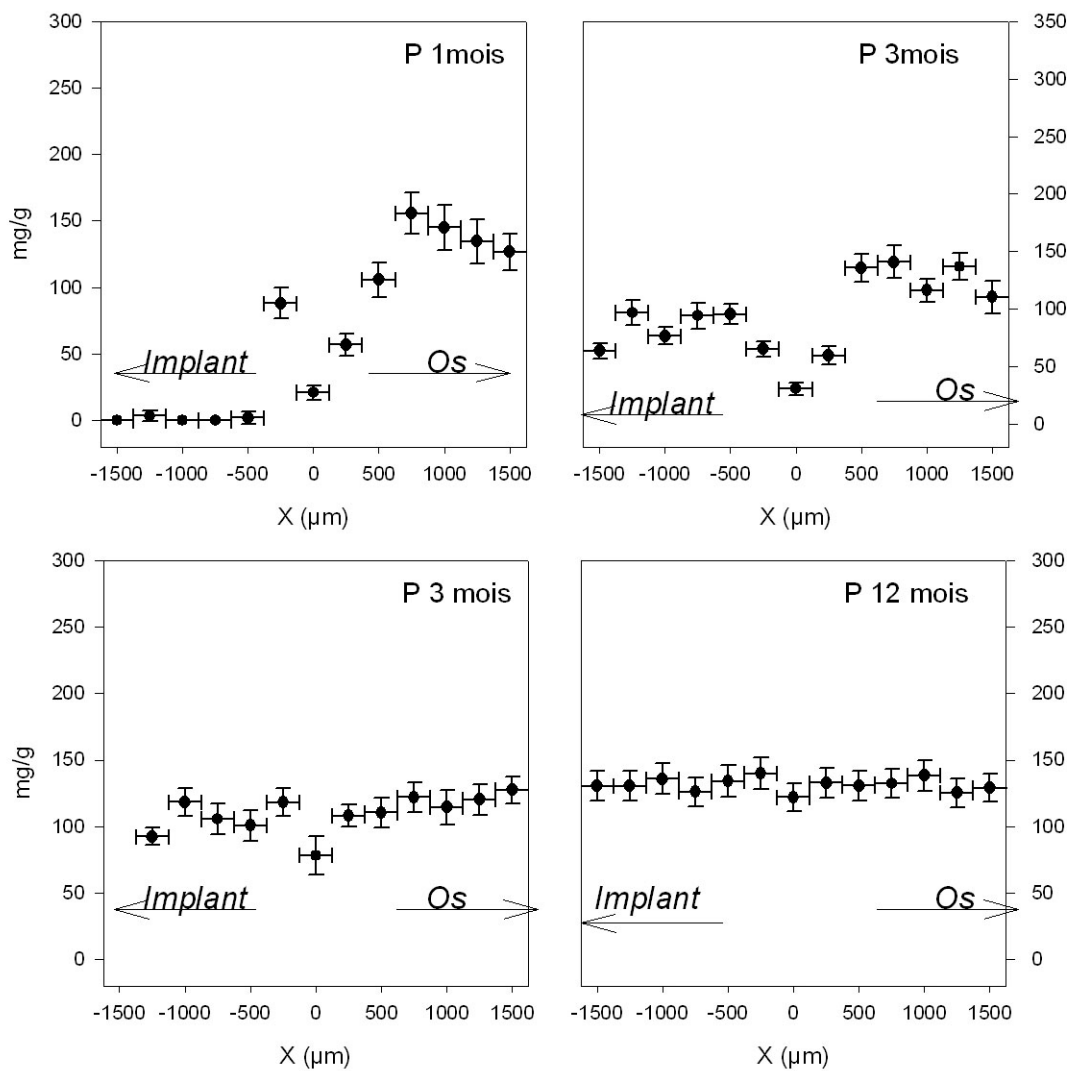


Figure 4.10 Profils de concentrations en phosphore de l'implant CaCO_3 44%

6 mois après implantation, une alternance de valeurs en calcium (correspondant à la matrice osseuse) et de valeurs plus élevées (correspondant au CaCO_3 44%) sont visibles au niveau de l'implant. Dans cette zone, les teneurs en phosphore sont proches de celles de la matrice osseuse. L'implant est toujours présent mais en faible quantité. Les faibles concentrations en calcium et en phosphore de la zone déminéralisée (à l'interface) ont laissé la place à des valeurs caractéristiques de la matrice osseuse. Il est impossible de différencier les trois zones (implant, interface et os). Le processus de minéralisation est en nette progression.

12 mois après implantation, l'implant présente un profil homogène avec des valeurs proches de celles de la matrice osseuse. La différenciation des différentes zones est impossible.

* Concentrations en strontium et en zinc (figures 4.11 et 4.12)

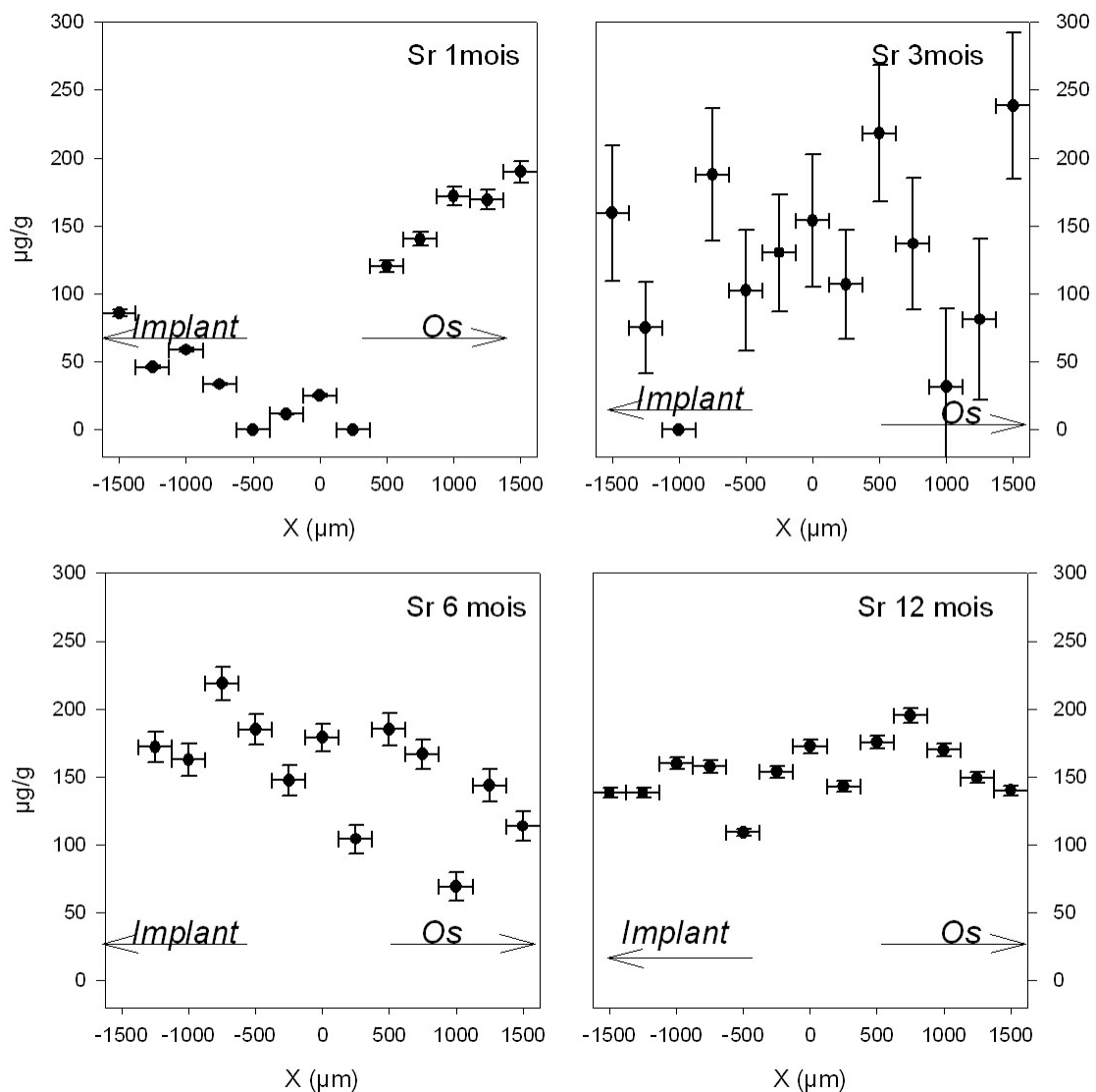


Figure 4.11 Profils de concentrations en strontium de l'implant CaCO_3 44%

1 mois après implantation, les teneurs en strontium sont inférieures à 100 $\mu\text{g/g}$ et des teneurs en zinc à l'état de trace au niveau de l'implant. L'interface biomatériau/ os présente un déficit en strontium à la périphérie du biomatériau. L'interface (zone déminéralisée) est la plus étendue des 4 matériaux analysés.

3 mois après implantation, on observe des valeurs nulles et des barres d'erreur importantes pour le strontium. Ces incertitudes peuvent résulter des défauts de surface plus importants que pour les autres échantillons. Le point de l'interface qui correspondait à des teneurs nulles en calcium et en phosphore présente une teneur de 100 $\mu\text{g/g}$ en strontium et inférieure à 50 $\mu\text{g/g}$ en zinc, favorisant l'hypothèse d'une interface mal minéralisée caractérisée par des déficits en calcium et en phosphore.

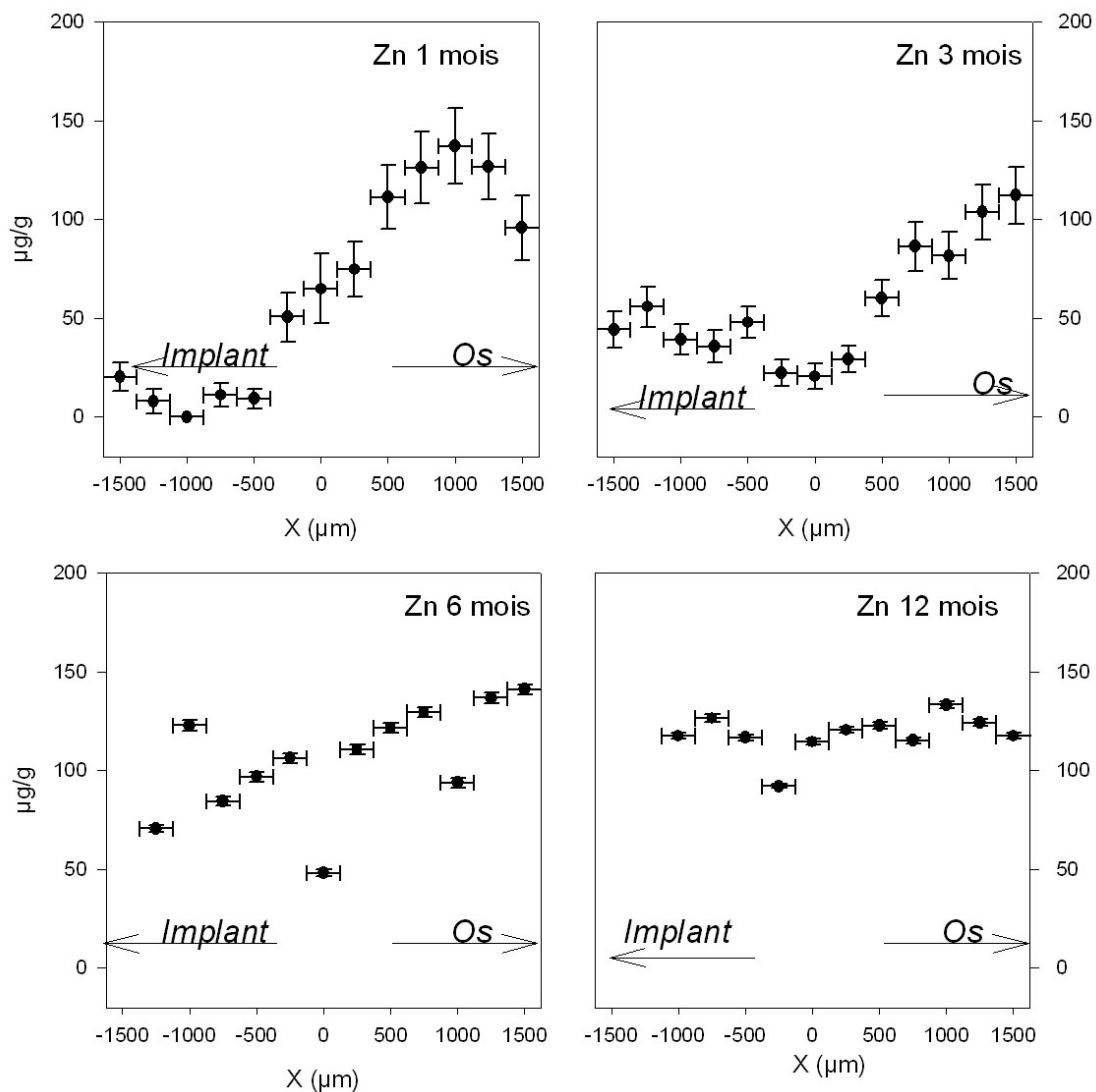


Figure 4.12 Profils de concentrations en zinc de l'implant CaCO_3 44%

6 mois après implantation, les profils en strontium et en zinc au niveau de l'implant sont plus réguliers que pour le délais de 3 mois. Les valeurs moyennes montrent une colonisation uniforme de l'implant et la disparition de l'interface.

12 mois après implantation, l'implant présente des teneurs en strontium et en zinc proches de celles de la matrice. Il est impossible de différencier les trois zones (implant, interface et os). Le matériau est en grande partie résorbé.

- **Implant CaCO₃ 55%**

* Concentrations en calcium et phosphore (figures 4.13 et 4.14)

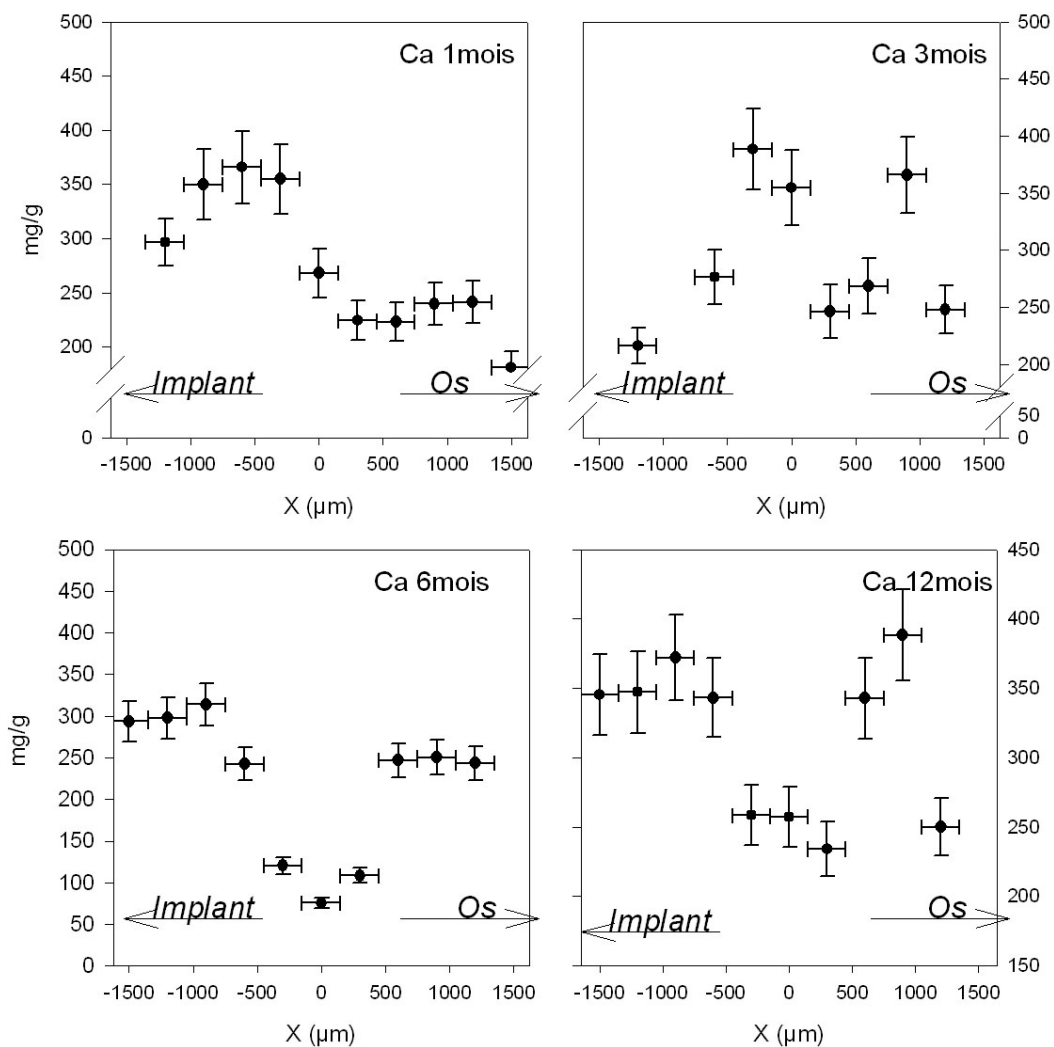


Figure 4.13 Profils de concentrations calcium de l'implant CaCO₃ 55%

1 mois après implantation, l'implant présente des teneurs en calcium comprises entre celles de carbonate de calcium et celles de la matrice osseuse et des teneurs en phosphore quasi nulles. L'interface entre le biomatériau et l'os varie régulièrement vers les valeurs de la matrice osseuse.

3 mois après implantation, l'échantillon étudié présente une surface très irrégulière, ce qui rend difficile l'exploitation de cette courbe. On peut noter que les teneurs en calcium sont dans l'ensemble inférieures à celles du matériau de départ et qu'il y a eu colonisation du matériau par le phosphore. L'interface n'est plus déminéralisée.

6 mois après implantation, l'implant présente des teneurs en calcium proches de 250 mg/g et des teneurs en phosphore proches de 127 mg/g. L'interface est toujours présente, cette zone est plus déminéralisée que 3 mois après implantation pour cette brebis.

12 mois après implantation, les concentrations en phosphore et en calcium dans la zone caractéristique de l'implant sont voisines de celles de la matrice osseuse. L'interface s'est résorbée, signe de la minéralisation de la zone faiblement minéralisée observée à 3 et 6 mois.

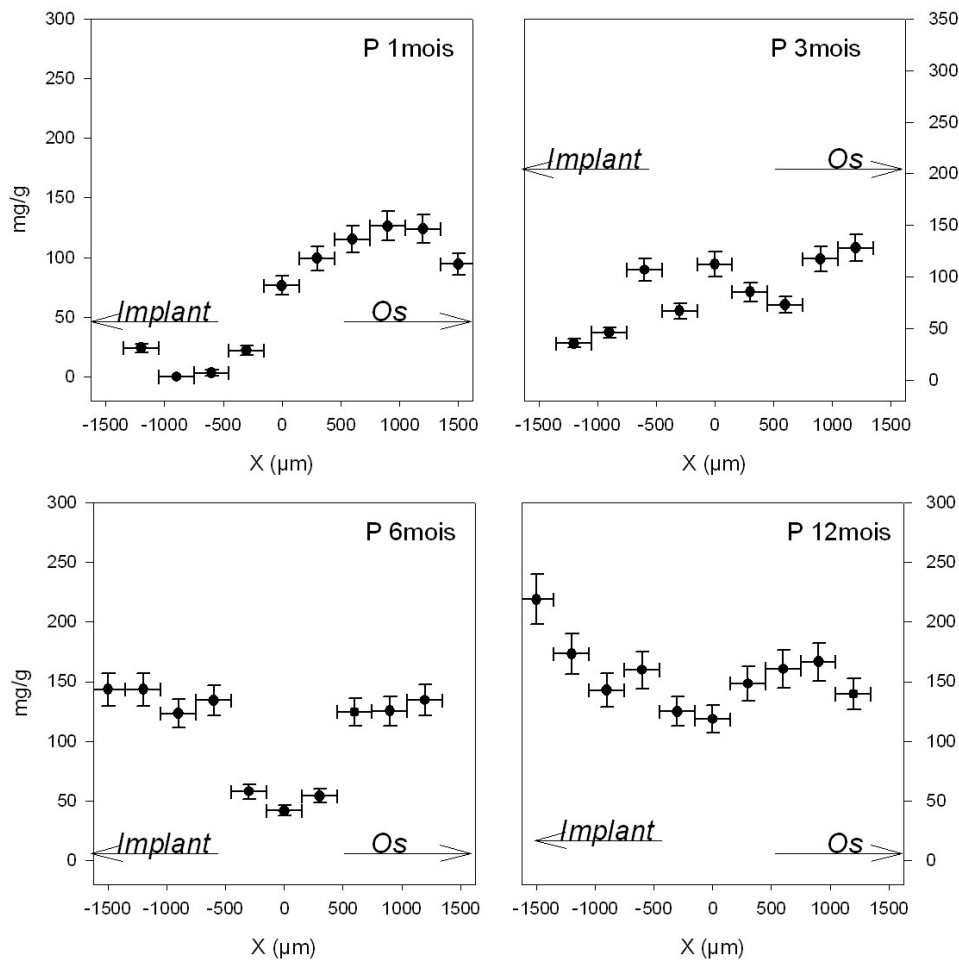


Figure 4.14 Profils de concentrations en phosphore de l'implant CaCO_3 55%

* Concentrations en strontium et en zinc (figures 4.15 et 4.16)

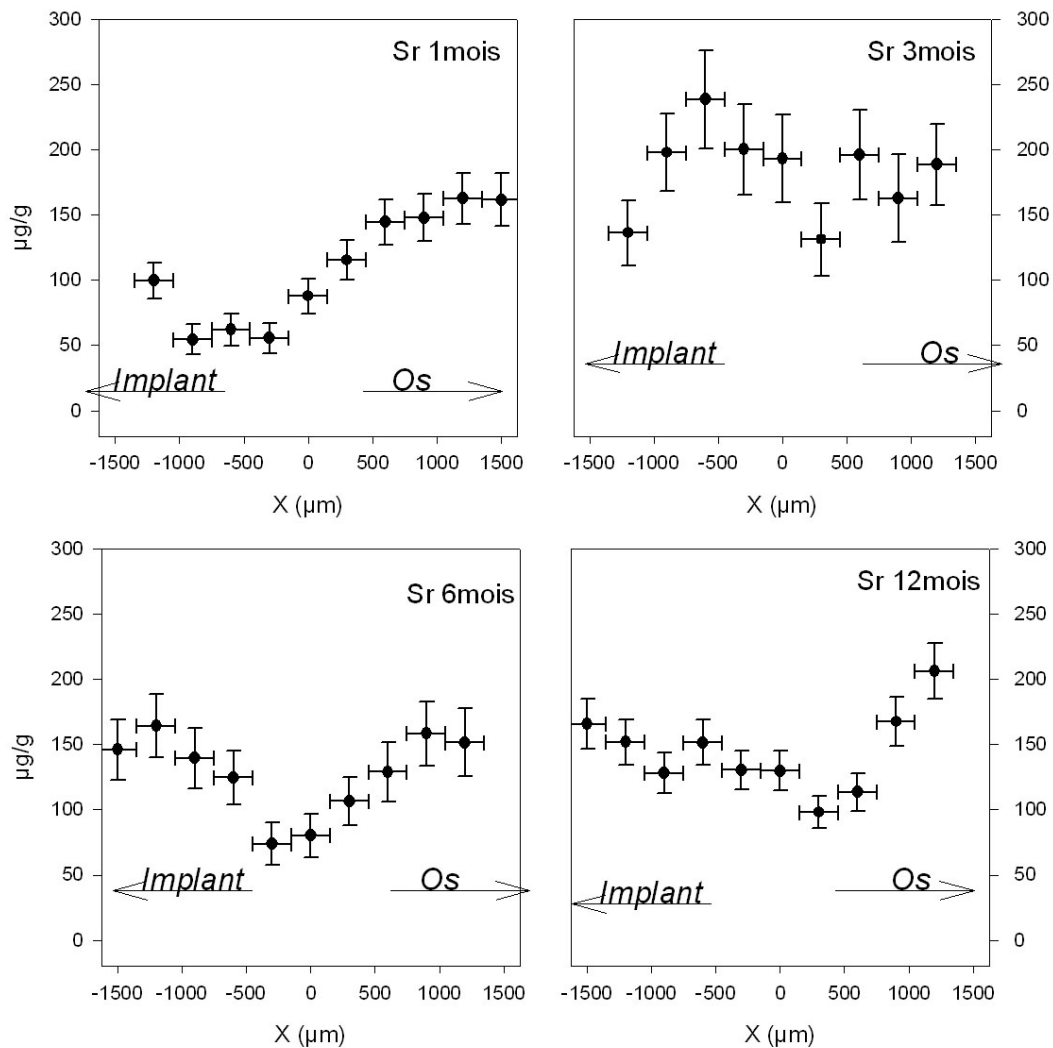


Figure 4.15 Profils de concentrations en strontium de l'implant CaCO_3 55%

1 mois après implantation, les teneurs en strontium et en zinc au niveau de l'implant sont de l'ordre de 100 µg/g et 25 µg/g respectivement. L'interface entre le biomatériau et l'os varie régulièrement vers les valeurs de la matrice osseuse.

3 mois après implantation, l'implant est colonisé par le strontium et le zinc, déjà visible 1 mois après implantation. Comme pour le phosphore, le profil est peu accidenté au niveau de l'interface. Les teneurs en éléments traces de l'implant, de l'interface et de la matrice sont trop voisines pour permettre une différenciation de ces trois zones, mais l'erreur sur la mesure est importante.

6 mois après implantation, l'implant présente des teneurs en strontium et en zinc proches de 150 $\mu\text{g/g}$ et 117 $\mu\text{g/g}$ dans la zone caractéristique de l'implant et de la matrice osseuse. L'interface est toujours présente, cette zone est plus marquée que 3 mois après implantation.

12 mois après implantation, les teneurs en strontium sont proches de 150 $\mu\text{g/g}$ dans la zone caractéristique de l'implant et de la matrice osseuse. L'interface s'est minéralisée. Les résultats obtenus pour le zinc confirment ces résultats.

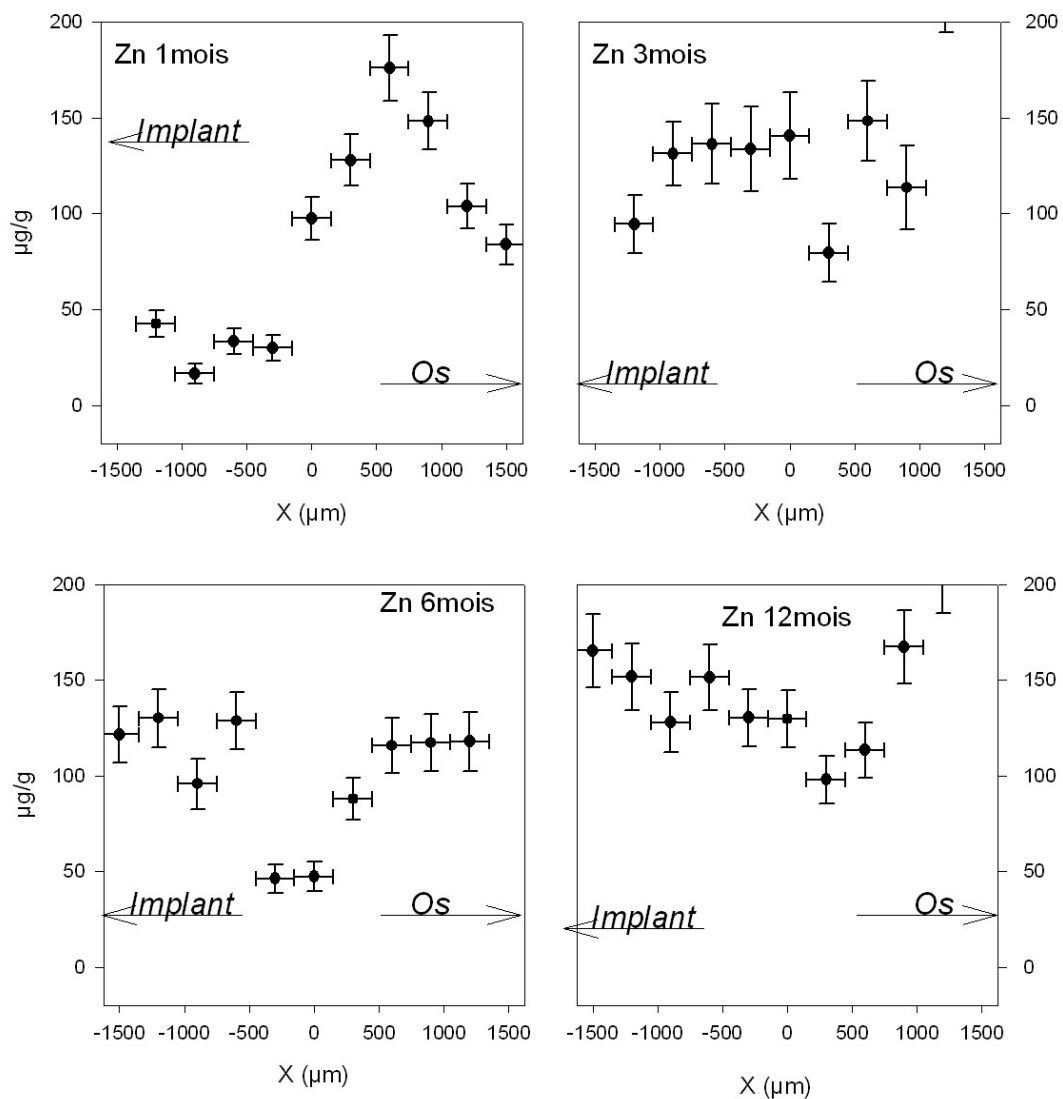


Figure 4.16 Profils de concentrations en zinc de l'implant CaCO_3 55%

- **CaCO₃ avec gentamicine**

* Concentrations en calcium et en phosphore (figures 4.17 et 4.18)

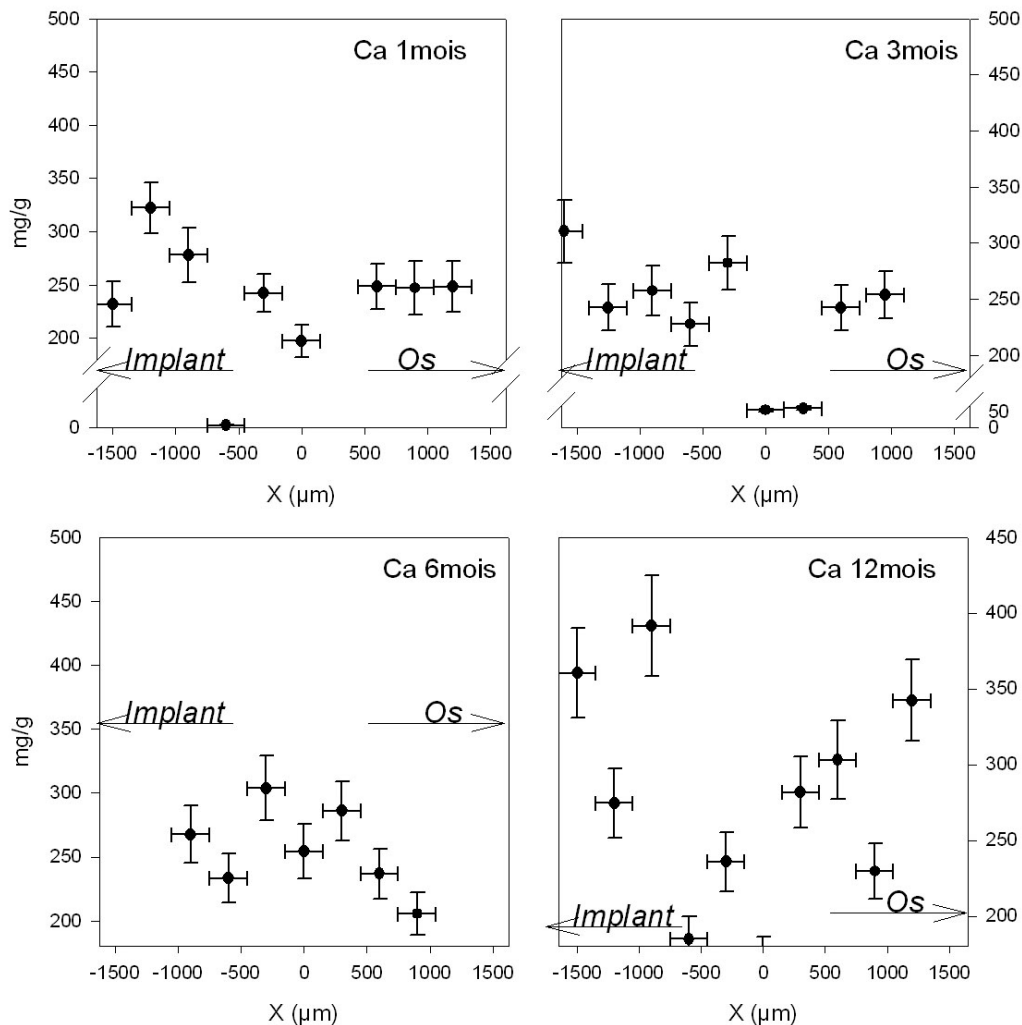


Figure 4.17 Profils de concentrations en calcium de l'implant CaCO₃ avec gentamicine

1 mois après implantation, les teneurs en calcium au niveau de l'implant sont les plus proches de la matrice (par comparaison avec les autres biomatériaux de cette étude) et des teneurs en phosphore quasi nulles. Un point de concentration nulle peut être dû à une erreur de mesure due à un défaut de surface (artefact ou vide). L'interface entre le biomatériau et l'os n'est pas minéralisée.

