



HAL
open science

Caractérisation par micro-faisceau d'ions des réactions physico-chimiques induites in vitro par des verres bioactifs nanostructurés élaborés par la méthode sol-gel

Jonathan Lao

► To cite this version:

Jonathan Lao. Caractérisation par micro-faisceau d'ions des réactions physico-chimiques induites in vitro par des verres bioactifs nanostructurés élaborés par la méthode sol-gel. Biophysique [physics.bioph]. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2007. Français. NNT: . tel-00178257

HAL Id: tel-00178257

<https://theses.hal.science/tel-00178257v1>

Submitted on 10 Oct 2007

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.

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

THÈSE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
(SPECIALITÉ : PHYSIQUE NUCLÉAIRE APPLIQUÉE)

par

Jonathan LAO

Maître ès-Sciences, Diplômé d'Études Approfondies

**Caractérisation par micro-faisceau d'ions des
réactions physico-chimiques induites *in vitro*
par des verres bioactifs nanostructurés
élaborés par la méthode sol-gel**

Thèse soutenue publiquement le 17 juillet 2007, devant la commission d'examen :

Président :	M.	A.	BALDIT	
Examineurs :	M.	E.	JALLOT	Directeur de thèse
	M.	P.	LAQUERRIERE	
	M.	J.M.	NEDELEC	Co-directeur de thèse
	M.	R.	ORTEGA	Rapporteur
	M.	C.	REY	Rapporteur

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Monsieur Alain Baldit, Directeur du Laboratoire de Physique Corpusculaire de Clermont-Ferrand, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et m'avoir fait l'honneur de présider le jury de thèse.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Édouard Jallot, Professeur à l'Université Blaise Pascal et en charge de l'équipe de Physique Nucléaire Appliquée aux Biomatériaux, qui a dirigé mes travaux avec une immense conscience professionnelle. J'ai bénéficié durant ces trois années de ses compétences et de son goût pour la recherche, qu'il a toujours su me communiquer sans jamais se départir de ses qualités humaines, toutes aussi importantes. J'exprime ma gratitude à Jean-Marie Nedelec, Maître de Conférences à l'Université Blaise Pascal, qui a co-encadré mes travaux avec zèle et dévouement. Mon travail a pleinement profité de toute son expertise, qu'il a distillée avec cordialité. Que mes deux directeurs de thèse sachent donc qu'ils reçoivent, outre ma gratitude, toute mon estime et ma considération !

Je tiens à remercier pour leur accueil les autres membres de l'équipe de Physique Nucléaire Appliquée aux Biomatériaux : Emmanuelle Chassot-Feschet, Maître de Conférences, et Jean-Léon Irigaray, Professeur émérite. Je remercie également Stéphanie Veysseire qui aura été d'une aide plus que précieuse en ultramicrotomie. Je félicite Laurence Courtheoux, qui a été post-doctorante durant un an dans l'équipe, pour son poste de Maître de Conférences récemment obtenu à l'Université de Montpellier, et la remercie pour ses conseils, son aide, son altruisme. Je lui souhaite beaucoup de réussite dans ses nouvelles fonctions.

Je suis honoré que Monsieur Richard Ortega, Chargé de Recherches au Laboratoire de Chimie Nucléaire Analytique et Bio-environnementale du CENBG, ait pris part à la révision de ce manuscrit en qualité de rapporteur. Je le remercie pour l'ensemble de ses conseils et pour sa participation au jury de thèse.

Je suis reconnaissant envers Monsieur Christian Rey, Professeur à l'ENSIACET de Toulouse, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail et de participer au jury de thèse. Je lui suis gré de la pertinence de ses remarques et de la qualité de ses commentaires, qui continuent d'alimenter ma réflexion.

Que Monsieur Patrice Laquerriere, Chargé de Recherches au sein de l'unité INSERM Interfaces biomatériaux/tissus hôtes de Reims, reçoive le témoignage de ma reconnaissance pour sa participation au jury de thèse et pour ses commentaires avisés sur l'ensemble de mon travail.

Je tiens à remercier Monsieur Philippe Moretto, Professeur à l'Université de Bordeaux et responsable scientifique de la plate-forme AIFIRA du CENBG, pour son accueil, sa grande disponibilité et pour l'intérêt qu'il a manifesté pour nos travaux. Je lui suis particulièrement reconnaissant de nous avoir fait bénéficier de son savoir-faire exceptionnel dans les techniques d'analyse par faisceau d'ions. Je remercie également l'ensemble du personnel de la plate-forme AIFIRA pour leur accueil.

Une partie de mes travaux a également été effectuée dans les locaux du Laboratoire des Matériaux Inorganiques : j'en remercie l'ensemble du personnel.

J'exprime mes remerciements à Mhammed Benbakkar, du Laboratoire des Magmas et Volcans de Clermont-Ferrand, pour les analyses en ICP-AES. Merci également à Anne-Marie Gelinaud, de CASIMIR, pour les analyses en microscopie électronique.

Que nos collègues biologistes, Jean-Michel Sautier et Juliane Isaac, du Laboratoire de Biologie Orofaciale et Pathologie de Paris, soient aussi remerciés pour le travail conséquent qu'ils réalisent dans le cadre de notre collaboration.

Je tiens à remercier le personnel du Laboratoire de Physique corpusculaire, en particulier l'ensemble des personnels administratifs et informatiques, pour leur disponibilité et leur sympathie.

Enfin, je témoigne toute ma reconnaissance à ma famille, à ceux qui me sont chers, ma mère, mon père, mon frère. J'accorde toute l'ardeur de mon affection à Clotilde et à notre fils Théotime ; je vous dois les milles lueurs qui constellent mon âme de songes dorés.

Table des matières

Introduction	5
Partie I Les biomatériaux.....	11
Chapitre 1 Considérations générales.....	13
1.1 Définitions	13
1.1.1 Les matériaux à vocation de biomatériaux	13
1.1.2 La biocompatibilité	13
1.2 Les biomatériaux en tant que substituts osseux	14
1.2.1 Enjeux économiques et de société	14
1.2.2 Description du tissu osseux.....	14
1.2.3 De la biocompatibilité à la bioactivité	15
1.2.4 Directions de recherche.....	16
Chapitre 2 Les verres bioactifs.....	17
2.1 Présentation	17
2.1.1 Historique, développement et propriétés.....	17
2.1.2 Le processus de bioactivité.....	19
2.2 Les verres élaborés par sol-gel	20
2.3 Description des matériaux élaborés	21
2.3.1 Les verres binaires et ternaires	21
2.3.2 Les verres dopés en strontium	22
Partie II Matériels et méthodes expérimentales.....	25
Chapitre 3 Élaboration des verres bioactifs et essais <i>in vitro</i>.....	27
3.1 Synthèse des verres bioactifs par le procédé sol-gel	27
3.1.1 Principe.....	27
3.1.2 Aspects physico-chimiques de la polymérisation sol-gel.....	28
3.1.3 Protocole de synthèse.....	30
3.2 Étude <i>in vitro</i> de la bioactivité.....	31
3.2.1 Choix du milieu biologique	31
3.2.2 Protocole expérimental.....	31
Chapitre 4 Méthodes d'analyses physiques et résultats préliminaires... 	33
4.1 Spectrométrie d'émission atomique ICP-AES	33

4.1.1	Principe.....	33
4.1.2	Préparation des échantillons	34
4.1.3	Composition des verres	34
4.2	Mesures de surface spécifique et de porosité par adsorption de gaz	35
4.2.1	Principe.....	35
4.2.2	Résultats.....	39
4.3	Microscopie électronique à balayage.....	41
4.3.1	Principe.....	41
4.3.2	État de surface des verres bioactifs avant les essais <i>in vitro</i>	43

Partie III Caractérisation par microfaisceau d'ions47

Chapitre 5 La microsonde PIXE-RBS.....49

5.1	Les faisceaux d'ions pour l'analyse chimique élémentaire	49
5.1.1	Différentes techniques de caractérisation.....	49
5.1.2	Pénétration des ions dans la matière	50
5.2	Émission X induite par particules chargées : PIXE.....	52
5.2.1	Présentation de la méthode	52
5.2.2	Principe physique : la fluorescence X.....	52
5.2.3	Rendement de fluorescence	54
5.2.4	Sections efficaces.....	56
5.2.5	Bruit et interférences spectrales	58
5.2.6	Analyse quantitative.....	61
5.2.7	Comparaison de la méthode PIXE avec d'autres techniques de fluorescence X..	65
5.3	Spectrométrie de rétrodiffusion de Rutherford : RBS.....	67
5.3.1	Principe.....	67
5.3.2	Section efficace de diffusion élastique	69
5.3.3	Analyse des données.....	70
5.4	Validation des résultats	72
5.4.1	Analyse d'échantillons de référence.....	72
5.4.2	Comportement des échantillons sous irradiation	73

Chapitre 6 Dispositif expérimental : le CENBG75

6.1	La ligne microfaisceau.....	75
6.2	La chambre d'analyse et de détection	77
6.2.1	Description.....	77
6.2.2	Détection du rayonnement X.....	78

Partie IV Caractérisation des réactions physico-chimiques lors des interactions entre verres bioactifs nanostructurés et milieu biologique81

Chapitre 7 Étude du processus de bioactivité pour les pastilles de verres binaires et ternaires : $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$83

7.1 Imagerie chimique multiélémentaire à la périphérie des pastilles de verre après immersion dans le milieu biologique.....	83
7.2 Mesures locales des concentrations élémentaires lors des interactions pastilles de verre/milieu biologique.....	89
7.2.1 Évolution des concentrations à la périphérie des pastilles de verre	89
7.2.2 Évolution des concentrations dans la région intérieure des pastilles de verre	93
7.2.3 Évolution des rapports atomiques à l'interface pastilles de verre/milieu biologique .	94
7.3 Évolution de la composition du milieu biologique lors des interactions avec les pastilles de verre	96
7.4 Résumé des observations expérimentales pour les pastilles de verres $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$	99

Chapitre 8 Étude du processus de bioactivité pour les pastilles de verres dopés en strontium : $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$101

8.1 Imagerie chimique multiélémentaire à la périphérie des pastilles de verres dopés en strontium après immersion dans le milieu biologique	101
8.2 Mesures locales des concentrations élémentaires lors des interactions pastilles de verre/milieu biologique.....	106
8.2.1 Évolution des concentrations à la périphérie des pastilles de verres dopés en strontium.....	106
8.2.2 Évolution des concentrations dans la région intérieure des pastilles de verres dopés en strontium	112
8.2.3 Évolution des rapports atomiques à l'interface pastilles de verre/milieu biologique...	114
8.3 Évolution de la composition du milieu biologique lors des interactions avec les pastilles de verres dopés en strontium	117
8.4 Résumé des observations expérimentales pour les pastilles de verres dopés en strontium.....	123

Chapitre 9 Étude du processus de bioactivité pour les grains de verres binaires $\text{SiO}_2\text{-CaO}$, ternaires $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, et les grains de verres dopés avec 5 % de strontium.....125

9.1 Imagerie chimique multiélémentaire à la périphérie des grains de verre après immersion dans le milieu biologique.....	125
9.2 Mesures locales des concentrations élémentaires lors des interactions grains de verre/milieu biologique.....	133
9.2.1 Évolution des concentrations à la périphérie des grains de verre.....	133
9.2.2 Évolution des concentrations dans le cœur des grains de verre	136
9.2.3 Évolution des rapports atomiques à l'interface grains de verre/milieu biologique...	137
9.3 Évolution de la composition du milieu biologique lors des interactions avec les grains de verre.....	140

9.4 Résumé des observations expérimentales pour les grains de verres binaires, ternaires et dopés avec 5 % de strontium	143
---	-----

Partie V Discussion sur les réactions physico-chimiques lors des interactions entre verres bioactifs nanostructurés et milieu biologique145

Chapitre 10 Critères d'évaluation de la bioactivité *in vitro*147

10.1 Évolution de l'état de saturation du milieu biologique	147
10.2 Cinétique d'évolution de la couche phosphocalcique à l'interface verre bioactif/milieu biologique	151

Chapitre 11 Bilan des interactions verres bioactifs/milieu biologique...157

11.1 Réactions physico-chimiques à l'interface verre bioactif/milieu biologique.....	157
11.2 Le verre binaire SiO ₂ -CaO.....	159
11.3 Influence du phosphore sur le processus de bioactivité : les verres ternaires SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅	161
11.4 Influence du dopage en strontium sur le processus de bioactivité : les verres SiO ₂ -CaO-SrO et SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅ -SrO	162
11.5 Autres facteurs influençant la bioactivité	164
11.5.1 Taille et texture des particules	164
11.5.2 Le milieu biologique	164

Partie VI Conclusion générale.....167

Bibliographie173

Introduction

Les biomatériaux représentent une des grandes avancées thérapeutiques de ces quarante dernières années. Définis comme des matériaux travaillant sous contrainte biologique, voués au remplacement d'une fonction ou d'un organe, ils sont présents dans de très nombreuses stratégies curatives. On estime ainsi à environ 3,2 millions le nombre de personnes qui, en France, sont porteuses de biomatériaux. Ces derniers soulèvent des problèmes d'ordre scientifique mais aussi économique, éthique, réglementaire et industriel qui astreignent à l'observance d'exigences de sécurité, fiabilité et reproductibilité. La responsabilité est immense puisque si un traitement médicamenteux peut être interrompu à tout moment, un biomatériau une fois implanté ne pourra être retiré que lors d'une nouvelle intervention chirurgicale. Des progrès considérables ont été réalisés dans le domaine à mesure que de nouveaux concepts ont émergé. S'il paraissait autrefois invraisemblable qu'un dispositif implanté en milieu vivant ne soit pas à terme rejeté par l'organisme, les biomatériaux de nouvelle génération tels que les verres bioactifs sont capables de se lier harmonieusement aux tissus vivants en participant activement au processus curatif, voire même en stimulant directement la réponse de l'organisme.

Appartenant à la famille des biomatériaux céramiques, les verres bioactifs présentent des propriétés particulièrement intéressantes pour le comblement de défauts osseux et le revêtement prothétique en chirurgies orthopédique, maxillo-faciale et dentaire. Placés au contact de tissus vivants, les verres bioactifs engendrent en effet une série de réactions physico-chimiques à l'interface matériau/tissus osseux qui conduisent à la formation d'une couche de phosphate de calcium. Cette couche se développe par la suite en un minéral analogue à celui contenu dans les os. Outre sa similitude avec la phase minérale de l'os, l'intérêt de cette couche est qu'elle peut servir de site de minéralisation pour les cellules osseuses et permettre au final un lien intime entre le verre bioactif et les tissus hôtes. C'est cette liaison qui caractérise la bioactivité d'un matériau. Le processus de bioactivité résulte d'une interdépendance complexe de paramètres liés à la composition et à la texture du verre ; accéder à une meilleure compréhension des phénomènes physico-chimiques mis en œuvre nécessite de disposer d'informations quantitatives sur le processus. Mais pour l'heure, celles-ci sont encore peu nombreuses.

C'est sur ces considérations que s'est fondée notre décision d'élaborer et de caractériser des verres bioactifs dans le cadre d'un projet de recherche pluridisciplinaire : le projet « BIOVERRES » financé par le programme National en Nanosciences et Nanotechnologies PNANO 2005 de l'ANR, n° ANR-05-NANO-040, qui s'étend sur trois ans de 2006 à 2009. L'équipe de Physique Nucléaire Appliquée aux Biomatériaux du Laboratoire de Physique Corpusculaire de Clermont-Ferrand (CNRS/IN2P3 UMR 6533), forte d'une expérience de plus de quinze ans dans la caractérisation de biomatériaux à l'aide de méthodes de grande performance issues de la physique nucléaire, s'est associée à l'équipe TransChiMiC du Laboratoire des Matériaux Inorganiques de Clermont-Ferrand (CNRS UMR 6002) pour mettre au point des verres bioactifs nanostructurés. Les cinétiques et les amplitudes des processus physico-chimiques peuvent être modulées par la maîtrise des caractéristiques texturales ainsi que la présence et la concentration de certains éléments. Enfin, dans ce projet, l'étude du comportement des cellules osseuses au contact des différents verres est réalisée par une équipe de

biologistes du Laboratoire de Biologie Orofaciale et Pathologie de Paris VII (INSERM UMRS 872).

Nos objectifs ont porté dans un premier temps sur la synthèse de verres bioactifs nanostructurés à base d'oxydes de silicium, calcium, phosphore et strontium ; la méthode d'élaboration qui a été choisie est le procédé sol-gel, procédé de chimie douce qui rend possible l'élaboration d'un verre à des températures modérées. Le contrôle des paramètres de synthèse et de traitement thermique permet de moduler la texture du matériau à l'échelle du nanomètre. En outre, le procédé sol-gel garantit l'obtention de produits d'excellente pureté, dans des systèmes de composition aisément ajustable et paramétrable.

Dans un second temps, nous nous sommes attachés à étudier l'influence des éléments phosphore et strontium sur les processus *in vitro* de dissolution, de formation et de développement de la couche phosphocalcique engendrés par le matériau lorsqu'il est placé au contact d'un milieu biologique. La réalisation de cet objectif a exigé : 1) l'analyse locale de la distribution des éléments chimiques à l'interface matériau/milieu biologique, 2) l'utilisation de méthodes de caractérisation d'excellente sensibilité et de résolution spatiale adaptée afin d'acquérir des informations quantitatives fiables. Sur ces considérations, des cartographies de l'interface verre bioactif/milieu biologique ont été réalisées au moyen de méthodes d'analyse par faisceaux d'ions : l'émission X induite par particules chargées (PIXE) couplée à la spectrométrie de rétrodiffusion de Rutherford (RBS). La microsonde nucléaire PIXE-RBS possède en effet une sensibilité de l'ordre du ppm qui l'indique tout particulièrement pour l'étude des éléments traces (notamment le magnésium et le strontium) impliqués dans le processus de bioactivité. De plus, elle permet l'obtention de cartographies chimiques de l'interface verre bioactif/milieu biologique à l'échelle micrométrique, rendant possible l'analyse des gradients de concentrations à l'interface. Ces travaux de caractérisation par faisceau d'ions ont été menés dans le cadre d'une collaboration avec le Centre d'Études Nucléaires de Bordeaux-Gradignan (CNRS/IN2P3 UMR 5797).

Ce document est scindé en six parties.

La première partie traite de considérations générales sur les biomatériaux et s'attarde en particulier sur les verres bioactifs et la description qualitative du processus de bioactivité. Les raisons qui ont motivé l'élaboration de verres dans les systèmes $\text{SiO}_2\text{-CaO}$, $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ y sont exposées.

La deuxième partie s'attache à décrire les méthodes expérimentales utilisées pour l'élaboration des verres et la caractérisation de leur composition et de leurs propriétés texturales. La synthèse des matériaux par le procédé sol-gel, les protocoles expérimentaux concernant les essais *in vitro* et la préparation des échantillons, la mise en œuvre et les résultats expérimentaux obtenus par les méthodes de spectrométrie d'émission atomique par source plasma à couplage inductif (ICP-AES), de mesure de surface spécifique et de microscopie électronique constituent le cœur de cette section.

La troisième partie est vouée à une description complète de la microsonde nucléaire PIXE-RBS. Y sont passés en revue le principe de la caractérisation par faisceau d'ions, les avantages liés à l'utilisation des microsondes nucléaires dans le cadre de notre étude, les calculs pour le traitement quantitatif des données et la description du dispositif expérimental du CENBG.

La quatrième partie présente les cartographies chimiques de l'interface verre bioactif/milieu biologique obtenues en PIXE. Des mesures locales de concentrations élémentaires

ont été réalisées. Le suivi de l'interface en fonction du temps d'interaction entre verre bioactif et milieu biologique dispense des informations précieuses sur la réactivité des matériaux et sur l'ampleur et la cinétique des réactions physico-chimiques à la surface des verres. Enfin, des informations complémentaires concernant les échanges ioniques sont obtenues par l'analyse de la composition du milieu biologique, réalisée en ICP-AES.

La cinquième partie s'efforce de dégager des arguments permettant la comparaison entre les divers verres bioactifs élaborés. L'évolution de l'état de saturation du milieu biologique et les cinétiques d'évolution de la couche phosphocalcique à l'interface verre/milieu biologique permettent d'évaluer et de confronter la bioactivité des différents matériaux. Un bilan des interactions entre verres bioactifs et milieu biologique, soulignant l'influence du phosphore d'une part et du strontium d'autre part sur le processus de bioactivité, conclue cette partie.

La sixième partie clôt ce manuscrit en faisant le point sur les travaux réalisés et en dégageant les perspectives de développement et de recherche.

Partie I

Les biomatériaux

Chapitre 1

Considérations générales

L'utilisation de matériaux non vivants au contact de l'organisme est souvent nécessaire pour la réparation de lésions tissulaires, la préservation de l'intégrité corporelle et pour pallier les déficiences fonctionnelles. Déjà utilisés dans l'Antiquité, ces procédés ont amené à définir récemment le concept de biomatériau.

1.1 Définitions

1.1.1 Les matériaux à vocation de biomatériaux

Lors de la conférence de Chester (UK) en 1986, la Société Européenne des Biomateriaux a défini un biomatériau comme « un matériau utilisé dans un dispositif médical et conçu pour interagir avec les systèmes biologiques » [1]. Mais au delà de toute définition formelle, la notion de biomatériau réside dans la nécessaire prise en compte du contact de ces matériaux avec des fluides ou des tissus vivants. Le domaine des biomatériaux est donc très vaste et regroupe des milliers de produits, d'origine naturelle ou synthétiques, ayant en commun l'absence d'effet délétère pour l'organisme. Les biomatériaux peuvent être classés en quatre groupes :

- Les métaux et alliages métalliques
- Les céramiques
- Les polymères et matières molles
- Les matériaux d'origine naturelle

Le champ d'application des biomatériaux est extrêmement étendu. Citons de façon non exhaustive des exemples d'utilisation en ophtalmologie (lentilles de contact), chirurgie cardiovasculaire (valves cardiaques, cœur artificiel, colles tissulaires) ainsi qu'en chirurgies dentaire, maxillo-faciale et orthopédique (prothèses, comblement osseux, reconstruction maxillo-faciale).

1.1.2 La biocompatibilité

Après introduction dans l'organisme, un biomatériau, qui reste malgré tout un corps étranger, entraîne une réaction inflammatoire plus ou moins importante des tissus environnants. Celle-ci est composée de différentes phases, dont la phase d'infiltration cellulaire puis la phase de réparation sont l'aboutissement. Selon la nature du matériau et l'état de sa surface de contact avec l'organisme, la phase de réparation peut se faire de trois manières différentes, que l'on peut énumérer par ordre de satisfaction croissant : 1) un rejet spontané du matériau

par l'organisme dans des délais variables, 2) une encapsulation fibreuse et une tolérance de l'organisme vis-à-vis de l'implant et 3) une intégration harmonieuse du matériau et une colonisation par les tissus vivants.

C'est pourquoi la notion de biocompatibilité est essentielle ; elle a été définie comme étant « la capacité d'un matériau à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique ». Être biocompatible signifie d'une part que le matériau n'est pas à l'origine de phénomènes locaux néfastes pour la santé du receveur, et d'autre part que le matériau ne risque pas d'engendrer des produits de dégradation toxiques ni de voir ses qualités intrinsèques altérées par les tissus ou les fluides du receveur. Dans la mesure où la relation entre matériau et tissus doit être maintenue le plus longtemps possible, ces exigences doivent être satisfaites au mieux [2]. La grande diversité des comportements observés suite à l'implantation d'un biomatériau en milieu vivant oblige cependant à distinguer différents degrés dans la biocompatibilité ; ceux-ci seront passés en revue au paragraphe 1.2.3.

1.2 Les biomatériaux en tant que substituts osseux

1.2.1 Enjeux économiques et de société

Les troubles musculo-squelettiques, qui sont de loin les pathologies professionnelles les plus répandues dans les pays industrialisés (62 % de l'ensemble des maladies professionnelles recensées en France), ainsi que les maladies ostéo-articulaires et les carences osseuses affectent un nombre croissant d'individus. À titre d'illustration, plus de 750 000 français sont porteurs d'une prothèse de hanche ou de genou, dont la durée de vie moyenne est de 15 ans. À cet enjeu social considérable s'ajoute les perspectives d'un marché économique très important : en France, 10 milliards d'euros de frais de santé ont été dépensés en 2002 pour les maladies du système ostéo-articulaire, des muscles et du tissu conjonctif et 8 milliards d'euros pour les maladies des dents et de la bouche [3].

On estime qu'en 2020, 21 % de la population française sera âgée de 65 ans et plus. Ce phénomène de vieillissement des populations, auquel s'ajoute nécessairement le besoin de mettre au point des implants ayant une durée de vie accrue, explique la demande croissante en biomatériaux capables de combler les pertes osseuses et de suppléer les fonctions lésées par un handicap.

1.2.2 Description du tissu osseux

L'os est un tissu complexe qui possède trois fonctions principales : 1) la formation du squelette et le maintien de son intégrité, 2) être une réserve de calcium et de phosphore qui sont nécessaires à un grand nombre de fonctions métaboliques et 3) servir de contenant à la moelle osseuse. L'os adulte est principalement de deux types : l'os cortical compact, représentant 80 % de la masse osseuse et situé essentiellement dans les os longs, et l'os spongieux ou trabéculaire, qui représente 20 % de la masse osseuse et est situé dans les extrémités supérieures des os longs et constitue la structure principale des os plats et des os courts [4, 5].

Le tissu osseux est une matrice hautement spécialisée composée d'une trame organominérale et de cellules osseuses. La partie organique de la matrice extracellulaire est constituée à 90 % d'une protéine fibreuse : le collagène. La partie minérale de la matrice, qui constitue plus des deux tiers d'un os cortical compact, est un phosphate de calcium dont la composition dérive de l'hydroxyapatite stoechiométrique de formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. La différence est que le minéral osseux s'apparente plus à une hydroxyapatite carbonatée mal cristallisée, au

sein de laquelle les groupements phosphates peuvent être substitués par des espèces bivalentes telles que les carbonates CO_3^{2-} et hydrogénophosphates HPO_4^{2-} , substitutions qui sont compensées par la formation de lacunes ioniques assurant la neutralité électrique [6, 7]. Ainsi le grand nombre de vacances présentes augmente la solubilité du minéral ; la dissolution des hydroxyapatites carbonatées s'en trouve alors facilitée, propriété très utile puisqu'elle autorise au final le renouvellement des os à travers le cycle de remodelage osseux. La formule générale du minéral osseux ainsi décrit est :



Cette structure accepte ainsi un grand nombre de substituants : des éléments tels que Na^+ , Mg^{2+} , K^+ et Sr^{2+} sont couramment présents, sous forme de traces, en se substituant à Ca^{2+} . D'autres éléments tels que F^- et Cl^- peuvent se substituer aux hydroxydes OH^- . Enfin, des molécules d'eau peut également être présente [8, 9, 10, 11, 12].

L'une des propriétés les plus importantes de l'os est sa porosité interconnectée. Elle permet une bonne vascularisation des tissus et donc la circulation des fluides biologiques et des cellules. Celle-ci est indispensable au renouvellement des tissus via le remodelage osseux, qui est assuré par l'activité incessante des ostéoclastes, cellules responsables de la résorption de l'os ancien, et des ostéoblastes, responsables de la formation d'os nouveau. Les biomatériaux à vocation de substituts osseux doivent dès lors veiller à assurer une vascularisation suffisante.

1.2.3 De la biocompatibilité à la bioactivité

Un matériau biocompatible peut se contenter d'être inerte. Dans ce cas, s'il s'établit un lien entre le biomatériau et les tissus, il s'agit seulement d'une encapsulation fibreuse non adhérente : on parle de fixation morphologique. Pendant très longtemps, ce principe d'« inertie biologique » a présidé à la conception des biomatériaux : on pensait qu'il était requis de réduire au maximum la réponse engendrée par l'introduction d'un corps étranger dans l'organisme. Mais les progrès récents dans le domaine, et par lesquels on a souhaité que le matériau implanté interagisse positivement avec les tissus hôtes, ont débouché sur de nouveaux concepts, cherchant à mettre à profit la réplique du système immunitaire.

Les biomatériaux de dernière génération peuvent ainsi posséder des propriétés de bio-résorption, d'ostéoconduction, d'ostéoinduction ou encore de bioactivité. Un matériau biorésorbable subit une dégradation de la part de l'organisme jusqu'à sa disparition complète. L'ostéoconduction est la propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire. Le lien entre biomatériau et tissus receveurs est alors garanti par la croissance des tissus au sein de l'implant poreux : l'attache résultante est appelée fixation biologique, car elle est uniquement due à l'activité du milieu biologique mettant à profit la porosité de l'implant. Les céramiques phosphocalciques poreuses telles que le phosphate tricalcique ou l'hydroxyapatite synthétique sont des exemples de biomatériaux ostéoconducteurs [13, 14, 15]. L'ostéoinduction correspond à la capacité d'induire une différenciation cellulaire en vue de synthétiser une matrice osseuse minéralisable. Les nouveaux matériaux polymères et céramiques, dans lesquels sont incorporés des protéines spécifiques, en sont l'illustration [16].

À ces propriétés peut s'ajouter la bioactivité. Il s'agit de la capacité active d'un matériau à nouer un lien intime fort à l'interface implant/tissus receveurs. Tout l'intérêt d'un implant bioactif réside en la création d'une attache à l'interface implant/tissus hôtes, appelée fixation bioactive, assurée par un ensemble de réactions physico-chimiques propres au maté-

riau [17]. Ces réactions engendrent la formation d'une couche phosphocalcique proche de la phase minérale de l'os. La liaison avec les tissus vivants est ensuite assurée par l'incorporation de protéines, l'adhésion cellulaire et la minéralisation de l'ensemble. Cet ancrage diffère d'une simple fixation biologique dans le sens où les caractéristiques de réactivité du matériau autant que celles du milieu biologique sont véritablement l'amorce de la fixation bioactive. La jonction résultante est de caractère beaucoup plus fort et permet une intégration harmonieuse du matériau.

Selon qu'un biomatériau possède une ou plusieurs des propriétés décrites ci-dessus, de très fortes différences sont constatées dans le comportement et la réactivité du matériau vis-à-vis de son environnement. Ces constatations ont amené à définir deux classes de bioactivité [18]. La bioactivité de classe A concerne ainsi les matériaux bioactifs présentant des propriétés d'ostéoconduction et d'ostéoinduction. Les réactions ayant lieu en surface de ces matériaux génèrent des produits de dissolution capable d'induire une réponse intracellulaire et extracellulaire [19]. La classe B fait référence aux matériaux bioactifs uniquement ostéoconducteurs ; les réactions de surface sont de moindre amplitude, les produits issus de la dissolution sont minimes et la réponse induite à l'interface entre le matériau et son environnement est exclusivement extracellulaire [20].

1.2.4 Directions de recherche

Concernant les biomatériaux liés à la chirurgie orthopédique, dentaire et maxillo-faciale, trois grands domaines de recherches, complémentaires, sont à distinguer.

Les études de l'interface biomatériau/tissu receveur concernent, pour celles qui sont menées *in vitro*, des domaines tels que la biocompatibilité et les échanges ioniques à l'interface matériau/cellule, les modifications de l'état de surface du matériau, l'intégration et le comportement des cellules osseuses dans le matériau. Les études *in vivo* ont trait à la caractérisation de la biointégration des matériaux à l'os, des caractéristiques viscoélastiques du tissu au contact des matériaux, ou encore à l'étude de la membrane fibreuse qui se crée autour des matériaux.

La biomécanique cellulaire s'intéresse aux réactions des cellules sous contrainte de cisaillement, à la modélisation des réactions et à la biologie de l'inflammation en présence de biomatériaux.

Le développement de nouveaux matériaux, vise à pallier aux différents problèmes de stabilité vis à vis des tissus environnants, de disparités mécaniques, de production de débris d'usure, et de maintien d'une bonne vascularisation.

Notre équipe de recherche s'est intéressée à la mise au point de verres poreux bioactifs et plus particulièrement à la caractérisation de l'interface matériau/fluides biologiques. Ces travaux sont réalisés dans le cadre du projet « BIOVERRES » financé par le programme National en Nanosciences et Nanotechnologies PNANO 2005 de l'ANR, n° ANR-05-NANO-040, qui s'étend sur trois ans de 2006 à 2009.

Chapitre 2

Les verres bioactifs

Appartenant à la famille des biomatériaux céramiques, les verres bioactifs se signalent par leur grande réactivité en milieu biologique, qui les indique tout particulièrement pour des utilisations en tant que substituts osseux ou revêtements prothétiques en chirurgie orthopédique, maxillo-faciale et dentaire.

2.1 Présentation

2.1.1 Historique, développement et propriétés

Les verres bioactifs ont d'ores et déjà prouvé leur performance dans le comblement de pertes osseuses : d'une part grâce à la création d'un lien chimique fort avec les tissus hôtes, et d'autre part car ils n'engendrent pas la formation de capsules fibreuses, facilitant alors la liaison directe entre implant et tissus receveurs. La découverte du premier verre bioactif eut lieu en 1969, lorsque Larry Hench mit au point le Bioglass 45S5[®], un verre à base de SiO₂ (45 % en teneur massique), CaO (24,5 %), P₂O₅ (6 %) et Na₂O (24,5 %) [21, 22]. Capable de se lier spontanément aux tissus vivants après implantation, l'efficacité et la grande sûreté du matériau l'ont amené à être régulièrement utilisé dans de nombreuses opérations cliniques au cours des vingt dernières années. Le premier succès clinique du Bioglass 45S5[®] eut ainsi trait à la réparation des os de l'oreille interne ; les études ont montré à l'époque que les performances du dispositif surpassaient celles des prothèses métalliques et autres biocéramiques [23]. Des essais *in vitro* complémentaires firent la lumière sur la nature de la liaison à l'interface implant/tissus hôtes : celle-ci consiste en un entremêlement de cristaux d'hydroxyapatite, formés en surface du verre suite à un ensemble de réactions physico-chimiques (décrites plus amplement au paragraphe 2.1.2), et de fibres de collagène, synthétisées à l'interface par les ostéoblastes. La minéralisation de cette matrice par les ostéoblastes crée, en milieu vivant, une attache à caractère extrêmement fort entre l'implant et les tissus hôtes [24]. Depuis l'invention du Bioglass 45S5[®], nombre d'autres verres bioactifs et de vitrocéramiques (coexistence d'une matrice vitreuse et d'une phase cristalline) ont été mis au point : parmi ceux-ci, citons les produits commerciaux NovaBone[®] [25], Ceravital[®] [26], Cerabone[®] A/W [27, 28]. De nombreux exemples d'applications cliniques de ces matériaux ont été rapportés, particulièrement en chirurgies dentaire et maxillo-faciale [29]. Des études *in vivo* menées sur des animaux ont également démontré l'utilité des verres bioactifs pour le revêtement de prothèses métalliques à usage orthopédique [30, 31, 32].

La capacité d'un verre bioactif à se lier à l'os est inhérente à la réactivité chimique du verre placé au contact de fluides biologiques. Celle-ci résulte d'une interdépendance complexe de facteurs physico-chimiques tels que la texture, les concentrations ioniques à l'interface ma-

tériau/fluides biologiques, les cinétiques de réactions ou encore les limites de solubilité des ions constitutifs du matériau. Les premières études sur les verres bioactifs tendaient à montrer que la matrice vitreuse devait contenir une proportion élevée de phosphore et de calcium pour développer la couche de phosphate de calcium. Il a pourtant été démontré plus tard que ceci n'est pas un élément essentiel à la bioactivité ; les propriétés texturales du matériau, en particulier une importante porosité, peuvent pallier au manque de certains de ces éléments dans la composition de départ du verre. Néanmoins, en modulant la composition de la matrice vitreuse, il est évidemment possible de modifier ses propriétés et de les adapter au mieux à son application. Il est reconnu par exemple que l'ajout d'aluminium ou de bore ralentit la dissolution du verre par les fluides biologiques, ceci pouvant même aller jusqu'à l'inhibition de la bioactivité [33, 34, 35].

Pendant de nombreuses années, il a été considéré que la condition nécessaire et suffisante à la bioactivité *in vivo* d'un verre était la capacité à former une couche d'hydroxyapatite à sa surface. Bien qu'utile, des études récentes ont prouvé que cette étape du processus n'est pas la condition *sine qua non* pour que le matériau se lie à l'os ; le phénomène clé réside en réalité dans le contrôle du taux de relargage des espèces ioniques issues de la dissolution du matériau, tout particulièrement les espèces silicium et calcium [36]. En effet, la génération d'os nouveau nécessite la différenciation des cellules responsables de la formation osseuse. Or chez les personnes âgées, peu de cellules osseuses sont capables de se diviser et de former de l'os véritablement nouveau. Les cellules souches des ostéoblastes doivent recevoir de la part de leur environnement local le stimulus approprié qui leur intimera l'ordre d'initier le cycle de division cellulaire. Les biomatériaux inertes ainsi que les biomatériaux de classe B ne sont pas aptes à créer un environnement local favorable à l'émission de ce stimulus. Seuls les biomatériaux de classe A sont capables, grâce à leur propriété d'ostéoinduction, d'engendrer *in vivo* la production rapide d'os nouveau [37, 38]. En effet, s'ils sont évacués à une vitesse et en quantité convenables, les ions calcium et silicium issus de la dissolution du verre bioactif peuvent promouvoir la prolifération et la différenciation des ostéoblastes, responsables de la minéralisation de l'os. Cette promotion de la différenciation ostéoblastique serait suscitée par l'activation de certains gènes et facteurs de croissance impliqués dans la régulation du cycle de division cellulaire [39, 40]. Il en résulte que le lien *in vivo* entre implant et tissus receveurs est grandement amélioré.

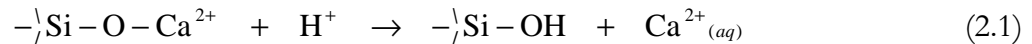
Ces découvertes ont initié le développement d'une nouvelle génération de biomatériaux, capables d'encourager la formation d'os nouveau à travers un contrôle génétique direct, avec en ligne de mire des utilisations prometteuses en ingénierie tissulaire et en régénération tissulaire *in situ*. Dans cette optique, le contrôle des cinétiques des réactions ayant lieu à l'interface implant/tissu receveur est un paramètre capital dans la maîtrise et l'optimisation de la bioactivité [41].

Terminons cet aperçu de l'histoire et du développement des verres bioactifs en signalant que des efforts sont fournis en vue d'inscrire les réactions ayant lieu à la surface des verres bioactifs dans un cadre théorique : à ce titre, les simulations quantiques sont prometteuses et pourraient permettre, grâce à leur caractère prédictif, de proposer de nouveaux matériaux. Des calculs en dynamique moléculaire permettent ainsi d'accéder à une meilleure compréhension du comportement bioactif, sans connaissances expérimentales *a priori* des systèmes étudiés [42, 43].

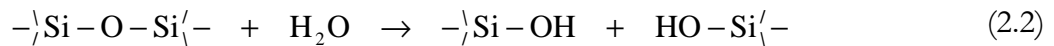
2.1.2 Le processus de bioactivité

Les propriétés singulières des verres bioactifs sont une conséquence des réactions physico-chimiques qui ont lieu en surface du matériau. À la différence d'un verre classique, un verre bioactif est instable d'un point de vue hydrolytique, c'est-à-dire qu'il se dissout au contact des fluides biologiques. Ceci tient à sa composition et notamment sa teneur en oxydes alcalins et alcalino-terreux. Un phénomène d'hydrolyse initie donc le processus bioactif. Puis les réactions ayant lieu en surface du matériau aboutissent à la formation d'une couche phosphocalcique en périphérie du verre, qui finit par précipiter en un phosphate de calcium proche de l'hydroxyapatite. Cette couche octroie des sites privilégiés pour l'adhésion cellulaire, la minéralisation osseuse garantissant *in fine* une fixation avec les tissus hôtes. Le processus de bioactivité a été décomposé en plusieurs étapes [44].

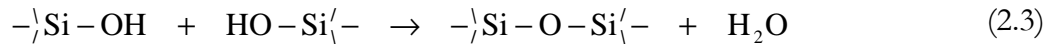
Première étape : les ions alcalins et alcalino-terreux (Na^+ , Ca^{2+} ...) présents en surface du verre sont échangés rapidement avec les ions H^+ ou H_3O^+ issus du fluide biologique, selon :



Deuxième étape : rupture des liaisons Si-O-Si du réseau vitreux par hydrolyse. Il s'ensuit un relargage de groupements solubles $\text{Si}(\text{OH})_4$ dans le milieu, tandis que des groupements silanols Si-OH se forment à la surface du verre :



Troisième étape : repolymérisation d'une couche riche en silice SiO_2 sur la surface du verre désormais appauvrie en cations alcalins et alcalino-terreux :



Quatrième étape : les ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} issus du matériau migrent à travers la couche riche en SiO_2 jusqu'à la surface du verre. À ceux-ci s'ajoutent les ions calcium et phosphates déjà présents dans le milieu biologique, le tout alimentant la formation et la croissance d'une couche riche en calcium et en phosphore en surface du matériau.

Cinquième étape : la couche amorphe de phosphate de calcium cristallise en incorporant des anions hydroxyles OH^- et carbonates CO_3^{2-} issus du milieu et se transforme en une couche mixte d'hydroxyapatite carbonatée analogue à celle présent dans l'os.

En milieu vivant, la couche d'hydroxyapatite nouvellement formée octroie un environnement idéal pour le développement de six autres étapes consistant en des réactions cellulaires. Ainsi s'opère tout d'abord l'adsorption et la désorption de protéines et de facteurs de croissance en surface de la couche d'hydroxyapatite, s'ensuit l'adhésion des ostéoblastes, puis la prolifération et la différenciation ostéoblastiques. Finalement, la fixation bioactive en milieu vivant est garantie par la minéralisation d'une matrice résultant de l'agglomération des cristaux d'apatites issus des processus de précipitation et de minéralisation cellulaire, qui se lient les uns aux autres à travers un entrelacs de fibres de collagène. Cette matrice minérale est le produit final du processus bioactif et est obtenue au bout de 6 à 12 jours d'essais *in vivo* et *in vitro* [45].

La littérature abonde en ce qui concerne la description qualitative du mécanisme de bioactivité [46, 47]. En revanche les informations quantitatives sur la physico-chimie du pro-

cessus bioactif et le rôle des éléments traces à l'interface verre/milieu biologique sont rares. Afin d'accéder à une meilleure compréhension de ce phénomène, nos recherches se sont attachées à quantifier les échanges ioniques ayant lieu entre le matériau et son environnement et à faire varier les propriétés physico-chimiques des verres.

2.2 Les verres élaborés par sol-gel

La méthode classique d'élaboration des verres est la fusion à haute température, dans laquelle un mélange d'oxydes est fondu à des températures comprises entre 800 °C et 1600 °C. Si l'on veut obtenir des verres bioactifs, cette méthode impose de strictes limitations quant à la composition du matériau en éléments silicium, calcium, sodium et phosphore. Ainsi, au début des années 90, Kokubo a montré que le verre binaire $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ présentait une bioactivité *in vitro* et *in vivo*, à condition que le pourcentage molaire de SiO_2 ne dépasse pas 65 % [48]. Cette restriction est imposée par le fait qu'à mesure que la teneur en SiO_2 augmente dans un verre élaboré par fusion, la probabilité de former des capsules fibreuses non adhérentes au contact des tissus vivants s'accroît ; on diminue alors l'approvisionnement en ions calcium et phosphates issus de la solution ainsi que la capacité à développer la couche de gel de silice en surface du verre. La formation de la couche de phosphate de calcium s'en trouve ralentie, voire même inhibée.

Pour s'affranchir de la plupart de ces limitations, il est avantageux d'opter pour le procédé sol-gel comme méthode de synthèse. C'est en 1991 que Li, Clark et Hench explorèrent une voie alternative à la méthode classique de fusion à haute température ; ils prouvèrent que des verres bioactifs stables pouvaient être synthétisés en faisant usage du procédé sol-gel [49]. Par ce moyen, la bioactivité est maintenue pour des verres de compositions très variées, et même pour des compositions voisines d'un gel de silice pur. Mais l'attrait principal du procédé sol-gel est qu'il permet d'accroître la bioactivité du matériau. Les travaux de Li, Clark et Hench ont démontré que, pour des verres de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, ceux élaborés par sol-gel étaient plus bioactifs que ceux élaborés de manière classique, au regard de la cinétique et du rendement de formation de la couche phosphocalcique.

L'amélioration de la bioactivité des matériaux synthétisés par sol-gel est due aux propriétés texturales uniques associée à cette voie de synthèse : à savoir, une porosité interconnectée, un volume poreux élevé et une taille de pores modulables de l'échelle micrométrique à nanométrique, assurant au matériau une plus grande surface de contact avec son environnement. La dissolution du matériau s'en trouve ainsi facilitée, assurant une hausse rapide de la concentration en ions calcium et phosphates dans le milieu environnant, ayant comme conséquence une amélioration sensible de la réactivité et du taux de formation de la couche apatitique grâce à une sursaturation du milieu biologique [50, 51]. À titre d'illustration, Pereira et ses collaborateurs ont précédemment démontré que la quantité de calcium relarguée en milieu aqueux par un verre synthétisé au moyen du procédé sol-gel était six fois supérieure à celle du verre homologue élaboré par voie de synthèse classique [52].

Avantageux, le procédé sol-gel l'est également dans la possibilité d'obtenir des produits dans une grande variété de mises en forme : poudre, monolithes, fibres, revêtement pour substrat cellulaire ou pour prothèse orthopédique sont autant de réalisations envisageables.

Enfin, ce processus chimique est mené à basse température (chimie douce), ce qui autorise un meilleur contrôle de la cinétique de la réaction, il est avantageux en terme de coût et

permet en outre d'obtenir des produits de grande pureté et de meilleure homogénéité. La chimie du procédé sera décrite plus en détail dans la partie II.

2.3 Description des matériaux élaborés

2.3.1 Les verres binaires et ternaires

Un intérêt majeur des verres est que toute propriété de ces matériaux peut être variée de manière continue par modification de la composition chimique. Un type de verre peut ainsi être infiniment soluble tandis qu'un autre, de composition différente, s'avèrera pratiquement inaltérable. Certains phénomènes ou propriétés observés découlent de la présence de motifs ou entités structurales particuliers dans le réseau vitreux. Ces entités peuvent s'y trouver en faible concentration.

Nos recherches ont porté sur l'étude de verres bioactifs de deux types : les verres binaires $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et les verres ternaires $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$. Les matériaux ont été élaborés par le procédé sol-gel. Le Tableau 2-1 indique les différentes compositions des verres étudiés.

	B 75	B 72,5	B 70	B 67,5
SiO_2	75	72,5	70	67,5
CaO	25	25	25	25
P_2O_5	0	2,5	5	7,5

Tableau 2-1: composition en oxyde des verres bioactifs binaires et ternaires (% massique).

La structure amorphe des verres de silice est communément décrite en se représentant un ensemble interconnecté de tétraèdres $[\text{SiO}_4]$, où chaque atome d'oxygène occupe le sommet d'un tétraèdre dont le centre correspond à un atome de silicium. Ces tétraèdres sont reliés les uns aux autres par leurs sommets, chaque atome d'oxygène joignant de la sorte deux tétraèdres. On dit alors que l'oxygène est pontant. Dans le cas de la silice cristallisée (c'est-à-dire du quartz), le réseau ainsi obtenu est uniforme, mais en ce qui concerne les verres amorphes, la structure est beaucoup plus ouverte (Figure 2-1). Il existe ainsi un ordre à courte distance (premiers voisins) mais un désordre à longue distance. Cette structure, plus aérée, facilite l'insertion de cations appartenant à la classe des modificateurs de réseau, tels que le calcium, le sodium ou le magnésium [53].

Dans les verres de type $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ ou $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, le silicium et le phosphore assument le rôle de formateur de réseau, participant à sa cohésion. L'introduction de cations modificateurs tels que le calcium engendre une dépolymérisation du réseau par la rupture de liaisons $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$, brisant par là même la cohésion de la structure vitreuse. Des entités $(-\text{Si}-\text{O}^-)\text{Ca}^{2+}(-\text{O}-\text{Si}-)$ sont alors créées, dans lesquelles l'oxygène n'établit plus la liaison entre tétraèdres voisins : c'est un oxygène non pontant. Le cation modificateur de réseau se loge ainsi dans une cavité du réseau au voisinage d'oxygènes non pontants.

Comme l'illustre la Figure 2-1, dans un verre binaire, certains atomes de silicium se joignent via des oxygènes pontants, tandis que d'autres sont liés à un calcium modificateur de réseau au moyen d'un oxygène non pontant. La structure des verres ternaires est analogue, à la différence que certains atomes de silicium sont substitués par le phosphore.

Par conséquent, la présence de calcium va se traduire par une augmentation du désordre de la structure. La cohésion du réseau étant moindre, il s'ensuit que les verres de type $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ seront hautement réactifs en milieu aqueux, car plus aisément dégradables. Cette grande réactivité est un atout majeur en vue d'applications cliniques [54].

Connaissant l'influence du calcium, nous avons choisi de fixer sa teneur à 25 % massiques dans la composition de nos matériaux, afin de maintenir une grande réactivité. Ainsi notre objectif sera de déterminer l'incidence de l'ajout de phosphore sur le processus de bioactivité.

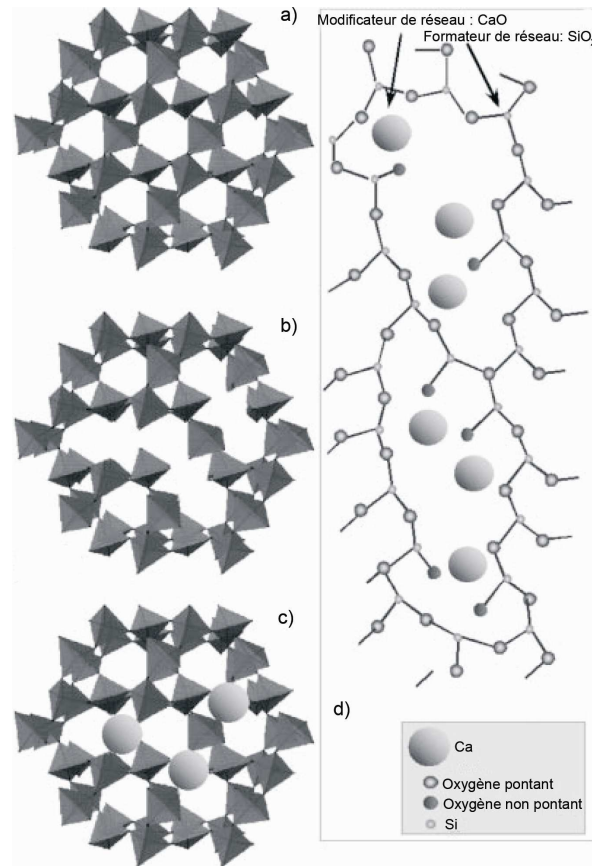


Figure 2-1: représentation tridimensionnelle de la structure a) de la silice cristalline, b) de la silice amorphe, c) d'un verre binaire et d) représentation en deux dimensions d'un verre binaire, d'après [54].

2.3.2 Les verres dopés en strontium

Découvert en 1790, le strontium est un alcalino-terreux au même titre que le calcium et le magnésium, qui sont d'importance biologique pour l'organisme. En présence de fluides biologiques, il existe sous la forme d'un cation divalent Sr^{2+} pouvant se lier aux protéines. Le Tableau 2-2 indique que le strontium est un élément trace du corps humain. Une alimentation équilibrée assure un apport moyen de strontium estimé à 1,9 mg par jour [55].

Élément	Numéro atomique	Masse atomique	Quantité dans l'organisme (g)	% de la masse corporelle
Mg	12	24,32	19	0,027
Ca	20	40,08	1000	1,4
Sr	38	87,63	0,32	0,00044

Tableau 2-2: propriétés des alcalino-terreux d'importance biologique pour l'organisme et leur distribution dans le corps d'un homme de 70 kg.

Jusqu'à récemment, le strontium et son rôle biologique dans l'organisme ont peu attiré l'attention des chercheurs, plus intéressés par d'autres métaux divalents tels que le calcium et le magnésium. Mais dernièrement, des observations cliniques ont prouvé que l'administration de strontium chez des patients atteints d'ostéoporose diminuait le risque de fracture, assurant un regain d'intérêt pour cet élément chimique [56, 57].

L'effet positif du strontium sur l'organisme se traduit par une promotion de la formation d'os et une diminution de la résorption osseuse, ceci sans altérer la minéralisation des tissus. Le strontium agit sur la différenciation cellulaire des ostéoblastes, responsables de la formation d'os. Cette action favorable aux ostéoblastes s'expliquerait par l'activation de récepteurs spécifiques dans les cellules, ayant pour conséquence la production de protéines responsables de la différenciation ostéoblastique [58]. On comprend donc tout l'intérêt du strontium dans le traitement de l'ostéoporose, maladie pour laquelle l'équilibre entre résorption et formation d'os est rompu.

D'autres observations nous renseignent sur les effets positifs du strontium. Dans l'émail des dents, des carences en strontium favorisent l'apparition de caries [59]. De tous les métaux présents sous forme de traces dans l'os humain, il a été démontré que seul le strontium est en relation avec la résistance mécanique des os [60]. Enfin, aucun symptôme de toxicité liée à une ingestion de strontium, même excessive, n'a été reporté chez l'homme.

Outre son rôle biologique important, le strontium, incorporé dans la composition de base des verres bioactifs, pourrait avoir des effets notables sur les réactions physico-chimiques du processus de bioactivité : en particulier sur la dissolution du matériau, sur le relargage des différents éléments et sur la formation de la couche phosphocalcique. Il est donc important d'évaluer l'influence du strontium sur la physico-chimie des verres bioactifs à travers l'étude des cinétiques de dissolution, du rendement et de la cinétique de formation de la couche Ca-P.

Ces constatations et la perspective d'applications cliniques variées ont motivé la décision d'élaborer des verres bioactifs dopés en strontium, de composition générale $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$. C'est la première fois, à notre connaissance, que des verres bioactifs contenant du strontium ont été élaborés et caractérisés. Deux compositions de verres binaire et ternaire ont été choisies en vue d'être dopées en Sr, à hauteur de 1 et 5 % (Tableau 2-3). Le strontium étant un modificateur de réseau, ayant en outre des propriétés physico-chimiques analogues au calcium, l'organisation structurale des verres dopés en strontium sera similaire à celle des verres binaires et ternaires décrits précédemment.

	B75-Sr1	B75-Sr5	B67,5-Sr1	B67,5-Sr5
SiO ₂	75	75	67,5	67,5
CaO	24	20	24	20
P ₂ O ₅	0	0	7,5	7,5
SrO	1	5	1	5

Tableau 2-3: composition en oxyde des verres dopés en strontium (% massique).

Partie II

Matériels et méthodes expérimentales

Chapitre 3

Élaboration des verres bioactifs et essais *in vitro*

3.1 Synthèse des verres bioactifs par le procédé sol-gel

3.1.1 Principe

La méthode sol-gel a été initiée à la fin du XIX^e siècle et s'est considérablement développée depuis une trentaine d'années. Son spectre d'applications variées s'étend de la cosmétique à l'aérospatiale. L'idée de base du procédé sol-gel consiste à gélifier un sol¹ en créant progressivement un réseau tridimensionnel. Dans le cas de gels polymériques, cette transformation s'opère au moyen d'une hydrolyse du précurseur chimique suivie par des réactions de polymérisation. On obtient alors des espèces de plus en plus condensées, qui forment un gel : une espèce quasi-solide qui peut être rigide ou bien élastique comme de la gélatine. Un traitement thermique de densification du gel est ensuite nécessaire pour aboutir au matériau final. La Figure 3-1 nous renseigne sur la variété des mises en forme permises par cette technique [61].

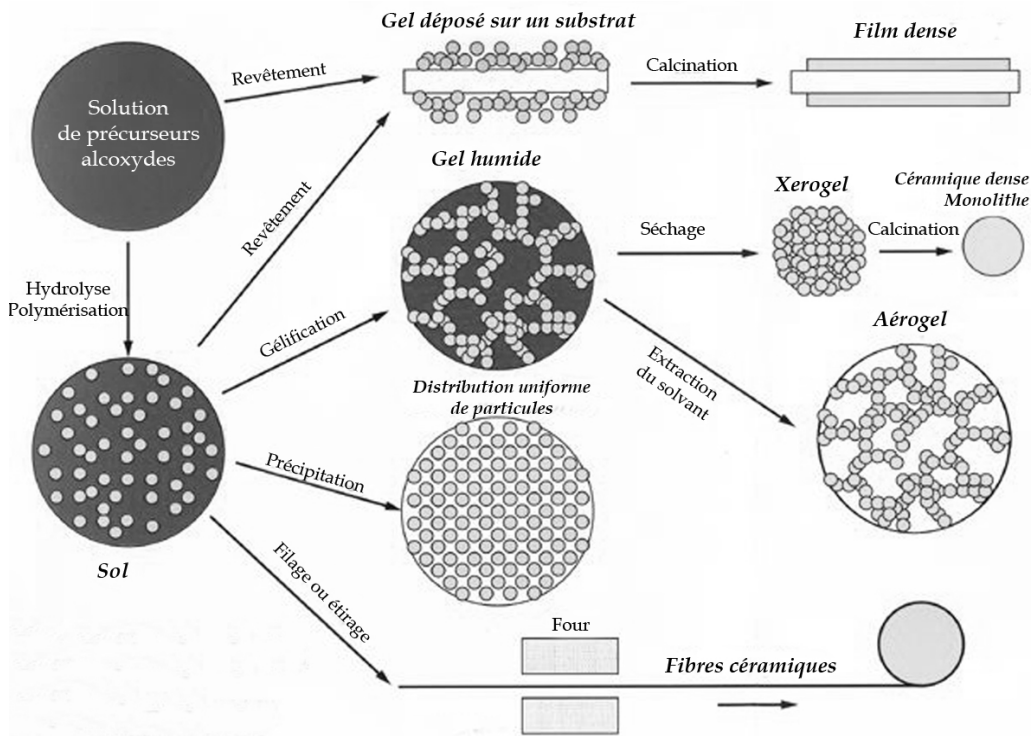


Figure 3-1: différentes mises en forme permises par l'utilisation du procédé sol-gel.

¹ Dispersion stable de particules dans un liquide.

3.1.2 Aspects physico-chimiques de la polymérisation sol-gel

Pour élaborer des verres bioactifs, nous avons choisi la voie de synthèse consistant à partir de précurseurs alcoxydes. Le déroulement du procédé sol-gel s'opère alors en plusieurs étapes, illustrées par la Figure 3-2 [62, 63].

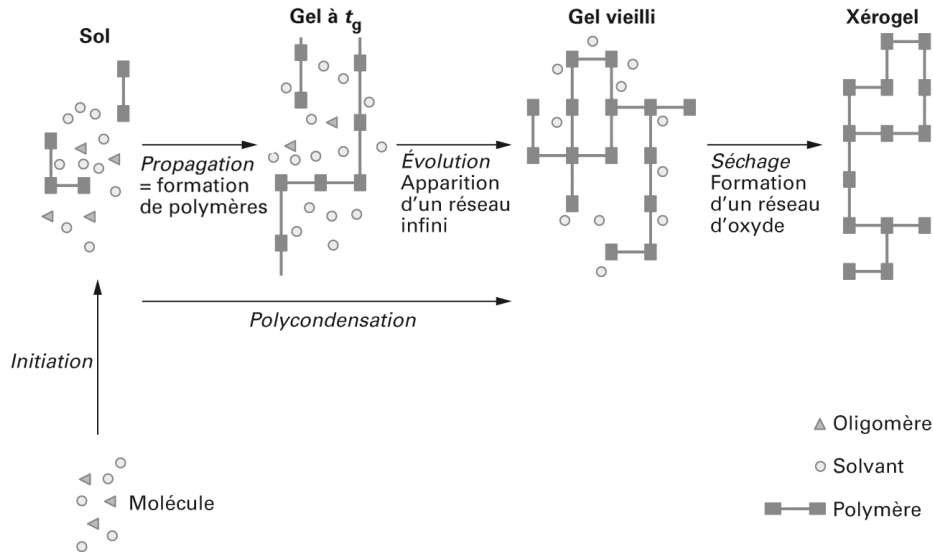


Figure 3-2: description schématique du processus de polymérisation sol-gel, d'après [64].

Première étape : à l'état liquide, le précurseur chimique, un alcoxyde de formule chimique $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ nommé tétraéthoxysilane (TEOS), est hydrolysé en présence d'eau. S'ensuit une série de réactions de condensation aboutissant à la création d'un réseau de silice. La Figure 3-3, dans laquelle M représente Si et R correspond au groupement éthyle C_2H_5 , illustre ces phénomènes.

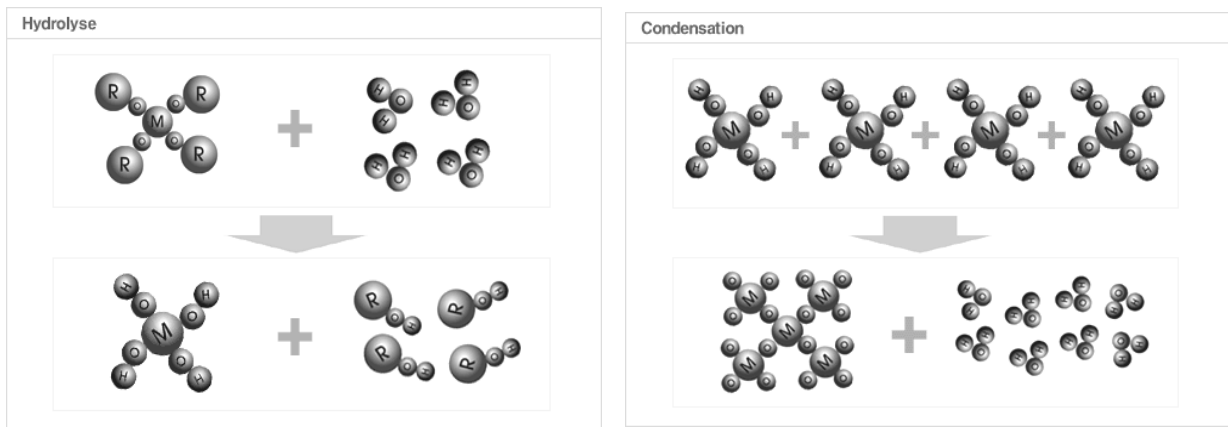


Figure 3-3: réactions d'hydrolyse et de condensation à la base du procédé sol-gel.

Lorsque suffisamment de liaisons $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ ont été formées dans une région, elles répondent en tant que particules colloïdales² : on obtient un sol. La taille des particules du sol ainsi que leur densité dépendent entre autres du pH et du rapport $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{TEOS}]$.

Deuxième étape : le sol étant un liquide de faible viscosité, il est versé dans un contenant choisi de manière à minimiser les interactions chimiques avec le sol, en vue d'éviter l'adhérence du futur gel aux parois. Lors de la gélification, les particules colloïdales et autres

² Particules de dimension submicrométrique.

groupements silicates finissent par se joindre au travers d'un véritable réseau tridimensionnel. Les propriétés physiques du gel vont dépendre de la taille des particules et de l'évolution de leur densité au point de gélification. Après gélification, la viscosité augmente brusquement et l'élasticité du matériau augmente de façon notable.

Troisième étape : le vieillissement du gel permet d'accroître sa consistance. En effet, passé le point de gélification, il subsiste toujours dans le liquide interstitiel des oligomères et d'autres courtes macromolécules qui continuent à réagir. L'ensemble du processus d'évolution du gel au cours du temps est appelé vieillissement. Il est réalisé en laissant la gélification s'opérer à température ambiante durant quelques heures à quelques mois suivant la consistance désirée. Lors du vieillissement, les réactions de condensation se poursuivent, en même temps que des dissolutions immédiatement suivies de précipitations localisées du réseau ont lieu, permettant la contraction du matériau et l'expulsion du solvant. Un gel vieilli doit être suffisamment résistant pour éviter la fragmentation lors du séchage.

Quatrième étape : le séchage permet d'évacuer les liquides (molécules d'eau, alcool...) piégés dans le réseau de pores interconnectés. De cette déshydratation résulte un solide poreux et stable chimiquement. On observe ainsi une contraction et une densification considérable du matériau, du à l'effondrement complet de la structure. De fortes contraintes capillaires s'exercent sur les pores lors du séchage, pouvant provoquer l'apparition de failles dans le matériau. Il est possible de diminuer l'intensité de ces contraintes par l'addition de tensioactifs lors de l'élaboration ou en effectuant le séchage dans une atmosphère saturée en eau. Le produit plus ou moins dense obtenu est nommé xérogel si le séchage a lieu en conditions atmosphériques, et aérogel en conditions supercritiques. Les caractéristiques du gel final, sa surface spécifique et sa porosité dépendent de l'histoire du gel humide. Si l'on désire obtenir un monolithe de xérogel sans craquelures, il est nécessaire de contrôler soigneusement la vitesse de séchage.

Cinquième étape : le gel poreux est calciné à haute température ce qui provoque sa densification. La température de calcination dépend principalement des dimensions des pores et de la connectivité recherchées, en tenant également compte des différentes températures de transition cristalline. Si l'on désire élaborer un verre bioactif amorphe, il convient d'effectuer la calcination à 700 °C ; une température plus élevée entraînerait la formation de phases cristallines (Figure 3-4).

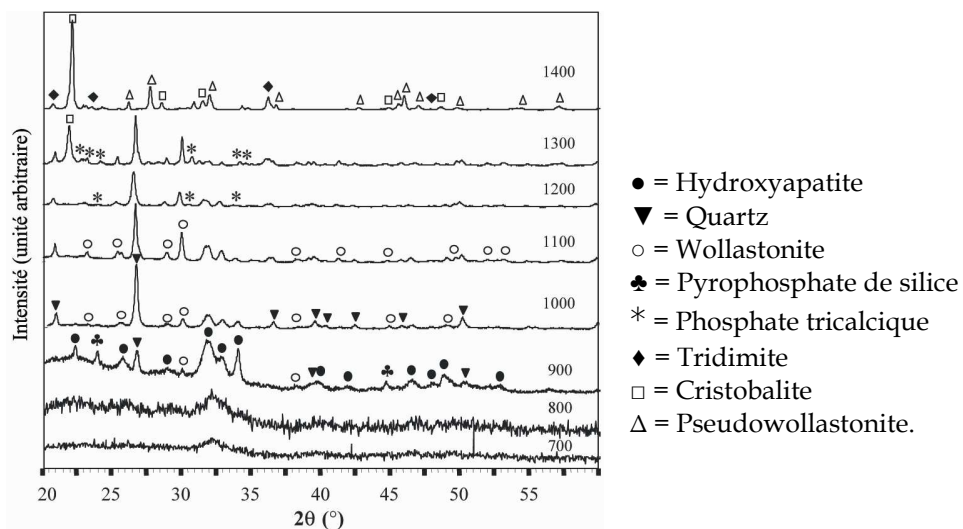


Figure 3-4: diffractogrammes obtenus pour un verre ternaire de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ après calcination à différentes températures comprises entre 700 °C et 1400 °C, d'après [65].

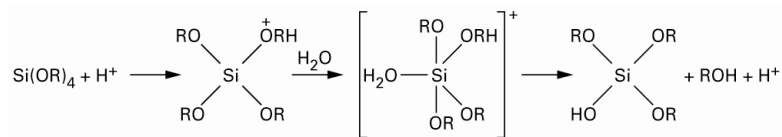
3.1.3 Protocole de synthèse

Les verres bioactifs ont été élaborés sous forme de poudres. En conséquence, il n'a pas été nécessaire d'imposer des conditions drastiques lors du vieillissement et du séchage des gels. Le Tableau 3-1 décrit les précurseurs chimiques fournis par Sigma-Aldrich (USA).

	Formule	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Pureté (%)
Tétraéthoxysilane (TEOS)	Si-(OC ₂ H ₅) ₄	208,33	99,999
Triéthylphosphate (TEP)	O=P-(OC ₂ H ₅) ₃	182,16	99,8
Nitrate de calcium tétrahydraté	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	236,15	99,99
Nitrate de strontium	Sr(NO ₃) ₂	211,63	99,995

Tableau 3-1: caractéristiques des précurseurs chimiques.

Les alcoxydes de silicium tels le TEOS sont indéfiniment stables en l'absence d'eau. C'est pourquoi la synthèse de gels de silice exige une étape d'hydrolyse. Cependant, comme le TEOS n'est pas miscible à l'eau, il est nécessaire d'utiliser un cosolvant pour effectuer la réaction. À cette fin l'alcool parent du TEOS, l'éthanol EtOH, a été employé. D'autre part l'étape d'hydrolyse étant très lente, on ajoute toujours un catalyseur, qui peut être un acide ou une base, chacun conduisant à des gels très différents. Nous avons pour notre part fait usage d'acide chlorhydrique HCl. Dans ce cas le mécanisme réactionnel de la catalyse acide s'effectue selon :



Concernant le protocole de synthèse, l'eau distillée nécessaire à l'hydrolyse est tout d'abord mélangée à l'acide chlorhydrique HCl (2N) et à l'éthanol EtOH (99 %), qui permettra, outre d'obtenir une solution homogène après introduction du TEOS, de bien dissoudre les cristaux de Ca(NO₃)₂·4H₂O. Les proportions d'eau, d'éthanol et d'acide chlorhydrique sont détaillées dans le Tableau 3-2 et sont en accord avec les travaux de Saravanapavan et Hench sur la synthèse de gels monolithiques [66]. La présence d'eau en excès permet notamment d'obtenir un temps de gélification plus court.

H ₂ O/(TEOS + TEP)	R _{molaire} = 12
H ₂ O/HCl	R _{volumique} = 6
H ₂ O/EtOH	R _{volumique} = 1

Tableau 3-2: proportions d'eau, d'éthanol et d'acide chlorhydrique.

Ces réactifs sont mélangés dans un ballon sous agitation magnétique pendant 15 minutes. Le TEOS est alors ajouté au mélange et, après 30 minutes, le TEP y est versé ainsi qu'un volume égal d'éthanol. Au bout de 20 minutes, le Ca(NO₃)₂·4H₂O et/ou le Sr(NO₃)₂ sont introduits. Le mélange est alors agité pendant 60 minutes supplémentaires.

Puis la solution est placée dans un verre de montre et séchée dans une étuve à 60°C pour gélification. Cette opération dure 4 heures, et le sol en ressort totalement gélifié. L'étuve est ensuite portée à 125°C pendant 24 heures. Le gel est à cet instant complètement fragmenté et est broyé finement au mortier pour la dernière étape de la synthèse : la calcination à 700°C pendant 24 heures, qui outre la densification va permettre d'évaporer intégralement les

résidus d'alcool et de nitrate piégés dans les pores. Le produit final est obtenu sous forme d'une fine poudre blanche.

La Figure 3-5 représente le diffractogramme du verre B70 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, caractérisé par la méthode d'analyse cristalline de diffraction des rayons X. Les diffractogrammes obtenus pour les autres verres sont semblables à celui-ci. L'absence de pics de diffraction indique que les verres élaborés sont bien amorphes.

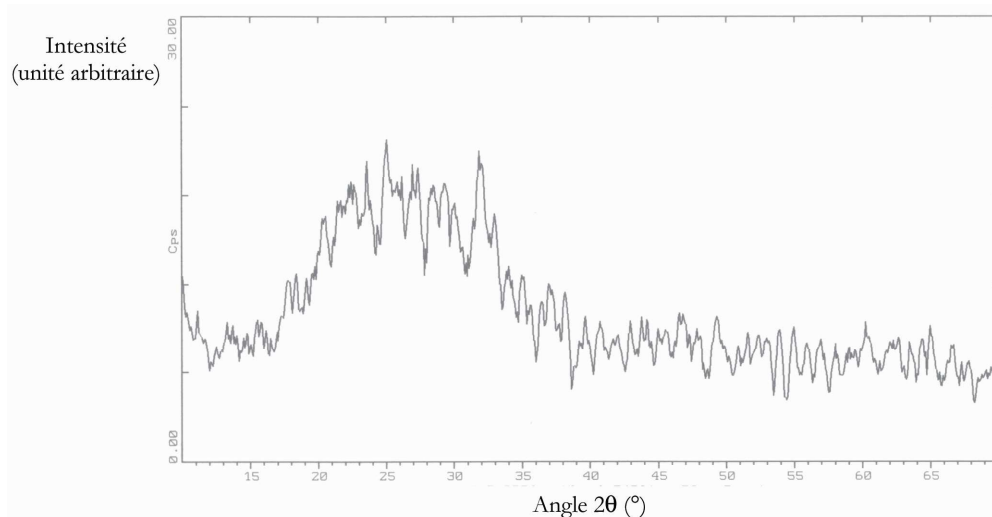


Figure 3-5: diffractogramme représentatif des verres élaborés (obtenu ci-dessus pour le verre B70).

3.2 Étude *in vitro* de la bioactivité

3.2.1 Choix du milieu biologique

Il est clairement établi que la faculté d'un biomatériau à se lier aux tissus vivants est dépendante de sa capacité : 1) à relarguer en concentrations adéquates certaines espèces ioniques et 2) à former une couche apatitique au contact de fluides biologiques imitant le plasma sanguin. Les essais *in vitro* sont donc un outil puissant pour évaluer la bioactivité d'un matériau.

