



**HAL**  
open science

# Développement de bioverre poreux ostéoinducteur pour application à l'orthopédie et à l'ingénierie tissulaire

Leila Lefebvre

► **To cite this version:**

Leila Lefebvre. Développement de bioverre poreux ostéoinducteur pour application à l'orthopédie et à l'ingénierie tissulaire. Matériaux. INSA de Lyon, 2007. Français. NNT : 051ISAL . tel-00749903

**HAL Id: tel-00749903**

**<https://theses.hal.science/tel-00749903v1>**

Submitted on 8 Nov 2012

**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.

Thèse

# Développement de bioverre poreux ostéoinducteur pour application à l'orthopédie et à l'ingénierie tissulaire

présentée devant  
L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

pour obtenir  
le grade de docteur

Ecole doctorale : Matériaux de Lyon...

.....  
Spécialité : Génie des matériaux

par  
Leila Lefebvre

Soutenue le 5 Novembre 2007 devant la Commission d'examen

## Jury

---

Hartmann Daniel	Professeur	Président
Bernache-Assolant Didier	Professeur	Directeur
Chevalier Jérôme	Professeur	Directeur
Lerich Anne	Professeur	Rapporteur
Michel Jean	Docteur, HDR	Rapporteur
Boccaccini Aldo	Professeur	
Membre invité : Gremillard Laurent	Docteur	
Rachid zenati	Docteur	

Comme un chercheur d'or, je ne puis transmettre à la postérité que le minerai précieux que j'ai extrait, et non pas mon travail, mes recherches et mes privations, mes joies et mes déceptions.

Konstantin Stanislavski - Ma vie dans l'art

---

A mes parents  
A Fred  
A tous ceux qui me sont Chers

# Avant Propos

---

Un des enjeux majeurs de notre société est l'amélioration de la qualité de la vie. Celle - ci passe par l'utilisation étendue de dispositifs médicaux de plus en plus sophistiqués, destinés à pallier un organe ou des tissus déficients dans le cadre d'une pathologie, d'un traumatisme, ou d'un vieillissement des tissus.

Les matériaux à vocation médicale, utilisés pour la réalisation d'implants ou de dispositifs médicaux, représentent alors un challenge pour l'avenir : accroître la qualité de vie des personnes souffrant de maladie et faire face au vieillissement de la population mondiale. Le meilleur exemple est aujourd'hui le développement des prothèses orthopédiques, dont l'usage, mais aussi la durée de vie se sont nettement accrus ces dernières années. On estime à plus de 20 milliards d'euros le marché des biomatériaux en 2001, avec une évaluation de l'ordre de 90 milliards en 2005. Pour exemples: le marché de la substitution osseuse est en augmentation de 40% par an ; le nombre de poses de prothèses orthopédiques en France, chaque année est de l'ordre de 200.000.

Le cahier des charges des matériaux à vocation biomédicale est des plus stricts et doit considérer les aspects de (bio) - fonctionnalité, mais aussi et surtout les aspects de biocompatibilité. Historiquement, la bio-compatibilité a d'abord été appréhendée de manière passive, avec le développement de matériaux les plus inertes possibles vis à vis des tissus. Aujourd'hui, une interaction positive est clairement visée, dans le but d'une intégration plus rapide et durable des implants et une guérison des tissus. On cherche alors des matériaux dits 'bio - actifs', qui présentent une affinité avec les tissus environnant et/ou qui permettent un relargage contrôlé de principes actifs. Dans ce cadre, l'orthopédie représente un exemple de l'évolution des concepts: on a historiquement d'abord essayé de remplacer les prothèses métal - polyéthylène par des matériaux engendrant à la fois moins de débris et des débris moins nocifs dans l'organisme. Les ingénieurs et les chirurgiens se sont alors naturellement tournés vers des matériaux céramiques dits 'bio - inertes', comme l'alumine pour des applications où l'on veut minimiser les interactions avec l'organisme (implant orthopédique). Depuis une vingtaine d'année, de nouvelles céramiques comme l'hydroxyapatite ont vu le jour, notamment en qualité de revêtements, pour autoriser une repousse osseuse à l'interface implant - tissus et réaliser une fixation 'biologique' des implants à l'os. Ces mêmes céramiques, sous une forme de matériaux poreux ont vu un développement de leurs applications en qualité de substituts osseux synthétiques. Ces revêtements et substituts en hydroxyapatite peuvent alors être chargés en principes actifs (aujourd'hui, cliniquement, essentiellement des antibiotiques).

Cependant, l'utilisation des céramiques bioactives en blocs poreux n'est pas encore un succès clinique total. Leur inconvénient majeur est en effet de présenter des propriétés mécaniques bien en deçà de celles présentées par les substituts d'origine naturelle (corail par exemple). Leurs faibles propriétés mécaniques sont un frein majeur à leur développement. De plus, ces céramiques sont ostéoconductrices (elles permettent à l'os de repousser à travers les interconnexions entre pores) mais pas ostéoinductrices (elles n'induisent pas la repousse osseuse en dehors d'un site osseux).

Ces céramiques dites 'de première génération' sont cependant l'objet de nombreuses études, car elles sont aujourd'hui considérées, malgré leurs défauts, comme indispensables dans certaines applications cliniques (notamment lors de reprises de prothèses de hanche). Des études portent par ailleurs sur la possibilité de les mélanger à une phase polymère (collagène par exemple) pour les rendre plus proches de l'os naturel. Cependant, la phase hydroxyapatite de cet os 'hybride' est très

(trop) stable et ne sera pas le siège des processus naturels du remodelage osseux (résorption de la matrice osseuse par les ostéoclastes, puis reconstruction par les ostéoblastes). Une alternative prometteuse est alors la réalisation de bio-verres poreux, plus facilement résorbables en surface, et qui permettent alors les processus de dissolution de Calcium et Phosphore, puis de re-précipitation en surface d'hydroxyapatite de caractéristiques plus proche de la partie minérale de l'os. Ils sont donc considérés comme plus bioactifs que l'hydroxyapatite, dans le sens où ils favorisent des processus de repousse osseuse. De plus, on peut considérer que la porosité est évolutive. Les bioverres, semblent être plus actifs *in vivo* et posséder de meilleures propriétés mécaniques que l'hydroxyapatite synthétique. Ces verres bioactifs sont déjà utilisés dans le domaine dentaire sous forme de granulés et développés pour les revêtements de prothèses métalliques. Ils ne sont cependant pas encore utilisés en orthopédie pour la réalisation de substituts poreux, à cause de verrous technologiques liés à leur fabrication. Dans un futur développement de ces matériaux, nous ne pouvons oublier une des perspectives majeures de la médecine régénératrice qui a trait à l'ingénierie tissulaire. L'ingénierie tissulaire de la peau est aujourd'hui un succès, celle du cartilage commence à donner des résultats prometteurs. L'ingénierie tissulaire osseuse est moins avancée. Elle est en outre demandeuse de supports ('scaffolds', ou squelettes) de cultures de cellules ostéo-progénitrices appropriés. Les bio-verres poreux, de part leur grande bio-activité et la possibilité de modifier leurs propriétés de surfaces peuvent s'avérer des candidats de choix pour cette recherche.

L'objet de ce travail est d'optimiser l'architecture de blocs poreux dérivés du bioverre 45S5 (porosité, structure des parois intracellulaires, topologie de la surface) et la microstructure (taux de cristallinité, taille des cristallites) dans le but de comprendre les relations procédé - microstructure - propriétés mécaniques et biologiques.

Pour réaliser ce projet, notre équipe collabore avec un réseau de 4 autres laboratoires (1 à Lyon et 2 à Saint Etienne) et d'un industriel qui unissent leurs compétences pour développer les matériaux de demain pour l'orthopédie et l'ingénierie tissulaire osseuse. Ces partenaires sont :

- Le département Biomatériaux et Mécanique du Centre Ingénierie et Santé de l'EMSE qui apporte sa contribution à la caractérisation physico-chimique des bioverres.
- Le laboratoire de Biologie du Tissu Osseux LBTO, Inserm E 366, Faculté de Médecine St Etienne qui travaille sur les effets des contraintes mécaniques sur le tissu osseux.
- Le laboratoire « Biomatériaux et remodelage matriciel » qui évalue la biocompatibilité des matériaux
- L'entreprise Noraker qui apporte son soutien à notre équipe sur les bioverre en fournissant la matière première et la mise en place des essais *in vivo*.

Les première et seconde parties de ce mémoire sont consacrées à une étude bibliographique sur la substitution osseuse et le bioverre 45S5, et aux différentes techniques et démarches expérimentales utilisées lors de cette thèse.

La troisième partie est consacrée à l'élaboration de bloc poreux à base de bioverre 45S5. C'est le cœur de cette thèse. Une étude approfondie des poudres, depuis la synthèse jusqu'à la caractérisation du comportement thermique et au frittage du matériau, y est présentée. Puis, différents procédés d'élaboration de pièces macroporeuses de bioverre dédiées à la substitution osseuse sont étudiés. Les procédés utilisés sont comparés en terme de faisabilité et notamment par le taux et la structure de pores que l'on peut obtenir pour chaque technique et leur influence sur les propriétés biologiques et mécaniques du matériau. L'élaboration de blocs poreux implique également une optimisation des conditions de dispersion des poudres.

## **Avant Propos**

La quatrième partie de ce manuscrit est consacrée à l'évaluation des propriétés biologiques du bioverre 45S5. L'optimisation des propriétés biologiques est menée par l'étude de l'effet des transformations structurales que peut subir le matériau sur la bioactivité du matériau et des cultures de cellules osseuses (ostéoblastes). Les propriétés physico-chimiques clés sont le taux de cristallinité (qui peut conditionner les cinétiques de dissolution) et l'état de surface (qui peut conditionner, comme pour les hydroxyapatites, l'adhésion cellulaire). Des tests d'adhésion, de viabilité et de prolifération cellulaire, sont menés. Dans un troisième temps, les substituts osseux optimisés sont implantés sur petits ruminants pour valider leur apport clinique.

## TABLE DES MATIERES

### Partie A: Etude Bibliographique p 8

---

#### Chapitre A-1 : L'os et la substitution osseuse

---

- A-1-I Structure et propriétés de l'os
  - 1. Composition
  - 2. Structure multi échelle
  - 3. Propriétés mécaniques
  - 4. Remodelage osseux
- A-1-II La substitution osseuse
  - 1. La greffe osseuse
  - 2. Substituts osseux synthétiques
    - a) Définition
    - b) Cahier des charges
    - c) Concept de Bioactivité
    - d) Verres bioactifs

#### Chapitre A - 2 : Le bioverre 45S5

---

- A-2-I Composition et Synthèse
  - A-2-II Interaction tissu-bioverre
    - 1. Tests biologiques
      - a) Tests in vitro
        - i. Culture cellulaire
        - ii. Formation de la couche d'HAC
      - b) Tests in vivo
    - 2. Osteoinduction
    - 3. Relargage ionique et évolution de pH
  - A-2-III Applications actuelles du bioverre 45S5
  - A-2-IV Evolution des bioverres lors de traitements thermiques
- REFERENCES DE LA PARTIE A**

### Partie B: Techniques Expérimentales p 42

---

#### INTRODUCTION



## Chapitre B -1 : Synthèse et caractérisation du bioverre 45S5

---

- B-1-I Synthèse des poudres
- B-1-II Caractérisation du bioverre 45S5
  - 1) Caractérisation physico-chimique
    - a) Contrôle de la composition
    - b) Caractérisation physique
    - c) Comportement thermique
  - 2) Caractérisation structurale
    - a) Diffraction des rayons X
    - b) Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier
  - 3) Caractérisation microstructurale
    - a) Microscopie électronique à balayage
    - b) Microscopie électronique à balayage environnemental
    - c) Microscopie électronique à transmission