3 mois après implantation, le CaCO₃ additionné de gentamicine présente (au niveau de l'implant) des teneurs en calcium et en phosphore voisines des teneurs caractéristiques de la matrice (250 mg/g et 127 mg/g environ pour le calcium et le phosphore). L'interface se caractérise par une diminution des teneurs en calcium et en phosphore sur une distance de 600 μm, ce résultat peut être imputé à l'irrégularité de la surface ou à une interface mal minéralisée.

6 mois après implantation, le CaCO_3 additionné de gentamicine présente le profil le plus homogène avec des teneurs en calcium et en phosphore proches de celles de la matrice. Il est impossible de différencier les trois zones (implant, interface et os). Le matériau est partiellement résorbé, il subsiste des points relatifs à des teneurs en calcium plus importantes qui peuvent être dues à la présence de l'implant de départ.

12 mois après implantation, le CaCO_3 additionné de gentamicine présente un profil contrasté avec des teneurs en calcium et en phosphore proches de celles de l'os, caractéristiques de l'ossification du matériau. Des teneurs en calcium inférieures à celles de la matrice (probablement dues à des défauts de surface) et des valeurs intermédiaires entre les valeurs du CaCO_3 et celles de la matrice osseuse sont caractéristiques de la persistance de biomatériau. Il est impossible de différencier les trois zones (implant, interface et os). Le matériau est partiellement résorbé.

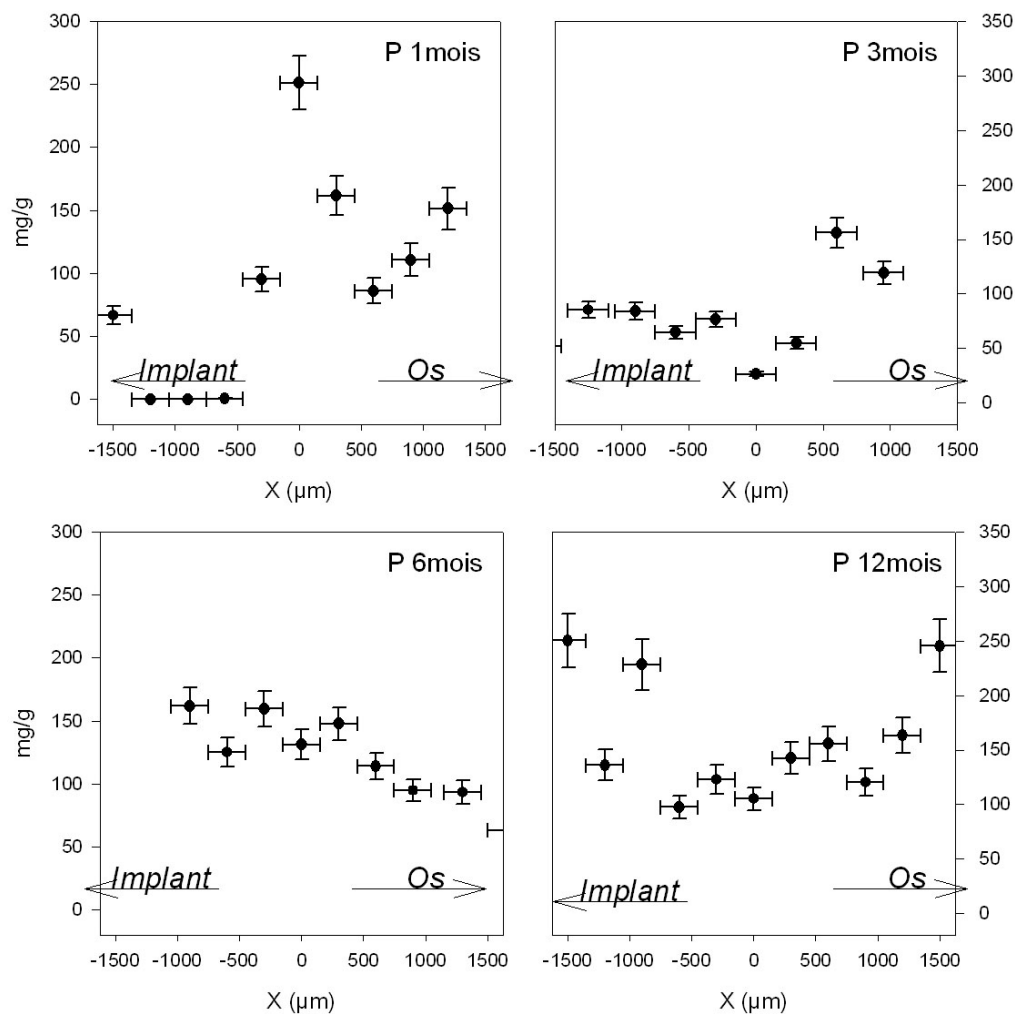


Figure 4.18 Profils de concentrations en phosphore de l'implant CaCO_3 avec gentamicine

* Concentrations en strontium et en zinc (figures 4.19 et 4.20)

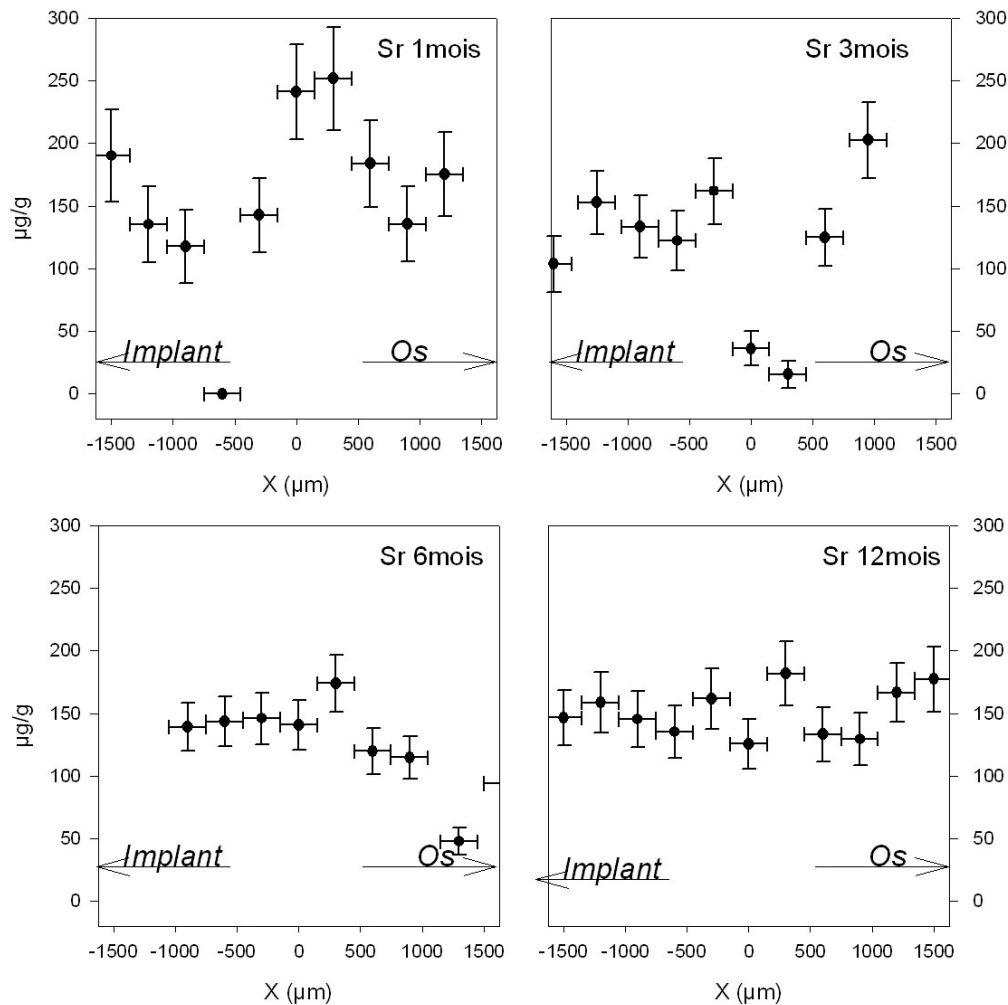


Figure 4.19 Profils de concentrations en strontium de l'implant CaCO_3 avec gentamicine

1 mois après implantation, les teneurs en strontium au niveau de l'implant sont voisines de 120 $\mu\text{g/g}$, les teneurs en zinc sont très irrégulièrement comprises entre 0 et 100 $\mu\text{g/g}$. Le point de concentration nulle est identique à celui observé sur le profils du calcium (figure 4.17), confirmant l'hypothèse d'une erreur due à l'état de surface. A partir de l'interface, les concentrations en strontium et en zinc augmentent de façon régulière pour atteindre les valeurs de la matrice osseuse.

3 mois après implantation, les teneurs en strontium au niveau de l'implant sont voisines des teneurs caractéristiques de la matrice. L'interface se caractérise par une diminution des teneurs en strontium et en zinc sur une distance de 600 μm . Ce résultat a déjà été observé pour le profil du calcium et du phosphore (figures 4.17 et 4.18) et peut être imputé à l'irrégularité de la surface ou à une interface mal minéralisée.

6 mois après implantation, au niveau de l'implant, les teneurs en strontium et en zinc proches de celles de la matrice. Il est impossible de différencier les trois zones (implant, interface et os). Le matériau est presque totalement minéralisé.

12 mois après implantation, les teneurs en éléments traces sont proches de celles de la matrice. Il est impossible de différencier les trois zones (implant, interface et os). Le matériau est presque totalement résorbé.

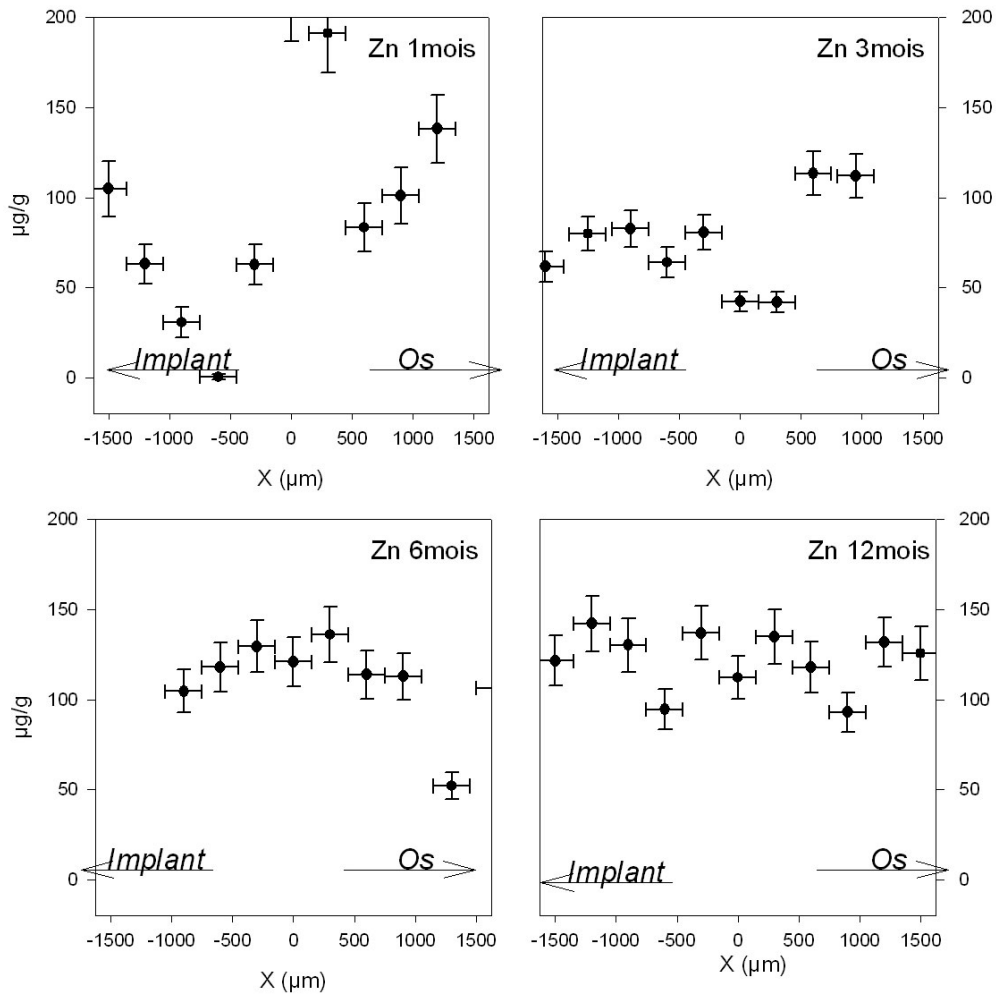


Figure 4.20 Profils de concentration en zinc de l'implant CaCO_3 avec gentamicine

- TCP

* Concentrations en calcium et en phosphore (figures 4.21 et 4.22)

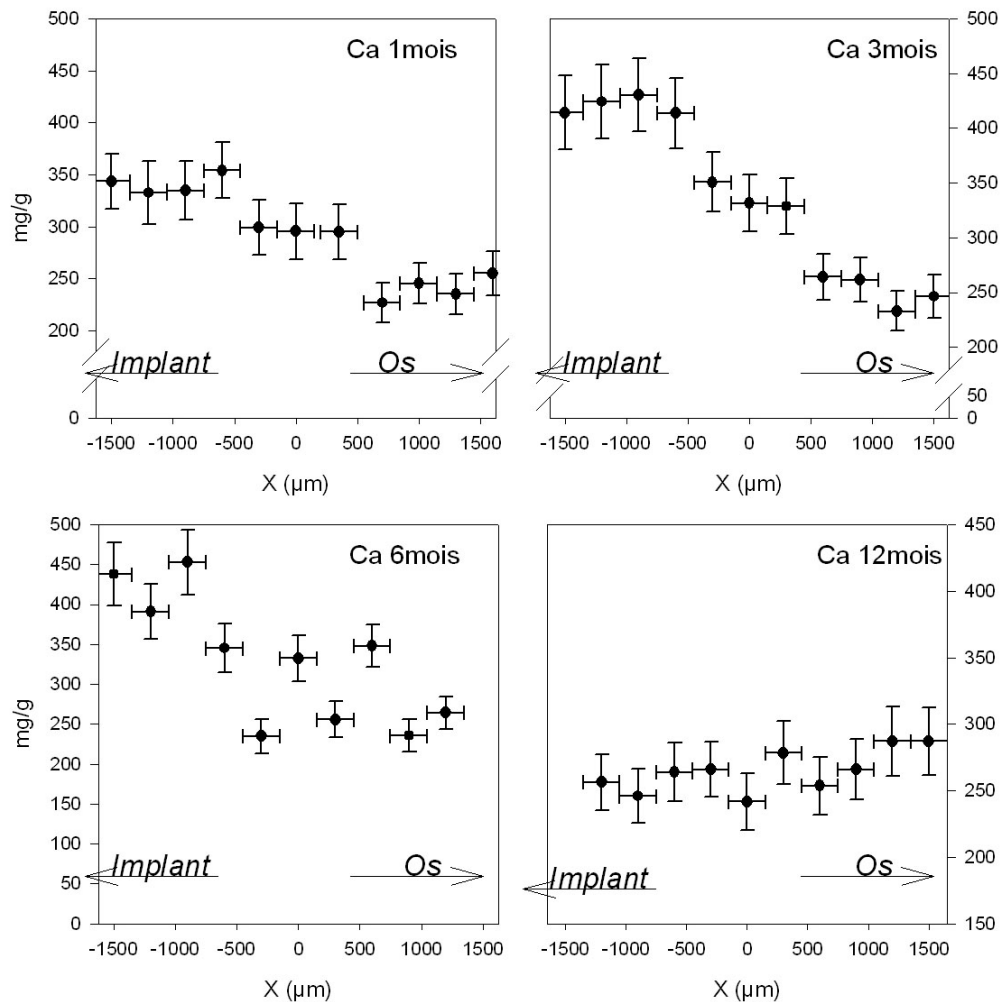


Figure 4.21 Profils de concentrations en calcium de l'implant TCP

1 mois après implantation, le TCP implanté présente des teneurs en calcium comprises entre celles de l'implant et celles de la matrice osseuse et des teneurs en phosphore voisines de celles de l'implant. L'interface entre le biomatériau et l'os varie régulièrement vers les valeurs de la matrice osseuse.

3 mois après implantation, le profil est voisin de celui observé à 1 mois, il existe toujours trois zones différenciées : l'implant avec des teneurs en calcium et en phosphore proches de celles du biomatériau, l'interface caractérisée par un gradient de concentration et la matrice osseuse.

6 mois après implantation, les teneurs en calcium et en phosphore au cœur de l'implant sont intermédiaires entre les valeurs du TCP et celles de la matrice osseuse. La zone d'interface caractérise ici la partie extérieure de l'implant où les concentrations en calcium mettent en évidence la présence de biomatériau et d'os.

12 mois après implantation, le TCP (45% de porosité) présente des concentrations en phosphore et en calcium dans la zone caractéristique de l'implant voisines de celles de la matrice osseuse. L'interface n'est plus visible. Les valeurs en calcium supérieures à celles de la matrice laissent penser que l'implant est toujours partiellement présent.

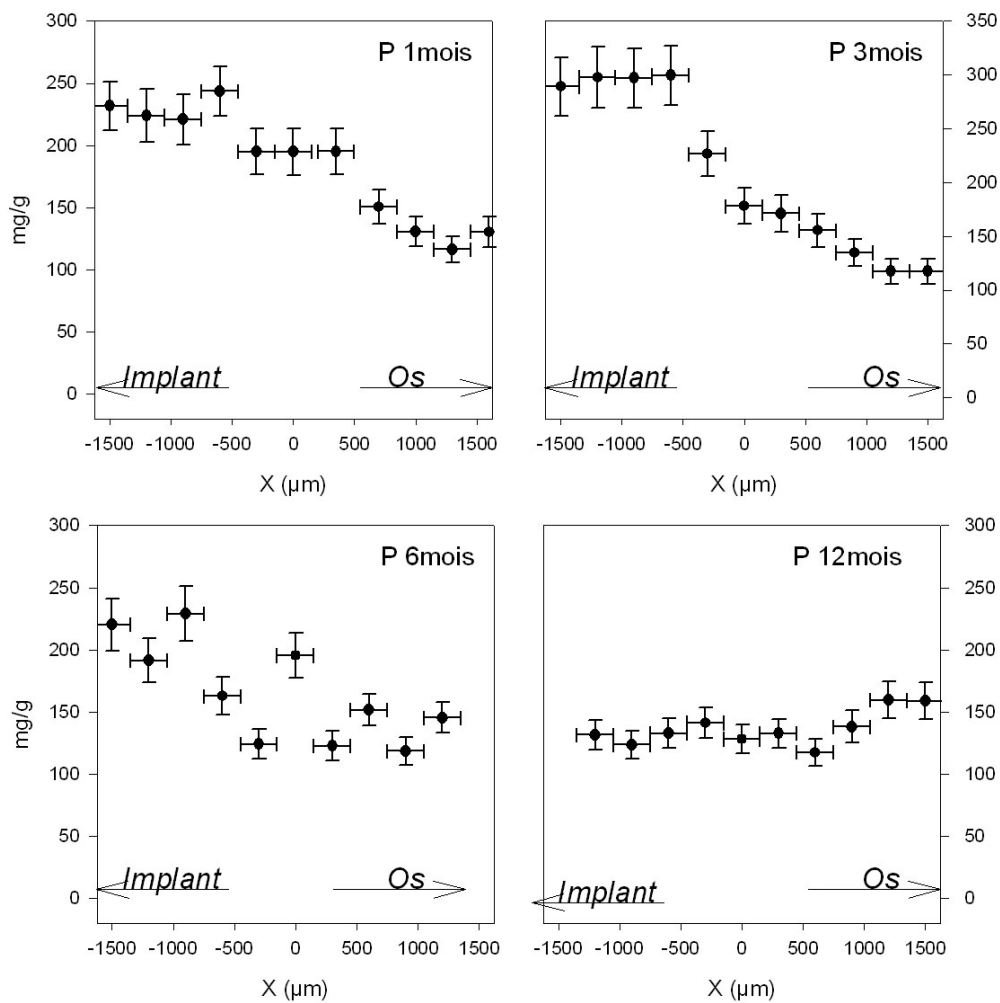


Figure 4.22 Profils de concentration en phosphore de l'implant TCP

* Concentrations en strontium et en zinc (figures 4.23 et 4.24)

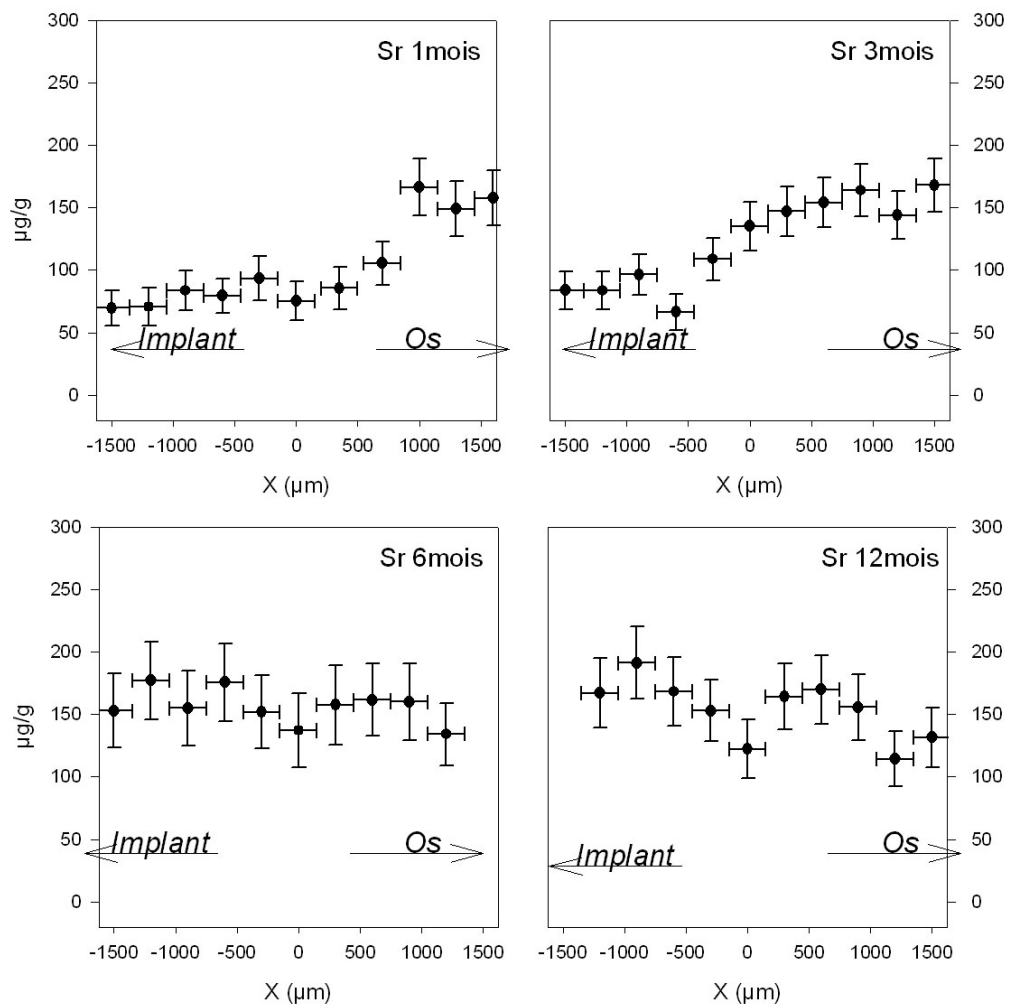


Figure 4.23 Profils de concentration en strontium de l'implant TCP

1 mois après implantation, les teneurs en strontium voisines de 100 µg/g au niveau de l'implant et il y a des traces de zinc. L'interface entre le biomatériau et l'os est minéralisée et l'augmentation de la concentration en éléments traces pour atteindre les teneurs caractéristiques de la matrice s'effectue sur une distance de l'ordre de 400 µm.

3 mois après implantation, les teneurs en strontium au cœur de l'implant sont voisines de 100 µg/g, la quantité de strontium dans l'implant n'a pas augmenté de manière significative entre 1 et 3 mois après implantation. L'interface s'étend sur 600 µm et varie régulièrement vers les valeurs de la matrice osseuse. Pour le zinc, le CaCO₃ à 44% de porosité et Le TCP (45% de porosité) présentent des valeurs faibles au niveau des implants.

6 et 12 mois après implantation, l'implant présente des teneurs en strontium et en zinc sont proches de celles de la matrice. Il est impossible de différencier les trois zones (implant, interface et os). Le matériau est presque totalement minéralisé.