Le milieu biologique dans lequel les verres bioactifs ont été immergés est du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biochrom AG). Ce choix a été motivé par la perspective d'études cellulaires futures, pour lesquelles il est fait usage du DMEM comme milieu de culture. La composition du DMEM est similaire à celle du plasma sanguin chez l'homme (Tableau 3-3). Le pH du DMEM à 37 °C vaut 7,43, une valeur analogue à celle du plasma sanguin.

	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma sanguin	142,0	5,0	1,5	2,5	105,0	27,0	1,0	0,5
DMEM	154,5	5,4	0,8	1,8	118,5	44,0	0,9	0,8

Tableau 3-3: concentrations ioniques moyennes du plasma sanguin chez l'homme et du DMEM (mmol.L⁻¹).

3.2.2 Protocole expérimental

Les échantillons de verres bioactifs ont été étudiés sous forme de poudre et sous forme de pastilles : disques de 13 mm de diamètre et 2 mm de hauteur, obtenues en compactant 90 mg de poudre au moyen d'une presse. Les verres bioactifs sont susceptibles d'être

utilisés dans des applications cliniques sous ces deux formes ; il est donc intéressant d'étudier ces deux types d'échantillons. La bioactivité s'y opère à des échelles différentes de temps et de dimensions.

3.2.2.1 Les pastilles de verre bioactif

Les pastilles de verre bioactif ont été immergées dans 45 mL de DMEM durant les délais suivants : 1 heure, 6 heures, 1 jour, 2 jours, 5 jours, 10 jours.

Après immersion, les pastilles sont récupérées puis séchées sous atmosphère ambiante, tandis qu'une partie du DMEM est prélevée afin d'être dosée en ICP-AES (cf. paragraphe 4.1). Les échantillons de pastilles destinés à être caractérisés par la microsonde nucléaire sont inclus dans de la résine. Des sections transverses du matériau sont ensuite réalisées à l'aide d'un microtome Leica RM 2145. Les coupes, de 30 μm d'épaisseur, sont effectuées perpendiculairement à la surface du disque. Finalement, les coupes sont placées sur des supports en Mylar percés en leur centre d'un trou de 3 mm de diamètre. C'est la zone de l'échantillon placée au-dessus du trou qui sera sondée par le microfaisceau d'ions.

3.2.2.2 Les grains de verre bioactif

N'étant pas massifs comme les pastilles et ayant en outre une structure poreuse, les grains de poudre réagissent plus vite que les pastilles. Notre étude sur les poudres s'est focalisée sur la caractérisation de 4 verres bioactifs : les verres B75, B67,5, B75-Sr5 et B67,5-Sr5. Pour chaque verre, 10 mg de poudre ont été immergés dans du DMEM suivant un rapport [surface spécifique]/[volume de DMEM] fixé à 500 cm^{-1} , ceci afin d'évaluer l'impact sur la bioactivité de la composition chimique du verre et non de sa surface de contact avec le milieu biologique. Les temps d'immersion dans le DMEM sont les suivants : 1 heure, 6 heures, 1 jour, 2 jours, 3 jours, 4 jours.

De même que pour les pastilles, au terme de l'interaction une partie du DMEM est prélevée et les grains de poudre sont récupérés, séchés sous atmosphère ambiante et inclus dans de la résine pour les analyses par microfaisceau d'ions (Figure 3-6). Des coupes transverses du matériau, de 1000 nm d'épaisseur, sont effectuées au moyen d'un ultramicrotome Leica EM UC6. Les coupes sont réalisées grâce à un couteau diamant (45 °) incliné de 6 ° par rapport au plan horizontal et à une vitesse de 1,4 mm/s. Les coupes sont récupérées sur des grilles en cuivre de type 50 mesh et celles-ci sont collées sur des supports en Mylar percés en leur centre d'un trou de 3 mm de diamètre. La Figure 3-7 représente la coupe d'un bloc de résine. Cette coupe de 1000 nm d'épaisseur contient des grains de verre bioactif (régions sombres de l'image) et a été déposée sur une grille en cuivre dont les barreaux sont visibles.

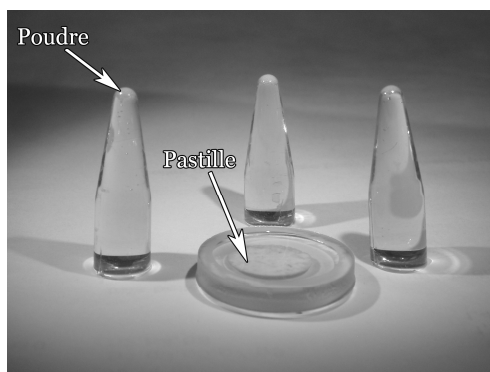


Figure 3-6: grains de poudre et pastilles de verre bioactif inclus dans des blocs de résine.

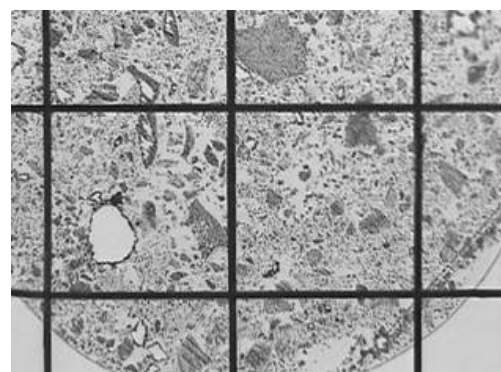


Figure 3-7: coupe contenant des grains de verre bioactif (image obtenue au microscope optique).

Chapitre 4

Méthodes d'analyses physiques et résultats préliminaires

4.1 Spectrométrie d'émission atomique ICP-AES

4.1.1 Principe

La spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif ICP-AES (Inductively Coupled Plasma–Atomic Emission Spectrometry) est une méthode d'analyse particulièrement adaptée à la détection des éléments majeurs et traces constituant un matériau. Son excellente sensibilité peut être nettement inférieure au ppm³. L'échantillon à analyser doit préalablement être mis en solution. Il est ensuite pulvérisé au sein d'un plasma d'argon dont la température avoisine les 10 000 °C. Cette température très élevée permet la dissociation de la matière en atomes et ions libres, dont les électrons périphériques sont excités. Leur retour à l'état fondamental stable s'accompagne d'une émission de photons dans l'ultraviolet et le visible. Ce rayonnement, dont les longueurs d'onde sont caractéristiques des éléments constitutifs de l'échantillon, est décomposé au moyen d'un réseau de diffraction. La détection et le comptage des photons grâce à un système de tubes photomultiplicateurs conduisent à une quantification, par comparaison entre le signal mesuré pour l'échantillon et celui obtenu pour des solutions de composition connue. L'ensemble de la procédure analytique est validée par des tests sur des matériaux de référence certifiés.

Concernant l'instrumentation, la torche à plasma est constituée par un tube de quartz entouré de plusieurs spires d'induction en cuivre, connectées à un générateur de radiofréquence de 30 MHz. L'ionisation du flux d'argon circulant à l'intérieur de la torche est amorcée par la décharge d'une bobine. Les ions et les électrons ainsi créés interagissent avec le champ magnétique produit par les spires, ce qui contraint les ions et les électrons à décrire une trajectoire circulaire à vitesse élevée. Un échauffement par effet Joule résulte de leur résistance à ce mouvement, permettant d'atteindre une chaleur de plasma extrêmement élevée.

L'ICP-AES possède plusieurs avantages par rapport aux autres spectroscopies d'émission. Tout d'abord, des spectres d'émission de qualité sont obtenus pour la plupart des éléments dans les mêmes conditions d'excitation, autorisant l'analyse multiélémentaire. D'autre part, la température de travail plus élevée a pour conséquence un faible niveau d'interférences. Enfin, les sources à plasma permettent le dosage d'éléments traces qui ont tendance à former des composés réfractaires, tels les oxydes de bore, phosphore ou encore uranium, extrêmement résistants à la décomposition thermique [67].

³ ppm :partie par million, unité correspondant à 10⁻⁶g/g.

4.1.2 Préparation des échantillons

Afin d'être dissociés et partiellement ionisés sous l'effet de la haute température, les échantillons à analyser doivent être injectés sous forme d'aérosol dans le plasma. Les prélèvements liquides de DMEM satisfont à cette condition et peuvent être injectés directement. En revanche les échantillons de poudre de verre doivent être mis en solution par la méthode de la fusion alcaline : à cette fin 500 mg de métaborate de lithium LiBO_2 , un réactif d'attaque polyvalent pour la réduction de groupements variés, sont mélangés avec 100 mg d'échantillon de poudre. Le mélange est ensuite placé dans un creuset en graphite et chauffé à 1100 °C dans un four à induction. Une perle de consistance visqueuse est obtenue et reprise dans 200 mL d'acide nitrique à 1 mol/L afin de réaliser une solution limpide susceptible d'être nébulisée dans le spectromètre. Cette solution sera aspirée par le nébuliseur, puis pulvérisée en fines gouttelettes dans la chambre de nébulisation, et pénètre finalement dans le brûleur puis dans le plasma.

Des solutions étalons, dont les concentrations atomiques en éléments sont connues, sont nécessaires à la calibration de l'appareil. Une solution d'acide nitrique HNO_3 permet de faire le « zéro ». Enfin une solution étalon de diorite est utilisée pour vérifier la calibration de l'appareil et évaluer les incertitudes. Les longueurs d'ondes caractéristiques des atomes émetteurs analysés sont indiquées dans le Tableau 4-1.

P	Mg	Si	Ca	Sr
213,618	279,553	288,158	317,933	407,771

Tableau 4-1: longueurs d'onde caractéristiques des éléments analysés (nm).

4.1.3 Composition des verres

Les résultats de l'analyse par spectrométrie d'émission atomique sont détaillés dans les Tableau 4-2 et Tableau 4-3. Les verres élaborés ont des concentrations en oxydes tout à fait conformes aux valeurs escomptées. La teneur en calcium se maintient à une valeur extrêmement proche de 25 % pour tous nos verres, tandis que les concentrations en silicium et phosphore sont légèrement en deçà des valeurs théoriques.

	B75		B72,5		B70		B67,5	
SiO_2	72,20	$\pm 0,37$	71,49	$\pm 0,40$	68,25	$\pm 0,26$	63,75	$\pm 0,40$
P_2O_5	–	–	2,48	$\pm 0,02$	4,85	$\pm 0,06$	6,95	$\pm 0,14$
CaO	24,50	$\pm 0,17$	24,36	$\pm 0,14$	25,76	$\pm 0,18$	24,13	$\pm 0,11$
Total	96,70	$\pm 0,41$	98,33	$\pm 0,42$	98,86	$\pm 0,32$	94,83	$\pm 0,44$

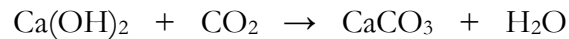
Tableau 4-2: concentrations en oxydes mesurées en ICP-AES pour les verres binaires et ternaires (% massique).

	B75–Sr1		B75–Sr5		B67,5–Sr1		B67,5–Sr5	
SiO_2	74,22	$\pm 0,52$	74,08	$\pm 0,51$	67,16	$\pm 0,47$	64,93	$\pm 0,45$
P_2O_5	–	–	–	–	7,04	$\pm 0,14$	7,62	$\pm 0,15$
CaO	23,60	$\pm 0,17$	19,03	$\pm 0,13$	23,31	$\pm 0,16$	20,25	$\pm 0,14$
SrO	0,83	$\pm 0,08$	3,83	$\pm 0,04$	0,81	$\pm 0,08$	4,27	$\pm 0,04$
Total	98,65	$\pm 0,77$	96,94	$\pm 0,68$	98,32	$\pm 0,85$	97,07	$\pm 0,78$

Tableau 4-3: concentrations en oxydes mesurées en ICP-AES pour les verres dopés en strontium (% massique).

Le fait que la somme des teneurs en oxydes ne soit pas égale à 100 % peut être expliqué par la présence possible de carbone en surface des échantillons. En effet le CO_2 contenu dans l'air ambiant peut pénétrer dans les échantillons de verre bioactif. Plus le matériau est poreux, plus cette pénétration est rapide et importante. Une fois à l'intérieur, ce gaz peut se

dissoudre dans l'eau contenue à la surface des pores et former des carbonates de calcium selon :



D'autre part, du fait de leur teneur élevée en cations alcalino-terreux, les verres élaborés sont très réactifs vis-à-vis de l'eau et ont tendance à s'hydrater facilement au contact de l'air.

4.2 Mesures de surface spécifique et de porosité par adsorption de gaz

4.2.1 Principe

La mesure de la surface spécifique, appelée également aire massique, est importante pour la caractérisation de poudres ou de solides, car sa connaissance contribue à améliorer le contrôle de la réactivité d'un matériau. La surface spécifique est définie comme la surface totale par unité de masse de l'échantillon accessible aux atomes et aux molécules, porosité ouverte comprise. Elle est exprimée en m^2/g . Le principe physique est basé sur l'adsorption d'un gaz, généralement l'azote, réalisée à sa température de liquéfaction (77 K pour le diazote). Les mesures présentent l'avantage d'être non destructives.

La tendance de toute surface solide à attirer les molécules de gaz environnant donne lieu au phénomène d'adsorption. Les processus d'adsorption peuvent être classés en physisorption⁴ ou en chimisorption⁵, suivant la force de l'interaction entre adsorbât et adsorbant. La mesure de la surface spécifique tire parti de la physisorption. Des quantités connues d'azote, gaz capable de s'immiscer dans les moindres pores et interstices du matériau, sont introduites séquentiellement et mises au contact de l'échantillon. Au fur et à mesure de l'introduction de molécules gazeuses dans le système, l'adsorbât tend à former une fine couche qui recouvre la surface de l'échantillon (Figure 4-1). La mesure de la pression résiduelle renseigne sur le nombre de molécules de gaz adsorbées, et il devient possible de tracer une isotherme d'adsorption, caractéristique du couple adsorbant/adsorbât étudié. Différentes méthodes sont alors disponibles pour extraire de l'isotherme les informations concernant la surface spécifique et la porosité du matériau. Dans le cadre de notre étude, nous avons fait usage des méthodes BET et BJH [68].

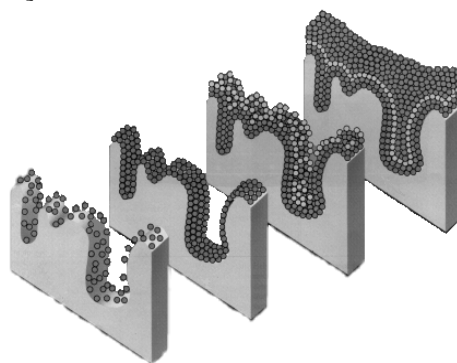


Figure 4-1: formation d'une monocouche puis de multicouches lors du recouvrement d'un matériau par des molécules de gaz adsorbées.

⁴ Adsorption réversible due aux forces de van der Waals et/ou d'interaction dipolaire.

⁵ Adsorption irréversible impliquant des liaisons de caractère chimique, caractérisée par un potentiel d'interaction élevé.

4.2.1.1 Calcul de la surface spécifique par la méthode BET

Sur la base de la théorie de Brunauer, Emmett et Teller (BET) datant de 1938, le nombre de molécules d'adsorbât requises pour couvrir la surface de l'échantillon sur une monocouche est estimé par [69] :

$$\left(V_{ads} \cdot \frac{P_0}{P} - 1 \right)^{-1} = \frac{1}{V_{mono} \cdot C} + \left(\frac{C-1}{V_{mono} \cdot C} \right) \cdot \frac{P}{P_0} \quad (4.1)$$

où

V_{mono} est le volume de gaz nécessaire pour recouvrir la surface du solide par une monocouche moléculaire.

V_{ads} est le volume de gaz adsorbé.

P est la pression de l'échantillon.

P_0 est la pression de vapeur saturante l'adsorbât.

C est la constante BET relative à l'enthalpie d'adsorption.

Dans l'équation 4.1, le terme $(V_{ads} \cdot P_0 / P - 1)^{-1}$ est nommé fonction BET. Les données de l'isotherme d'adsorption sont utilisées pour calculer cette fonction. Ainsi, le tracé de la fonction BET en fonction de la pression relative P/P_0 permet d'obtenir une droite de pente $(C-1)/V_{mono} \cdot C$ et d'ordonnée à l'origine $1/V_{mono} \cdot C$, autorisant le calcul du volume de la monocouche.

Connaissant V_{mono} , la surface spécifique BET s'exprime selon :

$$S_{BET} = \frac{V_{mono} \cdot N_A \cdot A_M}{V_M} \quad (4.2)$$

où

S_{BET} est la surface spécifique BET.

N_A est le nombre d'Avogadro.

A_M est la section utile de l'adsorbât : 16,2 Å² pour l'azote.

V_M est le volume molaire de l'adsorbât liquide : 34,7 cm³/mol pour le diazote liquide.

La théorie BET se base sur la théorie de Langmuir pour faire l'hypothèse que tous les sites d'adsorption sont identiques d'un point de vue énergétique et qu'il n'y a aucune interaction entre molécules adsorbées. Ce n'est évidemment pas le cas en réalité, mais la théorie BET est en général applicable dans le domaine de pression relative compris entre 0,05 et 0,35 pour des isothermes d'adsorption au diazote de type II et IV suivant la classification de l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

4.2.1.2 Distribution de taille des pores calculée par la méthode BJH

Le diamètre des pores constituant l'échantillon est estimé en poursuivant l'ajout de molécules de gaz au delà de la quantité nécessaire à la formation de la monocouche. Ce faisant, la pression résiduelle continue d'augmenter et des couches d'adsorbât s'empilent graduellement les unes sur les autres (Figure 4-1). Ces empilements finissent par obstruer peu à peu les pores du matériau. Quand la pression d'équilibre approche la saturation, les pores sont complètement remplis par l'adsorbât. Connaissant la densité de celui-ci, on peut calculer le volume total qu'il occupe, et, par conséquent, le volume poreux total de l'échantillon. Si l'on veut accéder à la distribution de la taille des pores de l'échantillon, il faut renverser le processus d'adsorption : on procède à la désorption. En retirant un volume connu de gaz pas à pas, on génère les isothermes de désorption.

Lors de l'adsorption/désorption, le mécanisme par lequel l'obstruction/désobstruction des pores par l'adsorbât s'opère peut être décrit par un phénomène de condensation capillaire. Les pores du matériau sont ainsi assimilés à des capillaires sur les parois desquels est condensé l'adsorbât. Comme le montre la Figure 4-2, un ménisque de rayon r_k se forme suite à la condensation d'une épaisseur t de gaz sur les parois d'un capillaire de rayon r_p .

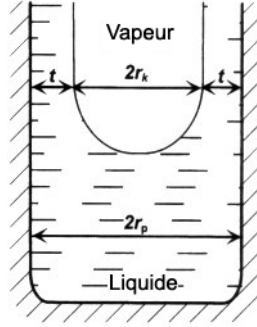


Figure 4-2: condensation d'un gaz dans un capillaire.

L'algorithme de Barrett, Joyner et Halenda (BJH) est la méthode la plus employée pour estimer la distribution de taille des pores. Valable pour des pores de diamètre compris entre 3 nm et 50 nm (mésopores) ainsi que pour des isothermes d'adsorption de type IV, cette méthode se base sur le phénomène de condensation capillaire pour analyser pas à pas les isothermes d'adsorption-désorption [70]. La loi de Kelvin, qui donne la relation entre la pression à laquelle se condense un gaz dans un capillaire et le rayon de courbure r_k du ménisque liquide formé, est supposée applicable et s'écrit :

$$P = P_0 \cdot \exp\left(-\frac{2\gamma \cdot V_M}{RT \cdot r_k}\right) \quad (4.3)$$

où

γ est la tension superficielle de l'adsorbât liquide à son point d'ébullition : $8,85 \cdot 10^{-7}$ J/cm² pour le diazote à 77 °K.

T est la température du point d'ébullition de l'adsorbât.

R est la constante des gaz parfaits : 8,314 J/K/mol.

Pour une adsorption de diazote à 77 K, il en résulte (avec r_k en nm) :

$$r_k = \frac{-0,415}{\log\left(\frac{P}{P_0}\right)} \quad (4.4)$$

Et alors le diamètre (en nm) du pore supposé cylindrique est lié au rayon de Kelvin r_k par :

$$r_p = r_k + t \quad (4.5)$$

L'épaisseur t de la couche multimoléculaire recouvrant la paroi du pore dépend de la pression d'équilibre selon une loi empirique (équation de Harkins-Jura) utilisée dans l'algorithme. On considère habituellement que la branche de désorption est plus représentative de l'équilibre existant entre le diazote restant à l'état gazeux et le diazote condensé par capillarité ; aussi l'algorithme BJH se base-t-il le plus souvent sur l'analyse séquentielle de la

branche de désorption pour le calcul pas à pas du rayon des pores. Il devient ainsi possible de tracer la distribution du volume poreux en fonction de la taille des pores et d'estimer le diamètre moyen de pore.

4.2.1.3 Analyse des isothermes de sorption

Des isothermes d'adsorption et désorption sont obtenues, qui ne se recouvrent que très rarement. L'hystérésis qui en résulte est caractéristique de la distribution en porosité et de la forme des pores du matériau. L'allure des isothermes et des hystérésis est révélatrice des caractéristiques texturales d'un matériau. Elle permet de conclure sur la présence de micropores⁶, de mésopores⁷ ou de macropores⁸. Les divers types d'isothermes d'adsorption (Figure 4-3) et d'hystérésis (Figure 4-4) sont classifiés suivant la nomenclature de l'IUPAC. Les courbes obtenues expérimentalement sont très souvent des isothermes d'adsorption composites des différents types détaillés ci-dessous.

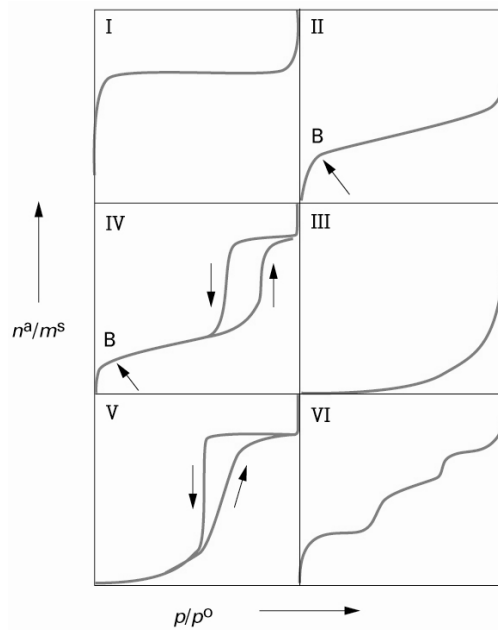


Figure 4-3: classification des isothermes d'adsorption d'après l'IUPAC.

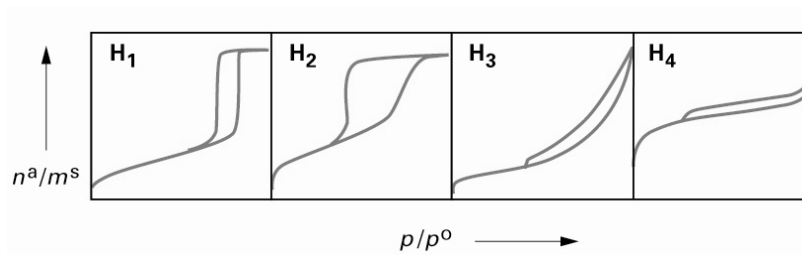


Figure 4-4: classification des différentes hystérésis selon l'IUPAC.

⁶ Micropores : pores de diamètre inférieur à 3nm.

⁷ Mésopores : pores de diamètre compris entre 3 nm et 50 nm.

⁸ Macropores : pores de diamètre supérieur à 50 nm.

4.2.2 Résultats

Les isothermes de sorption, représentant le volume d'azote adsorbé puis désorbé en fonction de la pression partielle, sont visibles en Figure 4-5. Selon la classification de l'IUPAC, ces isothermes appartiennent au type IV : une boucle d'hystérèse est présente et les branches d'adsorption et de désorption sont presque parallèles. Le cycle d'hystérèse est dû au phénomène de condensation capillaire, caractéristique d'un matériau méso ou microporeux. Considérons les pores comme ayant des formes cylindriques ; lors de l'adsorption, les couches de gaz vont s'empiler graduellement jusqu'à remplir totalement le volume poreux. Durant cette opération le ménisque de condensation du gaz a une forme cylindrique (Figure 4-2). En revanche, lors de la désorption, les pores se vident en formant un ménisque de forme hémisphérique; ce qui explique que pour une valeur de pression donnée, le volume de gaz évacué lors de la désorption est inférieur au volume de gaz qui avait été précédemment adsorbé à cette même pression. La branche de désorption est donc plus haute que la branche d'adsorption : une boucle d'hystérèse est obtenue.

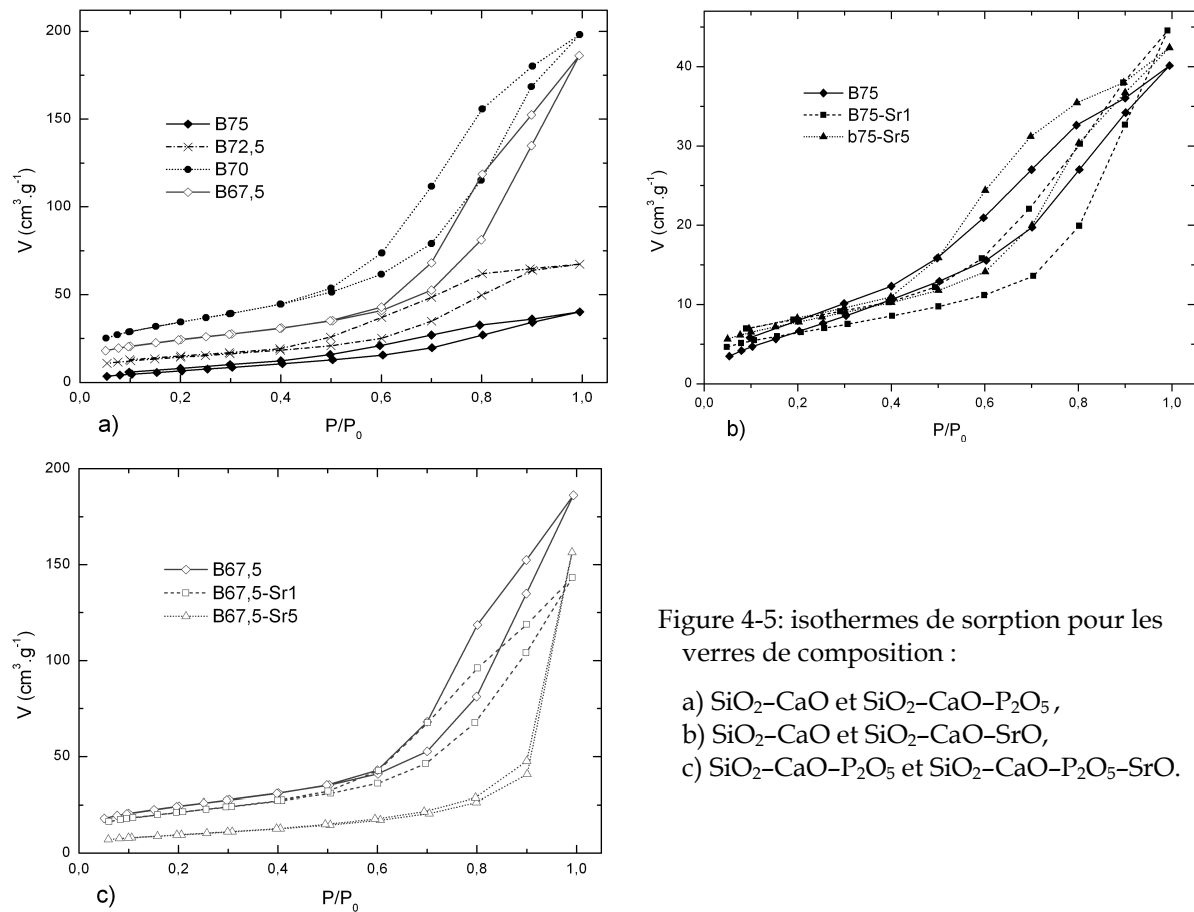


Figure 4-5: isothermes de sorption pour les verres de composition :

- a) $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$,
- b) $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$,
- c) $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$.

Si les isothermes de sorption sont de même type pour chacun des verres, différentes formes d'hystérésis sont toutefois observées et sont caractéristiques de structures poreuses bien spécifiques. Les verres B67,5 et B70, contenant moins de 70 % de SiO_2 , présentent un cycle d'hystérèse de type H_1 : à savoir, une boucle étroite avec des branches d'adsorption et de désorption abruptes. Ce type de boucle d'hystérèse est caractéristique de matériaux mésoporeux, dont les mésopores possèdent une forme tubulaire, i.e. des cylindres non parfaits, ouverts des deux côtés. Les verres B75 et B72,5, contenant plus de 70 % de SiO_2 , présentent une hystérésis de type H_2 , reconnaissable à la présence d'un plateau plus large à l'approche

des fortes pressions partielles. Ce type d'hystérésis est associé à des structures poreuses complexes faites d'un réseau de pores interconnectés, de taille et de forme très variables. Dans les systèmes $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$, l'introduction de strontium se traduit par l'obtention de boucles d'hystérèse d'autant plus étroites que la teneur en strontium est élevée. Cet effet du strontium est plus prononcé pour les verres contenant du phosphore : ainsi le verre B67,5-Sr5 présente un cycle étriqué, proche d'une hystérésis de type H_3 , indiquant la présence de pores très étroits [71, 72].

	B75	B72,5	B70	B67,5	B75-Sr1	B75-Sr5	B67,5-Sr1	B67,5-Sr5
Surface spécifique (m ² /g)	30	74	124	112	24	28	99	39
Diamètre moyen des pores (nm)	8,41	8,13	9,89	13,21	11,8	9,27	11,7	28,2
Diamètre modal des pores (nm)	4,6	4,6	6,2	8,9	6,1	4,7	6,2	4,6
Volume poreux total (cm ³ /g)	0,062	0,104	0,307	0,289	0,069	0,066	0,222	0,245

Tableau 4-4: propriétés texturales des poudres de verre bioactif. Le volume poreux total a été calculé à une pression partielle $P/P_0 = 0,995$.

Le Tableau 4-4 indique les valeurs de la surface spécifique, du diamètre moyen de pores et du volume poreux total, calculées au moyen de la méthode BJH après analyse des branches de désorption. La Figure 4-6 représente la distribution de tailles de pores de chacun des verres binaires, ternaires et dopés en strontium. Il est observé que la surface spécifique d'un échantillon augmente de manière conséquente avec sa teneur en phosphore, tout comme le volume poreux total. Le diamètre moyen des pores augmente également avec la teneur en phosphore, mais il faut cependant prendre en compte les distributions en porosité très larges observées pour chacun des échantillons (cf. Figure 4-6). La grande majorité des pores possède un diamètre moyen compris entre 3 nm et 80 nm, intervalle de valeur commun à chacun des verres.

Ces observations s'interprètent en raisonnant sur les propriétés physico-chimiques des éléments en présence. Nous l'avons vu au chapitre 2, le calcium est un modificateur de réseau : dans la structure vitreuse, le calcium est localisé dans des cavités « défauts », situées en bout de chaîne selon $(-\text{Si}-\text{O}^-)\text{Ca}^{2+}(\text{O}-\text{Si}-)$, induisant la création d'oxygènes non pontants. À l'inverse, le P_2O_5 est un formateur de réseau ; toutefois l'introduction de cet oxyde dans la matrice vitreuse a comme conséquence un arrangement des entités structurales tétraédriques plus désordonné que dans le cas d'un verre uniquement composé de SiO_2 et CaO . Il en résulte une distribution plus nombreuse et plus inhomogène de « défauts » et d'oxygènes non pontants pour les verres ternaires $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ que pour les verres binaires $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ [65]. Ceci s'exprime par la formation de mésopores plus ouverts et de diamètre moyen plus large, induisant une porosité plus importante pour les verres ternaires. La surface spécifique augmente donc également en conséquence. Il faut cependant noter qu'au-delà de 5 % de P_2O_5 , la surface spécifique et le volume poreux diminuent : lorsque suffisamment de P_2O_5 est présent, l'arrangement des entités structurales est plus régulier, entraînant une baisse de la porosité grâce à l'obtention d'un réseau plus uniforme.

Concernant l'addition de strontium dans la matrice vitreuse, elle conduit à une diminution de la surface spécifique et à une hausse du diamètre moyen de pore. Bien que le Sr

assume comme le Ca un rôle de modificateur dans le réseau vitreux, cet alcalino-terreux possède des propriétés physico-chimiques distinctes qui conduisent à des caractéristiques de texture et de porosité différentes pour les matériaux dopés en strontium.

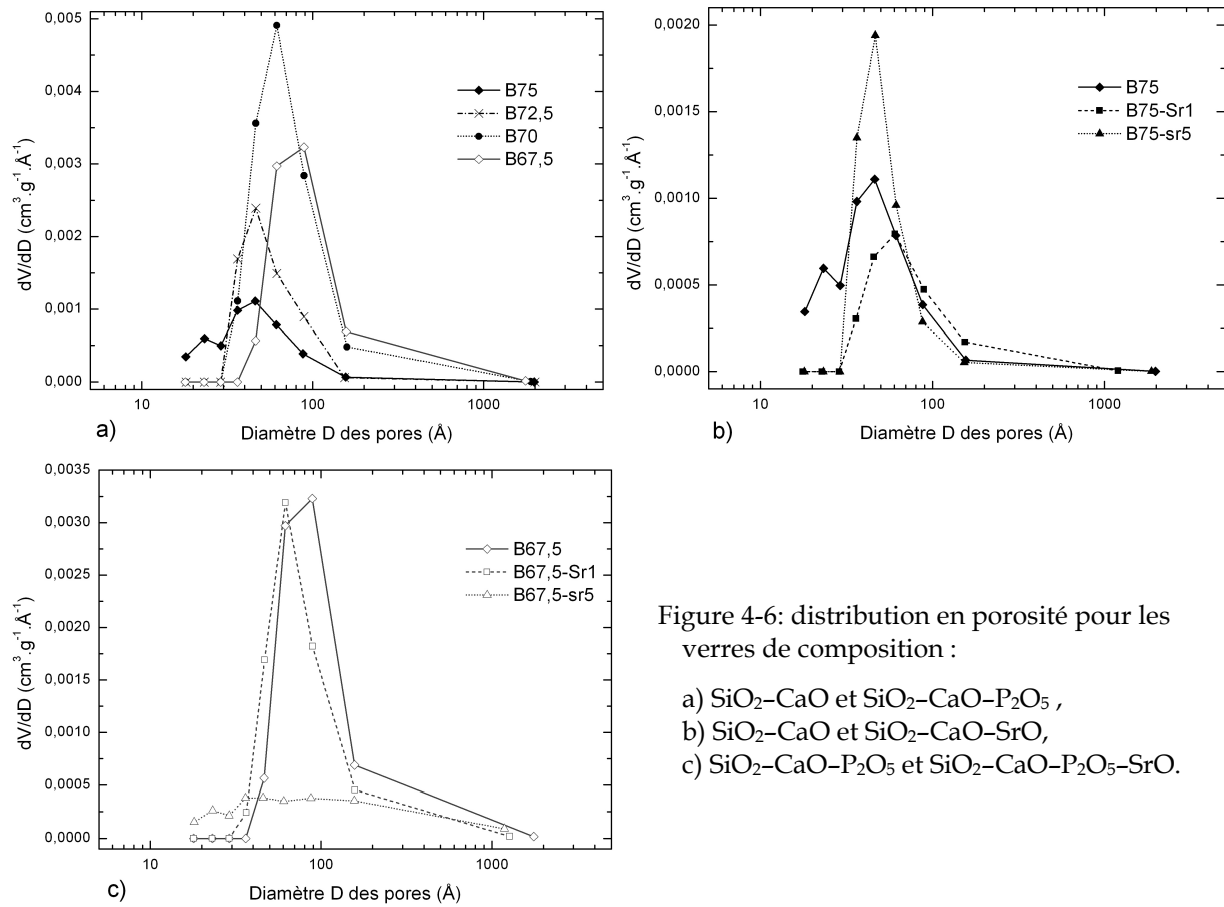


Figure 4-6: distribution en porosité pour les verres de composition :

- a) $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$,
- b) $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$,
- c) $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$.

4.3 Microscopie électronique à balayage

4.3.1 Principe

Outil d'analyse puissant pour obtenir des informations sur la morphologie et la composition chimique d'un objet solide, le MEB (Microscope Électronique à Balayage) permet d'atteindre une résolution de l'ordre de quelques nm et un grandissement jusqu'à plus de 300 000 fois. Le MEB consiste en une fine sonde électronique qui est projetée sur l'échantillon à analyser et dont la longueur d'onde associée autorise le sondage de la matière à une résolution performante.

Les électrons qui bombardent la surface de l'échantillon pénètrent profondément dans le matériau, irradiant un volume appelé poire d'interaction, dont la taille dépend du numéro atomique des éléments constitutifs de l'échantillon ainsi que de l'énergie des électrons incidents (Figure 4-7). Dans ce volume d'interaction, les électrons du faisceau incident perdent leur énergie par collisions multiples avec les atomes du matériau, générant de nombreux phénomènes secondaires : électrons rétrodiffusés qui peuvent atteindre une énergie égale à l'énergie d'accélération, électrons secondaires, électrons Auger, photons visibles, UV, IR, RX, absorption d'électrons, courants induits, élévation de température locale, vibration du ré-

seau... Toutes ces radiations rendent possibles l'observation et l'analyse simultanées d'un objet.

Les électrons secondaires sont créés par le passage d'un électron incident près d'un atome. L'électron incident peut transmettre une partie de son énergie à un électron peu lié de la bande de conduction provoquant ainsi une ionisation par éjection de ce dernier. L'énergie cinétique des électrons secondaires ne peut excéder 50 eV. À cause de cette faible énergie cinétique, seuls les électrons secondaires émis à proximité de la surface (c'est-à-dire tout au plus 10 nm) peuvent s'échapper de l'échantillon et être recueillis par le détecteur. Par conséquent la moindre variation topographique va modifier la quantité d'électrons secondaires collectés. Comme le rendement d'émission des électrons secondaires dépend en outre très peu du numéro atomique des atomes constitutifs de l'échantillon, le contraste obtenu est un contraste topographique.

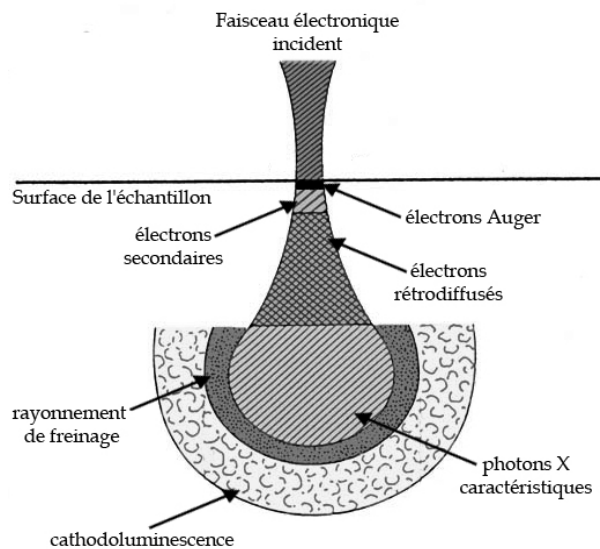


Figure 4-7: radiations émises lors de l'interaction électron-matière.

Les électrons rétrodiffusés résultent de la collision élastique entre les électrons incidents et les atomes de l'échantillon. Les électrons incidents sont alors dispersés dans toutes les directions en cédant une faible partie de leur énergie cinétique initiale ; les électrons rétrodiffusés correspondent à ceux qui sont diffusés à un angle supérieur à 90 °. Du fait de leur forte énergie, les électrons rétrodiffusés détectés peuvent provenir d'une plus grande profondeur que les électrons secondaires : leur sensibilité topographique est nettement inférieure. La quantité d'électrons rétrodiffusés croît avec le numéro atomique des atomes constitutifs de la cible ; le rendement d'émission des électrons rétrodiffusés est proportionnel à la racine carrée du numéro atomique Z . Les images ainsi obtenues ont un contraste en composition chimique.

Les rayons X sont émis lorsqu'un atome ionisé sous l'impact du faisceau d'électrons retourne à son état fondamental. En effet lorsqu'un électron d'une couche interne d'un atome a été éjecté, un électron d'une couche plus externe comble la lacune. La différence d'énergie entre ces deux couches engendre l'émission d'un photon X dont l'énergie est caractéristique de l'élément émetteur. Les photons sont recueillis et classés suivant leurs énergies (EDS⁹) ou leurs longueurs d'onde (WDS¹⁰) afin d'exploiter les informations sur la composition de

⁹ Energy Dispersive Spectrometry : spectrométrie à dispersion d'énergie.

¹⁰ Wavelength Dispersive Spectrometry : spectrométrie à dispersion en longueur d'onde.

l'échantillon. Ils sont très pénétrants et sont émis dans une poire d'interaction de l'ordre du micron cube.

Les électrons Auger sont une autre voie de désexcitation pour les atomes ionisés : la lacune initialement créée par l'électron éjecté est comblée par un électron d'une orbite plus externe. Cet électron périphérique se retrouve à son tour éjecté et peut être détecté. Les électrons Auger possèdent une très faible énergie et sont caractéristiques de l'atome qui les a émis. Ils permettent ainsi d'obtenir des informations sur la composition de l'échantillon et plus particulièrement de la surface de l'échantillon ainsi que sur le type de liaison chimique.

La cathodoluminescence fait référence aux photons dont la fréquence appartient au domaine du visible et de l'IR proche. Ce rayonnement fluorescent est émis notamment par les semi-conducteurs et certaines molécules organiques.

Certains des phénomènes décrits ci-dessus seront plus amplement détaillés dans la Partie III concernant l'analyse par microfaisceau d'ions. Afin d'étudier l'état de surface des verres bioactifs, il a été fait usage du MEB en mode imagerie par électrons secondaires (mode SEI : Secondary Electron Imaging).

4.3.2 État de surface des verres bioactifs avant les essais *in vitro*

La morphologie et la topographie de surface des échantillons de verre bioactifs ont été analysées au moyen d'un microscope à émission par effet de champ avec une tension d'accélération du faisceau électronique réglée à 2,5 kV. Grâce à cette faible énergie d'impact, les effets d'accumulation de charges à la surface des échantillons ont été grandement réduits et il n'a pas été nécessaire de métalliser la surface de nos matériaux. Dans ces conditions, la résolution d'analyse est de l'ordre de quelques centaines de nanomètre, autorisant des grossissements jusqu'à $\times 20\ 000$.

Les images sont présentées en Figures 4-8 et 4-9. Les échantillons possèdent une structure en éponge où l'on distingue très nettement des pores de tailles inhomogènes : la porosité, qui, suite aux procédés de vieillissement et de séchage rapides des gels, semble en partie occluse par endroit, existe à plusieurs échelles, de quelques nanomètres à la centaine de nanomètres. Les matériaux sont mésoporeux, disposant d'une structure ouverte et aérée, ainsi que l'attestait l'analyse par adsorption d'azote.

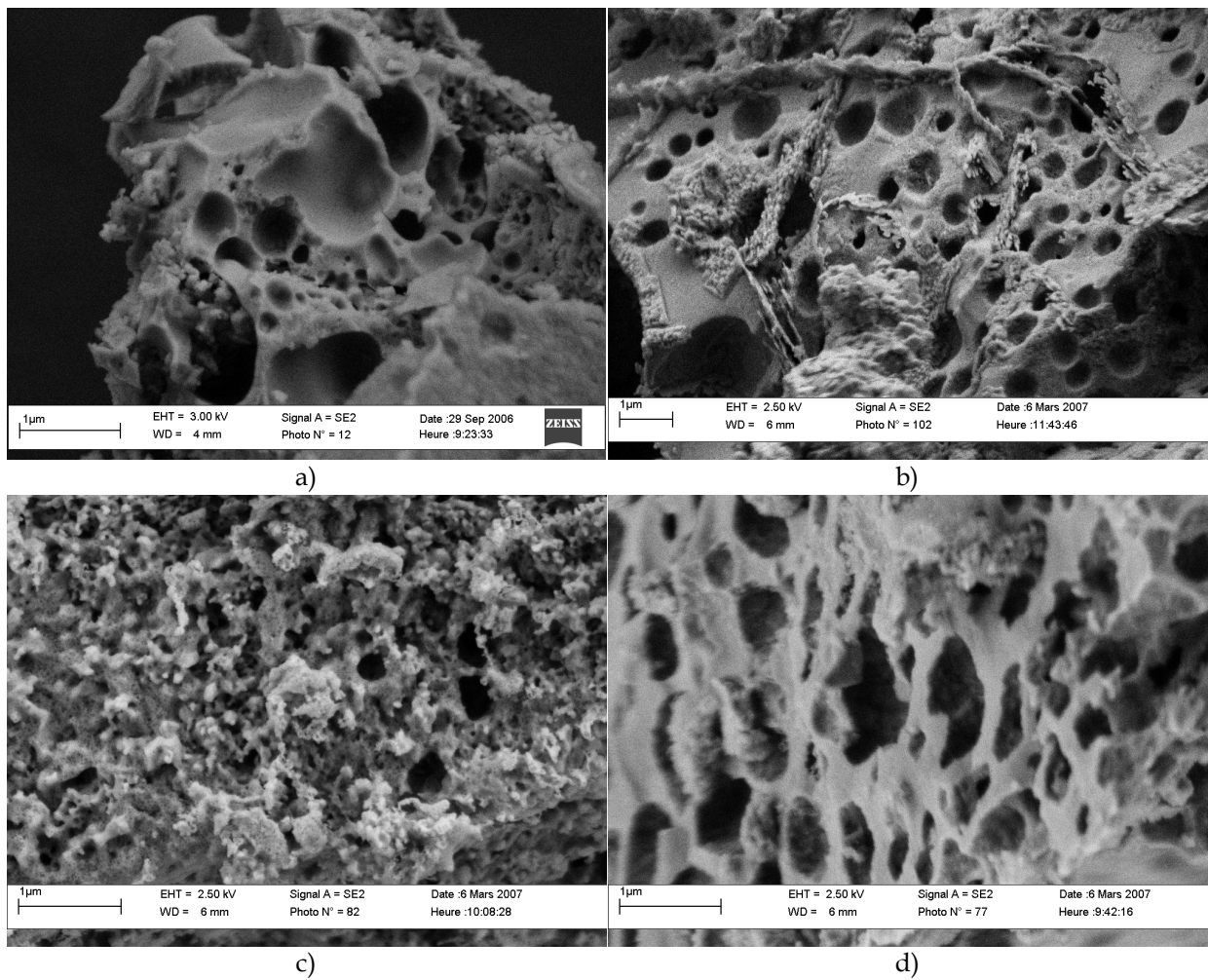
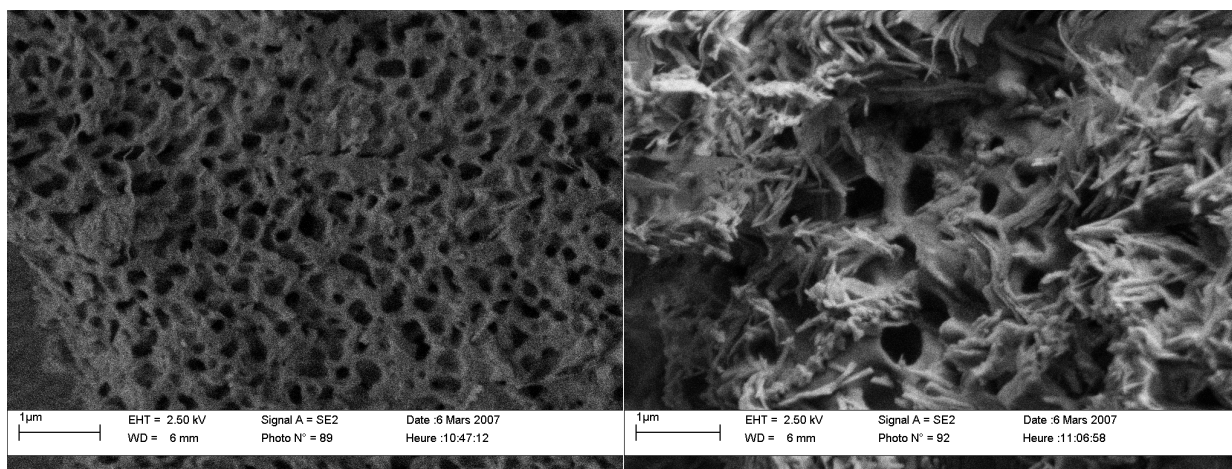
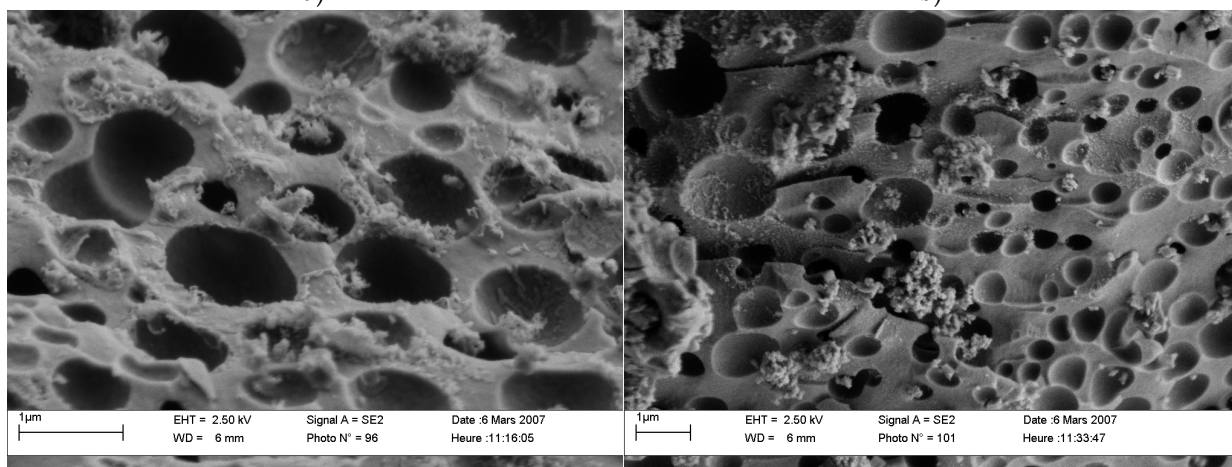


Figure 4-8: images en mode SEI des verres bioactifs binaires et ternaires a) B75, b) B72,5, c) B70 et d) B67,5.



a)

b)



c)

d)

Figure 4-9: images en mode SEI des verres bioactifs dopés en strontium, a) B75-Sr1, b) B75-Sr5, c) B67,5-Sr1 et d) B67,5-Sr5.

Partie III

Caractérisation par microfaisceau d'ions

Chapitre 5

La microsonde PIXE-RBS

Les méthodes d'analyse par faisceau d'ions (PIXE¹¹, RBS¹², STIM¹³, PIGE¹⁴, NRA¹⁵), plus communément désignées par le sigle IBA¹⁶, constituent un ensemble de techniques d'analyse élémentaire et d'imagerie qui tirent parti de l'interaction ion-matière sous ses formes multiples. Elles doivent leur appellation au fait que l'interaction entre les ions incidents et les noyaux atomiques présents dans la matière est à la base de leur mise en œuvre. Les caractéristiques les plus remarquables des microsondes nucléaires sont leur grande polyvalence alliée à d'excellentes performances analytiques, dues à l'utilisation d'ions légers de quelques MeV d'énergie. Autrefois confinées dans les seuls laboratoires de physique nucléaire équipés d'accélérateurs de particules de basse énergie reconvertis pour l'occasion, les microsondes ont profité de la sophistication de dispositifs expérimentaux dédiés pour connaître un essor justifié. Ces instruments possèdent en effet des avantages uniques, en particulier au niveau de la sensibilité de détection, qui les rendent indispensables à la caractérisation physico-chimique des verres bioactifs et à l'étude des éléments traces impliqués dans le processus de bioactivité.

5.1 Les faisceaux d'ions pour l'analyse chimique élémentaire

5.1.1 Différentes techniques de caractérisation

Les différents modes d'analyse associés aux microsondes nucléaires font usage d'un faisceau d'ions légers, principalement des protons $^1\text{H}^+$, deutérons $^2\text{D}^+$ ou particules alpha $^4\text{He}^+$, comme sonde de la matière. La nature du rayonnement secondaire détecté suite au bombardement de l'échantillon par le faisceau incident définit le mode d'analyse. Les différentes techniques de caractérisation, définies dans le Tableau 5-1, peuvent être mises en œuvre simultanément, assurant la collecte d'informations complémentaires.

Technique	Particules incidentes	Interaction	Détection
PIXE	p, α	Ionisation	Photons X
RBS	p, α	Diffusion nucléaire	p, α
STIM	p, α	Perte d'énergie	p, α transmis
PIGE	p	Réaction nucléaire	Photons γ
NRA	p, d	Réaction nucléaire	Particules chargées

Tableau 5-1: caractéristiques des méthodes d'analyse par faisceau d'ions.

¹¹ Particle Induced X-ray Emission : émission X induite par particules chargées.

¹² Rutherford Backscattering Spectrometry : spectrométrie de rétrodiffusion de Rutherford.

¹³ Scanning Transmission Ion Microscopy : microscopie ionique à balayage en transmission.

¹⁴ Particle Induced Gamma-ray Emission : émission gamma induite par particules chargées.

¹⁵ Nuclear Reaction Analysis : analyse par réaction nucléaire.

¹⁶ Ion Beam Analysis : analyse par faisceau d'ions.

Les techniques PIXE et RBS ont été utilisées pour l'analyse élémentaire des verres bioactifs et sont décrites plus amplement ci-après (cf. paragraphes 5.2 et 5.3).

La méthode STIM a trait à la mesure de la perte d'énergie du faisceau après traversée d'une cible, suffisamment mince pour être intégralement parcourue de part en part par les projectiles. Chaque particule incidente étant détectée, il est possible de travailler avec des faisceaux très peu intenses (courants de l'ordre de 10^{-15} A), permettant de réduire leur taille jusqu'aux alentours de 50 nm. Les informations obtenues donnent accès à l'épaisseur de l'échantillon et permettent de produire une cartographie de celui-ci en contraste de densité. Bien que la méthode STIM octroie une moins bonne résolution que la microscopie électronique en transmission, elle permet d'étudier des échantillons plus épais, jusqu'à quelques dizaines de micromètres. Elle est d'autre part souvent associée à la méthode PIXE pour une analyse quantitative et s'avère être d'une grande utilité pour l'imagerie d'échantillons organiques, comme par exemple des coupes minces de tissus biologiques ou des échantillons cellulaires [73, 74].

Les techniques PIGE et NRA reposent sur l'analyse des émissions produites lors des réactions nucléaires consécutives au bombardement de l'échantillon par le faisceau d'ions. Dès lors qu'une particule chargée a une énergie suffisante pour vaincre la répulsion coulombienne qu'oppose le noyau de l'atome cible et que le paramètre d'impact est proche de zéro, elle peut pénétrer dans le noyau de l'atome et donner lieu à une réaction nucléaire. Le noyau cible est modifié et il y a formation d'un noyau résiduel dans un état fortement excité. Ces noyaux nouvellement composés se désintègrent ou se désexcitent en émettant des particules chargées (protons, particules α), détectées en NRA, et/ou un rayonnement gamma, détecté en PIGE. Le caractère nucléaire de ces interactions permet de différencier les isotopes d'un même élément. Mais la détection d'un composant de l'échantillon est subordonnée à l'existence éventuelle d'une réaction nucléaire appropriée. D'autre part, les méthodes PIGE et NRA sont limitées à la détection des éléments légers de numéro atomique inférieur à 17, car au-delà l'énergie communiquée par l'accélérateur aux ions du faisceau, généralement inférieure à 5 MeV, n'est pas suffisante pour vaincre la barrière coulombienne [75].

Les microsondes nucléaires, par la grande diversité des techniques proposées, octroient donc la récolte d'un très riche panel d'informations. Il est ainsi possible d'explorer quasiment tout le tableau périodique en une seule analyse multiélémentaire. Au vu des éléments composant les verres bioactifs étudiés, caractérisés par un numéro atomique Z inférieur à 38, nous avons fait usage de la microsonde PIXE couplée à la spectroscopie RBS.

5.1.2 Pénétration des ions dans la matière

Les ions du faisceau subissent une perte d'énergie graduelle suite à leur pénétration dans le matériau. Ils y sont ralentis par de multiples collisions élastiques et inélastiques le long de leur trajectoire, jusqu'à éventuellement leur arrêt complet. Dans le domaine d'énergie des microsondes nucléaires (500 keV à 5 MeV), ce processus de ralentissement est principalement dû aux multiples interactions avec les électrons. Les ions, en cédant leur énergie aux électrons des atomes, provoquent de la sorte une forte ionisation. Mais la masse d'un ion étant très supérieure à celle d'un électron, les particules incidentes sont très peu déviées et leur trajectoire est quasiment rectiligne. Néanmoins, lorsqu'ils arrivent au terme de leur parcours, les ions interagissent fortement avec les noyaux : ils subissent des chocs successifs et leur trajectoire est à ce moment considérablement modifiée. Ainsi le parcours des ions dans la matière est limité par ces deux types d'interactions : électroniques et nucléaires. Le processus total de ralentissement est bien décrit par le pouvoir d'arrêt $S(E)$. Exprimé en MeV/cm (ou également

en $MeV.cm^2/g$, ce paramètre représente la perte d'énergie par unité de longueur traversée (ou par unité de masse superficielle traversée) [76] :

$$S(E) = \left| \frac{dE}{dx} \right| \text{ en } MeV/cm$$

ou

$$S(E) = \frac{1}{\rho} \left| \frac{dE}{dx} \right| \text{ en } MeV.cm^2/g \quad (5.1)$$

$$\text{avec } \frac{dE}{dx} = \left(\frac{dE}{dx} \right)_{\text{électronique}} + \left(\frac{dE}{dx} \right)_{\text{nucléaire}} \quad (5.2)$$

où ρ est la densité de matière traversée (g/cm^3) et x la profondeur (cm). En première approximation, la contribution du terme relatif aux interactions nucléaires est négligeable dans le domaine d'énergie s'étalant de 500 keV à 5 MeV.

Les pouvoirs d'arrêt de la plupart des éléments du tableau périodique ont été déterminés expérimentalement ou par des relations semi-empiriques [77, 78]. Le pouvoir d'arrêt $S_M(E)$ d'un matériau composé de n éléments est calculé grâce à une loi d'additivité énoncée par Bragg, considérant que la perte d'énergie globale est la somme des pertes d'énergies $S_i(E)$ dues aux différents éléments i , proportionnellement à leur abondance dans le matériau :

$$S_M(E) = \sum_{i=1}^n w_i \cdot S_i(E) \quad (5.3)$$

où w_i est la fraction massique de l'élément i .

Le parcours R d'un ion dans la matière donne une bonne estimation de sa profondeur d'arrêt de l'ion dans le matériau. Il est calculé par intégration du pouvoir d'arrêt :

$$R = \int_{E_0}^0 \frac{dE}{S(E)} \quad (5.4)$$

où E_0 est l'énergie initiale de l'ion incident.

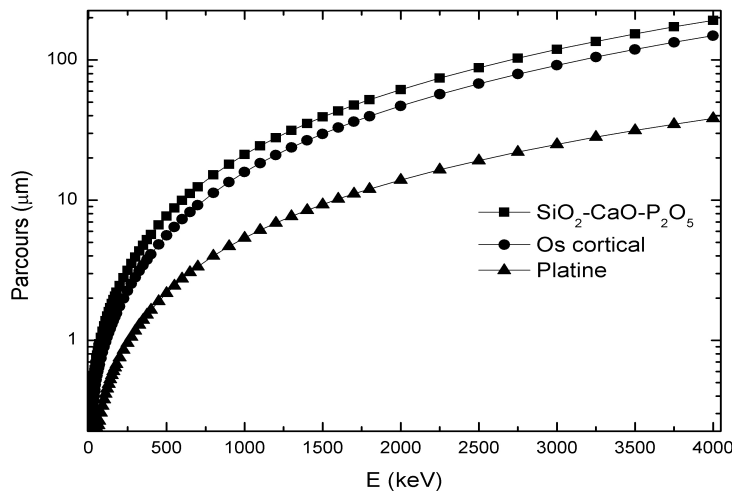


Figure 5.1: évolution du parcours moyen R d'un faisceau de protons dans un verre bioactif $SiO_2-CaO-P_2O_5$, dans un os cortical adulte et dans du platine en fonction de l'énergie des particules.

La Figure 5.1 représente le parcours d'un faisceau de protons dans différents matériaux en fonction de l'énergie d'accélération, simulé au moyen du logiciel SRIM¹⁷. Cette simulation indique que le faisceau de protons utilisé en PIXE permet de sonder les verres étudiés jusqu'à une profondeur de plusieurs dizaines de microns ; il en résulte que si l'on désire analyser les phénomènes apparaissant en surface des verres bioactifs, à savoir le développement de couches phosphocalciques localisées sur tout au plus quelques microns d'épaisseur, il est impératif de réaliser des coupes transverses fines de nos matériaux.

5.2 Émission X induite par particules chargées : PIXE

5.2.1 Présentation de la méthode

Les rayons X furent découverts en 1895 par Wilhelm Roentgen, ce qui lui valut le premier prix Nobel de physique de l'Histoire [79]. Depuis de nombreuses méthodes d'analyse physique se sont basées sur la détection des rayons X émis par des atomes suite à un bombardement de particules.

La méthode PIXE a été mise au point en 1970 par Sven Johansson et ses collaborateurs de l'Institut de Technologie de Lund en Suède, qui mirent à profit le développement de détecteurs de photons Si(Li) à haute résolution [80, 81]. L'un des grands avantages de la méthode PIXE est qu'elle tire parti d'un faisceau de protons ou de particules alpha accélérés dans la gamme du MeV pour assurer la production de rayons X avec un bon rendement. Il en résulte un excellent rapport signal/bruit de fond. Outre le fait que la PIXE est une méthode d'analyse multiélémentaire, c'est sa très grande sensibilité qui la distingue : celle-ci peut atteindre le ppm, ce qui fait de la PIXE un outil majeur pour l'étude des éléments traces. D'autre part, l'analyse est non destructive à l'échelle macroscopique. L'ensemble de ces spécificités fait de la PIXE une méthode prisée pour l'étude des objets d'art, des composants électroniques et des matériaux biologiques [82].

5.2.2 Principe physique : la fluorescence X

Le phénomène de fluorescence X peut schématiquement être décomposé en deux étapes : l'ionisation suite au bombardement des atomes cibles par le faisceau incident de protons ou de particules alpha, puis l'émission X proprement dite. À chacune de ces étapes est associée une probabilité ou un rendement pour la réalisation du processus. Après collision, les particules incidentes peuvent elles-mêmes subir d'autres diffusions élastiques ou inélastiques [83].

L'ionisation d'une couche interne, par éjection hors de son orbitale d'un électron des couches atomiques profondes, engendre la création d'une lacune électronique. Lorsque celle-ci est comblée par la transition d'un électron provenant d'une couche plus externe, il s'ensuit une libération d'énergie correspondant à la différence des énergies de liaison sur les couches électroniques impliquées. Cette énergie peut alors être dissipée selon différents modes qui sont en compétition : soit directement par l'émission d'un photon X, auquel cas il s'agit d'une transition radiative, soit indirectement par transfert à un électron périphérique, qui est éjecté, donnant lieu à l'émission d'électron Auger, une transition non radiative sur laquelle nous re-

¹⁷the Stopping and Range of Ions in Matter (SRIM) : logiciel développé par James Ziegler, permettant de décrire pas à pas le cheminement d'ions d'énergie donnée dans un milieu fixé en prenant en compte l'ensemble des processus d'excitation et d'ionisation ainsi que les déplacements d'atomes.

viendrons plus en détail. S'il y a transition radiative, alors l'énergie du photon X est dépendante du numéro atomique Z de l'élément émetteur, selon la loi énoncée par Moseley en 1914 [84] :

$$E = C \cdot (Z - s)^2 \quad (5.5)$$

où C et s sont des constantes dépendant du type de raie correspondant à la transition spectrale.

Seules certaines transitions radiatives sont permises. En effet, dans le formalisme du modèle en couches électroniques, les règles de sélection pour les transitions électromagnétiques sont les suivantes [85] :

$$\Delta n \geq 1, \Delta l = \pm 1 \quad \text{et} \quad \Delta J = \pm 1 \text{ ou } 0$$

où n est le nombre quantique principal.

l est le nombre quantique associé au moment angulaire orbital.

J est le nombre quantique associé au moment angulaire total.

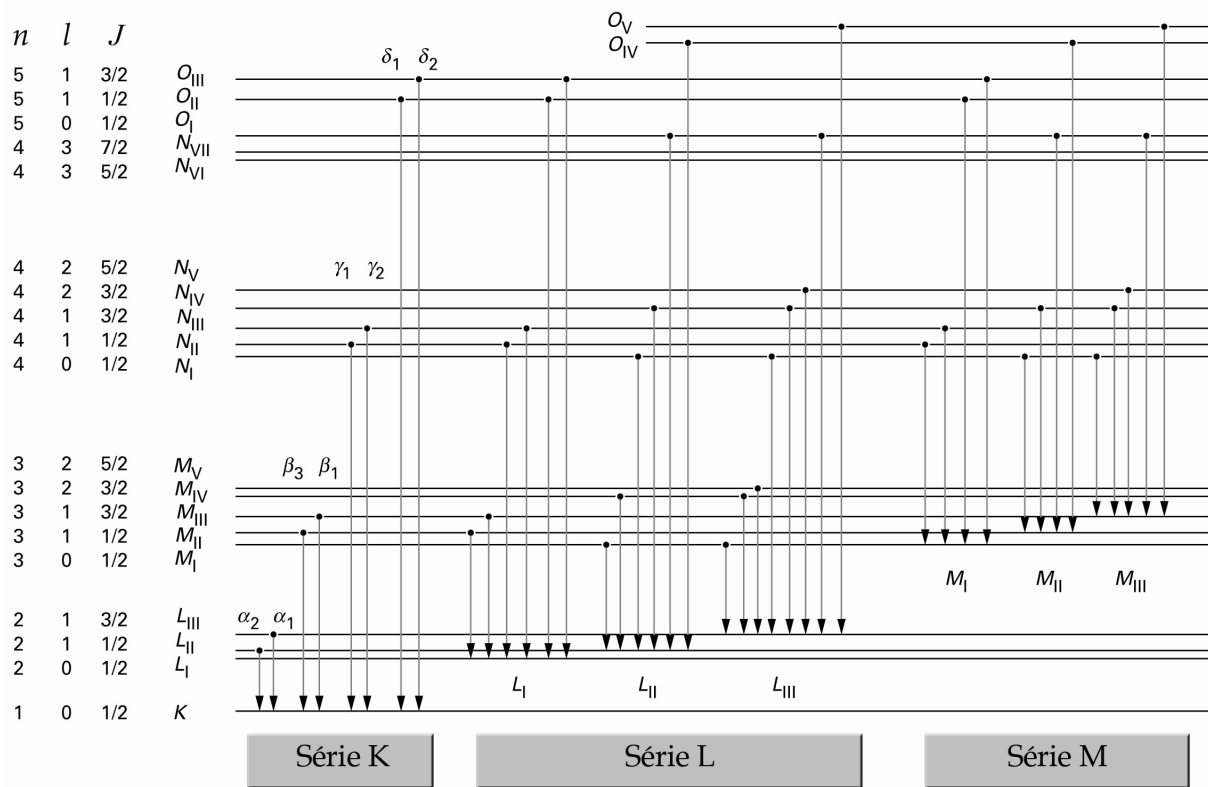


Figure 5.2: principales transitions radiatives autorisées pour les séries K, L et M.

La Figure 5.2 illustre ceci. Les règles sélectives impliquent qu'à la suite d'une ionisation de la couche K, les seules raies X qui puissent être émises correspondent aux transitions L_{II} -K et L_{III} -K (notées respectivement K_{α_1} et K_{α_2} dans la nomenclature de Siegbahn), aux transitions M-K (notées raies K_{β_1} , K_{β_3}), ou encore aux transitions N-K (notées K_{γ_1} , K_{γ_2}). Généralement l'émission du groupe K_{β} est moins probable que celle du groupe K_{α} . D'autre part, la différence d'énergie entre certaines raies appartenant à la même série est inférieure à la résolution des détecteurs Si(Li) ; c'est le cas par exemple entre les raies K_{α_1} - K_{α_2} et entre les raies K_{β_1} - K_{β_3} , ceci jusqu'au numéro atomique $Z = 40$. Sur les spectres X obtenus avec de tels

détecteurs, ces raies d'énergie proches sont confondues. Ainsi on regroupe souvent ces transitions spectrales, en définissant une raie unique K_α ou K_β , somme des contributions dues aux différentes transitions L-K ou M-K, pondérées par leurs intensités respectives m_i :

$$K_\alpha = \sum_i m_i \cdot K_{\alpha_i} \quad , \quad K_\beta = \sum_i m_i \cdot K_{\beta_i}$$

De même on définit pour la série L les raies L_α , L_β et L_γ . La Figure 5.3 représente l'évolution des énergies caractéristiques des raies K, L et M suivant le numéro atomique. Il en résulte que l'analyse d'un échantillon se fera préférentiellement au moyen des raies K et L. Le choix de l'une ou l'autre se fonde sur le numéro atomique des éléments en présence, sans oublier les caractéristiques du détecteur de photons X ; par exemple l'efficacité des détecteurs Si(Li) est constante sur l'intervalle d'énergie 1-25 keV, mais chute grandement en dehors. En pratique, les éléments de $Z < 50$ sont analysés via leurs raies K tandis que ceux de $Z > 50$ le sont via leurs raies L. Sur ces considérations, les verres bioactifs seront étudiés au moyen des raies K pour les éléments silicium, phosphore, calcium, strontium et magnésium.

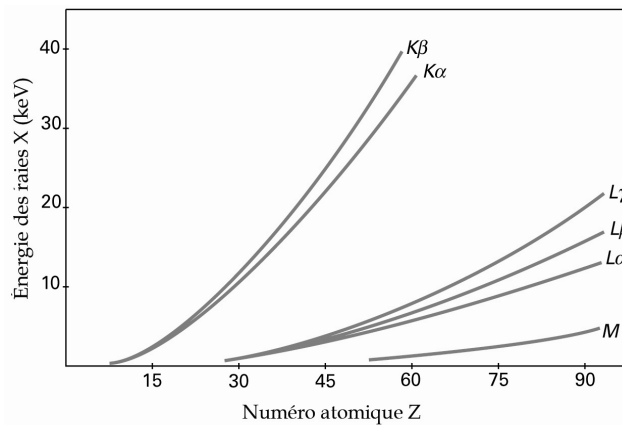


Figure 5.3: énergie des raies K, L et M en fonction du numéro atomique, d'après [85, 86]

5.2.3 Rendement de fluorescence

La production de rayons X n'est pas systématique et entre en compétition avec d'autres procédés non radiatifs qui sont l'émission d'électrons Auger et les transitions de Coster-Krönig. La Figure 5.4 représente ces phénomènes concurrents.

Après que la lacune créée ait été comblée par la transition d'un électron d'une couche plus externe, l'excès d'énergie résultant peut être dissipé par l'éjection d'un électron d'un état moins lié plutôt que par l'émission d'un photon. Ceci correspond à l'émission d'un électron Auger. La probabilité d'avoir un effet Auger augmente à mesure que la différence d'énergie entre les états potentiellement impliqués dans ce phénomène diminue. La probabilité d'effet Auger est donc maximale pour les éléments légers. Le réarrangement du cortège électronique qui suit l'émission d'un électron Auger octroie alors une nouvelle opportunité pour l'émission d'un photon X, qui sera cette fois-ci caractéristique du nouvel emplacement de la lacune.

Les transitions de Coster-Krönig, quant à elles, ne concernent pas la couche K. Elles consistent en la redistribution de la lacune électronique entre les sous-couches d'un même niveau de nombre quantique principal donné. Les transitions de Coster-Krönig sont plus rapides que les transitions intercouches ; à cause de cette redistribution, une lacune originellement créée dans une sous-couche peut être déplacée vers une sous-couche supérieure, puis être comblée par une autre transition, radiative ou non [85].