## Chapitre B -2 : Elaboration de pièces en bioverre 45S5

---

- B-2-I Etude de la densification du bioverre 45S5
  - 1) Etude dilatométrique
    - a) Dilatomètre horizontal
    - b) Dilatomètre vertical
    - c) Mesure de densité
  - 2) Caractérisation mécanique
- B-2-II Réalisation et caractérisation des suspensions de poudre
  - 1) Mise en suspension
  - 2) Caractérisation des suspensions
    - a) Comportement rhéologique
    - b) Mesures de potentiel zeta
    - c) Mesure granulométrique
- B-2-III Elaboration et caractérisation des pièces macroporeuses
  - 1) Techniques d'élaboration
    - a) Imprégnation de mousses
    - b) Utilisation de billes de PMMA
    - c) Freeze casting
    - d) Gel casting
  - 2) Caractérisation

## Chapitre B -3 : Caractérisation biologique

---

- B-3-I Influence des transformations sur la bioactivité
- B-3-II Evaluation biologique du bioverre *in vitro*
  - 1) Mise en place d'un protocole de culture
  - 2) Culture cellulaire

## REFERENCES DE LA PARTIE B

### Partie C: Elaboration de blocs poreux p69

---

#### INTRODUCTION

#### Chapitre C - 1 : Obtention des poudres et caractérisation

---

- C-1-I Optimisation du broyage des poudres
  - 1) Influence de la composition de la jarre et des billes
  - 2) Influence du taux et du type de billes
  - 3) Influence temps de broyage
  - 4) Conclusion
- C-1-II Caractérisation physico chimique des poudres
  - 1) Vérification de la composition et de l'état structural des poudres
  - 2) Caractérisation physique

#### REFERENCES DU CHAPITRE 1 PARTIE C

#### Chapitre C - 2: Caractérisation des transformations structurales du bioverre 45S5

---

- C-2-I Etude des transformations *in-situ*
  - 1) Analyse Thermique
  - 2) Microscopie en montée de température
- C-2-II Etude des transformations sur poudres traitées thermiquement
- C-2-III Cinétiques isothermes de cristallisation
- C-2-IV Cinétiques non isothermes de cristallisation
- C-2-V Résumé des transformations

#### Chapitre C-3 : Etude du frittage

---

- C-3-I Introduction
- C-3-II Comportement général
- C-3-III Modélisation
  - 1) Modélisation du premier stade de retrait
  - 2) Modélisation du second stade de retrait
- C-3-IV Cinétiques de frittage
  - 1) Influence de la vitesse de chauffe
  - 2) Cinétiques isothermes de retrait
    - a) Cinétiques Isothermes du premier stade
    - b) Cinétiques Isothermes du second stade
- C-3-V Propriétés mécanique en fonction du taux de densification

## **Résumé de l'influence des transformations structurales de poudres de bioverre sur leur frittabilité**

### **REFERENCES DU CHAPITRE 3 PARTIE C**

#### **Chapitre C - 4 : Elaboration de blocs poreux**

---

- C-4-I Mise en suspension des poudres
  - 1) Optimisation des conditions de dispersion des poudres de bioverre
    - a) Choix du milieu
    - b) Optimisation de la quantité de dispersant
    - c) Influence du taux de matière sèche
    - d) Optimisation du pH des suspensions dans l'eau
    - e) Influence du temps d'homogénéisation
    - f) Comportement des barbotines
- C-4-II Elaboration de blocs poreux
  - 1) Imprégnation de mousses
    - a) Choix du type de mousse et Imprégnation
    - b) Cycle de déliantage
    - c) Cycle de frittage
    - d) Caractérisation des poreux et optimisation du procédé d'imprégnation
    - e) Optimisation de la formulation des barbotines
    - f) Double imprégnation
    - g) Combinaison gel casting et imprégnation de mousse
  - 2) Utilisation de billes de PMMA comme porogènes
    - a) Par mélange
    - b) Par imprégnation de préformes
  - 3) Freeze casting
  - 4) Résumé et conclusion

### **REFERENCES DU CHAPITRE 4 PARTIE C**

#### **Partie D: Evaluation biologique p 151**

---

##### **Chapitre D-1 : Etude de la bioactivité du bioverre 45S5 et influence de ses transformations**

---

- D-1-I Bioactivité des poudres
- D-1-II Bioactivité des blocs poreux

### **REFERENCES DU CHAPITRE 1 PARTIE D**

#### **Chapitre D-2 : Culture cellulaire**

- 1) Mise en place d'un protocole de culture cellulaire
  - a- Contrôle de la dissolution des poudres de bioverre
  - b- Contrôle de la dissolution des blocs de bioverre
- 2) Culture cellulaire
  - a- Blocs poreux frittés à 800°C
  - b- Blocs poreux frittés à 1000°C, de taille de pores comprise entre 500 et 1000 µm

**REFERENCES DU CHAPITRE 2 PARTIE D**

**Chapitre D-3 : Implantation in vivo**

---

# **Partie A**

## **Etude Bibliographique**

## Chapitre A-1 : L'os et la substitution osseuse

### A-1-I Structure et propriétés de l'os 10

1. Composition 10
2. Structure multi échelle 11
3. Propriétés mécaniques 13
4. Remodelage osseux 16

### A-1-II La substitution osseuse 17

1. La greffe osseuse 17
2. Substituts osseux synthétiques 18
  - a) Définition 18
  - b) Cahier des charges 18
  - c) Bioactivité 19
  - d) Verres bioactifs 21

---

### A-1-I Structure et propriétés de l'os

Le système osseux forme une charpente où s'assemblent les organes du corps. Il assure notamment :

- Le soutien aux organes mous du corps,
- Le mouvement en servant de points d'attache aux muscles.
- Le stockage d'ions calcium et phosphore dans la structure même de l'os (le squelette renferme 99% du calcium de l'organisme).
- La protection des organes internes. Le crâne et la colonne vertébrale protègent le cerveau et la moelle épinière, la cage thoracique protège le coeur et les poumons et le bassin protège les organes de la reproduction,
- La formation des globules rouges dans les cavités de certains os.

---

### 1. Composition

Même si au premier abord les os peuvent apparaître relativement inertes et homogènes, ce n'est pas le cas. Les os sont des structures qui ont besoin de recevoir du sang et d'être innervées car ils renferment des cellules vivantes qui en renouvellent constamment le tissu, exigent des nutriments et doivent se débarrasser de leurs déchets. Le tissu osseux est constitué de différents types de cellules et par une abondante matière extracellulaire, la matrice. C'est la combinaison judicieuse d'éléments organiques et inorganiques de la matrice qui permet à l'os d'être extrêmement durable et résistant sans devenir cassant [1].

Les cellules impliquées dans le tissu osseux sont :

## Etude bibliographique

- Les ostéoblastes : rencontrés en surface du tissu osseux en croissance. Ils sont riches en organites, témoins de l'importance des synthèses protéiques (collagène en particulier) et mucopolysaccharidiques dont ils sont le siège. De plus, ces cellules contiennent une concentration élevée d'enzymes pyrophosphatases et phosphatases alcalines qui interviennent dans le déclenchement et l'entretien de la minéralisation de la substance pré-osseuse (substance ostéoïde).
- Les ostéocytes : Ce sont des ostéoblastes complètement entourés par la matrice osseuse minéralisée; ce sont les cellules osseuses mûres qui assurent l'entretien organique de l'os. Les ostéocytes constituent environ 1% de la masse du tissu osseux.
- Les ostéoclastes : Situés à la surface du tissu osseux en voie de résorption. Ils assurent la phagocytose de l'os.

La matrice extracellulaire est faite d'une matière organique (substance fondamentale et fibre collagène) minéralisée. La matrice organique (35% en volume de la matrice), sécrétée par les ostéoblastes, est constituée principalement de fibres de collagène de type I. La substance fondamentale, très peu abondante, contient des mucopolysaccharides (et en particulier du chondroïtine-sulfate), des glycoprotéines, des protéines sériques, de l'eau et des électrolytes. Ce sont ces substances qui confèrent à l'os sa flexibilité et sa grande résistance à la tension ou torsion. La dureté du tissu osseux est due à la minéralisation (ou calcification) de la matrice organique. Il s'agit essentiellement de cristaux d'hydroxyapatite (phosphate de calcium). Ceux-ci sont visibles en microscopie électronique entre les fibres de collagène ou à l'intérieur de celles-ci. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  situés en surface des cristaux participent à des échanges rapides avec le liquide interstitiel et donc avec le courant sanguin. Ces constituants minéraux forment près de 65% en volume de la matrice.

Le calcium est un élément important pour le corps et les os en sont le réservoir. Il est impliqué dans le fonctionnement de plusieurs phénomènes dans le corps (contractions musculaire et cardiaque et transmission de l'influx nerveux par exemple). Les os doivent répondre rapidement à toute élévation ou diminution de la calcémie : à tout moment, le calcium peut être libéré en fonction des besoins de l'organisme et du taux de calcium sanguin qui doit rester constant. Pour ce faire deux hormones sont impliquées dans la stimulation ou non des ostéoclastes. Celles-ci phagocyteront la matière osseuse afin de retourner du calcium dans le sang quand elles sont stimulées par la parathormone sécrétée par les parathyroïdes et cesseront, au contraire, quand la calcitonine sera sécrétée et le calcium se déposera.

---

## 2. Structure multi échelle

La plupart des os sont une construction élaborée, composée d'une partie extérieure dense d'os compact, entourant un noyau d'os spongieux. Dans certains cas (comme aux joints entre vertèbres ou à la fin des os long) cette configuration minimise le poids de l'os tout en assurant une large surface d'appui. Dans d'autres cas (comme dans la crête iliaque par exemple), l'os forme une structure légère en sandwich (2 « feuilles » d'os compact entourant de l'os spongieux).

La surface des os n'est pas lisse ou uniforme. On y retrouve des bosses, des trous et des crêtes permettant aux muscles, tendons et ligaments de bien s'y ancrer, et servant de passage aux vaisseaux sanguins et aux nerfs.

## Etude bibliographique

La structure hiérarchisée d'un os long est montrée en figure 1 [2-3]. La macrostructure de cet os est composée d'os spongieux et d'os cortical.

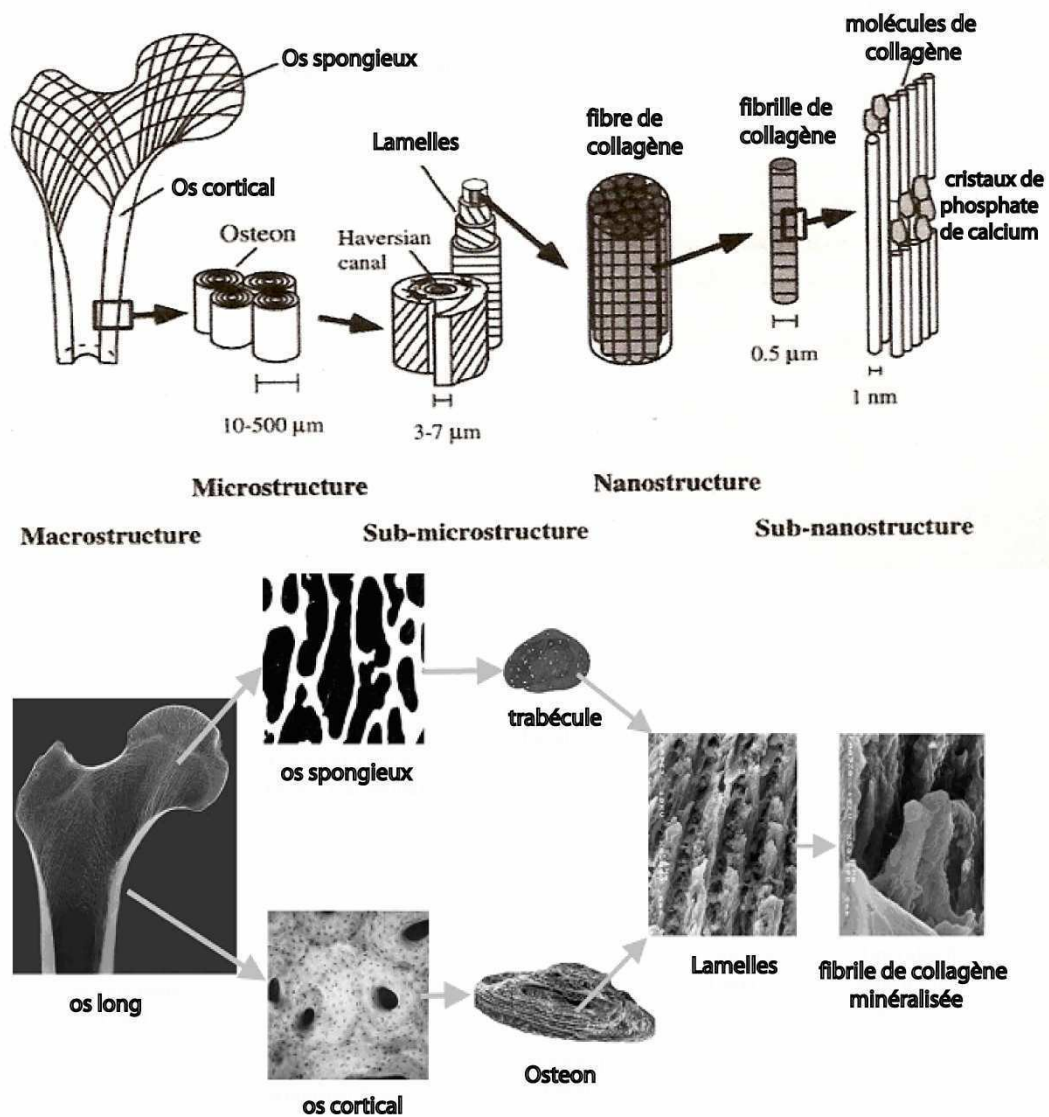


Figure A-1: Structure hiérarchisée de l'os [2-3]