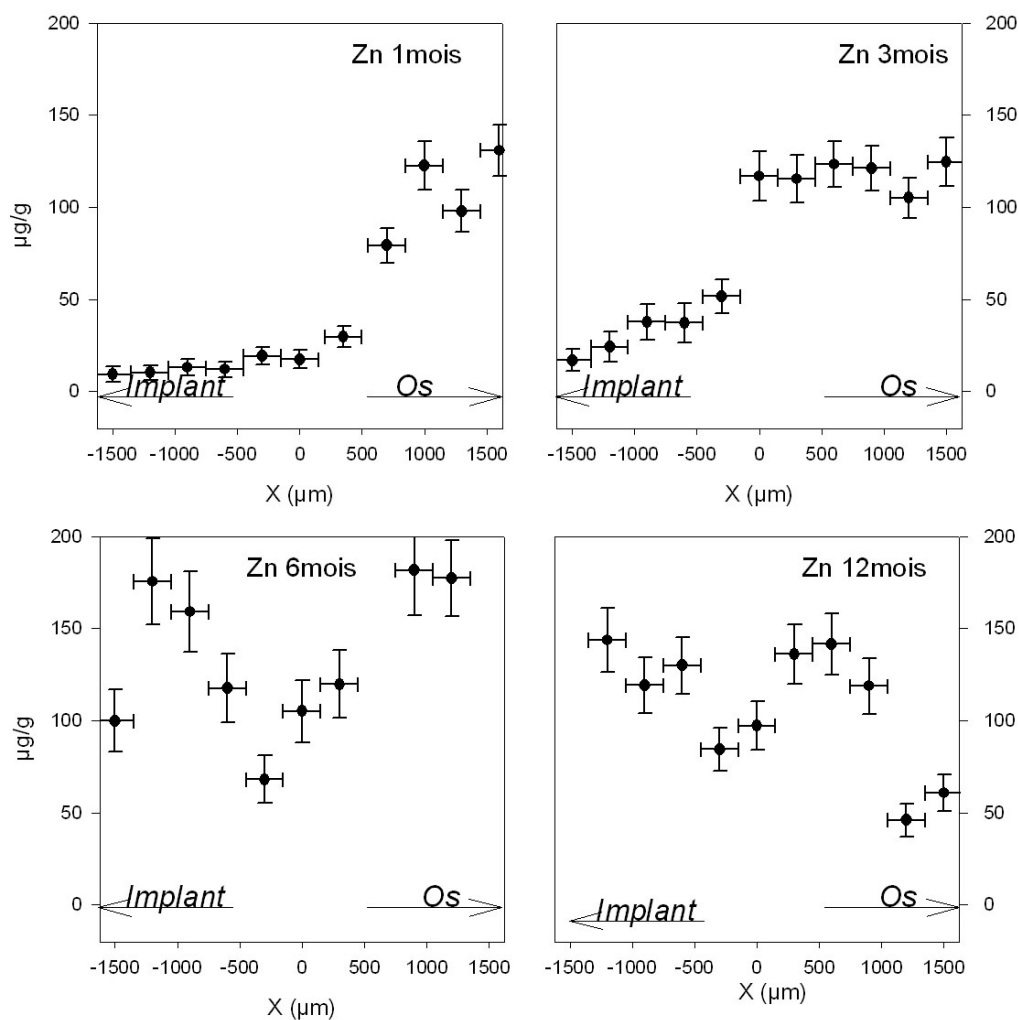


Figure 4.24 Profils de concentration en zinc de l'implant TCP

I.2.5 Discussion

La technique d'analyse PIXE appliquée à des carbonates de calcium et des TCP implantés *in vivo* a permis d'évaluer la variation des profils de concentration en calcium, en phosphore, en strontium et en zinc au cours du temps. Cette technique a apporté des informations quantitatives qui ont corroborées des études histologiques des matériaux implantés.

Un mois après implantation, le strontium a migré dans les implants dont la colonisation par le zinc est influencée par le pourcentage de porosité des matériaux implantés, sa migration est favorisée par l'augmentation du pourcentage de pores, la présence de phosphore dans les carbonates de calcium n'a pas été remarquée à ce stade.

Dès le délai de 3 mois, les éléments phosphore et strontium sont présents dans tous les biomatériaux à des teneurs voisines des valeurs caractéristiques de la matrice osseuse. Ici encore les teneurs des implants en zinc sont d'autant plus élevées que le pourcentage de porosité des implants est important. Pour le TCP, il y a compétition entre la diminution du phosphore constitutif du biomatériau et la colonisation de l'implant par le phosphore de l'organisme. Les profils à 3 et à 6 mois présentent donc des teneurs en phosphore supérieures à celles de la matrice (pour le TCP). Dès le délai de 3 mois, tous les profils des implants présentent des interfaces implant/ os minéralisées, la zone déminéralisée due à une zone fibreuse ou inflammatoire (visible pour le délai de 1 mois) avait un caractère temporaire, ce qui confirme l'hypothèse que ces modifications sont dues au geste chirurgical. En PIXE, l'absence de zone déminéralisée à l'interface (pour les délais de 3, 6 et 12 mois) confirme la bio-intégration des matériaux.

Les concentrations en calcium du CaCO_3 à 55% de porosité ainsi que du carbonate de calcium chargé en antibiotique diminuent plus rapidement que celles du TCP et du CaCO_3 44% à 1 et 3 mois après implantation. Le TCP et le CaCO_3 à 44% de porosité présentent des résultats similaires avec la présence de traces de biomatériaux 6 mois après implantation (profils de calcium).

L'augmentation du pourcentage de porosité et l'adjonction d'un antibiotique au matériau accélère la minéralisation du matériau pour les délais de 1 et 3 mois. Quel que soit le matériau implanté, les résultats à 12 mois montrent une minéralisation des implants, plus importantes pour le CaCO_3 44% et le TCP, que pour le CaCO_3 55% et CaCO_3 avec antibiotique. Les résultats moins significatifs observés pour le CaCO_3 55% et CaCO_3 avec antibiotique sont à mettre en regard avec l'irrégularité des surfaces des matériaux biologiques analysés par PIXE et ne permettent pas de conclure quant à la qualité de la minéralisation des biomatériaux 12 mois après implantation.

I.3 Application : étude des cinétiques de minéralisation des matériaux G54_500 et G54HT_500 implantés chez le lapin.

I.3.1 Implantation dans des tibias de lapins

a Protocole expérimental

Implantation *in vivo* dans des plateaux tibiaux de lapins de deux matériaux : G54_500 et G54HT_500 de diamètre 6 mm et de hauteur 4 mm.

Les échantillons ont été placés dans des éprouvettes en verre, fermées par un bouchon métallique puis stérilisés pendant 2h à 180°C en atmosphère sèche.

Le lapin a été choisi comme modèle animal. Quinze lapins de race New-Zealand (ESD®) ont été opérés. Les animaux mâles étaient âgés de 16 à 18 semaines, pesaient entre 3 et 4 kilogrammes.

Les animaux ont été identifiés et élevés en cage individuelles.

Ce protocole comprend 3 groupes d' animaux correspondant aux délais d'implantations

1 mois	5 lapins
3 mois	3 lapins
6 mois	3 lapins (non présenter dans ce travail)

b Implantations et prélèvements

30 minutes avant l'intervention chirurgicale les animaux ont reçu une injection de Kétamine (1cc/ kg) en intra musculaire puis une anesthésie locale par injection de Xylocaïne au niveau de la crête du plateau tibial juste avant l'intervention.

Les matériaux ont été implantés dans les plateaux tibiaux (figure 4.25) :

- G54_500	tibia droit
- G54HT_500	tibia gauche

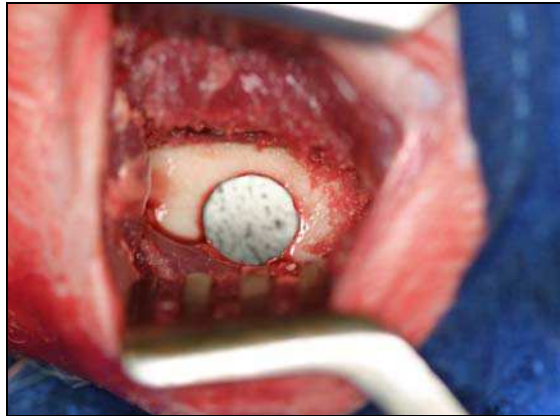


Figure 4.25 Site d'implantation des matériaux G54_500 et G54HT_500

Les prélèvements ont été réalisés pour les délais 1 et 3 (le délai de 6 mois est prévu pour la mi-juillet). 5 lapins ont été sacrifiés pour le délai de 1 mois, 3 lapins pour le délai de 3 mois. Après sacrifice, les plateaux tibiaux contenant les implants ont été stockés dans une solution à 10% en formol.

I.3.2 Préparation des échantillons

L'étude des échantillons géopolymères a été réalisée sur les implants inclus en résine. Ce choix ne permet pas de réutiliser les échantillons pour des analyses ultérieures (comme ce fut le cas pour l'étude des CaCO_3) en contre partie, l'état de surface de nos échantillons est amélioré, ce qui réduit les incertitudes observées dans la première partie de ce chapitre.

La résine utilisée nécessite un temps de prise d'environ 3 semaines. Les coupes ont une épaisseur minimale de 200 μm . Elles ont été obtenues grâce à un microtome à lame diamantée de type LEICA.

Avant l'analyse par PIXE, les échantillons ont été métallisés au carbone.

Des photographies de chaque coupe épaisse ont été prises afin de visualiser la géométrie des implants. Lors de l'étude par PIXE, les interfaces implant/ tissus hôtes ont facilement été délimitées à l'endoscope grâce à une différence d'aspect entre les implants et la partie biologique. La figure 4.26 présente un exemple d'échantillon analysé par PIXE. L'observation à l'endoscope durant les mesures est semblable au cliché de la figure 4.26, les points d'impact du faisceau de protons sont visibles (noté ligne sur la figure).

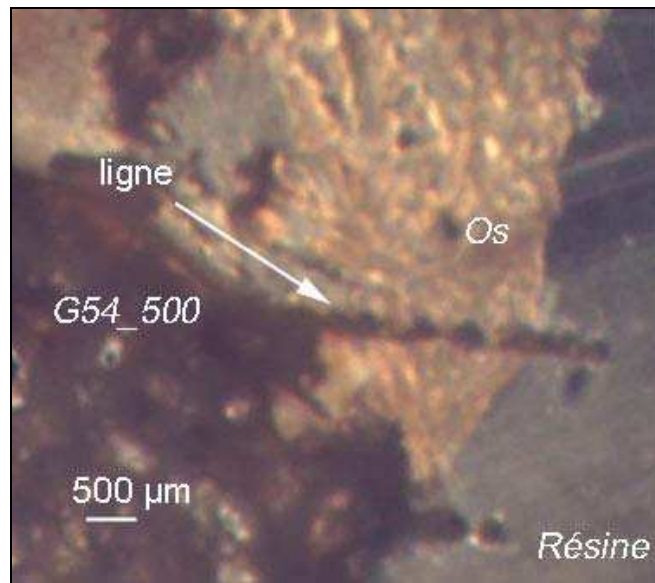


Figure 4.26 clichés du profil d'analyse réalisée par PIXE sur le géopolymère pur G54_500 (délai de 1 mois)

I.3.3 Paramètres d'analyse

Les profils de concentrations ont été réalisés au CNRS-CERI d'Orléans. Les échantillons étant ici inclus en résine, il a fallu diminuer le courant à des valeurs inférieures à 1 nA afin d'éviter de faire fondre la résine. Pour la même raison, la charge a été diminuée de $2 \cdot 10^{-7}$ C pour l'étude sur cibles massives contenant les CaCO_3 à $1 \cdot 10^{-7}$ C pour ces échantillons.

La quantification des éléments constitutifs des matériaux est possible par GUPIX, mais elle s'avère ici très délicate : la quantité de résine n'est pas connue et fluctue en fonction de la position sur l'échantillon.

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux profils des éléments : Si, K, Ca, P et Zn. Ces éléments ont permis de définir le comportement de l'échantillon (Si, K, Ca et P) et de la matrice osseuse (Ca, P et Zn).

Nos irradiations ont été réalisées durant des temps courts (environ 100 secondes par point).

La taille du faisceau a été fixée à 200 μm de diamètre afin de limiter l'influence des pores des implants. Comme précédemment nous avons travaillé avec un funny filter.

I.3.4 Résultats

a - Os témoin

Avant de commencer les analyses des profils de concentration des implants G54_500 et G54HT_500, nous nous sommes intéressés à la reproductibilité de nos mesures.

Différentes lignes d'irradiation ont été réalisées et correspondent aux profils présentés sur la figure 4.27. Il est possible de distinguer deux groupes :

- Les profils des éléments Ca, P et Zn présentent les intensités importantes
- Les profils des éléments Si, et K présentent des valeurs très faibles quelle que soit la zone irradiée. Les éléments Si et K sont présents dans la matrice osseuse à l'état de trace.

Le funny filter permet de minimiser l'effet du pic d'échappement du détecteur SiLi.

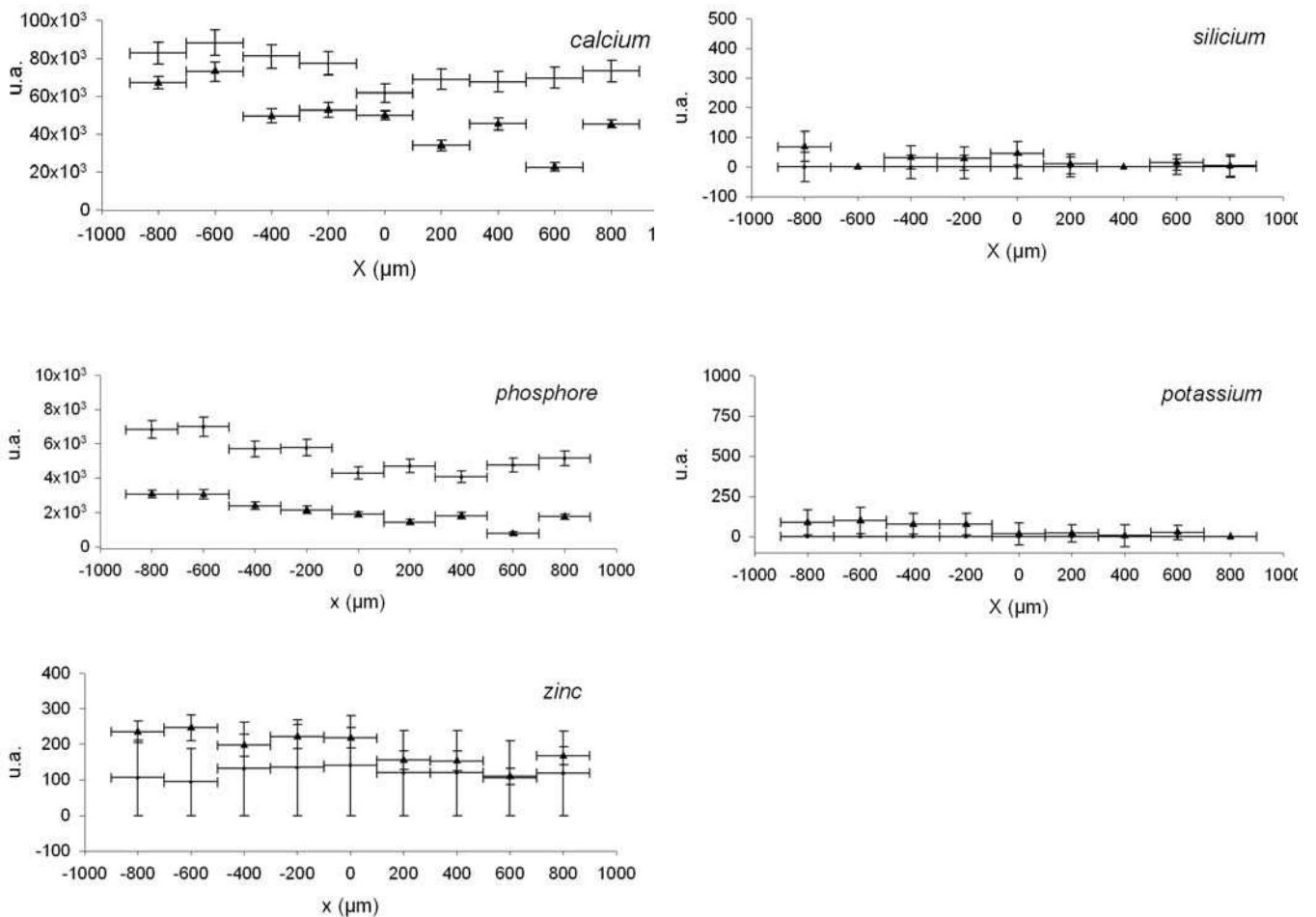


Figure 4.27 Profils des différents éléments étudiés par PIXE sur un prélèvement d'os de lapin.

b - Matériaux avant implantation G54_500 et G54HT_500

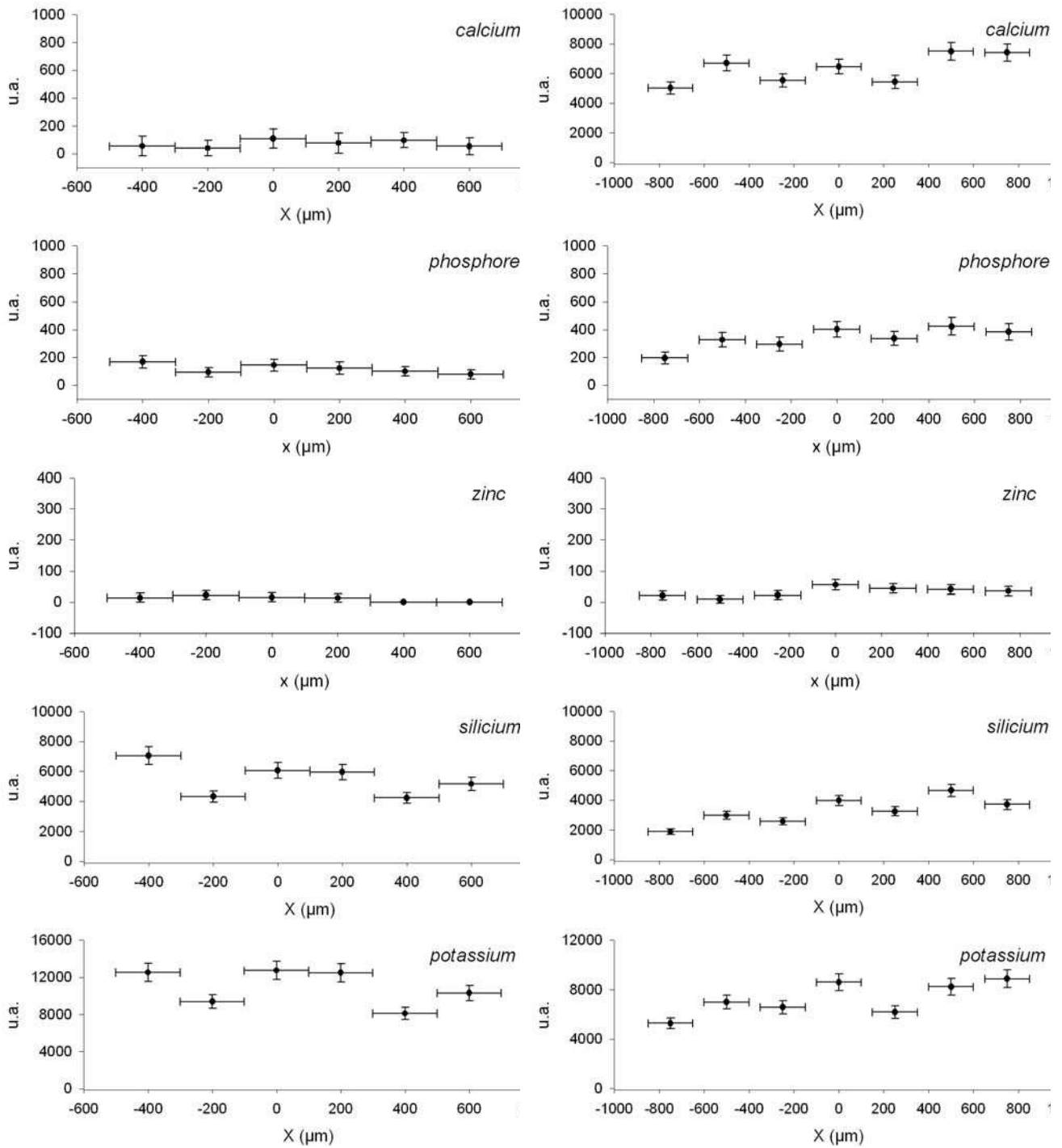


Figure 4.28 Profils de concentrations (u.a) des éléments constitutifs de la matrice osseuse. A gauche le G54_500 et à droite le G54HT_500

Les profils présentés sur la figure 4.28 ont été réalisés sur deux lignes distinctes des matériaux inclus en résine. Les x positifs correspondent à une ligne horizontale et les x négatifs à une ligne verticale.

Les échantillons purs (G54_500 et G54HT_500) ont été inclus en résine, cette inclusion n'étant pas parfaite, il persiste des porosités non incluses ce qui provoque des irrégularités de surface. Il a été nécessaire d'étudier l'influence de ces irrégularités et des porosités importantes des matériaux sur la reproductibilité des mesures.

Les profils sont plus homogènes pour le composite G54HT_500 que pour le géopolymère pur. La taille des pores n'influence pas la mesure pour une taille de faisceau de 200 μm de diamètre.

Les intensités des éléments Ca et P sont plus importantes pour le composite G54HT_500 que pour le géopolymère pur. Pour les éléments de la matrice géopolymère (Si et K), les intensités mesurées sont du même ordre de grandeur. L'élément Zinc, constitutif de la matrice osseuse est totalement absent des échantillons avant implantation.

c - Implant G54_500 et G54HT_500

Les profils présentés dans la suite de ce paragraphe sont centrés sur l'interface implant/ tissus hôtes ($x = 0$). Les abscisses négatives correspondent aux zones caractéristiques des implants et les abscisses positives correspondent aux zones caractéristiques du milieu hôte.

- **15 jours**

Un des lapins est décédé 15 jours après implantation. Les implants ont été prélevés et étudiés par PIXE car ils présentent un délai intermédiaire a permis de différencier par PIXE une zone fibreuse d'une zone minéralisée. Pour cette étude, nous nous sommes intéressés aux éléments Ca, P, Si et K qui présentent les intensités les plus importantes.

Les profils des implants G54HT_500 et G54_500 présentent trois zones distinctes (figures 4.30, 4.31) :

- Une zone caractéristique des implants avec des concentrations élevées en silicium, aluminium et potassium (comparativement avec les concentrations de la matrice osseuse).
- Une zone déminéralisée (concentrations voisines de 0 pour les éléments calcium et phosphore) dont la largeur est d'environ 500 μm , cette zone correspond à la zone fibreuse mise en évidence au microscope (figure 4.29).
- Une zone où les intensités en calcium et phosphore sont voisines de celles mesurées pour l'os cortical

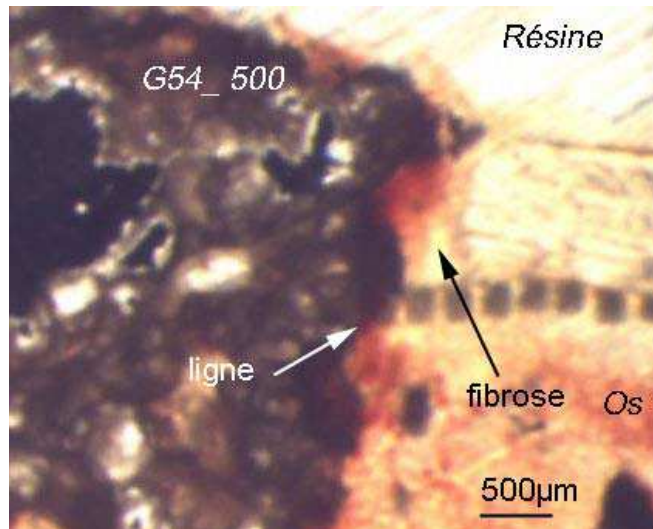


Figure 4.29 Cliché des points d'impacts du faisceau sur une coupe en résine de G54_500 après 15 jours d'implantation (le cliché de la coupe du composite est très similaire et n'est pas présenté ici)

Les profils en calcium et phosphore des implants G54_500 et G54HT_500 permettent de mettre en évidence les trois zones décrites précédemment. La zone fibreuse peut être associée en PIXE à une zone non minéralisée.

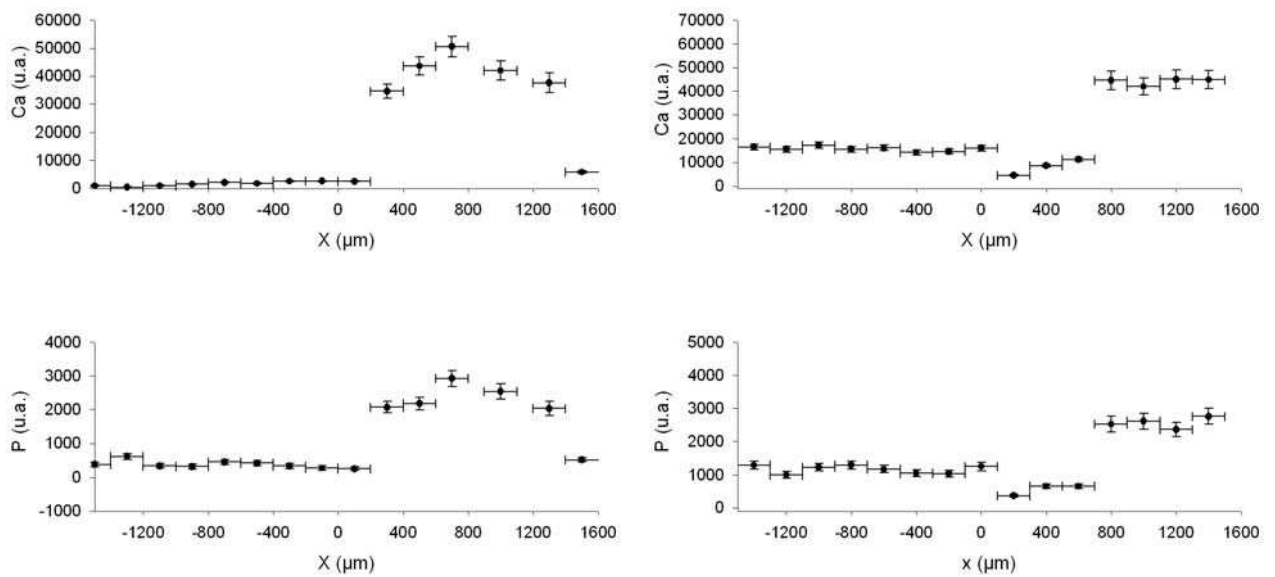


Figure 4.30 Profils de concentrations (u.a.) des éléments constitutifs de la matrice osseuse. A gauche le G54_500 et à droite le G54HT_500

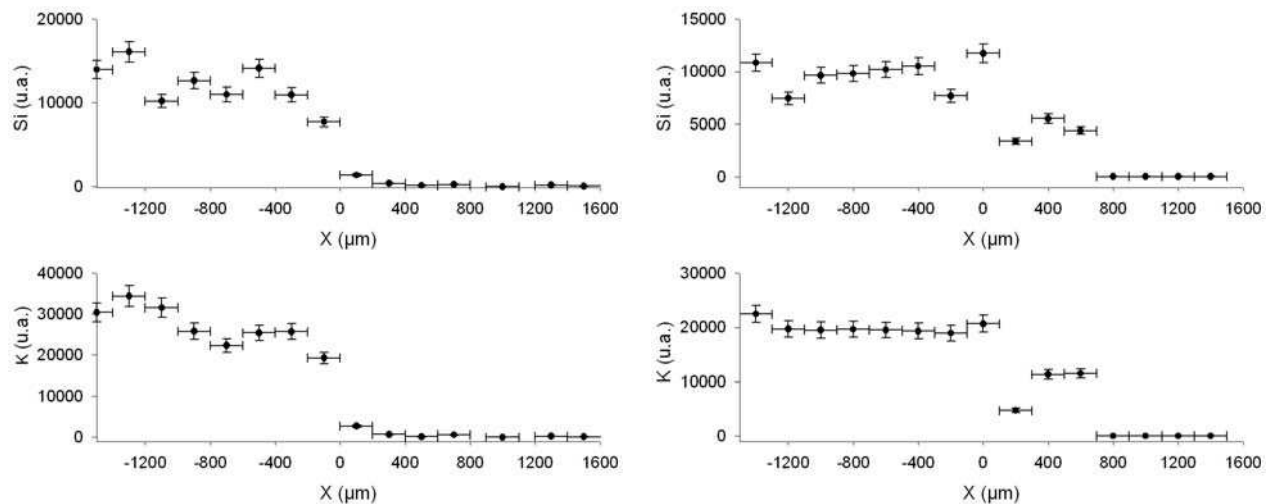


Figure 4.31 Profils de concentrations (u.a) des éléments constitutifs de la matrice géopolymère. A gauche le G54_500 et à droite le G54HT_500

- **Implants G54_500 et G54HT_500 à 1 et 3 mois après implantation**

Les profils d'intensités des implants G54_500 (figure 4.32) et G54HT_500 (figure 4.33) présentent 2 zones :

- Une zone ($x < 0$) caractéristique des implants avec des concentrations élevées en silicium et potassium (comparativement avec les concentrations de la matrice osseuse)
- Une zone ($x > 0$) où les intensités en calcium, phosphore et zinc sont voisines de celles mesurées pour l'os cortical (profil présenté figure 4.35).

Quel que soit le délai d'expérimentation (1 ou 3 mois), les éléments Si et K (dans la zone implant ($x < 0$)) présentent des intensités voisines de celles mesurées pour les matériaux avant implantation et des valeurs nulles pour les $x > 0$ caractéristiques de l'interface et de la matrice osseuse. Les profils obtenus pour les éléments Si et K sont très voisins de ceux obtenus pour le délai de 15 jours. Il n'y a pas de diffusion de silicium ou de potassium des implants vers la matrice osseuse.

Les profils en calcium et phosphore des implants G54_500 et G54HT_500 permettent d'étudier les interfaces entre les implants et la matrice osseuse.

Les implants G54_500 et G54HT_500 prélevés 1 mois après implantation sont caractérisés par des profils sans zone déminéralisée à l'interface. Il y a un contact intime entre les matériaux implantés et la matrice osseuse pour les profils étudiés. Les photographies obtenues par microscope optique confirment ces observations.

3 mois après implantation, il n'y a pas d'augmentation des intensités des éléments Si et K dans la zone caractéristique de la matrice osseuse. le profil réalisé sur l'implant G54_500 met en évidence la présence des éléments Ca, P et Zn dans la zone caractéristique de l'implant au niveau d'un pore. L'interface minéralisée à 1 mois est toujours présente. L'absence de gradient d'intensité pour les éléments Si et K au niveaux des implants montre qu'il n'y a pas de résorption de ces implants.