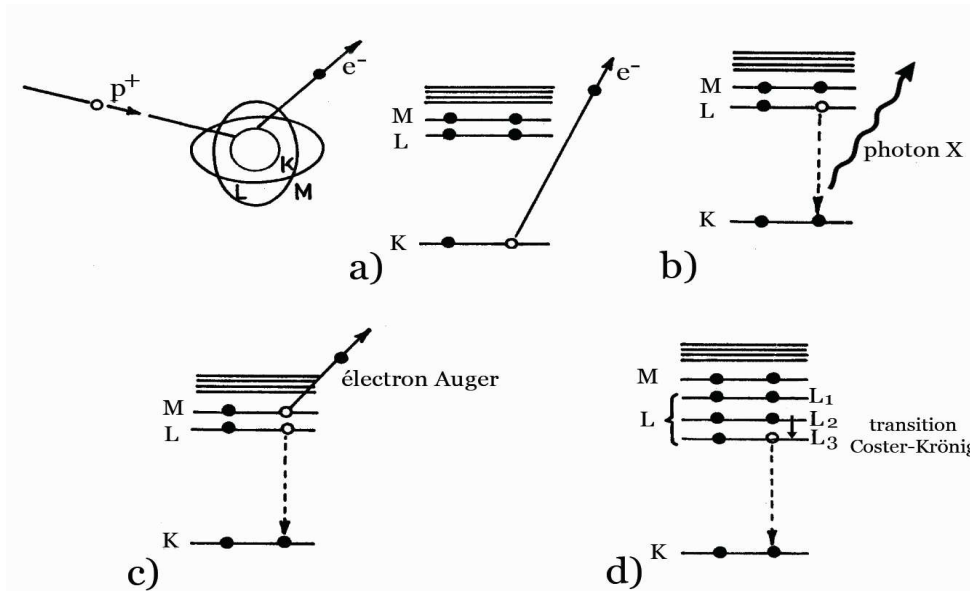


Figure 5.4: a) ionisation de la couche K d'un atome cible suite au bombardement d'une particule chargée pouvant induire b) l'émission d'un photon X, c) l'émission d'un électron Auger, d) des transitions de Coster-Krönig.

L'existence de ces phénomènes concurrentiels a amené à définir le rendement de fluorescence ω . Ce paramètre peut être décrit comme la probabilité pour que la lacune créée dans une couche donne lieu à l'émission d'un photon X, ou bien encore comme le rapport entre le nombre de photons X émis sur le nombre de lacunes initialement créées dans cette couche. L'évolution du rendement de fluorescence est représentée sur la Figure 5.5. Il y apparaît d'une part que l'émission Auger est prépondérante pour les éléments légers alors que les transitions radiatives dominent pour les atomes lourds, et d'autre part que le rendement de la couche L est beaucoup plus faible que celui de la couche K [89].

Si les rendements de fluorescence des couches L ne sont pas connus avec une grande précision (entre 20 et 30 % d'incertitudes pour ceux des éléments légers), ceux des couches K ont été déterminés expérimentalement avec une erreur relative inférieure à 5 % et peuvent être modélisés au moyen de la relation empirique suivante [87, 88] :

$$\left(\frac{\omega_K}{1 - \omega_K} \right)^{1/4} = 0,033 + 0,032 \cdot Z - 2,810^{-7} \cdot Z^3 \quad (5.6)$$

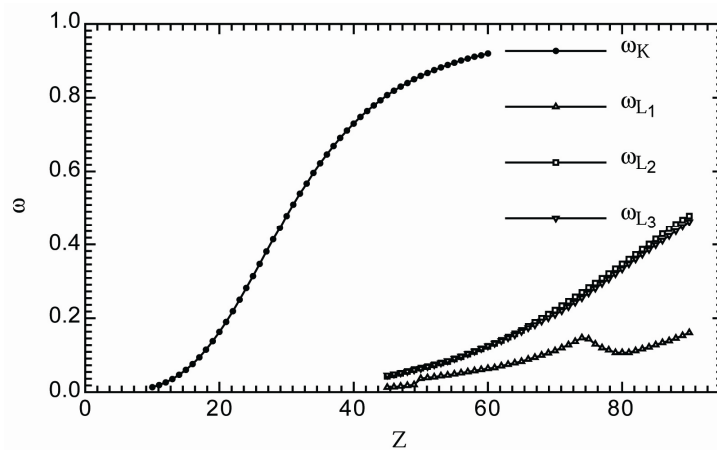


Figure 5.5: rendement de fluorescence expérimental des couches K et L en fonction du numéro atomique Z, d'après [86, 89].

5.2.4 Sections efficaces

5.2.4.1 Section efficace d'ionisation par particules chargées

La probabilité d'ionisation d'une couche atomique par le faisceau de particules incident est représentée par la section efficace d'ionisation, notée σ^I_s , où $s = K, L, M, \dots$. Des modèles théoriques décrivent l'ionisation des couches atomiques profondes par les protons et particules alpha utilisés comme projectiles. Ces modèles sont valables dans la gamme d'énergie utilisée en PIXE, à savoir de 0,5 à 5 MeV par nucléon. Leur principe repose sur l'interaction coulombienne entre un électron lié et le noyau de la particule chargée incidente et donnent accès au calcul de la section efficace d'ionisation d'un atome par une particule chargée.

Le modèle théorique le plus utilisé est l'approximation de Born en ondes planes, notée PWBA¹⁸, et qui met en relation la section efficace d'ionisation, l'énergie des particules incidentes et le numéro atomique de l'atome ionisé. Les autres modèles couramment employés sont l'approximation semi-classique, dénommée SCA¹⁹, qui fait intervenir le paramètre d'impact dans le calcul de la section efficace, et l'approximation du choc binaire, nommée BEA²⁰, qui simplifie grandement l'interaction binaire régie par les lois classiques entre un proton et un électron [90]. Ces modèles ne seront pas détaillés dans le cadre de ce travail, mais il est utile de retenir qu'ils rendent compte des trois observations suivantes :

- pour une énergie d'incidence E fixée, σ^I_s décroît rapidement à mesure que le numéro atomique Z de la cible augmente ;
- pour un atome cible de numéro atomique Z donné, σ^I_s augmente avec E , atteint une valeur maximale puis diminue. L'énergie correspondant au maximum est d'autant plus élevée que Z est grand.
- de la dépendance de σ^I_s en $\left(\frac{E}{A}\right)^4$ en fonction de l'énergie par nucléon (E/A) du projectile. Ceci explique notamment le choix d'utiliser des protons plutôt que des particules alpha, en vue d'optimiser la section efficace d'ionisation.

Il existe par conséquent un nombre important de données théoriques et expérimentales concernant σ^I_s . Pour un utilisateur de la PIXE, l'approche la plus courante consiste à adopter les données prédites par la théorie ECPSSR²¹ [91]. Ce modèle, développé par Brandt et Lapicki, introduit une série de modifications dans le modèle PWBA. Les corrections incorporées tiennent compte de la perte d'énergie du projectile durant la collision, de la déviation du projectile par le champ coulombien du noyau, de la perturbation des états stationnaires de l'atome par le projectile ainsi que des effets relativistes. Le modèle ECPSSR a été plus tard utilisé par Cohen et Harrigan [92] pour calculer et publier une table des sections efficaces d'ionisation en protons et en alpha, qui fait figure de référence. La Figure 5.6 illustre l'évolution des sections efficaces d'ionisation ECPSSR en fonction de l'énergie des particules incidentes. Enfin, il est à noter que Johansson et Campbell [93] ont vérifié expérimentalement les valeurs de section efficace prédites par la théorie ECPSSR. Ces valeurs de référence sont

¹⁸ Plane Wave Born Approximation.

¹⁹ Semi-Classical Approximation.

²⁰ Binary Encounter Approximation.

²¹ Energy loss, Coulomb field, Perturbation of the atomic Stationary States, Relativistic effects.

désormais utilisées par le logiciel GUPIX²², programme dont nous avons fait usage pour le traitement des données de l'analyse PIXE.

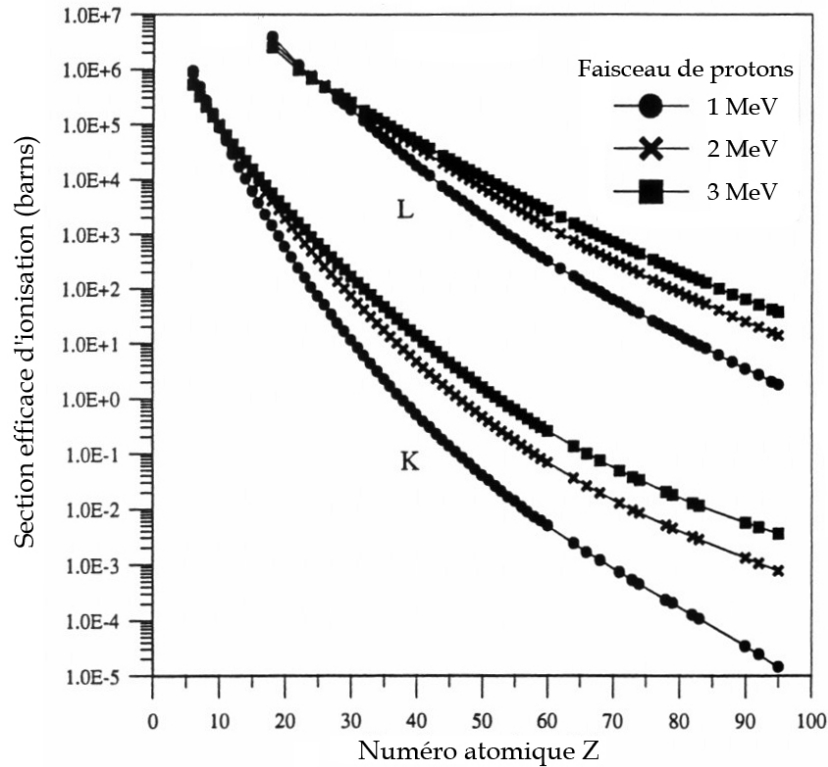


Figure 5.6: évolution des sections efficaces d'ionisation ECPSSR des couches K et L suivant le numéro atomique de la cible, pour un faisceau de protons d'énergie 1, 2 et 3 MeV, d'après [94, 95].

5.2.4.2 Section efficace totale de production des X

L'analyse quantitative des données spectrales acquises en PIXE nécessite la connaissance de la section efficace de production des rayons X notée σ_s^X , et ceci avec exactitude. La section efficace de production σ_s^X concernant une transition radiative ayant lieu sur la couche s est exprimée à partir des paramètres précédemment définis selon :

$$\sigma_s^X = \sigma_s^I \omega_s k \quad (5.7)$$

où k est la probabilité relative que la raie X considérée soit émise : c'est le rapport de l'intensité d'émission de la raie considérée (K_α, K_β, \dots) sur l'intensité totale des rayons X émis par la couche s.

Les sections efficaces des raies K_α et des raies L cumulées ont été déterminées par Grime et Watt pour des protons de diverses énergies d'incidence, sur la base des travaux de Johansson [96]. Les valeurs de ces sections efficaces en fonction de l'énergie sont tracées sur la Figure 5.7. Pour l'émission de raies K_α , il s'avère que les sections efficaces de production des X peuvent dépasser la centaine de barns²³ pour les éléments de numéro atomique situé entre 12 et 35. Ainsi, une énergie d'incidence de l'ordre du MeV est déjà suffisante pour atteindre la section efficace optimale en raie K des éléments majeurs présents dans les verres

²² Guelph PIXE Software Package (GUPIX) : logiciel permettant le traitement quantitatif des spectres X obtenus en PIXE.

²³ un barn vaut 10^{-24} cm², dimension qui correspond approximativement à 10 fois la section géométrique d'un proton.

bioactifs, à savoir le silicium, le phosphore et le calcium. En revanche, le strontium étant un élément plus lourd ($Z = 38$), l'optimisation de la section efficace de cet élément impose d'augmenter l'énergie d'incidence des protons.

Sur ces considérations, il a été choisi d'analyser les verres bioactifs au moyen d'un faisceau de protons d'énergie 1,5 MeV pour les verres de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, et d'énergie 2,9 MeV pour les verres dopés $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$.

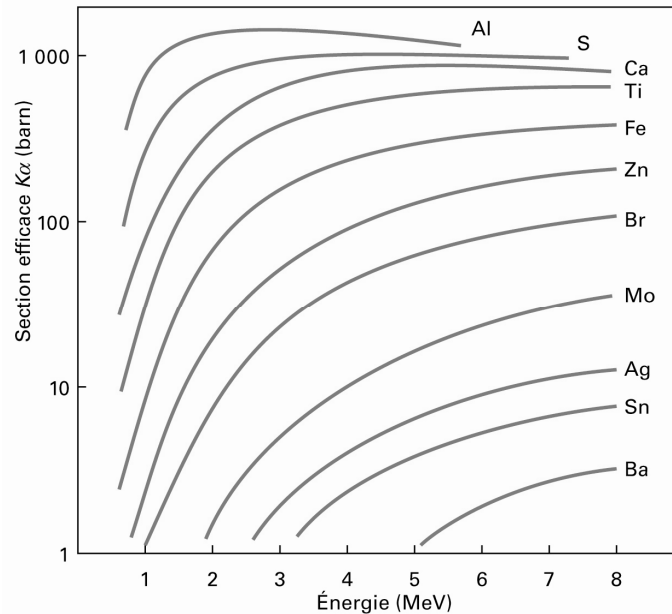


Figure 5.7: section efficace de production des rayons X pour les raies K_α de quelques éléments en fonction de l'énergie d'incidence du faisceau de protons, d'après [85].

5.2.5 Bruit et interférences spectrales

5.2.5.1 Bruit de fond continu

La présence de bruit de fond peut masquer en partie ou totalement le signal X d'un élément présent en faible concentration. Ce bruit de fond prend la forme d'un continuum d'intensité maximale à basse énergie et est dû principalement à trois composantes : le rayonnement de freinage des particules incidentes, des électrons secondaires et la diffusion Compton.

Le rayonnement de freinage des particules incidentes est produit suite au ralentissement des ions incidents lors de leur interaction avec les noyaux cibles. Ce rayonnement électromagnétique, communément appelé Bremsstrahlung, apparaît à chaque fois qu'une particule subit une accélération ou une décélération, et présente une distribution énergétique qui s'étale de zéro jusqu'à l'énergie cinétique initiale des projectiles. Sur le spectre X obtenu lors de l'analyse PIXE, le Bremsstrahlung des particules incidentes prédomine aux hautes énergies (Figure 5.8). La section efficace de ce phénomène est [97] :

$$\frac{d\sigma}{dE_X} = C \cdot \frac{A \cdot Z^2 \cdot Z_1^2}{E \cdot E_X} \cdot \left(\frac{Z}{A} - \frac{Z_1}{A_1} \right) \quad (5.8)$$

où E_X est l'énergie du rayonnement X émis.

Z , A et E sont respectivement la charge, la masse et l'énergie de la particule incidente.

Z_1 et A_1 sont la charge et la masse de l'atome cible.

L'équation 5.8 implique que la section efficace de production de ce rayonnement de freinage diminue à mesure que l'énergie des projectiles augmente. D'autre part, cette relation indique que la contribution du Bremsstrahlung des projectiles s'annule lorsque particule incidente et cible possèdent un même rapport (Z/A). Pour une cible de faible numéro atomique, notamment les échantillons organiques, ce rapport est voisin de $1/2$. Par conséquent ce bruit de fond disparaît lorsque des particules alpha sont utilisées comme projectiles. En revanche ce n'est pas le cas pour les protons.

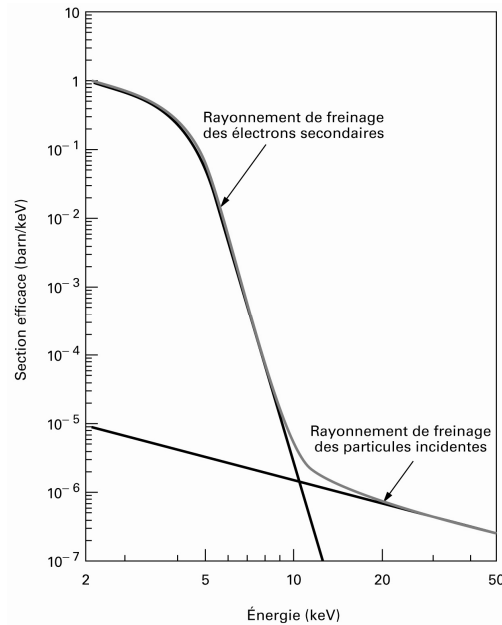


Figure 5.8: évolution de la section efficace d'émission des différentes composantes du rayonnement de freinage en fonction de l'énergie. La section efficace somme est représentée en grisé. Le Bremsstrahlung a été généré à un angle de 90° par des protons de 3 MeV bombardant du carbone [97].

Le rayonnement de freinage des électrons secondaires éjectés de la cible au cours de l'irradiation est la principale source de bruit de fond en PIXE. Il intervient lorsque les électrons secondaires interagissent à leur tour avec les atomes de la cible en perdant de leur énergie. Le ralentissement par interaction coulombienne avec les noyaux cibles donne naissance à un rayonnement continu limité à la partie basse énergie du spectre X [98]. En effet l'énergie maximale qu'un proton incident peut transmettre à un électron libre au cours d'une collision directe est :

$$E_{\max} = 4 \frac{m_e}{M} \cdot E \quad (5.9)$$

où E est l'énergie d'incidence du proton.

M est la masse du proton.

m_e est la masse de l'électron.

L'intensité du Bremsstrahlung des électrons secondaires décroît très rapidement au-dessus de E_{\max} . Le Bremsstrahlung des électrons secondaires a une distribution anisotrope, comme l'ont démontré Ishii et ses collaborateurs [99]. Enregistré sur un détecteur Si(Li) placé à 135° par rapport à l'incidence du faisceau, l'intensité de ce bruit de fond à basse énergie diminue de 40 % comparativement à un détecteur placé à 90° . La géométrie de la chambre d'analyse dont nous avons fait usage tient compte de cette observation pour le placement des détecteurs.

La diffusion Compton du rayonnement gamma émis éventuellement par la cible est essentiellement due au phénomène d'excitation coulombienne des noyaux. En effet les collisions entre projectiles et noyaux cibles peuvent donner lieu à une réaction nucléaire du type (p, γ) ou (α, γ) . Les photons gamma ainsi produits ont une énergie de plusieurs centaines de keV et sont susceptibles de céder une partie de leur énergie aux électrons du détecteur par le phénomène de diffusion Compton. Ceci parasite le spectre de rayons X et apparaît sous la forme d'un bruit de fond plat. La production du rayonnement gamma dépend de l'énergie du faisceau incident et de la composition élémentaire de la cible : par exemple le rendement des réactions nucléaires conduisant à l'émission de gamma est très élevé pour les éléments légers. Cependant, pour un faisceau de protons d'énergie inférieure à 3 MeV ce bruit de fond du au rayonnement gamma n'apparaît que rarement, car il faut nécessairement des énergies plus importantes pour franchir la barrière coulombienne de la cible.

5.2.5.2 Fluorescence secondaire

En plus de l'excitation directe des atomes cibles par les particules incidentes du faisceau, d'autres processus peuvent engendrer l'émission de photons X caractéristiques : l'ionisation par des électrons secondaires, la fluorescence X provoquée par l'absorption de l'émission continue du bruit de fond et la fluorescence secondaire induite par les photons X eux-mêmes. Parmi ces trois phénomènes, la fluorescence secondaire est la plus importante source d'interférences spectrales.

Lorsqu'une raie est émise très intensément par l'échantillon analysé, le phénomène de fluorescence secondaire peut apparaître. C'est le cas lorsque les photons X émis, au cours de leur trajet vers la sortie, interagissent dans l'échantillon cible en ionisant de nouveaux atomes : c'est le processus de photoionisation, qui peut ainsi induire de nouvelles transitions radiatives. L'émission résultante est la fluorescence secondaire. Seules les couches dont le seuil d'absorption critique est situé au-dessous de l'énergie de la raie X primaire peuvent être ionisées. En pratique seuls les atomes dont le numéro atomique est inférieur à celui de l'atome émetteur primaire peuvent donc être affectés par ce phénomène. Plus la différence entre l'énergie d'excitation de la raie primaire et l'énergie de la discontinuité d'absorption de l'atome cible est faible, plus la probabilité de photoionisation est grande. La fluorescence secondaire apparaît par conséquent en excitation K vers K pour des éléments émetteurs primaires et secondaires de numéro atomique très proche, et en excitation L vers K pour des couples émetteurs primaires lourds et émetteurs secondaires légers. Si les conditions favorables à ce phénomène sont réunies, la contribution de la fluorescence secondaire à l'émission X totale peut atteindre plusieurs dizaines de pourcent. Sur le spectre X, cette fluorescence a comme conséquence une diminution de l'intensité de la raie de l'émetteur primaire au profit de celle de la raie de l'émetteur secondaire, induisant une quantification erronée du spectre X. La formule de Reuter et ses collaborateurs [100], qui exprime le rapport des intensités entre l'émission primaire et l'émission secondaire, permet d'apporter les corrections nécessaires pour une quantification juste.

5.2.5.3 Autres sources d'interférences

D'autres types d'interférences spectrales sont introduites par le détecteur X et sont dues au fonctionnement même de la chaîne d'acquisition. Ces phénomènes sont détaillés dans le paragraphe 6.2.2.2.

5.2.6 Analyse quantitative

5.2.6.1 Calcul des concentrations

À partir du spectre X enregistré en PIXE, l'analyse quantitative consiste en l'identification des raies caractéristiques des éléments en présence et en la conversion de leur intensité en concentration élémentaire.

Pour un faisceau de N_p particules incidentes bombardant une cible constituée d'un élément de numéro atomique Z , le nombre dN_Z^X de photons émis pour une raie particulière sur une distance dx du parcours des protons est :

$$dN_Z^X = N_p \cdot N_Z \cdot \sigma_s^X(Z, E) \cdot dx \quad (5.10)$$

où

N_Z est la concentration de l'élément Z en atome/cm³.

N_p est le nombre de particules incidentes.

dx est l'élément d'épaisseur de cible où a lieu l'interaction et est exprimé en cm.

σ_s^X est la section efficace totale de production des rayons X : $\sigma_s^X = \sigma_s^i \omega_s k$.

L'équation 5.10 peut également être exprimée en terme de concentration massique de l'élément Z selon :

$$dN_Z^X = N_p \cdot \frac{C_Z \cdot N_A}{A_Z} \cdot \sigma_s^X(Z, E) \cdot dx \quad (5.11)$$

où

C_Z est la concentration massique de l'élément Z en g/cm³.

N_A est le nombre d'Avogadro : $N_A = 6,023 \cdot 10^{23}$ atomes/mol.

A_Z est la masse molaire de l'élément Z .

Cependant le nombre réel de photons collectés par le détecteur diffère de l'équation 5.10 ; pour accéder au nombre réel il faut faire intervenir des paramètres liés à l'atténuation des photons X ainsi que d'autres liés à la détection et au dénombrement des particules incidentes :

$$dN_Z^X = N_p \cdot N_Z \cdot \sigma_s^X(Z, E) \cdot T_{éch}(Z, E) \cdot T_{abs}(Z) \cdot \varepsilon \cdot \frac{\Omega}{4\pi} \cdot dx \quad (5.12)$$

où

Ω est l'angle solide de détection.

ε est l'efficacité du détecteur.

T_{abs} est le coefficient de transmission à travers les divers filtres absorbants placés devant le détecteur.

$T_{éch}$ est le coefficient de transmission correspondant à l'atténuation des photons par l'échantillon lui-même.

Les paramètres Ω et ε sont connus de l'utilisateur. La section efficace σ_s^X est accessible à partir d'ouvrages de référence. Le nombre de particules incidentes N_p est déduit de la mesure de la charge totale collectée sur l'échantillon, fournie par les données enregistrées en RBS

(cf. paragraphe 5.3). Quant aux coefficients de transmission, ils peuvent être exprimés sous la forme :

$$T_{abs}(Z) = \exp(-\mu_{abs} \cdot t_{abs}) \quad (5.13)$$

$$T_{éch}(Z, E) = \exp(-\mu_{éch} \cdot t_{éch}) = \exp\left(-\mu_{éch} \cdot \frac{\cos \phi}{\cos \theta} \cdot \int_{E_0}^{E_f} \frac{dE}{S(E)}\right) \quad (5.14)$$

où

μ est le coefficient d'atténuation linéaire.

t est l'épaisseur de matière traversée par le photon.

E_f est l'énergie finale du faisceau incident.

ϕ et θ sont respectivement l'angle d'incidence du faisceau et l'angle de détection des rayons X par rapport à la normale à la surface de l'échantillon.

D'après l'équation 5.12, pour obtenir un résultat quantitatif sur la concentration N_Z d'un élément, il suffit d'accéder au nombre de photons mesurés dN_Z^X : celui-ci s'obtient en intégrant la surface du pic caractéristique de l'élément Z considéré sur le spectre PIXE. Deux cas de figure sont cependant à distinguer : les cibles minces, comme la plupart des échantillons biologiques ou encore les aérosols par exemple, et les cibles épaisses [101, 102, 103].

Pour une cible mince, la perte d'énergie des particules incidentes est suffisamment faible pour que la section efficace soit considérée constante tout au long du parcours des projectiles dans l'échantillon. Les phénomènes secondaires d'absorption des X et de fluorescence sont également négligés. Les calculs sont alors simples et l'équation 5.12 est intégrée telle quelle, en considérant la section efficace à l'énergie d'incidence E_0 et en négligeant les effets de matrice du terme $T_{éch}$:

$$N_Z^X = N_p \cdot N_Z' \cdot \sigma_s^X(Z, E_0) \cdot T_{abs}(Z) \cdot \varepsilon \cdot \frac{\Omega}{4\pi} \quad (5.15)$$

où $N_Z' = N_Z \cdot x$ est exprimé en atomes/cm².

Pour une cible épaisse, il faut tenir compte des effets de matrice sur les particules incidentes, qui sont ralenties jusqu'à leur implantation dans le matériau, des effets de matrice sur l'atténuation des photons X émis, ainsi qu'évaluer la contribution de la fluorescence secondaire. Il est par conséquent nécessaire d'intégrer sur tout le parcours du projectile et de faire intervenir le pouvoir d'arrêt en remplaçant dx par le parcours élémentaire $dE/S(E)$:

$$N_Z^X = N_p \cdot N_Z' \cdot T_{abs}(Z) \cdot \varepsilon \cdot \frac{\Omega}{4\pi} \cdot \int_{E_0}^0 \frac{\sigma_s^X(Z, E) \cdot T_{éch}(Z, E)}{S(E)} dE \quad (5.16)$$

Plusieurs approches sont possibles pour la détermination des différents paramètres intervenant dans les calculs. Des échantillons de référence peuvent par exemple être utilisés

pour étalonner les rendements d'émission et de transmission des photons X. Mais cette méthode n'est évidemment valable que dans des conditions expérimentales très précises. Nous avons pour notre part choisi d'utiliser une méthode absolue, qui consiste à utiliser des valeurs tabulées pour les sections efficaces de production des photons X et les coefficients de transmission. Ceci requiert l'emploi de logiciels de traitement disposant de bases de données très complètes. Le logiciel dont nous avons fait usage est GUIPIX, développé par Campbell et Maxwell [104].

5.2.6.2 Utilisation du code GUIPIX

Le programme GUIPIX est un outil de conversion des intensités des pics caractéristiques en concentrations élémentaires. Il s'appuie pour cela sur la réalisation d'un spectre théorique qui est modélisé sur la base des valeurs de référence concernant les procédés de fluorescence, les effets de matrice et de détection, et bien sûr grâce aux paramètres expérimentaux fournis par l'utilisateur. Ceux-ci concernent l'énergie du faisceau, l'angle solide de détection, les paramètres décrivant le détecteur de photons X, la charge déposée sur l'échantillon et son épaisseur, ces deux derniers paramètres étant calculés à partir du spectre RBS (cf. paragraphe 5.3.3).

Le spectre X expérimental est constitué des raies caractéristiques qui ont la forme de pics gaussiens. Ces pics caractéristiques sont superposés à l'émission continue du bruit de fond. Afin d'assurer une juste quantification de la surface des pics, l'émission continue est éliminée par filtrage numérique des données expérimentales. Le spectre est ainsi convolé au moyen d'une fonction filtre symétrique d'aire zéro nommée filtre « top-hat ». De la sorte, le bruit de fond, supposé linéaire sur une largeur UW (Upper lobe Width²⁴) + $2 LW$ (Lower lobe Width²⁵), est entièrement éliminé sur cet intervalle. GUIPIX se base pour cela sur la largeur optimale proposée par Schamber et Statham [105, 106], décrite comme étant $UW = FWHM$ (Full Width at Half Maximum²⁶, calculée pour la position centrale du canal de détection) et $LW = \frac{1}{2} FWHM$, et ajuste la largeur de l'intervalle de façon à ce qu'elle soit le compromis idéal entre la suppression maximale de la contribution du bruit de fond et la perte minimale d'informations issues du pic.

Les informations parasites ainsi supprimées, le modèle mathématique du spectre théorique est ajusté au spectre expérimental de manière fidèle au moyen de la méthode non linéaire des moindres carrés. La méthode admet que la fonction théorique qui décrit les données avec la plus grande justesse est celle qui minimise la somme quadratique des déviations des mesures expérimentales vis-à-vis des données prédites théoriquement [107]. La procédure d'ajustement consiste en une boucle d'itération : les calculs sont continuellement renouvelés jusqu'à ce que les différentes concentrations élémentaires satisfassent à un critère de convergence.

²⁴ Largeur du lobe supérieur.

²⁵ Largeur du lobe inférieur.

²⁶ Largeur à mi-hauteur du pic caractéristique.

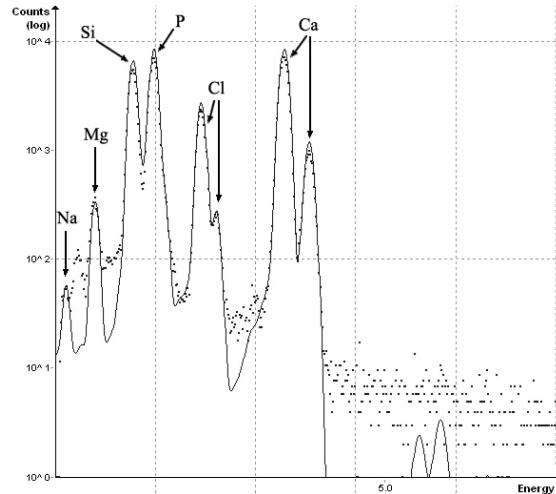


Figure 5.9: spectre X expérimental (en pointillé) et spectre théorique modélisé par GUPIX (en trait plein) concernant un verre bioactif $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$.

La Figure 5.9 représente l'exemple d'un spectre théorique ajusté aux données expérimentales et débarrassé de la contribution du bruit. Une fois le spectre théorique modélisé, les intensités des pics caractéristiques sont converties en concentrations élémentaires au moyen d'une relation analogue à l'équation 5.12 :

$$C_Z = \frac{I_Z^X}{I_t \cdot Q \cdot H \cdot \varepsilon_i \cdot T_{abs}} \quad (5.17)$$

où

C_Z est la concentration en élément de numéro atomique Z .

I_Z^X est l'intensité mesurée expérimentalement pour la raie X considérée.

I_t est l'intensité théorique calculée pour le spectre modélisé par unité de concentration, par stéradian et par μC .

Q est la charge déposée par le faisceau sur la cible : ce paramètre est déduit des mesures en RBS.

ε_i est l'efficacité intrinsèque du détecteur, d'une valeur proche de 1 pour des énergies situées entre 5 et 20 keV.

T_{abs} est le coefficient de transmission à travers les filtres placés devant le détecteur.

H est un paramètre instrumental décrivant le système.

En l'absence de filtres supplémentaires devant le détecteur, le paramètre H représente l'angle solide et est exprimé en stéradian : $H = 2\pi \cdot (1 - \cos \alpha) \approx \frac{S}{d^2}$

où α est l'angle d'ouverture du détecteur sur l'échantillon, S est la surface du détecteur et d la distance entre la cible et le détecteur. Cependant lorsque des filtres absorbants sont placés devant le détecteur, H n'est plus l'angle solide mais un paramètre instrumental dont la valeur dépend de l'énergie des photons X , et qui tient compte de la mauvaise connaissance de l'angle solide et du filtre utilisé (diamètre du trou et épaisseur). H doit être dans ce cas calibré (cf. paragraphe 6.2.2.3 pour plus de détails). Dans l'équation 5.17, l'introduction du paramètre H explique donc l'apparition de l'efficacité intrinsèque ε_i du détecteur au lieu de l'efficacité de détection ε [108].

Dans la pratique, pour s'affranchir des incertitudes liées à certains paramètres tels que l'efficacité de détection, l'angle solide et la charge déposée sur l'échantillon (cf. paragraphe 5.3.3), nous avons choisi de normaliser les concentrations élémentaires à 100 %. Dans ce cas, lors des calculs de concentrations GUPIX fait intervenir un terme supplémentaire dans le dénominateur de l'équation 5.17 : ce paramètre correctif permet d'ajuster la valeur du produit $Q \cdot H \cdot \varepsilon_i \cdot T_{abs}$, qui n'est pas toujours connue avec exactitude, afin de normaliser la somme des différentes concentrations élémentaires à 100 %. Cette normalisation est bien évidemment rendue possible grâce à la connaissance de la composition chimique de nos échantillons. Bien que certains éléments chimiques, tels l'oxygène, ne soient pas détectables, GUPIX peut assumer que leur concentration est dépendante de celle des autres éléments détectables ; il suffit alors d'entrer les valences supposées des éléments non détectables dans le code pour que GUPIX dresse une liste des différents composés potentiellement existants. La teneur des éléments non détectables est alors estimée par les relations de stoechiométrie liant les différents éléments constitutifs de ces composés. Grâce à cette procédure, la normalisation des concentrations est rendue possible malgré la présence de certains éléments non détectables.

Les incertitudes sur la quantification sont dues aux erreurs statistiques sur l'évaluation de la surface des pics, aux erreurs sur l'ajustement du spectre modélisé, aux erreurs liées aux chevauchements de certains pics, et aux erreurs inhérentes aux facteurs instrumentaux. L'erreur relative totale sur les concentrations est exprimée selon :

$$\frac{\Delta C_Z}{C_Z} = \sqrt{S^2 + F^2 + O^2 + I^2} \quad (5.18)$$

où

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

S est l'erreur statistique sur l'évaluation de la surface des pics.

F est l'erreur liée à la procédure d'ajustement du spectre modélisé.

O est l'erreur liée aux chevauchements de certains pics.

I est l'incertitude liée aux facteurs instrumentaux tels que les erreurs sur la mesure de la charge déposée sur l'échantillon, les dégâts dus à l'irradiation, etc.

Les paramètres S et F sont évalués par GUPIX à chaque analyse quantitative. Le logiciel considère également que l'erreur O est systématique et sa valeur est estimée à 1 %. Enfin il appartient à chaque utilisateur d'évaluer les incertitudes liées à l'expérimentation. Pour notre part, les incertitudes liées à la mesure de la charge déposée sur l'échantillon ont engendré des erreurs sur la concentration inférieures à 1 %.

5.2.7 Comparaison de la méthode PIXE avec d'autres techniques de fluorescence X

Le critère qui définit la quantité minimale détectable d'un élément contenu dans une matrice s'exprime de la sorte : il faut que l'intensité N_Z^X d'un signal caractéristique puisse être distinguée de façon significative de l'intensité N_B du fond continu. C'est le cas si :

$$N_Z^X \geq 3\sqrt{N_B} \quad (5.19)$$

où

N_Z^X est le nombre d'évènements sous le pic caractéristique de l'élément considéré.

N_B est le nombre d'évènements dus au fond continu sous le pic, dans l'intervalle FWHM.

La limite relative de détection de la PIXE en fonction de l'énergie d'incidence des protons et du numéro atomique de l'atome cible est portée en Figure 5.10. La sensibilité maximale en PIXE est obtenue pour les éléments situés dans les domaines de numéro atomique $20 \leq Z \leq 35$ et $70 \leq Z \leq 85$. Il est également observé que la quasi-totalité du tableau périodique est couverte avec une limite relative de détection inférieure à 5 ppm.

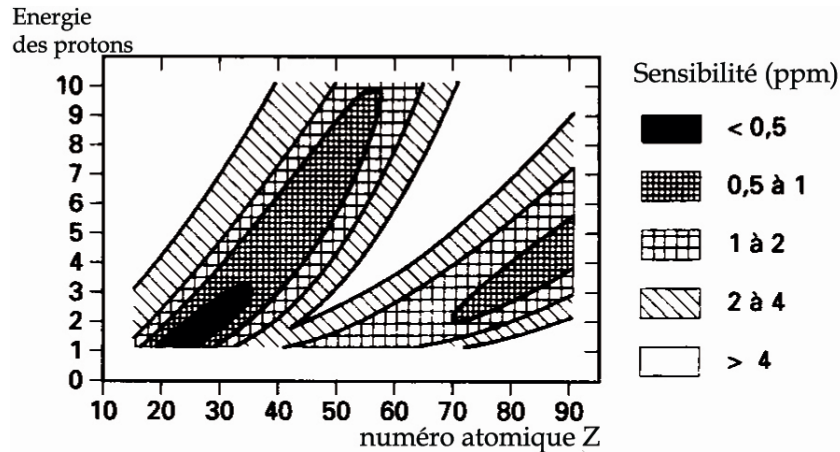


Figure 5.10: sensibilité de la PIXE en fonction du numéro atomique et de l'énergie des protons incidents [109].

Outre les protons et particules alpha utilisés en PIXE, il est possible d'opter pour des électrons (microscopie électronique) ou des photons X (XRF²⁷, SXRF²⁸) en tant que sondes excitatrices pour induire l'émission X. Chacune de ces techniques présente un intérêt spécifique, plus ou moins bien adapté à la nature de l'échantillon étudié.

Les microscopes électroniques sont ainsi équipés de spectromètres X analogues à ceux utilisés en PIXE. Cependant, si la taille de la sonde électronique est bien inférieure à celle d'un faisceau d'ions focalisés, autorisant l'imagerie électronique à une résolution incomparable, la production des rayons X induite par des électrons se fait dans une poire d'interaction de l'ordre du μm^3 (Figure 5.11). Sur des échantillons épais, la résolution obtenue en microscopie électronique n'est donc pas meilleure que celle de la PIXE, où la taille du faisceau d'ions est $1 \mu\text{m}$. On peut remédier à cela en microscopie électronique à transmission, en réalisant des coupes ultrafines du matériau, de l'ordre de 100 nm d'épaisseur : cependant couper des échantillons de verre bioactif à de telles épaisseurs est bien plus contraignant qu'en PIXE, où les coupes peuvent être plus épaisses, de 1000 nm à $30 \mu\text{m}$ selon les échantillons. D'autre part, bien que les sections efficaces d'ionisation des couches atomiques K et L par des électrons d'énergie 10 à 100 keV soient comparables à celles des protons de quelques MeV, l'analyse quantitative en microscopie électronique est bien moins sensible qu'en PIXE. Ceci est dû au rayonnement de freinage des électrons incidents, qui est beaucoup plus important que pour des protons ou des particules alpha. En effet, l'intensité du Bremsstrahlung est en terme classique proportionnelle au carré de l'accélération, donc au terme $(F/m)^2$, où F est la force électrique et m la masse du projectile. Par conséquent, pour un proton, qui est approximativement 1836 fois plus lourd qu'un électron, l'intensité du Bremsstrahlung sera beaucoup plus faible. Ainsi en microscopie électronique, le bruit de fond continu est une centaine de fois plus élevé qu'en PIXE, ce qui dégrade fortement le rapport signal/bruit et la sensibilité de la méthode, ne nous autorisant pas dans ce cas l'étude des éléments traces impliqués dans le processus de bioactivité.

²⁷ X-Ray Fluorescence.

²⁸ Synchrotron X-Ray Fluorescence.

L'utilisation de photons X comme source excitatrice, désormais produits par rayonnement synchrotron pour des faisceaux de grande intensité, offre quant à elle des performances en sensibilité comparables à celle de la PIXE, mais pour des domaines d'analyse différents. Le photon X est en effet une sonde performante pour induire l'émission X : les sections efficaces de photoionisation sont élevées pour les couches atomiques K et L et croissent très vite à mesure que le numéro atomique Z augmente, alors que celles des particules chargées diminuent rapidement avec Z . L'analyse SXRF se justifie donc pour l'analyse des éléments lourds, tandis que la PIXE suffit à étudier les éléments légers [110].

Cependant la méthode PIXE offre un avantage indéniable par le fait que l'analyse est multiélémentaire et octroie l'obtention de cartographies en contraste chimique. Les gradients de concentrations élémentaires à l'interface verre/milieu biologique sont ainsi directement observables, ce qui est d'une grande utilité pour l'identification des phénomènes engendrés par le processus de bioactivité : la diffusion des ions, l'évolution du réseau vitreux et la formation de la couche de phosphate de calcium pourront être plus facilement observées. Par ailleurs, l'ensemble des photons X détectés durant l'irradiation est enregistré dans une mémoire de masse, autorisant ainsi un retraitement des données post-irradiation pour des mesures de concentrations localisées dans des zones d'intérêt particulier.

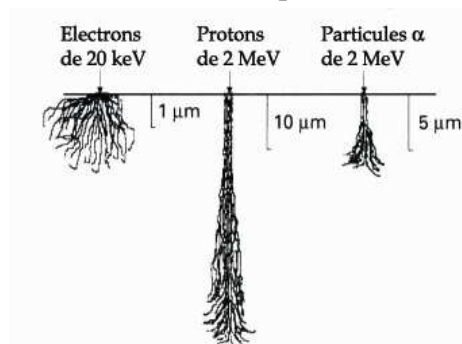


Figure 5.11: parcours comparés des électrons, des protons et des particules α dans du silicium, d'après [111].

5.3 Spectrométrie de rétrodiffusion de Rutherford : RBS

5.3.1 Principe

La technique RBS a été employée en complément de la PIXE pour calculer la charge déposée par le faisceau de protons sur l'échantillon et déterminer l'épaisseur de ce dernier. Ces deux paramètres sont effectivement nécessaires à la quantification des spectres PIXE.

Le principe de la méthode RBS est basé sur l'interaction coulombienne entre noyaux atomiques. La mesure du nombre et des énergies des ions diffusés par les noyaux cibles renseignent sur l'identité des atomes diffuseurs, leur concentration et leur localisation en profondeur. La spectrométrie RBS est particulièrement bien adaptée à la détermination d'éléments traces plus lourds que les éléments majeurs de la matrice.

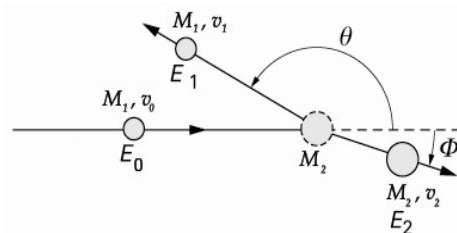


Figure 5.12: collision élastique entre une particule de masse M_1 animée d'une vitesse v_0 avec un atome de masse M_2 initialement au repos.

Lorsque l'échantillon est bombardé par le faisceau de particules, une fraction de celles-ci est diffusée élastiquement par les noyaux cibles vers un détecteur qui mesure leur énergie. En considérant le choc élastique (Figure 5.12) d'une particule de masse M_1 , vitesse v_0 , énergie cinétique E_0 avec un atome cible de masse M_2 , initialement au repos, les principes de conservation de l'énergie et de la quantité de mouvement imposent :

$$\frac{1}{2}M_1v_0^2 = \frac{1}{2}M_1v_1^2 + \frac{1}{2}M_2v_2^2 \quad (5.20)$$

$$\overrightarrow{M_1v_0} = \overrightarrow{M_1v_1} + \overrightarrow{M_2v_2} \quad (5.21)$$

Ces égalités permettent d'exprimer l'énergie E_1 du projectile après la collision selon :

$$E_1 = K \cdot E_0 \quad (5.22)$$

$$\text{où } K = \left(\frac{(M_2^2 - M_1^2 \sin^2 \theta)^{1/2} + M_1 \cos \theta}{M_1 + M_2} \right)^2 \quad (5.23)$$

K est appelé facteur cinématique.

Dans les équations 5.22 et 5.23, les paramètres E_0 , M_1 , et θ sont connus ; la mesure de l'énergie de la particule diffusée E_1 suffit donc pour déterminer la masse M_2 et par suite identifier l'atome cible. Le facteur cinématique K dépend uniquement de l'angle de diffusion θ et du rapport des masses de l'ion incident et de l'atome diffuseur. En revanche il ne dépend pas de l'énergie du projectile. L'énergie transférée à l'atome cible est maximale lorsque K est minimum, ce qui est le cas pour une diffusion à 180° . Dans ce cas, il faut nécessairement $M_1 < M_2$ c'est-à-dire que les particules incidentes soient plus légères que les atomes cibles. Le facteur cinématique s'avère avoir une incidence sur la résolution en masse de la méthode. En effet, dans le cas où l'angle de détection est proche de 180° et où $M_1 \ll M_2$, la différence d'énergie ΔE_1 entre deux atomes de masse proche sera exprimée en fonction de la différence de leurs masses ΔM_2 suivant :

$$\Delta E_1 = E_0 \cdot M_1 \cdot \frac{4 - (\pi - \theta)^2}{M_2^2} \cdot \Delta M_2 \quad (5.24)$$

Par conséquent, la résolution en énergie sera d'autant meilleure que M_2 est faible. Ceci explique que la technique RBS soit une méthode efficace pour l'identification des éléments légers, voire même de leurs isotopes, alors que l'étude des éléments lourds est plus difficile. En vue d'optimiser la résolution énergétique, il convient d'augmenter la masse et/ou l'énergie de la particule incidente, ou encore de choisir un angle de détection proche de 180° .

La Figure 5.13 illustre le cas d'un échantillon épais où le projectile est diffusé à une profondeur x de la surface de l'échantillon par un atome de masse M_2 . L'énergie E_m mesurée par le détecteur placé en θ est exprimée par la relation :

$$E_m = K \cdot (E_0 - \Delta E_{in}) - \Delta E_{out} \quad (5.25)$$

où ΔE_{in} est la perte d'énergie de la particule incidente lors du trajet d'entrée dans le matériau et ΔE_{out} est la perte d'énergie de la particule incidente lors du trajet de sortie hors du matériau, définies suivant :

$$\Delta E_{in} = \int_0^x \rho(x) \cdot S(E) \cdot dx \quad \text{et} \quad \Delta E_{out} = \int_{x/\cos\theta}^0 \rho(x) \cdot S(E) \cdot dx$$

où $\rho(x)$ est la densité du matériau et $S(E)$ le pouvoir d'arrêt.

Le calcul de la perte d'énergie via l'équation 5.25 nécessite donc une connaissance préalable des éléments présents dans l'échantillon afin d'estimer la densité du matériau ainsi que les pouvoirs d'arrêt. La mesure du spectre en énergie des particules diffusées permet ensuite d'établir des profils de concentration pour chaque élément présent dans l'échantillon. La spectrométrie RBS est donc une méthode privilégiée pour l'analyse de films minces multicouches.

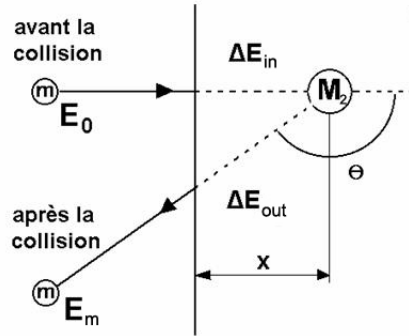


Figure 5.13: rétrodiffusion d'une particule incidente d'énergie E_0 par un centre diffuseur localisé à une profondeur x de la surface de l'échantillon.

5.3.2 Section efficace de diffusion élastique

Outre l'optimisation de la résolution en énergie, il convient pour une analyse dans de bonnes conditions d'optimiser la section efficace caractérisant le phénomène de diffusion élastique. En supposant que seule la force de répulsion coulombienne intervient dans le mécanisme de rétrodiffusion, la section efficace différentielle, exprimée en mb/sr , est calculée de façon classique selon la formule de Rutherford :

$$\sigma_R = \left(\frac{Z_1 \cdot Z_2 \cdot e^2}{4E_0} \right)^2 \cdot \frac{1}{\sin^4(\theta/2)} \quad (5.26)$$

Cependant cette description de la diffusion fait l'hypothèse que les réactions nucléaires d'une part et les effets d'écran du cortège électronique de l'atome cible d'autre part sont négligeables. Les réactions nucléaires ne concernent généralement pas les basses énergies. Les effets d'écran sont quant à eux négligeables si le projectile pénètre le cortège électronique de l'atome cible, mais ceci n'est pas toujours vérifié, surtout à basse énergie. Les effets d'écrantage sont dans ce cas introduits dans le calcul de la section efficace au moyen d'un facteur correctif :

$$\sigma = F \cdot \sigma_R \quad (5.27)$$

où F est le facteur correctif d'écrantage, dont les valeurs expérimentales sont tabulées dans des ouvrages de référence [112]. La Figure 5.14 représente les variations de F avec l'énergie du projectile et le numéro atomique de la cible.

Au facteur correctif près, l'équation 5.26 signale que la section efficace, et par conséquent la sensibilité de la technique RBS, sera d'autant plus grande que :

- la charge Z_1 du projectile sera élevée (dépendance de σ en Z_1^2).
- le noyau cible sera lourd (dépendance de σ en Z_2^2).
- l'énergie de projectile sera petite (dépendance de σ en E_0^{-2}).
- l'angle de détection θ sera petit (dépendance de σ en $[\sin(\theta/2)]^{-4}$).

Il est donc visible que les conditions favorables à une optimisation de la section efficace sont pour la plupart en conflit avec celles qui optimisent la résolution en énergie de l'équation 5.24. En pratique, l'utilisateur est astreint à un compromis entre sélectivité et sensibilité. Considérant cet aspect, la méthode RBS est à utiliser pour doser de façon sensible mais peu sélective les éléments lourds présents dans une matrice légère, ou bien pour doser sélectivement des éléments légers mais avec une sensibilité amoindrie.

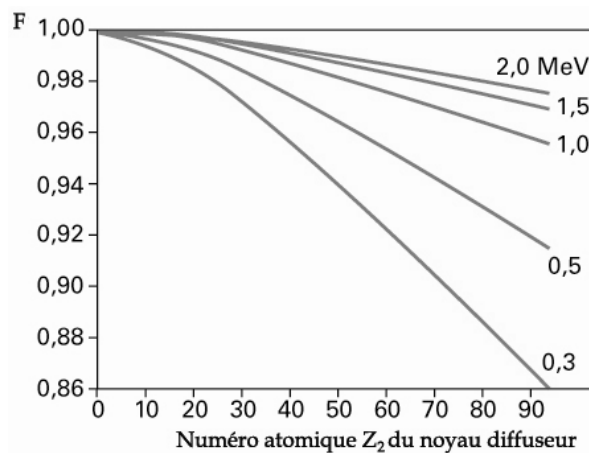


Figure 5.14: évolution du facteur correctif F d'écart à la loi de Rutherford, en fonction du numéro atomique de la cible et de l'énergie d'incidence.

5.3.3 Analyse des données

Le traitement analytique des données RBS est réalisé au moyen de codes de simulation. Nous avons fait usage du programme SIMNRA, mis au point par Mayer [113]. En vue de réaliser un spectre modèle qui sera ajusté de façon itérative aux données expérimentales grâce à la méthode des moindres carrés, SIMNRA nécessite la connaissance de l'énergie de faisceau, de l'angle de détection, des paramètres concernant la calibration en énergie et une estimation au moins approximative du nombre de particules incidentes. La cible doit être décrite comme une superposition de couches homogènes en composition et d'épaisseurs variables. Une estimation de la composition et de l'épaisseur de chacune des couches constituant la cible est requise ; ces paramètres seront ensuite modulés séquentiellement durant la procédure d'ajustement, afin que le spectre modèle soit le plus fidèle possible au spectre expérimental. Enfin il est nécessaire de spécifier les fichiers de définition concernant les sections efficaces des processus physiques. Dans le cadre de notre étude, nous avons uniquement considéré les sections efficaces des phénomènes de collision élastique de type Rutherford. Pour les énergies auxquelles nous avons travaillé, cette approximation n'est pas toujours valable, à cause des réactions nucléaires qui peuvent avoir lieu ; en conséquence cela peut engendrer des incertitudes importantes sur la détermination par SIMNRA de la charge déposée et de la teneur de la cible en éléments les plus légers. Néanmoins, ces incertitudes n'ont au

final pas de répercussion sur le calcul des concentrations élémentaires effectué sous GUPIX, car GUPIX altère les valeurs de ces paramètres en vue d'ajuster au mieux le spectre modèle aux données expérimentales. L'analyse de plusieurs échantillons de référence a ainsi permis de vérifier la validité de notre méthodologie (cf. paragraphe 5.4).

La Figure 5.15 représente des exemples de spectres RBS expérimentaux obtenus pour des échantillons de verres bioactifs, sur lesquels sont ajustés les simulations réalisées via SIMNRA. À partir du spectre modélisé sont ainsi déduites des informations sur la teneur des éléments dans l'échantillon.

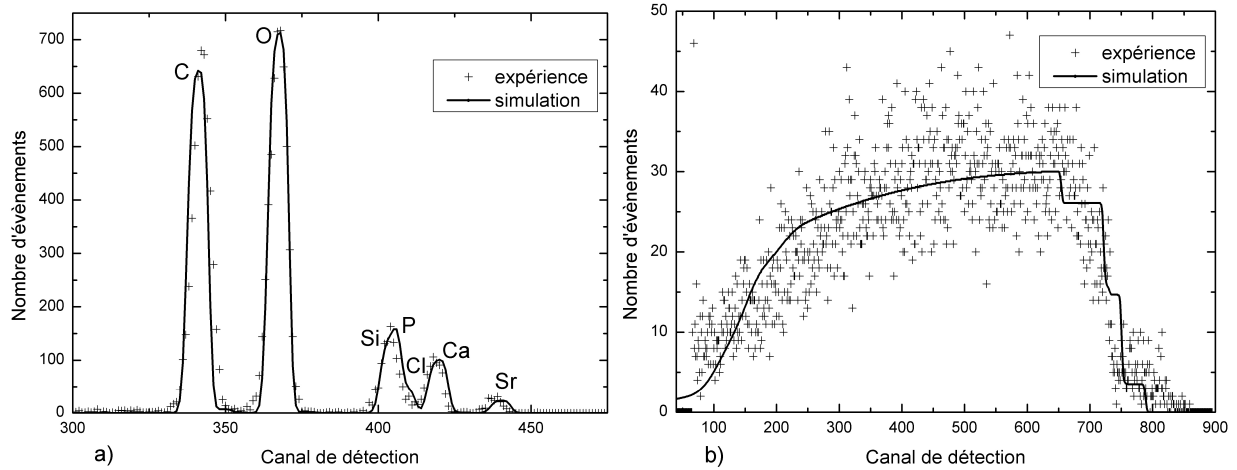


Figure 5.15: spectres RBS expérimentaux et simulés concernant un verre de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$, obtenus a) pour une coupe transverse de 1000 nm d'épaisseur réalisée sur un grain de poudre, b) pour une coupe transverse de 30 microns d'épaisseur réalisée sur une pastille.

La stoechiométrie relative entre deux éléments A et B distribués de façon homogène dans un échantillon est déterminée à partir du spectre RBS par :

$$\frac{N_A}{N_B} = \frac{H_A \cdot \Delta E_A}{H_B \cdot \Delta E_B} \cdot \frac{\sigma_B}{\sigma_A} \quad (5.28)$$

où

H représente la hauteur du pic de perte d'énergie.

ΔE est la largeur en énergie du pic considéré.

σ est la section efficace de diffusion associée à l'élément considéré.

L'épaisseur de l'échantillon (en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) et la charge totale (en μC) qui y est déposée par le faisceau de particules sont deux paramètres dont GUPIX nécessite la connaissance ; ils sont directement déduits du nombre de particules rétrodiffusées et de la composition de la cible calculés via SIMNRA. Ainsi l'épaisseur t de l'échantillon en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ est exprimée selon :

$$t = \frac{T}{N_A} \cdot 10^6 \cdot \sum_i w_i \cdot M_i \quad (5.29)$$

où

T est l'épaisseur de la cible en atome/ cm^2 , calculée par SIMNRA.

N_A est le nombre d'Avogadro.

w_i est la concentration de l'élément i et M_i sa masse molaire.

La charge totale collectée Q (en C) est quant à elle égale à :

$$Q = \frac{P}{\Omega} \cdot 1,6 \cdot 10^{-19} \quad (5.30)$$

où

P , calculé par SIMRA, est le nombre de particules \times stéradian atteignant le détecteur de particules rétrodiffusées.

Ω est l'angle solide détection.

5.4 Validation des résultats

5.4.1 Analyse d'échantillons de référence

Afin de nous assurer de la validité de la méthodologie employée, plusieurs échantillons de concentrations élémentaires connues ont été analysés en PIXE-RBS en faisant usage d'un faisceau de protons. Les résultats sont présentés en Figure 5.16. Pour chacune des énergies de faisceau utilisées (1,5 et 2,9 MeV), les concentrations élémentaires calculées à partir des données expérimentales sont très proches des valeurs de référence. De légers écarts sont cependant observés pour les échantillons B67,5 et B67,5-Sr1 : ils sont dus au fait que des résidus de chlore, issus de la résine dans laquelle ces deux échantillons ont été inclus lors de la préparation préliminaire à l'analyse par microfaisceau d'ions (cf. chapitre 3), sont détectés.

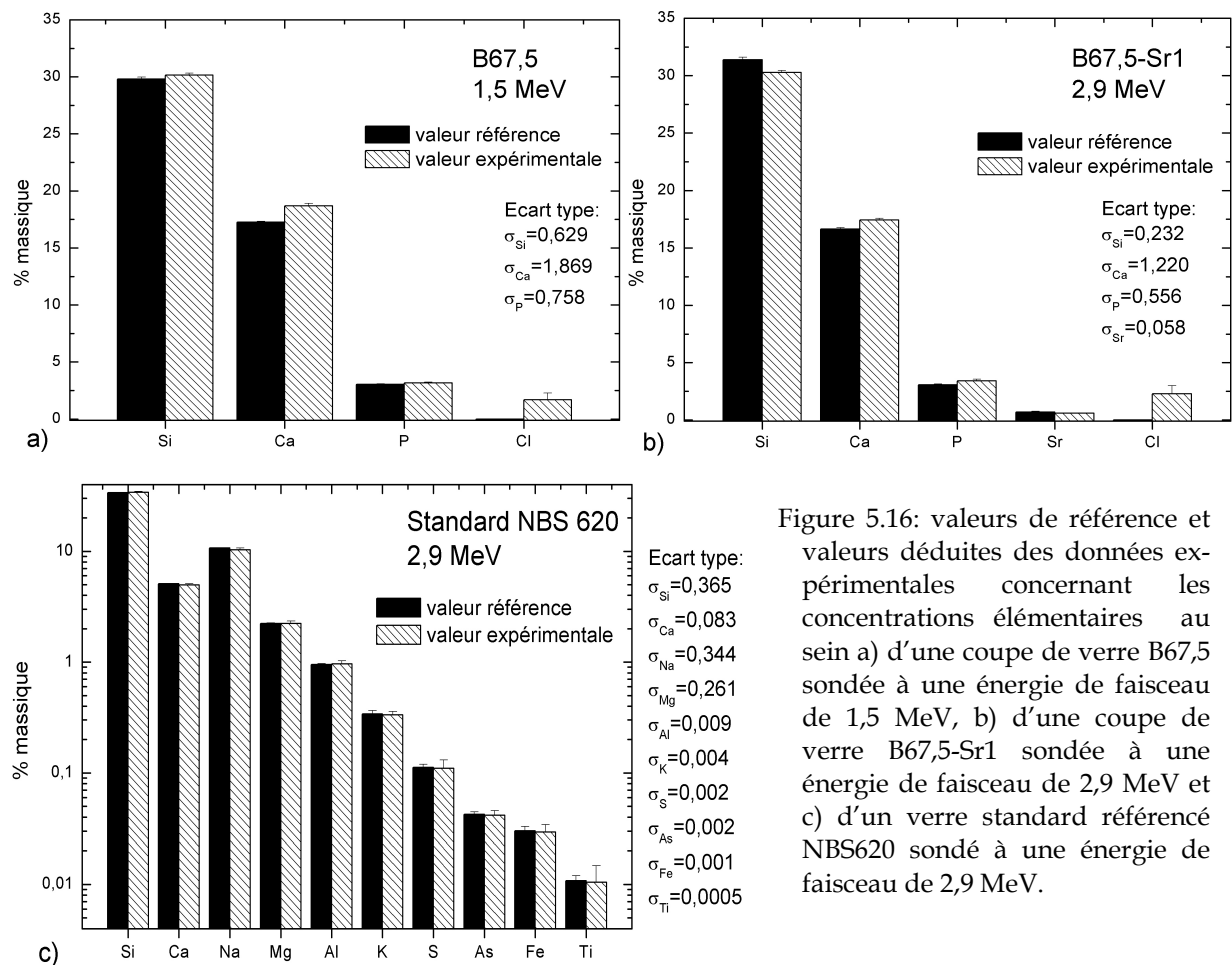


Figure 5.16: valeurs de référence et valeurs déduites des données expérimentales concernant les concentrations élémentaires au sein a) d'une coupe de verre B67,5 sondée à une énergie de faisceau de 1,5 MeV, b) d'une coupe de verre B67,5-Sr1 sondée à une énergie de faisceau de 2,9 MeV et c) d'un verre standard référencé NBS620 sondé à une énergie de faisceau de 2,9 MeV.

5.4.2 Comportement des échantillons sous irradiation

À la suite du bombardement de la cible par les particules incidentes, une partie de l'énergie des projectiles est absorbée par l'échantillon. Si cette énergie n'est pas dissipée par l'un des processus décrits précédemment (émission radiative ou non) alors elle peut être dissipée sous forme de chaleur. Des dommages dans le matériau peuvent en résulter, qui seront d'autant plus prononcés que le faisceau est finement localisé et avec une densité d'énergie élevée. Sachant que la puissance dissipée dans un volume de quelques μm^3 peut atteindre plusieurs dizaines de microwatts, il est préférable de sonder les cibles fragiles avec des particules qui perdent le minimum d'énergie dans l'échantillon. C'est l'une des raisons expliquant l'utilisation plus répandue de protons plutôt que de particules alpha, dont le pouvoir d'arrêt est quatre fois supérieur à celui de protons de même vitesse.

Les dommages causés par l'irradiation d'un microfaisceau sont divers. Lors de l'analyse, l'échauffement de la cible du à une dissipation de chaleur peut provoquer une déformation de l'échantillon (phénomène qui a été observé pour les coupes ultrafines de verres bioactifs inclus en résine), une migration de certains éléments ou encore une carbonisation et l'évaporation de composés volatils [114, 115, 116]. Il est également possible que l'échauffement engendre la perte de matière ; en particulier les éléments les plus légers tels que H, C, N et O sont sujets à l'évaporation. Enfin, la rupture des liaisons chimiques par ionisation le long du parcours des ions peut induire d'importantes pertes en éléments légers. Les échantillons biologiques, et donc les coupes de verres bioactifs, sont particulièrement concernés.

Le comportement de nos échantillons sous irradiation a été étudié. Les résultats concernant la stabilité des éléments Si, Ca, P et Sr sous le bombardement d'un faisceau de protons pour une durée d'une heure sont illustrés en Figure 5.17. Les données sont présentées pour différentes fractions de la charge totale collectée à la fin de l'irradiation, qui sont équivalentes à des intervalles réguliers de temps. Les éléments s'avèrent être peu altérés durant l'irradiation. De légères fluctuations, inférieures à 5 %, sont cependant observées. Elles sont dues principalement à la perte d'hydrogène et d'oxygène sous le faisceau, qui fausse le calcul sur la composition de la matrice.

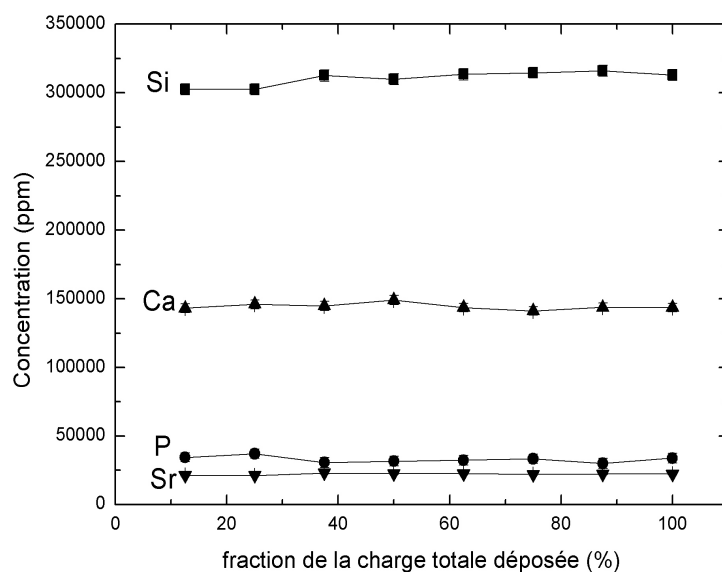


Figure 5.17: évolution des concentrations en Si, Ca, P et Sr en fonction de la charge déposée dans un verre de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ par des protons de 2,9 MeV bombardant l'échantillon pendant 1 heure.

Chapitre 6

Dispositif expérimental : le CENBG

Outil dédié aux caractérisations par faisceaux d'ions, la plate-forme AIFIRA²⁹ du Centre d'Études Nucléaires de Bordeaux-Gradignan (CENBG) met à profit les techniques des microsondes nucléaires dans des domaines aussi variés que l'étude du patrimoine culturel, la microélectronique, les matériaux, la biologie et l'environnement ou encore la physique des noyaux exotiques. À ces fins, le dispositif est composé de cinq lignes d'analyse par faisceaux d'ions, ayant chacune une configuration adaptée à des besoins spécifiques : ligne en faisceau extrait à l'air, ligne macrofaisceau, ligne microfaisceau, ligne nanofaisceau (actuellement en construction) et ligne dédiée à l'étude fondamentale de l'interaction neutron-matière. L'appareillage de la plate-forme AIFIRA est ainsi constitué d'un accélérateur de particules et des lignes de faisceau proprement dites. Afin de caractériser les propriétés physico-chimiques des verres bioactifs, nous avons fait usage de la ligne microfaisceau, dédiée à l'analyse et l'imagerie à une échelle adaptée à l'étude de nos matériaux. Elle dispose d'un système de focalisation et de balayage, d'une chambre d'analyse et d'une informatique d'acquisition et de traitement des signaux.

6.1 La ligne microfaisceau

Le domaine d'énergie des particules utilisées en analyse par faisceau d'ions s'étend typiquement de 0,5 à 5 MeV pour des protons ou particules alpha. Ceci trouve sa justification en raisonnant sur les différents régimes d'interactions entre particules incidentes et atomes cibles. En effet, si la vitesse des ions incidents est plus faible que celle des électrons de l'échantillon gravitant sur leurs orbitales (vitesse calculée selon $v_0 \cdot Z$ où v_0 est la vitesse de Bohr), alors les collisions électroniques élastiques prédominent. La perte d'énergie des ions se fait dans ce cas selon un régime d'interaction nucléaire, qui peut se révéler destructeur pour la matière traversée : érosion de la surface, déplacements atomiques, et implantation massive des ions incidents sont autant de dégâts susceptibles d'endommager l'échantillon et modifier ses propriétés physico-chimiques. Pour éviter ces dommages et favoriser les ionisations par interactions inélastiques à même d'induire l'émission X, les ions incidents sont accélérés avec des énergies plus élevées de 0,5 à 5 MeV, de sorte que leur vitesse est grande comparativement à celle des électrons sur leurs orbitales.

Jusqu'en 2005, l'accélérateur électrostatique avec lequel nous travaillions au CENBG était du type Van de Graaff. Il a depuis été remplacé par une machine de dernière génération : un accélérateur électrostatique simple étage de type Singletron. Ce dernier permet la déli-

²⁹ Applications Interdisciplinaires des Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine.

vance de faisceaux d'ions (protons, deutérons, hélions) de basse énergie (inférieure à 3,5 MeV) avec des performances de haut niveau, notamment en termes de stabilité en énergie ($\Delta E/E = 2,5 \cdot 10^{-5}$) et de brillance de faisceau. Les accélérateurs électrostatiques simple étage sont constitués d'une grande enceinte sous pression, à l'intérieur de laquelle sont enfermés la source d'ions positifs et le dispositif d'accélération. Ce dernier fonctionne grâce à un générateur haute tension qui assure le dépôt de charges électriques positives sur une courroie isolante. Celle-ci, entraînée par un moteur, transporte les charges vers une électrode terminale (une sphère métallique creuse généralement). À cet endroit, les charges électriques sont arrachées et déposées sur le matériau conducteur du terminal, créant ainsi une différence de potentiel entre la cuve de l'accélérateur, mise au potentiel de la masse, et l'électrode terminale. La cuve est remplie d'un gaz isolant (en général du SF₆) qui permet de retarder les décharges (tension de claquage) entre le terminal et les parois de la cuve.

Le faisceau délivré en sortie d'accélérateur est guidé vers un aimant qui défléchit le faisceau à 90°, puis vers l'aimant d'analyse. Lors du passage dans l'aimant, seuls les ions de rapport masse/charge désiré sont défléchis de manière à pénétrer dans la ligne de faisceau. D'autre part la position du faisceau en sortie d'aimant est asservie grâce à des lèvres de régulation permettant également d'ajuster leur énergie avec précision. Les particules pénètrent ensuite dans la ligne microfaisceau, située à 10° de la ligne nanofaisceau, comme l'illustre la Figure 6.1.

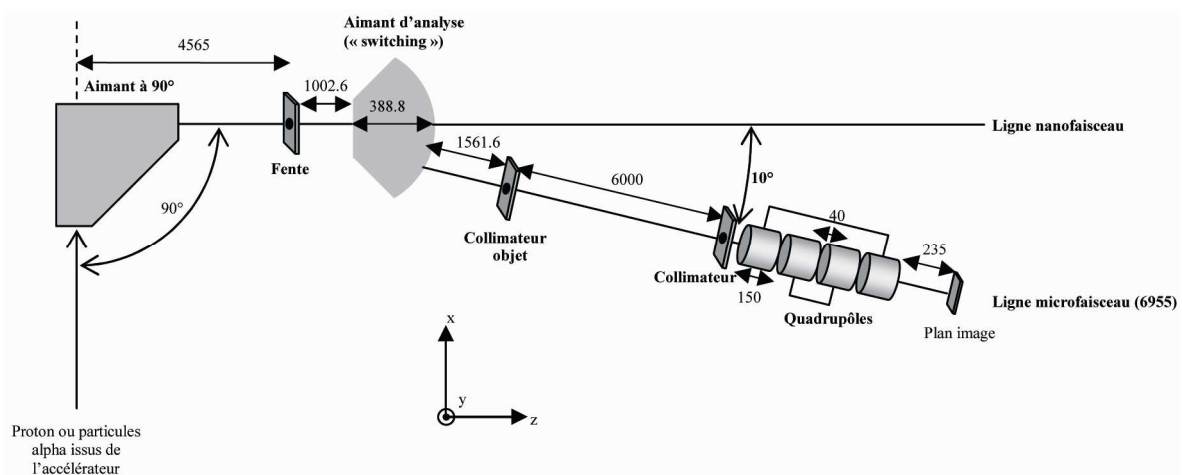


Figure 6.1: disposition de la ligne microfaisceau du CENBG, d'après [117]. Les distances sont exprimées en mm.

Les particules sont transportées dans la ligne à travers des tubes d'aluminium au sein desquels règne un vide de 10^{-4} à 10^{-5} Pa. Sur la ligne microfaisceau sont installés un certain nombre de dispositifs permettant de conduire le faisceau de particules jusqu'à l'échantillon : la taille du faisceau est délimitée au moyen de fentes et de collimateurs (diaphragmes en platine), sa position dans la ligne est contrôlée grâce à des profileurs et des quartz escamotables, son intensité est mesurée en différents points de la ligne grâce des cages de Faraday escamotables, et la trajectoire des particules est guidée grâce à des déflecteurs et des lentilles magnétiques quadripolaires. Ces lentilles sont couplées deux à deux en un quadruplet de type Dymnikov [118] et affectent l'image du collimateur objet situé six mètres en amont sur la ligne. La symétrie cylindrique du quadruplet octroie des facteurs de démagnification égaux à 10 dans les plans horizontal et vertical. Étant donné que les collimateurs objets utilisés ont un diamètre de 5 à 50 μm , le faisceau de forme circulaire obtenu en bout de ligne aura par conséquent une taille comprise entre 0,5 et 5 μm dans le plan focal [119].

Installées entre la sortie du dernier quadripôle magnétique et le plan focal du système, deux paires de plaques sous tension assurent la déflexion du faisceau dans le plan horizontal et dans le plan vertical. Ces plaques permettent le balayage de la surface de l'échantillon par le faisceau, ceci dans une fenêtre de quelques dizaines de μm à deux millimètres selon l'énergie et la charge des ions incidents. La fréquence de balayage a été choisie à 50 Hz pour nos échantillons, étant établi qu'une vitesse de balayage de cet ordre de grandeur permet de limiter les dommages des échantillons biologiques sous irradiation [120].