D'après Hansen et al. [4] les os sont composés à 65% en volume d'hydroxyapatite et 35% de collagène, de cellules et d'eau. Le collagène type I de l'os est un matériau très flexible, de limite d'élasticité en traction très élevée et qui est constitué de longues chaînes d'acides aminés arrangées en une structure en triple hélice. Dans l'os, la structure cristalline de la phase inorganique d'hydroxyapatite forme un lien avec les molécules de collagène. Ces dernières s'assemblent pour former des fibrilles, qui elles même se rassemblent pour former des fibres de collagène qui s'organisent en lamelles. L'orientation des fibres dans les lamelles est anisotrope, ce qui amène une résistance des lamelles supérieure dans le sens des fibres. La partie minérale d'hydroxyapatite donne à l'unité basique de l'os de bonnes propriétés en compression tandis que le collagène lui apporte sa bonne flexibilité le long de la direction des fibres.



## Etude bibliographique

Afin de former l'os compact, les lamelles sont ensuite arrangées en structures tubulaires à parois épaisses appelées ostéons dans lesquels les mûrs sont constitués de plusieurs couches de lamelles. Les lamelles s'orientent selon l'axe de l'ostéon, c'est pour cela que les ostéons sont plus résistants à des forces appliquées sur leur longueur. La partie cavitaire centrale de cette structure est connue en tant que canal de Havers. Celui-ci contient un vaisseau sanguin qui apporte des nutriments à tout l'ostéon à travers de petits canalicules émanant du canal. Chaque ostéon est couvert par un mûr liant connu en tant que « ligne de ciment ». L'os mature est principalement constitué de beaucoup de ces sous systèmes, qui collectivement sont connus comme os haversien.

L'os spongieux, quant à lui, dérive de l'arrangement des lamelles en trabécules. Dans ce cas, les lamelles sont plates et forment une structure tubulaire. L'os spongieux est alors constitué d'un réseau interconnecté de tiges ou de plaquettes. Un réseau de tiges engendre des cellules ouvertes de faible densité alors qu'un réseau de plaquettes donne lieu à une structure plus dense de cellules virtuellement fermée. Dans la pratique, la densité relative de l'os spongieux varie de 0,05 à 0,7. La densité augmente lorsque les tiges s'élargissent et s'aplatissent pour former des plaquettes, et finalement fusionnent pour donner des cellules fermées [5].

### 3. Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques de l'os spongieux sont typiques de celles observées pour des matériaux cellulaires. La courbe représentant la déformation en fonction de la force appliquée en compression d'un os est constituée de trois stades caractéristiques (figure 2).

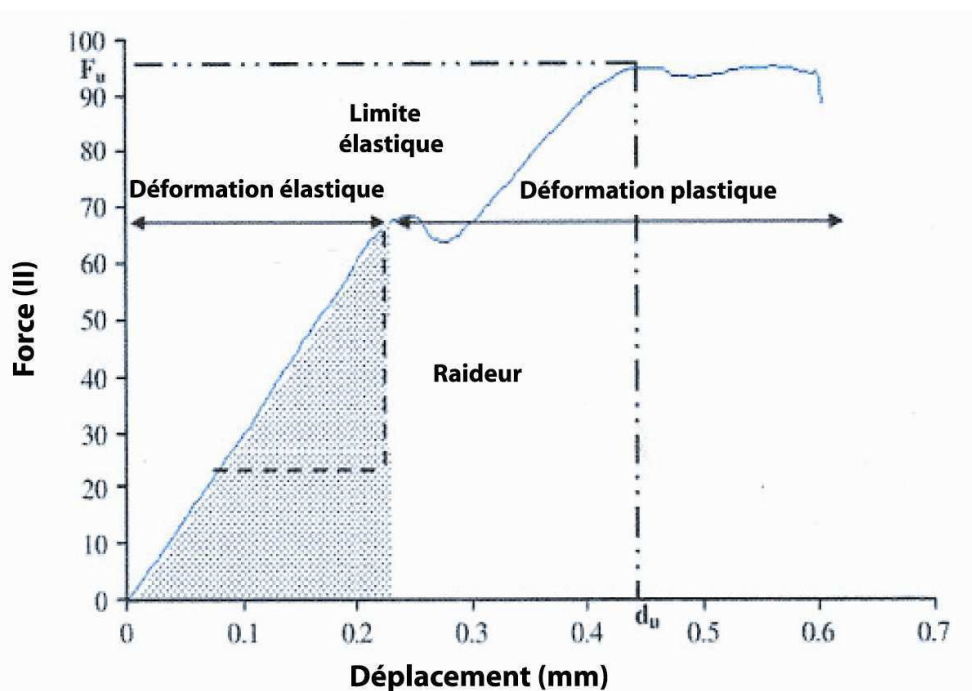


Figure A-2 : Courbe force-déplacement typique de l'os, où  $F_u$  est résistance maximale à la rupture,  $d_u$  le déplacement final, et la raideur, la pente du segment linéaire de la courbe [6]

Lorsqu'on augmente la force appliquée, le premier régime est élastique linéaire, le second est une déformation dite « plastique », avec endommagement, et enfin, le troisième est une

## Etude bibliographique

densification du matériau. De plus, le module et la résistance de l'os spongieux varient avec la densité comme ce qui observé dans les mousses [4].

Les os sont constamment soumis à des forces de compression, de tension et de flexion lors des activités quotidiennes [7-9]. L'adaptation de l'os spongieux aux chargements en compression et en tension *in vivo* entraîne l'alignement des trabécules en direction de l'axe principal de contrainte. Les chargements conduisant à un trauma ne sont pas alignés sur cet axe et pour cela conduise à des fractures par cisaillement. Beaupied et al. [6] ont donné un descriptif des tests mécaniques et des protocoles expérimentaux utilisés pour prédire les mécanismes de fracture.

Les tests en torsion apportent des informations sur des paramètres mécaniques tels que le module et la force de torsion avant rupture. Ils peuvent être réalisés sur tout type d'os. Des os entier sont préférés lorsqu'on étudie de petits animaux. Le tableau 1 résume les valeurs obtenues par différents chercheurs ayant travaillé sur le sujet. A cause de l'anisotropie de l'os, ces tests sont réalisés dans différentes directions, habituellement le long des axes longitudinaux et transversaux des os. Vashishth et al. [9] ont montré que des chargements en torsion entraînaient des fractures en spirale sur l'os compact.

Type d'os	Direction	G (MPa)	R <sub>max</sub> (MPa)	R <sub>élastique</sub> (MPa)
spongieux (tibia bovin)	Longitudinale	349 ± 128	6,35 ± 2	4,24 ± 1,42
	Transverse	296 ± 103	4,92 ± 1,48	3,26 ± 0,99
Dense (tibia bovin)	Longitudinale		84 ± 7	68 ± 7
Spongieux (tête fémorale humaine)	Axe de charge principal	289 ± 183	6,1 ± 2,7	4,3 ± 1,9

Tableau A-1 : Résultats des tests de torsion [9-11]

Des tests en compression et en traction sont également utilisés. Les tests en compression sont préférés car ils reproduisent les forces qui sont subies par le squelette *in vivo*. Le tableau 2 résume les valeurs obtenues avec ces tests par différentes études. Des différences significatives existent entre les paramètres mécaniques obtenus lors de tests de compression et de traction. Par exemple, la limite élastique de l'os spongieux diffère lors de la traction et de la compression [13], et la résistance en traction est environ 50% inférieure à la résistance en compression [12]. Des différences similaires sont obtenues pour l'os compact. Dans des tests sur les diaphyses fémorales humaines, Kaneko et al. [15] ont trouvé que la limite élastique, la résistance maximale à la rupture, le module d'Young et la déformation élastique sont plus faibles en traction qu'en compression. Parallèlement, la déformation à la rupture est plus importante en traction. Enfin, la déformation plastique d'un os compact est plus marquée en traction qu'en compression.

La plupart des études de la résistance en traction de l'os compact montre que les propriétés mécaniques sont corrélées à la porosité [17]. De plus, dans une étude des propriétés élastiques de l'os compact, Dong et al. [14] ont évalué la résistance en traction en utilisant des tests de traction dans les directions longitudinale et transversale. L'élasticité suivant l'axe longitudinal est corrélée à la porosité, alors que l'élasticité le long de l'axe transversale ne l'est pas. De plus, l'os compact est caractérisé par une élasticité isotrope transverse: ces propriétés élastiques sont identiques dans les directions anteroposterieures et médiale-latérales mais différentes dans la direction longitudinale.

## Etude bibliographique

Type d'orientation osseuse	Test	E (GPa)	R <sub>max</sub> (MPa)
Os spongieux			
Bovin	Compression	2,64 ± 1,08	30,9 ± 11,4
Tête fémorale humaine	Compression	1,88 ± 2,8	
Bovin	Traction	2,61 ± 1,04	15,6 ± 3,2
Os cortical			
Transverse	Traction	9,55 ± 1,36	
Longitudinal	Traction	16,61 ± 1,83	
Longitudinal	Traction	22,7 ± 1,7	95,6 ± 10,9
Longitudinal	Compression	23 ± 1,8	161,8 ± 5,9
	Compression	1,76 ± 0,72	

**Tableau A-2 : Résultats des tests de compression et de traction (module d'Young (E) et résistance maximale à la rupture (R<sub>max</sub>)) [12-16].**

Les tests de flexion sont utiles pour évaluer la résistance mécanique d'os de petits animaux, comme les rats, qui sont difficiles d'utilisation lors de tests de compression ou de traction. Les tests de flexion génèrent à la fois des forces en compression et en tension. Le tableau 3 résume les valeurs obtenues avec ces tests par différentes études. Les données de force et de déplacement enregistrées lors du test sont utilisées en combinaison avec les paramètres géométriques de l'os pour en déduire ses propriétés mécaniques. L'aire transversale et la forme sont considérées comme constantes le long de l'axe longitudinal de l'os. Bien que cette hypothèse ne soit pas vérifiée, ces tests sont utiles par comparaison des résultats obtenus entre différentes études.