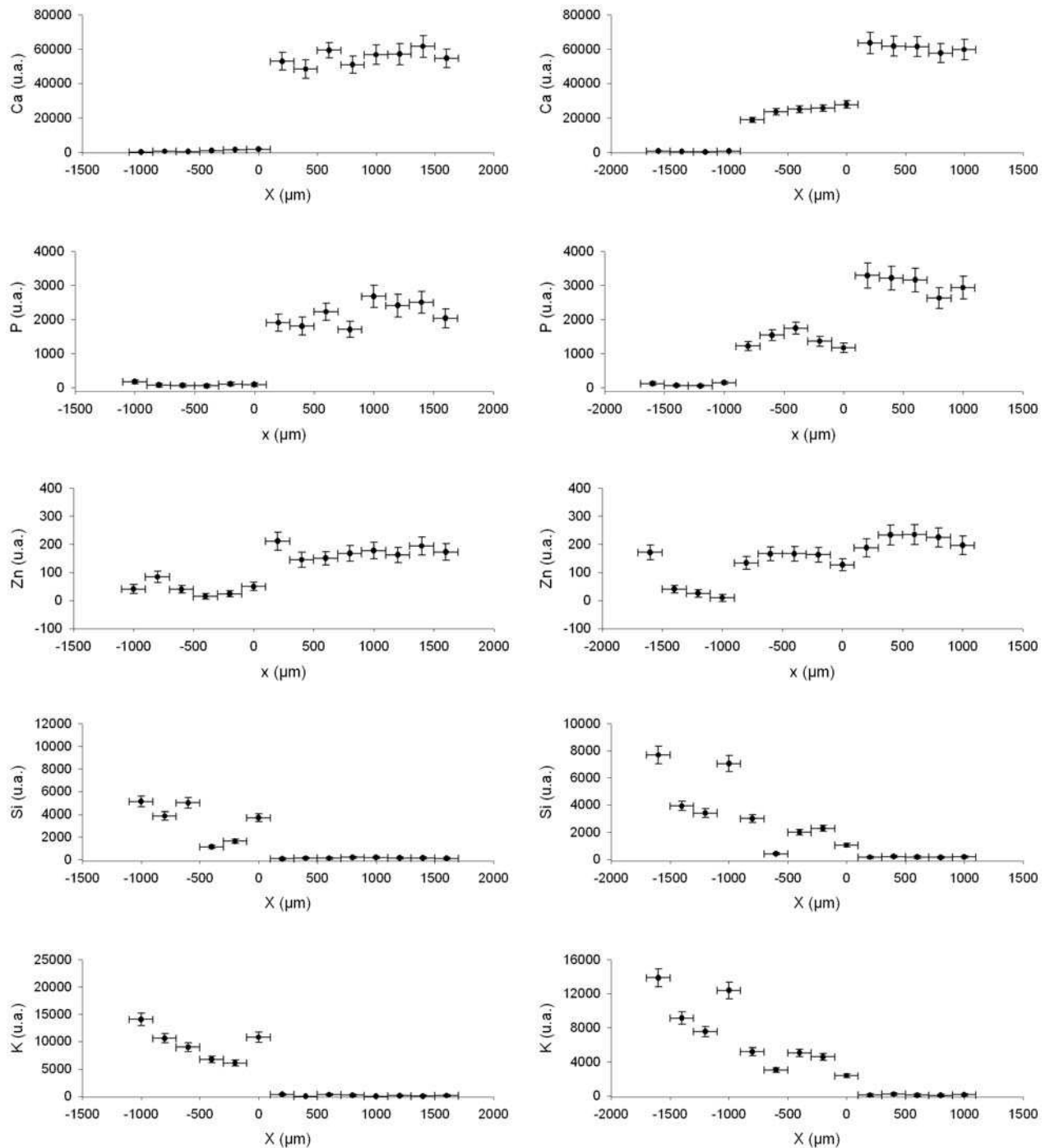


Figure 4.32 Profils de concentrations (u.a) de l'implant G54_500. A gauche le délai de 1 mois et à droite le délai de 3 mois

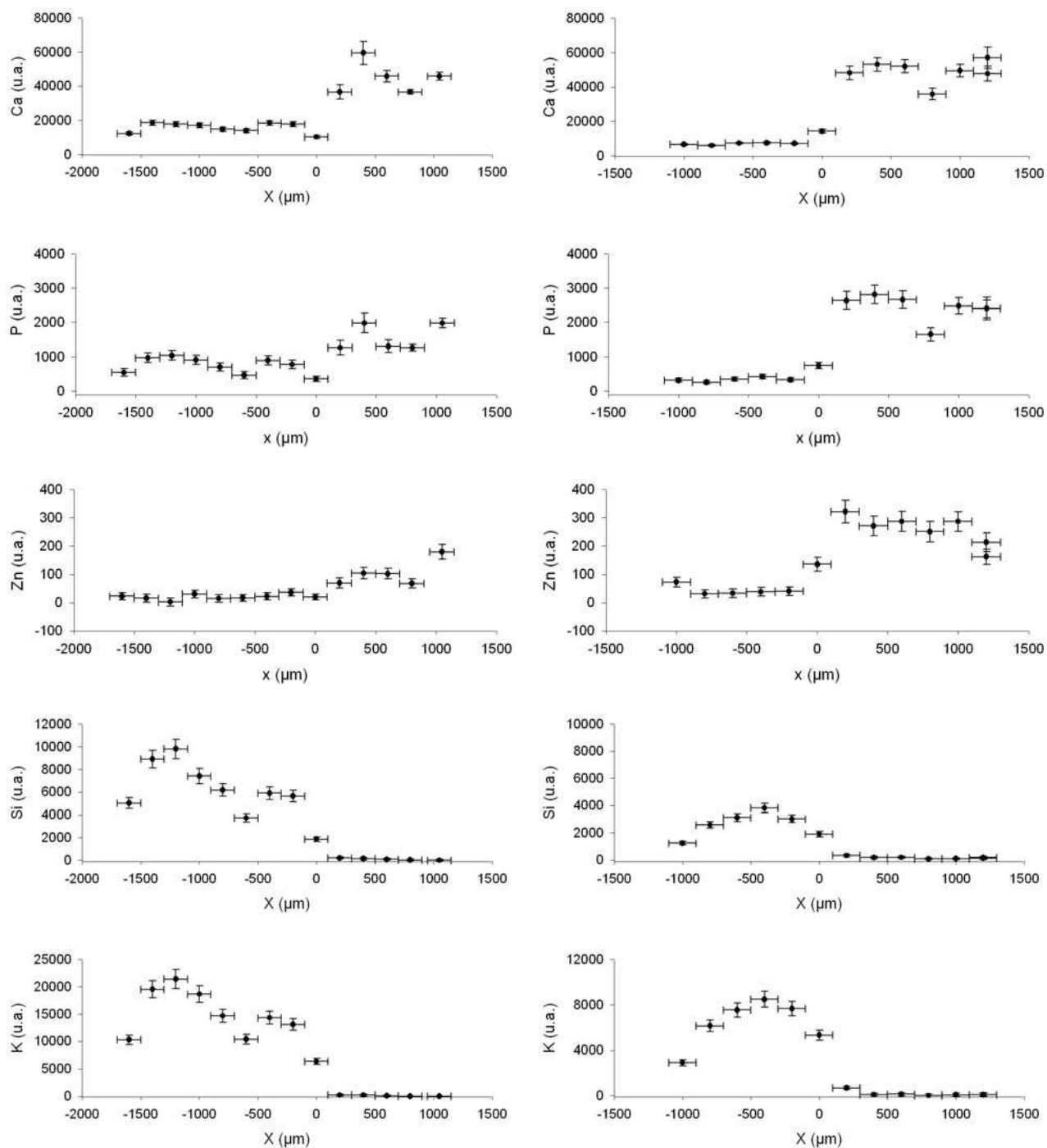


Figure 4.33 Profils de concentrations (u.a.) de l'implant G54HT_500. A gauche le délai de 1 mois et à droite le délai de 3 mois

I.3.5 Discussion

L'étude par PIXE sur les carbonates de calcium et le TCP (partie I.2) a été réalisée sur des échantillons non inclus en résine ce qui nous a permis de réutiliser ces échantillons pour d'autres études, notamment l'étude par activation neutronique.

La principale difficulté rencontrée avec ce type d'échantillons est liée au repérage de l'implant : il reste qualitatif et des incertitudes peuvent subsister quant à la position précise de l'interface.

Ces difficultés de repérage sont inexistantes avec l'utilisation d'échantillons enrobés en résine. Le repérage est précis et les profils obtenus peuvent être observés au microscope afin de corrélérer plus finement encore les résultats obtenus par PIXE et les observations biologiques.

A 1 mois après implantation, les interfaces entre les implants G54_500, G54HT_500 et la matrice osseuse sont minéralisées. La PIXE permet d'observer ce contact intime.

L'étude des éléments constitutifs de la matrice géopolymère permet d'observer qu'il n'y a pas de migration de ces éléments dans les tissus biologiques environnants. Ce résultat est vérifié pour les délais de 1 et de 3 mois.

Pour le délai de 3 mois, nous avons pu mettre en évidence par PIXE la colonisation d'un pore du géopolymère pur G54_500. Ce résultat confirme la colonisation des pores des matériaux observés par microscopie (ces résultats seront détaillés au chapitre suivant). Les porosités plus petites du composite G54HT_500 n'ont pas permis de mettre en évidence cette colonisation. Néanmoins elle sera mise en évidence en biologie.

L'inconvénient de la résine est l'impossibilité de réutiliser les échantillons pour d'autres analyses. Un autre désavantage de la PIXE appliquée à des échantillons inclus en résine réside dans la difficulté à quantifier les différentes concentrations.

II Analyse de matériaux CaCO₃ et TCP par activation neutronique (N.A.A)

II.1 Principe et intérêt de la méthode d'Analyse par Activation Neutronique

II.1.1 Principe

L'analyse par Activation Neutronique (Neutron Activation Analysis) est une méthode qualitative et quantitative d'analyse multi-élémentaire.

Suite à une réaction nucléaire entre un neutron et un atome de la cible (collision non élastique), l'atome est alors excité et émet un rayonnement γ , devenant un isotope radioactif qui va se désexciter par l'émission d'une particule β et d'un photon γ .

Le nombre de radiations émis à une énergie donnée (caractéristique d'un élément) est directement proportionnel au nombre de noyaux contenus dans l'échantillon. Cette propriété nous permet de remonter à la fraction massique de l'élément étudié au sein de l'échantillon irradié.

II.1.2 Intérêt

L'étude de la composition d'échantillons biologiques à l'aide de neutrons rapides présente de nombreux avantages. Cette technique permet d'identifier et de déterminer la présence de nombreux éléments dans un échantillon irradié (70% des éléments présentent des propriétés qui leur permettent d'être irradiés). Cette méthode est non destructive, sensible, rapide et multi-élémentaire .

L'irradiation des échantillons s'effectue sous atmosphère. Il est préférable que l'échantillon à analyser et le matériau de référence présentent des géométries semblables.

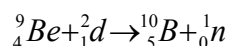
Un inconvénient de cette méthode est lié aux nombreuses interférences entre les éléments. L'étude des interférences présentée par la suite a montré que l'analyse des éléments Ca, P, Sr et Mg est possible.

II.1.3 Dispositif expérimental

Nous avons travaillé au CNRS CERI d'Orléans avec un cyclotron isochrone à énergie variable. Nous avons utilisé un faisceau de deutons d'énergie 17,5 MeV et d'intensité 25 μA [9].

L'énergie de 17,5 MeV permet de générer des neutrons d'énergie moyenne 7 MeV qui ont pu irradier les différents noyaux constitutifs de nos échantillons.

Les neutrons sont produits par l'impact des deutons sur un disque de béryllium de 60 mm de diamètre et de 2,6 mm d'épaisseur suivant la réaction suivante :



Le choix de la cible de béryllium a été influencé par des travaux antérieurs [10], ce matériau présente un bon rendement neutronique, un faible échauffement et une usure lente.

Le spectre en énergie des neutrons produits est continu. Le flux de neutrons arrivant sur nos échantillons est compris entre 10^9 et 10^{10} $\text{n cm}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Ces neutrons interagissent avec les échantillons pour produire des rayonnements γ .

Le comptage des γ a été réalisé à l'aide d'un détecteur à semi-conducteur de type Ge(Li) avec un volume actif de 100 cm^3 et une résolution de 2,5 à 3 keV. Le détecteur est relié à un analyseur multicanaux et à un ordinateur permettant un traitement direct du spectre de l'échantillon.

II.2 Application à l'étude des teneurs en Ca, P, Sr et Mg des matériaux TCP et CaCO_3 implantés chez la brebis.

II.2.1 Préparation des échantillons

Les échantillons implantés dans des fémurs de brebis et prélevés pour l'analyse par PIXE ont été utilisés pour l'étude par activation neutronique.

Pour l'analyse par PIXE, les échantillons ont été métallisés au carbone avant d'être irradiés. Pour l'étude par activation neutronique, ils ont été tout d'abord polis afin d'éliminer la couche de surface.

Afin d'obtenir des résultats comparables, nous avons isolé les implants de la matrice osseuse grâce à un trépan chirurgical de 4 mm de diamètre.

Les cylindres ainsi obtenus présentaient des dimensions de 4 mm de diamètre et des hauteurs fonction de l'épaisseur de la coupe réalisée lors du prélèvement. Tous nos échantillons (implants et références) ont été pesés avant d'être placés individuellement dans des tubes de polyéthylène. Ces tubes sont restés fermés jusqu'à la fin de leur manipulation (après irradiation, lorsque leur radioactivité a totalement diminuée).

II.2.2 Paramètres d'analyse

Pour chacun des matériaux étudiés, des références (Hydroxyapatite, $MgCO_3$ et $SrCO_3$ de chez Sigma) ont été irradiés dans les mêmes conditions. L'ensemble des échantillons (implant et références) ont été placés dans des tubes de polyéthylène. Le porte-échantillons est en rotation permanente devant la cible de béryllium pour rendre l'irradiation homogène. L'ensemble a été irradié pendant 30 minutes.

Nous nous sommes intéressés aux éléments Ca, P, Mg et Sr que nous avons analysé grâce aux réactions nucléaires suivantes (tableau 4-3) :

Réaction nucléaire	Rapport isotopic	Demie-vie	Section efficace (mb)	Energie seuil (MeV)	Energie du photopic (keV)
${}^{44}_{20}Ca(n, p){}^{44}_{19}K^*$	2,1	22 min	3,5	5,4	1157 (88%)
${}^{31}_{15}P(n, \alpha){}^{28}_{13}Al^*$	100	2,3 min	30	2,0	1778 (100%)
${}^{24}_{12}Mg(n, p){}^{24}_{11}Na^*$	78,7	15 h	130	4,93	1368 (100%)
${}^{88}_{38}Sr(n, 2n){}^{87}_{38}Sr^*$	82,5	2,8 h	250	11,25	388 (83%)

Tableau 4-3 Réactions nucléaires des noyaux étudiés par NAA

Les éléments que nous voulons étudier afin de mettre en évidence la minéralisation d'implants synthétiques ne sont pas les seuls à émettre à ces énergies. Avant de commencer les mesures, il a donc fallu étudier les interférences possibles.

Aucun élément constitutif de la matrice osseuse en quantité non négligeable n'émet à la même énergie que le calcium ce qui élimine les interférences éventuelles. Pour le magnésium, il peut y avoir de interférence avec l'aluminium (27) lors d'une irradiation avec des neutrons rapides et avec le sodium (par réaction des neutrons thermiques). Cependant l'aluminium étant un élément non essentiel on peut considérer qu'il est absent des échantillons étudiés. Lors de la production de neutrons rapides, il y a production de 1 à 10% de neutrons thermiques, la proportion de neutrons

thermiques étant faible, même si une partie du sodium constitutif de la matrice osseuse réagit, il pourra être négligé.

Le phosphore peut présenter des interférences avec les éléments silicium (28) et aluminium, mais comme précédemment ces interférences peuvent être négligées car les teneurs en aluminium et en silicium sont normalement nulles. Le strontium ne présente pas d'interférence avec les éléments présents dans la matrice biologique.

$$m = C \frac{M\lambda}{\theta N \sigma \Phi \varepsilon f} \frac{e^{\lambda t_a}}{(1 - e^{-\lambda t_i})(1 - e^{-\lambda t_c})}$$

ε : efficacité du détecteur

ϕ : flux de neutrons ($n \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

σ : section efficace (cm^2)

f : coefficient de branchement

θ : rapport isotopique

M : masse molaire de l'élément

N : nombre d'Avogadro

m : masse de l'élément dans l'échantillon (g)

λ : constante de décroissance (s^{-1})

$\lambda = (\ln 2)/T$ où T est la période

t_i : temps d'irradiation (s)

t_a : temps d'attente avant comptage (s)

t_c : temps de comptage (s)

C : nombre de coups sous le photopic pour l'échantillon

Les concentrations des différents éléments présentés ci-après ont été obtenues à partir de l'équation ci-dessus.

Cette formule fait intervenir de nombreux paramètres expérimentaux, il est possible de s'en affranchir en irradiant simultanément l'échantillon et un matériau de référence dont on connaît la teneur en élément étudié. La formule précédente se simplifie pour donner :

$$\tau = \frac{m_{\text{ref}} C_{\text{ech}}}{m_{\text{tot}} C_{\text{ref}}} e^{\lambda(t_a \text{ech} - t_a \text{ref})} \frac{(1 - e^{-\lambda t_c \text{ref}})}{(1 - e^{-\lambda t_c \text{ech}})}$$

τ : concentration de l'élément dans l'échantillon (mg/g ou $\mu\text{g/g}$ pour Sr)

$C_{\text{ech}} C_{\text{ref}}$: nombre de coups sous le photopic pour l'échantillon et la référence

λ : constante de décroissance (s^{-1}) $\lambda = (\ln 2)/T$ où T est la période

$m_{\text{ref}} m_{\text{tot}}$: masses de l'élément dans la référence (mg) et la masse totale de l'échantillon (g)

$t_{\text{aech}} t_{\text{aref}}$: temps d'attente avant comptage pour l'échantillon et la référence (s)

$t_{\text{cech}} t_{\text{cref}}$: temps de comptage pour l'échantillon et la référence (s)

Des durées d'irradiations de 30 minutes ont permis d'analyser la totalité des éléments à étudier. Les temps de comptages utilisés pour l'étude de nos échantillons ont été de 300 s pour le phosphore (contenu dans l'échantillon et la référence) ; 600 s pour le calcium (contenu dans la référence) et 2000 secondes pour l'échantillon à analyser (éléments calcium, magnésium et strontium). Le comptage des étalons en magnésium et en strontium a été effectué au minimum 6 heures après l'irradiation (afin de diminuer le temps mort) pendant un temps de comptage de 200 secondes.

L'ordre de passage des échantillons sur le détecteur a été fonction des périodes des éléments. Afin de s'affranchir au maximum des paramètres géométriques et de positionner les échantillons de manière reproductible nous avons utilisé une pièce intermédiaire placée sur le détecteur.

II.2.3 Résultats obtenus par activation neutronique

Pour chacun des matériaux analysés, nous avons représenté sur les figures suivantes les valeurs de chaque élément dans l'échantillon avant implantation (notés T0) ainsi que les valeurs de chaque élément dans la matrice osseuse des brebis implantées (noté os).

a - CaCO_3 44% (figure 4.34)

Les teneurs en calcium de l'implant diminuent en fonction du temps. 12 mois après implantation, les valeurs supérieures aux valeurs caractéristiques de la matrice osseuse mettent en évidence la persistance du carbonate de calcium même 12 mois après implantation.

Les concentrations en phosphore, magnésium et strontium présentent des profils en constante augmentation en fonction du temps après implantation. Les valeurs observées 12 mois après implantation sont inférieures aux valeurs obtenues pour la matrice osseuse. L'implant n'est pas totalement substitué par la matrice osseuse. Ces valeurs de concentration plus faibles s'expliquent par la persistance du carbonate de calcium.

Les incertitudes sur les mesures sont plus importantes pour les éléments calcium et strontium, elles restent cependant voisines de 10%.

b - CaCO_3 55% (figure 4.35)

Les résultats obtenus pour les implants de CaCO_3 à 55% de porosité sont très proches des résultats observés pour le CaCO_3 à 44% de porosité.

Comme précédemment la diminution du calcium en fonction du temps après implantation traduit la disparition du matériau synthétique. Même 12 mois après implantation, la teneur en calcium de l'implant reste supérieure à celle de la matrice. Le matériau est toujours partiellement présent.

Les concentrations des éléments constitutifs de la matrice osseuse (P, Mg et Sr) augmentent

progressivement pour atteindre des valeurs voisines de celles de la matrice : il y a minéralisation de l'implant CaCO_3 à 55% de porosité.

Les valeurs atteintes 12 mois après implantation sont ici encore inférieures à celles de la matrice : le matériau n'est pas totalement substitué par la matrice osseuse.

c - CaCO_3 avec gentamicine (figure 4.36)

De manière identique aux carbonates de calcium sans antibiotique, les concentrations en calcium diminuent en fonction du temps d'implantation.

Les concentrations en phosphore, magnésium et strontium augmentent en fonction du temps d'implantation. Les valeurs observées 12 mois après implantation le carbonate de calcium avec antibiotique est le matériau le plus substitué de tous les carbonates implantés.

Les incertitudes sur les mesures sont plus importantes pour les éléments calcium et strontium, elles restent cependant voisines de 10%.

d - TCP (figure 4.37)

Les profils de concentrations en phosphore, et calcium diminuent en fonction du temps d'implantation pour atteindre des valeurs voisines de celles de la matrice osseuse. Comme pour les carbonates de calcium présentés ci-dessus, les valeurs des éléments caractéristiques de l'implant restent supérieures à celles obtenues pour la matrice osseuse.

La substitution du TCP implanté n'est pas totale, même 12 mois après implantation.

L'étude des profils des éléments caractéristiques de la matrice osseuse (Mg et Sr) montrent qu'il y a eu migration de ces deux éléments de la matrice osseuse vers l'implant. Les valeurs de concentrations inférieures à celles de la matrice osseuse 12 mois après implantation confirme la minéralisation de l'implant. Cette substitution est incomplète et le TCP subsiste.

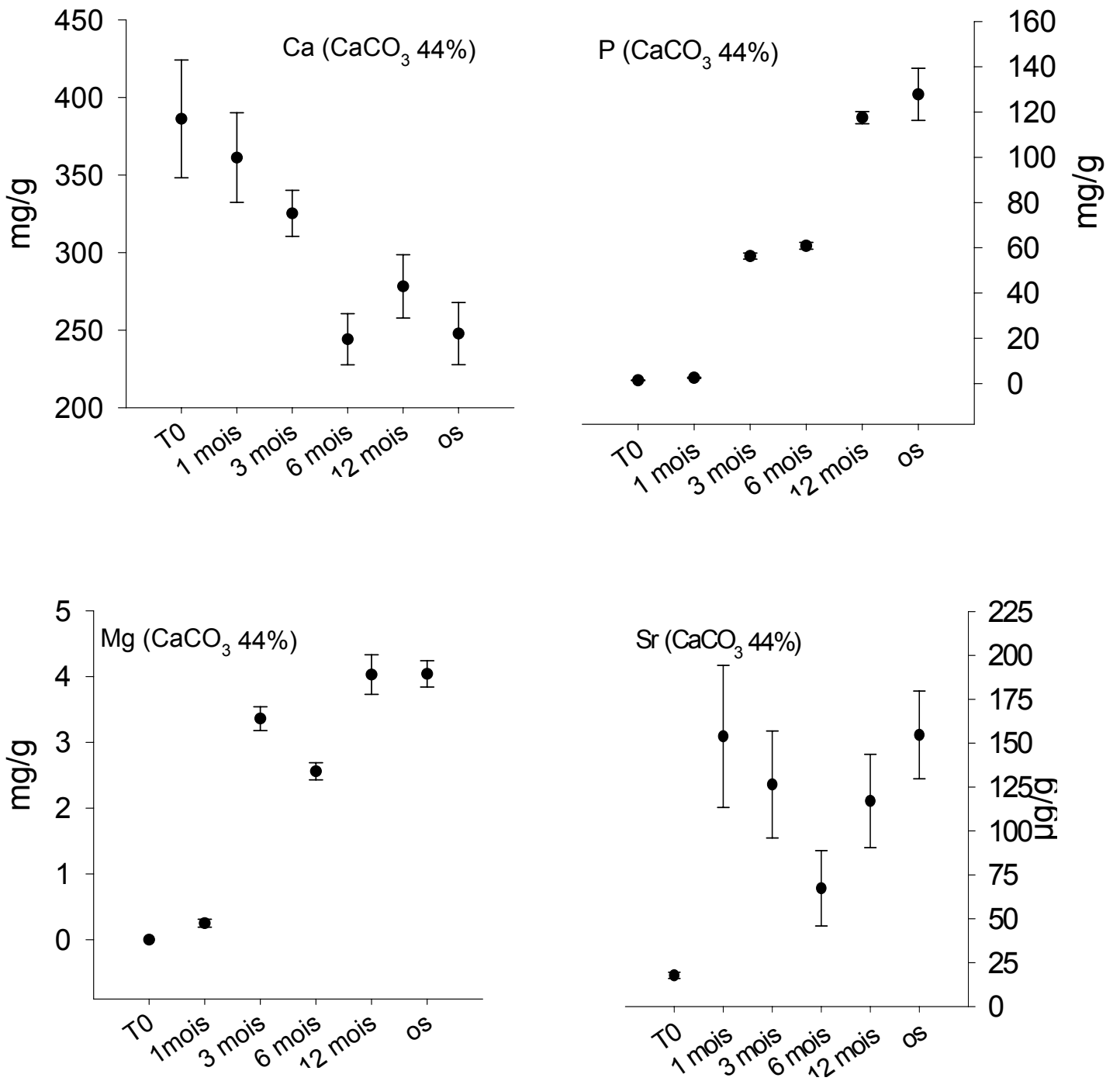


Figure 4.34 Evolution en fonction du temps des concentrations en calcium, phosphore, magnésium et strontium du CaCO₃ 44%

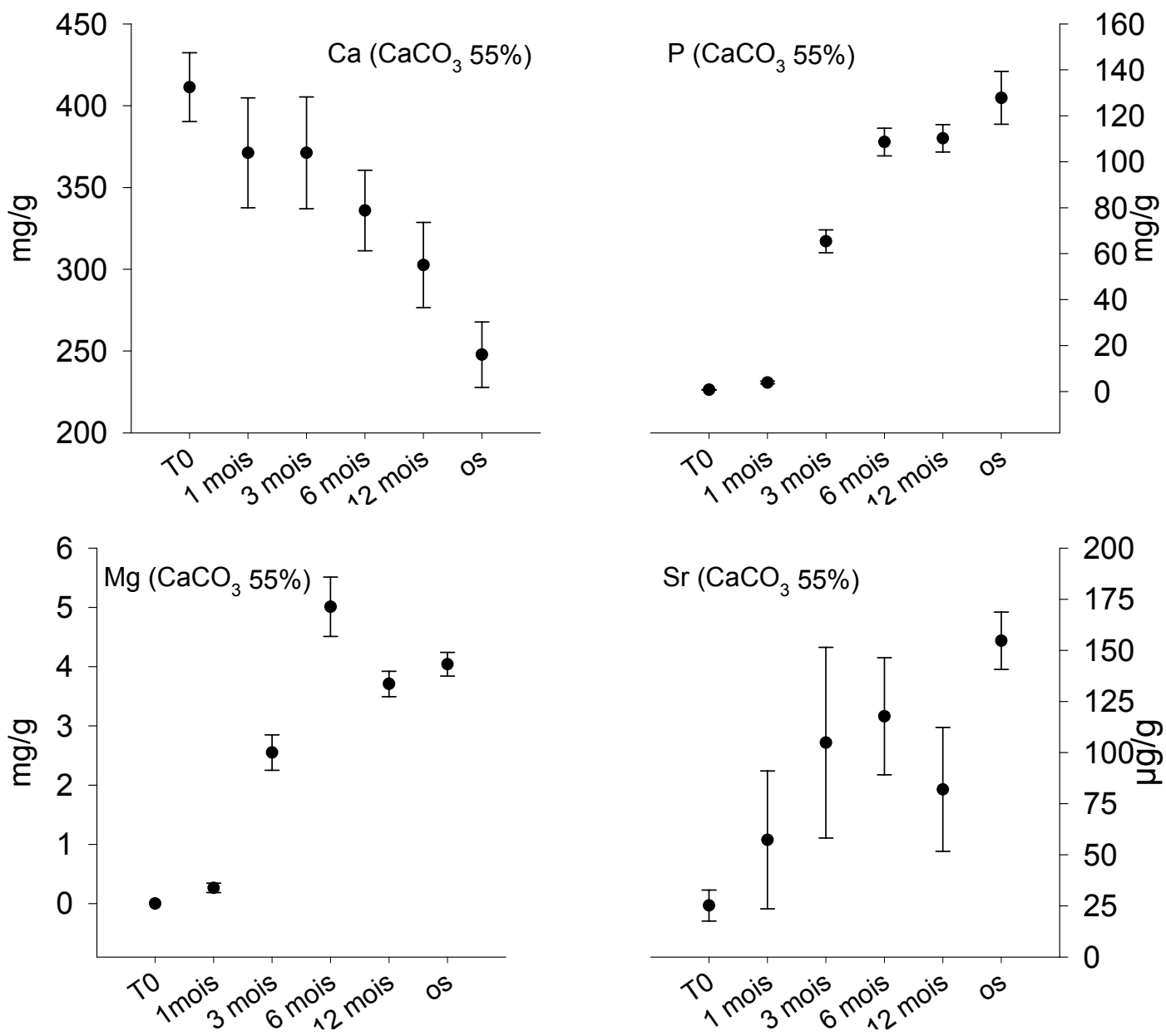


Figure 4.35 Evolution en fonction du temps des concentrations en calcium, phosphore, magnésium et strontium du CaCO₃ 55%