6.2 La chambre d'analyse et de détection

6.2.1 Description

La Figure 6.2 représente schématiquement la chambre d'analyse. Dans celle-ci, le porte-échantillon, d'une capacité de 12 cibles, est placé perpendiculairement à l'incidence du faisceau de particules. Derrière le porte-échantillon, le dispositif optique de repérage de la cible est constitué d'un microscope couplé à une caméra haute sensibilité. Le détecteur de particules rétrodiffusées utilisé en RBS consiste en un détecteur solide à barrière de surface, composé de silicium intrinsèque de quelques mm d'épaisseur et recouvert d'un film d'or. Le détecteur, de forme circulaire, est placé à 135° de l'axe du faisceau. Le détecteur de photons X, une diode silicium à jonction au lithium (jonction N-i-P), est également placé à 135° de l'axe du faisceau. Le fonctionnement de ce détecteur est décrit plus amplement ci-après. Concernant les ions transmis, un support amovible situé derrière la cible permet de mesurer le courant sur cible mince grâce à une cage de Faraday, ou bien de mesurer la perte d'énergie des particules incidentes transmises grâce à un détecteur en silicium utilisé en STIM [121]. Enfin, la chambre est maintenue sous un vide de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4} Pa.

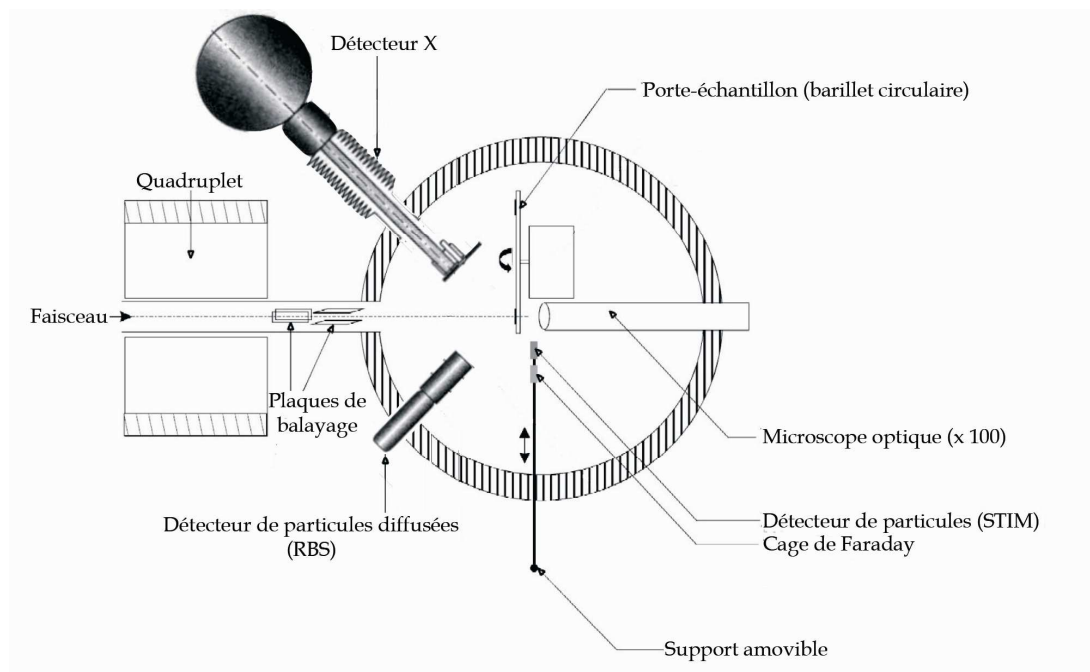


Figure 6.2: disposition schématique de la chambre d'analyse.

6.2.2 Détection du rayonnement X

6.2.2.1 Fonctionnement de la chaîne de détection

La détection des photons X est effectuée au moyen d'un spectromètre dispersif en énergie (EDS³⁰) placé à 135° de l'axe du faisceau. La position du détecteur dans l'enceinte résulte d'un compromis entre l'optimisation de l'efficacité géométrique de détection, assurée pour un positionnement le plus proche possible de l'échantillon, et la limitation du Bremsstrahlung des électrons secondaires, imposant un angle de positionnement le plus éloigné possible de 90° par rapport à l'axe du faisceau.

Le spectromètre utilisé est un détecteur à semi-conducteurs à cristaux de silicium dopés au lithium Si(Li), dont la résolution est de 150 eV à 5,89 keV (raie K du manganèse). La jonction au lithium permet de disposer d'une zone désertée épaisse de quelques millimètres propice à la création de paires électron-trou. En effet, dans la gamme d'énergie considérée (1 à 25 keV), la section efficace pour l'effet photoélectrique est nettement supérieure à la section efficace Compton. Ainsi l'interaction des photons X dans le détecteur Si(Li) se fait essentiellement par effet photoélectrique : les photons cèdent entièrement leur énergie au détecteur. De la sorte un photon X d'énergie E_0 entrant dans le cristal produit un nombre N de paires électron-trou égal à : $N=E_0/E_i$ où E_i est l'énergie moyenne de création de paires, proche de 3,8 eV pour le silicium. Les électrodes polarisant la diode assurent la collection de la charge résultante, égale à $Q=N.e$ et finalement une impulsion en tension $V=Q/C$ est collectée aux bornes d'une capacité en série avec un préamplificateur de type FET (Field Effect Transistor) refroidi à l'azote liquide. En bout de chaîne, un amplificateur est chargé de mettre en forme l'impulsion. Un analyseur multicanal permet de classer le nombre d'événements en fonction de leur énergie, et donc de reconstituer le spectre en énergie du rayonnement X émis par l'échantillon [122].

Le détecteur Si(Li) est maintenu à basse température dans un cryostat rempli d'azote liquide afin d'éviter toute détérioration (diffusion possible de la jonction Li), mais aussi pour assurer une conductivité électrique minimale du semi-conducteur en dehors de la présence des paires électron-trou et pour réduire au maximum le bruit de la chaîne d'acquisition. D'autre part, devant les risques de pollution, l'entrée du détecteur est fermée par une fenêtre en béryllium de 12 μm d'épaisseur. Celle-ci atténue peu les rayons X d'énergie supérieure à 1 keV, permettant la détection des éléments à partir du sodium ($Z = 11$). Le Tableau 6-1 résume les caractéristiques du détecteur Si(Li), dont la description est nécessaire à l'estimation de l'efficacité intrinsèque de détection, en vue d'une analyse quantitative absolue sous GUPIX.

Surface active du cristal	Épaisseur du cristal	Fenêtre	Épaisseur de la fenêtre	Contact	Résolution à 5,89 keV
80 mm ²	5 mm	Be	12 μm	Au	150 eV

Tableau 6-1: caractéristiques du détecteur Si(Li) utilisé.

6.2.2.2 Artefacts de détection

Trois phénomènes propres à la chaîne d'acquisition peuvent perturber le spectre X par l'introduction d'artefacts de détection : le phénomène d'empilement, l'apparition d'un pic parasite d'échappement et l'ionisation de la couche morte du détecteur par les photons X de

³⁰ Energy Dispersive Spectrometry : spectrométrie à dispersion d'énergie.

l'échantillon. Ces artefacts peuvent gêner l'identification des raies et empêcher la quantification de certains éléments, comme l'illustre la Figure 6.3.

Le phénomène d'empilement est observé pour les forts taux de comptage en photons X. Dans ce cas trop de photons sont envoyés sur la chaîne de détection et il arrive que deux d'entre eux (voire plus) soient détectés simultanément. Le résultat est l'apparition d'un « pic somme » dont l'énergie correspond à la somme des énergies associées aux impulsions détectées simultanément. Il apparaît également une augmentation de l'intensité du fond continu sous forme d'un plateau s'étalant de l'énergie des raies X les plus intenses jusqu'à une valeur correspondant à l'énergie du pic somme. Par conséquent le phénomène d'empilement dégrade la résolution spectrale et limite la sensibilité. La déflexion du faisceau de protons, l'utilisation de filtres en vue de limiter le taux de comptage de la raie la plus intense, et la fonction anti-empilement (PUR : Pile-Up Rejection) de l'amplificateur, qui redistribue dans le pic originel les impulsions empilées, permettent de diminuer ce phénomène.

La pic d'échappement résulte de l'excitation des atomes du cristal de silicium par les photons X issus de l'échantillon. Nous l'avons vu, ceux-ci interagissent dans le détecteur via l'effet photoélectrique, et l'excitation des atomes de silicium qui en résulte mène à l'émission d'une série de photons X d'énergie 1,74 keV (raie K du silicium) qui sont pour la plupart immédiatement réabsorbés dans le détecteur. Cependant, il est possible que le photon X, s'il est produit près de la surface du cristal, s'en échappe. La collection d'énergie est alors incomplète et le photon X initial est détecté avec une énergie erronée, celle de la raie caractéristique originelle moins l'énergie du photon X du silicium qui s'est échappé. Sur le spectre X, ceci est observé par la présence d'un pic d'échappement, décalé de 1,74 keV par rapport au pic initial.

La fluorescence secondaire de la couche morte du silicium, induite par les rayons X de l'échantillon, engendre l'émission secondaire de photons caractéristiques du silicium qui peuvent ensuite être absorbés dans le reste du cristal, résultant en l'apparition de la raie K du silicium sur le spectre. Ce pic est appelé pic de fluorescence interne.

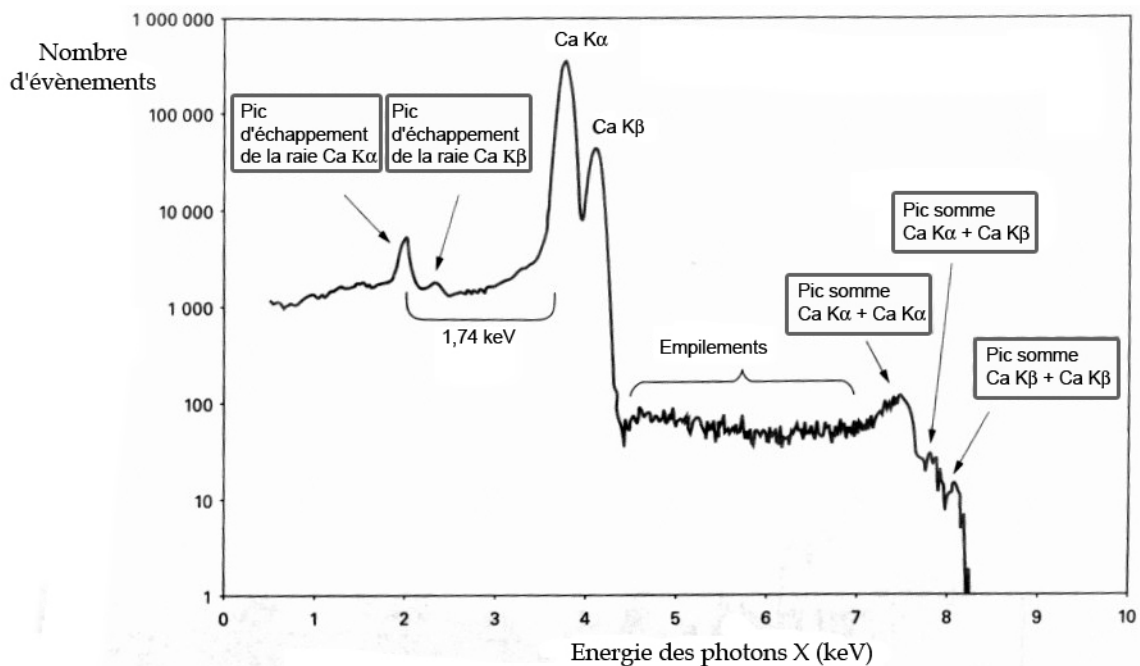


Figure 6.3: artefacts de détection sur un spectre PIXE.

6.2.2.3 Utilisation de filtres absorbants

Les raies X de basse énergie des éléments légers sont émises avec un fort rendement. Cela peut être gênant pour les échantillons de verre bioactif de type $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$. Sur ces considérations, l'énergie des protons incidents a été choisie à 2,9 MeV pour ces échantillons, en vue d'optimiser la section efficace de production des raies K du strontium. Mais à de telles énergies, en raison des phénomènes parasites évoqués précédemment, les raies caractéristiques des éléments majeurs légers de la matrice (Si, P, Ca) peuvent masquer les raies K du strontium, qui est présent seulement sous forme de traces. Il est alors recommandé d'interposer un filtre absorbant entre la cible et le détecteur, afin de réduire la composante basse énergie du spectre X et de favoriser la détection des éléments plus lourds, dont le rendement X est plus faible.

Cependant nous désirons également dans notre étude doser le magnésium, élément léger ($Z = 12$) présent lui aussi sous forme de traces. Il est donc dans ce cas délicat d'utiliser un filtre qui supprimerait le signal de cet élément trace. Une solution ingénieuse pour l'analyse simultanée des éléments lourds et légers est l'emploi d'un filtre percé en son centre, dit « funny filter ». Proposée pour la première fois par Harrison et Eldred [123], l'utilisation d'un funny filter permet de réduire considérablement l'intensité des raies X des éléments légers qui voient de la sorte leur angle solide de détection diminuer. Néanmoins un nombre suffisant de photons (5 à 25 %) passe par le trou au centre du filtre, octroyant un taux de comptage satisfaisant pour les éléments légers. Quant aux photons X des éléments plus lourds, tels le strontium, ils possèdent des énergies caractéristiques plus élevées et sont peu affectés par l'interposition du filtre [124, 109].

Nous basant sur ces constatations, nous avons fait usage d'un filtre en aluminium de 100 μm d'épaisseur, percé en son centre d'un trou de 2 mm de diamètre, et d'un filtre en carbone d'épaisseur 500 μm , percé d'un trou de 500 μm de diamètre. L'emploi d'un funny filter implique que l'angle solide n'est plus constant pour chaque raie élémentaire : il varie selon l'énergie de l'émission X. Le paramètre instrumental H utilisé dans l'équation 5.17 pour le calcul des concentrations sous GUPIX doit par conséquent être déterminé expérimentalement. Cette calibration est réalisée par l'analyse de standards de concentration connue. La Figure 6.4 représente la variation de H en fonction de l'énergie des photons X, pour les deux types de filtres.

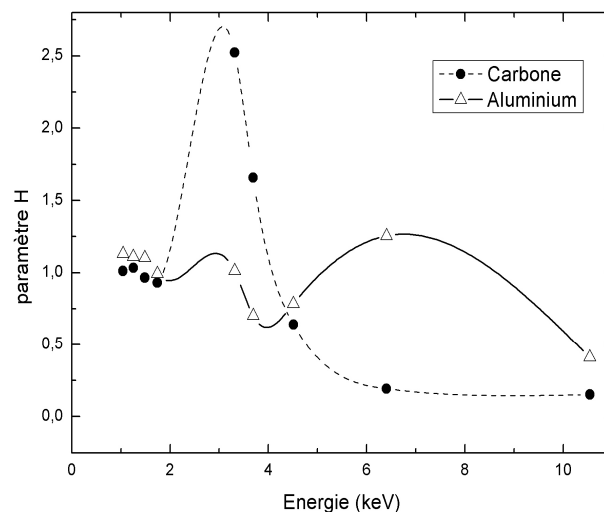


Figure 6.4: évolution du paramètre H en fonction de l'énergie des photons X, pour un filtre en aluminium de 100 μm d'épaisseur percé en son centre d'un trou de 2 mm de diamètre, et un filtre en carbone d'épaisseur 500 μm , percé d'un trou de 500 μm de diamètre.

Partie IV

Caractérisation des réactions physico-chimiques lors des interactions entre verres bioactifs nanostructurés et milieu biologique

Chapitre 7

Étude du processus de bioactivité pour les pastilles de verres binaires et ternaires : $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$

Dans ce chapitre seront présentées les cartographies multiélémentaires enregistrées lors de l'analyse micro-PIXE des échantillons de pastilles de verres binaires et ternaires après immersion dans un milieu biologique. Grâce à ces images en contraste chimique, il a été possible de réaliser le suivi de la distribution en silicium, calcium, phosphore, et magnésium à l'interface verre bioactif/milieu biologique en fonction du temps d'interaction entre le matériau et les fluides biologique. Les mesures de concentrations dans les verres réalisées en PIXE fournissent alors des informations locales sur la réactivité du matériau ; afin de disposer d'informations sur la réactivité globale des échantillons, l'évolution des concentrations dans le milieu biologique a été suivie par des mesures en ICP-AES. La confrontation de ces résultats est donc nécessaire et dispensera des informations complémentaires sur la réactivité des matériaux. Concernant l'analyse PIXE, les pastilles ont été sondées au moyen d'un faisceau de protons de diamètre $2\ \mu\text{m}$ et d'intensité $500\ \text{pA}$, en faisant usage du collimateur objet de diamètre $20\ \mu\text{m}$. Les cartographies ont été accomplies par le balayage de zone carrées de côté compris entre $40\ \mu\text{m}$ et $400\ \mu\text{m}$ suivant les régions d'intérêt.

7.1 Imagerie chimique multiélémentaire à la périphérie des pastilles de verre après immersion dans le milieu biologique

Des cartographies multiélémentaires ont été obtenues pour chacun des verres binaires et ternaires avant interaction et après 1 heure, 6 heures, 1 jour, 2 jours, 5 jours et 10 jours d'interaction avec le milieu biologique. Dans ce paragraphe, nous en présentons une petite sélection, restreinte aux images chimiques illustrant les étapes les plus importantes des réactions physico-chimiques mises en œuvre. Il est commode de débiter l'analyse micro-PIXE de l'interface verre bioactif/milieu biologique par l'étude du verre binaire B75, de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO}$. Ce verre ne contenant pas de phosphore, le suivi de la dissolution, des échanges ioniques et du développement de la couche phosphocalcique en sera facilité.

La Figure 7-1 représente les cartographies multiélémentaires obtenues pour ce matériau avant interaction dans le milieu biologique. On peut y observer une répartition correspondant au nombre de photons émis localement par l'échantillon sous irradiation. Le code de couleur adopté s'étale du blanc pour un nombre de coups nul jusqu'au jaune pour un nombre d'évènements détectés maximum. Deux zones sont visibles sur les cartographies de la Figure

7-1. La première (zone colorée) est composée de silicium et de calcium et correspond au verre bioactif. La seconde (zone blanche), dans laquelle du chlore est abondamment détecté (donnée non représentée), correspond à la résine au sein de laquelle le matériau est inclus. La répartition des éléments est uniforme : le matériau présente une distribution homogène en silicium et en calcium. Des trous sont visibles par endroits sur les cartographies et correspondent à des microdéchirures de l'échantillon lors de la coupe au microtome.

Au bout d'1 heure d'interaction avec le milieu biologique (Figure 7-2), le processus bioactif s'avère être déjà amorcé. La présence de phosphore est détectée en surface du matériau, mais de manière très localisée. Si le calcium est encore distribué de façon homogène dans les régions internes de la pastille, on observe que le relargage de cet élément a débuté sur les sites périphériques où le phosphore est présent. C'est la première étape du processus bioactif. Le réseau silicate apparaît quant à lui intègre et uniforme. Deux régions sont donc à distinguer : le cœur de la pastille, de composition homogène en silicium et en calcium, et la périphérie du matériau, composée d'une couche riche en silicium au sein de laquelle les ions calcium ont été relargués et où le phosphore, prélevé du milieu biologique, est intégré. Des traces de magnésium ont été prélevées du milieu biologique et sont détectées dans le matériau, mais leur localisation est rendue délicate par un faible rapport signal/bruit.

La Figure 7-3 représente la pastille de B75 après 6 heures d'interaction. Les deux régions précédemment observées ont évolué. La zone de relargage du calcium s'est étendue et des régions presque purement siliciques sont observées, s'étendant sur une profondeur allant jusqu'à 30 μm par endroits. Le réseau silicate a néanmoins conservé sa cohérence et le silicium est uniformément réparti. La couche périphérique s'est étalée : une bande riche en silicium, et dans laquelle sont incorporés du calcium, du phosphore et des traces de magnésium, est présente en surface du verre.

Après 1 jour d'immersion dans le milieu biologique, le réseau silicate n'est plus continu en périphérie du matériau (Figure 7-4). La couche périphérique est désormais essentiellement composée de calcium et de phosphore, et des traces de magnésium s'avèrent y être nettement localisées. L'intérieur de la pastille est toujours constitué du verre dans sa composition originelle.

Le processus bioactif suit son cours et au bout de 2 jours d'interaction, un gradient de concentration en calcium est observé de l'intérieur du matériau vers sa périphérie. On note l'apparition d'une zone tampon riche en calcium entre l'intérieur de la pastille et la couche périphérique. La couche périphérique est quant à elle une couche riche en calcium et en phosphore. Les échanges ioniques et les réactions physico-chimiques impliqués dans le processus de bioactivité se poursuivent et continuent d'alimenter la croissance de la couche Ca-P-Mg en surface du verre. Finalement, trois régions se distinguent nettement après 10 jours d'interaction (Figure 7-5). Le réseau vitreux originel, où de fortes concentrations en silicium sont présentes, est situé dans les régions intérieures de la pastille de verre. En périphérie, on observe le développement d'une bande riche en calcium et en phosphore, étalée sur une profondeur d'une dizaine de microns, dans laquelle sont incluses des traces de magnésium. Entre ces deux régions existe une zone étroite localement enrichie en calcium, engendrée par la diffusion de cet élément de l'intérieur du verre vers sa surface.

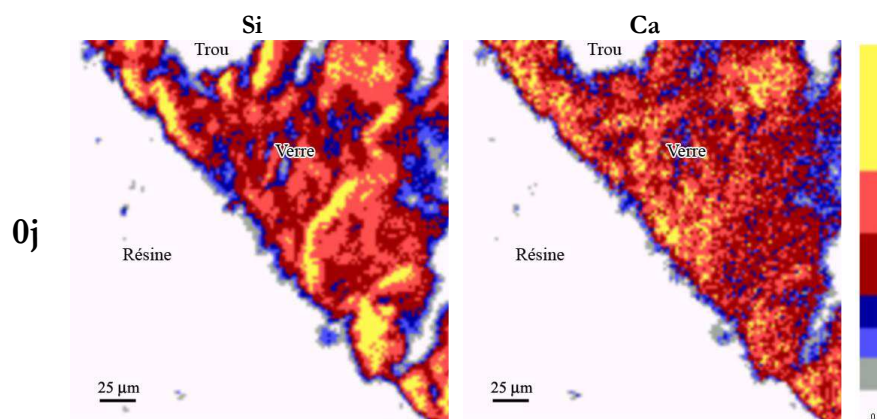


Figure 7-1: distribution des éléments silicium et calcium dans une pastille de verre B75 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ avant interaction avec le milieu biologique.

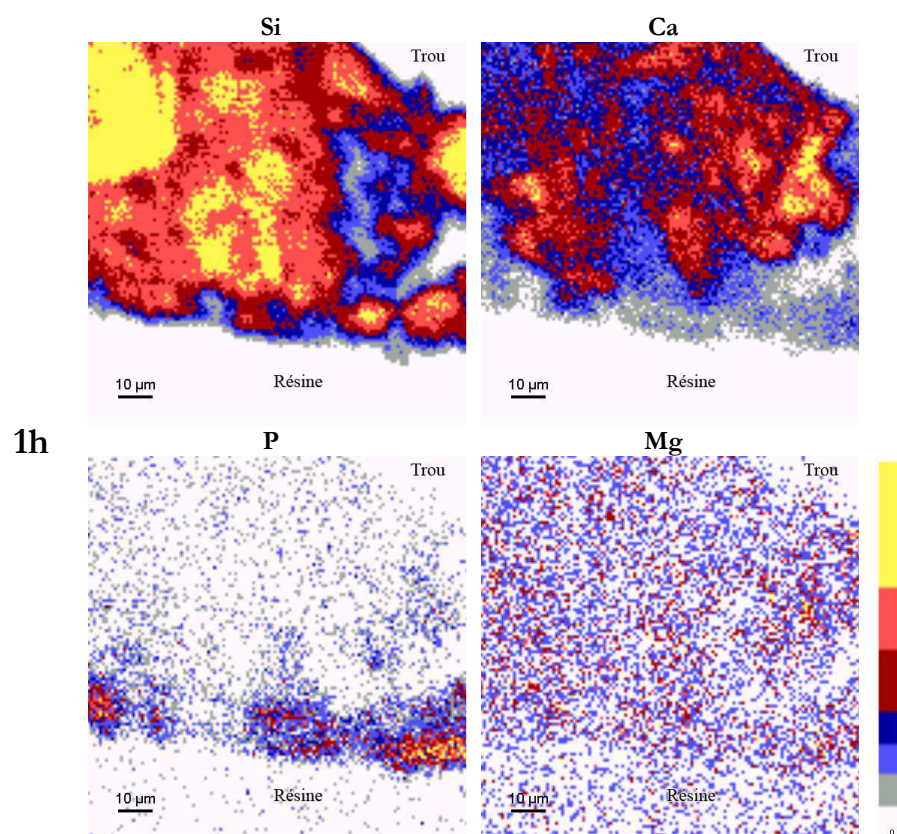


Figure 7-2: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et magnésium dans une pastille de verre B75 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ après 1 heure d'interaction avec le milieu biologique.

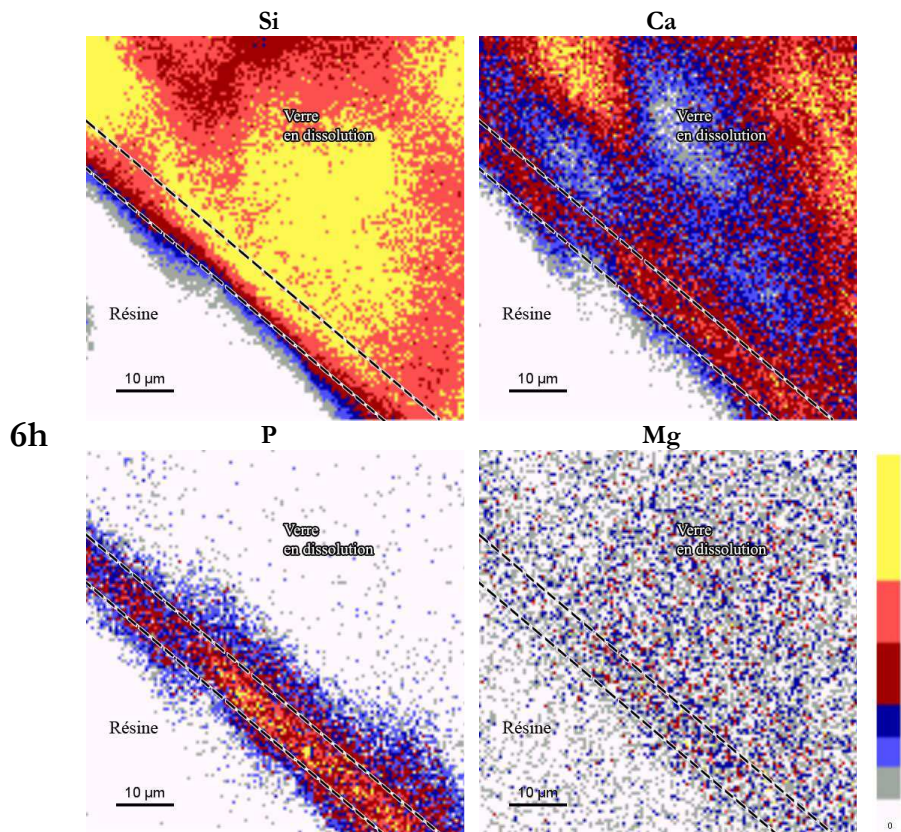


Figure 7-3: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et magnésium dans une pastille de verre B75 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ après 6 heures d'interaction avec le milieu biologique.

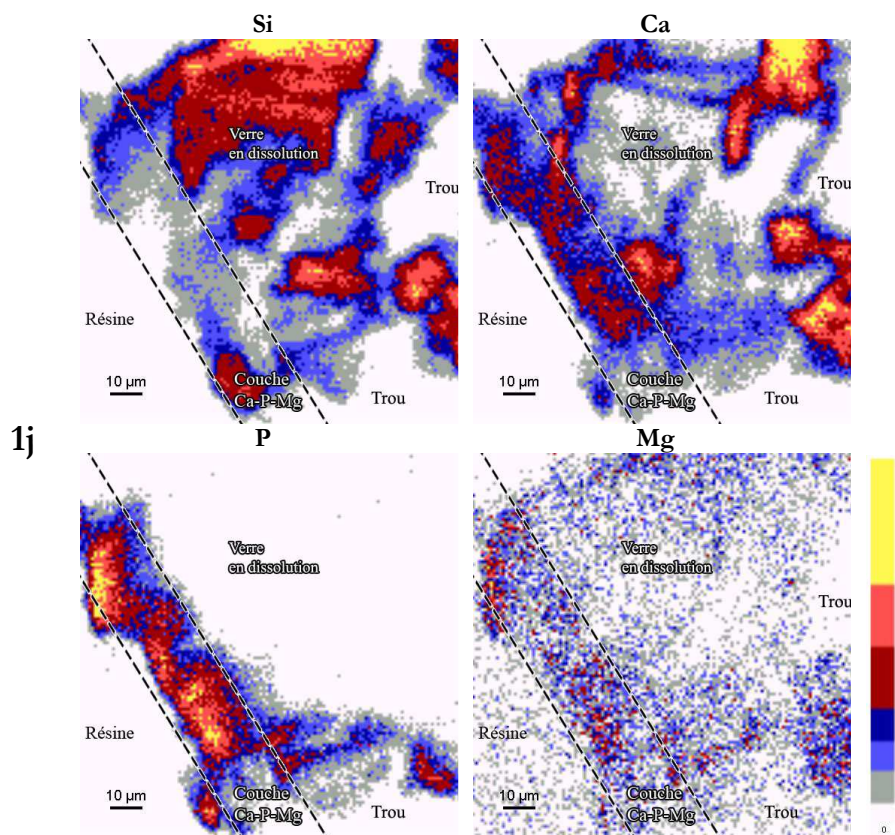


Figure 7-4: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et magnésium dans une pastille de verre B75 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ après 1 jours d'interaction avec le milieu biologique.

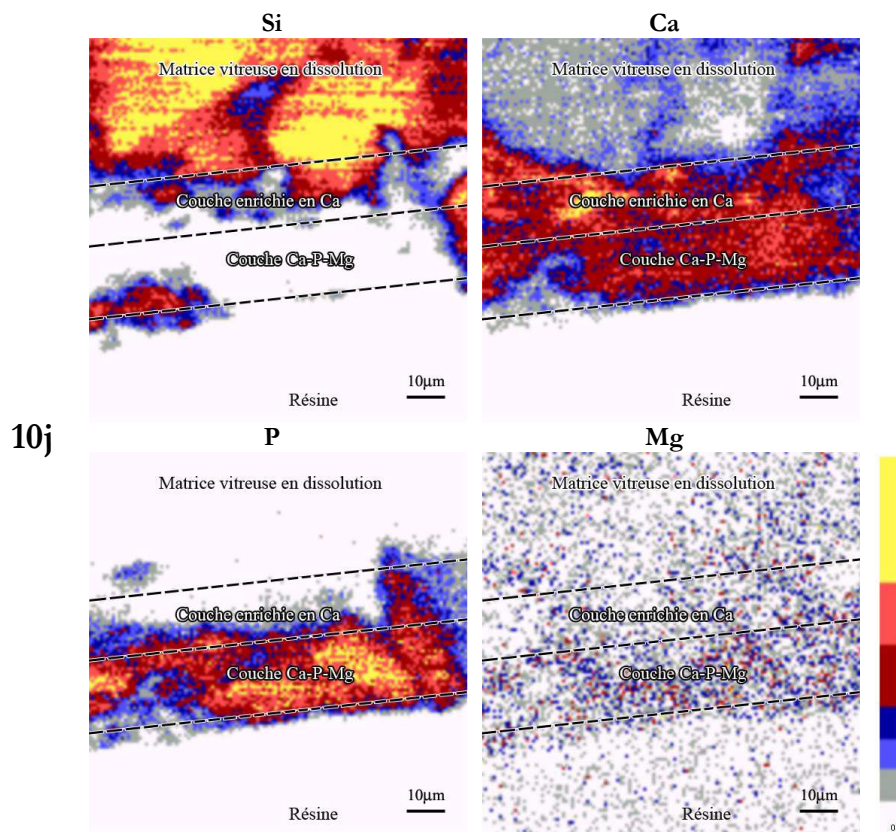


Figure 7-5: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et magnésium dans une pastille de verre B75 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ après 10 jours d'interaction avec le milieu biologique.

Concernant les verres ternaires B72,5 (2,5 % de P), B70 (5 % de P) et B67,5 (7,5 % de P), l'évolution des distributions élémentaires révèle que ces matériaux possèdent la capacité d'induire la formation d'une couche Ca-P-Mg périphérique suivant un mécanisme analogue à celui observé pour le verre B75. Cependant, le relargage des ions calcium du matériau s'avère être d'autant plus retardé que la teneur en phosphore dans le verre est importante. En effet, après 1 heure d'interaction le relargage du calcium semble moins prononcé pour les verres B72,5 et B70 que pour le verre binaire B75. D'après la Figure 7-6, il semble même ne pas avoir encore débuté pour le verre B67,5 après 1 heure d'interaction. À ce délai d'interaction, aucune trace de magnésium n'est détectée pour le verre B67,5. Néanmoins, la couche phosphocalcique se développe rapidement et au bout d'1 jour on distingue nettement la présence d'une couche riche en phosphore et en calcium localisée à la surface des différents verres. La Figure 7-7 illustre cette observation pour le verre B67,5. Après quelques jours d'immersion, la formation d'une couche Ca-P-Mg périphérique de 10 à 20 μm d'épaisseur est avérée (Figure 7-8). La couche tampon localement enrichie en calcium, qui était observée pour le verre B75, n'est présente pour aucun des verres ternaires.

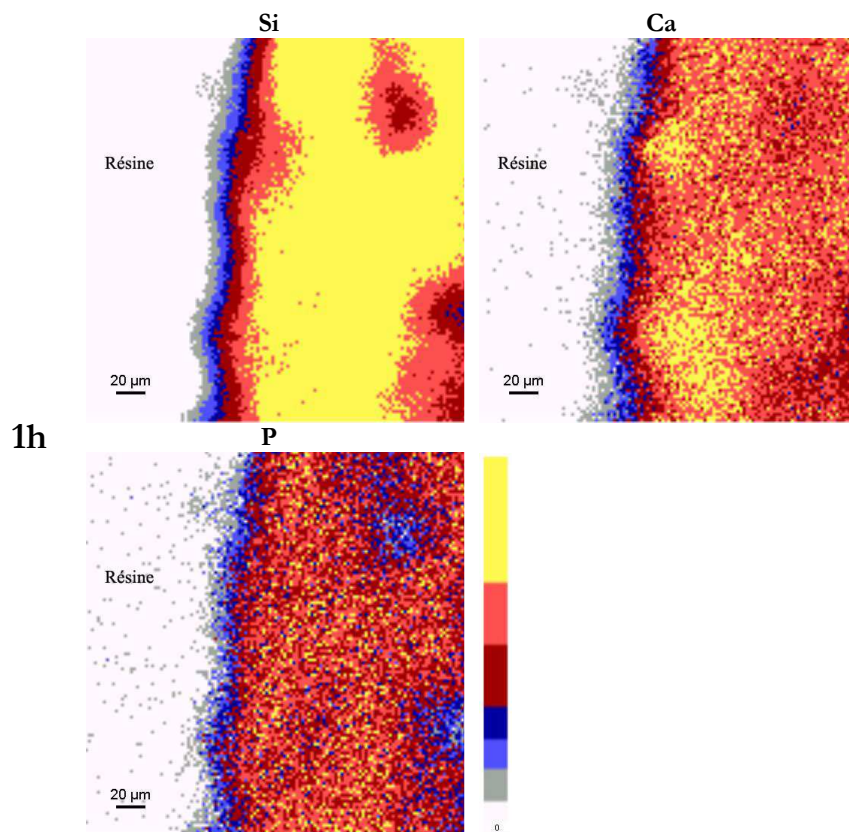


Figure 7-6: distribution des éléments silicium, calcium et phosphore dans une pastille de verre B67,5 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ après 1 heure d'interaction avec le milieu biologique.

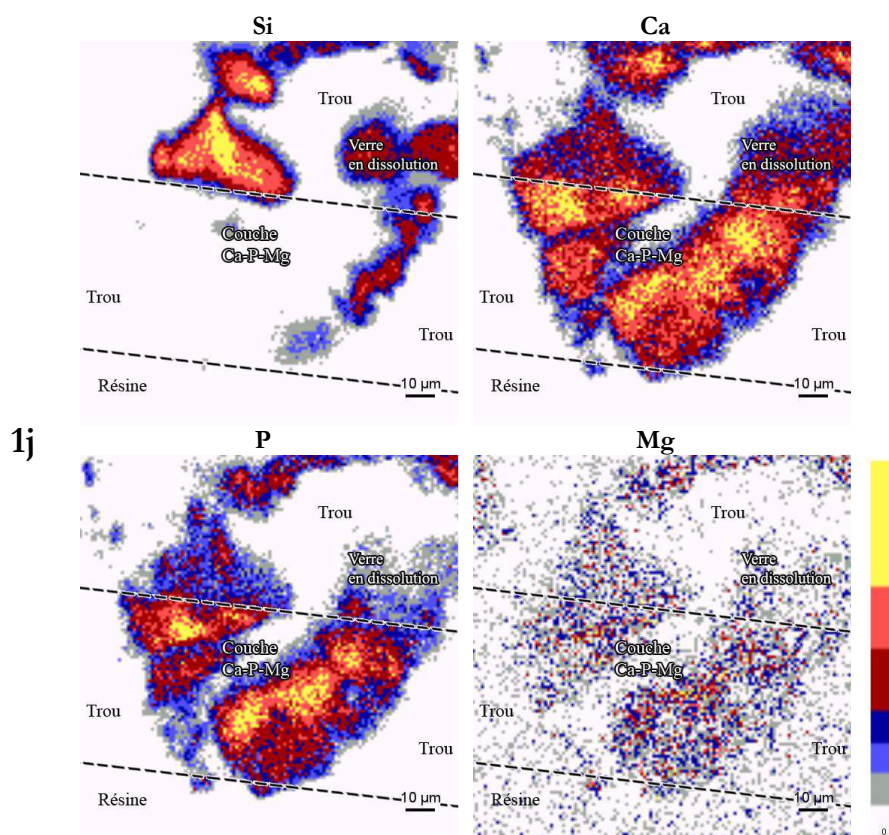


Figure 7-7: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et magnésium dans une pastille de verre B67,5 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ après 1 jour d'interaction avec le milieu biologique.

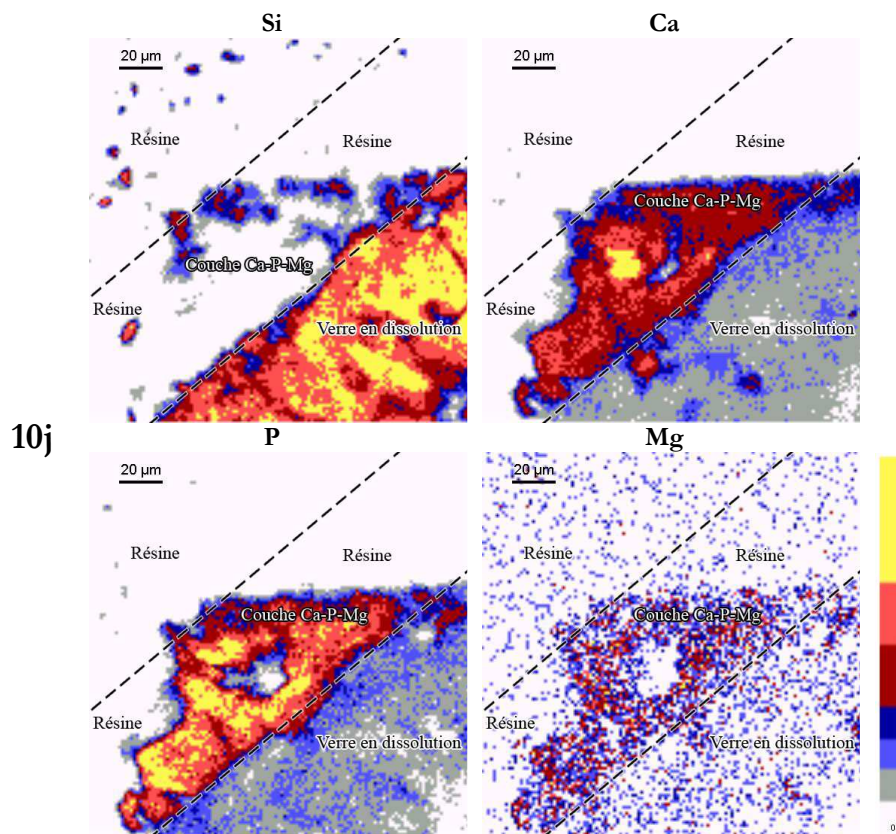


Figure 7-8: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et magnésium dans une pastille de verre B67,5 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ après 10 jours d'interaction avec le milieu biologique.

7.2 Mesures locales des concentrations élémentaires lors des interactions pastilles de verre/milieu biologique

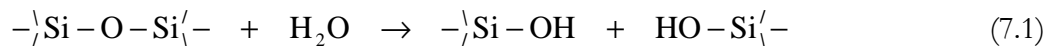
7.2.1 Évolution des concentrations à la périphérie des pastilles de verre

Suivant la répartition des éléments, les cartographies chimiques ont été sectorisées en différentes régions d'intérêt au moyen du logiciel SUPAVISIO. Chaque fois que la région périphérique riche en calcium et en phosphore a été repérée, des masques de mesures ont été définis, permettant d'y calculer les concentrations élémentaires. Suivant la région d'intérêt, des masques de 5 à 20 μm d'épaisseur ont été définis, l'épaisseur de la couche Ca-P augmentant avec le temps d'immersion. En appliquant cette méthodologie, l'évolution des concentrations des espèces Ca, P, Si et Mg à la périphérie des verres a pu être suivie et est représentée sur les Figures 7-9, 7-10, 7-11 et 7-12. Pour un temps d'interaction et une composition de verre donnés, les valeurs de concentrations portées sur les graphes sont la moyenne des concentrations calculées dans plusieurs régions d'intérêt, elles-mêmes définies dans différents échantillons de pastilles afin de s'assurer de la reproductibilité des mesures. Ainsi chaque point représente en moyenne 4 mesures de concentration. Quant aux incertitudes sur les concentrations, elles ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures, celles-ci étant estimées au moyen de l'équation (5.18) (cf. paragraphe 5.2.6.2).

Lors des 6 premières heures d'interaction avec le milieu biologique, c'est à la périphérie du verre binaire B75 que l'on assiste à la plus grande diminution de la concentration en calcium (Figure 7-9). En effet, au bout de 6 heures d'interaction avec le milieu biologique, la

périphérie du verre B75 n'est plus composée que de 12,7 % de calcium (en pourcentages massiques). Cet élément subsiste en concentrations relativement semblables à la périphérie des verres ternaires B72,5 et B70 : respectivement 14,3 % et 13,4 % de calcium y sont détectés. Pour le verre ternaire B67,5, à plus forte teneur en phosphore que les autres matériaux, il n'est pas observé de diminution de la concentration en calcium : celle-ci est maintenue constante jusqu'à 1 heure d'interaction, puis elle augmente jusqu'à représenter 33,4 % de la périphérie du verre après 6 heures d'interaction. Pourtant, le relargage du calcium hors de la matrice vitreuse a bien lieu (cf. paragraphe 7.3 concernant l'évolution de la composition du milieu biologique). En fait, cette augmentation relative de la concentration en calcium à la périphérie de B67,5 est due à une forte diminution de la concentration en silicium. C'est le signe que l'expansion d'une couche de type phosphocalcique, pour l'heure encore très riche en calcium, semble avoir déjà débuté pour ce verre. Dans le même temps, la concentration en silicium se maintient quasiment au même niveau pour les verres B75, B72,5 et B70 (Figure 7-11). Concernant le phosphore, la Figure 7-10 atteste que la concentration de cet élément augmente à la périphérie des verres jusqu'à en représenter 3 à 4 % après quelques heures d'interaction, selon les matériaux. D'autre part, il est visible en Figure 7-12 que l'incorporation de magnésium issu du milieu a débuté.

Au-delà de 6 heures d'interaction, la concentration en calcium à la périphérie des verres B75, B72,5 et B70 augmente considérablement. Pour tous les verres, un pallier est atteint au bout de quelques jours d'immersion dans le milieu. Le calcium s'avère alors être le principal constituant de la couche périphérique. Concernant le phosphore, la concentration de cet élément entre 6 heures et 1 jour double voire triple en périphérie du matériau. Elle s'élève jusqu'à une valeur limite, atteinte après 5 jours d'interaction avec le milieu biologique. Durant cet intervalle de temps, le réseau silicate se dépolymérise sur la périphérie du matériau suivant :



Ceci est signalé par la Figure 7-11 : la concentration en silicium décroît de manière conséquente et après 10 jours d'interaction, cet élément n'est plus présent qu'à hauteur de quelques pourcents à la surface des verres. Quant au magnésium, il est incorporé de manière notable (concentration supérieure à 0,5 %) dans la couche périphérique qui se développe à la surface des verres (Figure 7-12).

Ainsi, après 10 jours d'interaction dans le milieu biologique, la périphérie des différents verres a subi des modifications substantielles qui ont irrémédiablement remanié sa composition. La surface des verres bioactifs est désormais composée d'une couche riche en Ca et en P, contenant 30 à 45 % de calcium et 10 à 14 % de phosphore, dans laquelle sont incorporées des traces de magnésium à hauteur de 0,5 à 1 % et où subsistent des traces de silicium issus du réseau vitreux initial.

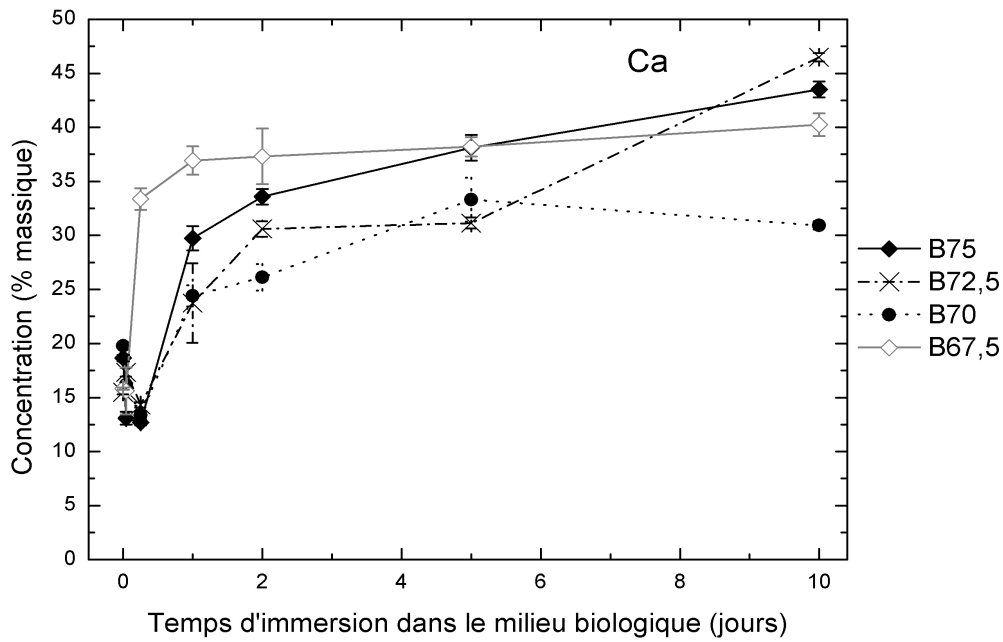


Figure 7-9: évolution de la concentration en calcium à la périphérie des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

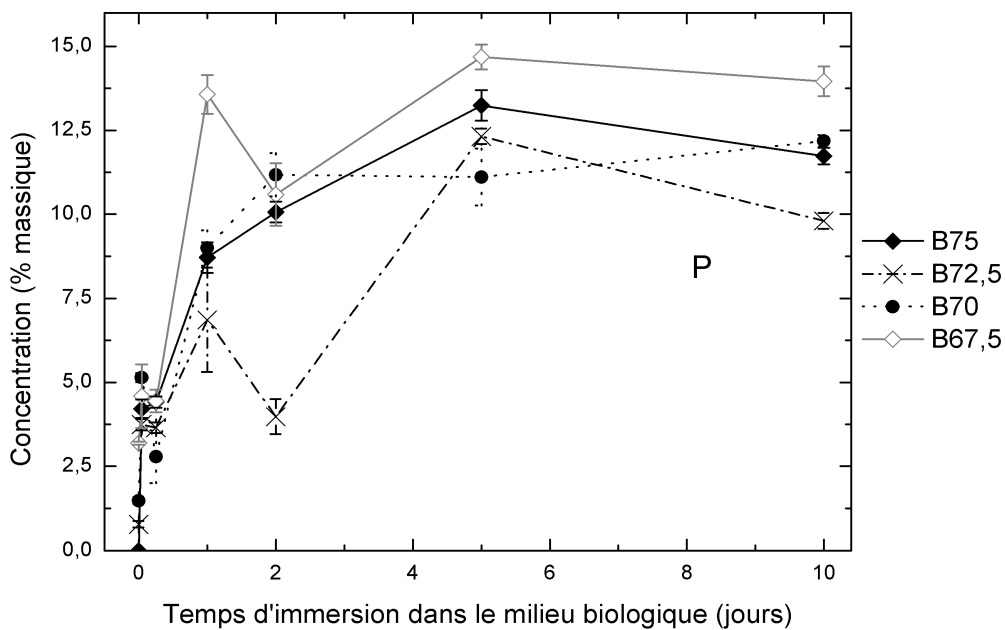


Figure 7-10: évolution de la concentration en phosphore à la périphérie des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

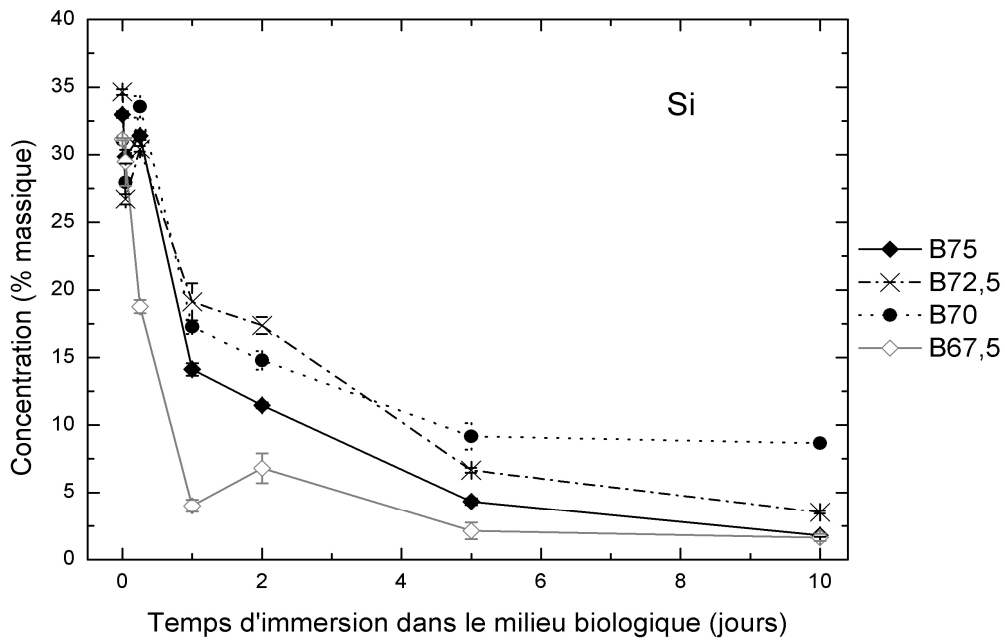


Figure 7-11: évolution de la concentration en silicium à la périphérie des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

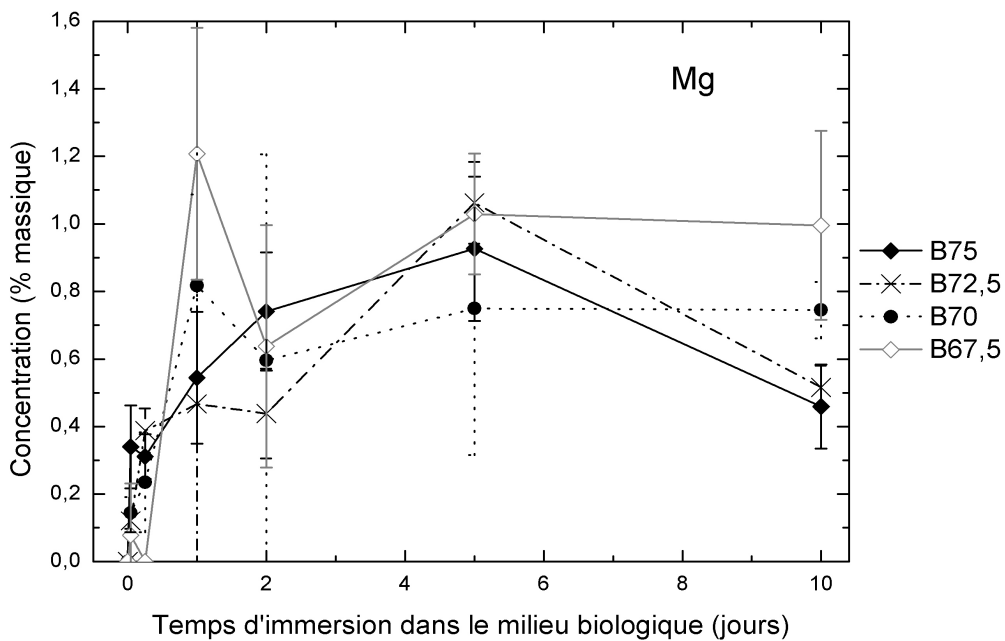


Figure 7-12: évolution de la concentration en magnésium à la périphérie des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

7.2.2 Évolution des concentrations dans la région intérieure des pastilles de verre

Les concentrations élémentaires dans les régions intérieures des pastilles de verre, non directement exposées aux fluides biologiques, ont également été calculées, en définissant des masques de mesures à l'intérieur des pastilles. Les résultats sont présentés sur les Figures 7-13 et 7-14. Pour un temps d'interaction et une composition de verre donnés, les valeurs de concentrations portées sur les graphes sont la moyenne des concentrations calculées dans plusieurs régions d'intérêt, elles-mêmes définies dans différents échantillons de pastilles afin de s'assurer de la reproductibilité des mesures. Ainsi chaque point représente en moyenne 4 mesures de concentration. Les incertitudes sur les concentrations ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

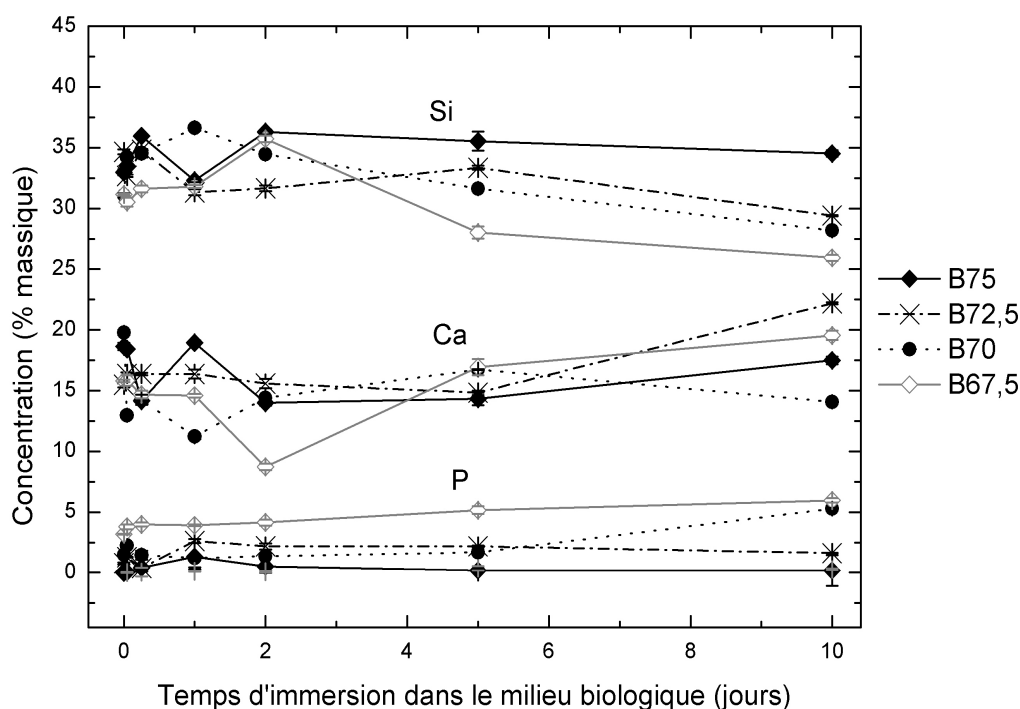


Figure 7-13: évolution des concentrations en silicium, calcium et phosphore dans la région interne des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ non directement exposée aux fluides biologiques. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

Lors des 2 premiers jours d'interaction avec le milieu biologique, des fluctuations notables sont observées pour les concentrations en silicium et en calcium à l'intérieur du matériau. Pour un même verre, il est à noter que les concentrations en silicium et calcium évoluent de manière diamétralement opposée. Ceci tient au fait que les oxydes de silicium et de calcium représentent à eux deux quasiment 100 % de la matrice vitreuse considérée. Une fluctuation dans la concentration de l'un des oxydes entraîne alors nécessairement une variation de caractère opposé pour l'autre oxyde. L'évolution de la concentration en phosphore démontre une légère tendance à la hausse. Des traces de magnésium (Figure 7-14) sont ponctuellement décelées, toujours dans des proportions inférieures à 0,4 %.

Les changements observés pour ces éléments sont dus aux phénomènes de diffusion et de migration des ions vers la périphérie du matériau, où le processus bioactif draine les ions de la matrice en vue d'alimenter la croissance de la couche phosphocalcique. Après 10 jours

d'interaction, on observe pour le verre binaire B75 que les concentrations des différents éléments retournent à une valeur proche de celle qui était leur dans la matrice vitreuse originelle. Pour les verres ternaires en revanche, on constate une diminution sensible de la concentration en silicium, parallèlement à une augmentation notable de la concentration en phosphore : c'est le signe que le développement de la couche Ca-P-Mg s'étend progressivement à des profondeurs de plus en plus importantes, jusqu'à atteindre les régions plus internes des verres.

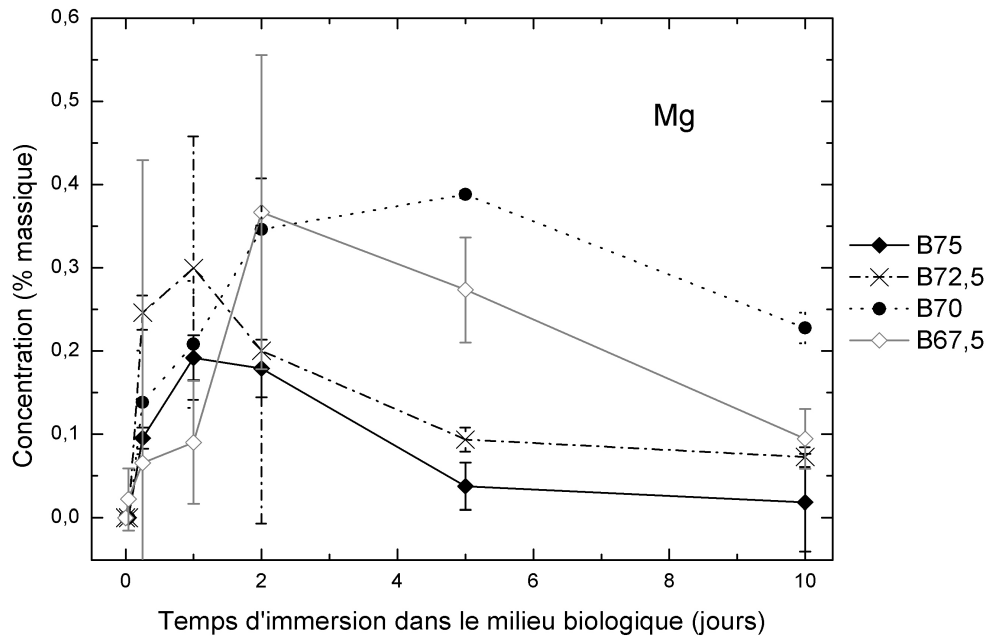


Figure 7-14: : évolution de la concentration en magnésium dans la région interne des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ non directement exposée aux fluides biologiques. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

7.2.3 Évolution des rapports atomiques à l'interface pastilles de verre/milieu biologique

Le suivi des rapports atomiques Ca/P et Ca/Mg à l'interface verre/milieu biologique a été accompli en définissant d'étroits masques de mesures de 1 micron de côté à l'extrême périphérie des verres, dans la zone de contact entre le matériau et le milieu biologique. Les informations obtenues sont représentées sur les Figures 7-15 et 7-16. Pour un temps d'interaction et une composition de verre donnés, les valeurs portées sur les graphes sont la moyenne des rapports Ca/P et Ca/Mg calculés dans plusieurs régions d'intérêt, elles-mêmes définies dans différents échantillons de pastilles afin de s'assurer de la reproductibilité des mesures. Ainsi chaque point représente en moyenne 4 mesures. Il convient de confronter les valeurs obtenues au rapport atomique de l'hydroxyapatite stoechiométrique de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: pour celle-ci, le rapport atomique Ca/P vaut 1,7.

Pour tous les verres, le rapport atomique Ca/P diminue à mesure que le temps d'interaction augmente. Une valeur limite est atteinte après 5 jours d'immersion dans le milieu biologique. Il est à noter que la décroissance est plus rapide pour les verres ternaires contenant du phosphore que pour le verre binaire B75. D'autre part, la valeur du rapport Ca/P finalement atteinte est plus faible pour les verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ que pour le verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$.

CaO. En effet, après 10 jours d'interaction, le rapport Ca/P est compris entre 1,8 et 1,9 pour les verres ternaires ; pour le verre binaire, ce rapport atomique est égal à 2,1.

Une autre indication concernant l'influence du phosphore est extraite de la Figure 7-16. Sur celle-ci, il est observé que le rapport Ca/Mg semble tendre vers une valeur d'autant plus faible que la teneur en phosphore dans la matrice vitreuse originelle est importante. Après 10 jours d'interaction, de plus grandes quantités de magnésium s'avèrent être présentes en surface des verres contenant du phosphore : le rapport atomique Ca/Mg s'étend sur une gamme de valeurs allant de 17 pour le verre à plus forte teneur en phosphore jusqu'à une valeur de 45 pour le verre sans phosphore.

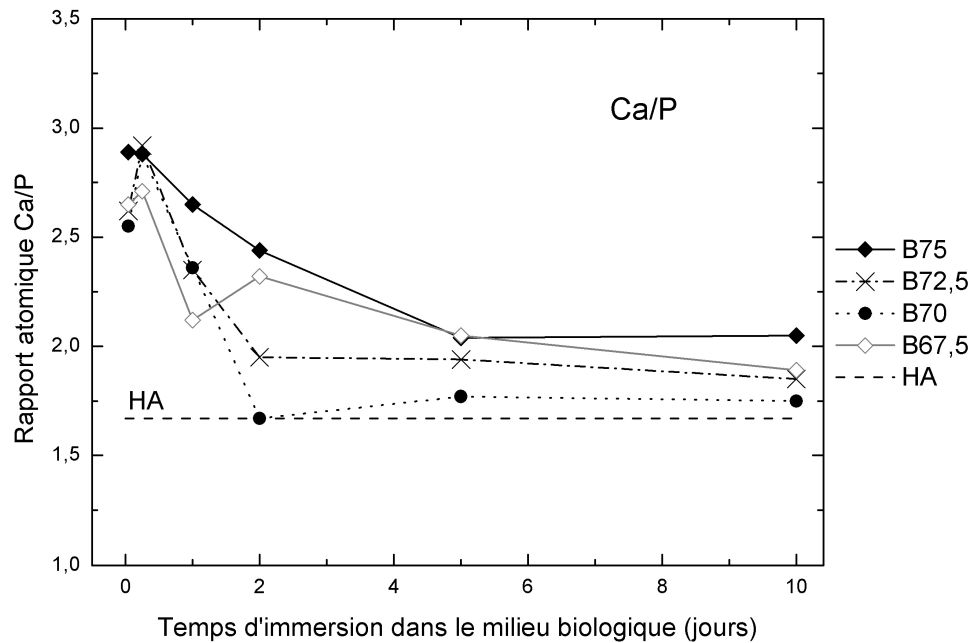


Figure 7-15: évolution du rapport atomique Ca/P à l'interface pastilles de verre/milieu biologique.

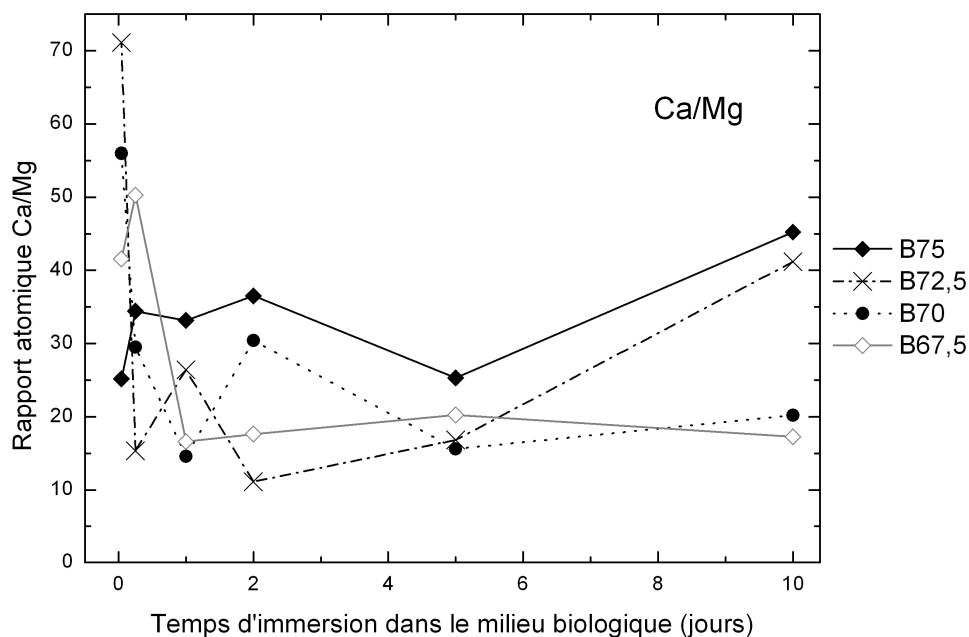


Figure 7-16: évolution du rapport atomique Ca/Mg à l'interface pastilles de verre/milieu biologique.

7.3 Évolution de la composition du milieu biologique lors des interactions avec les pastilles de verre

L'évolution de la composition du milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les pastilles de verre est exposée sur les Figures 7-17, 7-18, 7-19 et 7-20. Le suivi de la concentration en calcium dans le milieu biologique (Figure 7-17) indique une hausse de cet élément lors des premières heures d'interaction. Ceci correspond à la phase de désalcalinisation de la surface des verres, première étape du processus bioactif : le calcium est relargué hors de la matrice vitreuse, tel qu'observé lors de l'analyse de la périphérie des verres en micro-PIXE. Le relargage du calcium est plus rapide et plus abondant pour le verre sans phosphore B75. Après cette phase rapide de relargage, on constate une diminution progressive de la concentration en calcium dans le milieu biologique. Celui-ci est prélevé du milieu biologique et incorporé en périphérie des verres afin de participer à la croissance de la couche phosphocalcique. Cependant, après 10 jours d'interaction, le verre binaire B75 a relargué une quantité élevée de calcium, si bien qu'on note une augmentation globale de la concentration en calcium dans le milieu. Ceci pourrait également indiquer une dissolution abondante de la couche phosphocalcique nouvellement formée. À l'inverse, pour les verres ternaires, la quantité de calcium consommée est importante et la concentration de cet élément dans le milieu est en constante diminution.

D'autres informations utiles sont extraites de la Figure 7-18. Il y est exposé que la concentration en phosphore dans le milieu biologique diminue rapidement avec le temps d'interaction. Les verres binaires et ternaires incorporent une importante quantité de phosphore issu du milieu. Après 10 jours d'interaction, la quantité de cet élément présente dans le milieu biologique a été divisée par 2 voire 3. Il est constaté que le phosphore est prélevé dans des proportions d'autant plus importantes que la teneur en phosphore dans le verre considéré est élevée.

La Figure 7-19 montre l'évolution de la concentration en silicium dans le milieu biologique. Les verres binaires et ternaires semblent adopter une tendance commune. Au temps zéro, la quantité de cet élément présente dans le milieu biologique est nulle. Lors des premières heures d'interaction, de faibles quantités de silicium sont détectées dans le milieu. Puis, à mesure que les réactions de dissolution assurent la décomposition du réseau vitreux et que la couche Ca-P s'étend sur une plus large profondeur, de plus fortes concentrations de silicium sont relarguées dans le milieu biologique. Une valeur limite semble atteinte au bout de 10 jours d'interaction. La quantité de silicium alors détectée dans le milieu est de 56 à 59 ppm.

L'évolution de la concentration en magnésium démontre que de faibles quantités de cet élément sont prélevées du milieu biologique. On observe sur la Figure 7-20 une lente décroissance de la concentration en magnésium à mesure que le temps d'interaction se prolonge. Après 10 jours d'immersion, 1 à 2 ppm de magnésium ont été incorporés par les verres bioactifs. Il est à noter que le magnésium est prélevé dans des proportions plus importantes pour les verres ternaires. Pour le verre binaire, on note une hausse finale de la concentration en magnésium, ce qui tendrait à confirmer qu'une partie de la couche Ca-P-Mg est dissoute après 10 jours.

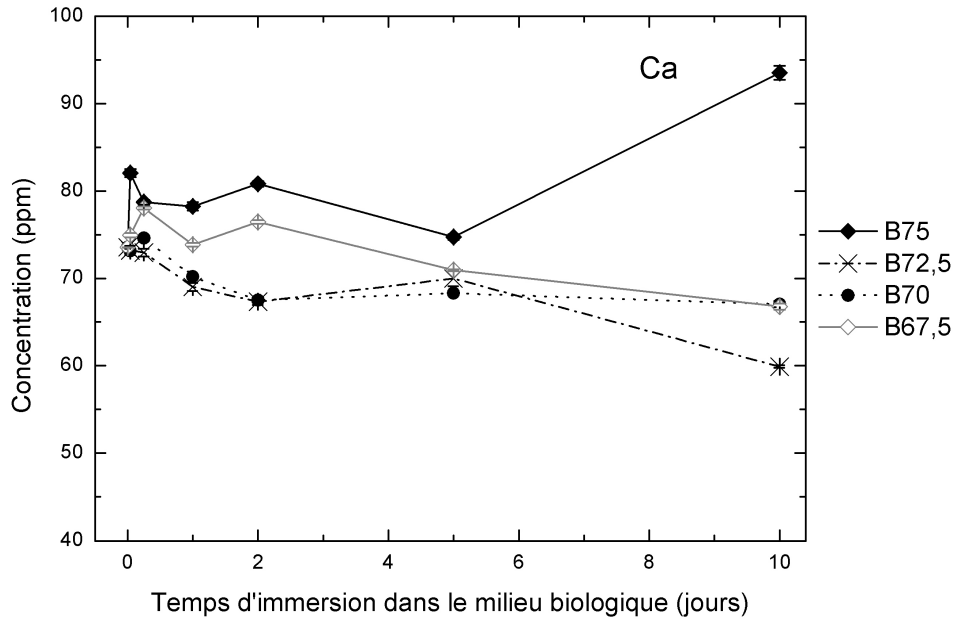


Figure 7-17: évolution de la concentration en calcium dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$.

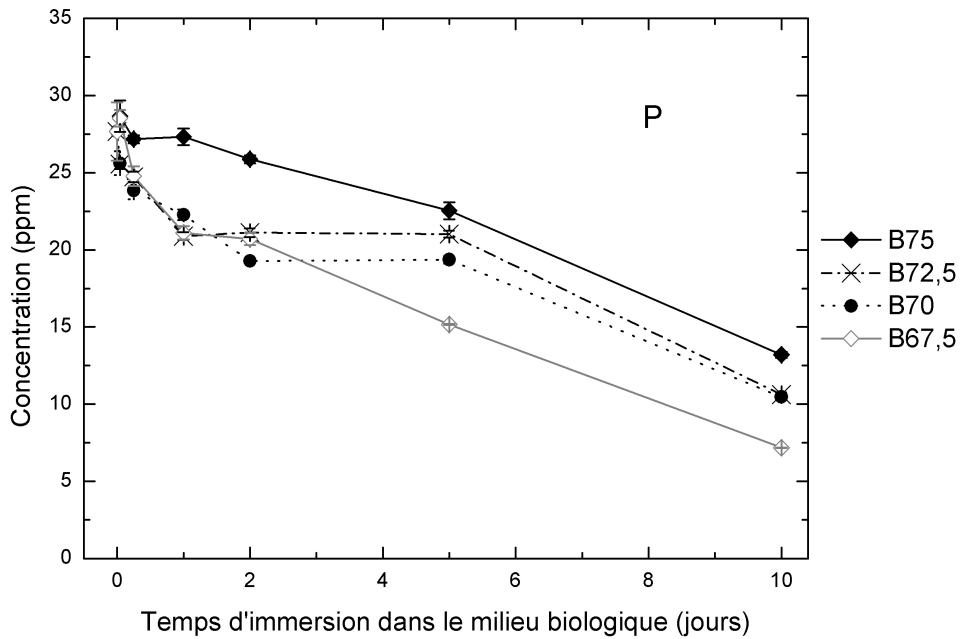


Figure 7-18: évolution de la concentration en phosphore dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$.