Les tests de flexion trois point sont couramment utilisés sur des os long de rongeurs pour différencier les espèces [18] et pour tester les effets de traitement sur les propriétés mécaniques [19]. Les différences de propriétés mécaniques sur les différents sites osseux dans le même animal sont étudiées. Dans des souris, Jämsä et al. [20] ont trouvé des valeurs de forces à la rupture, déformation à rupture, raideur et module d'Young plus élevées dans le tibia que dans le fémur. Les tests flexion 4 points [21-23] ou cantilever peuvent être utilisés sur toute la longueur des os ou sur des échantillons d'os cortical ou spongieux.

Test	Type d'os	E(GPa)	$\alpha_u$ (MPa)	R (N/mm)	F <sub>u</sub> (N)
3 points	Fémur d'un rat femelle	9,3 ± 0,7	133 ± 5		
3 points	Fémur de souris	1,92 ± 0,52	123 ± 23	70 ± 19	19,9 ± 4
4 points	Tibia humain	17 ± 1,7	131 ± 6		
4 points	Metacarpeal de chien	11,25 ± 1,49	356 ± 30	932 ± 190	624 ± 124
« cantilever »	Fémur de rat			105 ± 10	

**Tableau A-3 : Résultats des test de flexion : module d'Young (E), contrainte à la rupture ( $\alpha_u$ ), raideur (R) et force maximale à la rupture (F<sub>u</sub>). [18-22]**

Ces différents tests montrent la grande variété des propriétés mécaniques des os, dues à leur caractère « vivant », adaptable aux contraintes subies. De plus, il ne faut pas oublier que les propriétés mécaniques de l'os dépendent du taux d'humidité, un os extrait du corps humain et séché aura des propriétés mécaniques supérieures à celles d'un os en contact avec les fluides du corps.

#### 4. Remodelage osseux

Le tissu osseux doit permettre la formation adaptée du squelette durant la croissance, la conservation de ses propriétés mécaniques et leur adaptation aux contraintes, la réparation des fractures et la mise à disposition du calcium qu'il stocke. Pour assurer ces propriétés, l'os est en perpétuel renouvellement : c'est le remodelage osseux. Au cours du remodelage osseux, l'os ancien est détruit ou résorbé par des ostéoclastes et remplacé par de l'os nouveau généré par des ostéoblastes [24]. Dix pour cent de l'os du squelette adulte est renouvelé chaque année. Le remodelage a lieu dans une structure définie appelée unité multicellulaire de base (BMU) qui a pour dimensions 1 à 2 mm de long et 0,2 à 0,4 mm de large. Chez l'adulte, à tout moment, environ un million de BMUs sont activées. Dans l'os cortical, les BMUs progressent à la façon d'un tunnelier creusant l'os en front et résynthétisant de l'os neuf à l'arrière [25]. Dans l'os trabéculaire, les BMUs traversent de part en part l'os et forment une tranche neuve. Les acteurs principaux du remodelage osseux, les ostéoclastes et les ostéoblastes, agissent de façon exactement orchestrée dans l'espace et dans le temps. La durée de vie d'une BMU est de 6 à 9 mois, période durant laquelle les ostéoclastes et les ostéoblastes doivent être recrutés en permanence. Le cycle débute par l'activation des précurseurs des ostéoclastes et leur différenciation. Ceux-ci détruisent la matrice osseuse puis entrent en apoptose. Parallèlement les précurseurs ostéoblastiques sont activés et les ostéoblastes se différencient [24]. Ils synthétisent, en arrière du front des ostéoclastes, l'os neuf et remplissent d'abord la cavité de matrice extracellulaire organique, la matrice ostéoïde, qui ensuite se minéralise. Une partie des ostéoblastes meurt par apoptose ; l'autre partie devient des ostéocytes inclus dans la matrice osseuse et des cellules bordantes qui recouvrent la surface de l'os à l'état quiescent. La façon dont les BMUs choisissent les zones à résorber et à reconstruire est encore peu connue. Une piste pourrait être la piezoélectricité de l'HAP.

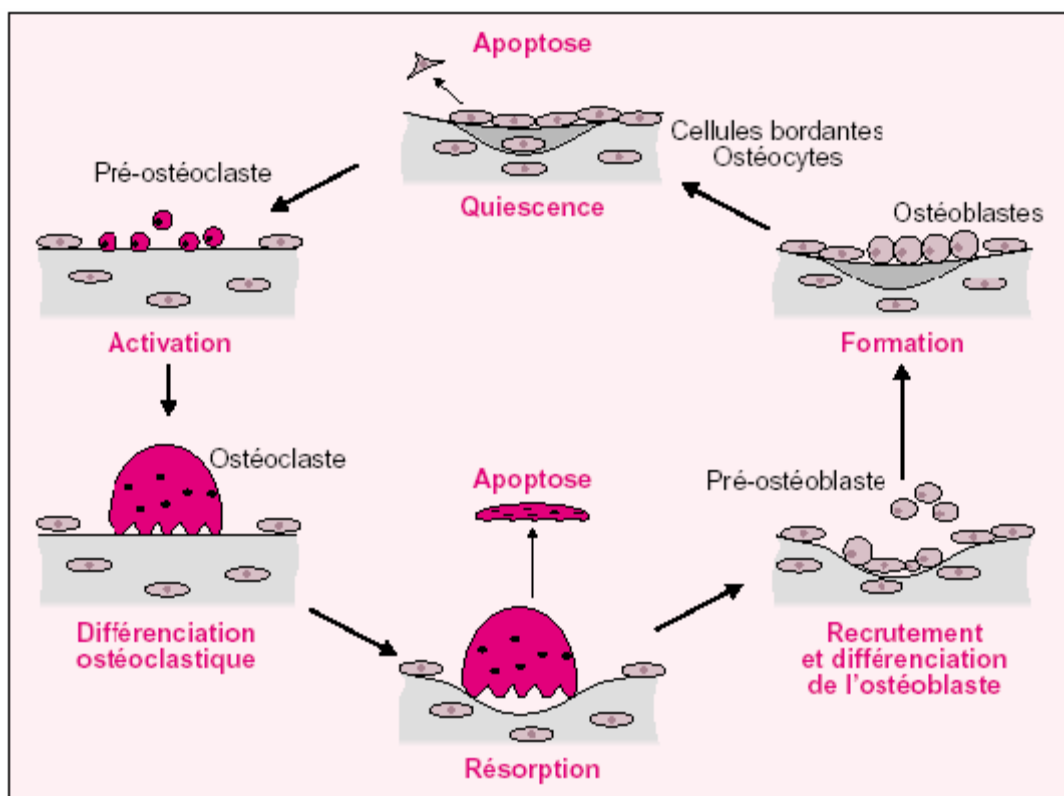


Figure A-3: Le cycle du remodelage osseux [26].

## A-1-II La substitution osseuse

Dans quelques cas le système osseux peut être déficient, il apparaît alors un besoin de substitution osseuse. De plus, le traitement de complication post-traumatique du squelette, tels que des retards de consolidation de fracture, des pseudarthroses et des cals vicieux est un déficit. La greffe osseuse est généralement recommandée pour stimuler la guérison de l'os. En outre, les fusions spinodales, le comblement de défauts suivant l'extraction de tumeurs osseuse et plusieurs maladies congénitales requièrent une greffe osseuse. Il existe plusieurs méthodes pour reconstruire des défauts osseux telles que les autogreffes, les allogreffes, l'utilisation de la matrice osseuse déminéralisée (DBM), l'aspirat de moelle osseuse autologue, des protéines osseuse morphogénétiques et plusieurs autres facteurs de croissance osseux, ainsi que des substituts osseux synthétiques [27].

---

### 1. La greffe osseuse

La substitution osseuse la plus évidente consiste à remplacer l'os déficient par un autre os. Ce dernier peut provenir du patient lui-même (Autogreffe), être prélevé sur des cadavres (allogreffe) ou sur des animaux (xéno greffe). Les xéno greffes sont évitées à cause des problèmes de biocompatibilité.

Un implant destiné à la régénération osseuse doit présenter quatre propriétés essentielles [28]: l'ostéogénèse (formation d'os nouveau et de tissu osseux par les cellules contenues dans le greffon), l'ostéoinduction (activation de la formation d'os nouveau par les tissus environnants du receveur), l'ostéoconduction (création d'un nouveau système haversien et vascularisation) et l'ostéointégration (liaison intime entre l'implant et l'os hôte).

La greffe osseuse est la seconde transplantation de tissus la plus commune après la transfusion sanguine. Plus de 500 000 procédures de greffe osseuse ont lieu annuellement aux Etats-Unis et 2,2 millions dans le monde pour réparer les défauts de l'os en orthopédie, neurochirurgie et dans le dentaire

L'autogreffe, ou l'utilisation de l'os autologue apporte des propriétés idéales d'ostéoconduction, d'ostéointégration et d'ostéoinduction. La crête iliaque est le site donneur le plus fréquemment utilisé car il apporte un accès facile à un os spongieux de très bonne qualité et en grande quantité. Le prélèvement d'os autologue de la crête iliaque a cependant plusieurs inconvénients puisqu'il augmente la durée de l'intervention chirurgicale et amène souvent des douleurs résiduelles et des désavantages esthétiques. De plus, la plupart des éléments cellulaires, tels que les cellules ostéogéniques ne survivent pas à l'implantation. D'autres limitations apparaissent pour des patients âgés et avec des maladies malignes. Enfin, le prélèvement de greffe autologue est associé à des complications telles que la formation d'hématomes, la perte de sang, la blessure de nerfs ou d'artères, la formation d'hernies, des infections, des fractures etc... pour 8 à 20% des cas.

L'allogreffe est la substitution osseuse la plus utilisée après l'autogreffe. Son utilisation a augmenté considérablement durant ces dix dernières années et compte pour à peu près 1/3 des greffes d'os réalisées aux Etats-Unis. Ce type de greffe consiste à utiliser un os provenant de cadavres. Cette dernière solution présente l'avantage d'être biocompatible, cependant elle peut

transmettre des maladies et est dépendante de la disponibilité des greffons. Pour palier le risque de transmission de maladies, on utilise des banques d'os lyophilisés. Ce type de greffon est prélevé sur des cadavres ou lors d'une ostéotomie, lavée et lyophilisée. Les cellules sont donc éliminées et il n'y a théoriquement plus de risque de transmission de maladie. Par contre le problème de disponibilité est toujours présent.

---

## 2. Substituts osseux synthétiques

### a) Définition

Les substituts osseux synthétiques sont des matériaux dérivés de la nature (corail par exemple) ou des matériaux synthétisés par la main de l'homme (céramiques ou polymères). Ils peuvent s'utiliser sous forme dense, de suspension injectable (ciments) ou de blocs poreux. Les matériaux utilisés peuvent être résorbable ou stable.

### b) Cahier des charges

La qualité essentielle que doit avoir un biomatériau est la biocompatibilité. Elle est étudiée par des tests *in vivo* sur animaux.

D'autres tests doivent de même permettre de connaître pour chaque matériau son pouvoir favorisant ou inducteur de la repousse osseuse. Il doit donc être possible de connaître sa biofonctionnalité de façon à pouvoir l'appliquer dans tel cas précis parfois dans un but mécanique mais le plus souvent en « suppléance » de la repousse osseuse.

Les structures poreuses sont favorisées car elles apportent une fixation à l'interface par la repousse des tissus dans les pores à la surface ou à travers l'implant. Cet attachement est appelé fixation biologique. Elle est capable de supporter des états de contrainte plus complexe que dans le cas des implants denses, presque inertes qui ne permettent qu'une fixation morphologique. Une bonne fixation biologique demande des pores de diamètre supérieur à 100-150 $\mu$ m pour apporter une vascularisation vers le tissu hôte [29].