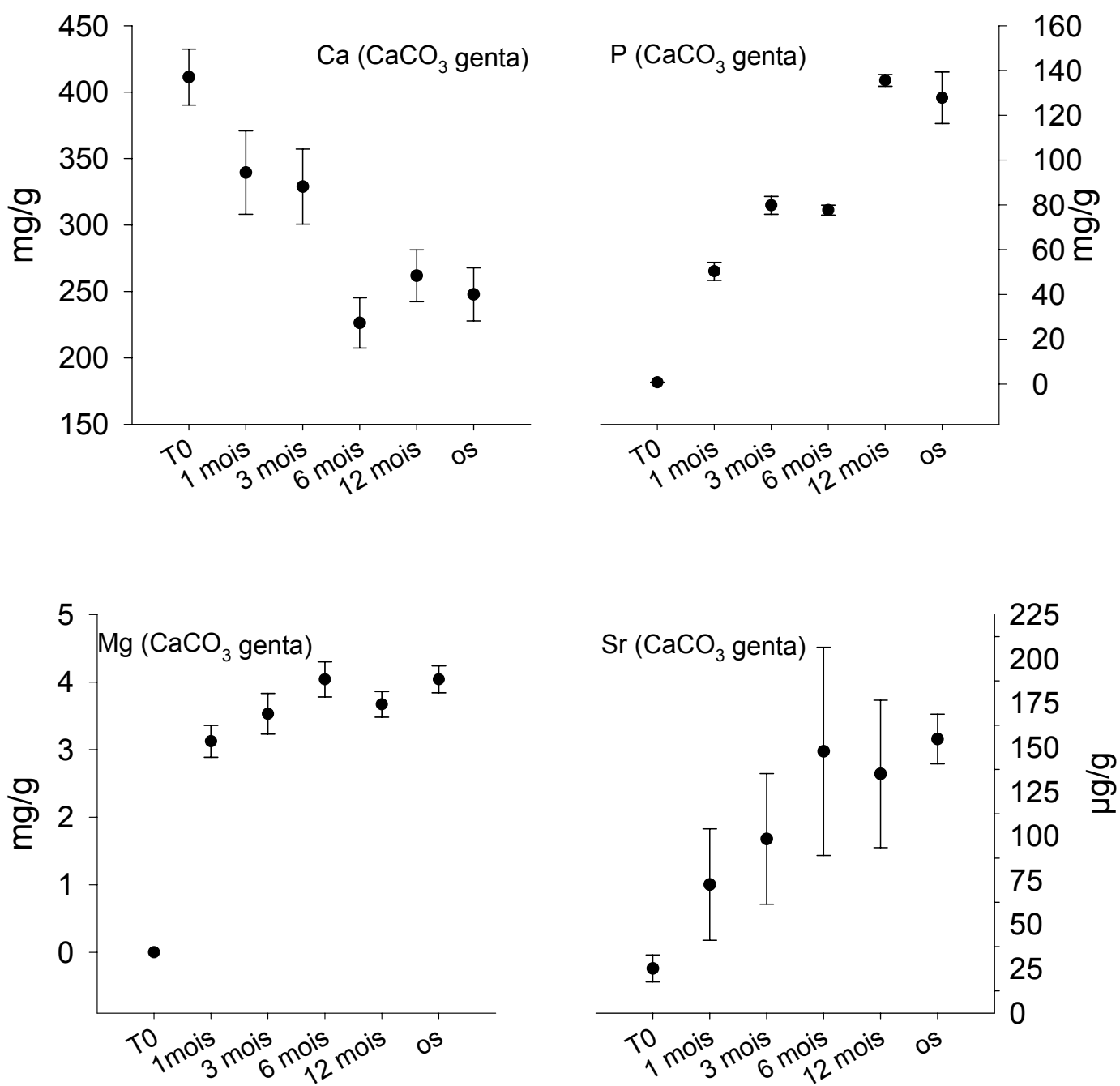


Figure 4.36 Evolution en fonction du temps des concentrations en calcium, phosphore, magnésium et strontium du CaCO_3 avec gentamicine

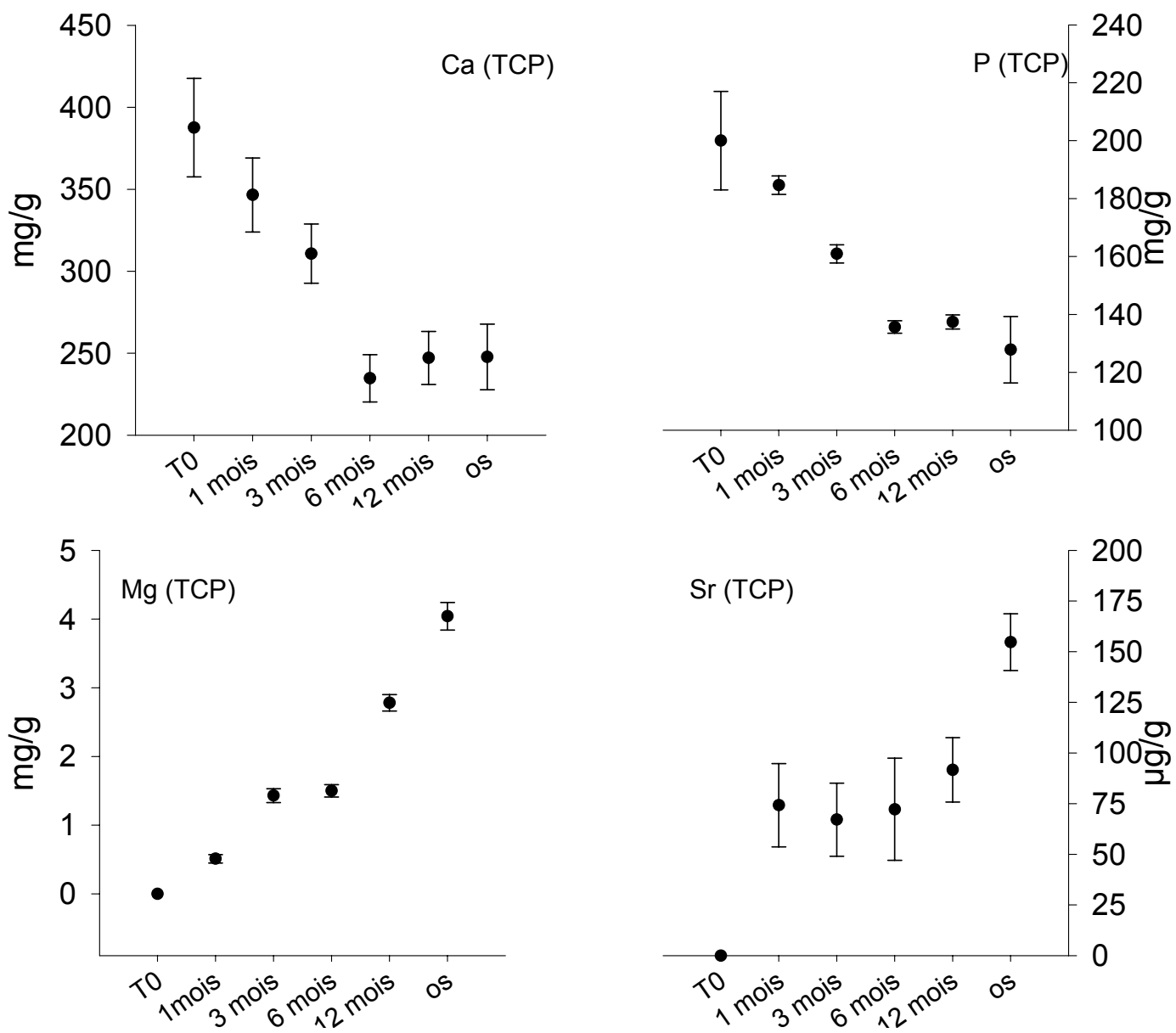


Figure 4.37 Evolution en fonction du temps des concentrations en calcium, phosphore, magnésium et strontium du TCP

II.2.4 Discussion

L'analyse par activation neutronique a permis d'évaluer les cinétiques de migration des éléments Ca, P, Mg et Sr sans détruire les échantillons.

Nous avons étudié 2 types d'éléments. Des éléments caractéristiques des implants (le calcium pour les carbonates et le calcium et le phosphore pour le TCP) d'une part et des éléments constitutifs de la matrice osseuse (Ca, P, Mg et Sr) d'autre part.

Tous les implants présentent des concentrations en calcium qui diminuent pour atteindre des valeurs proches de celles de la matrice osseuse. L'étude par NAA des implants CaCO_3 ne permet pas de différencier les cinétiques de résorption en fonction des pourcentages de porosité. Le carbonate de calcium avec gentamicine présente une augmentation plus rapide des concentrations en magnésium et en strontium que les carbonates sans antibiotique.

Les cinétiques de migrations du magnésium et du strontium dans les implants TCP est semblable à celle observée pour les implants CaCO_3 à 44% et à 55% de porosité. L'augmentation des teneurs de ces éléments traces dans les implants est visible dès le premier mois après implantation. Les échantillons CaCO_3 à 44% et à 55% de porosité ne présentent (pour les éléments Ca, P et Mg) que de faibles modifications pour le délai de 1 mois, il y a ensuite une accélération de la minéralisation des implants. Ce phénomène est également observé pour le TCP.

12 mois après implantation, seul le carbonate de calcium avec gentamicine semble être totalement substitué par la matrice osseuse. Ce phénomène est probablement lié à l'âge avancé des brebis. Par PIXE, les profils obtenus montrent des minéralisations meilleures à 12 mois avec des profils de concentrations caractéristiques de la matrice osseuse. La PIXE étant une méthode ponctuelle, elle n'analyse que la surface de l'échantillon alors que l'activation neutronique permet une analyse en volume.

Les carbonates de calcium présentent des profils de concentrations similaires à ceux obtenus pour le TCP, notre référence dans cette étude.

III Conclusion

Les échanges à l'interface ont pu être mis en évidence par PIXE avec la délimitation d'une zone intermédiaire entre l'implant et la matrice osseuse. La présence d'une zone inflammatoire et d'une fibrose peut être associée en PIXE à une zone totalement déminéralisée (étude de géopolymères pour le délai de 15 jours) ou d'une zone intermédiaire où l'on observe un gradient de concentrations (TCP 1 mois).

Les techniques PIXE et NAA sont complémentaires. La PIXE permet d'évaluer les cinétiques de migrations des éléments minéraux de la matrice osseuse et des implants, apportant un complément

d'information aux mécanismes cellulaires mis en évidence par histologie. La technique NAA permet d'étudier la minéralisation des implants pour déterminer l'ossification. Cette méthode d'analyse a montrée que l'ajout d'antibiotique accélère la diminution du calcium et la migration des éléments P, Mg et Sr au sein de l'implant.

Dans cette étude, les échantillons n'ont pas pu être inclus en résine ce qui a engendré des irrégularités de surfaces responsables de points incohérents sur les profils de concentrations. La non inclusion en résine s'est par contre avérée être un avantage qui nous a permis de quantifier les teneurs des différents éléments.

L'intercomparaison des profils par été rendu possible par PIXE. La minéralisation des implants est générale mais l'étude par NAA a confirmé qu'elle n'était pas totale 12 mois après implantation.

Références

- [1] CHOI C.G., **Thèse de doctorat n° 509** Université d'Orléans, 1996
- [2] MAXWELL J.A., TEEDSALE W.J., CAMPBELL J.L., **The Guelph PIXE software package II**, Nucl. Instr. Meth. (B 95), 1995, 407
- [3] CAMPBELL J.L., HOPMAN Th.L., MAXWELL J.A., NEJEDLY Z., **The Guelph PIXE software package III : Alternative proton database**, Nucl. Instr. Meth. (B 170), 2000, 193
- [4] LUCAS A., GAUDE J., CAREL C., MICHEL J.F., CATHELINÉAU G., **A synthetic aragonite-based ceramic as a bone graft substitute and substrate for antibiotics**, J. of Inorg. Chem. (3), 2001, 87
- [5] LUCAS-GIROT A., LANGLOIS P., SANGLEBOEUF J.C., OUAMMOU A., ROUXEL T., GAUDE J., **A synthetic aragonite-based bioceramic : influence of process parameters on porosity and compressive strength**, Biomaterials (23), 2002, 503
- [6] MARTIN S., **Apport des techniques nucléaires d'analyse dans l'évaluation de la substitution osseuse de biomatériaux résorbables *in vivo***, rapport de DEA Université de Rennes1, septembre 2002.
- [7] PAWLEY J., DOLE S., **A totally Automatic Critical Point Dryer**, Scann. Electron Microsc. (IITR), 1976, 287

- [8] IYENGAR G.V., KOLLMER W.E. and BOWEN H.J.M, **The elemental composition of human tissues and fluids**, Verlay Chemie Weinheim, NY, 1976
- [9] IRIGARAY J.L., OUDADESSE H. and BRUN V., **Nuclear methods to characterize biomaterials**, Biomaterials (22), 2001, 629
- [10] S. MELKI **Thèse de doctorat en sciences physiques**, Université d'Orléans, 1980

Chapitre 5

Etudes biologiques

Chapitre 5 : Etudes biologiques

I	Etude des implants CaCO₃ et TCP par histologie	195
I.1	Préparation des échantillons	195
I.2	Résultats	196
I.2.1	Implant CaCO ₃ 44%	196
I.2.2	Implant CaCO ₃ 55%	197
I.2.3	Implant CaCO ₃ avec gentamicine	197
I.2.4	Implant TCP	197
I.3	Discussion	198
II	Etudes biologiques des implants G54_500 et G54HT_500	199
II.1	Aspect macroscopique des implants	199
II.1.1	Photos macroscopiques et radiographies	199
II.1.2	Texture et MEB	200
II.2	Etude histologique	205
II.2.1	Protocole	205
II.2.2	Résultats	205
II.2.3	Discussion	207
III	Analyse par ICP de Ca, P, Mg et Al dans le sang	207
III.1	Préparation des échantillons	207
III.2	Résultats obtenus par ICP	208
IV	Discussion sur les matériaux géopolymères	209
V	Conclusion	209
	Références	210

I Etude des implants CaCO_3 et TCP par histologie

Parallèlement au travail réalisé par PIXE et par activation neutronique, une étude histologique sur coupes déminéralisées a été réalisée sur les mêmes échantillons [1].

Cette étude s'intéresse aux éléments suivants :

Au niveau de l'interface :

- Pour l'inflammation et la fibrose (l'importance de la fibrine et du dépôt fibreux, l'inflammation, la dégénérescence déterminée suivant des variations morphologiques tissulaires, le nombre et le type des cellules inflammatoires)
- La présence de nécrose (due à des déchets de noyaux de cellules et/ ou des défaillances des parois capillaires)
- les débris de matériaux

Au niveau des implants :

- la qualité du tissu de réhabilitation
- l'infiltration graisseuse

I.1 Préparation des échantillons

Le prélèvement des implants a été effectué de manière analogue à celle décrite pour la technique PIXE. Les échantillons étudiés sont constitués de l'implant et de l'os périphérique (diamètre 10 mm, épaisseur 3 mm).

Ces échantillons ont été au préalable fixés pendant 24 heures dans une solution de formaldéhyde à 10 % avant d'être déminéralisés par immersion dans un bain d'acide nitrique à 5% pendant 3 heures. Les échantillons déminéralisés ont été rincés pendant 30 minutes à l'eau courante afin d'éviter une précipitation du calcium en surface. Cette étape se répète jusqu'à une déminéralisation totale des matériaux, le nombre de cycles nécessaire est fonction de l'emplacement du biomatériau dans l'os (proximité de l'os cortical ou de la cavité médullaire) et du biomatériau (TCP ou CaCO_3). Pour ce travail, le nombre de cycle est compris entre 1 et 3 (soit une durée de 3 à 9 heures).

Une fois déshydratés (par immersion dans des bains de concentrations croissantes en alcool), les échantillons ont été inclus en paraffine puis coupés au microtome en rubans.

Les coupes ont été colorées au HES (hématoxyline éosine safran) et observées au microscope photonique, l'utilisation de ce colorant nous a permis d'étudier :

- Les pores du matériau (observation de l'avancée de la colonisation par le tissu conjonctif, les

ostéoblastes et les ostéoclastes).

- La périphérie du biomatériau (observation de la réaction inflammatoire, notamment la fibrose, le type et la quantité d'éléments inflammatoires (les polynucléaires, les lymphocytes, les plasmocytes et les macrophages)).

Les résultats ci-dessous présentent une synthèse des observations semi-quantitatives réalisées sur les coupes. Les sections ont été photographiées sur leur face marquée avec un appareil photographique numérique CANON EDS 30 monté sur banc.

I.2 Résultats

Cette étude a fait l'objet du stage de DEA de Melle Sophie MARTIN au sein de l'équipe biomatériaux en site osseux [1]. Nous résumons ici les principaux résultats expérimentaux afin de pouvoir corréler ces résultats avec ceux obtenus par des méthodes physique (décrits au chapitre 4).

I.2.1 Implant CaCO₃ 44%

Prélèvement à 1 mois : la moitié extérieure des pores du matériaux est colonisée. La quantité d'os néoformée est importante et de nombreux ostéoclastes et ostéoblastes sont visibles. De nombreux vaisseaux sanguins sont visibles dans les pores. A l'interface du matériau, des cellules lymphocytes, plasmocytes, macrophages sont observées et traduisent la présence d'une fibrose inflammatoire.

Prélèvement à 3 mois : la colonisation des pores est quasiment totale. La quantité d'os néoformé est importante, il est d'aspect immature. Comme à un mois, des vaisseaux sanguins et des cellules ostéoclastiques et ostéoblastiques sont visibles. La fibrose observée pour le délais de 1 mois est toujours présente.

Prélèvement à 6 mois : la quantité de pores colonisée est égale à celle observée pour le délai de 3 mois. L'os est maintenant d'aspect mature, et la fibrose périphérique a disparue.

Prélèvement à 12 mois : sur les coupes étudiées le matériau a totalement disparu et a été totalement substitué par de l'os. Les cellules osseuses sont présentent en faible quantité ce qui traduit un faible remodelage osseux.

I.2.2 Implant CaCO₃ 55%

Prélèvement à 1 mois : la colonisation osseuse a atteint le centre du matériau, l'os présent dans les pores du carbonate de calcium est d'aspect immature. De nombreux vaisseaux sanguins et cellules osseuses (ostéoclastes et ostéoblastes) sont présentes dans les pores. Une fibrose et une inflammation importantes sont visibles à l'interface implant/ os avec la présence de nombreuses cellules inflammatoires. Aucune nécrose n'est cependant observée.

Prélèvement à 3 mois : la quantité de pores colonisés est voisine de celle observée pour le délai de 1 mois, l'os néoformé est toujours d'aspect immature. Par contre, la fibrose périphérique a disparue et le nombre d'ostéoclastes et ostéoblastes a diminué.

Prélèvement à 6 mois : les pores sont entièrement colonisés par de l'os d'aspect mature. Les ostéoblastes et ostéoclastes ne sont plus visibles. Il n'y a pas de fibrose périphérique.

Prélèvement à 12 mois : la colonisation osseuse est achevée, peu de matériau reste encore visible. L'os est d'aspect mature mais le nombre réduit de cellules osseuses traduit un faible remodelage osseux.

I.2.3 Implant CaCO₃ avec gentamicine

Prélèvement à 1 mois : la quasi totalité des pores est colonisée, l'os néoformé est d'aspect immature. Des vaisseaux sanguins, des ostéoblastes et des ostéoclastes sont visibles dans les pores du matériau. A l'interface biomatériau/ os, il n'y a pas d'inflammation mais on observe une fibrose périphérique.

Prélèvement à 3 mois : la colonisation des pores est totale par de l'os d'aspect mature. De nombreux ostéoclastes et ostéoblastes sont visibles. La fibrose périphérique a disparue mais on note une légère inflammation.

Prélèvement à 6 mois : le matériau n'est plus visible. A l'interface, il n'y a plus ni fibrose ni inflammation.

Prélèvement à 12 mois : sur cette coupe le matériau est visible par endroits. L'os qui a substitué l'implant est en partie immature et le peu de cellules osseuses sont visibles. Absence de fibrose ou d'inflammation.

I.2.4 Implant TCP

Prélèvement à 1 mois : la quantité d'os néoformé est faible mais de type mature. La colonisation de l'implant a atteint le tiers extérieur de l'implant. Au sein des pores du TCP, on observe la présence de vaisseaux sanguins, d'ostéoblastes et de peu d'ostéoclastes. Il n'y a pas de nécrose en périphérie et peu de fibrose.

Prélèvement à 3 mois : le matériau de 4mm de diamètre a été colonisé sur la moitié de son rayon. Comme à un mois, il y a peu d'ostéoclastes, l'os formé est de type mature mais il est présent en faible quantité. L'étude histologique ne montre pas de fibrose.

Prélèvement à 6 mois : la colonisation des pores n'a pas progressé vers le cœur du matériau par rapport au délais de 3 mois. Un faible nombre de cellules osteoclastiques et ostéoblastiques traduisent un remodelage osseux lent. Il n'y a pas de fibrose.

Prélèvement à 12 mois : la colonisation des pores est quasiment complète, de la périphérie jusqu'au cœur de l'implant. On note toujours l'absence de fibrose.

I.3 Discussion

L'inflammation est secondaire au geste chirurgical et peut être visible jusqu'à 3 mois après implantation.

Aucune encapsulation fibreuse n'a été observée sur les matériaux prélevés : les carbonates de calcium et le TCP sont ostéointégrés.

Les résultats obtenus pour le TCP sont en accord avec la littérature : le matériau est substitué par de l'os par un mécanisme de dégradation par agrandissement des macropores. La vitesse d'ossification est relativement faible, certainement à cause de l'âge des brebis post-gestantes (âgées de 7 à 9 ans). Le remodelage osseux et la vascularisation des carbonates de calcium sont plus intenses que ceux observés pour le TCP. La colonisation des macropores des carbonates de calcium est plus rapide que celle du TCP.

L'ostéointégration des carbonates de calcium est améliorée par l'augmentation du pourcentage de porosité.

L'ajout d'antibiotique au CaCO_3 accélère le phénomène de résorption du matériau, la présence de l'antibiotique semble réduire l'inflammation. Les résultats obtenus pour le CaCO_3 55% avec et sans antibiotiques sont très semblables.

L'âge des brebis a certainement ralenti les phénomènes de remodelage osseux, cependant les 4 matériaux implantés ont démontré leur caractère ostéoconducteur.

II Etudes biologiques des implants G54_500 et G54HT_500

Ces études ont été réalisées en collaboration avec l'équipe biomatériaux en site osseux.

II.1 Aspect macroscopique des implants

II.1.1 Photos macroscopiques et radiographies

Des photographies sur banc muni d'une échelle centimétrique ont permis d'étudier l'aspect macroscopique des implants (figure 5.1). Pour le délais de un mois, on observe un remaniement osseux à l'endroit du forage, les implants sont recouverts par de l'os néoformé sans que celui-ci ne soit complètement cicatrisé. Trois mois après implantation, l'os cicatriciel est d'aspect normal et recouvre la zone d'implantation.



G54_500 à J0



G54_500 à 1 mois



G54_500 à 3 mois



G54HT_500 à J0



G54HT_500 à 1 mois



G54HT_500 à 3 mois

Figure 5.1 Plateaux tibiaux. En haut : implant G54_500, en bas : implant G54HT_500.

Des radiographies des implants ont été réalisées pour chaque délai (figure 5.2). Pour le délai de prélèvement de un mois, les implants G54_500 et G54HT_500 présentent des propriétés de radio-opacité voisines de celles de l'os. L'interface os/implant présente deux aspects : une radio opacité dans certaines zones (caractéristique d'une apposition osseuse) et une radio clareté sur le reste de l'interface. Trois mois après implantation (figure 5.2 à droite), il est difficile d'observer un contraste entre la zone caractéristique de l'implant et la matrice osseuse.

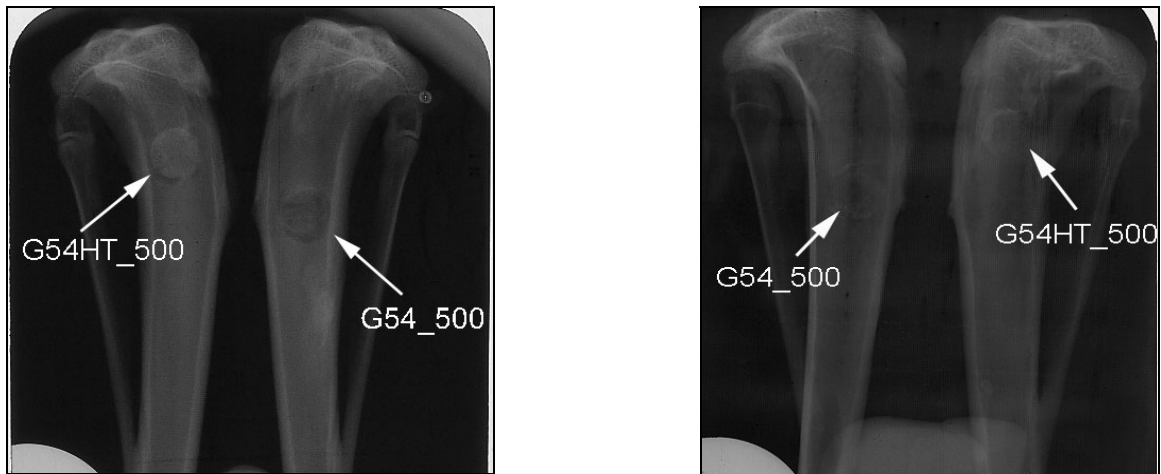


Figure 5.2 Plateaux tibiaux : a gauche 1 mois après implantation et à droite 3 mois après implantation.

II.1.2 Texture et MEB

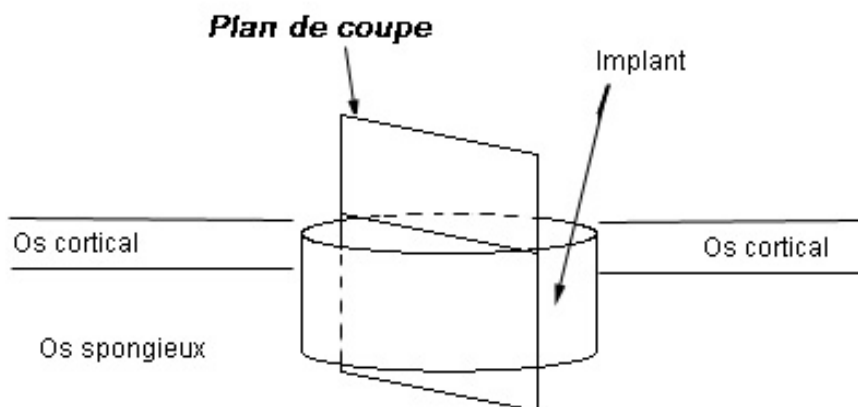


Figure 5.3 Schéma du plan de coupe des lames minces

Les plateaux tibiaux contenant les implants G54_500 et G54HT_500 ont été inclus en résine puis des coupes d'épaisseur 70 μm d'épaisseur ont été réalisés suivant l'axe de révolution du cylindre des implants (figure 5.3) grâce à un microtome de type LEICA. Chaque coupe a été visualisée à la loupe afin d'observer les différentes zones de contacts entre les implants et la matrice osseuse (contact implant/ os cortical et contact implant/ os spongieux).

* Observation des textures

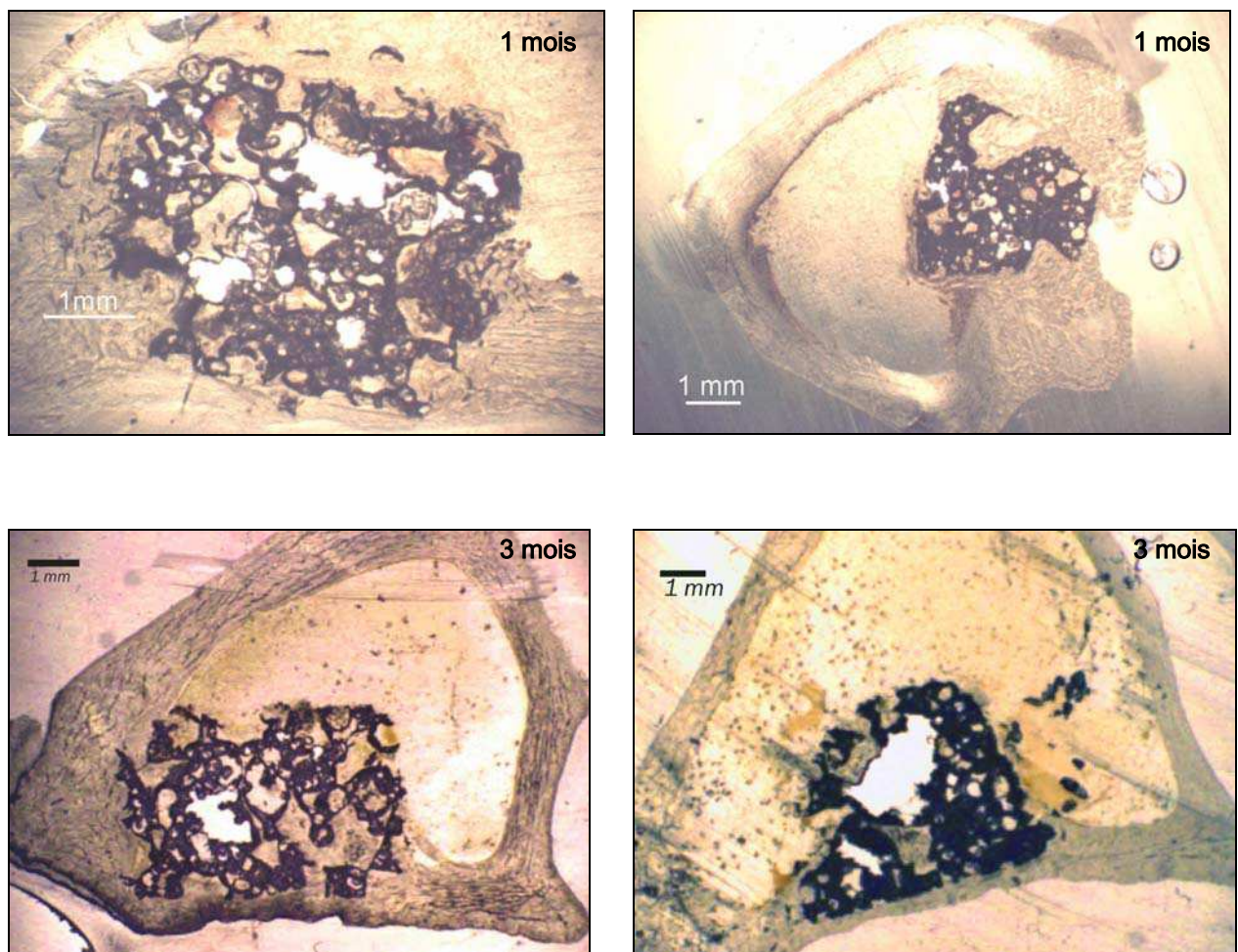


Figure 5.4 Coupes incluses en résine : G54_500 (à gauche) et G54HT_500 à droite. Lame d'épaisseur 250 μm vue à la loupe binoculaire.