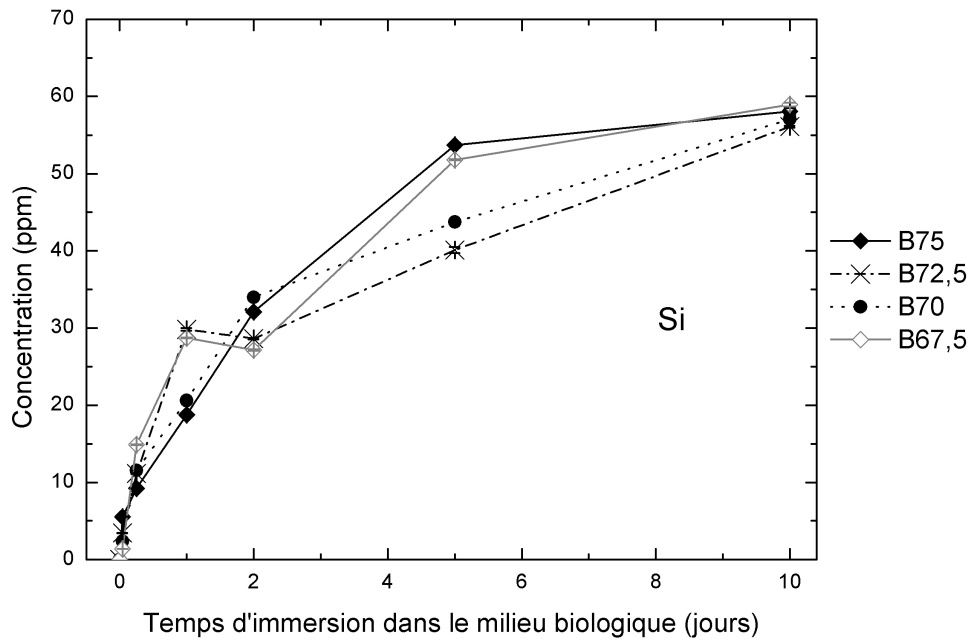


Figure 7-19: évolution de la concentration en silicium dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$.

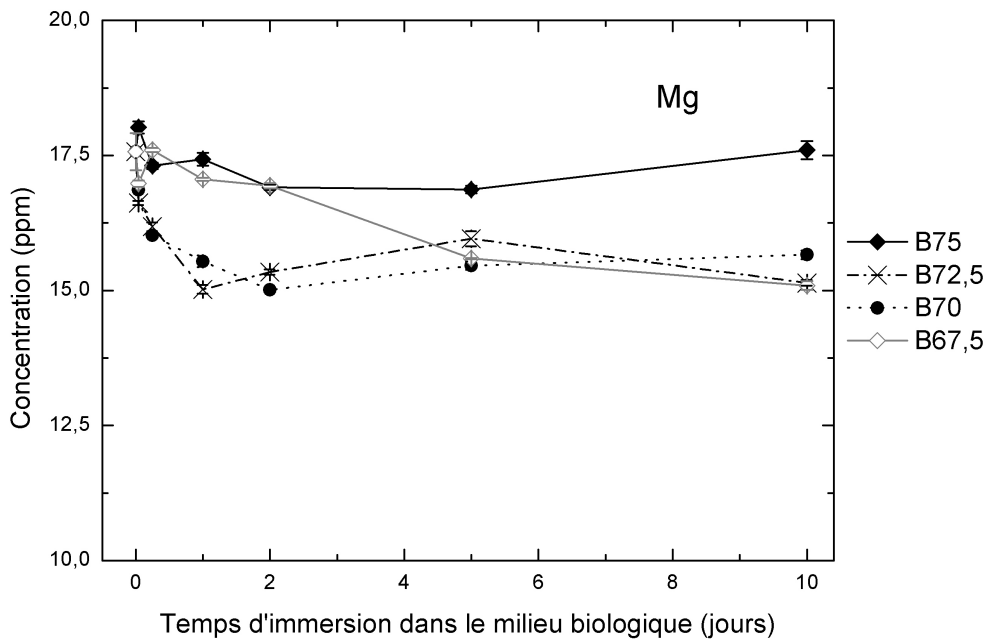


Figure 7-20: évolution de la concentration en magnésium dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$.

7.4 Résumé des observations expérimentales pour les pastilles de verres $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$

Les images chimiques obtenues en PIXE pour les matériaux avant interaction montrent une répartition des éléments uniforme : le procédé sol-gel permet l'obtention de verres homogènes en composition.

Lors des premières heures d'interaction entre les verres et le milieu biologique, le relargage des ions calcium hors de la matrice vitreuse est opéré. Le relargage du calcium est plus rapide et plus abondant pour le verre sans phosphore B75 : il semble d'autant plus retardé que la teneur en phosphore dans le verre est importante.

Par la suite, une couche phosphocalcique se développe rapidement en périphérie des matériaux, du fait de l'incorporation de calcium et de phosphore issus du milieu, conjuguée à la diffusion des ions de la matrice vitreuse jusque vers la surface du matériau. Après 10 jours d'interaction dans le milieu biologique, la périphérie des verres bioactifs est ainsi composée d'une couche contenant 30 à 45 % de calcium et 10 à 14 % de phosphore, dans laquelle sont incorporées des traces de magnésium à hauteur de 0,5 à 1 % et où subsistent des traces de silicium issus du réseau vitreux initial. Les images chimiques montrent alors la formation d'une couche Ca-P-Mg de 10 à 20 μm d'épaisseur à la périphérie des matériaux.

Le développement de la couche Ca-P-Mg semble s'étendre sur une profondeur plus importante pour les verres ternaires. En effet, on constate dans les régions plus internes des pastilles de verres ternaires une diminution sensible de la concentration en silicium, parallèlement à une augmentation notable de la concentration en phosphore, signe de l'expansion de la couche Ca-P-Mg. D'autres observations vont dans ce sens : le phosphore et le magnésium du milieu biologique sont prélevés dans des proportions plus importantes pour les verres ternaires. Pour le verre binaire B75, on note une hausse finale de la concentration en calcium et en magnésium dans le milieu biologique, ce qui pourrait indiquer qu'une partie de la couche Ca-P-Mg est dissoute après 10 jours. Enfin, la valeur du rapport atomique Ca/P finalement atteinte est plus faible pour les verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ que pour le verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$. Après 10 jours d'interaction, le rapport Ca/P est compris entre 1,8 et 1,9 pour les verres ternaires ; pour le verre binaire, ce rapport atomique est égal à 2,1. Il est également observé que le rapport Ca/Mg tend vers une valeur d'autant plus faible que la teneur en phosphore dans la matrice vitreuse originelle est importante.

Chapitre 8

Étude du processus de bioactivité pour les pastilles de verres dopés en strontium : $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$

Afin d'établir une comparaison entre les pastilles de verres dopés en strontium et les pastilles de verres binaires et ternaires, des mesures similaires à celles présentées au Chapitre 7 ont été effectuées. Si la méthodologie adoptée est identique, les cartographies chimiques ont néanmoins été acquises à une énergie d'incidence du faisceau de protons plus élevée, réglée à 2,9 MeV, et en faisant usage d'un funny filter.

8.1 Imagerie chimique multiélémentaire à la périphérie des pastilles de verres dopés en strontium après immersion dans le milieu biologique

Des cartographies multiélémentaires ont été obtenues pour chacun des verres dopés en strontium avant interaction et après 1 heure, 6 heures, 1 jour, 2 jours, 5 jours et 10 jours d'interaction avec le milieu biologique. Dans ce paragraphe, nous en présentons une sélection restreinte aux images chimiques les plus importantes pour la comparaison des réactions physico-chimiques à la périphérie des pastilles de verres dopés en strontium avec celles ayant lieu à la périphérie des pastilles de verres binaires et ternaires.

Les cartographies chimiques des verres de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ révèlent que l'ajout de strontium dans la composition du verre diminue la dissolution du matériau comparativement à un verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$. Cet effet est visible sur les cartographies du calcium. Sur la Figure 8-1, cet élément apparaît être encore distribué de façon homogène après 1 heure d'interaction pour les verres dopés en strontium, alors que son relargage hors du réseau vitreux avait déjà débuté sur la périphérie du verre B75. Après 6 heures d'immersion, le verre dopé à hauteur de 1 % en strontium présente une répartition élémentaire analogue au verre B75, avec l'existence d'une couche périphérique constituée de calcium, phosphore et silicium, et la concomitance du réseau vitreux originel au sein duquel les ions calcium ont diffusé vers la surface du matériau. En revanche la Figure 8-2 montre que le verre contenant 5 % de strontium présente une répartition uniforme en calcium après 6 heures d'interaction. La diffusion de cet élément ne prend des proportions comparables au verre B75 qu'après 1 jour d'immersion (Figure 8-3).

Concernant la distribution du strontium, cet élément est réparti uniformément jusqu'à 1 heure d'interaction. Une partie du strontium semble ensuite être relarguée de la périphérie

du matériau et le strontium est détecté dans des proportions plus importantes dans les régions intérieures des pastilles.

Le dopage en strontium s'avère également avoir une incidence sur le développement de la couche phosphocalcique. Ainsi, alors que la présence de phosphore était détectée à la périphérie du verre B75 dès 1 heure d'interaction, cet élément n'est décelé qu'après 6 heures d'interaction pour les verres B75-Sr1 et B75-Sr5. De même, les traces de magnésium ne sont décelées qu'au bout de 6 heures pour les verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ contre 1 heure pour le verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$. Par la suite, la couche Ca-P-Mg croît de manière similaire au verre binaire. Après 10 jours d'interaction (Figure 8-4), on observe les trois régions précédemment décrites pour le verre B75. Les régions les plus intérieures de la pastille sont constituées du réseau vitreux originel. La couche périphérique est une région étendue riche en calcium et en phosphore, dans laquelle sont présentes des traces de magnésium et de strontium. Enfin, entre ces deux régions, on constate la présence d'une zone intermédiaire localement enrichie en calcium.

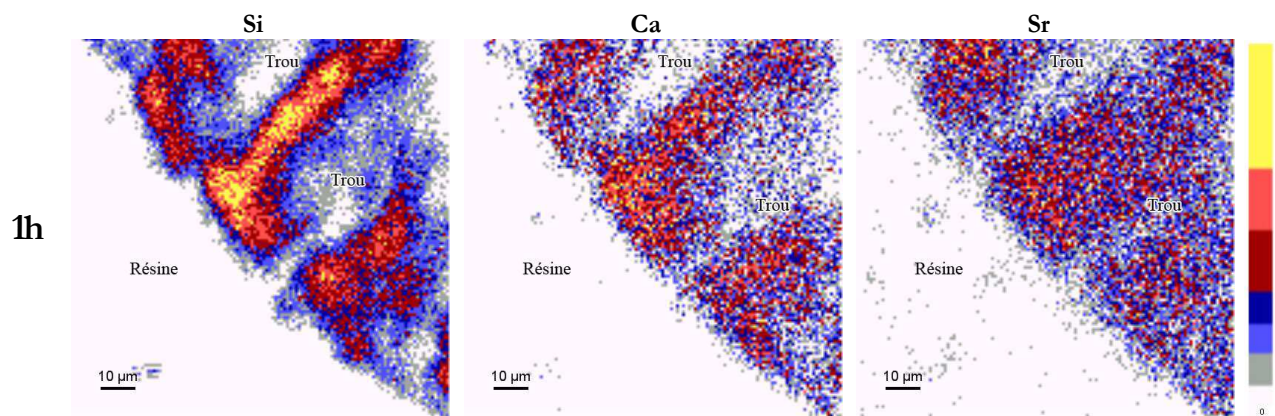


Figure 8-1: distribution des éléments silicium, calcium et strontium dans une pastille de verre B75-Sr5 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ après 1 heure d'interaction avec le milieu biologique.

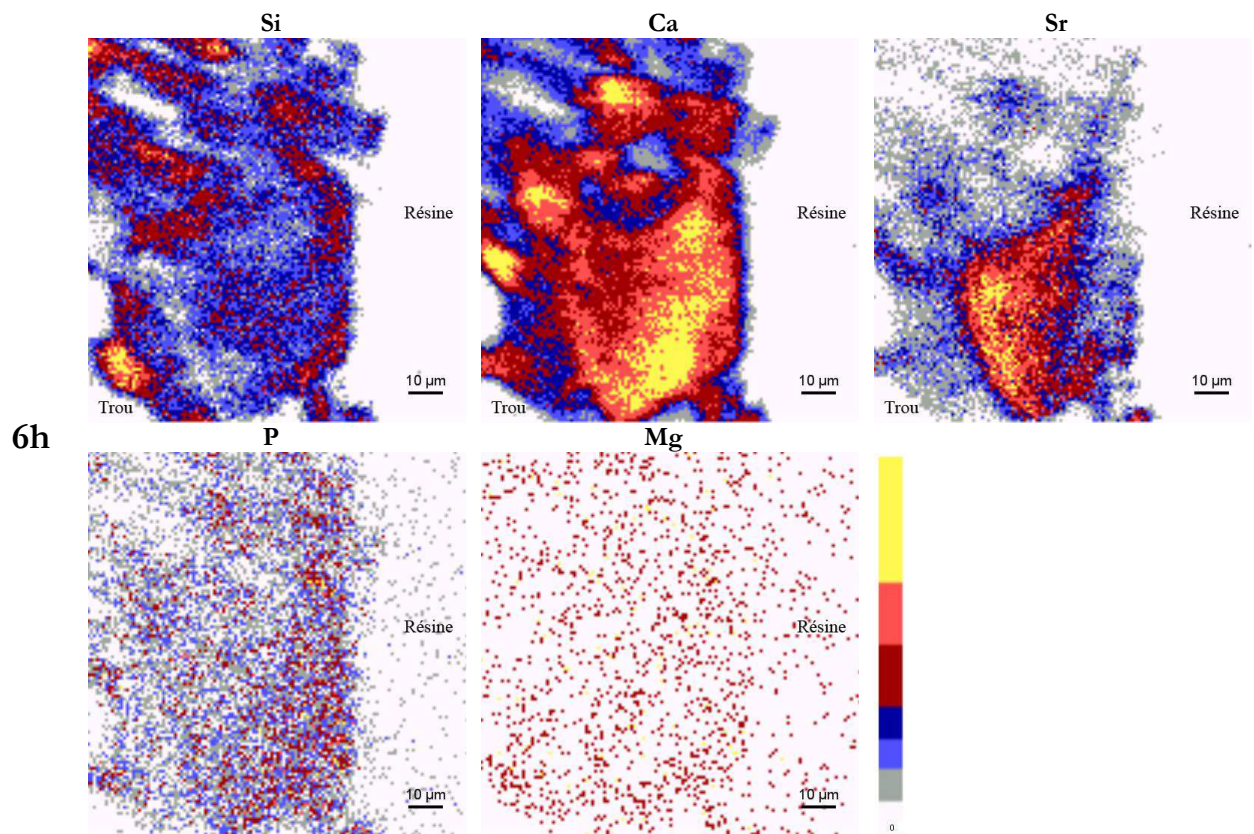


Figure 8-2: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore, strontium et magnésium dans une pastille de verre B75-Sr5 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ après 6 heures d'interaction avec le milieu biologique.

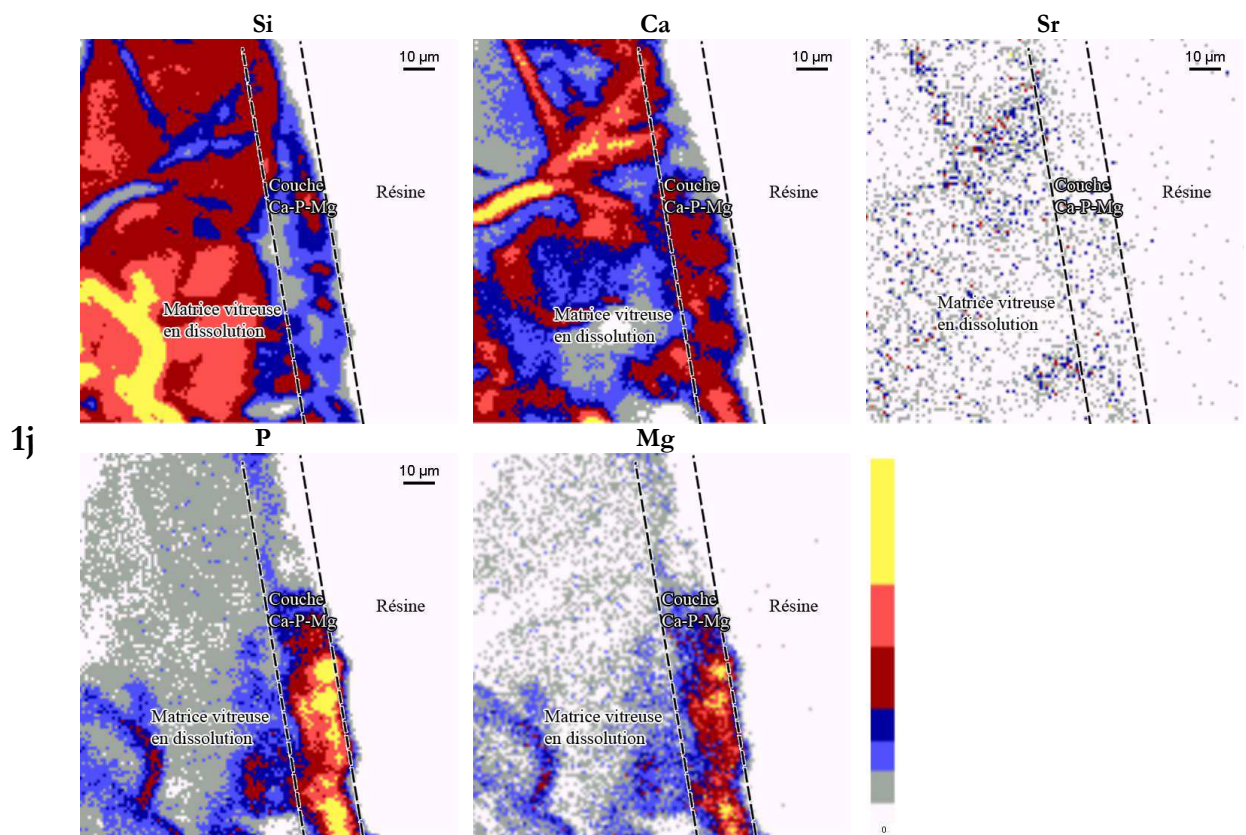


Figure 8-3: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore, strontium et magnésium dans une pastille de verre B75-Sr5 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ après 1 jour d'interaction avec le milieu biologique.

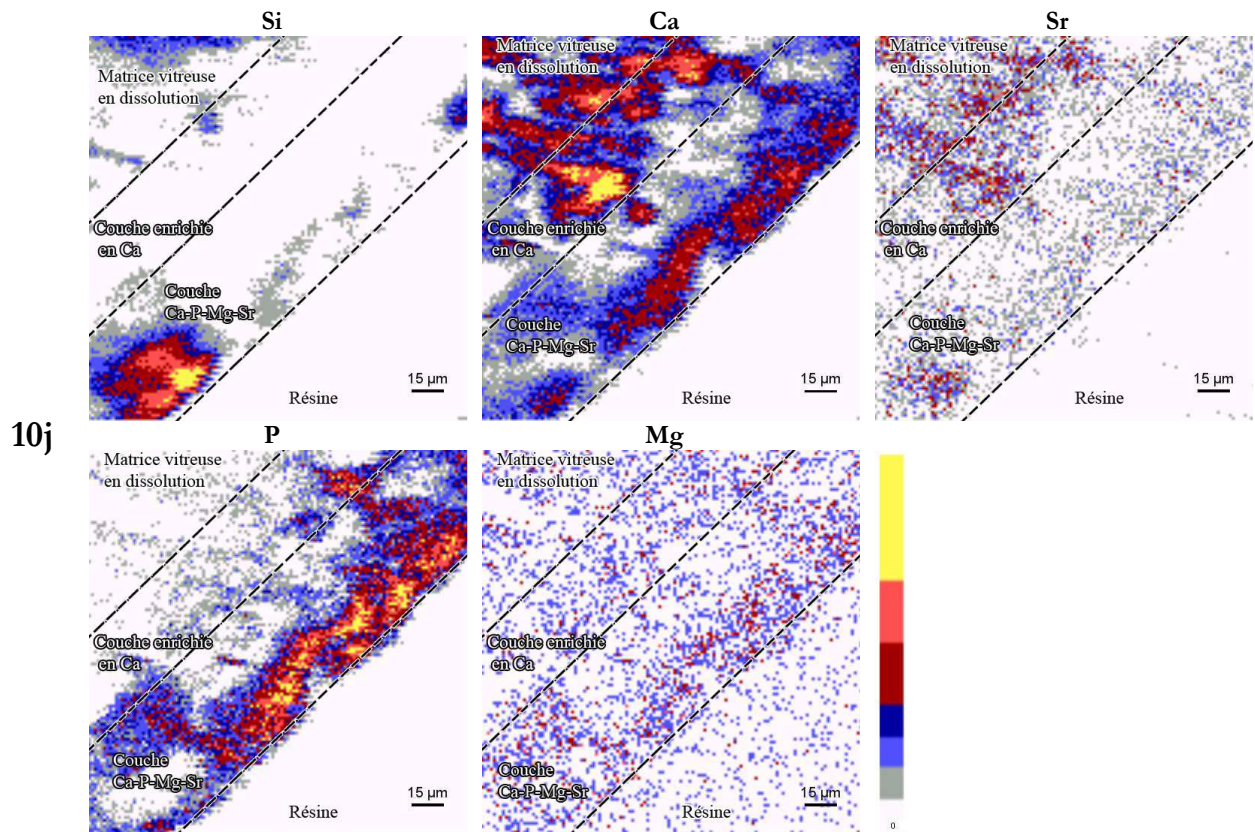


Figure 8-4: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore, strontium et magnésium dans une pastille de verre B75-Sr5 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ après 10 jours d'interaction avec le milieu biologique.

Les cartographies multiélémentaires concernant les verres de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ attestent également d'un ralentissement de la dissolution du matériau en comparaison du verre non dopé B67,5. L'ajout de strontium se traduit ainsi par le ralentissement du relargage du calcium. Après 6 heures d'immersion dans le milieu biologique (Figure 8-5), les verres B67,5-Sr1 et B67,5-Sr5 présentent toujours une distribution homogène en calcium, alors que la diffusion de cette espèce avait déjà débuté pour le verre B67,5. Le strontium, distribué de façon homogène aux premiers temps d'interaction, est en partie évacué de la couche phosphocalcique périphérique à mesure que celle-ci se développe. La capacité de ces matériaux à former une couche Ca-P-Mg-Sr est néanmoins avérée après quelques jours d'interaction (Figure 8-6).

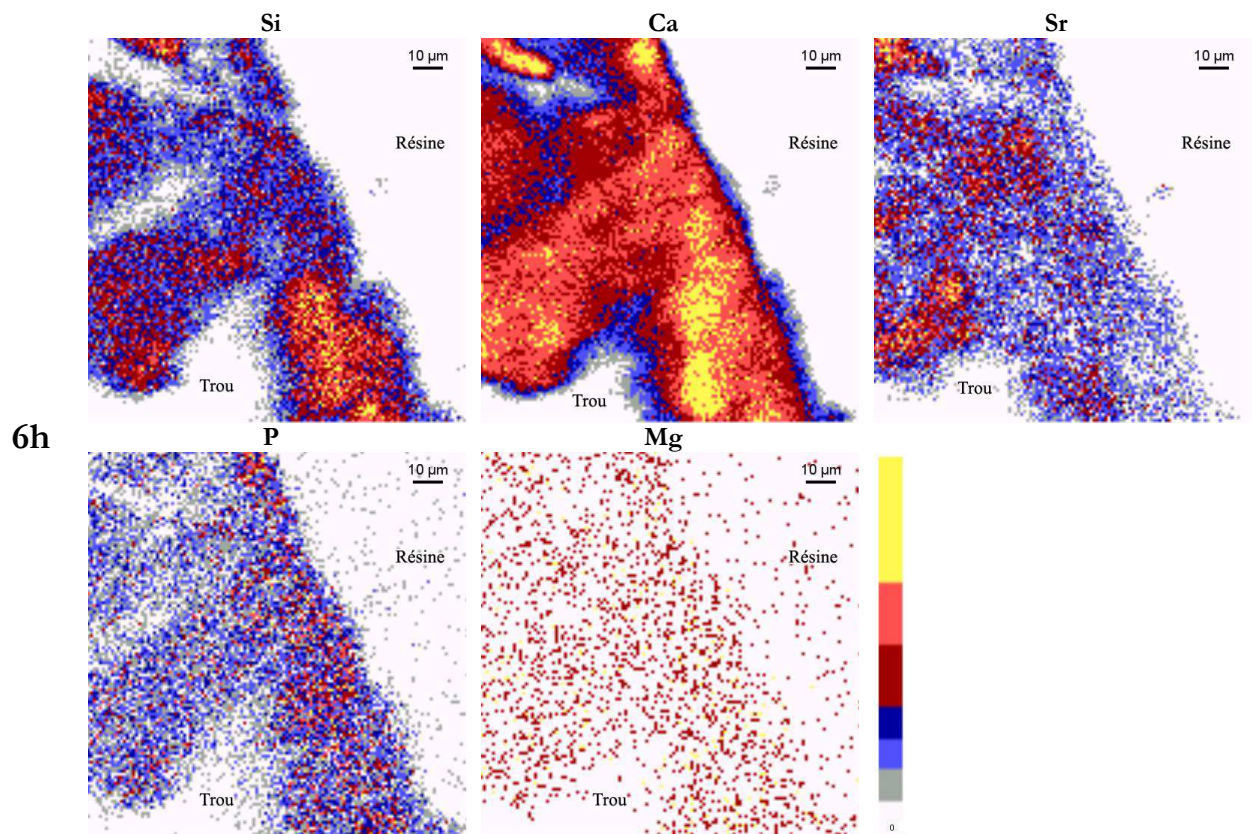


Figure 8-5: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore, strontium et magnésium dans une pastille de verre B67,5-Sr5 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ après 6 heures d'interaction avec le milieu biologique.

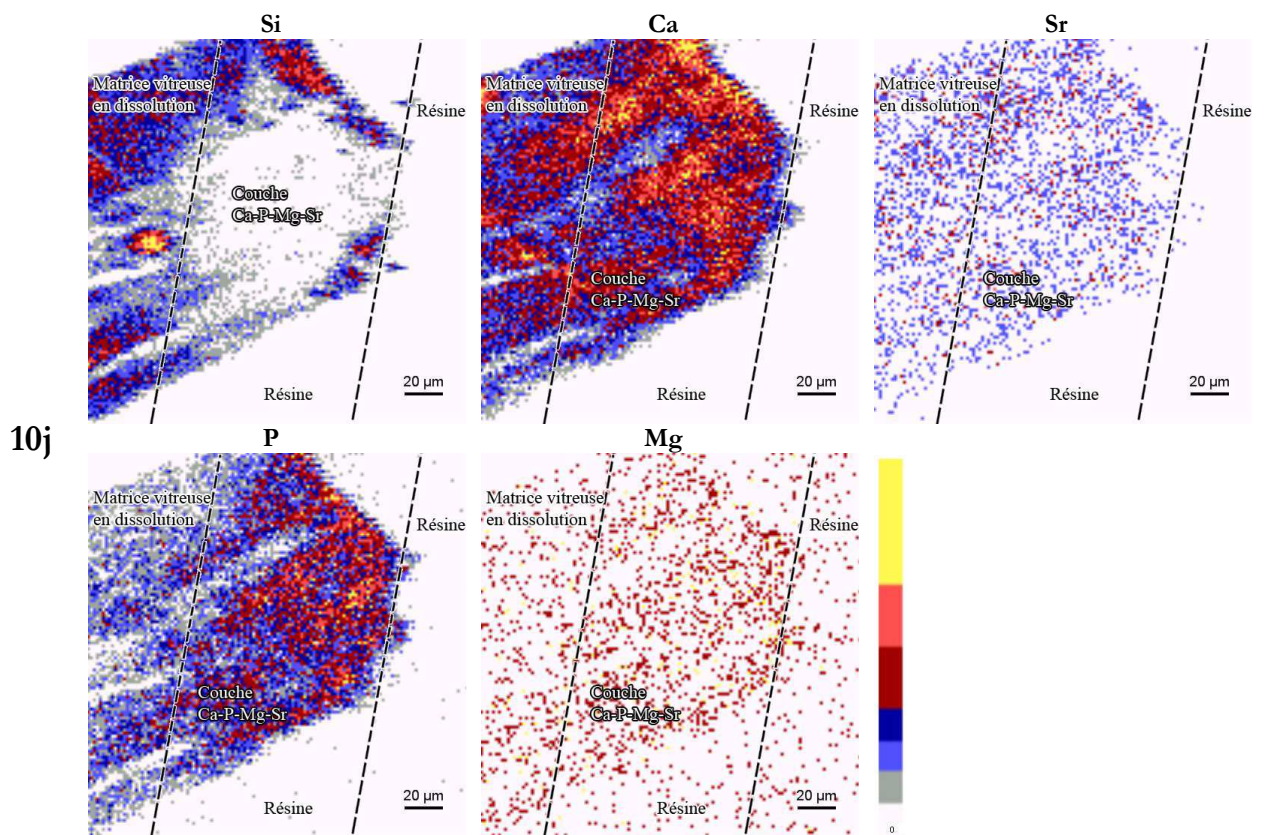


Figure 8-6: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore, strontium et magnésium dans une pastille de verre B67,5-Sr5 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ après 10 jours d'interaction avec le milieu biologique.

8.2 Mesures locales des concentrations élémentaires lors des interactions pastilles de verre/milieu biologique

8.2.1 Évolution des concentrations à la périphérie des pastilles de verres dopés en strontium

Les Figures 8-7, 8-8, 8-9 et 8-10 montrent l'évolution des concentrations élémentaires à la périphérie des verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$. Les concentrations calculées à la périphérie du verre B75 $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ y sont également portées afin d'opérer une comparaison. La Figure 8-7, représentant l'évolution des concentrations en calcium, indique que les verres B75-Sr1 et B75-Sr5 adoptent un comportement résolument différent du verre B75. Pour les verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$, la concentration en calcium commence par augmenter lors des premières heures d'interaction avec le milieu biologique. L'augmentation relative de la concentration en calcium est due à ce que dans le même temps la concentration en silicium diminue fortement (Figure 8-9). Ceci tend à indiquer que pour les verres dopés en strontium, le relargage du calcium n'est pas aussi rapide que la dépolymérisation du réseau : le relargage du calcium est ralenti et semble affecter une quantité plus limitée de cations de la matrice. Ce n'est qu'au-delà de 6 heures d'interaction que la concentration en calcium chute jusqu'à un minimum atteint après 1 jour d'interaction pour le verre B75-Sr1 et après 2 jours pour le verre B75-Sr5. Le minimum atteint est plus élevé que celui du verre B75 : l'ampleur de la dissolution est donc moindre pour les matériaux dopés en strontium.

Après l'étape de relargage, la quantité de calcium présente en périphérie des verres croît, mais cette augmentation est moins rapide pour les verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ que pour le verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$. Après 10 jours d'immersion, la proportion de calcium contenue dans la couche Ca-P périphérique des verres dopés en strontium est proche de 30 % massiques, ce qui est inférieur à la quantité de calcium détecté dans la couche Ca-P périphérique du verre B75 (44 % massique). Mais il faut tenir compte du fait que les matrices des verres B75-Sr1 et B75-Sr5 contiennent initialement moins de calcium.

La Figure 8-9 montre que la décroissance de la concentration en silicium à la périphérie des matériaux est d'autant plus lente que la proportion en strontium dans la matrice vitreuse originelle est élevée. Après 10 jours d'interaction, la couche périphérique du verre B75-Sr1 est encore composée de 6 % de silicium, celle du verre B75-Sr5 de 9 % de silicium.

Concernant le phosphore (Figure 8-8), la tendance observée semble commune aux trois verres B75, B75-Sr1 et B75-Sr5 ; à savoir, une augmentation rapide de la concentration de cet élément en périphérie des pastilles. Un extremum est finalement atteint après 10 jours d'interaction. La teneur en phosphore de la périphérie des verres B75, B75-Sr1 et B75-Sr5 est alors voisine de 12 %.

Des traces de magnésium sont détectées dans la couche qui se développe à la surface des verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ (Figure 8-10). La proportion de magnésium augmente à mesure que le temps d'immersion se prolonge et donc que la couche périphérique s'étend à la surface des verres. La quantité de magnésium incorporée à la périphérie des pastilles s'avère être plus importante pour les verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ que pour le verre binaire $\text{SiO}_2\text{-CaO}$.

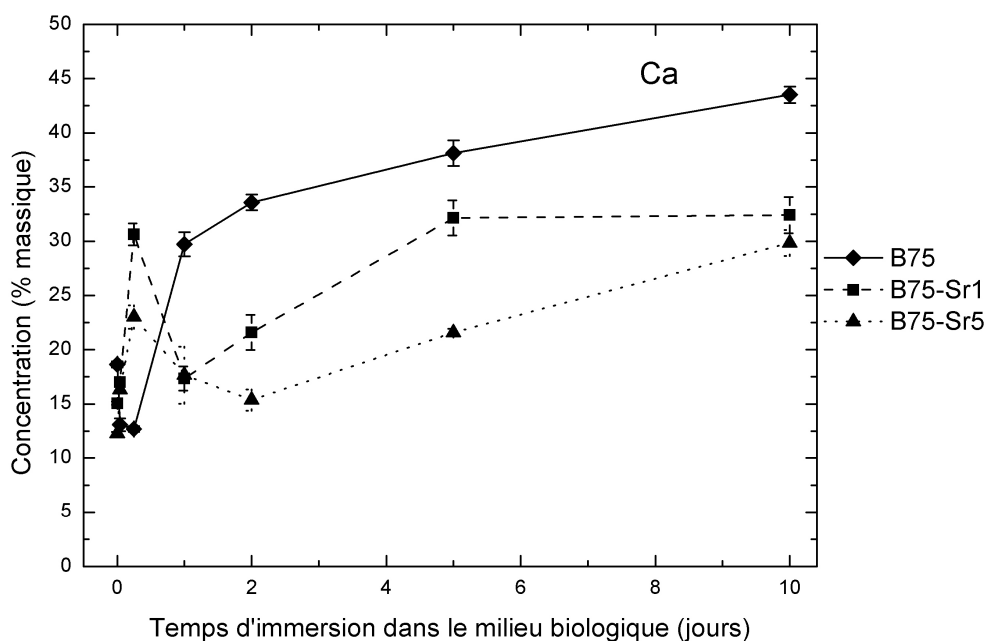


Figure 8-7: évolution de la concentration en calcium à la périphérie des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

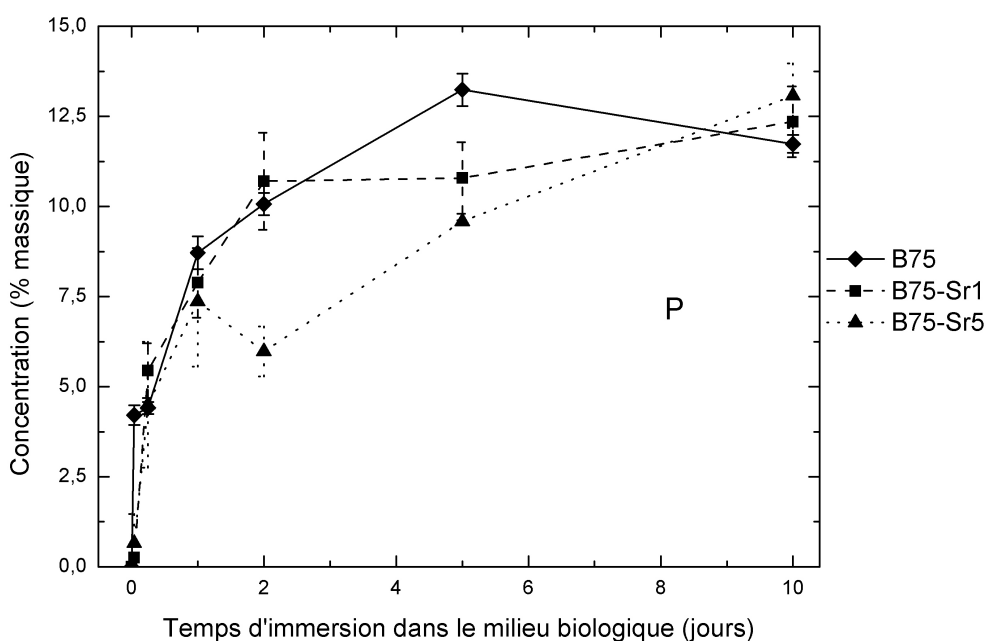


Figure 8-8: évolution de la concentration en phosphore à la périphérie des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

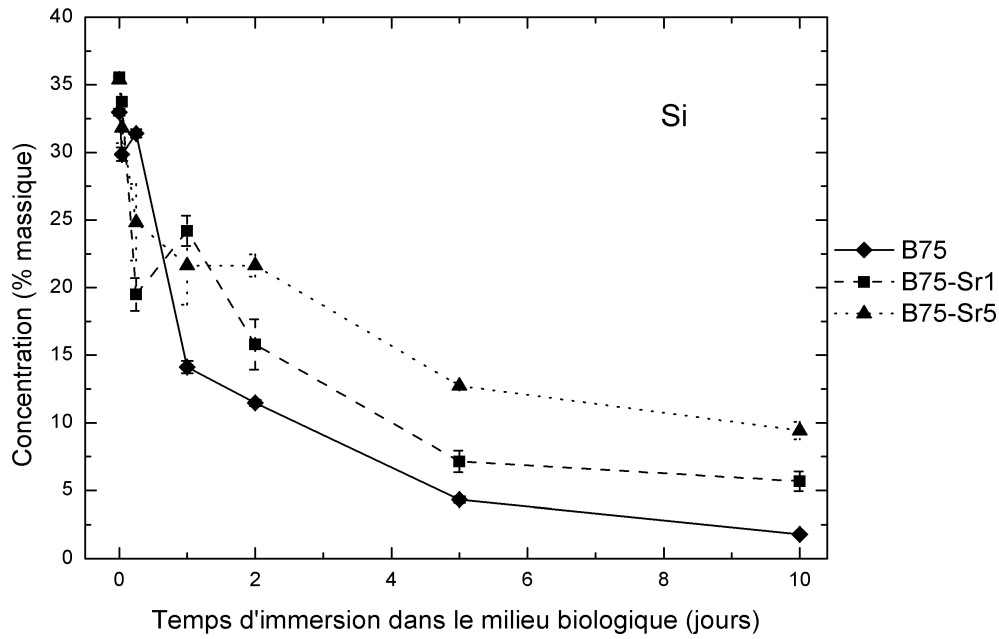


Figure 8-9: évolution de la concentration en silicium à la périphérie des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

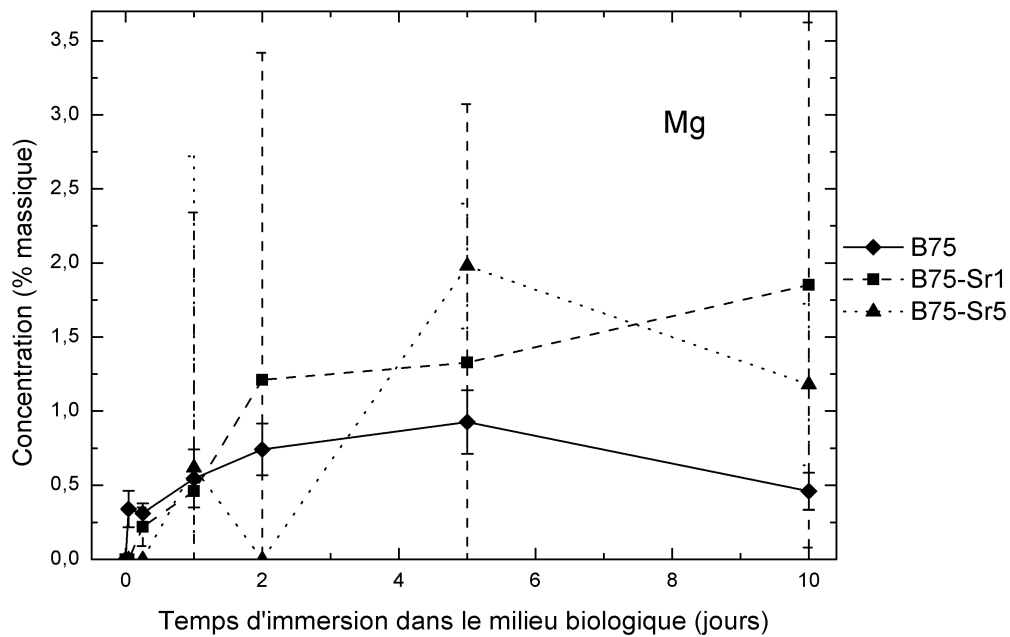


Figure 8-10: évolution de la concentration en magnésium à la périphérie des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

Les Figures 8-11, 8-12, 8-13 et 8-14 montrent l'évolution des concentrations élémentaires à la périphérie des verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$. Sur la Figure 8-11, l'évolution des concentrations en calcium à la périphérie des verres B67,5-Sr1 et B67,5-Sr5 augmente de manière analogue à celle du verre B67,5 ; cependant l'évolution est plus lente et le calcium est présent en quantité moins importante pour les verres contenant du strontium. Sur la Figure 8-13, on remarque que la cinétique de décroissance de la concentration en silicium est moins rapide pour les verres dopés en strontium que pour le verre ternaire B67,5. Après 10 jours d'interaction, de plus fortes concentrations de silicium subsistent à la périphérie des verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$. Ces observations sont le signe que pour les verres dopés en strontium, la dévitrification du réseau est opérée sur une profondeur moindre.

La quantité de phosphore décelée dans la région périphérique des pastilles augmente rapidement avec le temps d'immersion (Figure 8-12). L'évolution des concentrations est commune aux trois verres et la couche périphérique est à terme constituée de 11 à 15 % de phosphore. Concernant le magnésium, cet élément est au bout de 10 jours présent à hauteur du pourcent à la périphérie des pastilles. On note sur la Figure 8-14 qu'une plus grande quantité de magnésium est incorporée pour les verres composés de strontium B67,5-Sr1 et B67,5-Sr5 comparativement au verre B67,5.

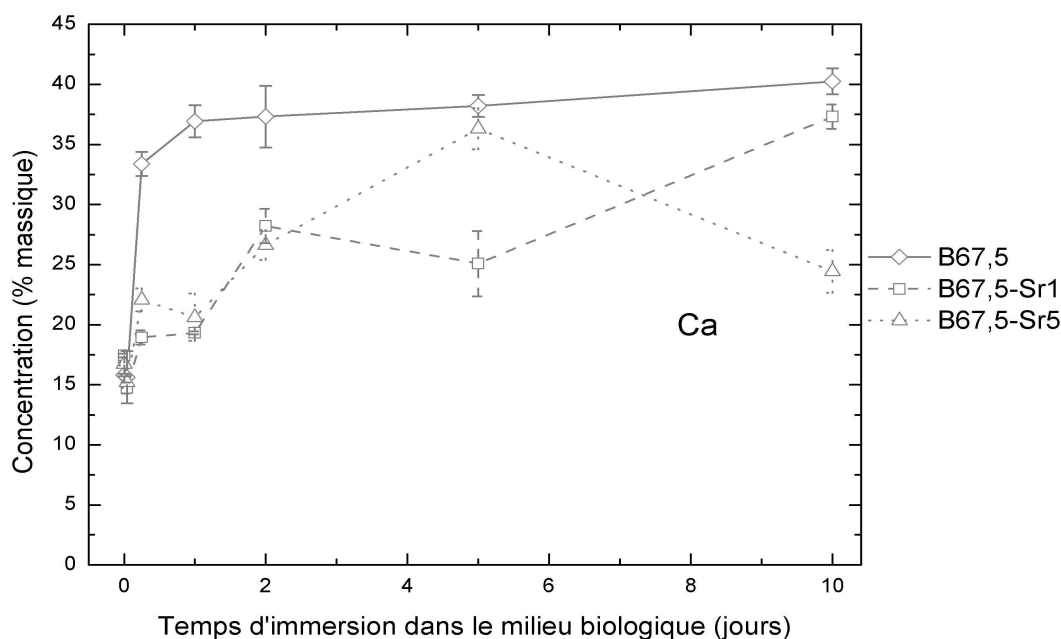


Figure 8-11: évolution de la concentration en calcium à la périphérie des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

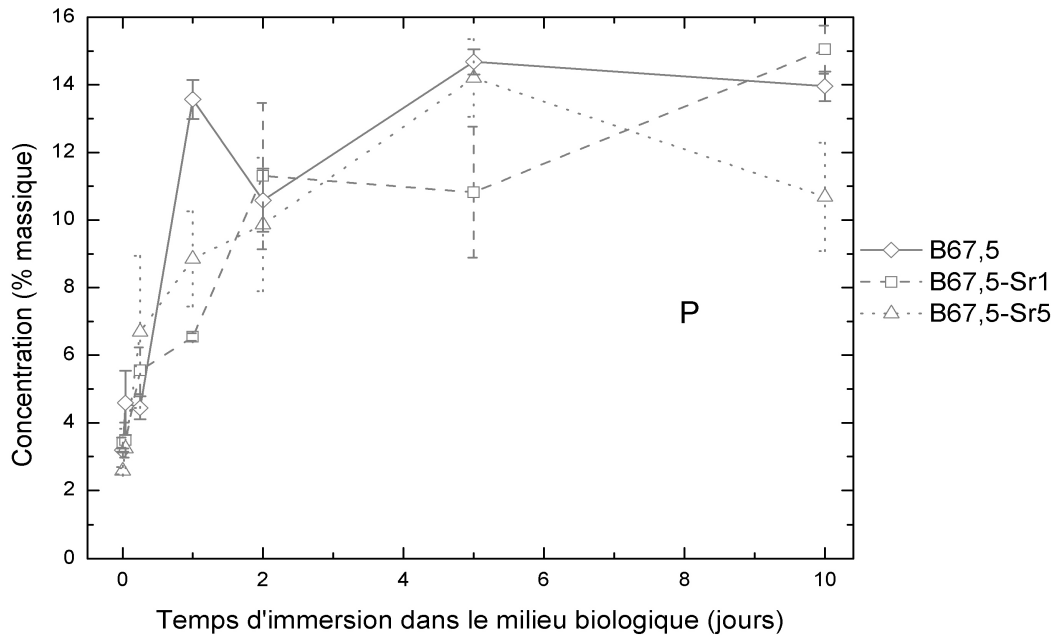


Figure 8-12: évolution de la concentration en phosphore à la périphérie des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

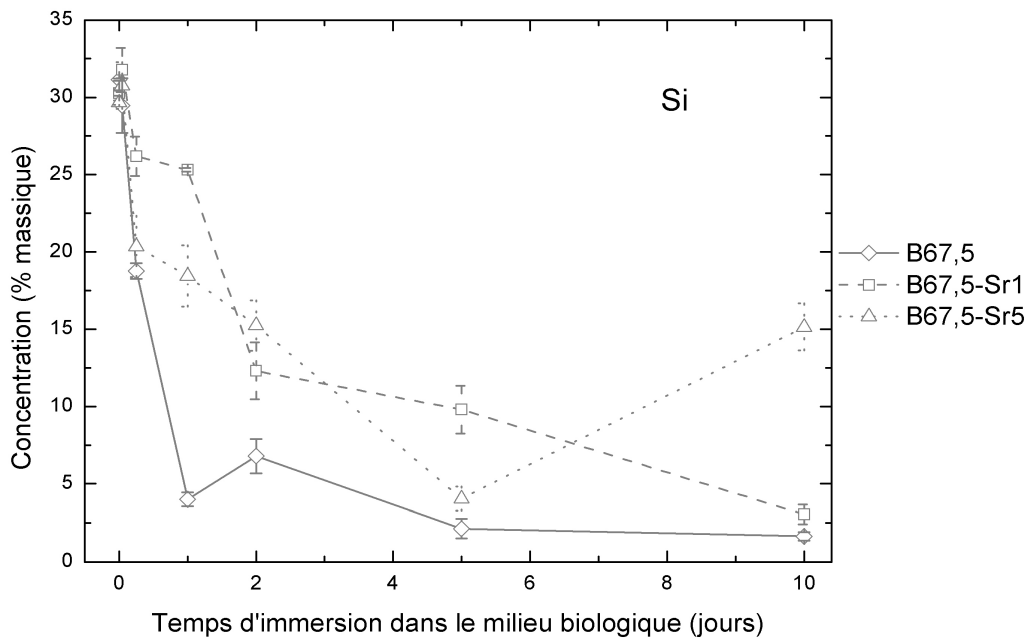


Figure 8-13: évolution de la concentration en calcium à la périphérie des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

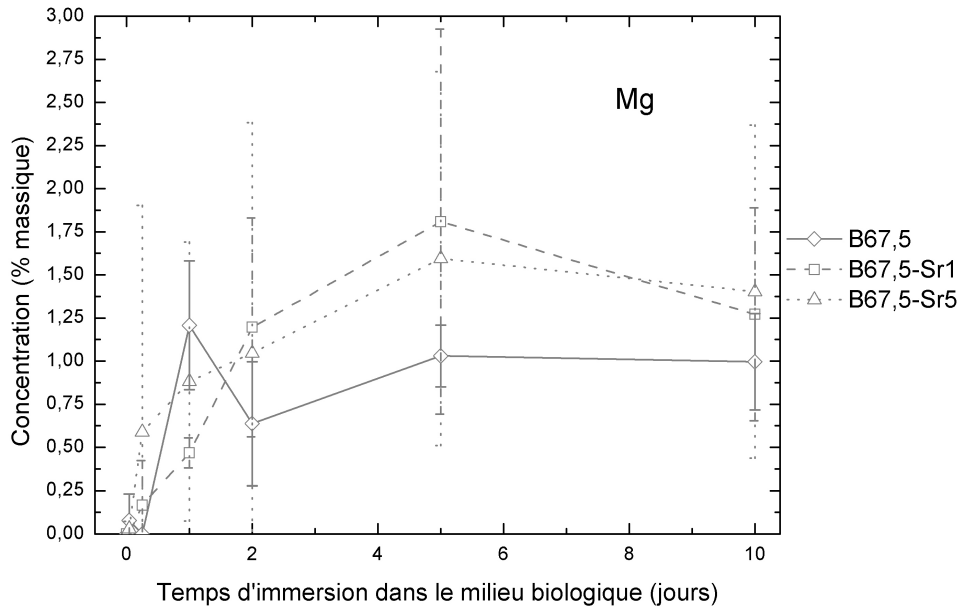


Figure 8-14: évolution de la concentration en magnésium à la périphérie des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

La Figure 8-15 représente l'évolution des concentrations en strontium à la périphérie des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$. Sous l'effet des échanges ioniques et des réactions physico-chimiques ayant lieu en surface, d'importantes fluctuations dans la concentration du strontium sont observées. Il est néanmoins possible de dégager pour la couche périphérique une tendance générale à un léger appauvrissement en strontium. Après 10 jours d'interaction, la périphérie des matériaux est d'autant plus riche en strontium que la proportion de cet élément était importante dans la matrice vitreuse originelle, et les concentrations mesurées sont inférieures aux valeurs initiales.

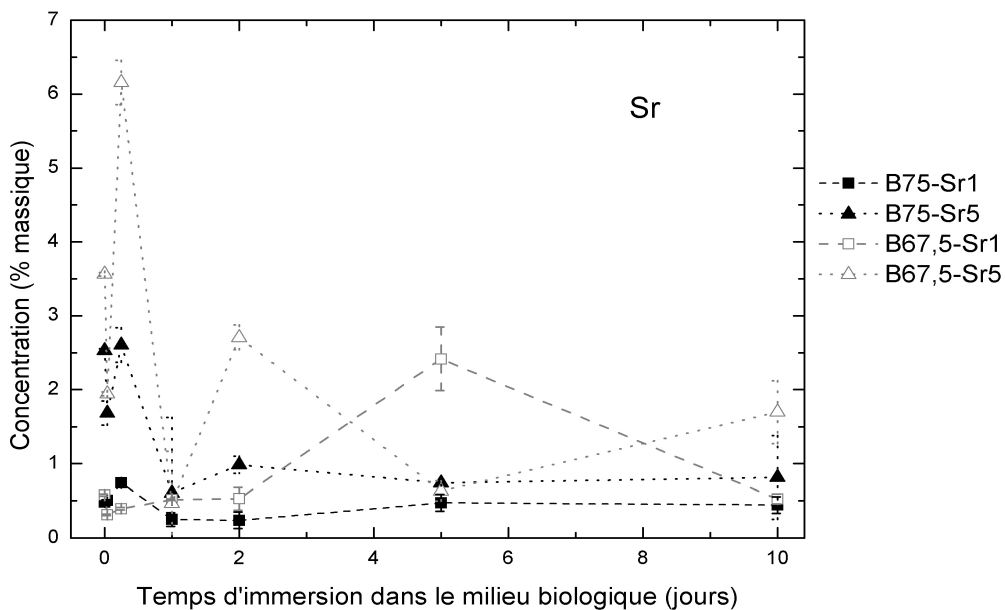


Figure 8-15: évolution de la concentration en strontium à la périphérie des différentes pastilles de verres dopés en strontium en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

8.2.2 Évolution des concentrations dans la région intérieure des pastilles de verres dopés en strontium

Les mesures des concentrations élémentaires dans les régions intérieures des pastilles de verre, non directement exposées aux fluides biologiques, sont représentées en Figure 8-16 pour les éléments Si, Ca, P, en Figure 8-17 pour le Sr et en Figure 8-18 pour le Mg. Comme remarqué précédemment, les phénomènes de diffusion et de migration des ions vers la périphérie du matériau entraînent des fluctuations dans la composition de la matrice vitreuse. Les principales variations sont observées pour les concentrations en silicium, calcium et strontium lors des 2 premiers jours d'interaction avec le milieu biologique. L'évolution de la concentration en phosphore démontre également une légère tendance à la hausse. Après 10 jours d'interaction, les concentrations des différents éléments retournent à une valeur proche de leur valeur originelle. Les régions intérieures des pastilles de verres dopés en strontium ont subi moins de modifications que les verres non dopés. L'amplitude et la cinétique de dissolution étant moindre pour les verres dopés, la couche Ca-P-Mg développée en périphérie ne semble pas s'étendre jusqu'aux régions les plus intérieures des pastilles de verre.

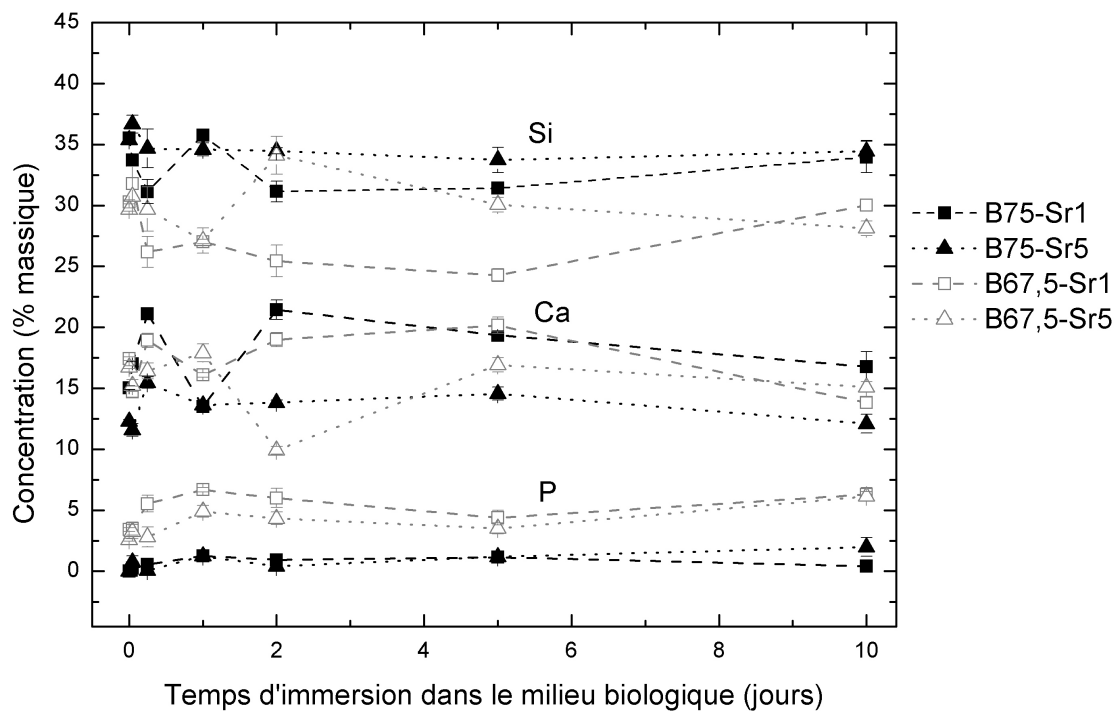


Figure 8-16: évolution des concentrations en silicium, calcium et phosphore dans la région intérieure des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ non directement exposée aux fluides biologiques. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

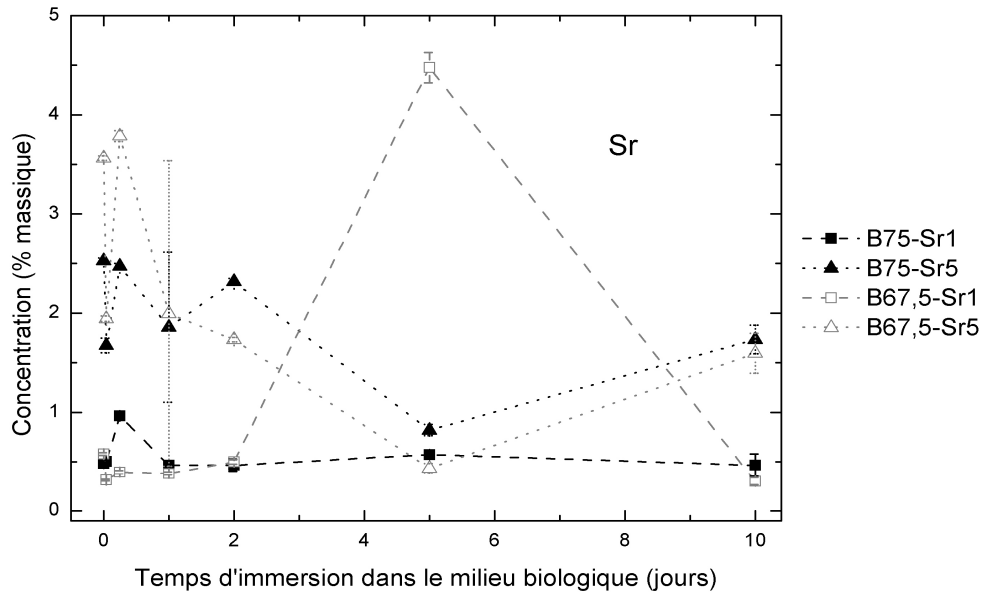


Figure 8-17: évolution des concentrations en strontium dans la région intérieure des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ non directement exposée aux fluides biologiques. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

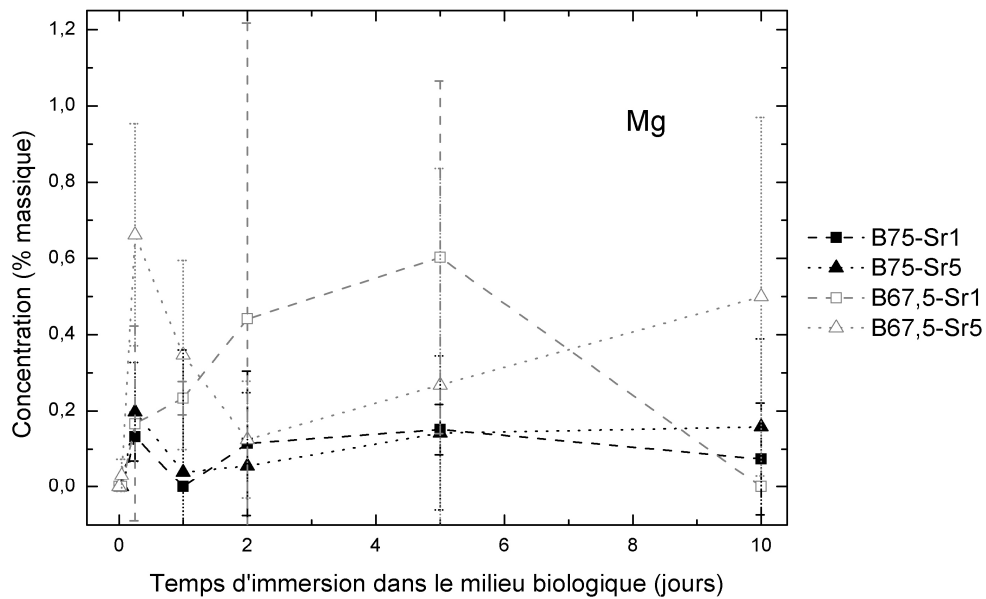


Figure 8-18: évolution des concentrations en magnésium dans la région intérieure des pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ non directement exposée aux fluides biologiques. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

8.2.3 Évolution des rapports atomiques à l'interface pastilles de verre/milieu biologique

L'évolution des rapports atomiques Ca/P, Ca/Mg et Ca/Sr à l'interface verre/milieu biologique est représentée sur les Figures 8-19, 8-20, 8-21, 8-22 et 8-23. Pour un temps d'interaction et une composition de verre donnés, les valeurs portées sur les graphes sont la moyenne des rapports Ca/P, Ca/Mg et Ca/Sr calculés dans plusieurs régions d'intérêt, elles-mêmes définies dans différents échantillons de pastilles afin de s'assurer de la reproductibilité des mesures. Chaque point représente en moyenne 4 mesures.

Lors des premières heures d'interaction, le rapport atomique Ca/P est plus élevé pour les verres SiO₂-CaO-SrO que pour le verre SiO₂-CaO (Figure 8-19). Cela tient au fait que le calcium, qui comme nous l'avons vu au paragraphe 8.2.1 est relargué en quantité moins importante pour les verres SiO₂-CaO-SrO, est donc présent en plus fortes proportions à la surface de ces matériaux. Au-delà de 6 heures d'interaction, la dissolution et le relargage du calcium s'accroissent pour les verres B75-Sr1 et B75-Sr5 ; ceci, ajouté à l'incorporation rapide de phosphore issu du milieu, résulte en la chute brutale du rapport Ca/P observée à 1 jour d'interaction. Puis, à mesure que le temps d'immersion dans le milieu biologique augmente, le rapport Ca/P tend vers une valeur limite proche de 1,7, qui est celle de l'hydroxyapatite stoechiométrique. Ainsi, après 10 jours d'immersion, on constate que la valeur du rapport Ca/P finalement atteinte est égale à 1,8 pour les verres B75-Sr1 et B75-Sr5, ce qui est plus proche de la valeur nominale de l'apatite stoechiométrique si l'on compare au résultat de 2,1 obtenu pour le verre B75. Concernant les verres SiO₂-CaO-P₂O₅-SrO, il est observé en Figure 8-20 que les rapports Ca/P mesurés à l'interface sont constamment inférieurs à ceux du verre SiO₂-CaO-P₂O₅. Ceci est dû d'une part à la plus faible croissance de la concentration en calcium constatée au paragraphe 8.2.1, et d'autre part à la plus faible proportion de calcium initialement présente dans ces matériaux : respectivement 24 % et 20 % pour les verres B67,5-Sr1 et B67,5-Sr5, contre 25 % pour B67,5. Après 10 jours d'interaction, la remarque émise pour les verres SiO₂-CaO-SrO est également valable pour les verres SiO₂-CaO-P₂O₅-SrO ; à savoir que le rapport Ca/P pour les verres dopés en strontium est plus proche de celui de l'hydroxyapatite stoechiométrique comparativement aux verres non dopés. Au bout de 10 jours d'immersion, ce rapport Ca/P vaut 1,6 pour le verre B67,5-Sr1 et 1,7 pour le verre B67,5-Sr5, contre 1,9 pour le verre B67,5.

Les Figure 8-21 et Figure 8-22 indiquent que les verres dopés en strontium adoptent un comportement différent des verres non dopés en ce qui concerne l'incorporation de magnésium. Les rapports Ca/Mg à l'interface verre/milieu biologique se stabilisent après quelques jours d'interaction, autour de valeurs plus faibles pour les verres contenant du strontium. Comparativement aux verres non dopés, une plus grande quantité de magnésium est manifestement incorporée à la surface des verres SiO₂-CaO-SrO et SiO₂-CaO-P₂O₅-SrO, au sein de la couche phosphocalcique nouvellement formée.

La Figure 8-23 représente l'évolution du rapport Ca/Sr pour chacune des pastilles de verres dopés en strontium. À mesure que le temps d'interaction se prolonge, on note une tendance globale à l'augmentation du rapport Ca/Sr. Ceci est dû à un appauvrissement de la surface des matériaux en strontium, et surtout à la croissance de la couche enrichie en calcium et en phosphore à la périphérie des pastilles : il y a un effet de dilution de la concentration en strontium dans la couche Ca-P. Les tendances observées sont communes aux verres contenant 1 % de strontium d'une part, et à ceux contenant 5 % de strontium d'autre part. Après 10 jours d'interaction, l'interface verre/milieu biologique est d'autant plus riche en strontium que la teneur en cet élément était élevée dans le verre originel.

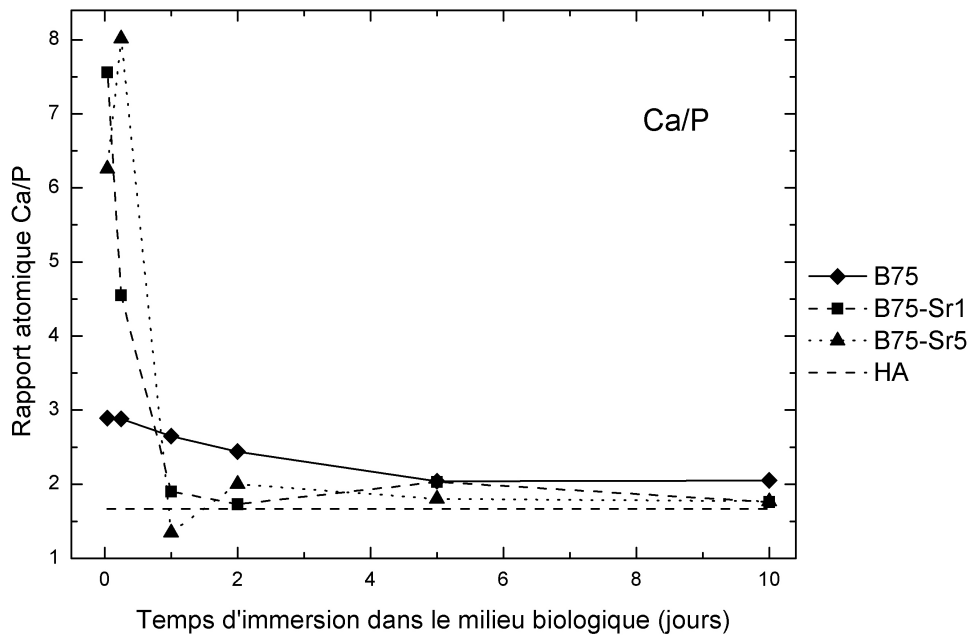


Figure 8-19: évolution du rapport atomique Ca/P à l'interface verre/milieu biologique pour les pastilles de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$.

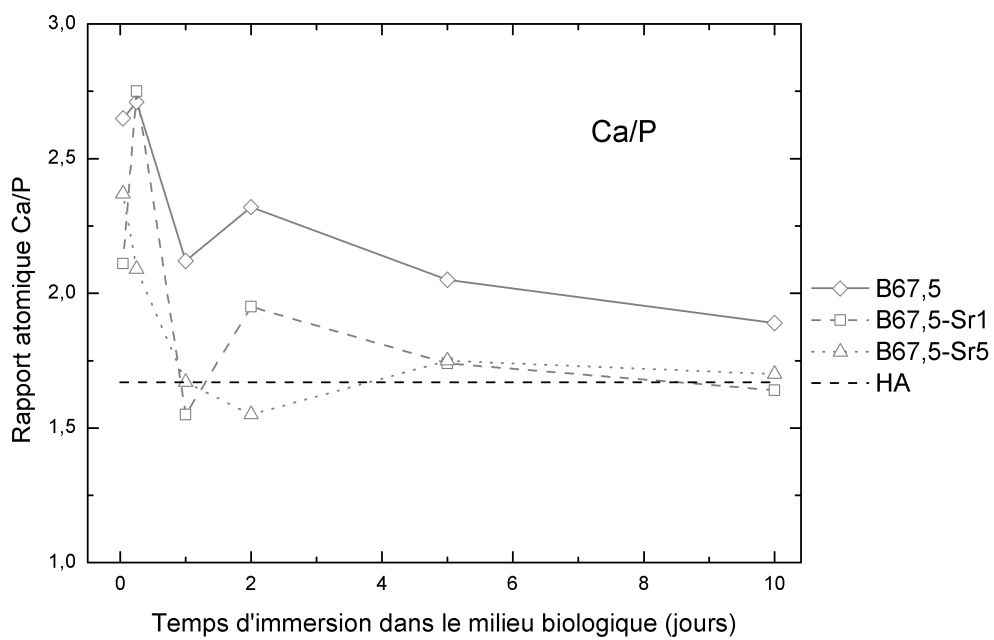


Figure 8-20: évolution du rapport atomique Ca/P à l'interface verre/milieu biologique pour les pastilles de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$.

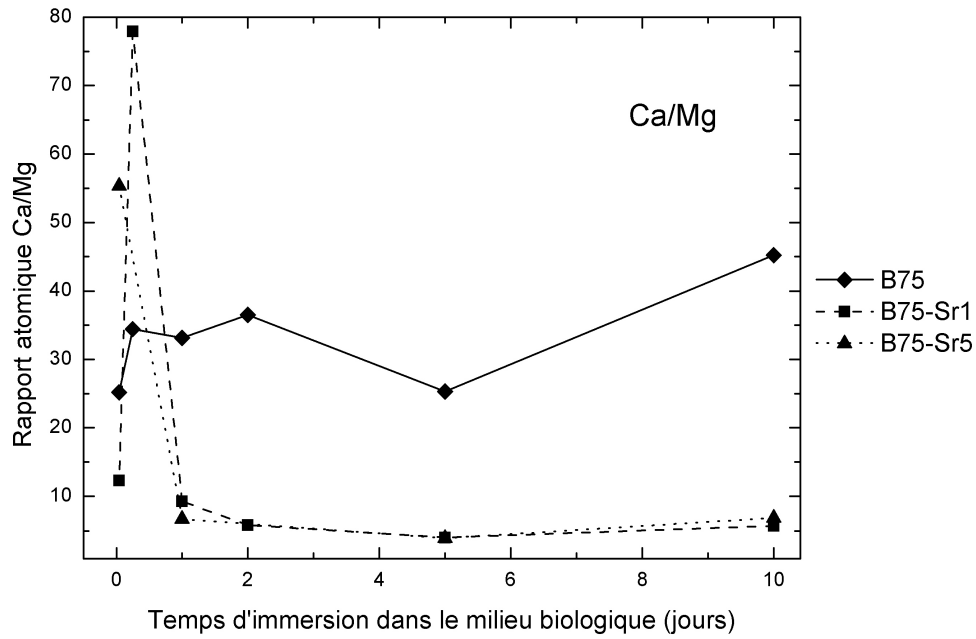


Figure 8-21: évolution du rapport atomique Ca/Mg à l'interface verre/milieu biologique pour les pastilles de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$.