Dans le cas de matériaux destinés à l'ingénierie tissulaire, Huttmacher [30] a résumé les besoins pour un échafaudage destiné à l'ingénierie des tissus musculosqueletaux. Idéalement, la structure pour cette application doit avoir les caractéristiques suivantes :

- Elle doit être tridimensionnelle et très poreuse avec une structure de pores interconnectée pour la croissance cellulaire et le transport des nutriments et déchets métaboliques ;
- Elle doit être biocompatible et biorésorbable avec des vitesses de dégradation et de résorption contrôlées pour corréliser la croissance des tissus et des cellules *in vitro* et *in vivo*.
- Elle doit avoir une chimie de surface appropriée pour l'accrochage, la prolifération, et la différenciation cellulaire ;
- Elle doit posséder des propriétés mécaniques s'approchant de celles des tissus au site d'implantation

Par ailleurs ces produits doivent répondre aux problèmes pratiques concernant le stockage, la façon de les stériliser sans que leurs propriétés s'en trouvent modifiées. Ils doivent être aisés à «

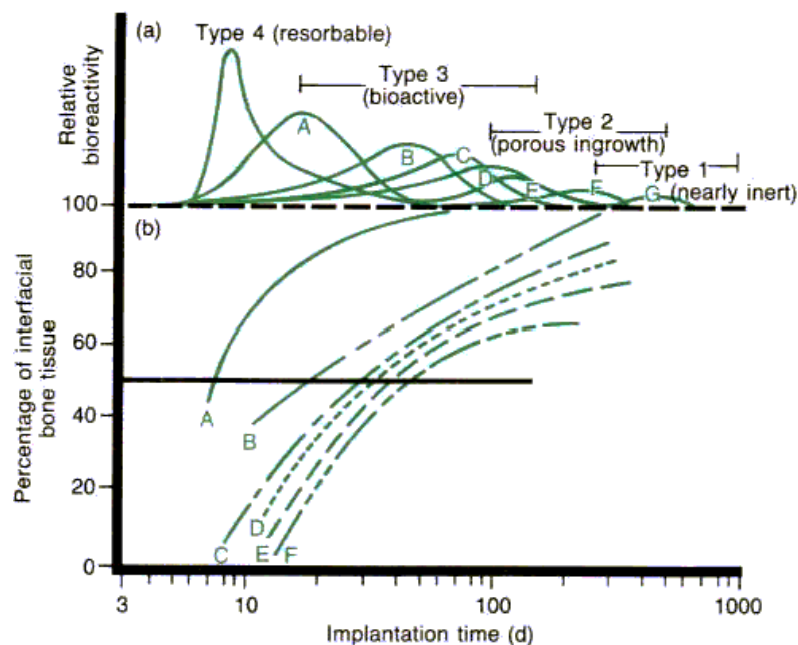
## Etude bibliographique

travailler» pour pouvoir s'adapter ou s'appliquer à de multiples utilisations. Enfin il ne faut pas oublier le problème économique ; ces matériaux ne doivent pas sous prétexte qu'ils sont d'usage médical être de prix prohibitif.

La recherche de substituts osseux synthétiques s'est rapidement tournée vers l'utilisation de céramiques. Cette dernière classe de matériau présente l'avantage d'être d'une grande dureté et de n'être pas soumis aux phénomènes de corrosion, comme dans le cas des métaux. On a tout d'abord cherché à utiliser des matériaux les plus inertes possibles tels que l'alumine par exemple. Ces matériaux étaient biocompatibles mais une capsule fibreuse non adhérente se formait à l'interface entre l'implant et l'os empêchant une liaison intime et forte avec l'os. Les recherches se sont alors tournées vers les matériaux bioactifs, c'est-à-dire ceux capables à la fois de former une liaison intime avec l'os et de favoriser la repousse osseuse.

### c) Le concept de bioactivité

Le concept de la bioactivité a été défini de la manière suivante : un matériau bioactif induit une réponse biologique spécifique à l'interface du matériau qui conduit à la formation d'un lien entre les tissus et le matériau. Un matériau bioactif crée donc un environnement compatible à la croissance de l'os (ostéogénèse) avec le développement d'une interface minérale qui joue le rôle d'un lien naturel entre les matériaux vivant et non vivant. Ce concept a été maintenant étendu pour inclure un grand nombre de matériaux bioactifs avec une large gamme de vitesse de liaison et d'épaisseur de la couche de liaison interfaciale. Ils incluent des verres bioactifs tels que le bioverre 45S5, des vitrocéramiques bioactives telles que l'apatite/wolastonite (A/W), des céramiques denses en phosphate de calcium tels que l'hydroxyapatite synthétique (HA), des composites bioactifs comme un mélange polyéthylène-hydroxyapatite (PE-HA), et une série de matériaux bioactif de revêtement. Les matériaux résorbables comme le phosphate tricalcique (TCP) sont également bioactifs. Cependant, il faut que leurs vitesses de résorption soient du même ordre de grandeur que la vitesse de formation de l'os. On utilise souvent ce type de matériaux en combinaison avec des céramiques bioactives plus stable (HA-TCP) [31].



**Figure A-4: Spectre bioactif pour divers implants en biocéramiques.(a) degrés relatifs de bioactivité et (b) dépendance du temps dans la formation d'un lien avec l'os à l'interface de l'implant. [(A) 45S5 bioglass. (B) Mina 13 Ceravital, (C) 55S4.3 Bioglass, (D) A/W glass ceramic, (E) HA, (F) KGy 213 Ceravital] [31]**

## Etude bibliographique

La figure 4 montre le spectre bioactif pour divers implants composés de céramiques bioactives.

Le degré de bioactivité d'un matériau spécifique peut être corrélé au temps pour lequel plus de 50% de l'interface est lié. Un indice de bioactivité a été introduit par Hench [32] comme étant:  $I_B = 100/t_{0,5bb}$  où  $t_{0,5bb}$  est le temps pour lequel plus de 50% de l'interface de l'implant est liée à l'os (en jours).

Tous les résultats des tests *in vivo* et *in vitro* montrent que la seule caractéristique commune aux matériaux d'implants bioactifs est la couche biologiquement active d'hydroxyapatite carbonatée qui se forme à leur surface. Cependant, les grandes différences des vitesses de liaison de l'os aux implants bioactifs indiquent que différents facteurs biochimiques sont mis en œuvre à l'interface implant tissu.

Chaque type d'implant bioactif induit une interaction avec les tissus environnants. Deux types d'interactions peuvent se dérouler:

- Une interaction extracellulaire, qui est déterminée par les propriétés de surface du matériau. Cette interaction permet l'adsorption à la surface de l'implant de diverses substances biologiques (facteurs de croissance, enzymes) présentes dans l'os. C'est le cas par exemple d'un implant comportant une surface de porosité nanométrique et contenant des silanols chargés négativement. L'adsorption de protéines est suivie par la coagulation et l'activation du système complémentaire et de l'adhésion cellulaire. L'interaction entre les récepteurs ostéoblastiques et les ligands correspondant aux protéines à la surface contribuent à l'adhésion cellulaire. A la surface de l'implant, les protéines adsorbées, comme les facteurs de croissance de l'os et les enzymes activées, ont un effet direct sur la différenciation et la prolifération cellulaire. Les configurations topographiques de la surface du matériau ont également un large effet sur le comportement cellulaire et la réponse des tissus. Green et al. ont montré que des cellules adsorbées sur des mailles de 2 et 5  $\mu\text{m}$  ont augmentés les vitesses de prolifération et la densité des cellules. Ce résultat montre que la taille et l'agencement des cristaux d'HCA sur la surface du matériau bioactif pourrait avoir un effet sur la différenciation des cellules souches [33].
- Une interaction intracellulaire qui conduit à une ostéogénèse et à un lien stable avec les tissus mous. Cette interaction se retrouve dans le cas des verres avec des  $I_B$  les plus grands à cause du relargage de silices solubles de leur surface. Des études menées par Keeting et al. montrent que les siliciums solubles sont des mitogènes efficaces pour des cellules ostéoblastiques humaines, ils augmentent la synthèse d'ADN et induisent l'activité des phosphatase alcaline et le relargage d'ostéocalcines [34]. Vrouwenvelder et al. démontrent que les cellules ostéoblastiques se divisent plus rapidement sur des substrats à base de bioverre que sur de l'hydroxyapatite synthétique [35]. Des études récentes sur des poussins et des rats effectuées par Carlisle montrent que l'os grandit rapidement en présence de silice, alors qu'un environnement déficient en silice retarde la croissance osseuse [36]. Tous ces résultats indiquent que les silices solubles jouent un rôle important dans la réparation des tissus et l'ostéogénèse.

En 1994, une nouvelle classification fut proposée, dans laquelle les matériaux bioactifs sont classés en deux types [37]:

1. Classe A, matériaux ostéoprotecteur. L'ostéoprotection a été défini par Wilson comme le procédé par lequel une surface bio active est colonisée librement par des cellules souches ostéogénique dans un environnement défectueux après une intervention chirurgicale. La



## Etude bibliographique

bioactivité de classe A intervient lorsque le matériau implique à la fois des réponses intracellulaires et extracellulaires à son interface. Des verres bioactifs de classe A peuvent se lier avec l'os et le tissu mou. Les siliciums solubles pourraient également induire un effet intracellulaire sur le collagène ou sur la réticulation des polysaccharides, qui mènent à une liaison étanche entre la couche minérale d'apatite et les fibres de collagène.

2. Classe B, matériau osteoconducteur. Les implants osteoconducteurs apportent simplement une interface biocompatible à travers laquelle l'os migre.  
La bioactivité osteoconductrice apparaît lorsqu'un matériau induit uniquement une réponse extracellulaire à son interface.

Sur toute la gamme de matériaux bioactifs qui existe, seuls quelques verres bioactifs de  $I_B$  élevé présentent une bioactivité osteoproductrice. Les implants d'hydroxyapatite synthétique sont osteoconducteurs ; c'est-à-dire qu'ils ont une bio activité de classe B, leur relargage de silices solubles est faible et ne peuvent pas former un lien stable avec les tissus mou. Le bioverre 45S5, un matériau bioactif de classe A, est à la fois osteoproducteur et osteoconducteur.

### d) Verres bioactifs

Les composés de base dans la plupart des verres bioactifs et des vitro céramiques, synthétisés par fusion à haute température, moulage et frittage, sont  $SiO_2$ ,  $Na_2O$ ,  $CaO$ ,  $P_2O_5$ . La première et le plus étudiée des composition est celle du bioverre 45S5, qui contient 45%  $SiO_2$ , 24,5%  $Na_2O$ , 24,5%  $CaO$  et 6%  $P_2O_5$  en pourcentage massique.

Une série de verres a été étudiée dans un système de ces quatre composés avec une concentration en  $P_2O_5$  constante et égale à 6%. L'influence de la composition sur la liaison biologique dans ce système est montrée sur la figure 5 [33,38].

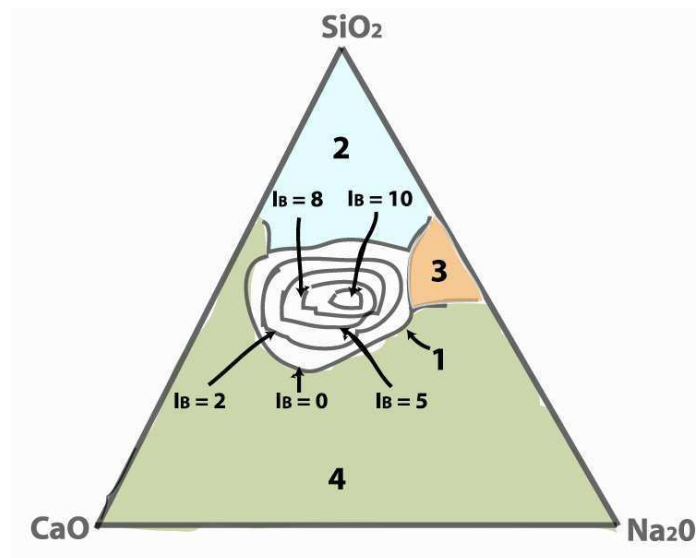


Figure A-5: Influence de la composition sur l'indice de bioactivité

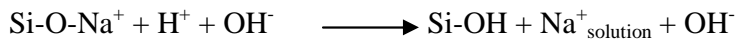
Les lignes Iso  $I_B$  montrent des compositions d'indice de bio activité équivalent. Dans la région 1, les verres sont bioactif et se lient à l'os. Les verres situés en 2 sont quasi inertes et donnent lieu à une capsule fibreuse à l'interface implant-tissu. Les verres en 3 sont totalement résorbés en 10-30 jours dans le corps. Les compositions situées en région 4 ne sont pas techniquement réalisables et n'ont jamais été implantés. Au centre de la région 1 se trouve une

## Etude bibliographique

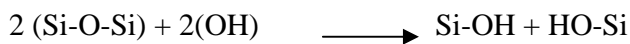
plus petite région ( $I_B = 8$ ), dans laquelle les constituants du collagène du tissu mou peuvent adhérer fortement aux verres bioactifs.