Des clichés des différentes coupes ont été photographiés lors de l'étude des textures à la loupe binoculaire. Ci-dessus sont présentées les coupes de 250 μm d'épaisseur à différents grossissements (figure 5.4). La partie la plus sombre correspond aux implants G54_500 (à gauche) et

G54HT_500 (à droite). L'os cortical correspond au contour arrondi en périphérie de l'image.

Au délai de 1 mois, la zone de forage est reconnaissable par l'observation d'os néoformé en quantité importante. Cet os en treilli part des berges de l'os cortical et recouvre partiellement l'implant en surface. A ce délai, cet os néoformé est également visible en périphérie du matériau implanté. Les pores externes sont colonisés par de l'os néoformé. Les clichés obtenus à des grossissements microscopiques plus importants présentés ici ne permettent pas d'observer de fibrose, l'interface est caractérisée par un contact intime entre l'implant et l'os environnant.

Les clichés des échantillons du délai de 3 mois montrent que les implants G54_500 et G54HT_500 sont toujours présents. La matrice osseuse recouvre maintenant la totalité de l'implant (au niveau de l'os cortical). Les pores interconnectés sont colonisés.

* Observation par Microscopie électronique à balayage

Afin de confirmer ces premières observations, nous avons étudié certaines de ces coupes en microscopie électronique à balayage. Deux analyses ont été réalisées : une cartographie des éléments Ca, P, Si, Al et K et une analyse par image MEB. L'étude cartographique, réalisée par EDX, est qualitative et a permis d'associer les niveaux de gris obtenus sur les clichés MEB à des zones caractéristiques de l'implant ou de la matrice osseuse.

Les figures 5.5 et 5.7 présentent des clichés MEB et les cartographies associées pour les implants G54HT_500 et G54_500 1 mois après implantation. La résine dans laquelle sont inclus les échantillons biologiques apparaît complètement noire, les implants présentent une coloration d'aspect plus clair, le niveau de gris intermédiaire est caractéristique d'une zone contenant exclusivement calcium et phosphore en quantité importante : signature de la matrice osseuse. L'aluminium constitutif de l'implant a été également cartographié, cet élément est présent en quantité trop faible pour être observé et se confond avec le bruit de fond.

Les figures 5.6 et 5.8 ont été obtenues par MEB en électrons secondaires afin d'accentuer d'avantage le contraste entre les zones décrites précédemment. Le fort grossissement (x 300) permet de visualiser une interface entre la matrice osseuse et le matériau. Les fissures observées à la surface de la coupe analysée sont caractéristiques des conditions de séchage des échantillons et ne sont pas dues au matériau. Ces clichés permettent de confirmer l'absence de fibrose et un contact intime entre les matériaux implantés et la matrice osseuse pour les délais de 1 et 3 mois.

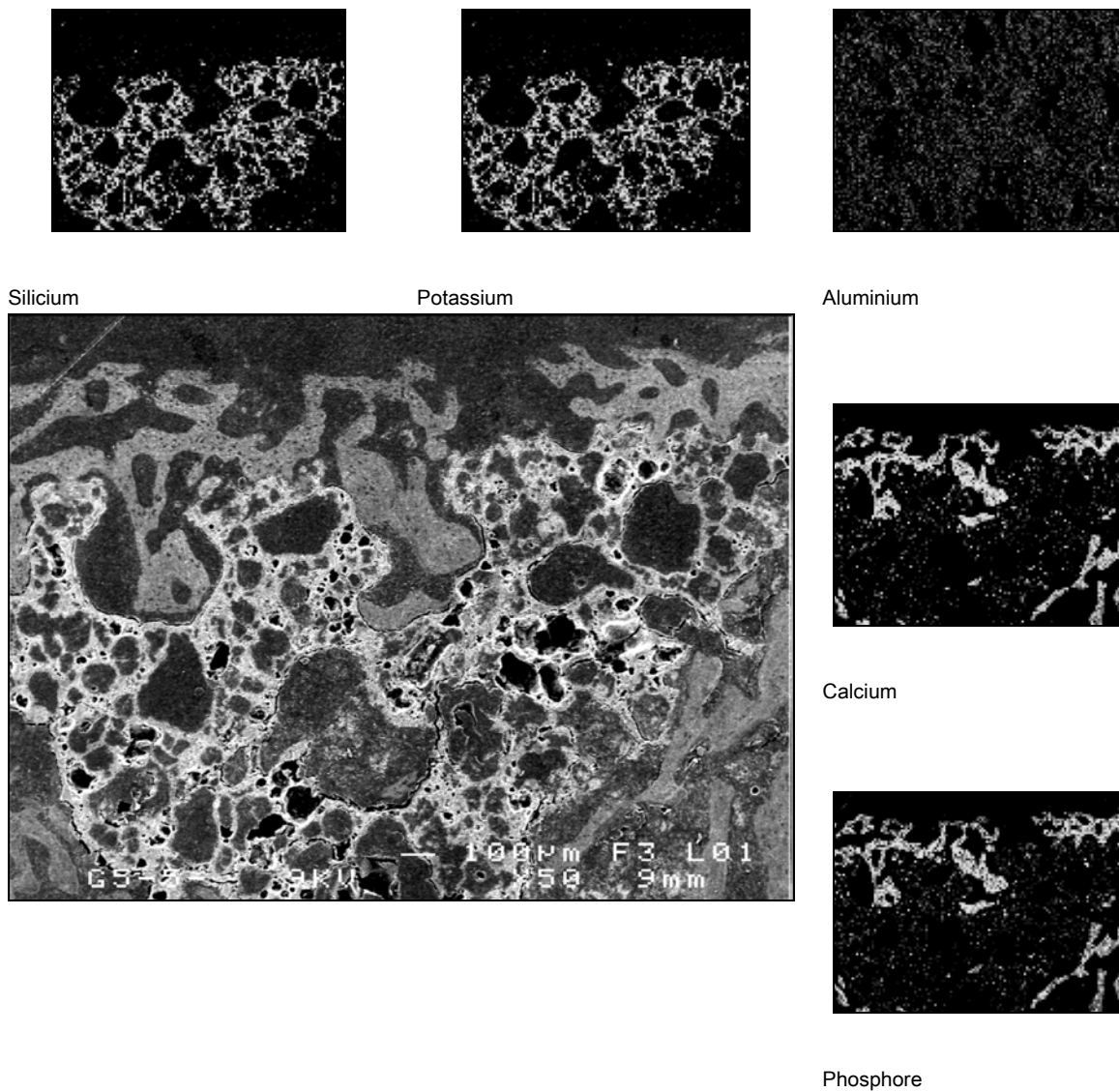


Figure 5.5 Echantillon G54HT_500 à 1 mois Cliché MEB (x 50) en électrons secondaires, et cartographies réalisées par EDX sur cette zone pour les éléments Si, K, Al, Ca et P.

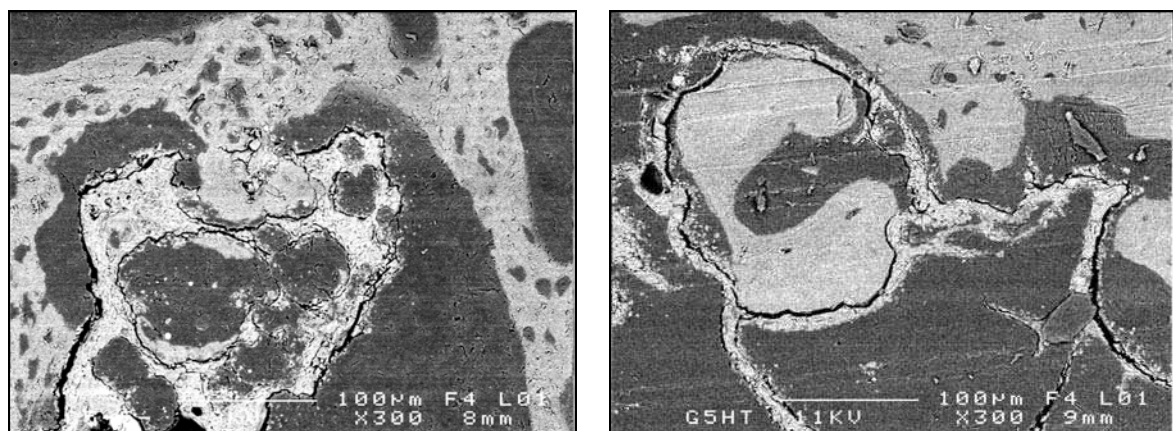


Figure 5.6 Détails d'interfaces (MEBx 300) entre l'os de la matrice et le G54HT_500 implanté. Délais de 1 mois (à gauche) et 3 mois (à droite). Ces clichés obtenus en électrons rétrodiffusés permettent de différencier l'os du matériau (en blanc).

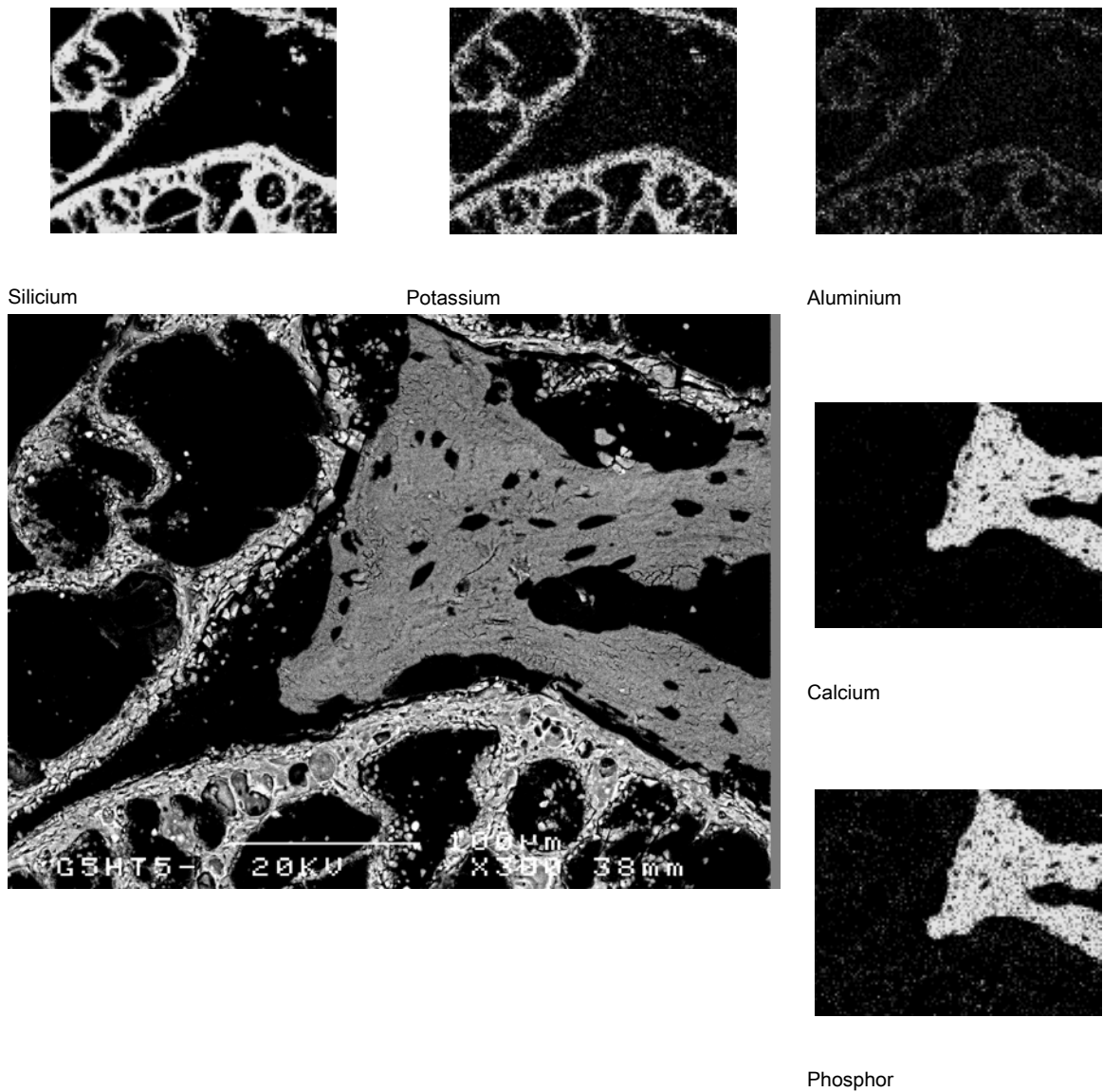


Figure 5.7 Echantillon G54_500 à 1 mois Cliché MEB (x 50) en électrons secondaires, et cartographies réalisées par EDX sur cette zone pour les éléments Si, K, Al, Ca et P.

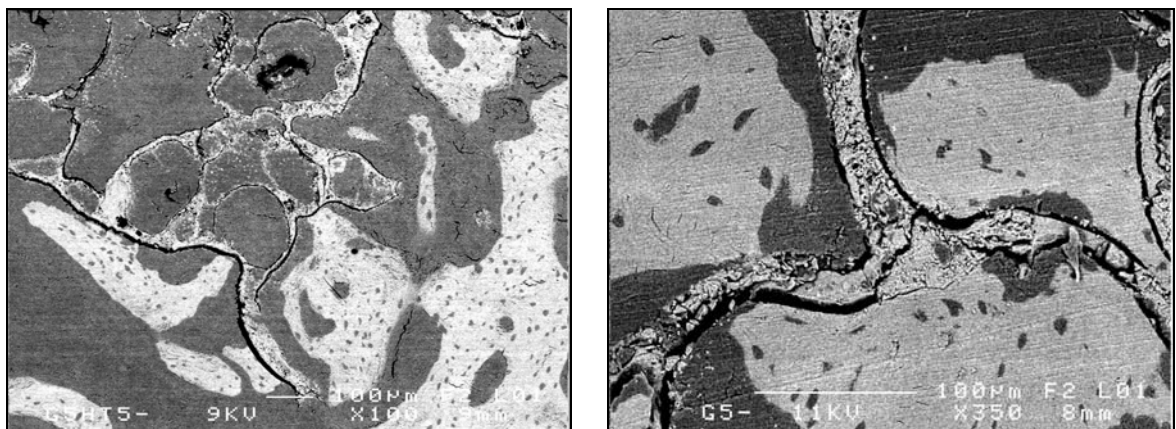


Figure 5.8 Détails d'interfaces (MEBx 300) entre l'os de la matrice et le G54_500 implanté. Délais de 1 mois (à gauche) et 3 mois (à droite). Ces clichés obtenus en électrons rétrodiffusés permettent de différencier l'os du matériau (en blanc).

Les prélèvements réalisés 1 mois après implantation montrent une bonne repousse osseuse en surface et une absence de nécrose au niveau des sites d'implantation. L'étude des clichés par microscopie optique et électronique ne mettent pas en évidence de différence significative entre les deux matériaux implantés. Les matériaux GHT_500 et G54HT_500 présentent des réactions du milieu hôte très semblables, ils permettent un contact intime entre l'implant et l'os et une colonisation des porosités externes. Ces résultats ont été complétés par une étude histologique de ces coupes. Trois mois après implantation, la repousse osseuse s'étend à l'intérieur des implants par l'intermédiaire des pores interconnectés. L'os occupe la majorité des pores observés.

II.2 Etude histologique

II.2.1 Protocole

Les implantations et les prélèvements ont été décrits au chapitre 4. Les implants ont été inclus en résine suivant le protocole présenté lors de l'étude par PIXE. Des coupes minces d'épaisseurs 70 µm ont été réalisées parallèlement à l'axe de révolution du cylindre (figure 5.3).

Les lames minces ont été colorées avec du trichrome de Masson. Ce colorant permet de visualiser le collagène de type 1 et les tissus fibreux.

II.2.2 Résultats

Les figures 5.9, 5.10 et 5.11 présentent des détails significatifs des coupes colorées des implants G54HT_500 (à gauche) et G54_500 (à droite) pour le délai de 1 mois.

Les détails des coupes de la figure 5.9 présentent l'os de la paroi osseuse de type lamellaire (coloration bleue foncée). La zone de forage est visible, avec une repousse osseuse qui part des berges de la matrice osseuse vers les implants (colorés en noirs). La repousse osseuse recouvre les implants à distance (figure 5.9), en surface et en périphérie.

Les petites bandes osseuses se détachent des parois osseuses corticales pour aller au contact des matériaux G54HT_500 (figure 5.10 à gauche) et G54_500 (figure 5.10 à droite).

Les détails des porosités extérieures des implants présentés sur la figure 5.11 montrent des zones de contacts sans interposition fibreuse de l'os et de chacun des matériaux. On peut observer la pénétration du tissu osseux dans les pores et les reliefs des implants. Les études histologiques pour le délai de 3 mois sont en cours.

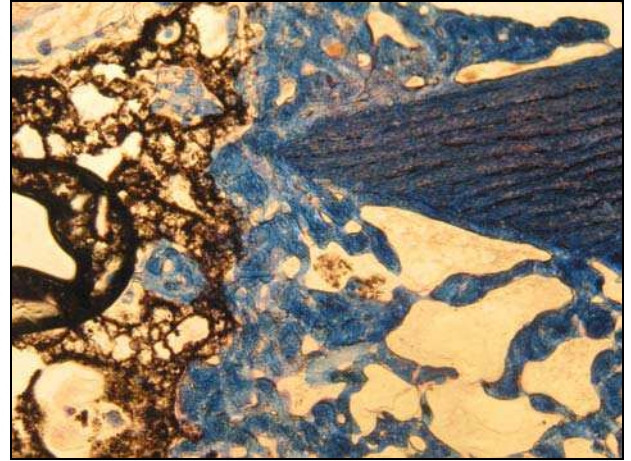
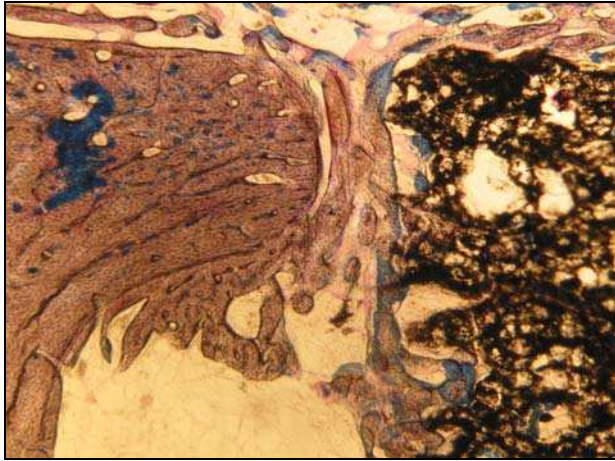


Figure 5.9 Coupe colorée au trichrome de Masson des implants G54HT_500 et G54_500 (de gauche à droite)

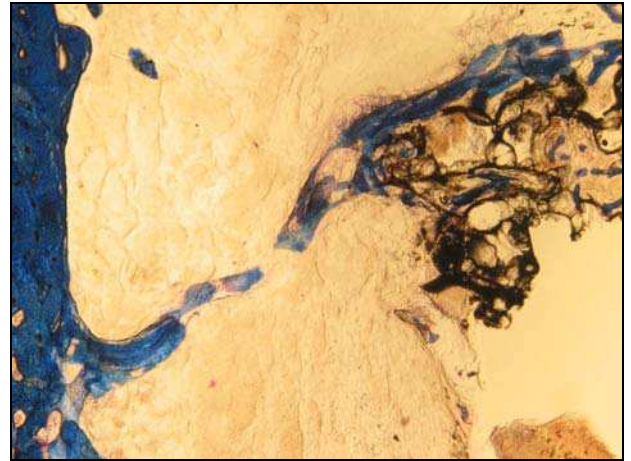
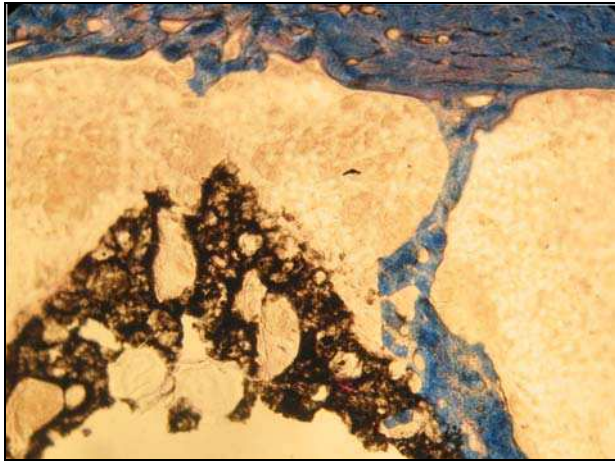


Figure 5.10 Détails de bandes osseuses entre l'os cortical et les implants

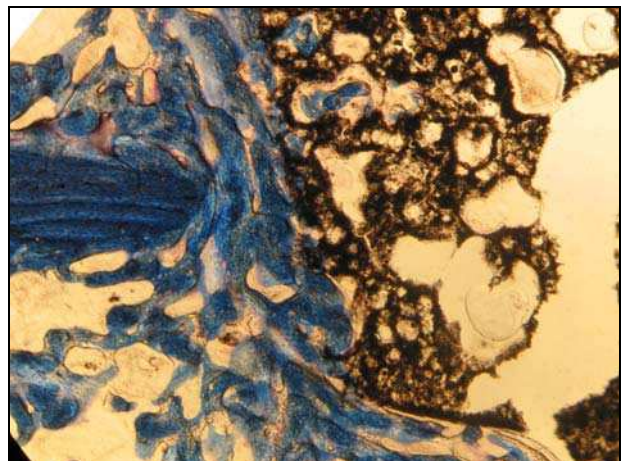


Figure 5.11 Détails des pores périphériques des implants G54HT_500 (à gauche) et G54_500 (à droite)

II.2.3 Discussion

Des études comparatives sur les sites d'implantations chez le lapin [2] ont montré que le site le plus favorable à la colonisation osseuse d'implant synthétique était le fémur. Dans cette étude nous avons travaillé avec des sites d'implantation dans des plateaux tibiaux et des échantillons de 6 mm de diamètre. La taille importante des implants ainsi que le site d'implantation peu favorable à une colonisation osseuse massive ont permis d'étudier le comportement de nos matériaux dans des conditions non optimales.

Les premières observations histologiques réalisées sur les implants de 1 mois mettent en évidence un comportement similaire des implants G54_500 et G54HT_500.

L'absence de fibrose observée pour tous les implants a permis de vérifier que le contact entre la matrice osseuse et les implants est intime. Les études histologiques ont permis d'affirmer les observations par radiographies, par microscopie optique et par MEB. Les implants prélevés à 1 mois montrent une colonisation des pores périphériques par de l'os néoformé. Cet os part des berges de l'os cortical hôte vers les implants, il est visible dans les pores périphériques, à la surface des implants et à l'interface entre les implants et l'os cortical.

3 mois après implantation, la surface des plateaux tibiaux est intégralement recouverte d'os. Les observations par microscopie optique et à balayage des implants 3 mois après implantation montrent que les matériaux ne sont pas résorbés mais ils permettent la repousse osseuse dans les porosités interconnectées.

III Analyse par ICP de Ca, P, Mg et Al dans le sang

Cette étude a permis de compléter les résultats obtenus *in vitro* pour des échantillons G54_500 et G54HT_500 immergés dans des solutions de SBF à 37°C. Des prélèvements de sang ont été effectués sur les lapins avant et après implantation. Comme précédemment (chapitre 3 partie II.2) le dosage des éléments a été effectué par ICP.

III.1 Préparation des échantillons

Les lapins ont subi plusieurs prélèvements, le premier à leur arrivée à l'animalerie (T_0) puis régulièrement entre le jour de l'intervention chirurgicale (J_0) et le sacrifice (J_{30} , J_{60} ou J_{90}).

Les échantillons ont été dilués comme suit :

0.5 mL de sang auxquels on ajoute 2mL HNO_3 dans une fiole jaugé à 100 mL égalisée avec de l'eau distillée.

Avant analyse, la solution a été filtrée sur papier tissé. Un blanc a été réalisé dans les mêmes conditions (2 mL HNO₃ puis volume égalisé à 100 ml).

III.2 Résultats obtenus par ICP

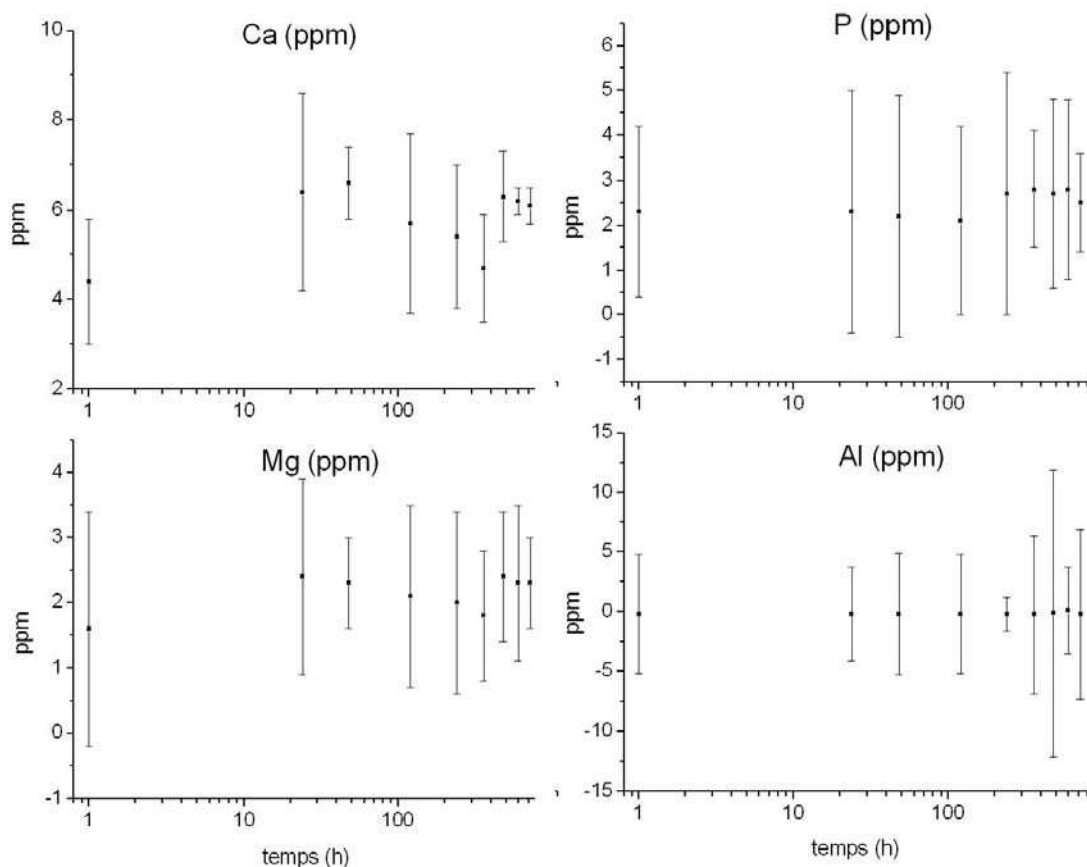


Figure 5.12 Concentrations des éléments Ca, P, Mg et Al dans le sang des animaux implantés. Etude en fonction du temps d'implantation.

L'étude SBF nous a permis de mettre en évidence qu'il n'y a pas de différence au niveau du relargage de l'aluminium que ce soit pour le G54_500 ou le G54HT_500.

L'étude ICP a conduit aux mêmes résultats *in vivo* (figure 5.12) : les teneurs en aluminium du sang n'évoluent pas et restent nulles de J₀ (avant l'opération) à J₃₀ (1 mois après l'opération).

L'étude ICP du calcium et du phosphore (éléments constitutifs du composite G54HT_500) ne montrent pas de variations significatives, la dissolution éventuelle du matériau n'est pas observable 1 mois après implantation.

Le magnésium contenu initialement dans le sang des mammifères reste à des teneurs de l'ordre de 2 ppm tout au long de l'étude.

IV Discussion sur les matériaux géopolymères

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au comportement *in vivo* des composites à matrice géopolymère G54. Ces matériaux ont été choisis car ils présentent les valeurs de pH les plus proches de 7 ainsi que les meilleures propriétés mécaniques.

L'étude *in vivo* qui est actuellement en cours a permis d'étudier le comportement à 1 et 3 mois après implantation. Un mois après implantation, les matériaux n'ont induit aucune réaction de rejet ni de nécrose au niveau des sites opératoires. Les études macroscopiques et histologiques ont montré l'absence de fibrose entre les implants et la matrice osseuse et la colonisation des pores externes par de l'os néoformé d'aspect immature.

L'analyse par ICP réalisée sur les prélèvements de sang des animaux implantés (pour le délai de 1 mois) n'ont pas mis en évidence de trace d'aluminium dans le sang.

Trois mois après implantation, les implants ont présenté des résultats similaires. L'ajout des phosphates de calcium a joué un rôle de charge au niveau physico-chimique en réduisant la porosité et en augmentant les propriétés mécaniques mais ces ajouts ne semblent pas avoir de rôle biologique pour ces matériaux.

V Conclusion

Biomatériaux CaCO₃ et TCP

La comparaison des cinétiques de migrations des différents éléments étudiés par PIXE a permis de mettre en évidence des mécanismes plus rapides pour les carbonates de calcium par comparaison au TCP (voir les valeurs en calcium et phosphore à 6 mois). Ce résultat a également été observé lors de l'étude histologique.

La colonisation des implants est visible dès le délais de 1 mois. Les concentrations en phosphore des carbonates de calcium présentent des valeurs voisines de zéro au centre des implants, l'étude biologique met en évidence des pores colonisés par de l'os immature. Il semble difficile par PIXE de différencier un pore non colonisé d'un pore colonisé par de l'os immature.