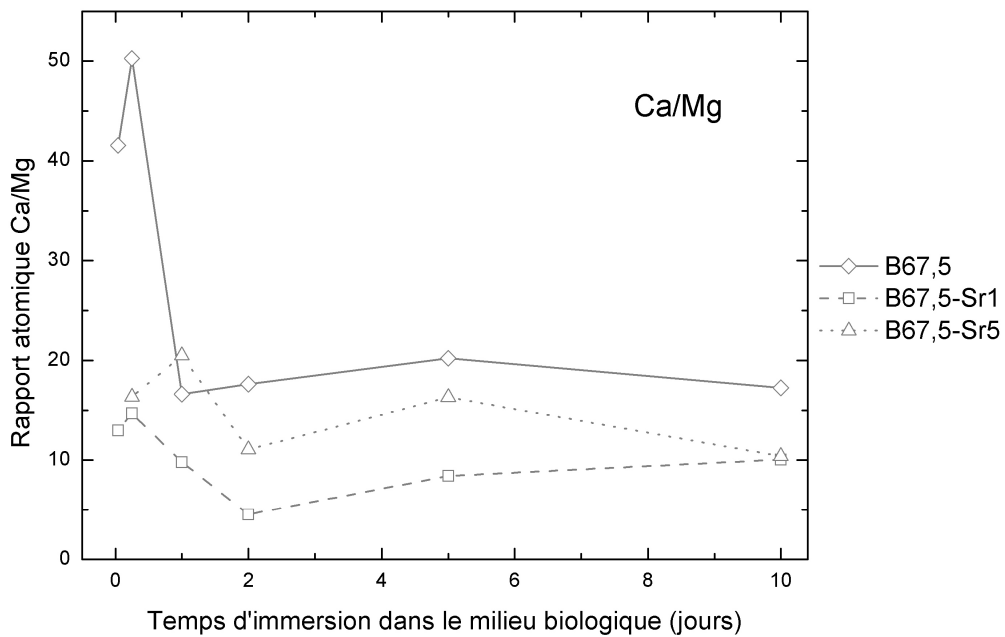


Figure 8-22: évolution du rapport atomique Ca/Mg à l'interface verre/milieu biologique pour les pastilles de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$.

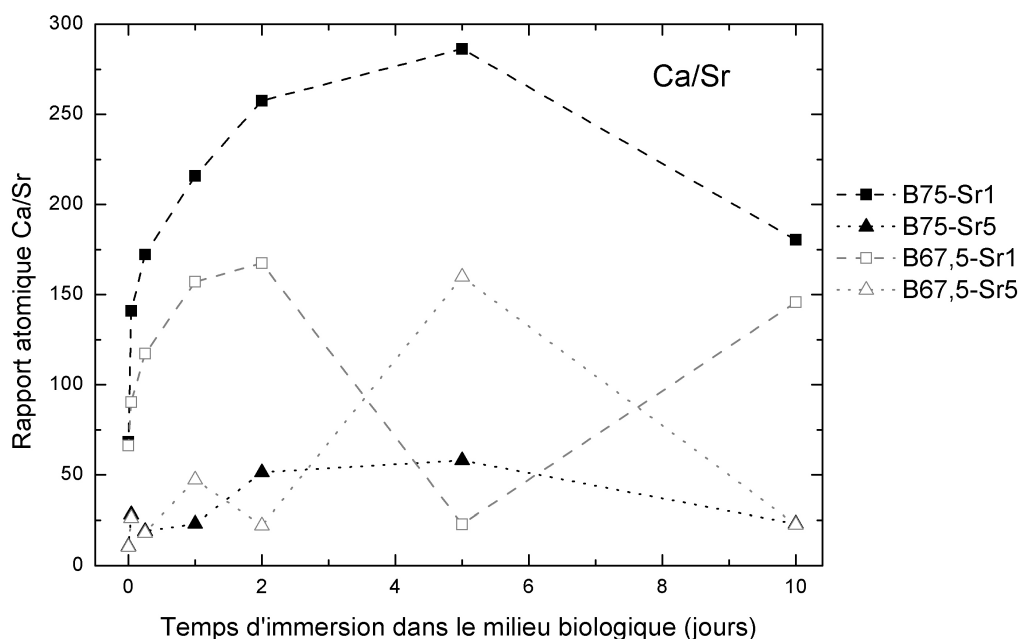


Figure 8-23: évolution du rapport atomique Ca/Sr à l'interface verre/milieu biologique pour les pastilles de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$.

8.3 Évolution de la composition du milieu biologique lors des interactions avec les pastilles de verres dopés en strontium

L'évolution de la concentration en calcium présente dans le milieu biologique (Figures 8-24 et 8-25) présente de faibles variations lors des premières heures d'interaction. La quantité de calcium relarguée dans le milieu lors de la phase de désalcalinisation de la surface est plus faible pour les verres dopés en strontium que pour les verres B75 et B67,5. Ensuite, à mesure que le temps d'immersion s'allonge, on constate pour tous les verres dopés une diminution progressive de la concentration en calcium dans le milieu biologique. Nous avons vu au paragraphe 7.3 que le verre binaire B75 relarguait d'importantes quantités de calcium si bien que cet élément était présent en plus forte concentration après 10 jours d'interaction qu'avant interaction ; cette observation n'est pas constatée pour les verres B75-Sr1 et B75-Sr5. Les verres dopés en strontium s'avèrent incorporer de plus grandes quantités de calcium, en comparaison des quantités de cet élément qui sont relarguées. Ainsi, après 10 jours d'interaction, la concentration en calcium dans le milieu biologique n'est plus que de 62 ppm pour les verres B75-Sr1 et B75-Sr5, alors qu'elle était de 94 ppm pour le verre B75. Pour les verres B67,5-Sr1 et B67,5-Sr5, elle est respectivement égale à 56 et 49 ppm, alors qu'elle valait 67 ppm pour le verre B67,5.

Les Figures 8-26 et 8-27 représentent l'évolution de la concentration en phosphore présente dans le milieu biologique. Pour tous les verres, on constate une importante diminution de la concentration de cet élément au fil du temps. Les décroissances observées pour chacun des échantillons sont analogues. On note toutefois qu'après 5 jours d'interaction la consommation de phosphore semble ralentie pour les verres dopés en strontium. Ce pourrait être le signe que le système verre-milieu biologique parvient à un équilibre.

Concernant le silicium, les Figures 8-28 et 8-29 montrent une tendance commune à tous les verres. À mesure que les réactions de dissolution décomposent le réseau vitreux sur des profondeurs de plus en plus grandes, des concentrations de silicium de plus en plus élevées sont décelées dans le milieu biologique. Au bout de 10 jours d'interaction, les quantités de silicium relarguées dans le milieu biologique sont plus faibles pour les verres dopés en strontium. Ceci est un autre indice de la moindre amplitude de dissolution pour les verres dopés.

D'autre part, les Figures 8-30 et 8-31 révèlent que les verres dopés en strontium incorporent plus de magnésium que les autres verres. La concentration de cet élément décroît lentement avec le temps d'immersion et au bout de 10 jours, la baisse de la concentration en magnésium est de 2 ppm pour les verres B75-Sr1 et B75-Sr5, 3 ppm pour le verre B67,5-Sr1 et 5 ppm pour le verre B67,5-Sr5.

Enfin, les mesures de la concentration en strontium présente dans le milieu biologique complètent cette étude (Figure 8-32). Initialement égale à zéro, la quantité de strontium dans le milieu biologique s'élève à quelques ppm après le relargage de cet élément hors de la surface des verres. On remarque que les verres B75-Sr5 et B67,5-Sr5 relarguent 5 fois plus de strontium que les verres B75-Sr1 et B67,5-Sr1, ce qui concorde avec les teneurs respectives en strontium de ces matériaux.

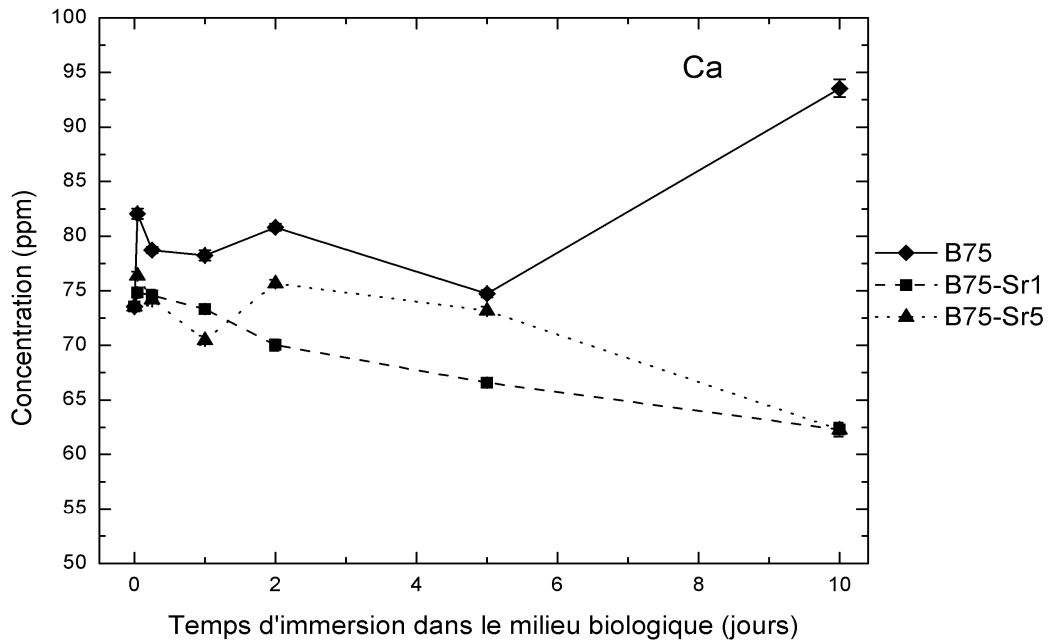


Figure 8-24: évolution de la concentration en calcium dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$.

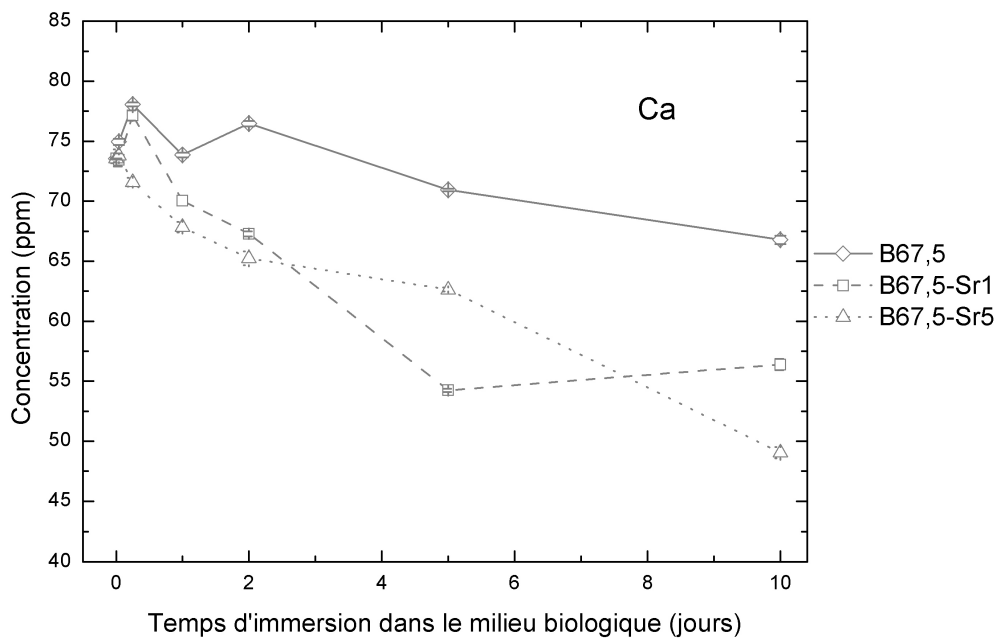


Figure 8-25: évolution de la concentration en calcium dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$.

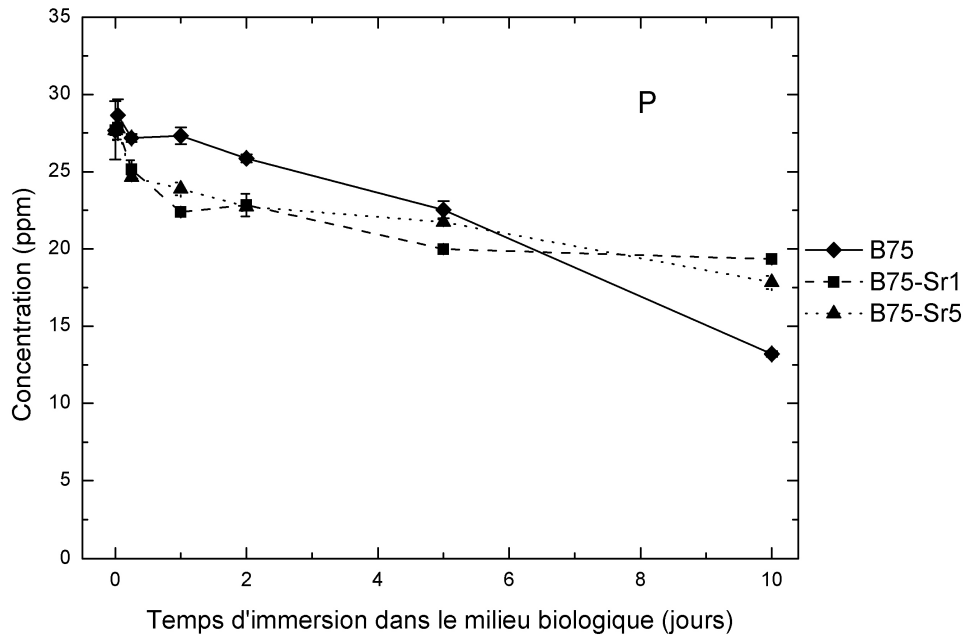


Figure 8-26: évolution de la concentration en phosphore dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$.

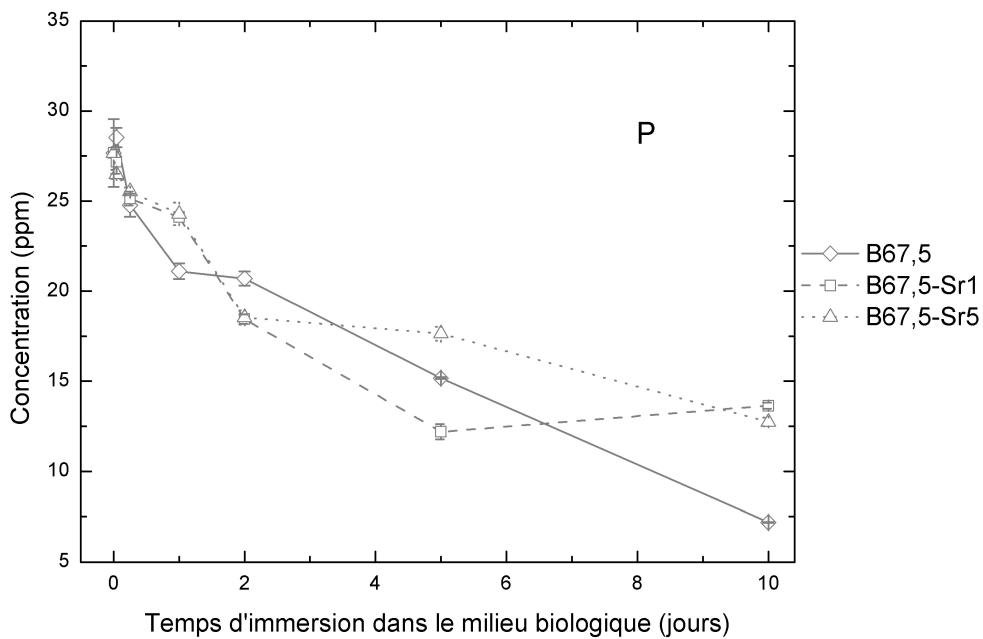


Figure 8-27: évolution de la concentration en phosphore dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$.

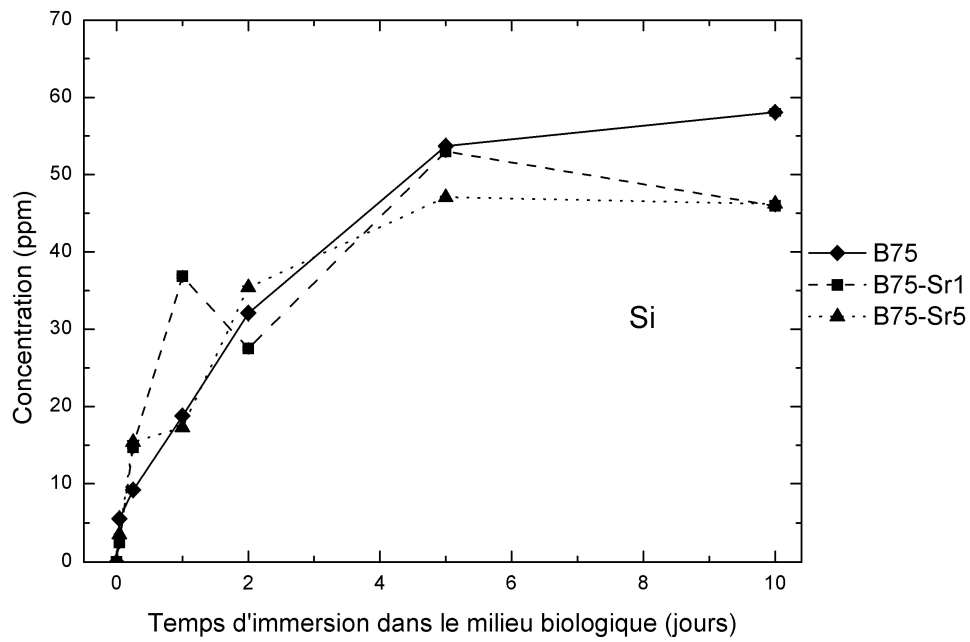


Figure 8-28: évolution de la concentration en silicium dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$.

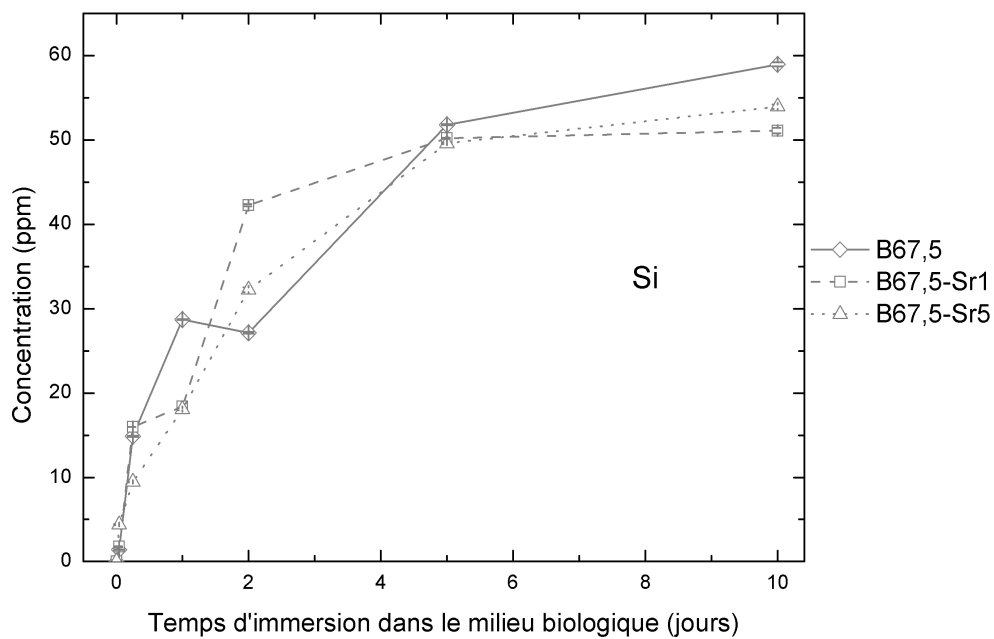


Figure 8-29: évolution de la concentration en silicium dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$.

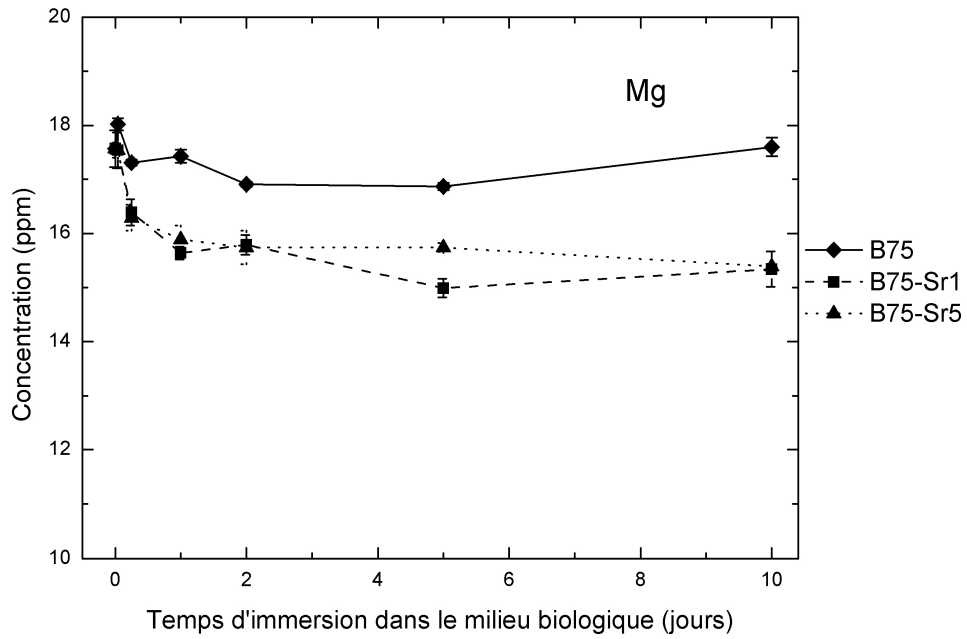


Figure 8-30: évolution de la concentration en magnésium dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$.

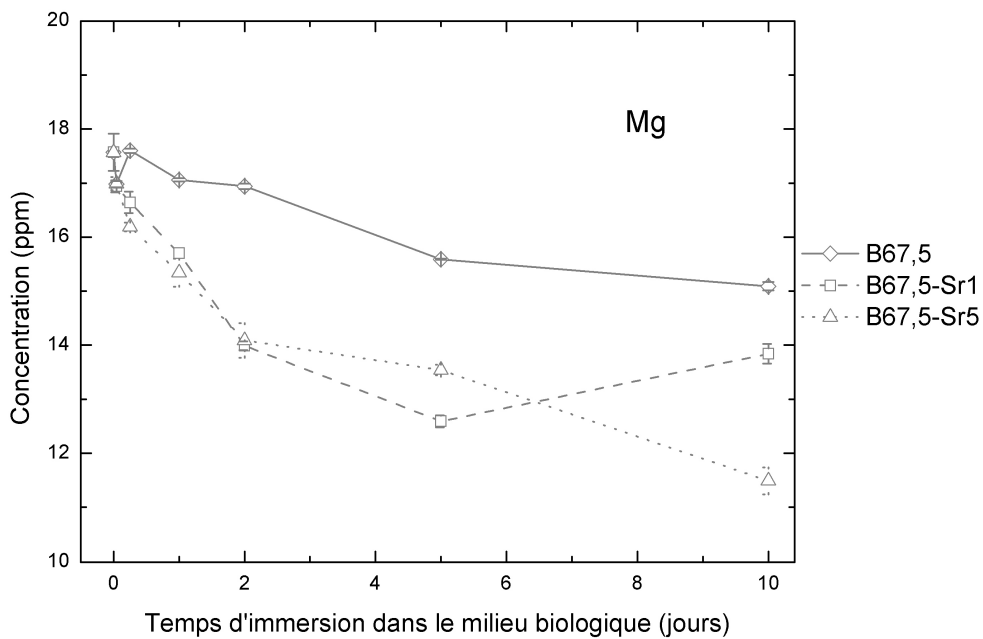


Figure 8-31: évolution de la concentration en magnésium dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$.

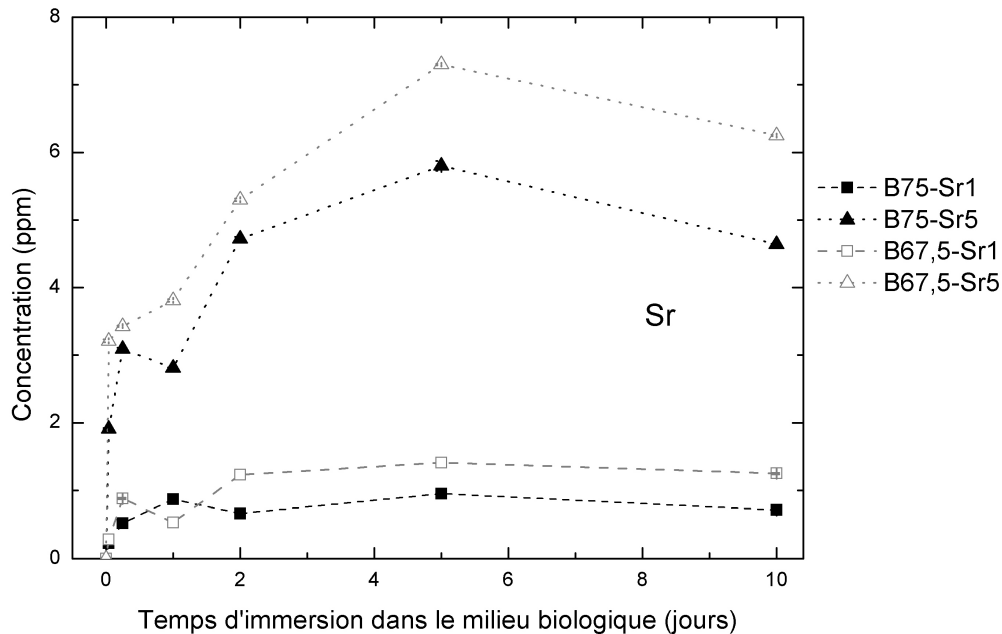


Figure 8-32: évolution de la concentration en strontium dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les pastilles de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$.

8.4 Résumé des observations expérimentales pour les pastilles de verres dopés en strontium

Les cartographies chimiques obtenues pour les verres dopés en strontium révèlent que l'ajout de strontium dans la composition de la matrice vitreuse ralentit la dissolution du matériau ainsi que le relargage du calcium comparativement aux verres non dopés. La quantité de calcium relarguée dans le milieu biologique lors de la phase de désalcalinisation est ainsi plus faible pour les verres dopés en strontium que pour les verres B75 et B67,5. L'évolution, plus lente, des concentrations en calcium et en silicium à la périphérie des matériaux tend à indiquer que l'ampleur de la dissolution est moindre pour les matériaux dopés en strontium.

Le dopage en strontium a également une incidence sur le développement de la couche Ca-P-Mg-Sr périphérique. Après 5 jours d'interaction, la consommation de phosphore issu du milieu biologique semble ralentie pour les verres dopés en strontium, signe possible que le système verre-milieu biologique parvient à un équilibre. Au bout de 10 jours d'interaction, la périphérie des verres dopés en strontium est moins riche en calcium et contient plus de silicium que les verres non dopés. D'autre part, les régions intérieures des pastilles de verres dopés en strontium ont subi moins de modifications que les verres non dopés. La couche Ca-P-Mg-Sr développée en périphérie ne semble donc pas s'étendre jusqu'aux régions les plus internes des pastilles de verre, à cause d'une amplitude et d'une cinétique de dissolution moindres. Cependant la quantité de magnésium incorporée à la périphérie des pastilles est plus importante pour les verres dopés en strontium. La quantité de magnésium présente dans le milieu biologique subit ainsi une plus forte diminution pour ces matériaux. Concernant la distribution du strontium, cet élément est en partie relargué de la périphérie des verres à mesure que la couche phosphocalcique se développe. La quantité de strontium relarguée dans le milieu biologique s'élève ainsi à quelques ppm, et est d'autant plus importante que la teneur en strontium dans le verre originel était élevée.

Enfin, le rapport atomique Ca/P à l'interface verre dopé en strontium/milieu biologique est, au bout de 10 jours d'interaction, situé entre 1,6 et 1,8, ce qui est plus proche de la valeur nominale de l'hydroxyapatite stoechiométrique. Le rapport Ca/Mg à l'interface verre/milieu biologique, plus faible pour les verres contenant du strontium, indique qu'une plus grande quantité de magnésium est incorporée à la surface de ces verres. Après 10 jours d'interaction, le rapport atomique Ca/Sr à l'interface verre/milieu biologique indique que celle-ci est d'autant plus riche en strontium que le verre originel contenait de cet élément.

Chapitre 9

Étude du processus de bioactivité pour les grains de verres binaires $\text{SiO}_2\text{-CaO}$, ternaires $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, et les grains de verres dopés avec 5 % de strontium

Dans le cadre de l'étude des grains de verres bioactifs, nous nous sommes attachés à la caractérisation des échantillons de compositions extrêmes : B75, B67,5, B75-Sr5 et B67,5-Sr5. L'analyse micro-PIXE des grains de verre a été conduite au moyen d'un faisceau de protons de diamètre 1 μm et d'intensité 50 pA, grâce à l'emploi d'un collimateur objet de 10 μm . Une plus grande rapidité de réaction et de dissolution en milieu physiologique ayant été constatée pour le verre binaire B75, ce matériau a été étudié sous forme de grains pour les délais d'interaction suivants : 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 6 heures, 1 jour, 2 jours, 3 jours et 4 jours. Le verre ternaire B67,5 et les verres dopés en strontium étant plus lents à réagir, ils ont été immergés pour des délais de 1 heure, 6 heures, 1 jour, 2 jours, 3 jours et 4 jours.

9.1 Imagerie chimique multiélémentaire à la périphérie des grains de verre après immersion dans le milieu biologique

Nous présentons dans ce paragraphe une sélection d'images chimiques restreinte à celles qui sont les plus importantes pour la comparaison des réactions physico-chimiques à la périphérie des différents grains de verre.

Les cartographies multiélémentaires révèlent une cinétique de dissolution et de réaction plus rapide pour le verre B75 $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ que pour le verre B67,5 $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$. Le verre B75 s'avère être très rapidement capable d'induire la formation d'une couche périphérique dans laquelle est détecté du phosphore. Sur la Figure 9-1, il est visible que les grains de verre B75 après 15 minutes d'interaction avec le milieu manifestent déjà leur aptitude à intégrer du phosphore issu du milieu biologique à leur surface. Sur les cartographies, quatre grains de différentes tailles sont visibles et sont dans des états d'avancement différents. Les deux grains situés au centre de la cartographie, d'une taille d'une vingtaine de microns, sont dans des états avancés au niveau du développement de la couche phosphocalcique. On distingue une couche de phosphore enrobant les matériaux sur une épaisseur de quelques microns. Le calcium est réparti de façon homogène, bien que d'étroites zones de dissolution

soient visibles par endroits sur la périphérie des grains. Le réseau silicate apparaît en dépolymérisation partielle sur le grain de droite. Le silicium y semble présent en plus fortes concentrations sur les bords du grain, dans les régions où la croissance de la couche de phosphate de calcium a débuté. Sur le grain de gauche, le réseau silicate est encore uniforme ; il existe toutefois sur le bord du grain une zone enrichie en calcium et en phosphore et appauvrie en silicium. Deux autres grains de poudre, plus petits et localisés dans le coin inférieur droit et le coin supérieur droit de la cartographie, sont en cours de dissolution. Le calcium y apparaît en phase de relargage. De faibles quantités de phosphore y sont décelées. Quant au magnésium, aucune trace de cet élément n'est encore détectée.

Le verre ternaire B67,5 est comparativement plus lent à amorcer les processus de dissolution et de formation de la couche phosphocalcique. La Figure 9-4 montre que les grains de B67,5 sont encore intègres après 1 heure d'interaction avec le milieu biologique. Le silicium, le phosphore et le calcium présentent une distribution uniforme. À l'inverse, le verre B75 après 1 heure d'interaction présente une répartition très marquée des éléments (Figure 9-2). Le cœur du grain est constitué essentiellement de silicium. On observe que le calcium a diffusé de l'intérieur du matériau vers sa périphérie, où une couche riche en phosphore et en calcium enrobe le matériau de façon uniforme. Des traces de magnésium sont relevées et sont présentes en quantités plus importantes en surface, dans la couche phosphocalcique.

Après 6 heures d'interaction, le processus de bioactivité a débuté pour le verre B67,5. Les grains ont entamé le relargage des ions calcium présents en surface du matériau. Tandis que les ions calcium sont dissous à l'interface matériau/liquide, le silicium et à un degré moindre le phosphore sont encore distribués de manière homogène dans le grain de verre. Le magnésium est détecté sous forme de traces. Pour le verre B75, la physionomie des grains est tout autre après 6 heures d'immersion. L'intérieur du matériau est constitué d'un cœur riche en silicium. La couche phosphocalcique périphérique n'entoure désormais que partiellement le grain de verre ; elle semble en cours de dissolution. Il subsiste néanmoins des sites riches en calcium et en phosphore, dans lesquels sont détectées des concentrations importantes de magnésium.

Les cartographies des grains de verre B75 après 1 jour et 2 jours d'interaction montrent clairement un matériau en dissolution. Au bout d'un jour, la couche phosphocalcique ne subsiste que dans quelques régions de la surface du verre. Après 2 jours d'interaction, la couche phosphocalcique a été dissoute presque intégralement, comme l'expose la Figure 9-3. Il ne demeure que le cœur riche en silicium, plus résistant à la dissolution. Ces observations sont également constatées après 3 et 4 jours d'interaction ; s'il subsiste quelques rares précipités de phosphates de calcium, la majorité des grains est constituée d'un cœur riche en silicium à la surface duquel sont présents du calcium et du phosphore, de manière éparse et en faibles concentrations. Aucune trace de magnésium n'est détectée après 2 jours d'interaction.

Le comportement des grains de verre B67,5 est très différent. La couche phosphocalcique est beaucoup plus lente à se développer. Ce n'est qu'après 1 jour d'immersion dans le milieu qu'apparaît la formation d'une couche de phosphate de calcium périphérique, pour l'heure encore mince. Après 2 jours d'immersion, la couche de phosphate de calcium s'est élargie et enrobe le grain dans sa globalité (Figure 9-5). Le réseau silicate apparaît brisé sur la zone périphérique, et distribué uniformément au cœur du matériau. On distingue également dans les coins de la Figure 9-5 plusieurs petits grains qui ont réagi plus rapidement et qui sont presque intégralement changés en phosphates de calcium. Après 4 jours d'interaction en milieu biologique, la couche phosphocalcique s'est étendue à l'ensemble du matériau (Figure 9-6). La majorité des grains de verre B67,5 se révèle être changée en phosphate de calcium.

De faibles concentrations de silicium ainsi que des traces de magnésium sont détectées dans le matériau, qui n'est plus un verre à proprement parler. Ainsi, les phosphates de calcium engendrés par les grains de verre B67,5 s'avèrent être beaucoup plus stables que ceux formés par les grains de verre B75, qui ont été dissous après quelques jours d'interaction. La résistance accrue de la couche phosphocalcique est un indice sur la formation d'une phase cristalline de type apatitique, plus stable et endurente à la dissolution en comparaison des phosphates de calcium amorphes.

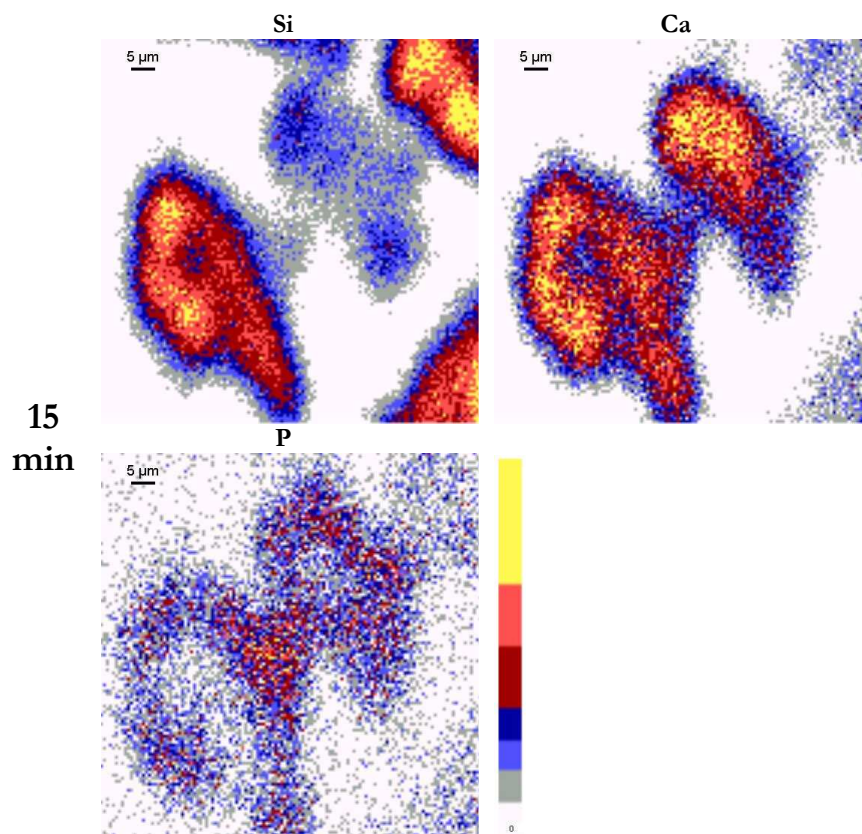


Figure 9-1: distribution des éléments silicium, calcium et phosphore dans des grains de verre B75 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ après 15 minutes d'interaction avec le milieu biologique.

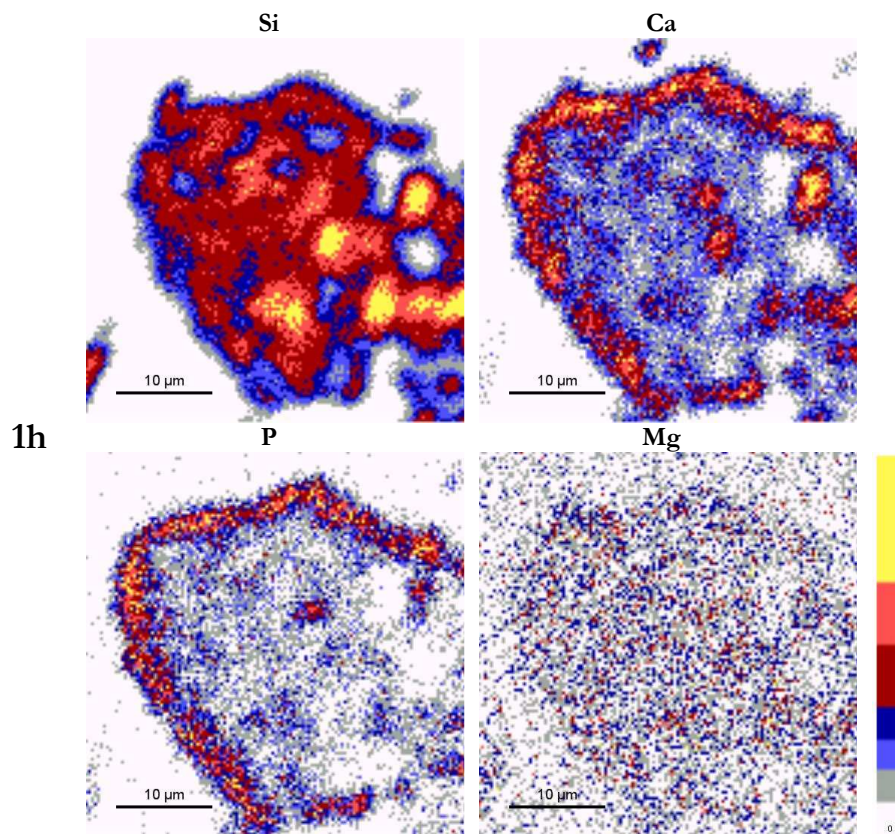


Figure 9-2: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et magnésium dans des grains de verre B75 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ après 1 heure d'interaction avec le milieu biologique.

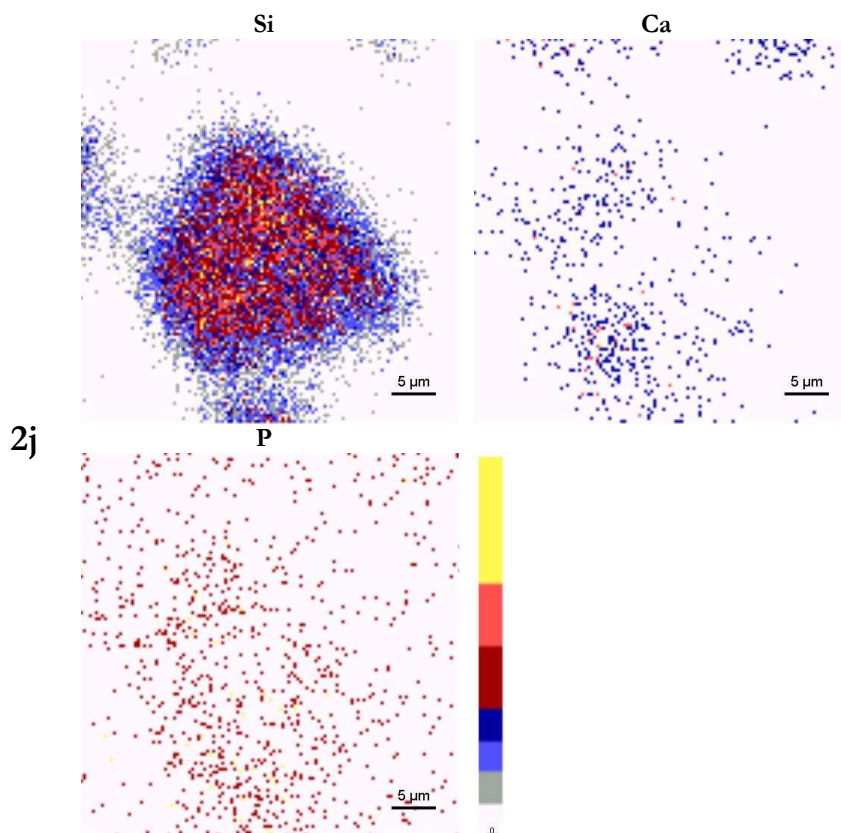


Figure 9-3: distribution des éléments silicium, calcium et phosphore dans des grains de verre B75 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ après 2 jours d'interaction avec le milieu biologique.

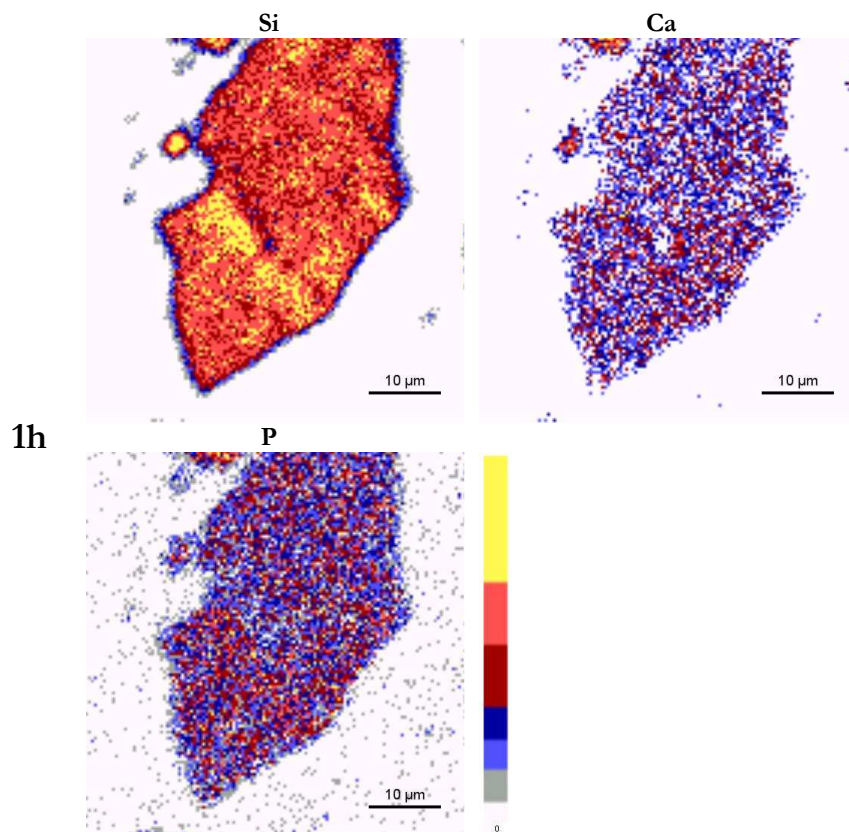


Figure 9-4: distribution des éléments silicium, calcium et phosphore dans des grains de verre B67,5 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ après 1 heure d'interaction avec le milieu biologique.

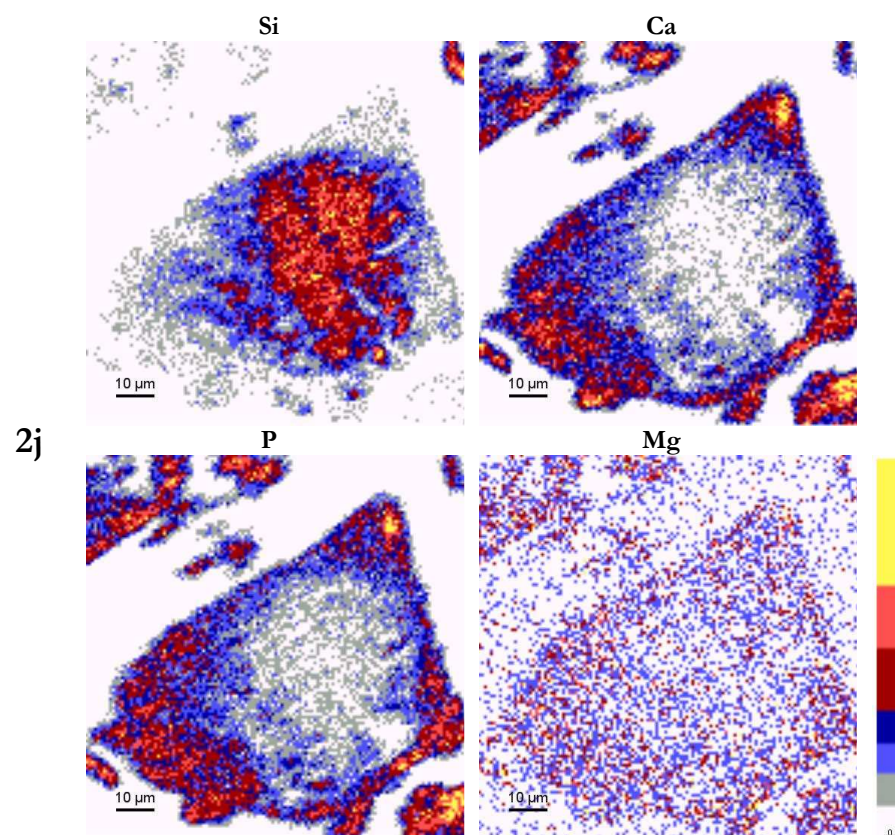


Figure 9-5: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et magnésium dans des grains de verre B67,5 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ après 2 jours d'interaction avec le milieu biologique.

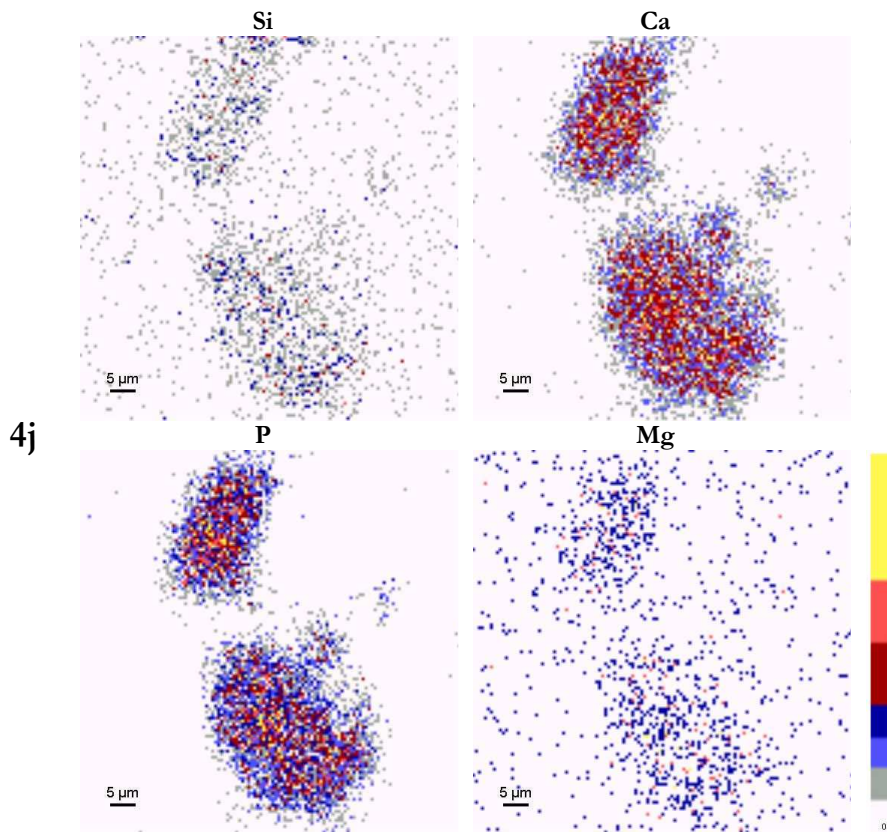


Figure 9-6: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et magnésium dans des grains de verre B67,5 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ après 4 jours d'interaction avec le milieu biologique.

Les cartographies multiélémentaires concernant les grains de verre B75-Sr5 et B67,5-Sr5 démontrent que l'ajout de strontium dans la composition du matériau ralentit de manière significative la dissolution et le développement de la couche phosphocalcique. Après 1 heure d'interaction, le verre B75-Sr5 a à peine amorcé l'intégration du phosphore issu du milieu biologique à sa périphérie (Figure 9-7). Le relargage du calcium en surface du matériau a également débuté. Ce n'est qu'au bout de 6 heures d'interaction que l'on distingue la formation de la couche de phosphate de calcium périphérique, qui s'étend sur une épaisseur uniforme après 1 jour (Figure 9-8). Le cœur du matériau est toujours composé du réseau vitreux original. La couche Ca-P poursuit son expansion et, contrairement au verre binaire B75, elle n'est pas dissoute après 4 jours d'interaction. Sur la Figure 9-9, il est visible qu'au bout de 4 jours les grains de verre sont composés d'une trame phosphocalcique, dans laquelle subsiste une importante quantité de silicium, et où sont décelées des traces de magnésium et de strontium. La stabilité plus importante des grains de B75-Sr5 pourraient être une indication de la formation d'une phase apatitique : enrobant le matériau, celle-ci jouerait dès lors le rôle de couche protectrice vis-à-vis de la dissolution.

Concernant le verre B67,5-Sr5, les grains sont encore intègres 6 heures après avoir interagit avec le milieu biologique. Au bout d'1 jour, on constate que l'état des grains a peu évolué. Le calcium semble cependant être en dissolution et la structure vitreuse apparaît brisée très localement, sur d'étroites régions périphériques. Après 4 jours d'interaction (Figure 9-10), on constate que les grains sont encore composés d'une importante quantité de silicium. Le calcium et le phosphore sont présents en plus fortes concentrations sur la périphérie des grains, mais sont étalés sur une profondeur moindre en comparaison des autres verres.

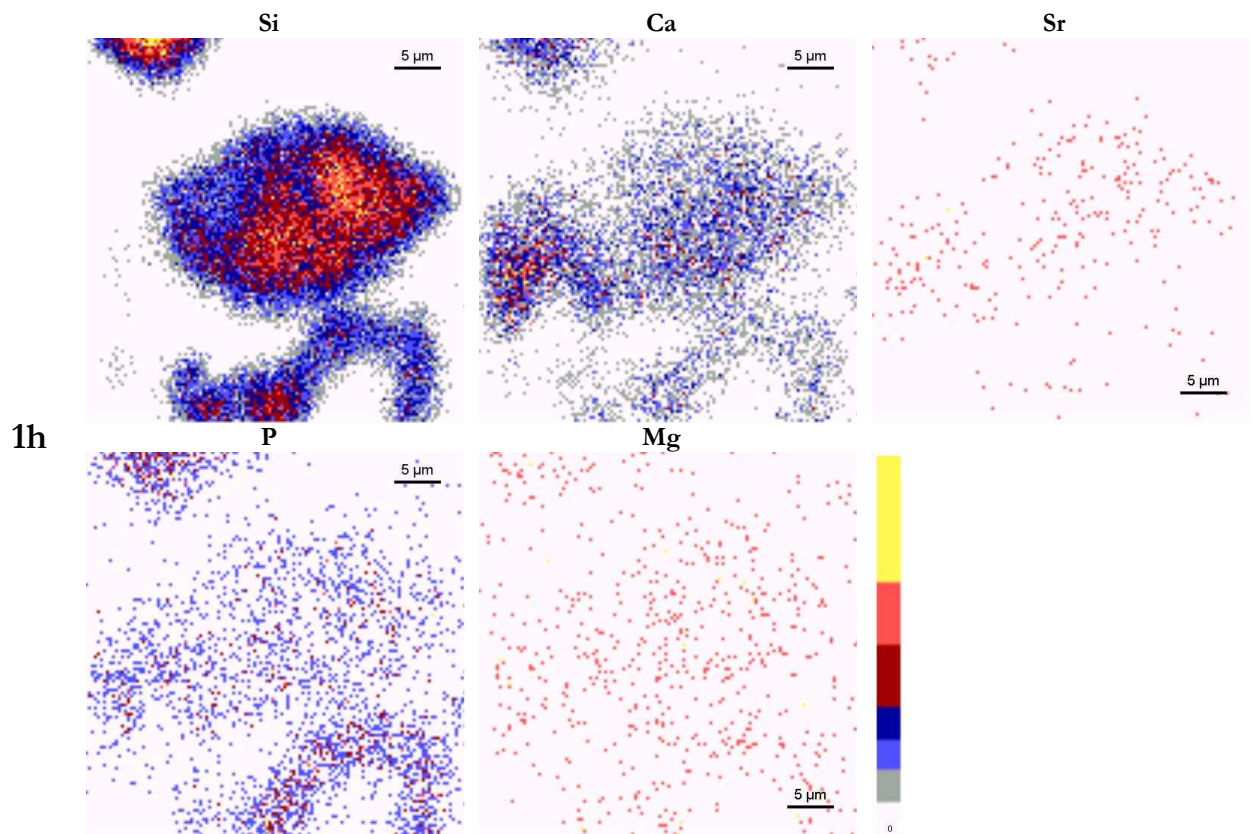


Figure 9-7: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore, strontium et magnésium dans des grains de verre B75-Sr5 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ après 1 heure d'interaction.

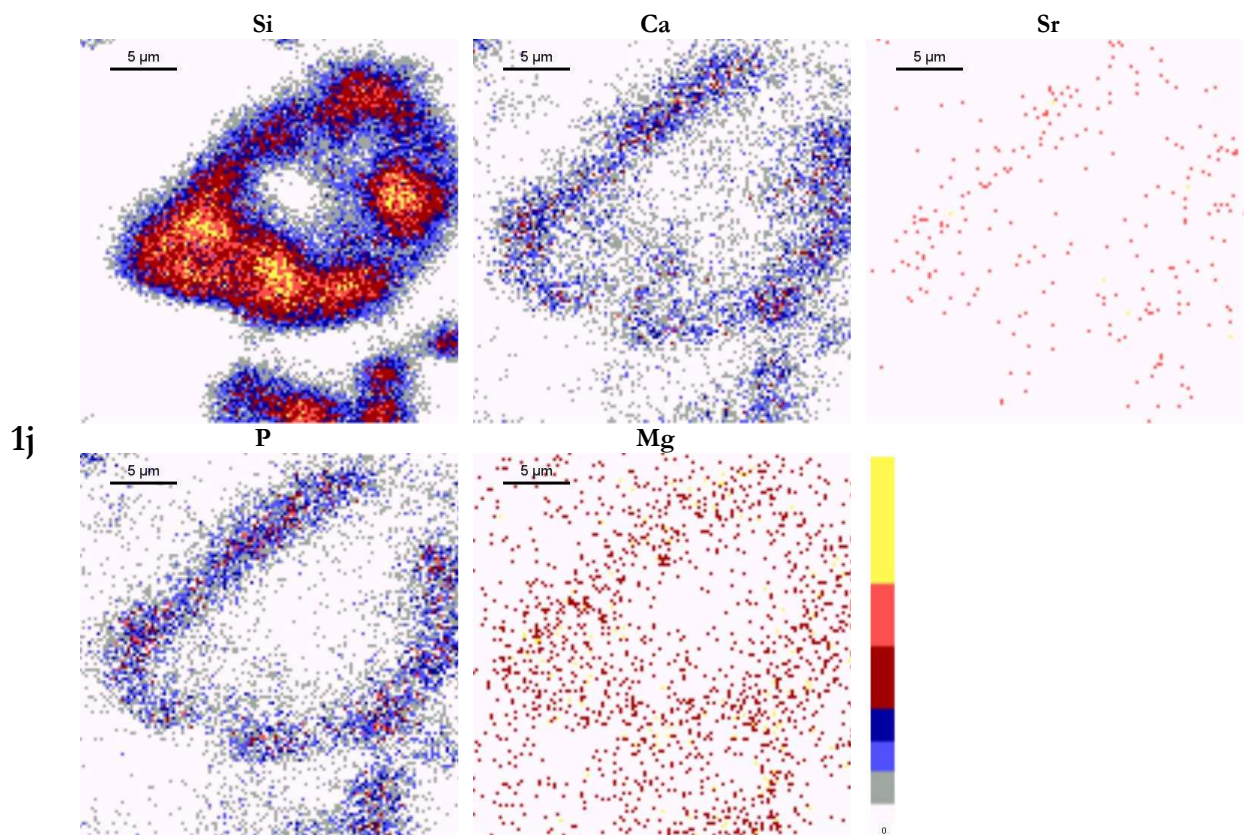


Figure 9-8: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore, strontium et magnésium dans des grains de verre B75-Sr5 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ après 1 jour d'interaction.

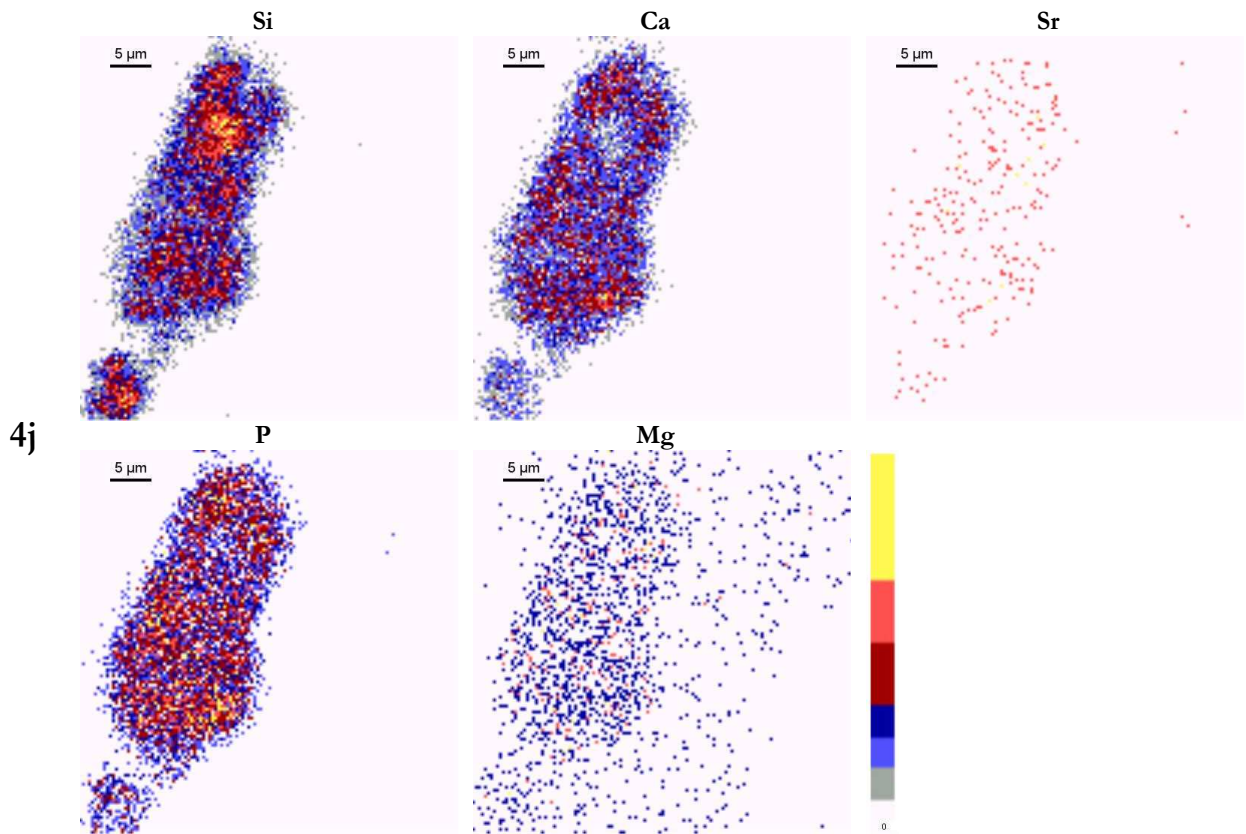


Figure 9-9: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore, strontium et magnésium dans des grains de verre B75-Sr5 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ après 4 jours d'interaction.

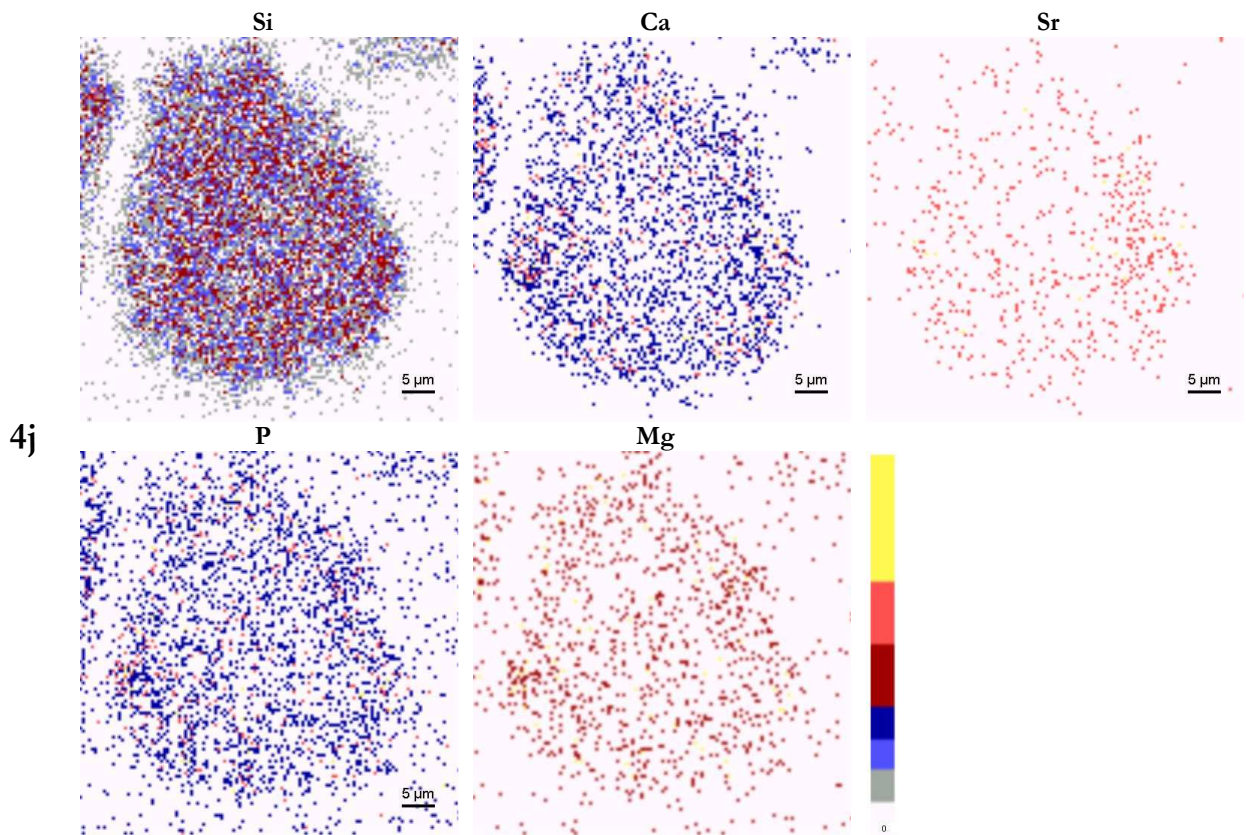


Figure 9-10: distribution des éléments silicium, calcium, phosphore, strontium et magnésium dans des grains de verre B67,5-Sr5 de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ après 4 jours d'interaction.

9.2 Mesures locales des concentrations élémentaires lors des interactions grains de verre/milieu biologique

9.2.1 Évolution des concentrations à la périphérie des grains de verre

L'analyse locale de la périphérie des grains révèle que les phénomènes observés pour les poudres sont identiques à ceux observés pour les pastilles, à des échelles de temps et de dimensions réduites toutefois. Les concentrations élémentaires affichent des tendances analogues à celles observées précédemment. Deux comportements sont à distinguer : celui du verre binaire B75, très rapide à réagir, et celui adopté par le verre ternaire B67,5 et les verres dopés en strontium B75-Sr5 et B67,5-Sr5, plus lents. La Figure 9-11 montre l'évolution de la concentration en calcium. Pour les verres B67,5, B75-Sr5 et B67,5-Sr5 la quantité de cet élément en périphérie des grains augmente avec le temps d'immersion, jusqu'à représenter 25 à 34 % de la couche périphérique au bout de 4 jours d'interaction. Pour le verre B75, la proportion de calcium augmente rapidement lors des toutes premières heures d'interaction et représente 34 % de la périphérie des grains au bout de 6 heures d'immersion (cf. encart de la Figure 9-11). Au-delà de 6 heures, on observe une chute brutale de la quantité de calcium. Celui-ci est relargué de la périphérie des grains de verre B75, et comme constaté sur les cartographies multiélémentaires de cet échantillon, il n'y subsiste qu'en quantité infime après 4 jours d'interaction.

Ces observations s'appliquent également à l'évolution de la concentration en phosphore (Figure 9-12). Comme pour les pastilles, la concentration de cet élément augmente rapidement à la périphérie des grains. Après 4 jours d'interaction, le phosphore y est contenu à hauteur de 9-10 % pour les verres dopés en strontium, et à hauteur de 16 % pour le verre ternaire. Pour le verre B75, la quantité de phosphore croît rapidement jusqu'à 6 heures d'interaction. Au-delà, la concentration en phosphore chute jusqu'à des valeurs quasi nulles. La couche phosphocalcique formée en bordure des grains de verre B75 apparaît donc instable et est rapidement dissoute sous l'action des fluides biologiques.

Ce constat est avéré par l'observation de la Figure 9-13. Il y est visible que la concentration en silicium en bordure des grains de verre B75 décroît en début d'interaction avec le milieu biologique, correspondant à la destruction du réseau vitreux sur la périphérie du matériau. Cependant, au-delà de 6 heures d'interaction, la couche phosphocalcique périphérique est dissoute et conséquemment les grains ne sont plus constitués que d'un cœur vitreux riche en silicium. Pour les verres B67,5, B75-Sr5 et B67,5-Sr5 le phénomène observé est différent : le réseau silicate est progressivement détruit sur les régions périphériques des grains, et par suite la concentration de cet élément diminue. On note que la décroissance est plus lente pour les verres dopés en strontium comparativement aux verres non dopés ; c'était aussi le cas pour les échantillons de verre sous forme de pastille.

La Figure 9-14 montre que le magnésium est inclus sous forme de traces à la périphérie des grains, en quantité plus importante pour les verres dopés en strontium comparativement aux verres non dopés. Pour l'échantillon B75, le magnésium est détecté lors des premiers temps d'interaction, puis disparaît à mesure que la couche de phosphate de calcium périphérique est dissoute. Pour les autres échantillons, la teneur en magnésium de la périphérie des verres est comprise entre 0,5 et 1,5 % massiques.

Enfin, sur la Figure 9-15, les fluctuations constatées à propos de la concentration en strontium tendent à indiquer un faible appauvrissement de cet élément à la surface des verres B75-Sr5 et B67,5-Sr5. Après 4 jours d'immersion dans le milieu biologique, le strontium est

détecté dans des proportions légèrement inférieures à celles contenues initialement dans la matrice vitreuse.