Comme nous l'avons vu précédemment, une caractéristique commune des matériaux bioactifs est une modification de la surface de l'implant dépendante du temps qui se produit après implantation. La séquence des 11 réactions qui se déroulent à la surface du verre bioactif permettant la création d'un lien avec l'os qui se forme est [38]:

**Etape 1** : Echange rapide de cations alcalins avec les  $H_3O^+$  du milieu physiologique.



**Etape 2** : Perte de silice soluble sous la forme de  $Si(OH)_4$  vers la solution. Les liaisons Si-O-Si se rompent et on a formation de SiOH à l'interface verre/solution.



**Etape 3** : Condensation et repolymérisation d'une couche à la surface riche en  $SiO_2$  qui est appauvri en cation alcalins ou alcalino terreux.



**Etape 4** : Migration de  $Ca^{2+}$  et  $PO_4^{3-}$  vers la surface à travers la couche riche en  $SiO_2$  pour former un film riche en  $CaO-P_2O_5$  au dessus de la couche de  $SiO_2$ . Cette migration est suivi par la croissance d'un film amorphe riche en  $CaO-P_2O_5$ , par incorporation progressive de calcium et phosphate soluble provenant de la solution.

**Etape 5** : Cristallisation du film amorphe riche en  $CaO-P_2O_5$  par incorporation de  $OH^-$ ,  $CO_3^{2-}$  pour former une couche d'hydroxyapatite carbonatée (HAC).

**Etape 6** : Absorption de substances biologiques dans la couche d'HAC

**Etape 7** : Action des macrophages

**Etape 8** : Attachement de cellules souches

**Etape 9** : Différenciation des cellules souches

**Etape 10** : Génération de la matrice osseuse

**Etape 11** : Cristallisation de la matrice

Les cinq premières réactions qui se déroulent à la surface du verre bioactif ne dépendent pas de la présence de tissus. Elles peuvent se dérouler dans de l'eau distillée, des solutions tamponnées au TRIS ou dans le SBF, et ont été largement étudiées [39-40]. Ces réactions permettent de former une couche d'hydroxyapatite carbonatée (HCA) cristallisée à la surface de l'implant. Les étapes 6-11 sont nécessaires pour que l'implant se lie aux tissus et sont similaires aux étapes de remodelage osseux.

Certaines études montrent que l'adsorption de protéines se déroule lors des quatre premières étapes [41]. Elle contribuerait à la nature biologique de la couche d'HAC obtenue. *In vitro*, cette couche de phosphate de calcium cristallise en formant une couche d'hydroxyapatite carbonatée dans une période de trois à six heures. Cette surface étant chimiquement et structurellement proche de celle de l'os naturel, les tissus humains sont capables de s'y attacher directement. Puis cette couche d'hydroxyapatite carbonatée s'épaissit pour former une zone liante de 100 à 150  $\mu m$  et donc une interface mécaniquement accommodante essentielle pour le maintien d'un lien bioactif de l'implant avec le tissu naturel. Ces réactions de surface se

## Etude bibliographique

déroulent lors des 12 à 24 premières heures d'implantation ainsi, pendant ce temps, les cellules ostéogéniques, comme les ostéoblastes ou les cellules souches mésenchymales, viennent infiltrer le défaut osseux. Ces cellules rencontrent alors une surface identique à celle de l'os contenant des composés organiques et non une surface étrangère. Cette série d'évènements permet aux bioverres de participer au processus de réparation en créant un lien direct entre le matériau et les tissus. Les procédés normaux de réparation et de régénération du corps humain débutent après que cette couche de surface ait commencé à se former. Les bioverres minimiseraient le temps de réponse des macrophages et des réactions inflammatoires qui accompagnent un traumatisme en incluant la chirurgie.

La vitesse des réactions de surface est contrôlée par la composition du matériau. Pour des verres jusqu'à 53% molaire de  $\text{SiO}_2$ , la cristallisation de HCA se fait très rapidement à la surface du verre, en 2h. Ces compositions développent rapidement une liaison avec l'os et forment également une liaison adhérente, interdigitée du collagène avec les tissus mous. Des verres contenant entre 53 et 58 % molaire de  $\text{SiO}_2$  ont besoin de 2 à 3 jours pour former une couche d'hydroxyapatite cristallisée. Les compositions contenant plus de 60% molaire de  $\text{SiO}_2$  ne forment pas de couche d'hydroxyapatite cristallisée même après quatre semaines dans le SBF [42]. Ces chiffres ont été obtenus sur des verres synthétisés par trempe depuis l'état liquide.

Certains composés comme  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ou  $\text{ZrO}_2$  par exemple peuvent inhiber le processus de liaison avec l'os [43-44]. Cet effet négatif des ions  $\text{Al}^{3+}$  sur le processus de liaison avec l'os est attribué à une augmentation de la résistance à l'échange d'ions lors des réactions de surface, à la précipitation d'ions multivalents comme les oxydes, hydroxydes ou les carbonates, et au saut du point isoélectrique de la surface du négatif au positif au pH physiologique [45-46].

Les faibles propriétés mécaniques des verres bioactifs monophasés réduisent les applications cliniques à des situations de structure non porteuse. Un des moyens pour résoudre ce problème est de préparer des vitro céramiques par cristallisation du verre.

La synthèse de bioverre par la méthode sol-gel permet d'obtenir des verres bioactifs avec plus de 60% de silice. En effet cette technique permet d'obtenir des verres bioactifs contenant jusqu'à 88% molaire en silice. Le procédé sol-gel est une méthode chimique permettant de produire des céramiques, des verres, des vitrocéramiques et des composites à des températures très inférieures à celles utilisées lors des procédés traditionnels. Ce procédé a donc été utilisé pour produire une nouvelle génération de verres bioactifs [47-49]. Sept étapes sont impliquées dans l'élaboration de verres par cette méthode. (cf. figure 6)[50].

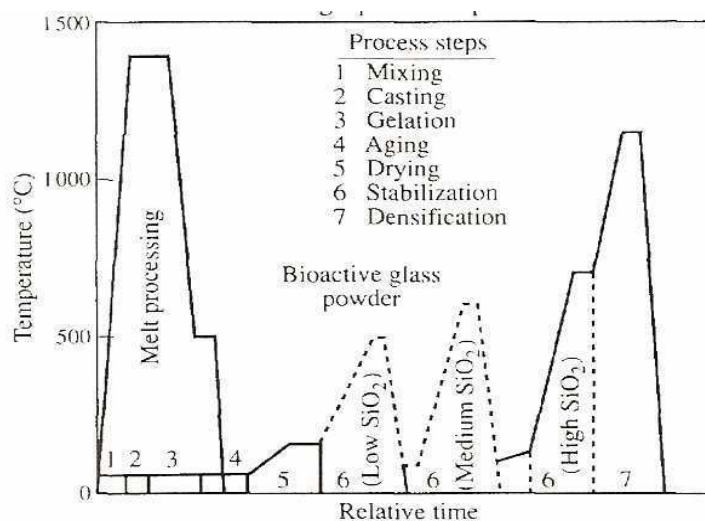


Figure A-6: Les 7 étapes du procédé sol-gel [4]

## Etude bibliographique

Les verres élaborés de manière traditionnelle ayant plus de 55% de  $\text{SiO}_2$  ne développent une couche polycristalline d'HCA qu'après plusieurs jours alors que les verres obtenus par sol-gel le font en cinq minutes d'exposition à une solution physiologique [50]. Les principales différences entre la chimie de surface des verres traditionnels et des verres dérivés du procédé sol-gel sont :

- Les verres sol-gel ont une fraction volumique de nanoporosité plus importante à leur surface.
- Les verres sol-gel comportent de grande concentration en ions silanols à leur surface.
- Les verres sol-gel ont des cercles siloxane à leur surface

Ainsi, la bioactivité des verres sol-gel peut être contrôlée par la régulation des la chimie de surface, comme le taux de relargage des siliciums solubles et la topographie de surface. Des verres  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  dérivés d'alkoxydes par la méthode sol-gel ont une large gamme de compositions bioactives par rapport aux verres ou céramiques élaborées par des méthodes traditionnelles.

## Chapitre A - 2 : Le bioverre 45S5

- A-2-I Composition et Synthèse 25
- A-2-II Interaction tissu-bioverre 26
  - 1. Tests biologiques 26
    - a) Tests in vitro 26
      - i. Culture cellulaire 26
      - ii. Formation de la couche d'HAC 27
    - b) Tests in vivo 27
  - 2. Osteoinduction 28
  - 3. Relargage ionique et évolution de pH 30
- A-2-III Applications actuelles du bioverre 45S5 29
- A-2-IV Evolution des bioverres lors de traitements thermiques 32

---

En 1969, une question a été posée par l'US Army Medical Research and Development : serait-il possible de préparer un biomatériau qui se lierait chimiquement dans les tissus hôtes ? Dans le cadre de ce projet, L.L Hench [51] a mis au point le premier matériau bioactif, présentant une liaison intime avec l'os. Le bioverre 45S5 est un matériau à base de  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$  et  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Ce verre a la propriété de développer à sa surface, lorsqu'il est immergé dans le milieu physiologique, une couche d'hydroxyapatite carbonatée (HAC). Cette couche d'HAC permet à l'implant de s'accrocher de manière stable au milieu extérieur. C'est le verre le plus utilisé et le plus bioactif, il permet un accrochage chimique en environ 12h.

---

### A-2-I Composition et Synthèse

Le bioverre 45S5 de Hench est composé de 45% de  $\text{SiO}_2$ , 24.5% de  $\text{Na}_2\text{O}$ , 24.5% de  $\text{CaO}$  et 6% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  en pourcentage massique. Comme tous les verres, le 45S5 contient un agent vitrifiant ( $\text{SiO}_2$ ), un fondant ( $\text{Na}_2\text{O}$ ) permettant de baisser la température de fusion du verre et un « stabilisateur » ( $\text{CaO}$ ). Par contre ce bioverre diffère par son contenu en phosphore et par les proportions d'oxydes alcalins et alcalino terreux, rendant le verre instable d'un point de vue hydrolytique, c'est-à-dire pouvant se dissoudre rapidement dans les fluides de l'organisme vivant, accélérant ainsi sa résorption. Le phosphore favorise la nucléation de la phase de phosphate de calcium.

## A-2-II Interaction tissu-bioverre

Les interactions tissu-bioverre déterminent l'intégration du bioverre à son environnement (biointégration). Plusieurs paramètres jouent un rôle important dans cette interaction : on a coutume de distinguer l'ancrage mécanique, qui assure la stabilité initiale de l'implant et l'ancrage chimique, qui détermine véritablement l'intégration de l'implant à l'organisme hôte.

Outre la qualité de l'acte chirurgical, divers facteurs morphologiques déterminent l'ancrage mécanique de l'implant. Une surface poreuse ou présentant un relief et des surfaces partiellement biodégradables résorbées de façon irrégulière est considérée propice à une intégration mécanique. Le bioverre 45S5 réunit ces propriétés et permet d'éviter la formation d'une capsule fibreuse épaisse à l'interface implant/tissu.

Lorsque le bioverre 45S5 est introduit en tant qu'implant, on assiste à la formation d'une apatite carbonatée analogue au minéral osseux qui forme un lien très fort entre l'os et l'implant. L.L. Hench a résumé les cinq étapes permettant la création de ce lien (cf. § verres bioactifs).