L'irrégularité des surfaces, l'intercomparaison relative des différents profils a conduit à des conclusions en accord avec celles obtenues suite à l'étude histologique.

Matériaux G54_500 et G54HT_500

Les premières études *in vivo* des matériaux à matrice géopolymère n'ont pas mis en évidence de fibrose ni de nécrose 1 et 3 mois après implantation.

Le géopolymère pur G54_500 et le composite G54HT_500 présentent des résultats identiques, l'ajout du phosphate de calcium a amélioré le comportement mécanique des composites mais ne semble pas influencer significativement le comportement *in vivo*.

Les implants sont ostéo-intégrés, les études biologiques ont mis en évidence l'apparition d'os cicatriciel partant des berges du défaut vers les implants. Cet os néoformé recouvre la surface des implants après 1 mois et présente une cicatrisation parfaite à 3 mois.

La repousse osseuse est centripète, cet os en treillis migre vers les pores périphériques des implants.

Les échantillons ont fait l'objet d'une étude par PIXE, cette technique a permis de confirmer les observations biologiques. 1 mois après implantation, l'étude des profils de composition des éléments Si et K met en évidence une absence de migration de ces éléments des implants vers la matrice osseuse.

L'absence de zone déminéralisée pour les profils en calcium, phosphore et zinc confirme l'absence de fibrose entre les implants et la matrice osseuse.

Les résultats obtenus pour les échantillons prélevés à 3 mois confirment la colonisation des pores des matériaux par de l'os néoformé.

Les études ICP réalisées sur des prélèvements sanguins durant l'expérimentation animale (pour le délai de 1 mois) n'ont pas pu mettre en évidence des variations des concentrations en calcium, phosphore dans le sang. Aucune augmentation des concentrations en aluminium n'a pas été observée. Ces premiers résultats *in vivo* confirment les conclusions obtenues *in vitro* quant à la stabilité des implants et à l'absence de relargage d'aluminium dans des proportions mesurables.

Références

- [1] MARTIN S., **Apport des techniques nucléaires d'analyse dans l'évaluation de la substitution osseuse de biomatériaux résorbables *in vivo***, rapport de DEA Université de Rennes1, septembre 2002.

- [2] LE GUEHENNEC L., HOUCHMAND-CUNY M., GOYENVALLE E., AGUADO E., PILET P., DACULSI G. et LAYROLLE P., **Modèles de petits animaux pour l'évaluation de substituts osseux céramiques**, 7^{ème} Forum des jeunes Chercheurs en Odontologie, Rennes 5-6 mai 2004, 8

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans la première partie de ce travail, nous avons synthétisé des composites constitués d'une matrice géopolymère associée à des phosphates de calcium. La réalisation de ces matériaux avait pour objectif une application potentielle comme biomatériaux de comblements osseux. Dans le domaine des matériaux de comblement osseux, de nombreux paramètres influent sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des implants. Nous avons choisi d'optimiser les valeurs de pH des matériaux tout en maintenant un bon compromis entre la contrainte à la rupture en compression et le pourcentage de porosité,

Pour optimiser ces paramètres, nous avons réalisé différents géopolymères (G80, G67 et G54) que nous avons associés avec différents phosphates de calcium.

Les matériaux ont pu être obtenus par coulage dans des moules. Les synthèses de ces matériaux se déroulent en milieu fortement basique, le pH des matériaux et des composites géopolymères/phosphates de calcium est supérieur à 10 quel que soit le géopolymère.

Afin de réduire les valeurs de pH des échantillons géopolymères et composites, nous avons étudié l'influence de deux traitements thermiques sur les matériaux. Une température de traitement de 500°C a permis d'abaisser le pH des composites à des valeurs inférieures à 8 tout en ayant un bon compromis entre contrainte à la rupture et porosité.

Les structures des géopolymères purs et des composites obtenus ont été caractérisées par DRX, FTIR et RMN MAS. Ces techniques nous ont permis de constater que les géopolymères purs présentent un réseau de tétraèdres SiO_4 en chaînes, réticulées par des aluminiums en coordinance 4. Les modifications des conditions de synthèses n'ont pas influencées la structure amorphe des géopolymères. Les températures de traitements thermiques (250°C et 500°C) n'étaient pas assez élevées pour induire la cristallisation des aluminosilicates : même après traitement thermique à 500°C, tous les géopolymères présentent des structures amorphes.

Les matériaux obtenus par l'association de ces géopolymères avec des phosphates de calcium se présentent comme des composites : une matrice géopolymère où sont inclus des phosphates de calcium. A la température de synthèse, les analyses DRX et RMN MAS ont montré qu'il n'y a pas de fusion entre l'aluminosilicate de la matrice et le phosphate inclus.

Les études structurales réalisées sur les composites après traitement thermique ont permis de vérifier que même après un traitement à 500°C, les composites conservent leur structure initiale.

La principale action du traitement thermique concerne la diminution des valeurs de pH de l'ensemble des matériaux. Cette diminution de pH est accompagnée par la diminution de l'intensité de la bande d'absorption caractéristique des groupements hydroxyles en FTIR et en RMN MAS 1H avec la diminution de l'intensité du signal. Le départ d'eau de la structure des géopolymères et des composites s'accompagne d'une augmentation du pourcentage de porosité des matériaux, cette

augmentation est influencée par le rapport K_2O/SiO_2 (qui définit le géopolymère) et par la quantité de phosphate de calcium ajouté à la matrice lors de la synthèse.

Les études des propriétés mécaniques de ces matériaux après traitements thermiques nous ont permis de définir les meilleurs paramètres de synthèse (rapport K_2O/SiO_2 , température de traitement thermique et choix des phosphates de calcium) pour obtenir le meilleur compromis entre pourcentage de porosité et propriétés mécaniques.

Les composites et le géopolymère pur présentant des valeurs de pH voisines de 7 ainsi que de bonnes propriétés mécaniques (par rapport à leur pourcentage de porosité) ont fait l'objet d'une étude *in vitro* et *in vivo* afin d'évaluer leur potentiel pour une utilisation comme biomatériaux.

L'étude *in vitro* par immersion des échantillons dans des solutions de SBF a montré qu'il n'y a pas de dissolution des échantillons pour des délais allant jusqu'à 30 jours. Les concentrations en aluminium des solutions sont restées à des valeurs nulles quelle que soit la durée d'immersion (mesure par ICP). L'étude par MEB et FTIR des échantillons après immersion n'a pas mis en évidence de dépôt d'hydroxyapatite, signature de la bioactivité *in vitro*.

Les premières études *in vivo* réalisées par l'implantation d'un géopolymère pur et d'un composite dans des tibias de lapins ont montré qu'il n'y a pas de rejet ni de fibrose au niveau des implants. Dès le délai de un mois, les porosités externes des implants sont colonisées par de l'os néoformé. La cicatrisation en surface des matériaux est totale à 3 mois. Les analyses par PIXE des implants confirment la consolidation de l'interface dès le délai de 1 mois.

Des études par ICP des concentrations sanguines (en Ca, Al, P et Mg) après l'implantation ont montré qu'il n'y a aucune variation des valeurs en aluminium dans le sang. Ces résultats confirment la stabilité des matériaux qui avait été observée *in vitro*.

Ce travail propose de nombreuses perspectives quant au matériau géopolymère et aux techniques physiques d'analyses d'implants biologiques.

Les premiers résultats *in vivo* obtenus pour le géopolymère sont très encourageants. Il reste à confirmer ces résultats à préciser les applications de ce type de matériaux en approfondissant les études aux contacts de tissus.

Des études en cours s'intéressent à la possibilité de l'utilisation de ces géopolymères comme ciments d'obturations, ce sont alors les propriétés de basicité et de fluidité qui sont optimisées.

Les résultats obtenus par PIXE et NAA pour le $CaCO_3$ montrent un comportement *in vivo* similaire à celui d'un produit commercialisé étudié comme référence (le TCP). Cette étude constitue l'une des parties du projet ANVAR sur ce matériau qui a fait l'objet d'un brevet déposé par l'université de Rennes1. Les enjeux sont maintenant d'ordre industriel.

Annexes

Annexe 1 mécanisme du remodelage osseux

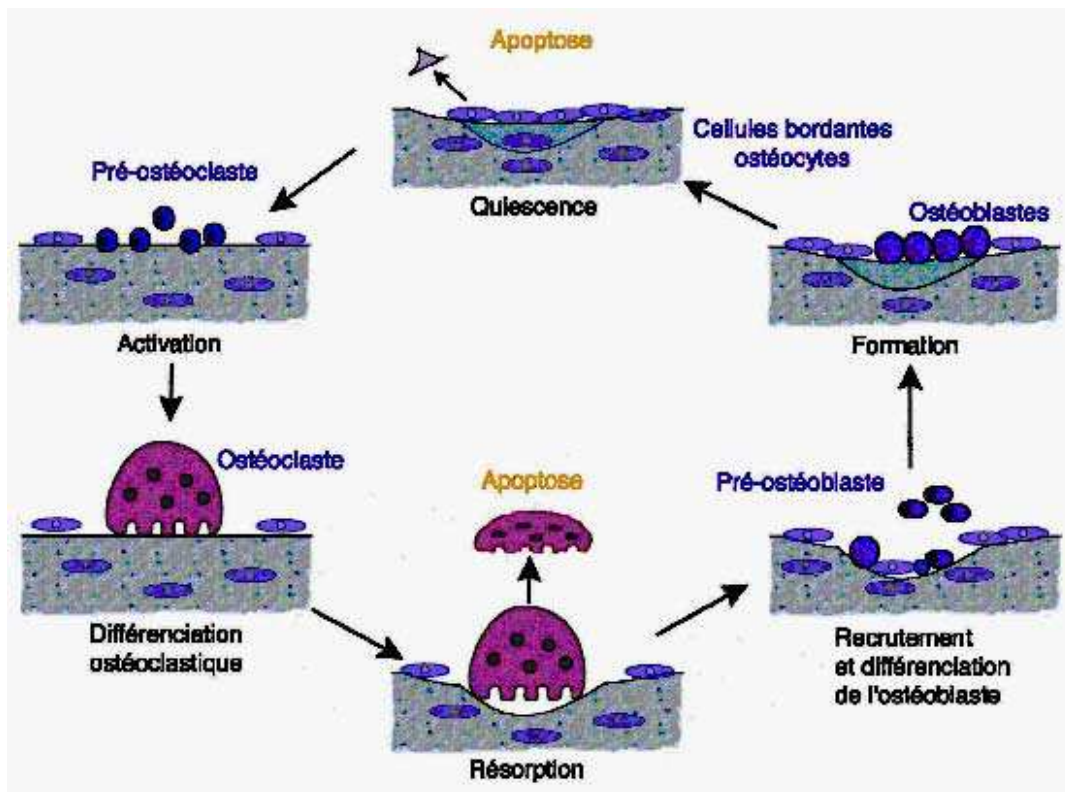


Figure 1 Présentation des différentes phases du remodelage osseux [1]

phase de quiescence

Cette phase peut durer plusieurs années. Elle se caractérise par la présence, à l'état latent, de cellules bordantes empêchant l'accès des ostéoclastes à la matrice extra cellulaire contenant les facteurs de croissance (activateur de la résorption).

phase d'activation/ différenciation ostéoclastique

En début de cycle de remodelage, les cellules bordantes se rétractent sous l'action de facteurs ostéorésorbants (hormones, vitamines). Par contact avec la MEC, les préostéoclastes migrent vers la surface osseuse et fusionnent pour donner des ostéoclastes actifs multi-nucléés. Les ostéoclastes actifs vont adhérer à la surface osseuse afin de pouvoir la résorber.

phase de résorption du tissu osseux (1 à 2 semaines)

Les ostéoclastes devenus actifs se fixent à la matrice osseuse pour commencer la phase de

résorption. Il y a dissolution de la partie minérale par acidification du milieu et dégradation de la partie organique par l'attaque enzymatique. Les ostéoclastes « creusent » une lacune au fond de laquelle ils se déposent.

phase d'inversion

La dissolution de la partie minérale de la matrice osseuse provoque une augmentation de la concentration en calcium dans la cavité de résorption. Ce déséquilibre entraîne des modifications des cellules ostéoclastiques qui vont se décrocher de la surface. Dès leur activation, les ostéoclastes ont secrété des facteurs de croissance, signaux d'appel pour les cellules pré-ostéoblastes qui vont migrer vers la cavité pour s'y différencier.

phase de production du tissu osseux (3 mois)

Les ostéoblastes entrent en jeu pour former la matrice extra-cellulaire dans la cavité puis la minéraliser. Les ostéoblastes proviennent de la différenciation des cellules ostéoprogénitrices qui tapissent le fond de la cavité. Les ostéoblastes forment une nouvelle matrice extra-cellulaire non minéralisée (le tissu ostéoïde) qui comble la cavité. La minéralisation s'effectue à partir de l'interface entre la partie ostéoïdique et la partie minérale initialement présente. Cette croissance est rapide (20 μm en 1 mois), les ostéoblastes piégés dans ces tissus deviennent inactifs : les ostéocytes.

[1] Marie P., **Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste**, Médecine/Science (17), 2001, 1252

Annexe 2 : rôle de quelques éléments analysés dans ce travail

Le strontium

Des études *in vitro* ont montré que des concentrations en strontium comprises entre 0,1 à 1Mmol inhibent la résorption osseuse alors que des concentrations égales en calcium n'ont pas le même effet, le strontium agit directement sur les cellules ostéoclastiques [1]. L'étude de la formation osseuse a été étudiée *in vitro* en présence de strontium : une concentration de 1Mmol en strontium augmente la réplication des cellules préostéoblastiques [2]. Ce phénomène n'a pas été observé pour des concentrations égales en calcium. Ces études montrent que le strontium joue un rôle direct avec la matrice osseuse suivant le mécanisme potentiel suivant (figure 1) :

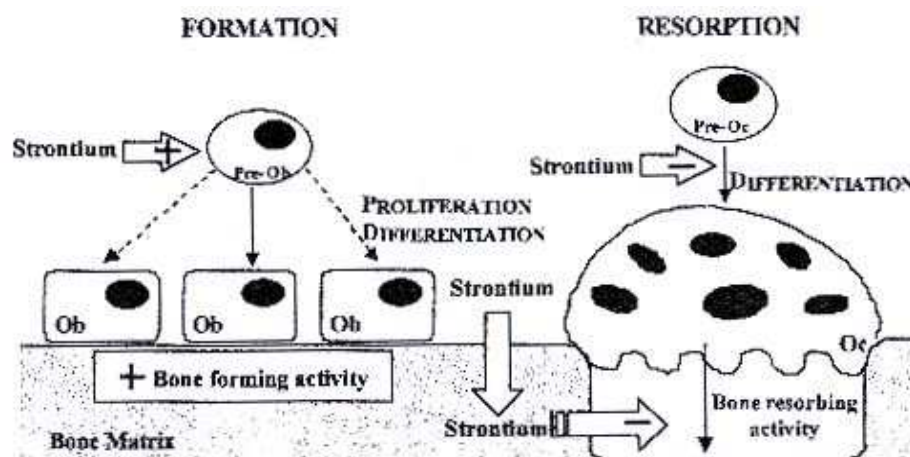


Figure 1 Mécanismes possibles du strontium au niveau de la matrice osseuse [3]

D'après le mécanisme de la figure 4, le strontium favorise la réplication des cellules préostéoblastiques, augmentant la synthèse de la matrice osseuse. Parallèlement, il inhibe la différenciation des ostéoclastes et diminue leur activité.

Pre-Ob : cellule préostéoblastique, Ob : ostéoblaste, Pre-Oc cellule préostéoclastique, Oc : ostéoclaste, + : effet stimulant, - = effet inhibiteur. [3]

L'aluminium

Sa concentration est d'environ 2 µg/L [4] et peut atteindre des valeurs de 350 µg/L chez des patients sous dialyse [4]. Les études récentes [5] ont mis en évidence l'implication de l'aluminium dans le développement de certains types de dysfonctionnement (ostéodystrophie) rénaux, neurologique, pulmonaires [6].

Des études proposent un modèle selon lequel l'aluminium se déposerait principalement sur le front de minéralisation de la matrice osseuse [7]. Le mécanisme proposé par C. Exley et al. [8] repose sur la forte affinité de l'aluminium III pour les phosphates des biomolécules phosphorées (adénosine, AMP, ADP et ATP par exemple) : les forces de liaisons entre Al et ces biomolécules sont supérieures à celles des éléments Ca, Mg... il s'en suit une perturbation des mécanismes cellulaires nécessitant les éléments calcium et magnésium [9].

Aluminium III et la maladie d'Alzheimer : Le symptôme principal de la maladie d'Alzheimer est une démence importante liée à la formation de neurofibrilles tangle et plaques seniles de protéines amyloïdes dans le cerveau [10]. Il a été montré que l'aluminium pouvait induire la formation de telles plaques.

Le silicium

Le silicium est l'un des éléments les plus abondant de la surface terrestre. Cet élément serait impliqué dans le contrôle hormonale des femelles, protégerait des problèmes cardiaques chez l'homme [11] et serait impliqué dans la synthèse chlorophyllienne, dans certaine protéines.

Perry et al. ont montré la forte affinité entre les éléments Si et Al, même à des rapports Si/Al = 1000, l'aluminium s'associe avec le silicium aqueux (Si(OH)_4) pour former des complexes stables [12], ces complexes diminuent la toxicité de l'élément Al [13]. Des études réalisées sur des patients souffrants de la maladie d'Alzheimer et présentant des traces d'aluminium dans les régions lésées ont mis en évidence la coexistence de silicium sur les mêmes sites. La toxicité de l'aluminium est diminuée avec la présence de silicium, le silicium empêcherait l'aluminium d'interagir avec les cellules chez les plantes. Chez l'homme, le silicium sous forme Si(OH)_4 semble minimiser l'absorption intestinale de l'aluminium, diminuant la quantité d'aluminium véhiculée vers les tissus par le sang et autres fluides [13].

- [1] SU Y., BONNET J., DELOFFRE P., TSOUDEROS Y., BARON R., **The strontium salt S12911 inhibits bone resorption in mouse calvaria and isolated rat osteoclast culture**, Bone Miner. (17), 1992, 188
- [2] CANALIS E., HOTT M., DELOFFRE P., TSOUDEROS Y., MARIE P.J., **The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro**, Bone (18),1996, 517
- [3] MARIE P.J., AMMANN P., BOIVIN G., REY C., **Mechanisms of action an therapeutic potential of strontium in bone**, Calcif. Tissue Int. (69), 2001, 1216

- [4] VAN LANDEGHEM G.F., DE BROE M.E., D'HAESE P.C., **Al and Si : their speciation distribution and toxicity**, Clin. Biochem. (31), 1998, 385
- [5] D'HAESE P.C., VAN DE VYVER F.A., DE WOLFF F.A., DE BROE M.E., **Measurement of Al in serum, blood, urine and tissues of chloric hemodialyzed patients by use of aelectrothermal atomic absorption spectrometry**, Clin. Chem. (31), 1985, 24
- [6] THOMSON S.M., BURNETT B.C., BERGMANN J.D., HIXSON C.J., **Comparative hinalation hazards of aluminium and brass powders using bronchopulmonary lavage as an indicator of lung damage**, J. Applied Toxicol. (6), 1986, 197
- [7] QUARTLEY B., ESSELMONT G., TAYLOR A., DOTROBA M., **Effect of oral Al citrate on short-term tissue distribution of Al**, Fd. Chem. Toxic. (8), 1993, 543
- [8] EXLEY C., BIRCHALL J.D., **Hydroxyaluminosilicate formation in solutions of low total aluminum concentration**, Polyhedron (11), 1992, 1901
- [9] KISS E., . ZATTA P and CORAIN B., **Interaction of aluminium (III) with phosphate-binding sites: biological aspects and implications**, Coordination Chemistry Reviews (149),1996, 329
- [10] CHADWICK D., WHELANS J. (Eds.), **Aluminium in Biology and medecine**, Ciba found. Symp. (169), Wiley NY 1992, 1
- [11] LOEPER J., LOEPER J., FRAGNY M., in G. BENDZ, LINDQVIST I. Eds, **Biochemistry of silicon and related problems**, 40th Nobel symposium, plenun press, NY 1977, 281
- [12] PERRY C.C., KEELING-TUCKER T., **Model studies of the precipitation of silica in the presence of aluminium ; implications for biology and industry**, J. Inorg. Biochem (78), 2000, 331
- [13] BIRCHALL J.S., ESPIE A.W., **Silicon biochemistry**, Ciba found symp. (121), Wiley Chichester, 1986, 140

Annexe 3 RMN [1]

Principe

Le spin I d'un noyau lui confère des propriétés magnétiques qui vont rendre l'analyse RMN possible. Pour que le spin soit non nul, il faut que le noyau étudié possède un nombre de masse A (nucléon) ou un nombre de protons Z impair.

Les noyaux de spin non nul sont en rotation sur eux même ce qui génère un moment magnétique :

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \hbar \mathbf{I}$$

Le rapport gyromagnétique γ est spécifique à chaque isotope, \mathbf{I} représente le vecteur moment magnétique de spin. En absence de champ magnétique externe, $\boldsymbol{\mu}$ prend toutes les orientations définies par les $(2I+1)$ niveaux d'énergies qui sont dégénérés.

Cette propriété intrinsèque du noyau va être utilisée par la RMN. Lorsque la particule de spin I est placée dans un champ magnétique \mathbf{B}_0 , elle emmagasine une énergie

$$E = \boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0 \cos \theta$$

(θ est l'angle entre \mathbf{B}_0 et $\boldsymbol{\mu}$ soit $54,7^\circ$). L'orientation de $\boldsymbol{\mu}$ par rapport à \mathbf{B}_0 est discrète, il n'y a que $2I+1$ valeurs, ce qui entraîne la levée de dégénérescence des niveaux d'énergies (interaction Zeeman).

Pour un noyau ayant un spin $\frac{1}{2}$ l'action du champ B_0 entraîne la levée de dégénérescence en deux niveaux d'énergies :

$$E_1 = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0 \text{ et } E_2 = \boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0$$

La différence d'énergie ΔE entre les niveaux E_1 et E_2 sera $\Delta E = 2 \boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0$

La technique de RMN consiste à exciter la particule placée dans un champ \mathbf{B}_0 avec une onde électromagnétique de fréquence ν (fréquence de Larmor). Cette fréquence permet de fournir au système une énergie égale à ΔE , différence d'énergie entre les niveaux.

Dans l'exemple précédent (spin $\frac{1}{2}$), $h\nu = \Delta E$, d'où $\nu = 2\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0 / h$

Cette excitation va permettre de peupler le niveau le plus énergétique ($+\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0$) afin d'égaliser les populations des deux niveaux (temps de relaxation du système). Cette fréquence ν est pulsée, ce qui provoque un retour à l'état initial des populations de spins.

L'interaction Zeeman décrite ci-dessus est la plus importante, elle est de l'ordre de quelques dizaines ou centaines de MHz. Cependant, dans le cas d'étude d'échantillons solides, l'énergie Zeeman est perturbée par d'autres interactions entraînant des perturbations des conditions de résonance et un chevauchement des raies du spectre.

Lors d'une étude par RMN d'un solide, les interactions suivantes entrent en jeu :

Interaction quadripolaire : cette interaction apparaît lorsque le moment quadripolaire électrique interagit avec le moment quadripolaire. Le moment quadripolaire apparaît au niveau du noyau si le

spin est supérieur à $\frac{1}{2}$. Cette interaction est influencée par la symétrie de l'environnement, déplace les niveaux d'énergie et est anisotrope. Les raies des spectres seront plus larges et auront une forme non symétrique. L'aluminium qui nous intéresse a un spin 5/2, nous présenterons ses résultats en fonction de ν_Q fréquence quadripolaire et $\eta_Q \in [0, 1]$ paramètre d'asymétrie.

Interaction dipolaire : interaction magnétique directe entre proches voisins qui contribue vectoriellement au champ principal, l'énergie de cette interaction diminue en $1/r^3$ lorsque la distance r entre les noyaux augmente. Cette interaction provoque un élargissement des raies mais elle peut être moyennée par la rotation à l'angle magique (54.7° par rapport à la direction du champ magnétique principal).

Interaction de déplacement chimique : le champ magnétique agissant effectivement sur un noyau (B_{eff}) est fonction d'une constante d'écran due au cortège électronique ($B_{\text{eff}} = B_0 (1-\sigma)$). Les conditions de résonance en sont modifiées et la fréquence de résonance est déplacée de ν_{ref} à ν . L'étude de ce déplacement ($\delta = (\nu - \nu_{\text{ref}}) / \nu_{\text{ref}} \cdot 10^6$) permet de connaître l'environnement d'un noyau. Dans un solide, cette interaction est anisotrope. La rotation à l'angle magique moyenne l'anisotropie du déplacement chimique et permet d'accéder à la valeur isotrope.

Acquisition du signal

A l'équilibre, l'aimantation M est suivant z , l'excitation est générée par un champ radiofréquence B_1 qui oriente tous les moments M dans le plan (xoy) . L'acquisition commence juste après l'arrêt de l'impulsion. On recueille un signal qui correspond à la variation de l'aimantation dans le plan (xoy) en fonction du temps (figure 1). La transformée de Fourier de ce signal permet d'obtenir les spectres qui seront analysés ci-après.

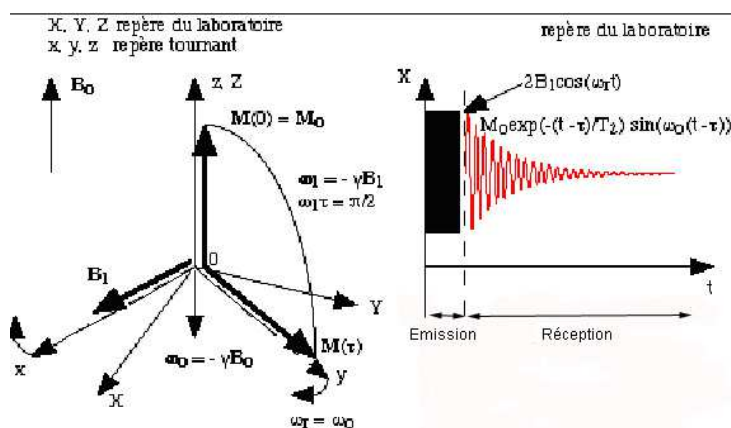


Figure 1

- [1] DERIANO S., **Conception chimique de verres silicatés à hautes performances mécaniques**, Thèse de doctorat n° 2795, Université de Rennes 1, 2002

Annexe 4 DRX des composites traités à 250°C

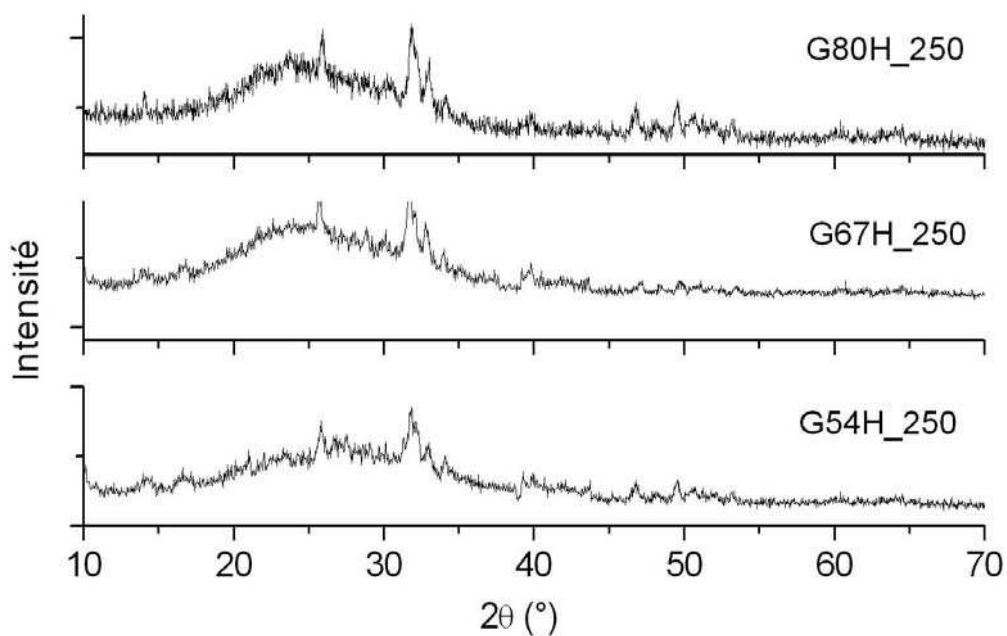


Figure 1 DRX des composites géopolymères/ HA après un traitement thermique à 250°C

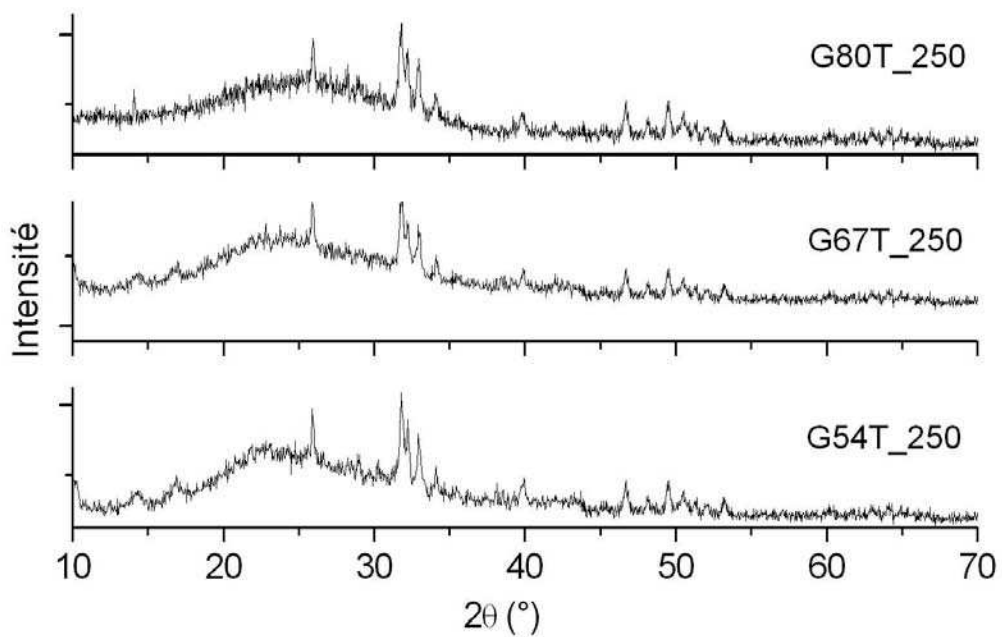


Figure 2 DRX des composites géopolymères/ TCP après un traitement thermique à 250°C