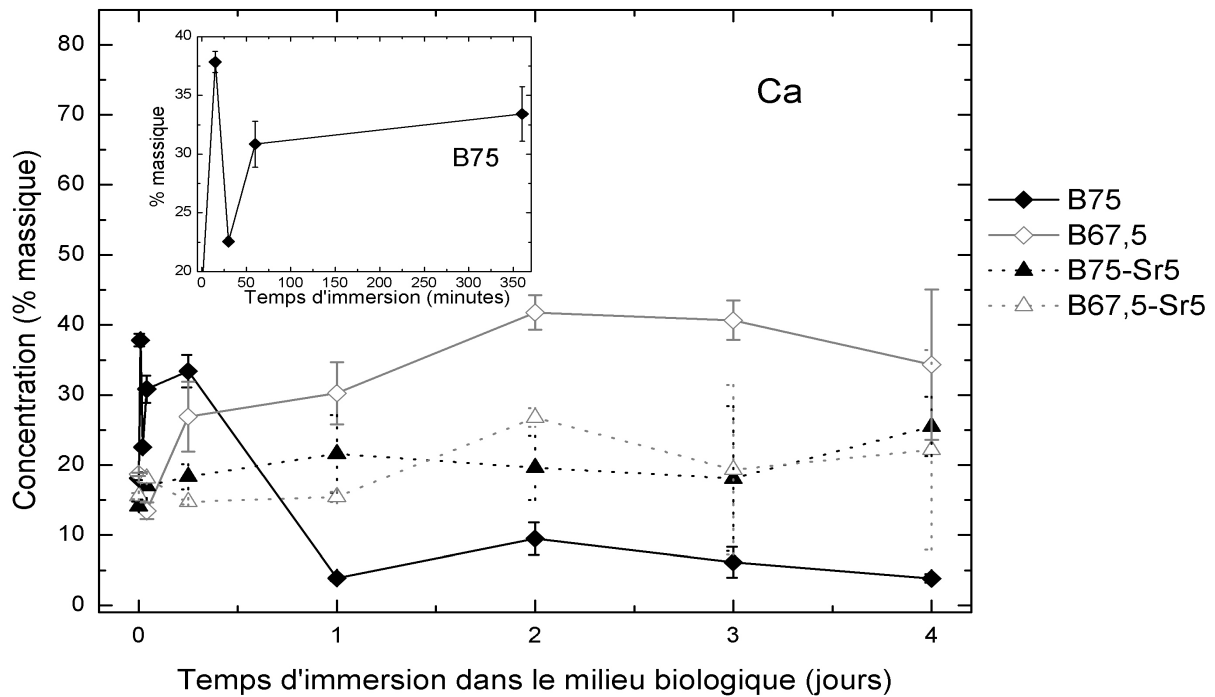


Figure 9-11: évolution de la concentration en calcium à la périphérie des grains de verre en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Encart : évolution de la concentration en calcium à la périphérie des grains de verre B75 lors des 6 premières heures. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

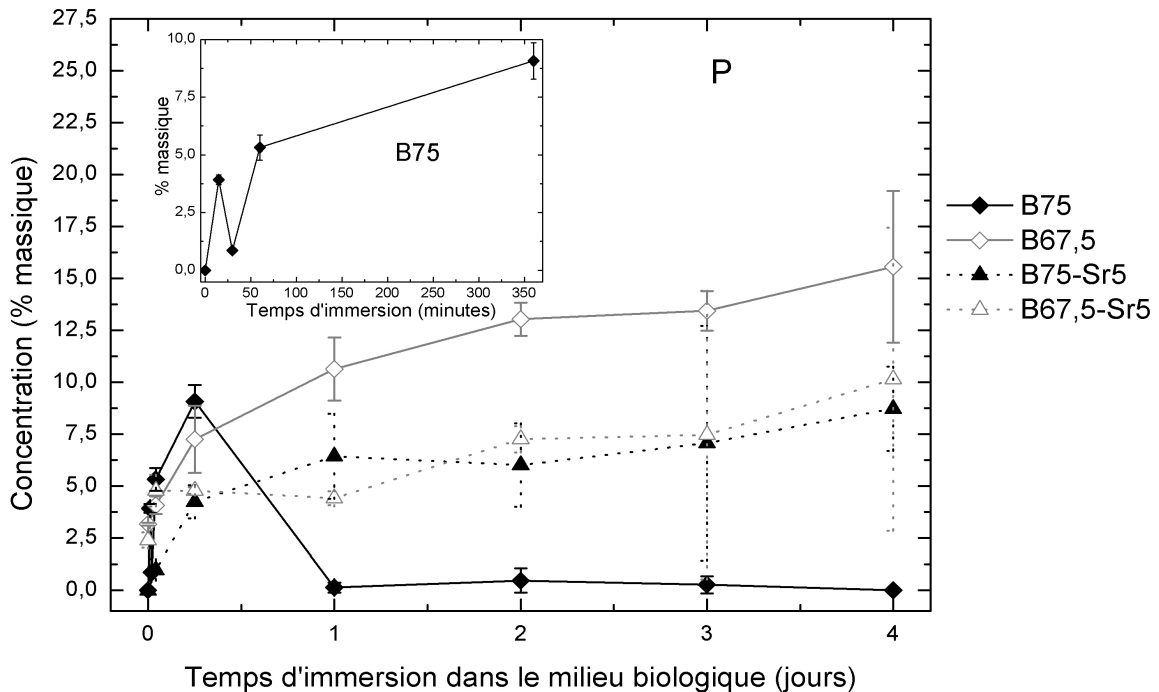


Figure 9-12: évolution de la concentration en phosphore à la périphérie des grains de verre en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Encart : évolution de la concentration en phosphore à la périphérie des grains de verre B75 lors des 6 premières heures. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

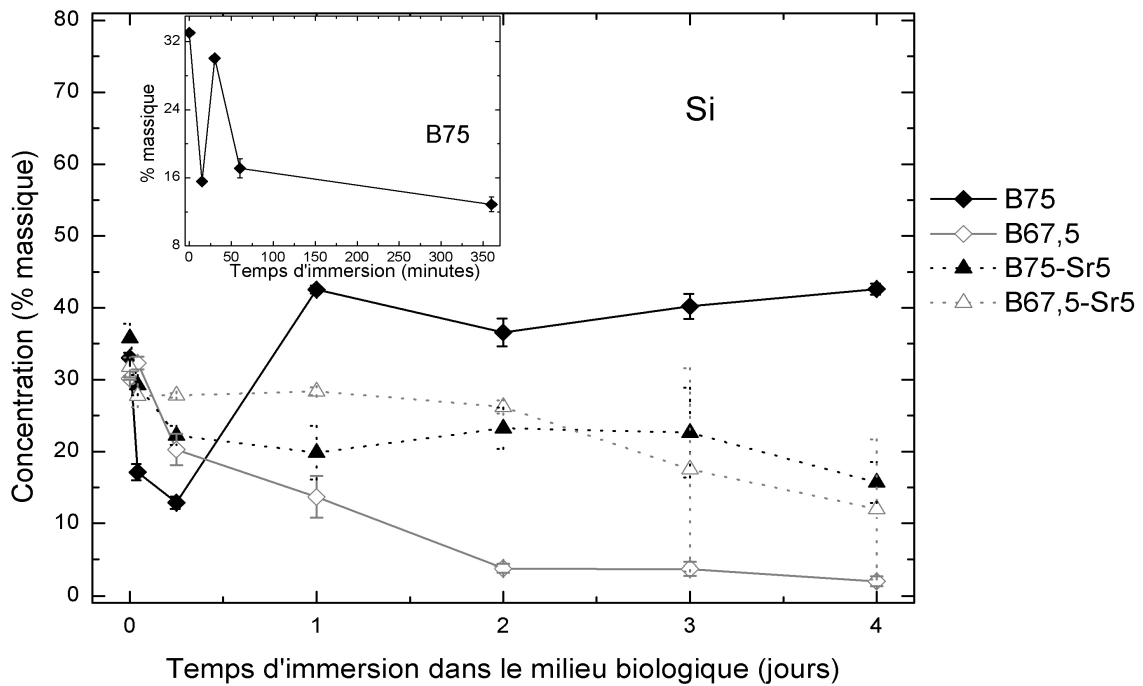


Figure 9-13: évolution de la concentration en silicium à la périphérie des grains de verre en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Encart : évolution de la concentration en silicium à la périphérie des grains de verre B75 lors des 6 premières heures. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

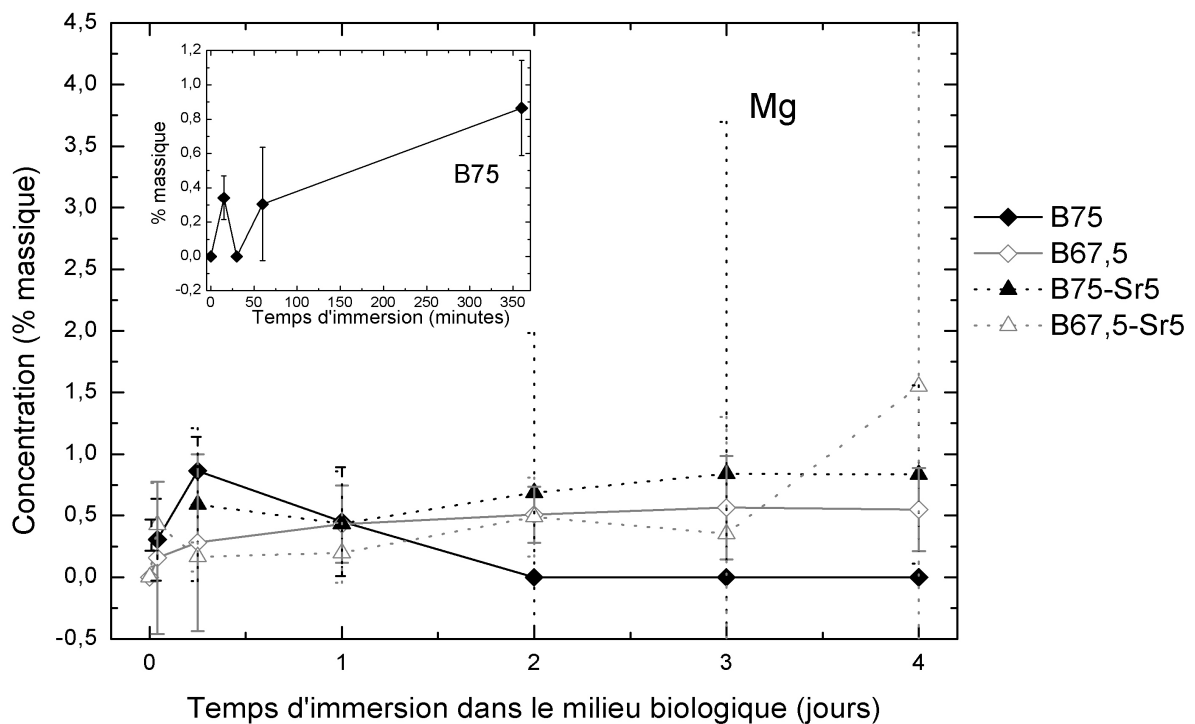


Figure 9-14: évolution de la concentration en magnésium à la périphérie des grains de verre en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Encart : évolution de la concentration en magnésium à la périphérie des grains de verre B75 lors des 6 premières heures. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

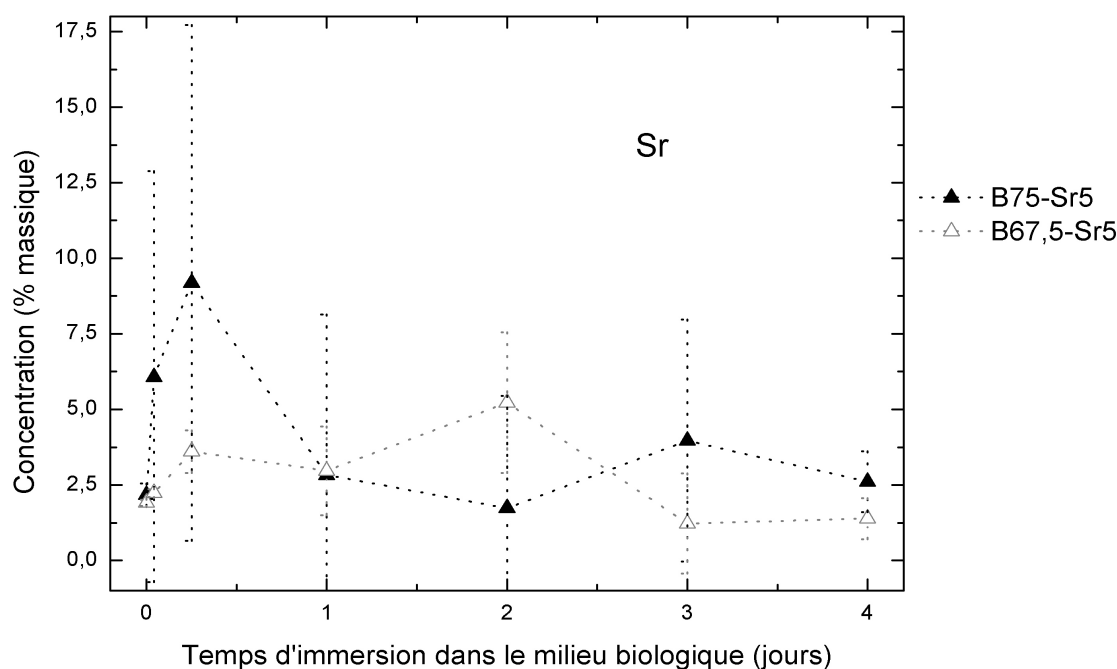


Figure 9-15: évolution de la concentration en strontium à la périphérie des grains de verre en fonction du temps d'immersion dans le milieu biologique. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

9.2.2 Évolution des concentrations dans le cœur des grains de verre

Les concentrations élémentaires dans le cœur des grains de verre ont été calculées et sont représentés en Figure 9-16. Les phénomènes de diffusion et de migration des ions vers la périphérie du matériau entraînent des fluctuations dans la composition de la matrice vitreuse. Plusieurs comportements sont à distinguer. Tout d'abord, à mesure que le temps d'interaction augmente, le cœur des grains de verre B75 s'appauvrit en ions alcalino-terreux, qui ont diffusé vers la périphérie. Conséquemment, le cœur des grains s'enrichit en silicium.

Concernant les grains de verre B67,5, ceux-ci sont peu à peu intégralement transformés en phosphate de calcium, comme observé auparavant sur les cartographies multiélémentaires. Après 4 jours d'interaction, on constate que la quantité de silicium présente dans le cœur des grains a considérablement diminué. Le réseau vitreux initial laisse place à un cœur enrichi en calcium et en phosphore, et contenant du magnésium. Il est donc manifeste que la couche périphérique Ca-P-Mg s'est élargie à l'ensemble du grain, jusqu'à atteindre le cœur des matériaux. Ce phénomène n'est pas observé de façon aussi évidente pour le verre B67,5-Sr5. Pour celui-ci, les concentrations des différents éléments constitutifs après 4 jours sont proches des valeurs initiales dans la matrice vitreuse. Ce constat concerne également les grains de verre B75-Sr5, dont le cœur, malgré un léger enrichissement en phosphore, a subi peu de modifications substantielles.

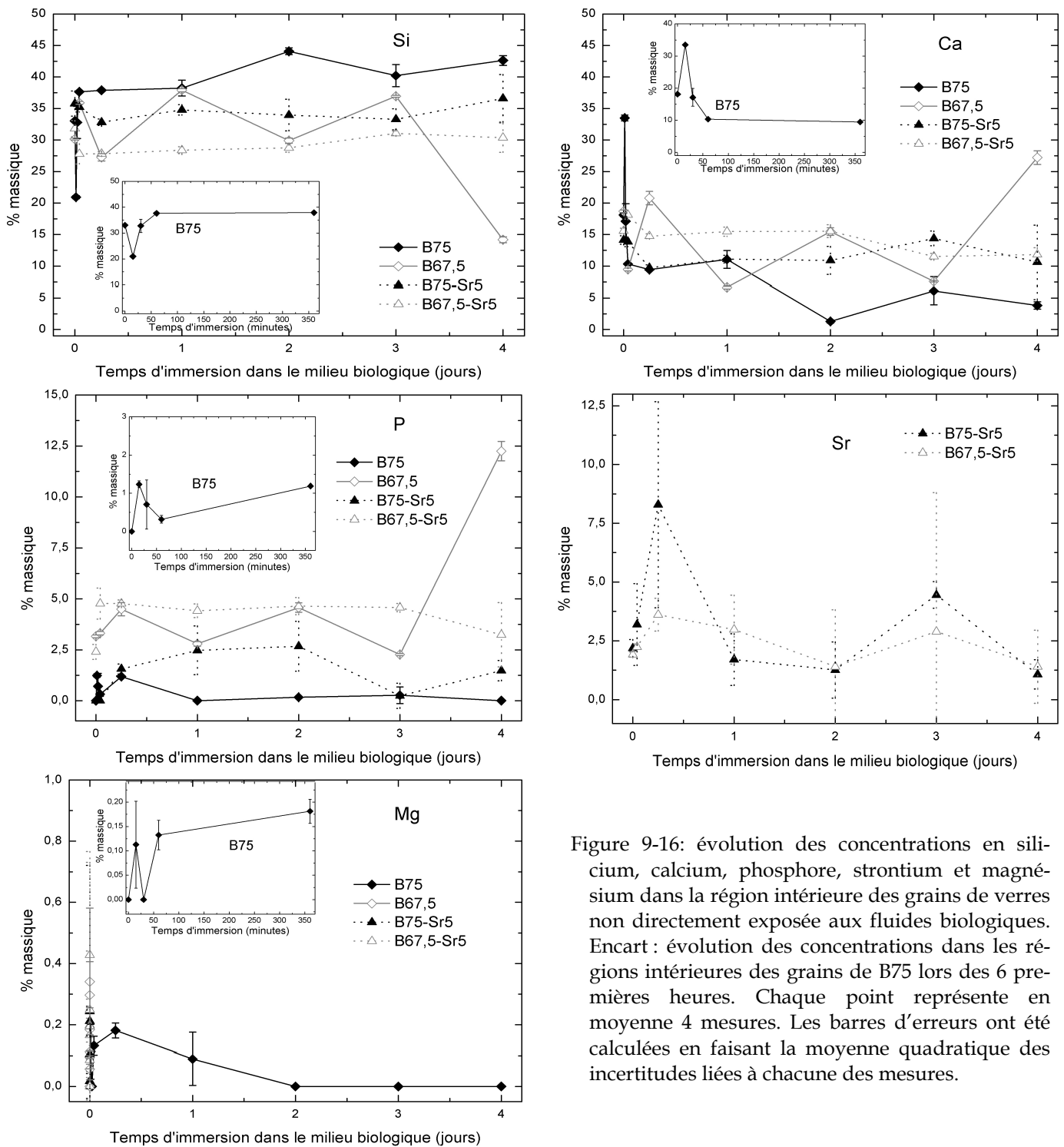


Figure 9-16: évolution des concentrations en silicium, calcium, phosphore, strontium et magnésium dans la région intérieure des grains de verres non directement exposée aux fluides biologiques. Encart : évolution des concentrations dans les régions intérieures des grains de B75 lors des 6 premières heures. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Les barres d'erreurs ont été calculées en faisant la moyenne quadratique des incertitudes liées à chacune des mesures.

9.2.3 Évolution des rapports atomiques à l'interface grains de verre/milieu biologique

La Figure 9-17 représente l'évolution du rapport Ca/P à l'interface grain de verre/milieu biologique. Pour un temps d'interaction et une composition de verre donnés, les valeurs portées sur les graphes sont la moyenne des rapports atomiques calculés dans plusieurs régions d'intérêt, elles-mêmes définies dans différents échantillons de pastilles afin de

s'assurer de la reproductibilité des mesures. Chaque point représente en moyenne 4 mesures. Pour le verre B75, on observe une décroissance très rapide du rapport Ca/P lors des premières heures d'interaction avec le milieu biologique. Après 6 heures d'immersion, le rapport Ca/P vaut 2,5. Mais au-delà de 6 heures, la couche phosphocalcique nouvellement formée est progressivement dissoute. Le phosphore n'est plus présent qu'en infimes proportions à la surface des grains de verre B75, résultant en une brusque augmentation du rapport Ca/P. Au bout d'1 jour, ce rapport est égal à 23,0. Il se maintient à ce niveau par la suite. Pour les verres B67,5, B67,5-Sr5 et B75-Sr5 le comportement observé est similaire à celui constaté pour les pastilles. Le rapport Ca/P décroît avec le temps d'immersion. Après 4 jours d'interaction, il est égal à 2,0 pour le verre B75-Sr5 et vaut 1,6 pour les verres B67,5 et B67,5-Sr5.

L'évolution du rapport Ca/Mg est visible en Figure 9-18. Pour le verre B75, le rapport diminue rapidement ; mais au-delà de 6 heures d'interaction il n'est plus détecté de magnésium à la surface des grains. Ce rapport n'est donc plus défini pour le verre B75 après 6 heures d'immersion. Pour les autres verres, la quantité de magnésium incorporée en surface des grains augmente manifestement avec le temps d'interaction. Il est remarqué que de plus amples concentrations de magnésium sont présentes à la surface des grains de verres dopés en strontium, résultant en un rapport Ca/Mg plus bas.

Concernant l'évolution du rapport Ca/Sr (Figure 9-19), on observe que ce dernier diminue lors des premiers temps d'interaction, lorsque les réactions de dissolution opèrent la désalcalinisation de la surface des grains. Bien qu'appartenant tous deux à la famille des alcalino-terreux, le calcium est plus affecté par les phénomènes de dissolution que le strontium, résultant en une diminution du rapport Ca/Sr. Puis, à mesure que la couche riche en calcium et en phosphore se développe à la surface des grains, la concentration en calcium augmente, et avec elle le rapport Ca/Sr.

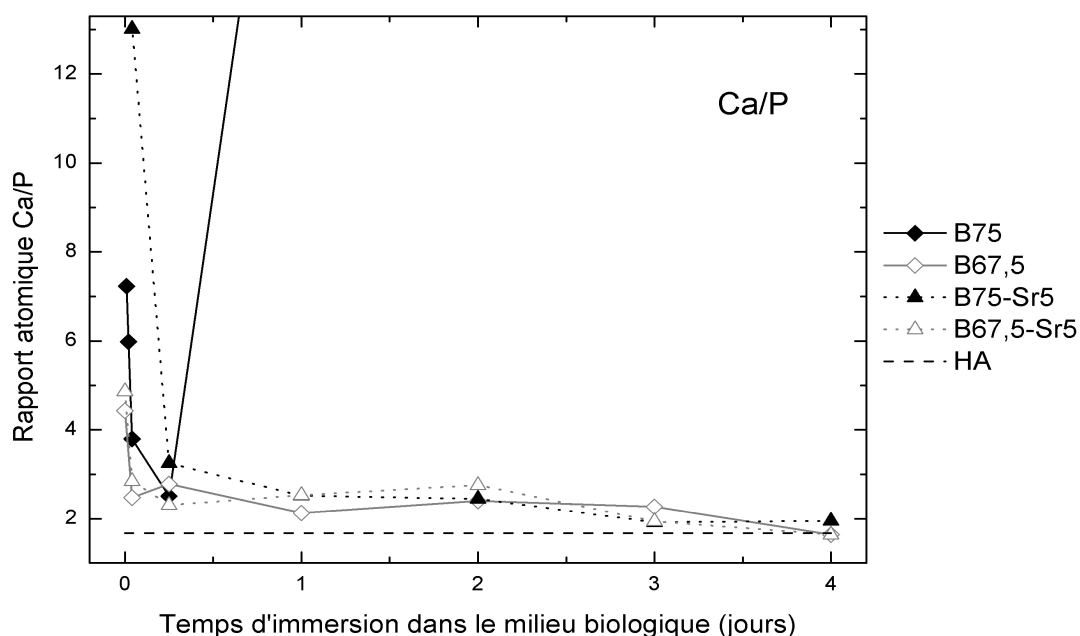


Figure 9-17: évolution du rapport atomique Ca/P à l'interface verre/milieu biologique pour les quatre types de grains de verre.

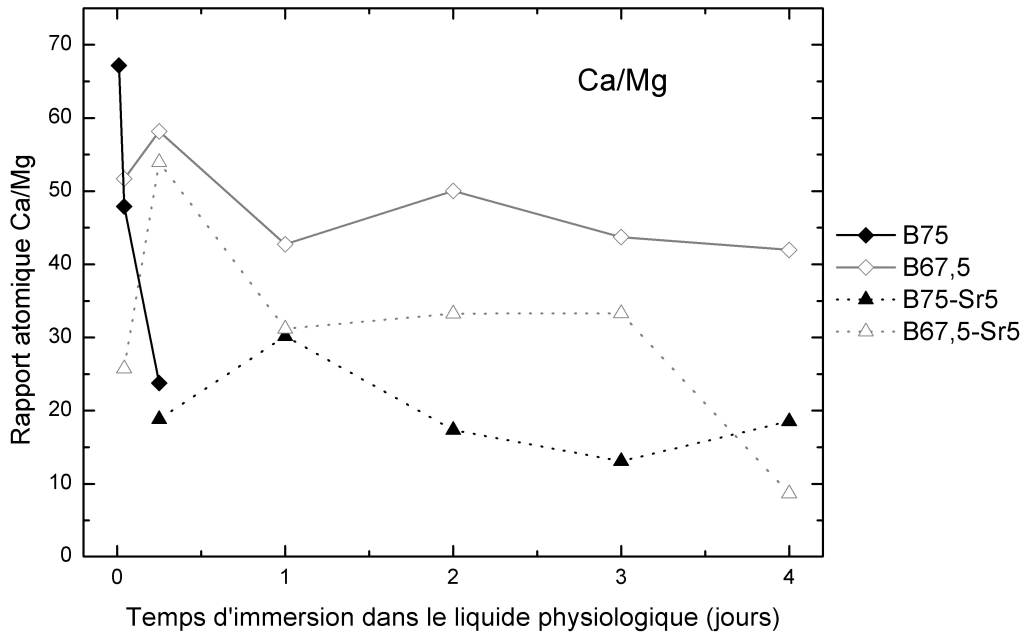


Figure 9-18: évolution du rapport atomique Ca/Mg à l'interface verre/milieu biologique pour les quatre types de grains de verre.

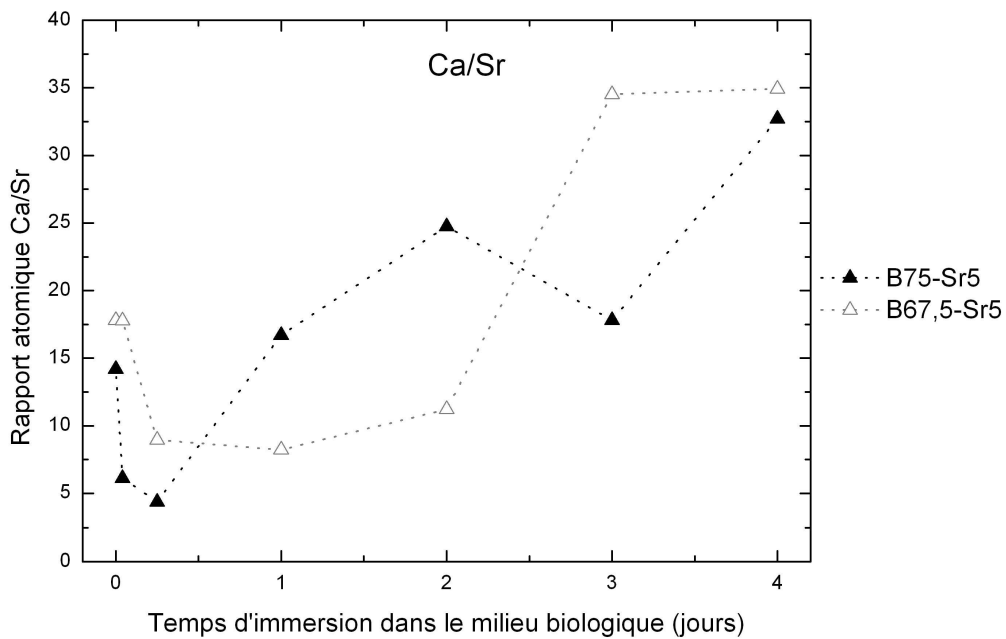


Figure 9-19: évolution du rapport atomique Ca/Sr à l'interface verre/milieu biologique pour les grains de verres dopés en strontium.

9.3 Évolution de la composition du milieu biologique lors des interactions avec les grains de verre

Les mesures des concentrations élémentaires dans le milieu biologique signalent un appauvrissement global du milieu en calcium, phosphore et magnésium, qui sont prélevés par les grains de verre pour participer à la formation et à la croissance de la couche Ca-P-Mg périphérique, tandis que les éléments silicium et strontium issus des grains de verre sont relargués dans le milieu. Lors des premières heures d'interaction, la quantité de calcium dans le milieu augmente, suite à la désalcalinisation de la surface des verres (Figure 9-20). Puis il est observé une baisse de la concentration en calcium jusqu'à 1 jour d'interaction. Plusieurs comportements sont ensuite distingués. Pour le verre B67,5 la quantité de calcium décroît de façon continue jusqu'à 4 jours d'interaction. Pour les verres dopés en strontium B75-Sr5 et B67,5-Sr5, la concentration en calcium dans le milieu est maintenue quasiment constante jusqu'à 3 jours d'interaction, puis diminue à nouveau au-delà. Pour le verre B75, la couche phosphocalcique formée à la périphérie des grains est dissoute après 1 jour d'interaction. Par suite, d'importantes quantités de calcium sont relarguées dans le milieu. Concernant le phosphore (Figure 9-21), on observe une décroissance commune à tous les échantillons. La quantité de phosphore dans le milieu décroît de manière importante lors des premières heures d'interaction, puis la consommation de cet élément est fortement ralentie après 1 jour, signe possible que le système verre-milieu biologique parvient à un équilibre. Pour le verre B75, la consommation en phosphore semble même cesser après 2 jours d'interaction. Au final, cet élément est prélevé en plus grandes quantités pour les verres ternaires et dopés en strontium en comparaison du verre binaire B75. La Figure 9-22 représente l'évolution de la concentration en silicium. De grandes quantités de cet élément sont relarguées dans le milieu lors des premières heures d'interaction, puis la concentration en silicium atteint une valeur limite après quelques jours d'immersion. Il est observé en Figure 9-23 une lente décroissance de la concentration en magnésium dans le milieu. Cet élément apparaît être incorporé de façon plus importante par les verres dopés en strontium. Enfin, la Figure 9-24 expose les mesures concernant la concentration de strontium. Après 4 jours d'interaction, cet élément est relargué à hauteur de 11 à 15 ppm dans le milieu.

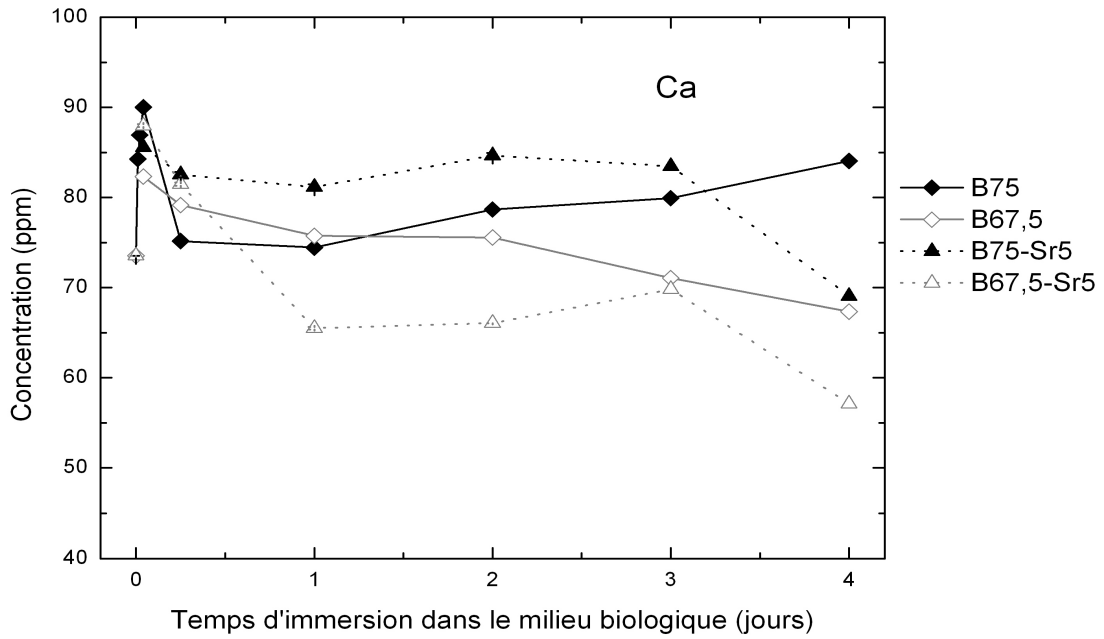


Figure 9-20: évolution de la concentration en calcium dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les quatre types de grains de verre.

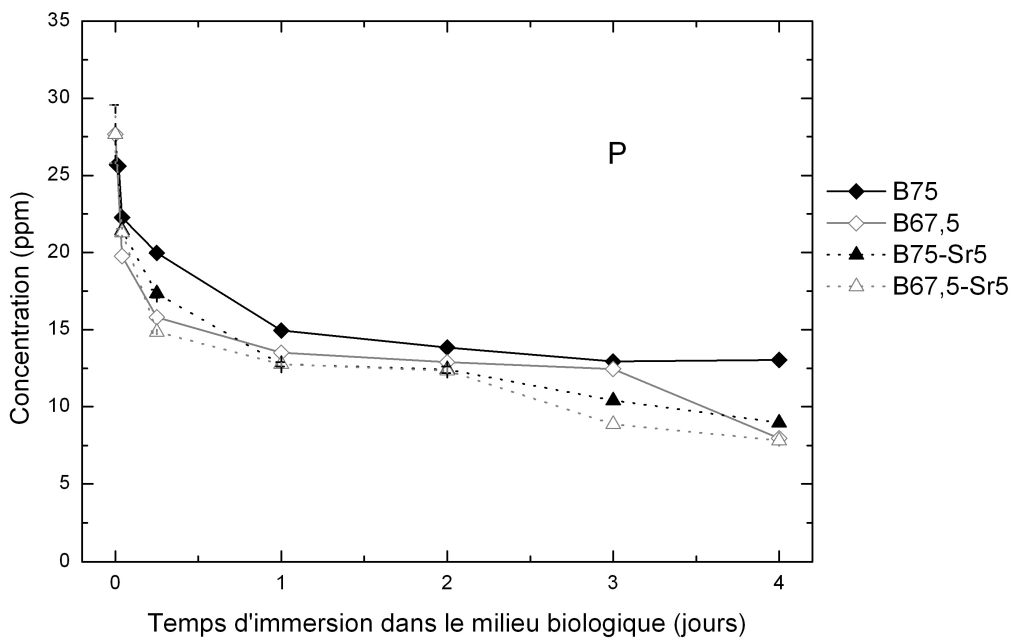


Figure 9-21: évolution de la concentration en phosphore dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les quatre types de grains de verre.

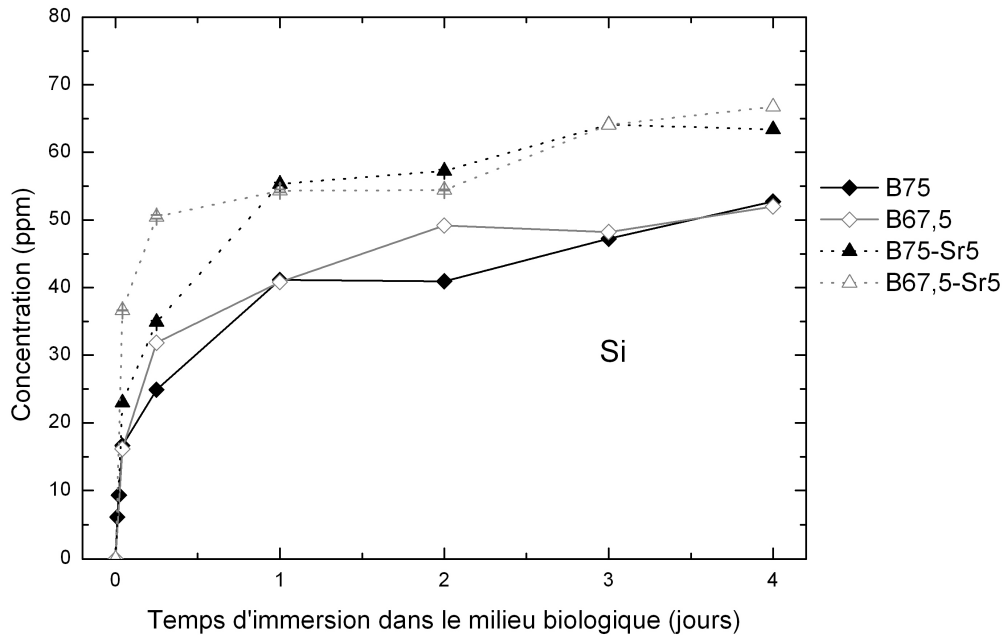


Figure 9-22: évolution de la concentration en silicium dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les quatre types de grains de verre.

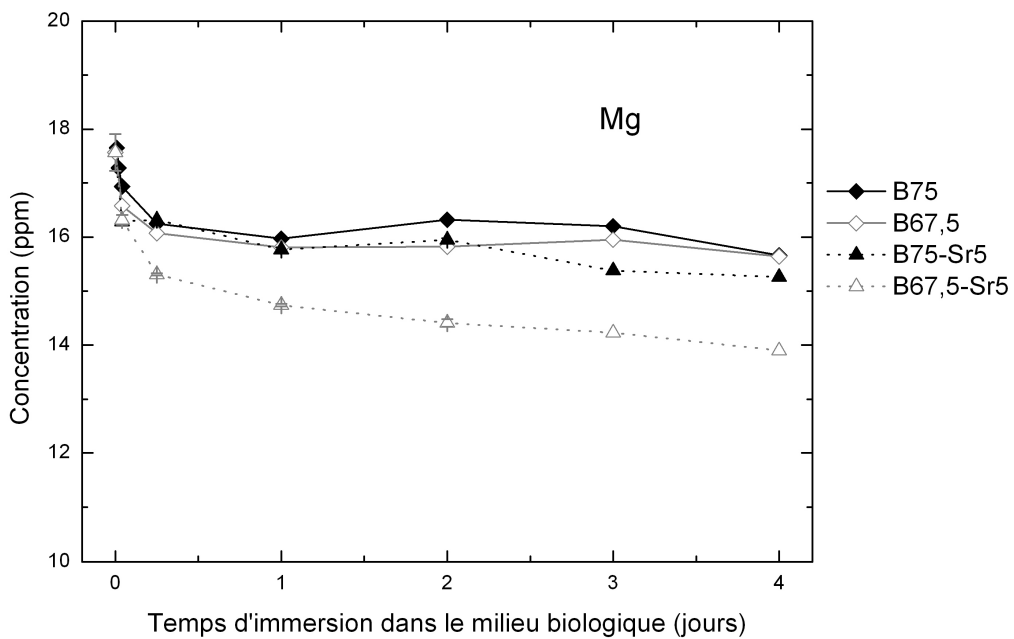


Figure 9-23: évolution de la concentration en magnésium dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les quatre types de grains de verre.

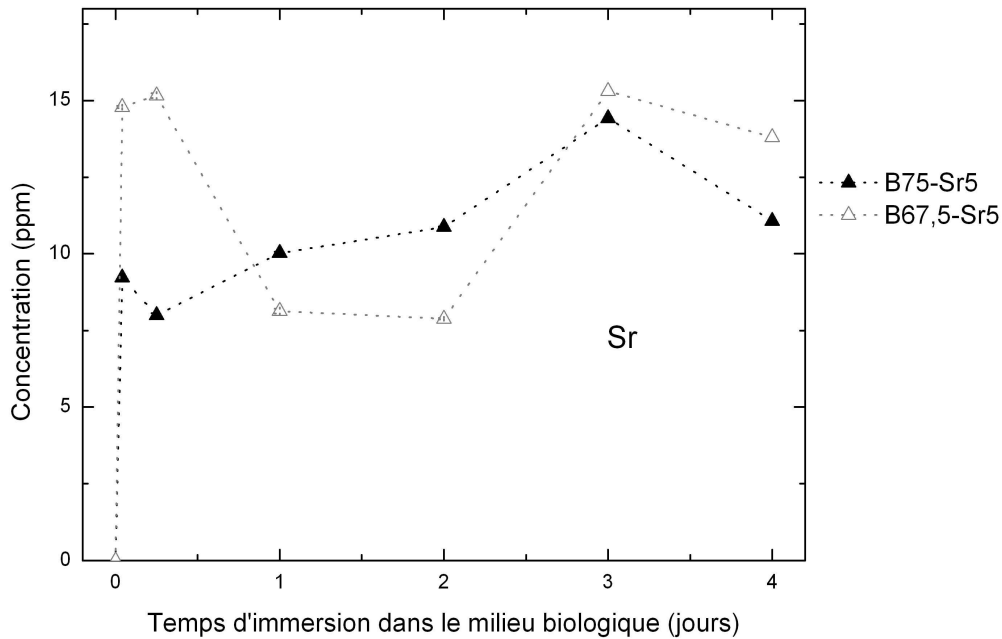


Figure 9-24: évolution de la concentration en strontium dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les grains de verre dopés en strontium.

9.4 Résumé des observations expérimentales pour les grains de verres binaires, ternaires et dopés avec 5 % de strontium

Les réactions de dissolution et de formation de la couche Ca-P-Mg sont plus rapides pour le verre B75 comparativement au verre B67,5. De plus, l'ajout de strontium dans la composition du matériau ralentit de manière significative la dissolution et le développement de la couche Ca-P-Mg.

Ainsi, le verre B75 est capable en quelques minutes d'induire la formation d'une couche périphérique de phosphate de calcium. Mais après 6 heures d'immersion, la couche phosphocalcique périphérique n'entoure plus que partiellement les grains de verre et au bout de 2 jours, elle est presque intégralement dissoute. Il ne demeure que le cœur riche en silicium, plus résistant à la dissolution.

Les verres B67,5, B75-Sr5 et B67,5-Sr5 sont plus lents à amorcer les processus de dissolution et de formation de la couche phosphocalcique. Pour le verre B67,5, la couche phosphocalcique s'est étendue à l'ensemble du matériau après 4 jours d'interaction, et les grains de verre sont alors intégralement changés en phosphates de calcium. Pour les verres B75-Sr5 et B67,5-Sr5, les grains sont après 4 jours d'interaction composés d'une trame phosphocalcique dans laquelle subsiste d'importantes quantités de silicium, et où sont décelées des traces de magnésium et de strontium. La couche Ca-P-Mg est étalée sur une profondeur moindre pour le verre B67,5-Sr5 en comparaison des autres verres.

Une information importante est que la couche Ca-P-Mg formée en périphérie des grains B67,5, B75-Sr5 et B67,5-Sr5 n'est pas dissoute après 4 jours d'interaction. La stabilité plus importante de la couche périphérique pourrait être une indication de la formation d'une phase apatitique. C'est aussi ce qu'indique l'évolution du rapport atomique Ca/P à l'interface

verre/milieu : après 4 jours d'interaction, il est égal à 2,0 pour le verre B75-Sr5 et vaut 1,6 pour les verres B67,5 et B67,5-Sr5.

Enfin, les calculs des concentrations élémentaires à la périphérie des grains, les mesures de la composition du milieu biologique et le calcul du rapport atomique Ca/Mg à l'interface verre/milieu s'accordent sur le fait que le magnésium est inclus en quantités plus importantes pour les verres B75-Sr5 et B67,5-Sr5. Quant au strontium, il est en partie relargué hors de la surface des verres B75-Sr5 et B67,5-Sr5. Après 4 jours d'interaction, cet élément est présent à hauteur de 11 à 15 ppm dans le milieu.

Partie V

Discussion sur les réactions physico-chimiques lors des interactions entre verres bioactifs nanostructurés et milieu biologique

Chapitre 10

Critères d'évaluation de la bioactivité *in vitro*

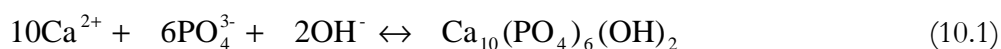
Nous disposons d'informations sur la réactivité des verres à une échelle locale, grâce à la microsonde PIXE, et à une échelle globale, grâce aux mesures de la composition du milieu biologique en ICP-AES. Il est proposé dans ce chapitre d'opérer des comparaisons entre matériaux à ces deux échelles. Tout d'abord, par des considérations sur l'évolution thermodynamique du système, nous pourrions établir pour chaque verre un critère permettant d'évaluer le potentiel de formation d'une couche d'hydroxyapatite. Cela est accessible par l'étude de l'état de saturation du milieu biologique vis-à-vis du minéral apatitique. Puis, en nous basant sur les mesures du rapport atomique Ca/P à l'interface verre bioactif/milieu biologique, nous fournirons une estimation de la cinétique d'évolution de la couche de phosphate de calcium.

10.1 Évolution de l'état de saturation du milieu biologique

À la suite des interactions physico-chimiques avec les verres, la composition du milieu biologique subit d'importants changements. Le processus bioactif induit à la surface des verres la formation de précipités de type apatitique qui, nous l'avons vu au chapitre 1, peuvent être définis comme des nanocristaux d'une hydroxyapatite déficiente en calcium, de formule générale $Ca_{10-x}(PO_4)_{6-x}(CO_3)_x(HPO_4)_x(OH)_{2-x}$, au sein de laquelle des substitutions ont lieu au profit des ions carbonates, hydrogénophosphates, alcalins et alcalino-terreux. Les échanges ioniques intenses entre les verres et le milieu provoquent ainsi d'important changement dans l'état de saturation du milieu biologique vis-à-vis du minéral formé. Le suivi de cet état de saturation fournit des informations précieuses quant à la capacité de chacun des verres à former une couche apatitique.

Cependant, le calcul de cet état de saturation est rendu délicat pour plusieurs raisons : à cause de l'hétérogénéité de cristallisation des apatites biologiques d'une part, et de la difficulté à déterminer avec exactitude l'importance des substitutions ioniques dans les cristaux d'apatite d'autre part. Pour ces raisons, il est commode d'effectuer le calcul de l'état de saturation du milieu biologique vis-à-vis de l'hydroxyapatite stoechiométrique $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Ce sont alors les tendances relatives observées dans l'évolution de l'état de saturation du milieu qui vont constituer un critère d'évaluation de la bioactivité *in vitro*.

La formation d'hydroxyapatite s'effectue selon :



Le produit d'activité ionique Q de l'équation 10.1 est défini à partir des activités des différentes espèces ioniques comme étant :

$$Q = a_{Ca^{2+}}^{10} \cdot a_{PO_4^{3-}}^6 \cdot a_{OH^-}^2$$

$$Q = \gamma_{Ca^{2+}}^{10} \cdot [Ca^{2+}]^{10} \cdot \gamma_{PO_4^{3-}}^6 \cdot [PO_4^{3-}]^6 \cdot \gamma_{OH^-}^2 \cdot [OH^-]^2$$
(10.2)

où les coefficients d'activité γ traduisent les interactions entre l'espèce i et les autres constituants du système ; ils dépendent de la force ionique de la solution, du pH et de la température.

Nous pouvons alors définir IS , indice de saturation de la solution vis-à-vis de l'hydroxyapatite selon :

$$IS = \frac{Q}{K_{sp}}$$
(10.3)

où K_{sp} est le produit de solubilité de l'hydroxyapatite. K_{sp} n'est autre que la valeur du produit d'activité ionique lorsque la solution et la phase solide décrites dans la réaction 10.1 sont à l'équilibre. Le produit de solubilité K_{sp} de l'hydroxyapatite stoechiométrique en milieu aqueux est estimé à $10^{-117,2}$ à 37 °C [125, 126].

L'indice IS renseigne sur l'état de saturation de la solution. Sa connaissance permet de prévoir l'évolution du système dans la mesure où celui-ci tend à l'équilibre thermodynamique. C'est le cas lorsque $Q = K_{sp}$: la solution et la phase solide sont à l'équilibre. Lorsque $Q < K_{sp}$, la solution est dite sous-saturée par rapport au minéral ; il y a alors dissolution de ce dernier. Lorsque $Q > K_{sp}$, la solution est sursaturée par rapport au minéral et la réaction 10.1 bascule préférentiellement dans le sens de la précipitation.

D'après l'équation 10.3, le calcul de l'indice de saturation IS ne nécessite donc que la connaissance du produit d'activité ionique Q . La valeur de ce dernier peut être déterminée à tout moment pour chacun des échantillons. En effet, sur la base des travaux de Ohtsuki, Kokubo et Yamamuro, les valeurs des coefficients d'activité γ sont connues pour une solution physiologique [127, 128] : les coefficients γ valent respectivement 0,36 pour Ca^{2+} , 0,06 pour PO_4^{3-} et 0,72 pour OH^- . Les concentrations en calcium et en phosphore sont connues grâce aux mesures en ICP-AES, tandis que la quantité d'ions hydroxyles présents dans le milieu est déduite des mesures de pH qui ont été réalisées pour chacun des échantillons. Les indices de saturation concernant les différents échantillons sont présentés sur les Figures 10-1, 10-2 et 10-3.

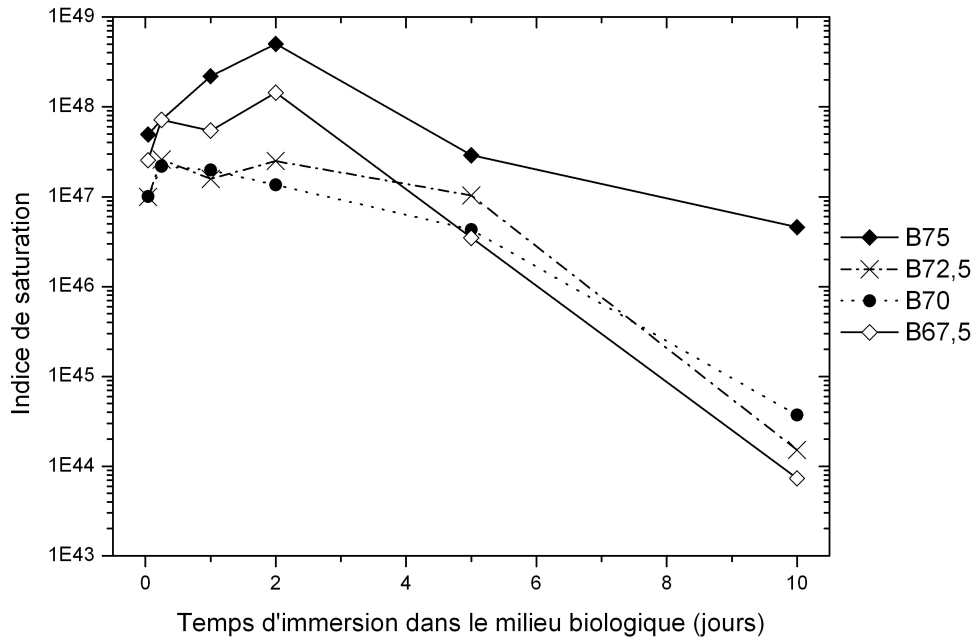


Figure 10-1: évolution de l'indice de saturation du milieu biologique vis-à-vis de l'hydroxyapatite suite à l'immersion de pastilles de verres $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$.

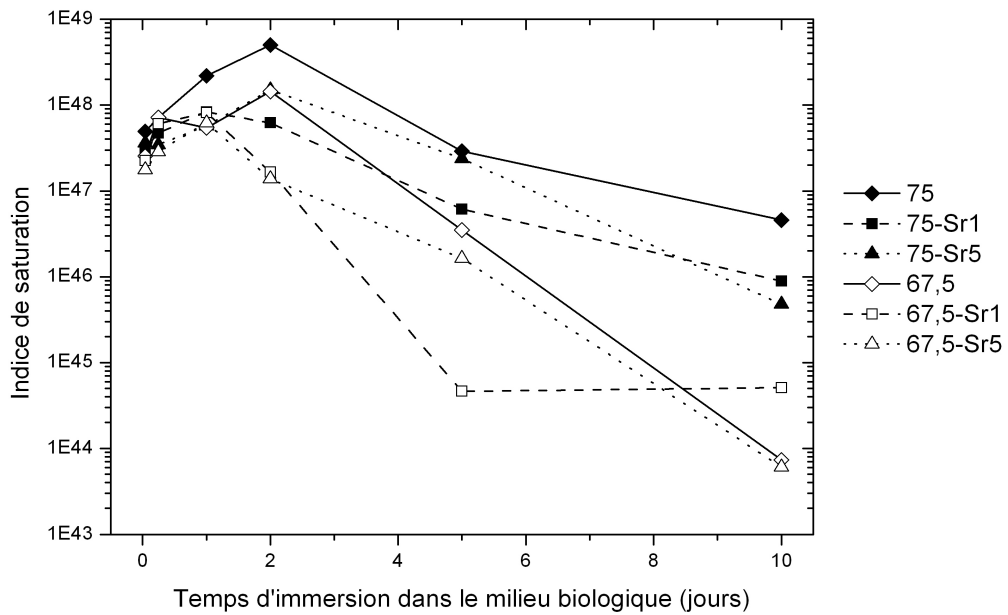


Figure 10-2: évolution de l'indice de saturation du milieu biologique vis-à-vis de l'hydroxyapatite suite à l'immersion de pastilles de verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$.

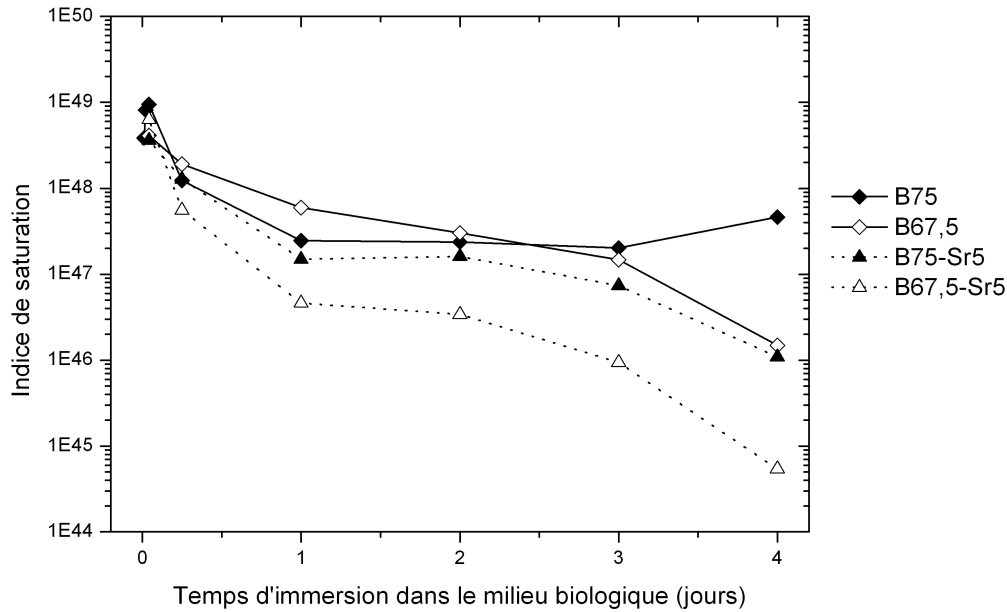


Figure 10-3: évolution de l'indice de saturation du milieu biologique vis-à-vis de l'hydroxyapatite suite à l'immersion de grains de verres $\text{SiO}_2\text{-CaO}$, $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$.

Les résultats indiquent que le milieu biologique est initialement sursaturé vis-à-vis du minéral apatitique ; la réaction 10.1 est favorablement déplacée dans le sens de la précipitation et le milieu biologique est donc propice à la formation de précipités d'hydroxyapatite. Celle-ci a lieu en surface des verres bioactifs, qui offrent des sites privilégiés pour la nucléation apatitique, en particulier du fait des faibles énergies interfaciales octroyées par le développement d'un gel de silice en surface des verres (troisième étape du processus de bioactivité) [127]. Lors des premiers délais d'interaction, il est observé une hausse de l'état saturation du milieu biologique, due au relargage des ions calcium hors de la matrice vitreuse. Après cette phase de relargage, l'indice de saturation diminue à mesure que le temps d'interaction augmente, signe que les ions calcium, phosphates et hydroxyles sont incorporés en surface du verre pour permettre la croissance du minéral apatitique. Différents comportements sont observés. En Figure 10-1, il est visible que l'état de saturation diminue plus rapidement pour les verres contenant du phosphore que pour le verre sans phosphore B75. En particulier, la pente de décroissance semble d'autant plus grande que la teneur en phosphore dans le matériau initial est importante. En comparaison du verre binaire B75, les verres contenant du phosphore sont donc plus prompts à tendre vers l'équilibre thermodynamique du système, c'est-à-dire que la formation d'apatite est accélérée.

La Figure 10-2 représente les évolutions comparées de l'indice de saturation pour les verres dopés en strontium et les verres B75 et B67,5. Il est visible que la décroissance est plus rapide pour les verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ en comparaison du verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$, et dans une moindre mesure pour les verres de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ comparativement au verre $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$. D'un point de vue thermodynamique, les verres dopés en strontium présentent ainsi un plus grand potentiel pour la formation *in vitro* de précipités d'hydroxyapatite à leur surface.

Les comportements observés pour les grains de poudre sont affichés en Figure 10-3. Pour le verre B75, on constate que l'indice de saturation diminue rapidement après l'étape de relargage, mais au bout d'un jour d'interaction une valeur seuil est obtenue : l'évolution ther-

modynamique du système est ensuite figée entre 1 jour d'interaction et 3 jours d'interaction. Puis, au bout de 4 jours, l'indice de saturation augmente, signalant une dissolution de la phase minérale précédemment formée. Les grains de verre B75-Sr5 induisent un comportement différent. Bien que son évolution soit ralentie après 1 jour d'interaction, l'indice de saturation du système est en constante diminution et il n'est pas observé de stagnation de l'état du système. D'autre part, ainsi que constaté pour les pastilles, les verres contenant du phosphore ont des pentes de décroissances plus importantes. L'évolution du système est plus rapide pour le verre B67,5-Sr5 que pour le verre B67,5. D'un point de vue thermodynamique, les grains de verre B67,5, B67,5-Sr5 et B75-Sr5 possèdent le plus grand potentiel de formation d'hydroxyapatite. Toutefois de nombreux autres paramètres entrent en considération dans l'évaluation de la bioactivité *in vitro* ; il est indispensable de confronter ces résultats avec ceux concernant l'analyse micro-PIXE locale des matériaux.

10.2 Cinétique d'évolution de la couche phosphocalcique à l'interface verre bioactif/milieu biologique

Le suivi du rapport atomique Ca/P à l'interface verre bioactif/milieu biologique fournit de précieuses indications sur l'évolution physico-chimique de la surface des matériaux au cours des interactions. Pour l'ensemble des verres, il est observé pour ce rapport une décroissance de type exponentielle à mesure que le temps d'immersion s'allonge, jusqu'à une valeur limite proche de la valeur caractéristique de l'hydroxyapatite. Afin d'établir un point de comparaison sur le caractère bioactif des différents verres, les cinétiques d'évolution du rapport Ca/P ont été modélisées à partir d'une loi exponentielle de type :

$$R_{Ca/P} = A \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + R_{lim}$$

où $R_{Ca/P}$ est la valeur du rapport atomique Ca/P à l'interface verre bioactif/milieu biologique au bout d'une durée t d'interaction.

τ est la constante de décroissance.

R_{lim} est la valeur asymptotique du rapport atomique Ca/P.

A est l'amplitude du rapport atomique Ca/P.

La Figure 10-4 présente quelques exemples d'ajustement de cette loi avec les mesures réalisées sur des échantillons de pastilles et de grains de verre. L'ajustement, basé sur la méthode des moindres carrés, a été réalisé de manière itérative au moyen du logiciel OriginLab. Les barres d'erreurs calculées sont fonction de la valeur minimum finalement établie pour le paramètre χ^2 , qui représente la somme quadratique des déviations des mesures expérimentales du rapport Ca/P vis-à-vis des valeurs prédites théoriquement par la loi exponentielle.

Les Tableaux 10-1 et 10-2 présentent le comportement aux limites de la loi exponentielle pour chacun des échantillons.

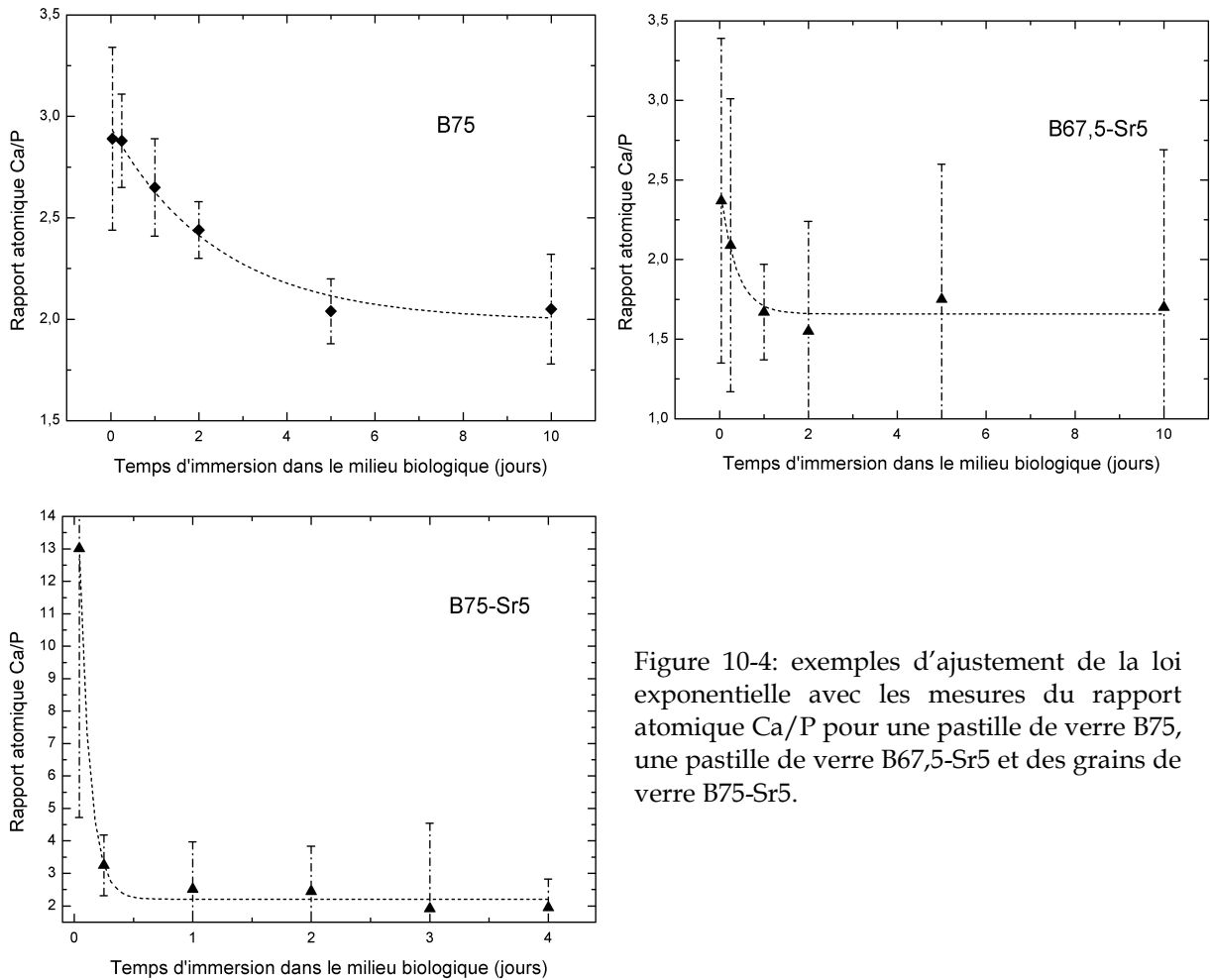


Figure 10-4: exemples d'ajustement de la loi exponentielle avec les mesures du rapport atomique Ca/P pour une pastille de verre B75, une pastille de verre B67,5-Sr5 et des grains de verre B75-Sr5.

	$R_{Ca/P} = A \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + R_{lim}$		Ca/P expérimental	
	Valeur initiale (t = 1 heure)	Limite asymptotique (t = ∞)	Valeur initiale (t = 1 heure)	Valeur finale (t = 10 jours)
B75	2,95 ± 0,14	1,99 ± 0,07	2,89 ± 0,45	2,05 ± 0,27
B72,5	2,84 ± 0,37	1,85 ± 0,16	2,62 ± 0,31	1,85 ± 0,13
B70	2,82 ± 0,50	1,70 ± 0,21	2,55 ± 0,18	1,75 ± 0,17
B67,5	2,70 ± 0,35	1,96 ± 0,15	2,65 ± 1,04	1,89 ± 0,10
B75-Sr1	8,51 ± 0,30	1,81 ± 0,08	7,56 ± 2,71	1,76 ± 0,90
B75-Sr5	7,87 ± 3,06	1,55 ± 1,11	6,26 ± 11,8	1,77 ± 0,47
B67,5-Sr1	2,43 ± 0,75	1,70 ± 0,29	2,11 ± 0,89	1,64 ± 0,19
B67,5-Sr5	2,47 ± 0,18	1,66 ± 0,05	2,37 ± 1,02	1,70 ± 0,99

Tableau 10-1: valeurs initiale, finale et limite asymptotique du rapport atomique Ca/P pour les pastilles de verre.

	$R_{Ca/P} = A \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + R_{lim}$				Ca/P expérimental			
	Valeur initiale		Limite asymptotique ($t=\infty$)		Valeur initiale		Valeur finale	
B75	9,67	$\pm 1,08$	2,47	$\pm 0,30$	7,23	$\pm 0,56$	2,51	$\pm 0,17$
B67,5	4,43	$\pm 0,87$	1,90	$\pm 0,25$	4,43	$\pm 0,16$	1,64	$\pm 2,21$
B75-Sr5	13,05	$\pm 7,94$	2,05	$\pm 1,10$	13,01	$\pm 8,29$	1,95	$\pm 0,87$
B67,5-Sr5	4,85	$\pm 0,97$	1,85	$\pm 0,28$	4,86	$\pm 0,88$	1,64	$\pm 2,23$

Tableau 10-2: valeurs initiale, finale et limite asymptotique du rapport atomique Ca/P pour les grains de verre. La valeur initiale correspond à la valeur du rapport Ca/P après 1 heure d'interaction avec le milieu biologique pour les verres B67,5, B75-Sr5 et B67,5-Sr5, et après 15 minutes d'interaction pour le verre B75. La valeur finale expérimentale est celle obtenue au bout de 4 jours d'interaction pour les verres B67,5, B75-Sr5 et B67,5-Sr5, et après 6 heures d'interaction pour le verre B75.

L'intérêt de cette modélisation mathématique réside en la détermination du paramètre τ : la connaissance de cette constante de temps permet d'évaluer la rapidité avec laquelle la couche de phosphate de calcium évolue vers une phase apatitique. La Figure 10-5 indique les valeurs du paramètre de décroissance τ pour les pastilles de verres binaires et ternaires en fonction de leur teneur en phosphore. Il est visible que le paramètre τ pour les verres de type $SiO_2-CaO-P_2O_5$ est presque deux fois inférieur à celui du verre binaire SiO_2-CaO . À la surface des verres contenant du phosphore, la couche de phosphate de calcium tend donc plus rapidement vers une phase de type apatitique. La Figure 10-6 représente l'évolution de τ en fonction du dopage en strontium de la matrice vitreuse. Pour les verres de composition $SiO_2-CaO-SrO$ et $SiO_2-CaO-P_2O_5-SrO$, la valeur de la constante de temps est considérablement abaissée en comparaison des verres non dopés en strontium. À cette cinétique d'évolution plus vélocité s'ajoute le fait que la valeur du rapport Ca/P finalement atteinte pour les verres dopés en strontium est plus proche de celle de l'hydroxyapatite (cf. partie IV).

Le paramètre τ a également été estimé pour chacun des échantillons de poudre (Figure 10-7). Les valeurs de τ s'avèrent être inférieures à celles des pastilles : les grains de verre, de taille réduite et de structure poreuse, voient leur surface évoluer plus rapidement que celle des pastilles, de structure massive et compacte. Mais contrairement à ce qui est observé pour les pastilles, le verre binaire B75 semble réagir plus rapidement que son équivalent dopé en strontium, le verre B75-Sr5. Il est toutefois délicat d'établir des comparaisons avec l'échantillon B75, car le rapport Ca/P en surface du verre B75 ne décroît que lors des 6 premières heures ; il augmente brusquement ensuite, à cause de la dissolution des phosphates de calcium précédemment formés. En conséquence, la modélisation mathématique ne peut être opérée que jusqu'au temps $t = 6$ heures pour cet échantillon. Le rapport Ca/P alors atteint est égal à 2,5, ce qui est considérablement éloigné de la valeur de l'hydroxyapatite. Au contraire, pour le verre B75-Sr5 la couche phosphocalcique qui se développe est stable même après 4 jours d'interaction, et le rapport Ca/P atteint est plus bas : il est égal à 2,0. Concernant les verres contenant du phosphore, il n'est pas observé de différences significatives entre les verres B67,5 et B67,5-Sr5. Les valeurs des constantes de temps et des rapports Ca/P finalement atteintes sont comparables pour ces deux échantillons. L'influence du strontium sur la cinétique d'évolution de l'interface verre/liquide n'est donc pas évidente sur les échantillons de grains de poudre. Mais à partir des hypothèses établies précédemment suite à l'analyse micro-Pixe, on peut conjecturer qu'à la surface des grains de verres dopés en strontium, la couche de phosphate de calcium se forme sur une profondeur plus réduite en comparaison des verres non dopés, et sur une épaisseur inférieure à la résolution limite de $1 \mu m$ de la microsonde. Dès lors, l'évaluation du rapport atomique Ca/P pourrait être faussée, résultant en une surestimation.

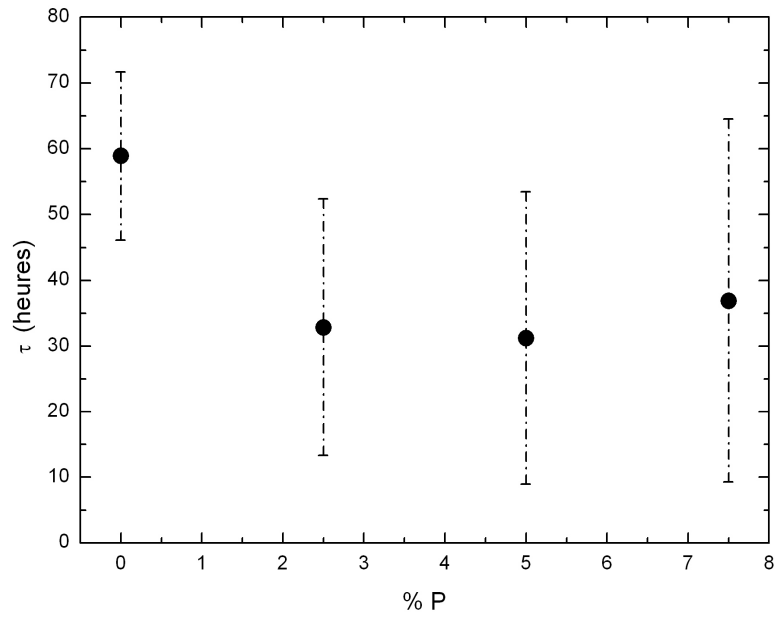


Figure 10-5: évolution du paramètre τ en fonction de la teneur en phosphore dans les pastilles de verre bioactif.

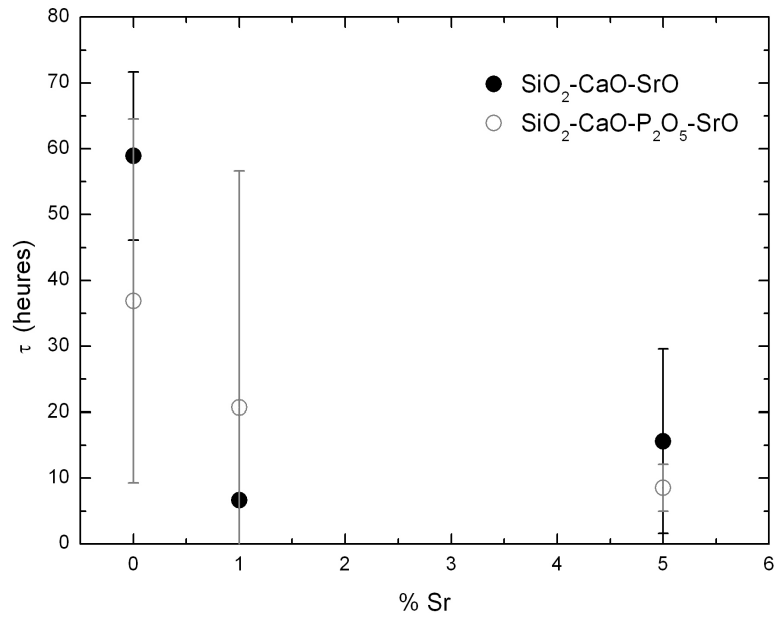


Figure 10-6: évolution du paramètre τ en fonction de la teneur en strontium dans les pastilles de verre bioactif. Les verres B75, B75-Sr1 et B75-Sr5 sont représentés en noir et les verres B67,5, B67,5-Sr1 et B67,5-Sr5 en gris.

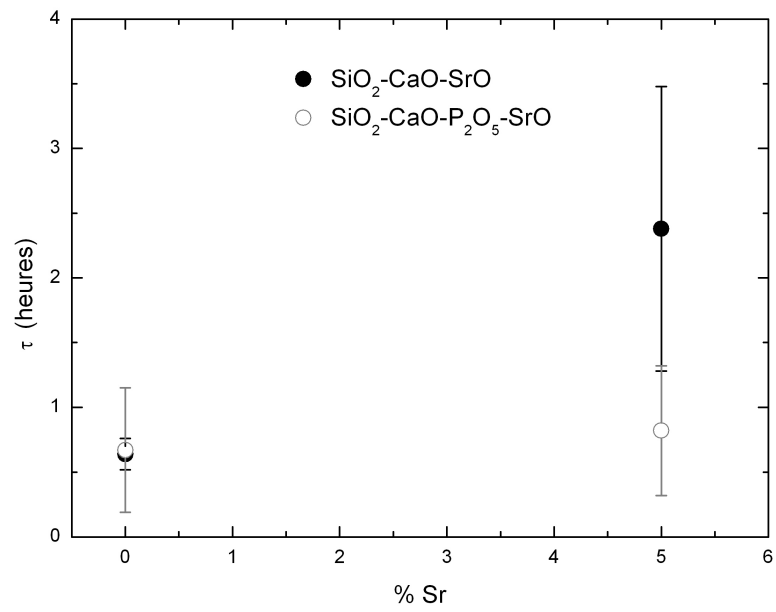


Figure 10-7: évolution du paramètre τ en fonction de la teneur en strontium dans les grains de verre bioactif. Les verres B75 et B75-Sr5 sont représentés en noir et les verres B67,5 et B67,5-Sr5 en gris.

Chapitre 11

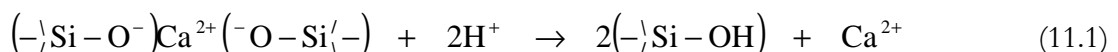
Bilan des interactions verres bioactifs/milieu biologique

Les cartographies multiélémentaires révèlent que tous les échantillons de verre élaborés sont bioactifs. Une fois immergé dans le milieu biologique, ils sont à même d'induire le développement d'une couche riche en calcium et en phosphore et contenant des traces de magnésium (et de strontium pour les verres contenant ce dernier) à leur surface. Sur la base des observations précédemment exposées, il est proposé dans ce chapitre de réaliser tout d'abord une synthèse du mécanisme général de bioactivité. Une somme d'informations a été collectée à propos des échanges ioniques ayant lieu à l'interface verre bioactif/milieu biologique, à propos de la formation de la couche de phosphate de calcium et de son évolution ; nous nous attacherons dans un second temps à dégager les arguments permettant de conclure sur l'influence de la composition des verres binaires, ternaires et dopés en strontium sur le processus de bioactivité.

11.1 Réactions physico-chimiques à l'interface verre bioactif/milieu biologique

Les réactions physico-chimiques du processus bioactif consistent en un mécanisme commun à tous les verres élaborés ; cependant la composition et la texture des matériaux influent grandement sur la cinétique et l'ampleur des phénomènes. La Figure 11-1 représente de façon schématique les principales étapes associées aux réactions du processus de bioactivité, telles qu'elles ont pu être identifiées lors de la caractérisation micro-PIXE de l'interface verre/milieu biologique. Les particularités inhérentes à chaque verre ne seront pas détaillées ici mais dans les paragraphes 11.2, 11.3 et 11.4.

Ainsi que nous l'avons décrit au chapitre 2, la première étape du processus bioactif est le relargage des ions modificateurs de réseau présents dans la matrice vitreuse. Cette étape est communément appelée désalcalinisation de la surface car elle affecte les cations alcalins et alcalino-terreux faiblement liés à la matrice du verre. Ceux-ci sont échangés avec les ions H^+ issus du fluide biologique [129] :



La réaction 11.1 est déplacée vers la droite pour les solutions de pH peu élevé, ce qui est le cas du milieu biologique dont le pH mesuré est égal à 7,4 à 37°C. À un tel pH les échanges ioniques sont ainsi favorisés et intensifs. Les mesures de la composition du milieu révèlent en effet une hausse de la concentration en calcium lors des premières heures. Les mesures micro-PIXE montrent en parallèle une diminution sensible de la concentration en

calcium à la périphérie des matériaux lors des premiers délais d'interaction. La deuxième étape correspond à l'hydrolyse du verre bioactif sous l'action des fluides biologiques : le réseau silicate se rompt en surface du matériau. Conséquemment, des groupements solubles $\text{Si}(\text{OH})_4$ sont relargués dans le milieu. Ceci est attesté d'une part par l'augmentation de la concentration en silicium dans le milieu biologique avec le temps d'interaction, et d'autre part par la diminution de la quantité de silicium présente en périphérie des matériaux. Ces deux réactions constituent l'amorce du processus de bioactivité. Avec le temps elles progressent de la surface jusque vers le centre des matériaux.