---

### 1. Tests biologiques

Les propriétés biologiques du bioverre 45S5 sont testées à la fois *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, la bioactivité et la biocompatibilité peuvent être mesurées par le suivi de la formation de la couche d'HAC à la surface du matériau et l'exposition du bioverre aux cellules. *In vivo*, on s'intéresse à la tolérance des animaux au matériau après implantation et aux mécanismes de liaison de l'implant avec l'os hôte.

La formation d'hydroxyapatite carbonatée à la surface du bioverre 45S5 peut être suivie par différentes techniques comme la spectrométrie infra rouge à transformée de fourrier (FTIR), la spectrométrie Raman, la diffraction des rayons X, la spectroscopie à dispersion d'énergie (EDS) et la microscopie électronique à balayage (MEB).

#### a) Tests *in vitro*

##### i. Culture cellulaire

Les tests *in vitro* avec mise en contact des cellules avec le matériau sont standardisés et consistent à cultiver des cellules sur le matériau et à mesurer sa cytotoxicité, en d'autres termes c'est une mesure du nombre de cellules qui vont être tuées par le matériau.

Dans le cas du bioverre 45S5 de L.L. Hench, les tests *in vitro* ont été réalisés par contact direct dans différents milieux. Le test par contact direct est le test le plus simple, un morceau du matériau est placé au dessus d'une couche de cellules. Les substances toxiques provenant du matériau peuvent diminuer la vitesse de croissance cellulaire ou endommager les cellules de différentes façons.

El ghannam et al. [52] ont montré que les osteoblastes mis en contact avec le bioverre 45S5 catalysent la formation de la couche d'HAC cristallisée. Les 11 réactions induites par l'exposition du bioverre au fluide biologique et conduisant à la formation de l'HAC se réalisent alors en parallèle et l'adsorption de protéine commence au début de la dissolution du matériau. Ils

montrent également que l'adsorption de protéine de sérum dans cette couche favorise l'adhésion, la prolifération et l'expression cellulaire [53]. Les cellules adhèrent à la surface du verre pour former une couche d'ostéoblastes et de matrice extracellulaire. Des fibrilles de collagène calcifiées et liées entre elles par des nodules minéralisés de  $\text{Ca/P} = 1,67-1,69$  apparaissent. Quand la surface est fracturée, les cellules sont présentes dans toute l'épaisseur des blocs. De plus, lorsque la surface de verre bioactif est modifiée par un prétraitement conduisant à la formation préalable de la couche d'HAC, l'activité de la phosphatase alcaline, utilisée pour déterminer le développement phénotypique des ostéoblastes, est dépendante du degré de cristallisation de la couche d'HAC. Elle est plus importante sur des matériaux contenant une couche HAC à leur surface que pour des matériaux avec une couche de phosphate de calcium amorphe.

### ii. Formation de la couche d'HAC

La formation de la couche d'hydroxyapatite carbonatée à la surface du bioverre 45S5 est un élément déterminant de l'activité biologique. Les nanocristaux qui la constituent sont extrêmement réactifs et ont la propriété de lier des protéines osseuses spécifiques (ostéopontine, ostéocalcine, etc.), ce qui favorise ensuite l'adhésion, la multiplication et l'expression cellulaire. Les processus de formation de cette couche sont cependant assez différents de ceux qui se produisent au cours de l'ossification primaire, qui peut être décrite comme la minéralisation d'une matrice collagénique préalablement formée. Cette couche ne présente pas, par ailleurs, l'organisation si caractéristique du tissu osseux avec les cristaux d'apatite bien orientés par rapport aux fibres de collagène et doit plutôt être considérée comme une minéralisation incontrôlée. Les événements qui se produisent à la surface du matériau bioactif 45S5 présentent cependant une certaine analogie avec ceux qui interviennent au cours du remodelage osseux dans la zone cémentaire qui limite les ostéons [54]. Les mêmes phénomènes et les mêmes protéines semblent impliqués. La couche d'HAC néoformée est propice à l'adhésion des cellules ostéoblastiques, qui vont alors se multiplier puis former la matrice collagénique et la minéraliser.

Kokubo et al. [55] ont montré que la formation d'apatite à la surface de matériaux bioactifs *in vivo* pouvait être reproduite dans une solution de SBF (simulated body fluid) ayant des concentrations ioniques quasi identiques au plasma humain.

Dans le but de tester le comportement chimique et biologique des bioverres à l'interface avec l'os, Ràmila [56] a utilisé deux sortes d'essais *in vitro* : statique et dynamique. Il a montré que la formation d'une hydroxyapatite carbonatée cristallisée se réalisait plus vite en dynamique. On peut donc penser que la formation de la couche d'HAC sera plus rapide *in vivo* que *in vitro* à cause du flux permanent du plasma humain dans le corps.

Parallèlement, Radin et al. [57] ont montré par immersion du bioverre 45S5 dans différentes solutions que l'apparition de la couche d'HAC était retardée dans des solutions en présence de sérum (milieu de culture) mais qu'elle était plus homogène.

### b) Tests *in vivo*

Il y a habituellement une bonne corrélation entre les résultats des cultures de cellules et les études effectuées *in vivo*, mais, à cause de la complexité du corps humain, il peut y avoir des exceptions et il peut y avoir endommagement des tissus *in vivo*. C'est pour cela qu'il est indispensable de tester le matériau sur les animaux avant qu'il soit introduit dans l'organisme d'un humain. On procède dans un premier temps à un test de contact du matériau sur la peau et les yeux des animaux, puis, si les résultats sont probants, on l'introduit dans le site où il va être utilisé chez les humains. Pour tester les substituts osseux, on utilise principalement des chiens et des moutons.

Des études *in vivo* sur des bioverres poreux en 45S5 implantés pour combler des défauts osseux d'os cortical de rat montrent que ce bioverre est bien biocompatible et que le tissu osseux intègre bien la surface poreuse [58]. Le tissu osseux pousse d'abord sur l'interface et dans les porosités du matériau. Ensuite le tissu osseux s'étend à travers tout le substitut osseux et celui-ci est enfin graduellement résorbé. L'os retrouve ainsi ses propriétés mécaniques plus ou moins rapidement selon la présence ou non de cellules osseuses cultivées sur le substituts avant l'implantation. L'addition d'une substance *ostéogénique* accélère la vitesse de réparation de l'interface substitut osseux/os endommagé. La résorption du bioverre s'opère par dissolution des ions de Na, Ca, P et Si qui est essentielle au corps humain et est biologiquement régulée.

Une autre étude avec cette fois une mousse poreuse en bioverre 58S montre la formation de nodules dans un milieu de culture d'ostéoblastes [59]. Ces nodules apparaissent dans les microporosités et se minéralisent ensuite sans avoir à rajouter d'agent minéralisant. Mais la survie des cellules et la minéralisation des nodules d'ostéoblastes dépendent de la dissolution ionique du bioverre dans le milieu. Il est plus favorable que les concentrations en ions relargués soient faibles.

---

## 2. Osteoinduction

Généralement les biomatériaux à base de CaP ne sont pas supposés être ostéoinducteurs. Ces matériaux sont donc utilisés avec ajout d'un agent cristallisant ou d'ostéoblastes. Pourtant des implantations de blocs poreux en bioverre 45S5 dans des muscles de chiens indiquent l'induction d'une croissance osseuse dans les pores du bioverre [60]. Ces conditions d'implantations dans des tissus mous ne reflètent pas les conditions du bioverre en contact avec un tissu osseux mais elles montrent le caractère ostéoinducteur des bioverres dans un milieu vivant.

De plus l'ostéoinduction du bioverre peut provenir des produits de sa dissolution dans le milieu biologique environnant. Une étude *in vitro* sur l'expression génique et la prolifération d'ostéoblastes a été réalisée avec du bioverre 45S5 [61,62]. Elle montre que les produits ioniques comme Si et Ca influent fortement sur la prolifération d'ostéoblastes et donc sur l'induction de la repousse osseuse. Par ailleurs la minéralisation de l'os doit se faire avec le transport de P qui lui dépend de la dissolution de Na. Une solution contenant des ions Ca, P et Si peut stimuler la transcription des gènes des cellules ostéoblastes. Ces propriétés de la dissolution du bioverre montrent bien sa qualité de matériau ostéoinducteur.

---

## 3. Relargage ionique et évolution de pH

Les produits de la dissolution influent sur la formation de nodules d'ostéoblastes et leur minéralisation en os [59], en particulier le silicium. Mais ils peuvent provoquer par ailleurs une apoptose, c'est-à-dire la mort de cellules dans le milieu ou sur la surface du bioverre. Le relargage le plus important dans les bioverres est celui de Si car c'est celui-ci qui varie le plus et qui paraît influencer le comportement des cellules. Par ailleurs on remarque que le relargage de Si et de Ca est inversement proportionnel au taux de Si que contient le matériau [63]. Ceci peut se comprendre du fait que le Si renforce les liaisons dans le matériau donc ralentit la diffusion et le relargage des ions en solution.

Le relargage de composés ioniques dans le milieu de culture peut faire évoluer le taux de proton H<sup>+</sup> et donc faire évoluer le pH. Naturellement le pH se stabilise à 7,2 dans un milieu de



## Etude bibliographique

culture de cellules en présence d'ostéoblastes [64]. De même dans une fourchette de pH comprise entre 7,0 et 7,6, les activités des ostéoblastes (dont la synthèse de collagène) augmentent avec le pH. Le rang de pH de 7,0-7,8 testé est celui acceptable pour le sang, on peut donc penser que à des pH supérieurs à 7,8 les cellules meurent. Dans les tests *in vitro* réalisés par L.L. Hench [59], l'apoptose de 50% des cellules est observée dans un échantillon de pH 8. Le pH doit avoir une forte influence sur la mort de ces cellules cependant en neutralisant la solution on diminue l'apoptose de seulement 9% ce qui mène à penser que le pH n'est pas le seul responsable de cette mort cellulaire. Pour les tests *in vitro* où le milieu est dilué le pH reste en dessous de 7.6 ce qui est acceptable. Il faut donc bien surveiller dans un test *in vitro* le relargage ionique et l'évolution du pH pour que les conditions de prolifération et d'attache des ostéoblastes soient idéales. Il faut savoir par ailleurs que le test *in vitro* ne peut pas simuler complètement l'échange et l'interaction du bioverre avec le milieu vivant. Le but étant de trouver une structure de bioverre idéale qui puisse se résorber par dissolution ionique dans le milieu tout en le favorisant la repousse osseuse.

---

### A-2-III Applications actuelles du bioverre 45S5

Les applications cliniques des verres bioactifs et des vitro céramiques ont été reportées par Gross et al., Yamamuro et al., et Wilson et al. (cf tableau 4) [65].

Les implants en verres bioactifs et en vitro céramique sont utilisés depuis plus de 10 ans pour remplacer les petits os de l'oreille moyenne (ossicules) endommagés par des infections chroniques, un problème clinique appelé « perte de conductivité de l'ouïe ». La figure 7 présente un exemple d'un implant d'oreille moyenne en bioverre 45S5 utilisé en tant que prothèse ossiculaire.

Applications	Matériaux
Orthopédie	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , ZrO <sub>2</sub> stabilisée, Poudres de HA, Poudre de verres bioactifs
Dépôt pour fixation bioactive	HA, Vitro céramiques bioactives
Comblement osseux	Phosphate tricalcique, sels de phosphate de calcium
Implants dentaires	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , HA, Verres bioactifs
Tendons et ligaments artificiels	Composites fibre de carbone/PLA
Oblitération d'une poche périodontale	HA, Composites HA-PLA, Phosphate tricalcique, Sel de phosphate de calcium, Verres bioactifs
Augmentation de la crête alvéolaire	HA, Composite HA-os autologue, Verres bioactifs
Reconstruction maxillofaciale	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , HA, Composite PE-HA, Verres bioactifs
Chirurgie spinale	Vitro céramiques bioactives, HA
Traitement thérapeutique de tumeurs	Verres aluminosilicate dopés aux terres rares
Valves artificielles du cœur	Dépôt pyrolytique de carbone
Otolaryngologique	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , HA, Verres bioactifs, Vitro céramiques bioactives, Composite PE-HA

**Tableau A-1 : Applications cliniques des biocéramiques (HA, hydroxyapatite, PE, polyéthylène, et PLA, acide polylactique.**

La survie d'un implant en verre bioactif pour le remplacement de l'oreille moyenne est considérablement plus grande que celle des implants bioinertes pour la même application (figure 7). Les implants bioinertes ne se lient pas au tympan, ils s'érodent donc graduellement à travers le tissu et sont expulsés à travers le tympan en l'espace de 2 à 3 ans. A l'inverse, les verres très bioactifs forment un lien avec le collagène du tympan et se lient fermement à l'os restant de la

## Etude bibliographique

plateforme. Ils s'accrochent donc aux deux extrémités ce qui empêche l'expulsion. La conductivité auditive est excellente et il n'y a pas de croissance de tissu fibreux qui détériorerait la transmission des sons. De plus, il n'existe pas de micromouvements à l'interface implant-tissu. L'implant reste donc stable.