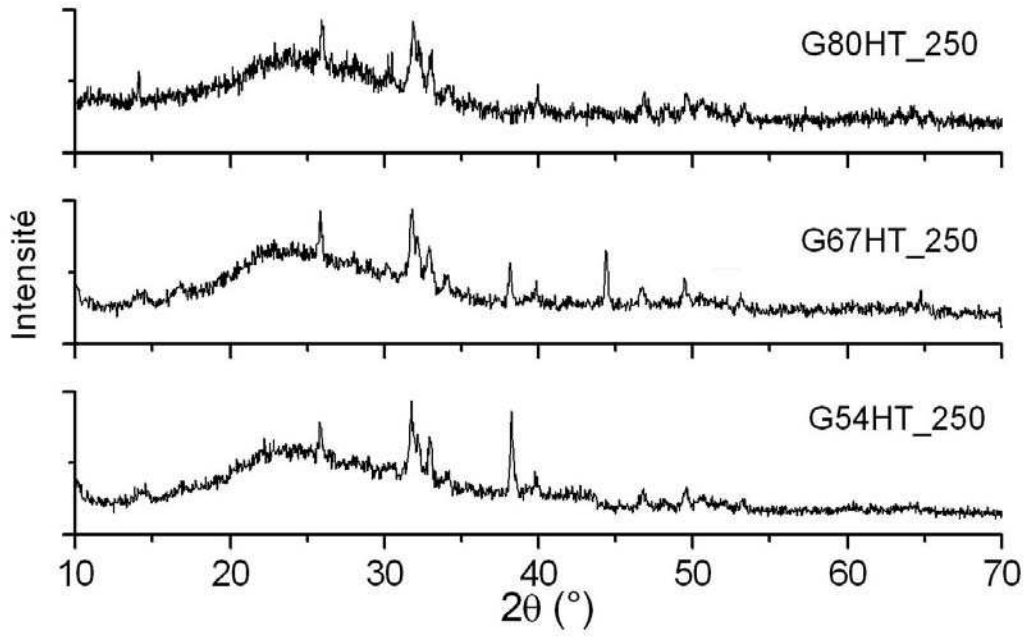


Figure 3 DRX des composites géopolymères/ HA TCP après un traitement thermique à 250°C

Annexe 5 FTIR des composites

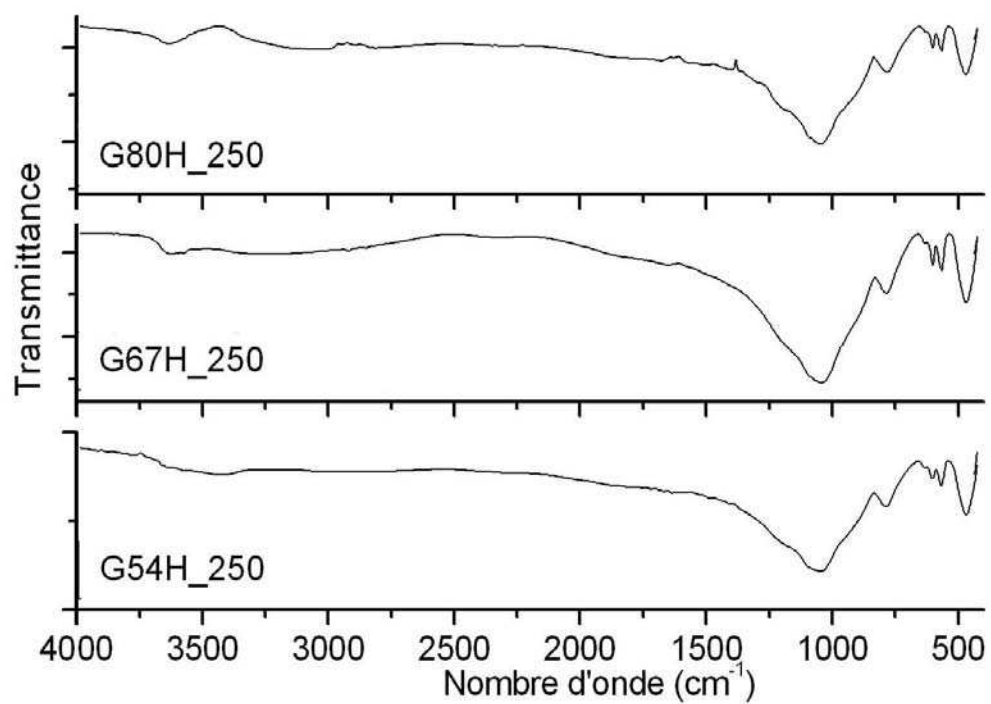


Figure 1 FTIR des composites géopolymères/ HA après un traitement thermique à 250°C

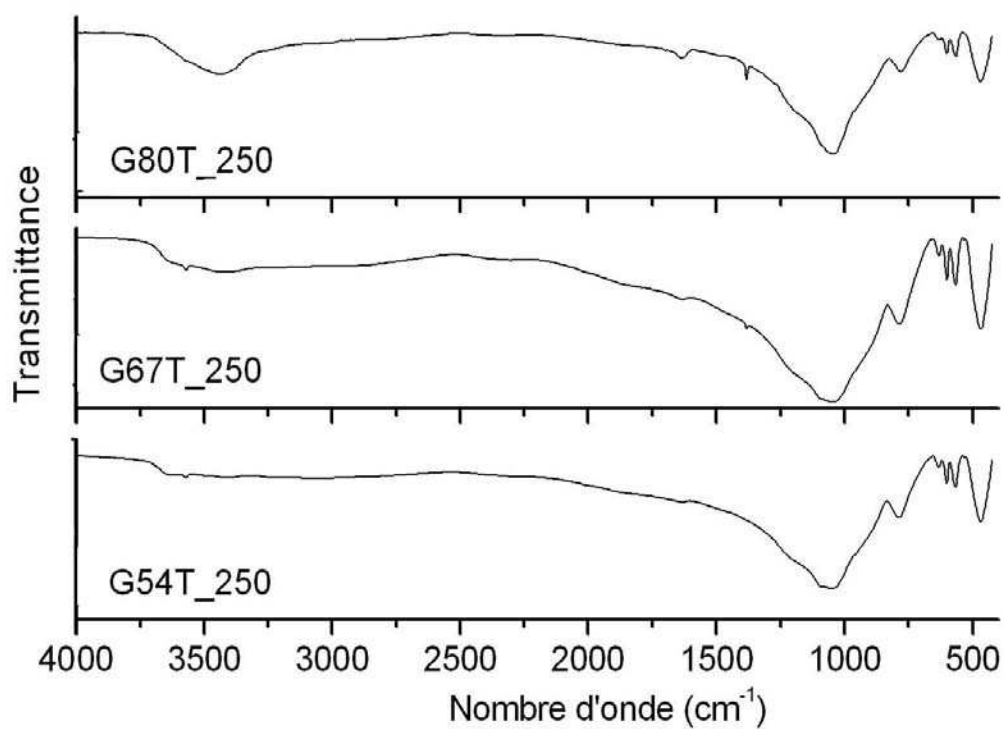


Figure 2 FTIR des composites géopolymères/ TCP après un traitement thermique à 250°C

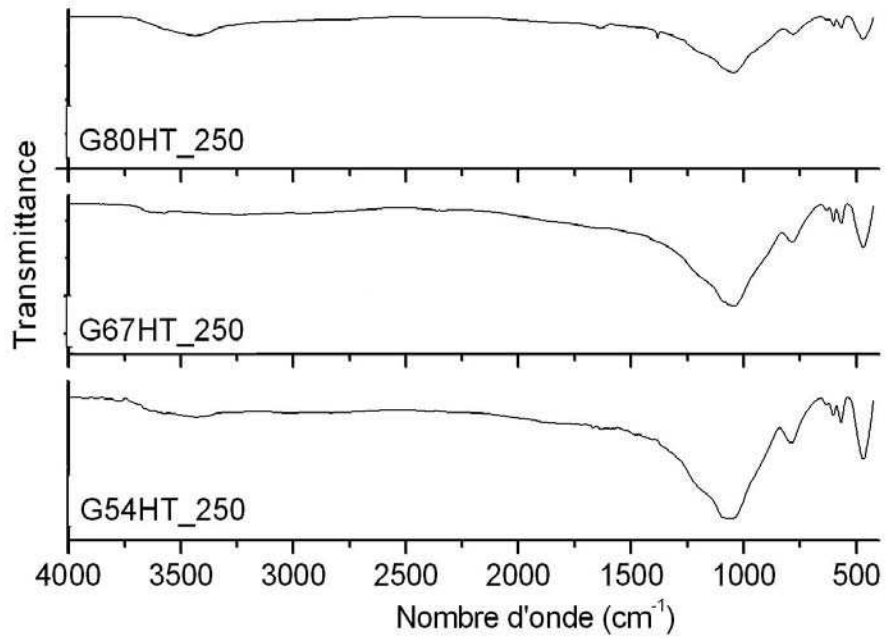


Figure 3 FTIR des composites géopolymères/ HA TCP après un traitement thermique à 250°C

Annexe 6 méthode des plans d'expérience

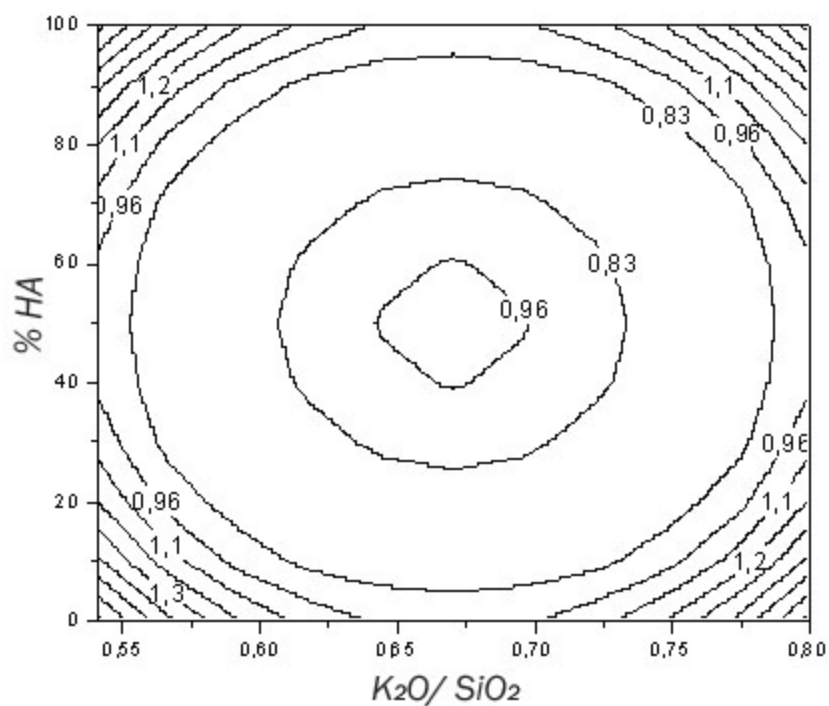


Figure 1 Courbe d'erreur obtenue dans le cas de l'utilisation d'un plan de Doehlert. Le modèle hexagonal proposé par Doehlert introduit des valeurs d(\hat{y}_p) supérieures à 1 dans les angles du domaine.

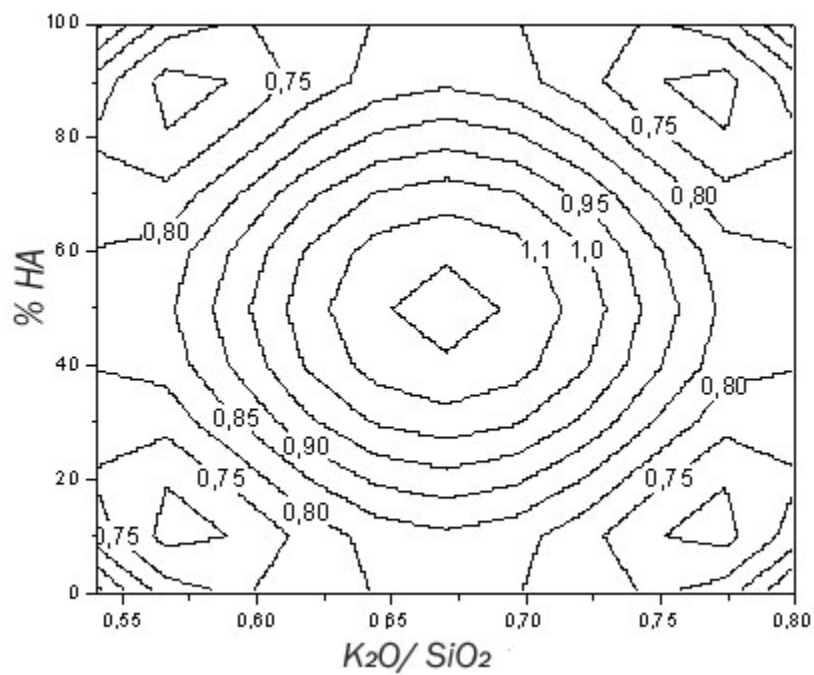


Figure 2 Courbe d'égal erreur obtenue pour une matrice centrée sur le point milieu G67 H50 T50

Le modèle carré centré (figure 2) permet de mieux approximer les angles du domaine. La seule zone où l'erreur du modèle est supérieure à l'erreur expérimentale se situe au barycentre du domaine d'étude.

	const	X ₁	X ₂	X ₁₂	X ₁ ²	X ₂ ²
y1	1	-1	-1	1	1	1
y2	1	1	-1	-1	1	1
y3	1	-1	1	-1	1	1
y4	1	1	1	1	1	1
y5	1	0	-1	0	0	1
y6	1	0	1	0	0	1
y7	1	-1	-0,2	0	1	0
y8	1	1	-0,2	0	1	0

	X ₁	X ₂
Niveau -1	K ₂ O/ SiO ₂ = 0,54	100 % HA
Niveau -0,2	-	60 % HA 40 % TCP
Niveau 0	K ₂ O/ SiO ₂ = 0,67	50 % HA 50 % TCP
Niveau 1	K ₂ O/ SiO ₂ = 0,8	100 % TCP

Tableau 1 Matrice d'expérience notée X

- X₁ rapport molaire K₂O/ SiO₂ dans la solution de silicate.
- X₂ pourcentage massique de TCP substitué à l'hydroxyapatite HA.

Statistique de Student

La détermination du t_β (variable de Student) pour les valeurs de % de porosité et de contrainte à la rupture est fonction du nombre de degrés de liberté ν et du nombre de mesures n. ν = n-2 pour Δ σ(MPa) et n = n-1 pour Δ %poro. Les points y1 à y8 sont utilisés pour calculer le modèle mathématique qui permettra d'établir le relation entre les paramètres de synthèse et le pourcentage de porosité ou les propriétés mécaniques en compression.

Calcul de la matrice des coefficients et des résultats

Pour établir l'équation reliant les paramètres de synthèse aux propriétés physiques que l'on détermine, il est nécessaire de calculer la matrice de coefficients a_i . La matrice des coefficients $\hat{\mathbf{a}}$ est obtenue à partir de la matrice d'expérience \mathbf{X} et de la matrice des valeurs expérimentales \mathbf{y} suivant la relation :

$$\hat{\mathbf{a}} = (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^t \mathbf{y}$$

\mathbf{X} : la matrice d'expérience

\mathbf{X}^t : la transposée de \mathbf{X}

\mathbf{y} : la matrice de résultats

La matrice des valeurs calculées $\hat{\mathbf{y}}$ appliquée à tout le domaine est obtenu par l'équation suivante :

$$\hat{\mathbf{y}} = \mathbf{X} \hat{\mathbf{a}}$$

Pour chaque coefficient calculé a_i , on détermine l'erreur introduite par le modèle. La matrice erreur $\sigma(\hat{\mathbf{a}})$ est obtenue comme suit :

$$\sigma(\hat{\mathbf{a}}) = \sigma_r (\text{Diag}(\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1})^{1/2}$$

σ_r correspond à la variance des résidus.

Le modèle du plan d'expérience permet de déterminer la matrice de coefficients $\hat{\mathbf{a}}$ avec

$\hat{\mathbf{a}}^t = [a_0 \ a_1 \ a_2 \ a_{12} \ a_{11} \ a_{22}]$ et les erreurs sur chacun des coefficients $\sigma(\hat{\mathbf{a}})$.

L'équation reliant le pourcentage de porosité y (ou la contrainte à la rupture) sera de la forme :

$$y = a_0(\pm\sigma(a_0)) + a_1(\pm\sigma(a_1)) X_1 + a_2(\pm\sigma(a_2)) X_2 + a_{12}(\pm\sigma(a_{12})) X_{12} + a_{11}(\pm\sigma(a_{11})) X_1^2 + a_{22}(\pm\sigma(a_{22})) X_2^2$$

Si les coefficients a_{ij} sont négatifs, les paramètres X_{ij} correspondant sont responsables d'une diminution de la valeur de la propriété y . Inversement, des coefficients a_{ij} positifs correspondent à des paramètres X_{ij} qui augmentent la valeur de y .

Valeurs des coefficients

Pourcentage de porosité

$$\begin{aligned} a_0 &= 72,72 \pm 1,24 & a_1 &= 5,63 \pm 0,44 & a_2 &= 0,52 \pm 0,44 \\ a_{11} &= -1,31 \pm 0,94 & a_{12} &= -0,36 \pm 0,53 & a_{22} &= 2,98 \pm 0,98 \end{aligned}$$

Contrainte à la rupture

$$\begin{aligned} a_0 &= 1,193 \pm 0,096 & \exp(a_0) &= 3,298 \pm 1,10 & a_1 &= -0,440 \pm 0,034 & a_2 &= 0,058 \pm 0,034 \\ a_{11} &= -0,029 \pm 0,073 & & & a_{22} &= -0,217 \pm 0,076 & a_{12} &= -0,060 \pm 0,042 \end{aligned}$$

Calcul des test de Fisher, courbe des résidus et R²

test de Fisher [1]

Ce test permet de calculer l'importance du manque d'ajustement (écart entre les résultats expérimentaux et théoriques).

F est le rapport entre :

- la variance des résultats théoriques
- la variance des résultats expérimentaux

Ce rapport permet de calculer la probabilité pour que la variance d'ajustement est négligeable devant la variance expérimentale. Si la valeur de F est supérieure à une valeur indiquée dans les tables, les variances sont significativement différentes. Dans notre cas cela remettrait en cause la validité du modèle. La table statistique est donnée à la fin de cette annexe, elle est fonction du nombre de degrés de liberté du numérateur et du dénominateur.

Calcul des valeurs de F pour le pourcentage de porosité et la contrainte à la rupture.

$$F = \frac{\text{variance expérimentale}}{\text{Variance théorique}}$$

La variance (notée s²) a pour formule

$$s^2 = \frac{\sum (y_i - y_{moy})^2}{(n-1)}$$

avec n le nombre de mesures, n-1 le nombre de degrés de liberté, y_i la valeur pour la i^{ème} mesure et y_{moy} la moyenne.

Les variances expérimentales pour le pourcentage de porosité et la contrainte à la rupture ont été

calculées avec 99 mesures. Les variances de chaque modèle ont été établies avec 9 mesures (indiquées dans le tableau 3-1).

	Nombre de degrés de liberté (ddl)	Variance	F
Contrainte rupture expérience	98	1,44	0,92
Contrainte rupture modèle	8	1,32	
% porosité expérience	98	18,69	1,43
% porosité modèle	8	26,82	

Tableau récapitulatif des valeurs permettant le calcul des tests de Fisher

R² [2]

R² est compris entre 0 et 1, il correspond au rapport entre :

- la somme des carrés des réponses prédites moins la somme des carrés de la moyenne (numérateur)
- la somme des carrés des réponses mesurées moins la somme des carrés de la moyenne (dénominateur)

Analyse des résidus [2]

Ce diagramme permet de faire apparaître graphiquement des relations entre paramètres. Si les points sont dispersés aléatoirement, il n'y a pas de relation entre les deux paramètres étudiés et toutes les informations ont été traitées.

[1] DANIELIE P. , **Statistique théorique et appliquée**, De Boek et Larcier, Bruxelles 1998

[2] GOUPY J., **Plan d'expériences pour surfaces de réponses**, Edition DUNOD, 1999

[3] Souvray P., **Les tables Statistiques Mode d'emploi**, Collection A savoir, Ed. AFNOR, 2002

TABLE DE FISCHER - SNEDECOR (P=0,95)

v_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
v_2													
1	161	199,5	215,7	224,6	230,2	234	236,8	239	240,5	241,9	243,9	245,9	248
2	18,5	19	19,16	19,25	19,3	19,33	19,35	19,4	19,38	19,4	19,41	19,43	19,45
3	10,1	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,74	8,7	8,66
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6	5,96	5,91	5,86	5,8
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,68	4,62	4,56
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,1	4,06	4	3,94	3,87
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,57	3,51	3,44
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,5	3,44	3,39	3,35	3,28	3,22	3,15
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,07	3,01	2,94
10	4,96	4,1	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,91	2,85	2,77
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,2	3,09	3,01	2,95	2,9	2,85	2,79	2,72	2,65
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3	2,91	2,85	2,8	2,75	2,69	2,62	2,54
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	2,6	2,53	2,46
14	4,6	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,7	2,65	2,6	2,53	2,46	2,39
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,9	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,48	2,4	2,33
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	2,42	2,35	2,28
17	4,45	3,59	3,2	2,96	2,81	2,7	2,61	2,55	2,49	2,45	2,38	2,31	2,23
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	2,34	2,27	2,19
19	4,38	3,52	3,13	2,9	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	2,31	2,23	2,16
20	4,35	3,49	3,1	2,87	2,71	2,6	2,51	2,45	2,39	2,35	2,28	2,2	2,12
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37	2,32	2,25	2,18	2,1
22	4,3	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,4	2,34	2,3	2,23	2,15	2,07
23	4,28	3,42	3,03	2,8	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32	2,27	2,2	2,13	2,05
24	4,26	3,4	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,3	2,25	2,18	2,11	2,03
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,6	2,49	2,4	2,34	2,28	2,24	2,16	2,09	2,01
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	2,15	2,07	1,99
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25	2,2	2,13	2,06	1,97
28	4,2	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	2,12	2,04	1,96
29	4,18	3,33	2,93	2,7	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22	2,18	2,1	2,03	1,94
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,09	2,01	1,93
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	2	1,92	1,84
60	4	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,1	2,04	1,99	1,92	1,84	1,75
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,17	2,09	2,02	1,96	1,91	1,83	1,75	1,66
infini	3,84	3	2,6	2,37	2,21	2,1	2,01	1,94	1,88	1,83	1,75	1,67	1,57

Annexe 7 : Protocole de synthèse du SBF

500 mL d'eau distillée ont été chauffé à 37°C [1] au bain marie. Cette température sera maintenue constante pendant le temps de la synthèse. L'addition des réactifs se fait suivant l'ordre suivant :

- NaCl	7,996 g
- NaHCO ₃	0,350 g
- KCl	0,224 g
- K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	0,228 g
- MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,305 g
- HCl 1N	15 mL
- CaCl ₂	0,278 g
- Na ₂ SO ₄	0,071g
- NH ₂ (CH ₂ OH) ₃	6,057 g

Le pH de la solution de SBF est amené à 7 [2-4] par ajout de HCl (de concentrations 45 mmol/L et 1mol/L) et de tris(hydroxyméthyl)aminométhane (de concentrations 50 mmol/L et 1mol/L). La solution est transférée dans une fiole jaugée et le volume est amené à 1L. Une quantité suffisante de solution a été synthétisée pour pouvoir réaliser l'ensemble des tests. La solution a été stockée dans des fioles jaugées de 1L, à une température comprise entre 5 et 10°C.

- [1] MENDEZ J.A., FERNANDEZ M., GONZALES-CORCHON A., SALVADO M., COLLIA F., DE PEDRO J.A., LEVENFELD B.L., LOPEZ-BRAVO A., VAZQUEZ B., SAN ROMAN J., **Injectable self curing bioactive acrylic-glass composites charged with specific anti-inflammatory/ analgenic agent**, *Biomaterials* (25), 2004, 2381
- [2] ZHU P., MASUDA Y., KOUMOTO K., **The effect of surface charge on hydroxyapatite nucleation**, *Biomaterial* (25), 2003, 3915
- [3] BARRERE F., VAN BLITTERSWIJK C.A., DE GROOT K., LAYROLLE P., **Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFx5 solution**, *Biomaterials* 23, (2002), 1921-1930
- [4] CHOU Y.F., CHIOU W.A., XU Y., DUNN J., WU B.M., **The effect of pH on the structural evolution of accelerated biomimetic apatite**, *Biomaterials* (25), 2004, 5323

Annexe 8 Pulvérisation cathodique [1]

La pulvérisation cathodique (sputtering) se produit lorsqu'une source d'ions ou d'atomes bombarde la surface d'une cible (la pulvérise). En retour, l'éjection de matériau de la cible bombardée (backspattering) se produit du côté du faisceau ionique incident. Les particules pulvérisées dans le milieu ambiant (vide, plasma) entrent en contact avec les surfaces environnantes (parois de la chambre, substrat) et s'y condensent.

La pression de la chambre est descendue sous vide secondaire, l'introduction d'un gaz inerte et l'augmentation de la ddp entre anode et cathode génèrent la création d'un plasma. La tension appelée tension luminescente est établie entre l'anode (où est posé le substrat) et la cathode (la cible). A cette tension, la concentration en ions et en électrons présents dans le gaz est importante ce qui provoque l'apparition d'une charge d'espace.

Les ions du plasma vont percuter la cible polarisée négativement. Les atomes de la cible vont pouvoir en être éjectés vers le plasma (étape de collision) si l'énergie des particules incidentes est supérieure au seuil de pulvérisation.

La plupart des particules pulvérisées sont éjectées sous forme neutre et se déposent sur le substrat placé à l'anode.

Le substrat placé sur l'anode subit un échauffement causé par l'impact des électrons secondaires.

[1] PERRIN A., **Cours de magistère matériaux 3^{ème} année**

Résumé

Dans le domaine de la chirurgie orthopédique ou maxillo-faciale, les praticiens sont confrontés à des pertes de substance osseuse qui nécessitent l'utilisation de matériaux de comblement (ou de substitution). L'utilisation de biomatériaux synthétiques (dont la disponibilité est très importante) permet de limiter les réponses immunitaires. Dans ce travail, nous nous intéressons à deux matériaux : les géopolymères et le carbonate de calcium synthétique sous forme d'aragonite pure.

Dans le domaine des biomatériaux de comblement, l'optimisation du compromis entre le pourcentage de porosité et les propriétés mécaniques (voisines de celles de l'os spongieux) favorise l'ostéointégration et la tenue des implants. Cette observation nous a conduit à étudier des aluminosilicates de la famille des géopolymères définis par le rapport molaire Si/Al = 21.

Les aluminosilicates synthétisés ont été associés à des phosphates de calcium : hydroxyapatite (HA), phosphate tri-calcique (TCP) et biphasique. Après traitement thermique à 500°C, les géopolymères présentent des valeurs de pH voisines de 7 ainsi qu'un bon compromis porosité/contrainte à la rupture (en compression). Pour le CaCO₃, notre laboratoire de recherches a mis au point la synthèse du carbonate de calcium sous forme d'aragonite pure. Ces matériaux ont fait l'objet d'études *in vitro* et *in vivo* afin d'évaluer leur potentiel pour une utilisation comme biomatériaux.

Les cinétiques de minéralisation des implants géopolymères et du biomatériau CaCO₃ ont été étudiées par PIXE (Proton Induced X-ray Emission) et par NAA (Neutron Activation Analysis). Les résultats obtenus pour le CaCO₃ par ces deux méthodes montrent un comportement *in vivo* similaire à celui d'un TCP utilisé comme référence (travail de recherches réalisée avec l'aide de l'ANVAR Bretagne).

Les premières études *in vivo* réalisées sur les géopolymères ont montré que ces derniers sont ostéointégrés. Dès le délai de un mois, les porosités externes des implants sont colonisées par de l'os néoformé. La cicatrisation en surface des matériaux est totale à 3 mois. Les analyses par PIXE des implants confirment la consolidation de l'interface dès le délai de un mois.

Mots clés : *Biomatériaux, Géopolymère (GPS), composites GPS - phosphates de calcium, synthèse, caractérisation structurale, porosité, contrainte à la rupture, plan d'expérience, bioactivité, Cytotoxicité, évaluation in vitro, évaluation in vivo, CaCO₃, PIXE, NAA,*

Summary

Synthetic biomaterials are used by surgeons to repair or augment parts of the skeleton. Their utilisation reduce immune response. They can be obtained in high quantities.

Those researches deal with geopolymers (Si/Al = 21). These aluminosilicates were synthesized and associated with calcium phosphates. After heating at 500°C, pH values of geopolymers are near 7 units and samples present a good compromise between porosity and compressive strength. These materials have been studied *in vitro* and *in vivo* to evaluate their potential use as biomaterials.

The mineralization kinetics of previous geopolymers and CaCO₃ have been studied. The obtained results for synthetic CaCO₃ by PIXE and NAA methods show a behaviour similar to implanted TCP. The *in vivo* studies of geopolymers show the osteointegration of the implants. The PIXE analysis of samples confirm the consolidation of the interface from 1 month.

Key words : *Biomaterials, Geopolymer (GPS), GPS – calcium phosphates composites, synthesis, structural characterisation, porosity, compressive strength, experimental design, bioactivity, cytotoxicity, in vitro evaluation, in vivo evaluation CaCO₃, PIXE, NAA, kinetics of mineralization*