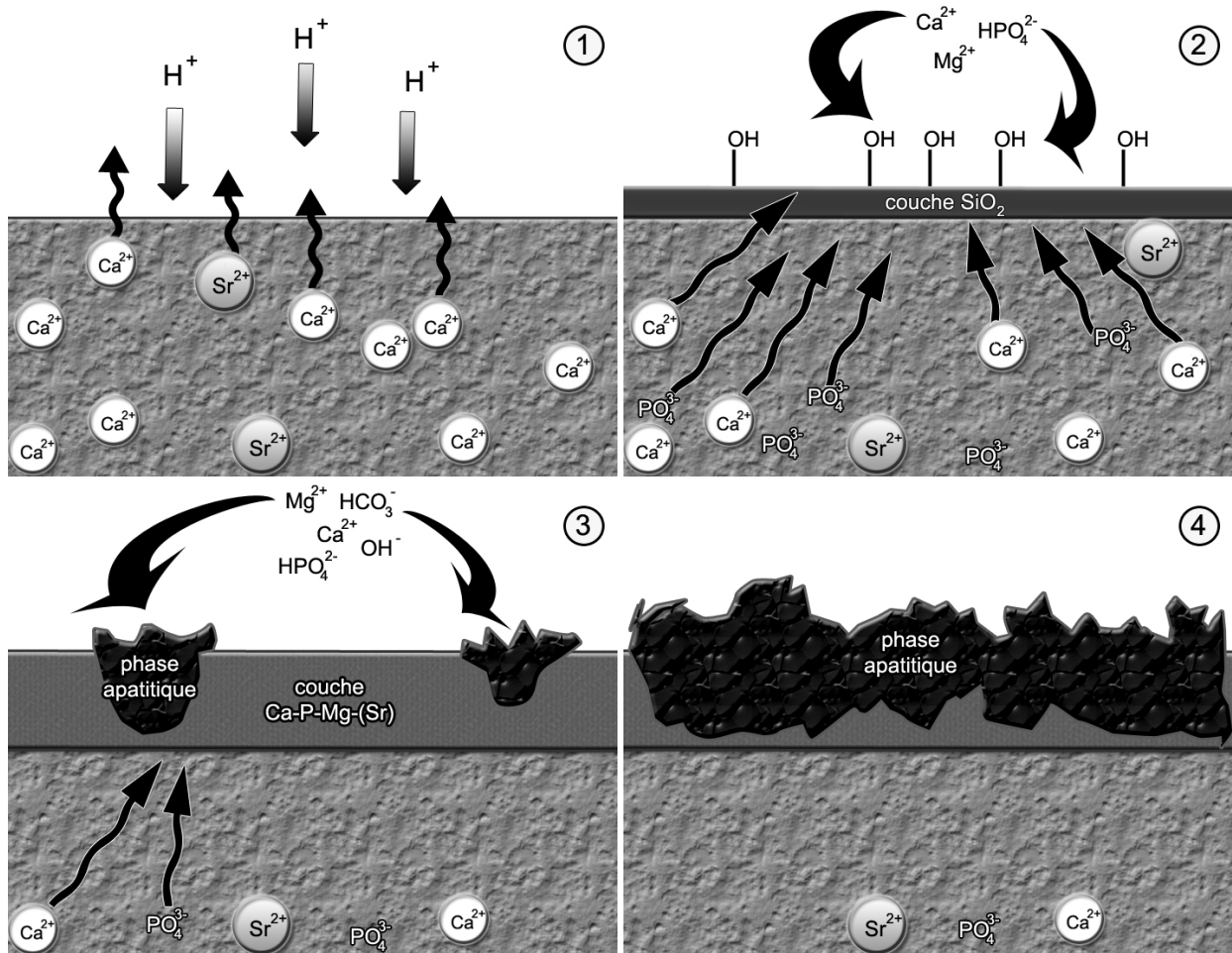
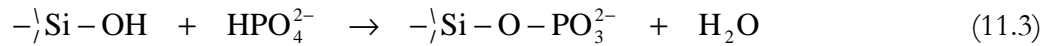
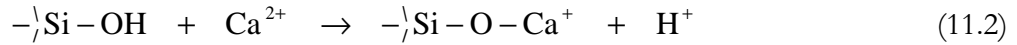


Figure 11-1: description schématique des principales étapes du processus de bioactivité, 1) désalcalinisation de la surface du verre, 2) diffusion des ions à travers le gel de silice nouvellement formé, 3) formation d'une couche Ca-P-Mg initialement amorphe et de sites de nucléation apatitique, 4) croissance de la phase apatitique.

Presque instantanément, les groupements silanols formés en surface des verres à la suite de l'hydrolyse du réseau vitreux se repolymérisent entre eux, aboutissant en la formation d'une couche de gel hydraté riche en silicium. L'épaisseur de cette couche mince, estimée à quelques dizaines de nanomètres [130], est malheureusement inférieure à la taille du micro-faisceau utilisé en PIXE et n'est donc pas directement observable en analyse par faisceau d'ions. On remarque néanmoins sur les cartographies multiélémentaires que le réseau silicate conserve son intégrité lors des premiers temps d'interaction et cet élément y apparaît encore uniformément distribué. Caractérisée par une importante surface spécifique [131], la couche hydratée enrichie en silice est propice à l'attraction des ions et molécules qui vont nourrir la

croissance rapide de précipités amorphes de phosphore et de calcium. Le développement de cette couche Ca-P est alimenté d'une part par les ions calcium et phosphates prélevés du milieu biologique, et d'autre part par le calcium et le phosphore de la matrice vitreuse qui migrent vers la périphérie du matériau. En surface du verre, les groupes Si-OH du gel de silice peuvent servir de sites d'accueil et permettre le lien chimique avec les ions calcium et hydrogénophosphates selon [132] :



Les ions calcium et phosphate se lient préférentiellement entre eux : c'est ainsi que s'opère l'essor de la couche Ca-P, résultant en l'accroissement de la concentration en calcium et en phosphore à la périphérie des matériaux. Des traces de magnésium, prélevées du milieu biologique, peuvent se lier à la surface des verres suivant un mécanisme analogue au calcium, et peuvent donc être incluses dans la couche périphérique. Une fois la couche phosphocalcique formée et ancrée à la surface des verres, la couche de gel de silice disparaît totalement [131] et le réseau vitreux est dépolymérisé sur une profondeur de plus en plus importante. C'est ce qui est observé sur les images chimiques micro-PIXE après 1 jour d'interaction. À mesure que le temps d'interaction se prolonge, la couche de phosphate de calcium initialement amorphe cristallise en une couche apatitique par incorporation d'ions OH⁻, CO₃²⁻ et Mg²⁺ issus de la solution. La décroissance du rapport atomique Ca/P à l'interface verre/ milieu biologique tend après plusieurs jours d'interaction vers une valeur proche de l'hydroxyapatite stoechiométrique. Il est remarqué que les teneurs en calcium, phosphore et magnésium de la couche périphérique des matériaux sont après plusieurs jours d'interaction voisines des valeurs typiques de l'os (Tableau 11-1).

Composition	Os humain	Hydroxyapatite
Calcium	34,8	39,6
Phosphore	15,2	17,8
Magnésium	0,72	–
Sodium	0,9	–
Potassium	0,03	–
Carbonate	7,4	–
Fluor	0,03	–
Chlore	0,13	–
Rapport atomique Ca/P	1,71	1,67

Tableau 11-1: composition typique en pourcentages massiques et rapport atomique Ca/P de la phase inorganique d'un os cortical adulte et de l'hydroxyapatite stoechiométrique, d'après [133, 134].

11.2 Le verre binaire SiO₂-CaO

Le verre B75 réagit plus rapidement que les autres matériaux en ce qui concerne la dissolution de la matrice vitreuse et l'apparition de la couche riche en calcium et en phosphore. L'analyse PIXE révèle que les phénomènes de diffusion du calcium et d'échanges ioniques s'opèrent dès les premiers délais d'interaction. La couche de phosphore et de calcium est alors formée de façon vélocité et apparaît plus tôt que pour les autres verres. Ceci est particulièrement flagrant sur les échantillons de grains de verre, dont la taille réduite leur permet de réagir bien plus rapidement que les pastilles, de structure massive et compacte.

La grande rapidité de dissolution du verre binaire $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ est due tout d'abord à l'importante quantité de calcium initialement présente dans la matrice vitreuse. Cet alcalino-terreux est très soluble au contact d'un milieu aqueux. D'autre part, le verre B75 est l'échantillon contenant la plus importante quantité de silicium : l'oxyde SiO_2 représente 75 % de la matrice vitreuse. Plus la concentration en silicium est élevée, plus le gel de silice hydraté qui se forme en surface du verre est épais ; or nous l'avons vu, ce gel de silice est très poreux et offre une grande surface de contact, ce qui accélère considérablement le processus de dissolution. Les mesures de la composition du milieu biologique attestent de l'ampleur du phénomène de dissolution pour le verre B75 : après quelques heures d'interaction, l'échantillon B75 s'avère être celui ayant relargué le plus de calcium dans le milieu.

Si la couche de phosphate de calcium est rapidement formée, il est toutefois observé que le rapport atomique Ca/P à l'interface verre/milieu biologique décroît plus lentement que pour les autres matériaux. La couche Ca-P-Mg formée en surface du verre B75 éprouve de plus grandes difficultés à évoluer vers une phase apatitique. Le rapport Ca/P minimal mesuré est égal à 2,1 pour les pastilles de B75 après 10 jours d'interaction et vaut 2,5 pour les grains de poudre après 6 heures d'immersion. Ces valeurs sont relativement éloignées des valeurs de l'hydroxyapatite stoechiométrique. La transformation de la couche phosphocalcique en apatite s'opère de façon progressive et implique la formation de phases métastables de phosphates de calcium. Par conséquent, ces valeurs élevées signalent qu'une importante quantité de phosphates de calcium non changés en apatite perdure. Ceci est confirmé par la dissolution rapide de la couche Ca-P observée sur les grains de poudre. La dissolution des phosphates de calcium engendre alors la hausse de la concentration en calcium constatée dans le milieu biologique pour les temps d'interaction les plus longs.

Une des raisons expliquant l'aptitude diminuée de ce verre à former une couche apatitique est que, dans la mesure où le phosphore nécessaire à la croissance de la couche Ca-P est initialement absent de la matrice du verre B75, cet échantillon ne dispose que d'un réservoir en calcium à la différence des verres ternaires qui bénéficient d'un réservoir en éléments calcium et phosphore. Par conséquent, le processus de bioactivité à la périphérie du verre B75 nécessite de prélever d'importantes quantités de phosphore du milieu biologique, qui en contient peu (aux alentours de 30 ppm), ce qui rend la croissance d'une couche apatitique plus difficile. De plus, un autre fait à considérer est que la transformation des phosphates de calcium en apatite s'effectue sur des sites particuliers de nucléation, donnant lieu à la formation de petits cristaux d'apatite de taille typiquement comprise entre 200 et 600 nm [135, 136]. Or les calculs de concentration à l'interface ont été effectués en définissant des masques de mesure de taille équivalente à celle du faisceau : de l'ordre du micron, soit la résolution limite de la microsonde nucléaire actuelle. Dès lors, la mesure du rapport Ca/P est perturbée par la présence de phosphates de calcium non changés en apatite subsistant localement entre des régions apatitiques [137]. Ce problème pourrait être résolu prochainement grâce à l'utilisation d'un faisceau de particules d'une taille de 100 nm.

D'autre part, une fois la dissolution du verre entamée, les analyses de la composition du milieu biologique signalent que le milieu biologique est peu à peu saturé en silicium. Après quelques jours d'interaction, la concentration de silicium atteint une valeur d'équilibre de l'ordre de 50 ppm pour les poudres à 60 ppm pour les pastilles. Or, à mesure que la quantité de silicium relarguée dans le milieu biologique augmente, le gel de silice hydraté et poreux peut subir un réarrangement résultant de l'équilibre dynamique de dissolution-recondensation : les pores deviennent plus larges et la porosité est en partie occluse. La couche de gel devient alors protectrice ; ce réarrangement peut gêner l'extraction des ions de la

matrice à travers la couche de gel, jusqu'à ce que celle-ci soit totalement dépolymérisée [138]. L'ensemble de ces phénomènes explique que, malgré la rapidité avec laquelle est formée la couche de phosphate de calcium, la bioactivité *in vitro* affichée par le verre B75 soit moindre comparativement aux autres matériaux.

11.3 Influence du phosphore sur le processus de bioactivité : les verres ternaires $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$

Le relargage des ions calcium de la matrice vitreuse et la formation de la couche de phosphate de calcium qui s'ensuit sont indéniablement retardés pour les verres de composition $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ comparativement au verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$. Ces remarques sont fondées sur plusieurs constatations. Tout d'abord, de plus fortes concentrations de calcium sont détectées à la périphérie des verres ternaires lors des premiers temps d'interaction ; cet élément est donc relargué en plus faibles proportions en surface des verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$. Confirmant cela, l'analyse de la composition du milieu biologique révèle que de plus faibles quantités de calcium sont décelées pour les verres ternaires lors des premières heures d'interaction. Néanmoins, une fois la formation de la couche de phosphate de calcium amorcée, on observe que celle-ci se développe plus rapidement en une couche de type apatitique pour les verres contenant du phosphore que pour le verre binaire, et cela sur une plus grande étendue. Ceci est indiqué par les plus grandes quantités de phosphore et de calcium prélevées du milieu biologique pour les verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, par une évolution plus rapide de l'état de saturation de la solution vis-à-vis du minéral apatitique, ainsi que par la rapide décroissance du rapport Ca/P, proche de la valeur nominale de l'hydroxyapatite stoechiométrique après quelques jours. Une fois formée, la couche Ca-P-Mg ralentit fortement la diffusion du phosphore, c'est pourquoi il n'est pas noté de relargage de cet élément dans le milieu.

Ces observations peuvent être attribuées à la plus faible teneur en silicium des verres ternaires en comparaison du verre binaire ; la couche de gel de silice hydratée, qui se forme en surface des verres lors de la troisième étape du processus bioactif, sera ainsi d'autant plus fine, ne permettant pas de bénéficier d'une dissolution aussi accélérée que pour le verre B75. En revanche, une fois la formation de la couche de phosphate de calcium initiée, sa croissance et son évolution sont plus rapides pour les verres ternaires car jouissant de meilleures conditions de développement : en effet, le phosphore étant déjà présent en surface des verres, le rapport Ca/P décroît d'autant plus rapidement et les phosphates de calcium évoluent vite en hydroxyapatite. D'abord limitée à quelques sites épars, la couche apatitique se déploie ensuite rapidement car les phosphates de calcium déjà transformés en apatite jouent le rôle d'agents de nucléation, augmentant la cinétique de formation de la nouvelle couche [139]. Ainsi, les rapports Ca/P sont proches de 1,7 malgré des mesures localisées sur des zones d'épaisseur de l'ordre du micron, ce qui tend à indiquer que les cristaux d'apatite formés sont plus larges et affectent une étendue et une profondeur de la surface du verre plus importantes en comparaison du verre B75 [140]. Ceci est confirmé par l'analyse PIXE des grains de verre B67,5 : après quelques jours ceux-ci sont changés dans leur quasi-intégralité en précipités de phosphate de calcium plus stables que ceux formés sur les grains de verre B75, puisque non dissous. Or à pH physiologique, l'hydroxyapatite est le minéral le moins soluble de tous les phosphates de calcium et est l'espèce la plus stable d'un point de vue thermodynamique [141].

Enfin, il est observé que le rapport Ca/Mg est plus faible pour les verres contenant du phosphore. Il semble qu'il existe un lien entre un faible rapport Ca/P et un faible rapport

Ca/Mg. La formation de la couche phosphocalcique étant plus étendue pour les verres ternaires, de plus nombreuses substitutions entre le magnésium issu du milieu et le calcium de la couche Ca-P sont possibles, résultant en un rapport Ca/Mg plus faible pour les verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ comparativement au verre B75. La présence de quantités de magnésium à l'interface verre/milieu biologique est une information d'importance dans la mesure où l'on reconnaît au Mg des propriétés bactéricides et anti-inflammatoires [142, 143, 144, 145].

11.4 Influence du dopage en strontium sur le processus de bioactivité : les verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$

Si l'ajout de strontium ne modifie pas le comportement global des verres — les échantillons sans phosphore adoptant un comportement analogue au verre B75 et les verres contenant du phosphore adoptant un comportement semblable au verre B67,5 — néanmoins la capacité de dissolution des verres dopés en strontium est diminuée ; la couche Ca-P se forme sur une profondeur moindre, mais les rapports Ca/P et Ca/Mg indiquent que la couche phosphocalcique tend plus rapidement vers une phase apatitique dans laquelle sont présentes des quantités de magnésium plus élevées.

La dissolution est donc restreinte. Une illustration de ceci est que le relargage du calcium hors de la surface des verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ ne prend des proportions comparables au verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ qu'avec plusieurs heures de retard. Une autre preuve du ralentissement de la dissolution est l'évolution de la composition du milieu biologique : lors des premières heures d'interaction, les verres contenant du strontium relarguent moins de calcium que leurs équivalents non dopés B75 et B67,5. À la périphérie des matériaux contenant du strontium, les concentrations élémentaires affichent des tendances similaires aux verres non dopés ; toutefois les cinétiques d'évolution du calcium et du silicium sont à l'évidence plus lentes pour les verres dopés en strontium. En revanche, on constate pour les échantillons de pastille dopés en strontium que le rapport Ca/P à l'interface tend plus rapidement vers une valeur comparable à l'apatite. La couche phosphocalcique évoluerait donc plus promptement en apatite pour les verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$. C'est la raison pour laquelle la couche Ca-P des grains de verre B75-Sr5 n'est pas dissoute après plusieurs jours, contrairement aux grains de verre B75 : une couche apatitique, endurante à la dissolution, est formée. D'autre part, il apparaît que la phase apatitique se développe sur une profondeur plus étroite : un argument en faveur de cette hypothèse est qu'aux délais d'interaction les plus longs, la périphérie des verres dopés est moins riche en calcium et contient plus de silicium que celle des verres non dopés. La dissolution des verres dopés en strontium étant moindre, le développement de la couche Ca-P a par conséquent lieu sur une profondeur plus restreinte. Ceci est en particulier flagrant sur les échantillons de grains de poudre, dont l'analyse de la périphérie révèle la présence de plus petites quantités de calcium et de phosphore pour les verres B75-Sr5 et B67,5-Sr5, tandis que subsistent encore des quantités importantes de silicium. Dans le cas des grains de verres dopés en strontium, la couche phosphocalcique pourrait ainsi être localisée sur d'étroites zones, de taille inférieure à la limite de résolution de la microsonde, résultant en une mesure erronée du rapport Ca/P.

L'explication de ces phénomènes tient aux caractéristiques des éléments constitutifs des matériaux. Les matrices des verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ contiennent moins de calcium que les verres binaires et ternaires. À la place, ce sont des cations strontium

qui ont été incorporés dans la matrice vitreuse. Si les éléments strontium et calcium appartiennent tous deux à la famille des alcalino-terreux, leurs propriétés physico-chimiques sont différentes (Tableau 11-2).

	Charge Z	Coordinance	Rayon ionique r (Å)	Force du champ ionique Z/r^2 (Å ⁻²)	Électronégativité	Force de simple liaison avec l'oxygène (kJ/mol)
Ca	+2	VI	0,99	2,04	1,04	351
Sr	+2	VI	1,18	1,44	0,99	389

Tableau 11-2: propriétés du calcium et du strontium, d'après [146, 147, 148]. La force de simple liaison avec l'oxygène est mesurée pour une molécule diatomique à 298 K. Les rayons ioniques sont ceux publiés par Shannon [149]. Les valeurs de l'électronégativité sont celles de l'échelle de Allred-Rochow.

Bien que de rayon ionique légèrement supérieur au calcium, le strontium assume un rôle identique dans la matrice vitreuse. En effet, l'un des critères permettant de prédire le rôle d'un oxyde est la force du champ ionique, définie comme la force exercée en un point distant de r d'une charge Z . En particulier, Mc Millan [150] a établi que les cations modificateurs de réseau possèdent une valeur de Z/r^2 inférieure à 5 Å⁻², ce qui est le cas pour le calcium et le strontium. Mais la notion de force de liaison introduite par Sun [151] est également importante. La force de simple liaison avec l'oxygène est exprimée par le rapport de l'énergie de dissociation de l'oxyde sur le nombre de liaisons échangées. Il s'avère que la force de liaison est plus importante pour le strontium ; la capacité de cet élément à être échangé avec les ions H⁺ du milieu est donc réduite par rapport au calcium, et la capacité de dissolution du matériau s'en trouve affectée. Un autre argument allant en ce sens est que l'électronégativité du strontium est inférieure à celle du calcium : l'aptitude du strontium à attirer à lui les électrons de la liaison covalente est donc inférieure à celle du calcium. Dans la matrice vitreuse, la liaison $(-)\text{Si}-\text{O}^- \text{Sr}^{2+}$ est donc plus stable grâce à une répartition des charges électroniques plus équilibrée. Ainsi, pour les verres dopés en strontium, la réduction de la dissolution, associée à un réservoir en calcium moins important, résulte en un déploiement de la couche phosphocalcique sur une profondeur plus limitée.

D'autre part, la couche Ca-P évolue plus rapidement en une couche apatitique pour les verres dopés en strontium. Dès lors, les possibilités de substitutions calcium-magnésium au sein de la couche apatitique nouvellement formée sont rendues possibles plus tôt pour les verres dopés en strontium, expliquant ainsi que de plus grandes quantités de magnésium soit détectées à l'interface verre dopé en strontium/milieu biologique.

En vue d'applications orthopédiques particulières, les preuves de la présence de strontium à l'interface verre/liquide, au sein de la couche Ca-P-Mg nouvellement formée, associées à la diffusion de traces de strontium dans le milieu biologique, pourraient constituer la propriété la plus remarquable des verres SiO₂-CaO-SrO et SiO₂-CaO-P₂O₅-SrO. En effet, après quelques jours d'interaction le rapport atomique Ca/Sr à l'interface verre/liquide est situé dans un intervalle compris entre 20 et 180 suivant la teneur en strontium des échantillons. La quantité de strontium relarguée dans le milieu s'élève quant à elle à quelques ppm. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles mesurées *in vivo* dans les os et plasmas d'animaux témoins soumis à un traitement médicamenteux à base de strontium, pour lequel il a été démontré des effets anti-ostéoporotiques évidents : à savoir, une stimulation de la différenciation ostéoblastique, une promotion de la formation d'os, parallèlement à une diminution de la

résorption osseuse [152, 153, 154]. Ceci pourrait résulter en une bioactivité grandement améliorée pour les verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ dans un milieu vivant, grâce aux effets positifs du strontium sur l'activité cellulaire et sur le cycle de remodelage osseux. Ces hypothèses seront donc mises à l'épreuve d'essais cellulaires et *in vivo* futurs. Par ailleurs, un brevet d'invention, financé par le CNRS, a été déposé pour les verres dopés en strontium [155].

11.5 Autres facteurs influençant la bioactivité

11.5.1 Taille et texture des particules

Les verres bioactifs ont été élaborés sous forme de grains de poudre de tailles inhomogènes. De la taille des grains de verre dépend évidemment la cinétique de dissolution, celle-ci étant plus importante pour les grains les plus petits. Sélectionner la taille des particules de verre permettrait ainsi un contrôle de la cinétique de dissolution du matériau. Cependant, il a été établi que la formation de la couche phosphocalcique doit moins à la taille des grains qu'à la composition de départ du matériau [156]. D'autre part, il semble que pour les verres élaborés par sol-gel, les processus de dissolution et de bioactivité affichent une dépendance plus marquée envers les caractéristiques de mésoporosité des matériaux qu'envers l'étendue de leur surface spécifique et de leur surface de contact avec le milieu [50, 157]. En particulier, la bioactivité des verres élaborés par sol-gel serait d'autant plus importante que la taille des pores et le volume poreux total sont élevés. Dans cette étude, nous avons choisi de mettre en évidence l'influence de la composition des matériaux sur le processus de bioactivité, et nous avons donc délibérément réalisé les synthèses sans fixer de valeur précise pour la porosité ; les verres élaborés présentent ainsi des distributions en porosité très larges. Mais la synthèse de matériaux dont les paramètres de porosité seraient contrôlés permettrait une maîtrise des cinétiques et de l'amplitude des réactions.

11.5.2 Le milieu biologique

Les phénomènes de dissolution et de formation de la couche de phosphate de calcium sont influencés par le choix du milieu biologique dans lequel sont réalisées les interactions matériau/liquide. En l'occurrence nous avons fait usage du DMEM, milieu biologique acellulaire contenant des protéines. Or les protéines sont des espèces chargées qui peuvent être attirées par la surface du verre, qui est elle aussi chargée à la suite des échanges ioniques, et la recouvrir par endroit d'un film protéique [158]. Bien que perméable, cette couche de protéines affecte la dégradation du matériau et peut ralentir les cinétiques de dissolution et de formation de la couche apatitique.

D'autre part, il est important de noter que les essais *in vitro* réalisés ont été conduits sous des conditions dites « statiques » : le milieu biologique n'a pas été remplacé pendant toute la durée des interactions. Ceci implique qu'après quelques jours d'interaction, certaines espèces ioniques (les phosphates en particulier) sont en grande partie consommées tandis que d'autres sont relarguées en quantité, provoquant une saturation de la solution. Évidemment cette situation diffère de celle rencontrée en milieu vivant, où un flux continu de liquides physiologiques assure une dissolution constante du verre bioactif, permettant la formation de couches apatitiques plus épaisses [159]. Enfin, dans le plasma sanguin sont contenus des ions qui ont un effet tampon et qui contribuent à maintenir le pH autour d'une valeur de 7,4 ; or le DMEM ne possède qu'un pouvoir tampon limité en conditions statiques, ce qui affecte la cinétique et l'équilibre des échanges ioniques.

Par conséquent, la cinétique et l'ampleur des réactions physico-chimiques impliquées dans le processus bioactif pourraient être très différentes dans un milieu cellulaire ou bien dans le cadre d'essais *in vivo*. En milieu vivant, le contrôle de la dissolution et du relargage des espèces dans le milieu, en particulier les espèces strontium et silicium, est capital. En vue de promouvoir l'activité cellulaire — notamment la différenciation et l'attachement des cellules — la cinétique et l'amplitude des réactions physico-chimiques doivent être ajustées de manière adéquate. La qualité de la fixation bioactive et la durabilité de l'implant en milieu vivant en dépendent.

Partie VI
Conclusion générale

L'étude des biomatériaux constitue un domaine de recherche actif et en plein essor, brassant les différentes disciplines scientifiques. Physique, chimie et biologie sont fédérées autour d'un projet commun : la mise au point d'une nouvelle génération de biomatériaux, capables de se lier avec les tissus receveurs, de former un lien interfacial fort et d'aider l'organisme à se soigner lui-même grâce à une action directe sur les cellules. Les applications sont considérables, particulièrement en ce qui concerne le comblement de défauts osseux en chirurgies orthopédique et dentaire.

Dans cette optique, nous avons élaboré plusieurs verres bioactifs dans des systèmes de composition binaire $\text{SiO}_2\text{-CaO}$, ternaires $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, et pour la première fois à notre connaissance des verres contenant du strontium $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$. Comme constaté grâce aux mesures de surface spécifique, d'ICP-AES et grâce à l'imagerie en microscopie électronique, l'utilisation du procédé sol-gel comme voie de synthèse des verres bioactifs octroie de nombreux avantages : tout d'abord, une structuration des matériaux à l'échelle du nanomètre associée à une porosité interconnectée, indispensable à une éventuelle vascularisation en milieu vivant. L'obtention de produits de grande pureté et homogénéité, la facilité et la souplesse de mise en œuvre ainsi que les coûts réduits sont d'autres atouts ayant motivé le choix de la synthèse par sol-gel.

L'étape suivante de notre démarche a consisté à réaliser les essais *in vitro* nécessaires à l'évaluation de la bioactivité lors des interactions verre/milieu biologique. Les protocoles expérimentaux développés à cette occasion se sont révélés fructueux : ils ont permis au final la réalisation de coupes transverses fines et ultrafines de nos matériaux, autorisant ainsi l'imagerie chimique à la périphérie des verres.

La bioactivité *in vitro* des verres est avérée : au contact d'un milieu biologique, tous les matériaux élaborés induisent la formation d'une couche Ca-P-Mg sur une profondeur de 10 à 20 micromètres, couche qui se développe progressivement en une phase apatitique analogue au minéral contenu dans les os. Si le phénomène de bioactivité a été étudié intensivement au cours des dernières années, nos travaux se distinguent par l'utilisation des méthodes non conventionnelles que sont les microsondes nucléaires ; leur emploi a permis la collecte d'informations quantitatives d'importance sur la réactivité locale des verres. L'obtention de cartographies chimiques de l'interface verre bioactif/milieu biologique par la méthode PIXE associée à la spectrométrie RBS a rendu possible l'étude des gradients de concentrations en éléments majeurs et traces à l'interface ainsi que l'évaluation des cinétiques et de l'amplitude des réactions physico-chimiques impliquées dans le processus bioactif. Ainsi renseignés sur la réactivité des verres à une échelle locale, nous avons également acquis des données sur la réactivité globale de nos matériaux grâce aux mesures de la composition du milieu biologique par l'ICP-AES. La confrontation de ces deux types d'information a permis d'établir des critères d'évaluation de la bioactivité *in vitro* de nos matériaux et d'en préciser le comportement pour chacun des systèmes de composition.

Si les réactions physico-chimiques du processus de bioactivité consistent en un mécanisme commun à tous les verres, la composition et la texture des matériaux influent grandement sur l'ampleur et la cinétique des phénomènes. Nous avons ainsi mis en évidence que le

verre binaire B75 est le plus prompt à réagir en ce qui concerne la dissolution de la matrice vitreuse et l'apparition de la couche riche en phosphore et en calcium. Les échanges ioniques s'opèrent en surface dès les premiers instants et la couche Ca-P-Mg est formée de façon vélocité. Il est toutefois observé, à travers la plus lente décroissance du rapport Ca/P à l'interface verre/milieu biologique, que la couche Ca-P-Mg éprouve de plus grandes difficultés à évoluer vers une phase apatitique, difficultés qui peuvent être justifiées en partie par le fait que la matrice du verre B75 ne dispose que d'un réservoir en élément calcium. Pour les verres contenant du phosphore, la désalcalinisation de la matrice et la formation de la couche de phosphate de calcium qui s'ensuit sont retardées ; nous avons cependant constaté, grâce au calcul du rapport Ca/P à l'interface et au suivi de l'état de saturation du milieu biologique, que la couche Ca-P-Mg se développe plus rapidement en une couche de type apatitique. Le fait que les phosphates de calcium précocement changés en apatite jouent le rôle d'agents de nucléation permettrait d'expliquer le développement plus rapide et plus étendu de la phase apatitique pour les verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$. Concernant les verres dopés en strontium, nous avons démontré que leur capacité de dissolution est amoindrie et que la couche Ca-P-Mg résultante se forme sur une profondeur plus réduite en comparaison des autres matériaux. Néanmoins, la couche évolue plus promptement en apatite d'après la rapide décroissance du rapport atomique Ca/P. Nous avons également obtenu des preuves de la présence de strontium à l'interface verre/liquide et de la diffusion de cet élément dans le milieu biologique sous forme de traces. Connaissant les effets bénéfiques du strontium sur l'activité cellulaire et sur le cycle de remodelage osseux, ces observations sont dignes d'être remarquées, car elles pourraient résulter en une bioactivité grandement améliorée pour les verres $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ au contact d'un milieu vivant.

Perspectives

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de cette thèse se situent en amont de la chaîne d'étude des biomatériaux : il se sont étendus de la conception de verres bioactifs jusqu'à leur étude *in vitro* dans un milieu acellulaire. Les résultats obtenus dégagent, outre les perspectives conséquentes au brevet déposé sur les verres dopés en strontium, de nombreuses autres voies d'investigation.

En premier lieu, la mise en place imminente (premier trimestre 2008) de la ligne nanofaisceau au CENBG aura comme conséquence directe une nette amélioration de la résolution spatiale en analyse par faisceau d'ions. La taille de la sonde escomptée est de l'ordre de 100 nm : la caractérisation de l'interface verre/milieu biologique n'en sera que plus finement résolue (gain d'un facteur 10). Ceci pourrait rendre possible l'observation de phases et de couches fines à la périphérie des verres bioactifs, actuellement non décelables avec le microfaisceau.

D'autre part, il paraît indispensable d'étudier les verres élaborés dans un milieu cellulaire. Nous l'avons vu, les produits issus de la dissolution de la matrice vitreuse (tout particulièrement les éléments strontium et silicium) peuvent induire une promotion de l'activité cellulaire. Le rôle et l'importance biologique de ces espèces se doivent donc d'être précisés. À ce titre, le dosage en milieu cellulaire de marqueurs tels que la phosphatase alcaline permettrait de rendre compte de la différenciation ostéoblastique. Les études cellulaires sont actuellement en cours de réalisation au Laboratoire de Biologie Orofaciale et Pathologie de l'université de Paris VII (INSERM UMRS 872), dans le cadre de notre collaboration liée au projet « BIO-VERRES », financé par le programme National en Nanosciences et Nanotechnologies de l'ANR jusqu'en 2009.

En complément, la caractérisation de l'interface verre bioactif/cellules osseuses par des méthodes d'analyse par faisceau d'ions permettrait l'étude des gradients de concentrations élémentaires aussi bien à l'interface qu'au sein même des organismes cellulaires. Notre équipe de recherche s'est récemment dotée d'un dispositif de cryofixation (« metal mirror ») qui va permettre la cryopréparation des cultures cellulaires et l'étude des ions diffusibles intracellulaires dans des cellules proches de l'état physiologique. Les techniques PIXE-STIM sont alors tout indiquées pour l'analyse. Le gain en résolution octroyé par la ligne nanofaisceau autorisera l'étude de la distribution des ions intracellulaires à l'échelle des organites cellulaires. De plus, l'excellente sensibilité de la méthode PIXE permettra notamment la détection du calcium intracellulaire, ce qui est actuellement impossible en cryo-microscopie électronique (sauf l'étude des stocks calciques qui est réalisable en EELS). L'étude du calcium intracellulaire pourra fournir des informations sur les phénomènes de minéralisation lors des interactions ostéoblastes/verres bioactifs et ostéoblastes/produits de dissolution. Une étude *in vivo* est également souhaitable pour les verres dont le comportement bioactif est le plus prometteur. Ces études seraient d'autant plus facilitées que la synthèse des verres bioactifs par le procédé sol-gel permet le revêtement sur prothèse métallique par des techniques de spin-coating ou de dip-coating.

En milieu vivant, les cinétiques de dissolution et d'échanges ioniques doivent impérativement être maîtrisées, sous peine de mort cellulaire. Il a ainsi été démontré que le relargage du silicium doit se faire dans un intervalle de temps et de concentration bien spécifique si l'on veut promouvoir l'expression des facteurs de croissance et/ou l'activation des gènes qui stimulent la différenciation des ostéoblastes. Le contrôle des cinétiques de réaction peut s'établir d'une part par un ajustement optimal de la composition du matériau, d'autre part par une maîtrise des paramètres de porosité et de texture du matériau. Dans ce cas, la synthèse des verres par le procédé sol-gel permet, en agissant sur le vieillissement et le traitement thermique du matériau à l'état de gel, d'élaborer des verres à porosité rigoureusement contrôlée. Une autre perspective attrayante est l'élaboration de matériau à porosité structurellement ordonnée et hiérarchisée : les méthodes de structuration à effet d'empreintes rendent désormais possible la synthèse de verres possédant un réseau de pores ordonnés et interconnectés à différentes échelles, dont l'agencement structural pourrait faciliter l'attachement cellulaire. Enfin, la synthèse de verres bioactifs sous forme monolithique est également envisageable ; elle permettrait de supplanter l'étude des matériaux à l'état de pastilles de poudre agglomérée.

Une dernière perspective attractive est la conception de matériaux capables de délivrer des doses contrôlées de substances agissant positivement sur les cellules osseuses. Si la synthèse de verres bioactifs contenant du silicium et dopés en strontium s'inscrit d'ores et déjà dans cette optique, d'autres voies d'exploration sont également à considérer ; en particulier, l'encapsulation au sein de matériaux poreux de facteurs de croissance à propriétés ostéoinductives, tels que les BMP (Bone Morphogenic Proteins). Terminons en faisant valoir que d'autres éléments présents dans l'os sous forme de traces, tels le zinc, le manganèse et le magnésium, sont à envisager en tant que dopants dans la matrice vitreuse, du fait de leurs propriétés biologiques et physico-chimiques.

Bibliographie

- [1] D.F. Williams
Definitions in biomaterials
2nd Consensus Meeting, Eur. Soc. Biomat., Chester, UK, September 1991, Ed. Elsevier.
- [2] J.L. Pariente, L. Bordenave, P. Confort
Biomatériaux, biomatériels et biocompatibilité
Progrès en urologie, 15 : 887-890, 2005.
- [3] A. Fénina, Y. Geoffroy, C. Minc, T. Renaud, E. Sarlon, C. Sermet
Les dépenses de prévention et les dépenses de soins par pathologie en France
Bulletin d'information en économie de la santé, 111, 2006.
- [4] S.V. Dorozhkin, M. Epple
Biological and medical significance of calcium phosphates
Angew. Chem. Int. Ed., 41 : 3130-3146, 2002.
- [5] I. Couret
Biologie du remodelage osseux
Médecine nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique, 28 : 57-65, 2004.
- [6] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi, A. Barroug
Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: implications for biominerals and biomaterials
Mater. Sci. Eng. C, 27 : 198-205, 2007.
- [7] G. Montel, G. Bonel, J.C. Heughebaert, J.C. Trombe, C. Rey
New concepts in the composition, crystallization and growth of the mineral component of calcified tissues
J. Cryst. Growth, 53 (1) : 74-99, 1981.
- [8] S. Mann
Molecular recognition in biomineralization
Nature, 232 : 119-124, 1988.
- [9] C. Rey, M. Shimizu, B. Collins, M.J. Glimcher
Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium-phosphate in bone and enamel, and their evolution with age. I: Investigations in the ν_4 PO₄ domain
Calcif. Tissue Int., 46 (6) : 384-394, 1990.

- [10] L.M. Miller, V. Vairavamurthy, M.R. Chance, R. Mendelsohn, E.P. Paschalis, F. Betts, A.L. Boskey
In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the ν_4 PO_4^{3-}
Biochim. Biophys. Act., 1527 : 11-19, 2001.
- [11] C. Rey, V. Renugopalakrishnan, B. Collins, M.J. Glimcher
Fourier transform infrared spectroscopic study of the carbonate ions in bone mineral during aging
Calcif. Tissue Int., 49 (4) : 251-258, 1991.
- [12] C. Rey, J.L. Miquel, L. Facchini, A.P. Legrand, M.J. Glimcher
Hydroxyl groups in bone mineral
Bone, 16 (5) : 583-586, 1995.
- [13] E. Jallot
Correlation between hydroxyapatite osseointegration and Young's modulus
Med. Eng. Phys., 20 (9) : 697-701, 1998.
- [14] E. Jallot, J.M. Nedelec, A.S. Grimault, E. Chassot, A. Grandjean-Laquerriere, P. Laquerriere, D. Laurent-Maquin
STEM and EDXS characterisation of physico-chemical reactions at the periphery of sol-gel derived Zn-substituted hydroxyapatites during interactions with biological fluids
Colloids Surf. B, 42 (3-4) : 205-210, 2005.
- [15] E. Jallot, J.L. Irigaray, H. Oudadesse, V. Brun, G. Weber, P. Frayssinet
Resorption kinetics of four hydroxyapatite-based ceramics by particle induced X-ray emission and neutron activation analysis
Eur. Phys. J: Appl. Phys., 6 (2) : 205-215, 1999.
- [16] J.R. Jones, L.L. Hench
Biomedical materials for new millennium: perspective on the future
Materials Science and Technology, 17 (8) : 891-900, 2001.
- [17] V. Banchet
Nanocaractérisation par spectroscopie d'émission X et de pertes d'énergie des électrons des réactions physico-chimiques à l'interface verre bioactif/fluides biologiques
Thèse, université de Reims Champagne-Ardenne, 2003.
- [18] L.L. Hench
Bioceramics
J. Am. Ceram. Soc., 81 (7) : 1705-1728, 1998.
- [19] L.L. Hench
Bioactive materials: the potential for tissue regeneration
J. Biomed. Mater. Res., 41 (4) : 511-518, 1998.
- [20] H. Oonishi, L.L. Hench, J. Wilson, F. Sugihara, E. Tsuji, S. Kushitani, H. Iwaki
Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes
J. Biomed. Mater. Res., 44 : 31-43, 1998.
- [21] L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee
Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials
J. Biomed. Mater. Res. Symp., 2 : 117-141, 1971.

- [22] L.L. Hench, H.A. Paschall
Direct chemical bond of bioactive glass ceramic materials to bone and muscle
J. Biomed. Mater. Res. Symp., 7 : 25-42, 1973.
- [23] L.L. Hench
The story of Bioglass®
J. Mater. Sci. Mater. Med., 17 : 967-978, 2006.
- [24] L.L. Hench, H.A. Paschall
Histochemical responses at a biomaterial's interface
J. Biomed. Mater. Res. Symp., 5 : 49-64, 1974.
- [25] M.W. Johnson, S.M. Sullivan, M. Rohrer, M. Collier
Regeneration of peri-implant infrabony defects using PerioGlas: a pilot study in rabbits
Int. J. Oral Maxillofacial Implants, 12 (6) : 835-839, 1997.
- [26] H. Broemer, K. Deutscher, B. Blencke, E. Pfeil, V. Strunz
Properties of the bioactive implant material 'Ceravital'
Science of Ceramics, 9 : 219-225, 1977.
- [27] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka
Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass ceramic A/W
J. Biomed. Mater. Res., 24 : 721-734, 1990.
- [28] T. Kokubo
A/W glass ceramics: processing and properties
In: Introduction to bioceramics, L.L. Hench and J. Wilson editors, World Scientific, 1993.
- [29] L.L. Hench, J.W. Hench, D.C. Greenspan
Bioglass: A short history and bibliography
J. Aust. Ceram. Soc., 40 (1) : 1-42, 2004.
- [30] M. Hamadouche, A. Meunier, D.C. Greenspan, C. Blanchat, J.P. Zhong, G.P. La-Torre, L. Sedel
Long-term in vivo bioactivity and degradability of bulk sol-gel bioactive glasses
J. Biomed. Mater. Res., 54 : 560-566, 2001.
- [31] Y. Barbotteau, J.L. Irigaray, E. Chassot, G. Guibert, E. Jallot,
Properties of two biological glasses used as metallic prosthesis coatings and after an implantation in body
Key. Eng. Mater, 254 : 717-720, 2004.
- [32] Y. Barbotteau, J.L. Irigaray, E. Jallot
Physicochemical characterization of biological glass coatings
Surf. Interface. Anal., 35 (5) : 450-458, 2003.
- [33] D.C. Greenspan, L.L. Hench
Chemical and mechanical behaviour of bioglass coated alumina
J. Biomed. Mater. Res., 10 : 503-509, 1976.

- [34] E. Jallot, H. Benhayoune, L. Kilian, J.L. Irigaray, Y. Barbotteau, G. Balossier, P. Bonhomme
Dissolution kinetics, selective leaching, and interfacial reactions of a bioglass coating enriched in alumina
J. Colloid Interface Sci., 233 (1) : 83-90, 2001.
- [35] E. Jallot, H. Benhayoune, L. Kilian, J.L. Irigaray, G. Balossier, P. Bonhomme
Growth and dissolution of apatite precipitates formed in vivo on the surface of a bioactive glass coating film and its relevance to bioactivity
J. Phys. D Appl. Phys., 33 (21) : 2775-2780, 2000.
- [36] I.D. Xynos, M.V.J. Hukkanen, J.J. Batten; L.D. Buttery; L.L. Hench; J.M. Polak
Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering
Calcif. Tissue Int., 67 : 321-329, 2000.
- [37] J. Wilson, S.B. Low
Bioactive ceramics for periodontal treatment: comparative studies in the Patas monkey
J. Appl. Biomater., 3 (2) : 123-129, 1992.
- [38] C. Loty, J.M. Sautier, M.T. Tan, M. Oboeuf, E. Jallot, H. Boulekbache, D.C. Greenspan, N. Forest
Bioactive glass stimulates in vitro osteoblast differentiation and creates a favorable template for bone tissue formation
J. Bone Miner. Res., 16 : 231-239, 2001.
- [39] I.D. Xynos, J.E. Alasdair; L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak
Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis
Biochem. Biophys. Res. Commun., 276 : 461-465, 2000.
- [40] I. Christodoulou, L.D.K. Buttery, P. Saravanapavan, T. Guangping; L.L. Hench, J.M. Polak
Dose- and time-dependent effect of bioactive gel-glass ionic-dissolution products on human fetal osteoblast-specific gene expression
J. Biomed. Mater. Res., 74B : 529-537, 2005.
- [41] P. Saravanapavan, J.R. Jones, R.S. Pryce, L.L. Hench
Bioactivity of gel-glass powders in the CaO-SiO₂ system: a comparison with ternary (CaO-P₂O₅-SiO₂) and quaternary glasses (SiO₂-CaO-P₂O₅-Na₂O)
J. Biomed. Mater. Res., 66 A : 110-119, 2003.
- [42] K.D. Lobel, J.K. West, L.L. Hench
Molecular orbital model of the diatom frustule: potential for biomimetics
J. Mater. Sci. Lett., 15 (8), 648-650, 1996.
- [43] J.M. Nedelec, L.L. Hench
Effect of basis set and of electronic correlation on ab initio calculations on silica rings
J. Non-Cryst. Sol., 277 : 106-113, 2000.
- [44] L.L. Hench, J.K. West
Biological applications of bioactive glasses
Life Chem. Reports, 13 : 187-241, 1996.

- [45] L.L. Hench, J.M. Polak
Third-generation biomedical materials
Science, 295 : 1014-1017, 2002.
- [46] L.L. Hench, J. Wilson
Introduction to bioceramics
In: Introduction to bioceramics, L.L. Hench and J. Wilson editors, World Scientific, 1993.
- [47] K. Ohura, T. Nakamura, T. Yamamuro, T. Kokubo, Y. Ebisawa, Y. Kotoura, M. Oka
Bone-bonding ability of P₂O₅-free CaO-SiO₂ glasses
J. Biomed. Mater. Res., 25 : 357-365, 1991.
- [48] Y. Ebisawa, T. Kokubo, K. Ohura, T. Yamamuro
Bioactivity of CaO-SiO₂ based glasses: in vitro evaluation
J. Mater. Sci. Mater. Med., 1 : 239-244, 1990.
- [49] R. Li, A.E. Clark, L.L. Hench
An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing
J. Appl. Biomater., 2 : 231-239, 1991.
- [50] M.M Pereira, L.L. Hench
Mechanisms of hydroxyapatite formation on porous gel-silica substrates
J. Sol-Gel Sci. Tech., 7 : 59-68, 1996.
- [51] J.P. Zhong, D.C. Greenspan
Processing and properties of sol-gel bioactive glasses
J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater., 53 : 694-701, 2000.
- [52] M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench
Calcium phosphate formation on sol-gel derived bioactive glasses in vitro
J. Biomed. Mater. Res., 28 : 693-698, 1994.
- [53] J. Phalippou
Verres : aspects théoriques
Tech. Ing., AFP 2 (AF 3600) : 3600.1-3600.15, 2001.
- [54] M. Vallet-Regí, C.V. Ragel, A.J. Salinas
Glasses with medical applications
Eur. J. Inorg. Chem., 1029-1042, 2003.
- [55] S.P. Nielsen
The biological role of strontium
Bone, 35 : 583-588, 2004.
- [56] P.J. Meunier, R.S. Lorenc, I.G. Smith
Strontium ranelate: new efficient antiosteoporotic agent for treatment of vertebral osteoporosis in post-menopausal women
Osteoporos. Int., 13 (3) : 66, 2002.
- [57] P.J. Marie
Strontium as therapy for osteoporosis
Current Opinion in Pharmacology, 5 : 633-636, 2005.

- [58] E. Brown
Is the calcium receptor a molecular target for the actions of strontium on bone ?
Osteoporos. Int. 14 (3) : S25-S34, 2003.
- [59] M.E. Curzon, M.H Ashrafi, P.C. Spector
Effects of strontium administration on rat molar morphology
Arch. Oral. Biol., 27 (8) : 667-671, 1982.
- [60] J.E.B. Jensen, H. Stang, B. Kringsholm
Relationship between trace element content and mechanical bone strength
Bone, 20 (4) : 104-108, 1997.
- [61] A.C. Pierre
Introduction aux procédés sol-gel
Ed. Septima, Paris, 1992.
- [62] L.L. Hench, J.K. West
The sol-gel process
Chem. Rev., 90 : 33-72, 1990.
- [63] C.J. Brinker, G.W. Scherer
Sol-gel science : the physics and chemistry of sol-gel processing
Ed. Academic Press, New York, 1990.
- [64] P. Audebert, F. Miomandre
Procédé sol-gel de polymérisation
Tech. Ing., JB 5 (J5820) : 5820.1-5820.10, 2005.
- [65] S. Padilla, J. Román, A. Carenas, M. Vallet-Regí
The influence of the phosphorus content on the bioactivity of sol-gel glass ceramics
Biomaterials, 26 (5) : 475-483, 2005.
- [66] P. Saravanapavan, L.L. Hench
Mesoporous calcium silicate glasses – I : synthesis
J. Non-Cryst. Sol., 318 : 1-13, 2003.
- [67] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman
Principes d'analyse instrumentale
Ed. de Boeck, 5e éd., Paris, 1998.
- [68] F. Rouquerol, J. Rouquerol, K. Sing
Adsorption by powders and porous solids
Ed. Academic Press, London, 1999.
- [69] S. Brunauer, P. Emmett, E. Teller
Adsorption of gases in multimolecular layers
J. Am. Chem. Soc., 60 : 309-319, 1938.
- [70] P.E. Barrett, L.G. Joyner, P.P. Halenda
The determination of pore volume and area distributions in porous substances – Computations from nitrogen isotherms
J. Am. Chem. Soc., 73 : 373-380, 1951.

- [71] F. Rouquerol, L. Luciani, P. Llewellyn, R. Denoyel, J. Rouquerol
Texture des matériaux pulvérulents ou poreux
Tech. Ing., TA 3 (P1050) : 1050.1-1050.27, 2003.
- [72] A.J. Salinas, A.I. Martín, M. Vallet-Regí
Bioactivity of three CaO-P₂O₅-SiO₂ sol-gel glasses
J. Biomed. Mater. Res., 62 : 524-532, 2002.
- [73] R. Lobinski, C. Moulin, R. Ortega
Imaging and speciation of trace elements in biological environment
Biochimie, 88 : 1591-1604, 2006.
- [74] R. Ortega
Chemical elements distribution in cells
Nucl. Instrum. Meth. B, 231 : 218-223, 2005.
- [75] C. Michelet-Habchi, P. Moretto
Microsondes nucléaires: des nanotechnologies à la biologie cellulaire
Images de la physique, 166-172, 2005.
- [76] P. Trocellier, P. Trouslard
Spectrométrie de collisions élastiques et de réactions nucléaires
Tech. Ing., TA 3 (P2560) : 2560.1-2560.23, 2002.
- [77] J.F. Ziegler, W.K. Chu
Stopping cross sections and backscattering factors for ⁴He ions in matter. Z = 1-92, E_c(⁴He) = 400-4000 keV
At. Data Nucl. Data Tables, 13 (5) : 463-489, 1974.
- [78] H.H. Andersen, J.F. Ziegler
Hydrogen stopping powers and ranges in all elements
Ed. Pergamon, Oxford, 1977.
- [79] W.C. Roentgen
On a new kind of rays
Annalen der Physik, 64 :1-18; 1898.
- [80] Johansson, Sven A. E.; Johansson, Thomas B
Analytical application of particle induced x-ray emission
Nucl. Instrum. Meth., 137(3) : 473-516, 1976.
- [81] T.B. Johansson, R. Akselsson, S.A.E. Johansson
X-ray analysis : elemental trace analysis at the 10⁻¹²g level
Nucl. Instr. Meth., 84 (1), 141-143, 1970.
- [82] S.A.E. Johansson
La microsonde nucléaire PIXE
La Recherche, 21 (222) : 722-729, 1990.
- [83] I.M. Govil
Proton induced X-ray emission : a tool for non destructive trace element analysis
Curr. Sci., 80 (12) : 1542-1549, 2001.

- [84] H.G. Moseley
The high-frequency spectra of the elements
Phil. Mag., 27 : 703-714, 1914.
- [85] P. Moretto, L. Beck
Émission X induite par particules chargées (PIXE) : théorie
Tech. Ing., TA 3 (P2557) : 2557.1-2557.8, 2003.
- [86] W. Bambynek, B. Crasemann, W.R. Fink, H.V. Freund, H. Mark, C.D. Swift, R.E. Price, P.V. Rao
X-ray fluorescence yields, Auger and Coster-Kronig transition probabilities
Rev. Mod. Phys., 44 : 716-813, 1972.
- [87] M.O. Krause, J.H. Oliver
Natural widths of atomic K and L levels, Ka x-ray lines and several KLL Auger lines
J. of Phys. Chem. Ref. Data, 8 (2) : 329-338, 1979.
- [88] D. Strivay
Nouvelles applications des techniques d'analyse par faisceaux d'ions
Thèse, université de Liège, 2001.
- [89] I.V. Mitchell, K.M. Barfoot
Particle induced x-ray emission analysis : application to analytical problems
Nuclear Science Applications, 1 (2) : 99-162, 1981.
- [90] S.O. Olabanji, J.M. Calvert
K-shell ionization cross sections and theoretical models
Nucl. Instr. Meth. A, 251 (2) : 354-365, 1986.
- [91] W. Brandt, G. Lapicki
Energy-loss effect in inner-shell Coulomb ionization by heavy charged particles
Phys. Rev. A, 23 (4) : 1717-1729, 1981.
- [92] D.D. Cohen, M. Harrigan
K- and L-shell ionization cross sections for protons and helium ions calculated in the ECPSR theory
At. Data Nucl. Data Tables, 33 (2) : 255-343, 1985.
- [93] S.A.E. Johansson, J.L. Campbell
PIXE : a novel technique for elemental analysis
Ed. Wiley, Hichester (UK), 1988.
- [94] C.G. Choi
Analyse quantitative par la mini-sonde nucléaire PIXE : applications aux sciences de la terre
Thèse, université d'Orléans, 1992.
- [95] D.D. Cohen
K and L shell X-ray cross sections for use in PIXE analysis systems
Nucl. Instr. Meth. B, 49 : 1-9, 1990.
- [96] R. Akselsson, T.B. Johansson
X-ray production by 1.5-11 MeV protons
Z. Phys., 266(4) : 245-255, 1974.

- [97] F. Folkmann, C. Gaarde, T. Huus, K. Kemp
Proton induced x-ray emission as a tool for trace element analysis
Nucl. Instr. Meth., 116 (3) : 487-499, 1974.
- [98] K. Ishii, S. Morita
Continuum X-rays produced by a few MeV proton bombardement
Nucl. Instr. Meth. B, 3 : 57-61, 1984.
- [99] K. Ishii, M. Kamiya, K. Sera, S. Morita, H. Tawara
Directional anisotropy of secondary-electron bremsstrahlung induced by proton bombardment of thin solid target
Phys. Rev. A, 15 (5) : 2126-2129, 1977.
- [100] W. Reuter, A. Lurio, F. Cardone, J.F. Ziegler
Quantitative analysis of complex targets by proton-induced x-rays
J. Appl. Phys., 46 (7) : 3194-3202, 1975.
- [101] S.A.E. Johansson, T.B. Johansson
Analytical application of particle induced X-ray emission
Nucl. Instr. Meth., 13 : 473-516, 1976.
- [102] P. Moretto, L. Beck
Émission X induite par particules chargées (PIXE) : applications
Tech. Ing., TA 3 (P2558) : 2558.1-2558.17, 2003.
- [103] J.L. Campbell, D. Higuchi, J.A. Maxwell, W.J. Teesdale
Quantitative PIXE microanalysis of thick specimens
Nucl. Instr. Meth. B, 77 : 95-109, 1993.
- [104] J.A. Maxwell, W.J. Teesdale, J.L. Campbell
The Guelph PIXE software package II
Nucl. Instr. Meth. B, 95 : 407-421, 1995.
- [105] F.H. Schamber
A modification of the linear least square fitting method which provides continuum suppression
in: X-ray fluorescence analysis of environmental samples : 241-257, ed. T.G. Dzubay, Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Michigan, 1979.
- [106] P.J. Statham
Deconvolution and background subtraction by least-squares fitting with pre-filtering of spectra
Analyt. Chem., 49 : 2149-2155, 1977.
- [107] J.A. Maxwell, R.G. Leigh, J.L. Campbell
Least-squares fitting of PIXE spectra with a digital filter treatment of the continuum
Nucl. Instr. Meth. B, 3 : 301-304, 1984.
- [108] G. Guibert
Étude par des méthodes nucléaires et physico-chimiques de la contamination des tissus situés autour de biomatériaux métalliques implantés. Mesure de la contribution à la toxicité par la radioactivité résiduelle de plusieurs biomatériaux
Thèse, université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand II), 2004.

- [109] T.A. Cahill
Proton microprobes and particle induced X-rays analytical systems
Ann. Rev. Nucl. Part. Sci., 30 : 211-252, 1980.
- [110] P. Chevallier, J.X. Wang, H. Bougault
Actual capabilities of x-ray fluorescence analysis induced by synchrotron radiation
Analysis, 16(5) : 261-266, 1988.
- [111] P. Berger, G. Revel
Microsondes nucléaires
Tech. Ing., TA 3 (P2563) : 2563.1-2563.16, 2005.
- [112] J.R. Tesmer, M. Nastasi
Handbook of modern ion beam material analysis
Ed. Materials Research Society, Pittsburgh, Pennsylvania, 1995.
- [113] M. Mayer
Ion beam analysis of rough thin films
Nucl. Instr. Meth. B, 194 (2) : 177-186, 2002.
- [114] M. Cholewa, G. Bench, B.J. Kirby, G.J.F. Legge
Changes in organic materials with scanning particle microbeam
Nucl. Instr. Meth. B, 54 : 101-108, 1991.
- [115] B.J. Kirby, G.J.F. Legge
Ion beam induced damage and element loss during a microanalysis of biological tissue
Nucl. Instr. Meth. B, 54 : 98-100, 1991.
- [116] F. Watt, G.W. Grime, C.C. Perry
The damage effects of a 1 micron proton beam on a single pollen grain
Nucl. Instr. Meth. B, 30 (3) : 331-336, 1988.
- [117] S. Incerti, C. Habchi, Ph. Moretto, J. Olivier, H. Seznec
Geant4 simulation of the new CENBG micro and nano probes facility
Nucl. Instr. Meth. B, 249 : 738-742, 2006.
- [118] A.D. Dymnikov, A.G. Glass, B. Rout
Zoom quadrupole focusing systems producing an image of an object
Nucl. Instr. Meth. B, 241 : 402-408, 2005.
- [119] P. Barberet
Développement d'une ligne d'irradiation microfaisceau en mode ion par ion pour la radiobiologie expérimentale à l'échelle cellulaire
Thèse, université de Bordeaux I, 2003.
- [120] Y. Llabador, D. Bertault, J.C. Gouillaud, P. Moretto
Advantages of high speed scanning for microprobe analysis of biological samples
Nucl. Instr. Meth. B, 49 : 435-440, 1990.
- [121] G. Devès, S. Matsuyama, Y. Barbotteau, K. Ishii, R. Ortega
Characterization of Si p-i-n diode for scanning transmission ion microanalysis of biological samples
Rev. Sci. Instrum., 77(5) : 056102/1-056102/3, 2006.
- [122] P. Chevallier
Détection et mesure des rayonnements nucléaires
Tech. Ing., TA 3 (P2550) : 2550.1-2550.24, 1996.

- [123] J.F. Harrison, R.A. Eldred
Automatic data acquisition and reduction for elemental analysis of aerosol samples
Adv. X-ray Anal., 17 : 560-570, 1974.
- [124] S. Gamma, M. Volfinger, C. Ramboz, O. Rouer
Accuracy of PIXE analyses using a funny filter
Nucl. Instr. Meth. B, 181 : 150-156, 2001.
- [125] E. Fernandez, F.J. Gil, M.P. Ginebra, F.C.M. Driessens, J.A. Planell, S.M. Best
Calcium phosphate bone cements for clinical applications, part I: solution chemistry
J. Mater. Sci. Mater. Med., 10 (3) : 169-176, 1999.
- [126] E. Fernandez, F.J. Gil, M.P. Ginebra, F.C.M. Driessens, J.A. Planell, S.M. Best
Calcium phosphate bone cements for clinical applications, part II: precipitate formation during setting reactions
J. Mater. Sci. Mater. Med., 10 (3) : 177-183, 1999.
- [127] C. Ohtsuki, T. Kokubo, T. Yamamuro
Mechanism of apatite formation on CaO-SiO₂-P₂O₅ glasses in a simulated body fluid
J. Non-Cryst. Solids, 143 (1) : 84-92, 1992.
- [128] X. Yan, W. Huang, C. Yu, H. Deng, Y. Wang, Z. Zhang, S. Qiao, G. Lu, D. Zhao
The in vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses
Biomaterials, 27 : 3396-3403, 2006.
- [129] L.L. Hench, D.E. Ckark
Physical chemistry of glass surfaces
J. Non-Cryst. Solids, 28 : 83-105, 1978.
- [130] V. Banchet, E. Jallot, J. Michel, L. Wortham, D. Laurent-Maquin, G. Balossier
X-ray microanalysis in STEM of short-term physicochemical reactions at bioactive glass particle/biological fluid interface. Determination of O/Si atomic ratios
Surf. Int. Anal., 36 (7) : 658-665, 2004.
- [131] L.L. Hench, G.P. LaTorre
The reaction kinetics of bioactive ceramics, part IV: effect of glass and solution composition
Bioceramics, 5 : 67-74, 1992.
- [132] O.H. Andersson, K.H. Karlsson
On the bioactivity of silicate glass
J. Non-Cryst. Solids, 129 : 145-151, 1991.
- [133] R.Z. LeGeros
Calcium phosphates in oral biology and medicine
Monogr. Oral Sci., 15 : 1-201, 1991.
- [134] G. Daculsi, J.M. Bouler, R.Z. LeGeros
Adaptive crystal formation : in normal and pathological calcification, in synthetic calcium phosphate and related biomaterials
Int. Rev. Cytology., 172 : 129-191, 1997.
- [135] S. Weiner, H. D. Wagner
The material bone : structure-mechanical function relations
Annu. Rev. Mater. Sci., 28 : 271-298, 1998.

- [136] H. Limeback
Molecular mechanisms in dental hard tissue mineralization
Curr. Opin. Dent., 1 : 826-835, 1991.
- [137] J. Lao, J.M. Nedelec, Ph. Moretto, E. Jallot
Micro-PIXE characterization of interactions between a sol-gel derived bioactive glass and biological fluids
Nucl. Instr. Meth. B, 245 : 511-518, 2006.
- [138] F. Devreux, P. Barboux
Numerical modelling of glass dissolution : gel layer morphology
J. Nucl. Mater., 298 : 145-149, 2001.
- [139] M. Vallet-Regí, I. Izquierdo-Barba, A.J. Salinas
Influence of P₂O₅ on crystallinity of apatite formed in vitro on surface of bioactive glasses
J. Biomed. Mater. Res., 46 : 560-565, 1999.
- [140] J. Lao, J.M. Nedelec, Ph. Moretto, E. Jallot
Biological activity of a SiO₂-CaO-P₂O₅ sol-gel glass highlighted by PIXE-RBS methods
Nucl. Instr. Meth. B, *in press*, doi: 10.1016/j.nimb.2007.03.092.
- [141] J. Coreno, R. Rodriguez, M.A. Araiza, V.M. Castano
Growth of calcium phosphate onto coagulated silica prepared by using modified simulated body fluids
J. Mater. Chem., 8 (12) : 2807-2812, 1998.
- [142] W. Diezel, P. Ludwig, T. Schewe, E. Schulz
Anti-inflammatory effect of magnesium ions due to inhibition of the enzyme 5-lipoxygenase
Derm. Monat., 179 (3) : 81-85, 1993.
- [143] D. Almoznino-Sarafian, S. Berman, A. Mor, M. Shteinshnaider, O. Gorelik, I. Tzur, I. Alon, D. Modai, N. Cohen
Magnesium and C-reactive protein in heart failure: an anti-inflammatory effect of magnesium administration ?
Eur. J. Nutr., 46 (4) : 230-237, 2007.
- [144] A. Spasov, E. Temkin, O. Ostrovskii, N. Kalinina, L. Gerchikov, V. Mikhal'chenko, L. Demina
The experimental and clinical validation of the use of a polikatan preparation in periodontal diseases
Stomatologia, 78 (5) : 16-19, 1999.
- [145] E. Jallot
Role of magnesium during spontaneous formation of a calcium phosphate layer at the periphery of a bioactive glass coating doped with MgO
Appl. Surf. Sci., 211 : 89-95, 2003.
- [146] R.C. Weast
CRC handbook of chemistry and physics
56th Ed., Ohio : CRC Press, 1976.
- [147] L. Brewer, E. Brackett
The dissociation energies of gaseous alkali halides
Chem. Rev., 61 : 425-432, 1961.

- [148] K.A. Gingerich, D.L. Cocke
Thermodynamic confirmation for the high stability of gaseous titanium-rhodium molecules as predicted by the Brewer-Engel metallic theory and the dissociation energy of diatomic rhodium
J. Chem. Soc. Chem. Commun., 9 : 536-538, 1972.
- [149] D. Shannon
Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides
Acta Crystallographica, A 32 : 751-767, 1976.
- [150] P.W. McMillan
Glass-ceramics
Academic Press, New York, 1964.
- [151] K.H. Sun
Fundamental condition of glass formation
J. Amer. Ceram. Soc., 30 (9) : 277-281, 1947.
- [152] M.D Grynepas, E. Hamilton, R. Cheung, Y. Tsouderos, P. Deloffre, M. Hott, P.J. Marie
Strontium increases vertebral bone volume in rats at a low dose that does not induce detectable mineralization defect
Bone, 18 : 253-259, 1996.
- [153] P.J. Marie, M. Hott
Short-term effects of fluoride and strontium on bone formation and resorption in the mouse
Metabolism, 35 : 547-551, 1986.
- [154] S.G. Dahl, P. Allain, P.J. Marie, Y. Mauras, G. Boivin, P. Ammann, Y. Tsouderos, P.D. Delmas, C. Christiansen
Incorporation and distribution of strontium in bone
Bone, 28 (4) : 446-453, 2001.
- [155] Brevet d'invention intitulé « Verres bioactifs dopés en strontium », n° FR07/04952.
Inventeurs : E. Jallot, J. Lao, J.M. Nedelec, J.M. Sautier, J. Isaac.
Brevet financé par le CNRS.
- [156] P. Sepulveda, J.R. Jones, L.L. Hench
In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses
J. Biomed. Mater. Res., 61 : 301-311, 2002.
- [157] M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench
Effect of texture on the rate of hydroxyapatite formation on gel-silica surface
J. Am. Ceramics Soc., 78 : 2463-2468, 1995.
- [158] K.D. Lobel, L.L. Hench
In vitro interactions with a bioactive gel-glass
J. Sol-Gel Sci. Technol., 7 : 69-76, 1996.
- [159] S. Radin, P. Ducheyne, S. Falaize, A. Hammond
In vitro transformation of bioactive glass granules into Ca-P shells
J. Biomed. Mater. Res., 49 : 264-272, 2000.

RESUME :

L'étude des verres bioactifs constitue un domaine de recherche pluridisciplinaire aux enjeux considérables : la mise au point d'une nouvelle génération de biomatériaux, capables de se lier avec les tissus receveurs, de former un lien interfacial fort et d'aider l'organisme à se soigner lui-même grâce à une action directe sur les cellules. Les applications concernent particulièrement le comblement de défauts osseux en chirurgies orthopédique et dentaire.

Dans cette optique, nous avons élaboré plusieurs verres bioactifs dans des systèmes de composition binaire $\text{SiO}_2\text{-CaO}$, ternaires $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, et pour la première fois à notre connaissance des verres contenant du strontium $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$. L'utilisation du procédé sol-gel comme voie de synthèse des verres bioactifs s'est révélée avantageuse, car permettant l'élaboration de matériaux nanoporeux, de grande pureté et homogénéité.

La bioactivité *in vitro* des verres est avérée : au contact d'un milieu biologique, tous les matériaux élaborés induisent la formation d'une couche Ca-P-Mg sur une profondeur de quelques microns à leur surface. Nos travaux se distinguent par l'utilisation des microsondes nucléaires PIXE-RBS pour la caractérisation de l'interface verre bioactif/milieu biologique; leur emploi a permis de réaliser des cartographies chimiques rendant possible l'étude des gradients de concentrations en éléments majeurs et traces à l'interface. De plus, des informations quantitatives sur la réactivité locale des verres ont été acquises. Ces données sont importantes pour évaluer les cinétiques et l'amplitude des réactions physico-chimiques impliquées dans le processus de bioactivité.

Nous avons ainsi mis en évidence que le verre binaire est le plus prompt à réagir en ce qui concerne la dissolution de la matrice vitreuse et l'apparition de la couche riche en Ca et en P. Toutefois la plus lente décroissance du rapport Ca/P à l'interface verre/milieu biologique indique que la couche Ca-P-Mg éprouve des difficultés à évoluer vers une phase apatitique. Pour les verres contenant du phosphore, la déalkalinisation de la matrice et la formation de la couche phosphocalcique sont retardées ; cependant le calcul du rapport Ca/P à l'interface et le suivi de l'état de saturation du milieu biologique montrent que la couche Ca-P-Mg se développe plus rapidement en une couche de type apatitique. Concernant les verres dopés en Sr, nous avons démontré que leur capacité de dissolution est amoindrie et que la couche Ca-P-Mg se forme sur une profondeur plus réduite. Néanmoins, la couche évolue plus promptement en apatite d'après la rapide décroissance du rapport Ca/P. Nous avons également obtenu des preuves de la présence de Sr à l'interface verre/liquide et de la diffusion de cet élément dans le milieu biologique sous forme de traces. Grâce aux effets bénéfiques du strontium sur l'activité cellulaire et sur le cycle de remodelage osseux, ceci pourrait résulter en une bioactivité grandement améliorée pour les verres dopés en Sr en milieu vivant.

Mots clés : biomatériaux, verres bioactifs, procédé sol-gel, microsondes nucléaires, PIXE-RBS.

ABSTRACT :

The study of bioactive glasses is a multi-field area of research aiming at a major goal: the development of new generation biomaterials that would be able to bond with host tissues through the formation of a strong interfacial bond, together with helping the body heal itself through the stimulation of specific cellular responses. Thus clinical applications of bioactive glasses mainly concern dental surgery and orthopaedics, for filling osseous defects.

For this purpose, we have elaborated bioactive glasses in the binary $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ system, ternary $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ system, and for the first time, to our knowledge, strontium-doped $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ and $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SrO}$ glasses. The materials were elaborated using the sol-gel process, which allowed the synthesis of nanoporous materials with great purity and homogeneity.

The bioactivity of the glasses was clearly demonstrated *in vitro*: in contact with biological fluids, the whole lot of materials were able to induce the formation of a Ca-P-Mg layer a few microns thick at their surface. Our work is characterized by the use of PIXE-RBS nuclear microprobes to study the bioactive glass/biological fluids interface. Thanks to these methods we obtained chemical maps that made possible the analysis of major and trace elements concentrations at the interface. Moreover, quantitative information regarding the local reactivity of glasses were acquired. These data are important to evaluate the kinetics and amplitude of the physico-chemical reactions involved in the bioactivity process.

Thus, we highlighted that the binary glass is the highest reactive regarding the dissolution of the glassy matrix as well as the first appearance of the Ca-P rich layer. However the Ca/P atomic ratio calculated at the glass/biological fluids interface decreases slowly, indicating that the Ca-P-Mg layer encounters difficulties to be changed into a more stable apatitic phase. For the P-containing glasses, the dealkalinization of the matrix and the formation of the calcium phosphate layer are delayed. However, calculation of the interfacial Ca/P ratios along with supersaturation studies of the biological medium demonstrate that the Ca-P-Mg layer is quickly changed into an apatitic phase. Concerning the Sr-doped glasses, we highlighted that the dissolution of the material decreased and that the Ca-P-Mg layer was formed on a reduced depth. Nevertheless, according to the rapid decrease of the Ca/P ratio, there is evidence that the layer is more quickly changed into apatite. We also demonstrated that traces of Sr are both present at the glass/biological fluids interface and diffused in the biological medium. Knowing the positive effects of Sr on the cellular activity and on the bone modelling process, it might result in an improved bioactivity for the Sr-doped glasses in contact with a living system.

Key words : biomaterials, bioactive glasses, sol-gel process, nuclear microprobes, PIXE-RBS.