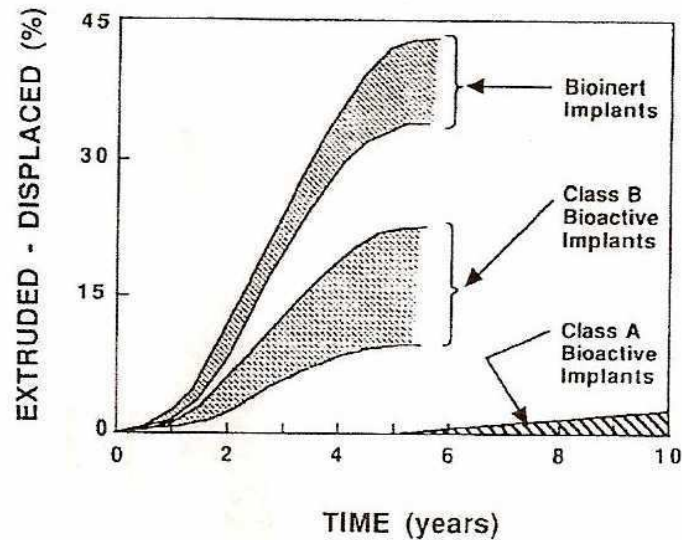


Figure A-7: Comparaison de la survie des implants bioinertes, bioactifs de classe B (HA synthétique) et bioactifs de classe A (45S5) pour remplacer l'os de l'oreille moyenne [31].

Une autre application des implants en bioverre 45S5 basée à la fois sur les liens avec les tissus mou et avec l'os, préserve la mâchoire de patients ayant subi l'extraction de leurs dents avant la mise en place d'un dentier. Ce type d'implant, appelé ERMI (Endosseous Ridge Maintenance Implant), développé par Stanley et al. [66], est une injection moulée en forme de cônes de différentes tailles pour convenir à la taille des racines des dents extraites (figure 8). Les rayons X montrent que l'implant reste stable dans l'os après plusieurs années et évite la résorption de l'os sous le dentier. La survie d'un implant ERMI en verre bioactif après 10 ans est considérablement plus élevée qu'avec d'autres implants bioactifs qui ne se lient pas au tissu mou (figure 9).

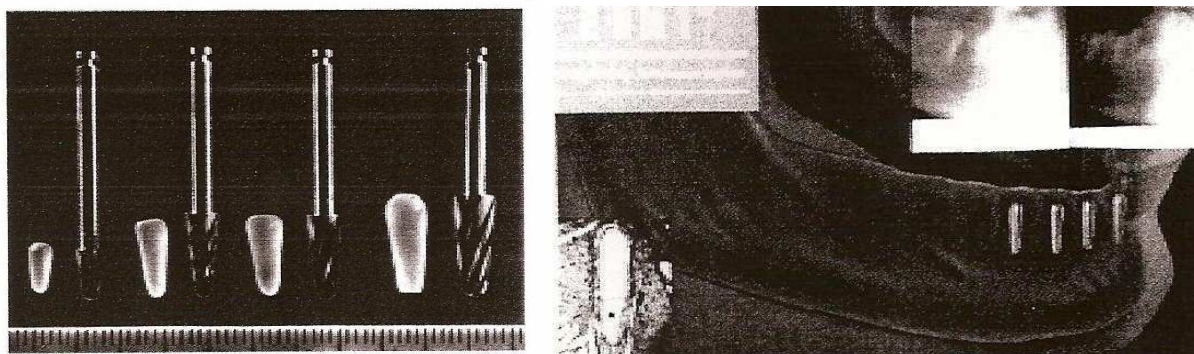


Figure A-8: Implants de verres bioactif (45S5) et vis utilisés pour remplacer les racines des dents extraites. Les rayons X montrent que l'implant reste stable dans l'os après plusieurs années et évite la résorption de l'os (Photo courtesy of Dr. David Greenspan, U.S. Biomaterials Corp.)

## Etude bibliographique

L'application clinique la plus importante des verres bioactifs se fait sous la forme de particules qui sont placés autour des dents qui ont eu une maladie periodontale, un problème clinique affectant une dizaine de millions de patients. Le bioverre 45S5 amène rapidement à la formation d'un nouvel os. A cause de la vitesse de formation du nouvel os, les tissus épithéliaux ne peuvent pas migrer sous la dent, ce qui est un problème courant si rien n'est utilisé pour combler l'espace entre la dent et l'os en cours de réparation. La jonction entre la dent et la membrane periodontale est stabilisée par l'utilisation de particules de verres bioactifs ce qui permet de sauver la dent.

Les mêmes particules de verres bioactifs sont utilisées dans bon nombre d'applications cliniques où une greffe d'os est requise pour combler ou augmenter le processus de réparation naturel de l'os. Dans le dentaire, un avantage lié à la réparation rapide de l'os par les matériaux bioactifs est que la douleur est minimisée et la mâchoire est rapidement stabilisée. Des procédures similaires peuvent être mises en place pour augmenter la mâchoire lorsqu'il faut améliorer la stabilité d'un implant dentaire.

Les particules de bioverre 45S5 sont également utilisées pour des applications orthopédiques comme des greffes d'os, les reprises totales de hanche et de genoux qui nécessitent des chirurgies correctives et des fusions spinales. Une découverte intéressante est l'hypothèse que les verres bioactifs stimulent la prolifération rapide de l'os par activation de processus génétiques contrôlés qui amènent à la production de facteurs de croissance. L'os trabéculaire régénéré par ces processus osteoconducteurs, c'est-à-dire par le comblement du défaut osseux par des particules de bioverre 45S5, est équivalent à l'os naturel.

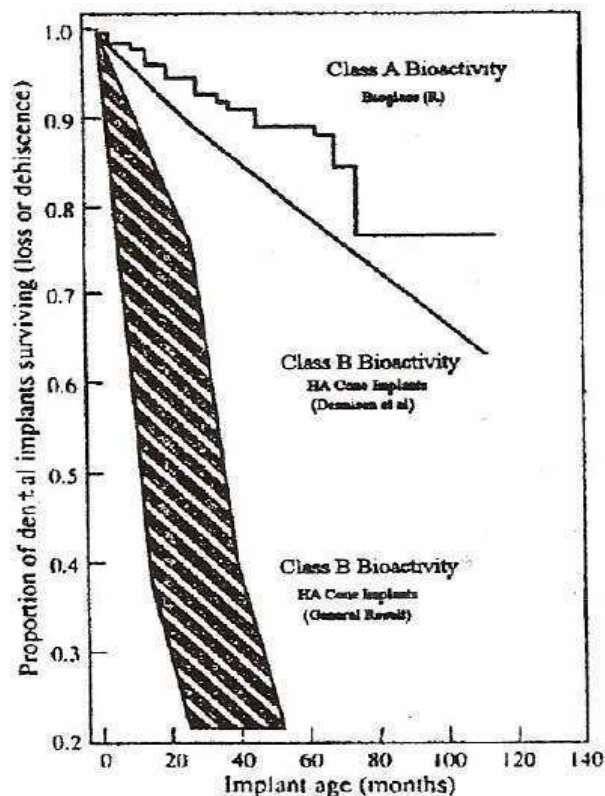


Figure A-9: Survie d'implant coniques en verre bioactif de classe A pour maintenir l'os alvéolaire comparé à des implants de classe B (HA synthétique) [31].

## A-2-IV Evolution des bioverres lors de traitements thermiques

La cristallographie des bioverres joue un rôle important sur leur bioactivité et leur résistance mécanique. Un certain nombre d'études ont porté sur la cristallisation des bioverres en particulier afin d'étudier son influence sur la bioactivité du matériau (capacité à former une couche de HAP). Des études portant sur des variations de la composition ou la cristallisation pour améliorer la résistance mécanique des bioverres montrent que le bioverre 45S5 de L.L. Hench paraît être le meilleur compromis en terme de fonctionnalité et bioactivité [65,67-68].

Généralement, pour les études portant sur la cristallisation des bioverres, les échantillons sont obtenus par synthèse du verre dans un creuset de platine suivi du moulage dans un moule préchauffé et d'un recuit afin de libérer les tensions induites durant la trempe à l'air pour permettre la découpe du verre (Exemples de recuits effectués Tableau 5).

Une analyse thermique différentielle (ATD) (Figure 12) permet d'identifier entre autres les températures de transition vitreuse  $T_g$  et la température de début de cristallisation  $T_c$  [69-72]. Les températures obtenues lors des études portant sur le comportement du 45S5 traité thermiquement sont recensées dans le Tableau 6.  $T_g$  est mesurée au niveau de la réaction endothermique.  $T_c$  est la température à laquelle on observe une rupture de pente du signal  $\Delta T=f(T)$ . Cette température n'est pas toujours facile à détecter mais on peut comparer les cinétiques de cristallisation en première approximation en utilisant  $T_p$ , maximum du pic exothermique de cristallisation.

Dans cet exemple d'ATD réalisé par El-Ghannam et al. [72], il est possible d'identifier un premier pic exothermique qui correspond à la cristallisation de la phase majoritaire identifiée comme  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  mais le second pic exothermique à  $847^\circ\text{C}$  n'est pas expliqué.

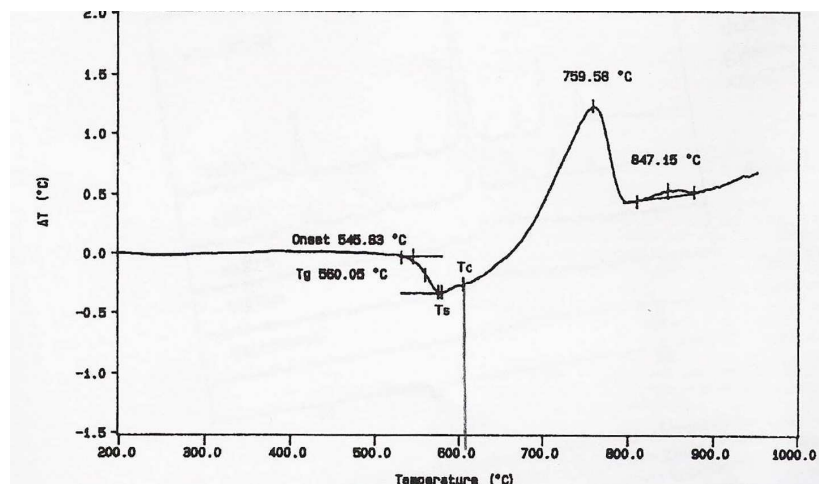


Figure A-10: ATD du 45S5 [72]

ElBatal et al. [68] utilisent aussi une analyse dilatométrique du bioverre pour détecter la température de transition vitreuse et la température de ramollissement  $T_s$  mais ne l'exploitent pas pour étudier la cristallisation.

## Etude bibliographique

D.C. Clupper et L.L. Hench [67] calculent l'énergie d'activation de la cristallisation qui s'élève à 350kJ/mol.

A la suite de ces analyses, des traitements thermiques ont été effectués afin d'obtenir différents taux de cristallinité. Ces traitements sont recensés dans le Tableau 5.

Etude	Recuit		Traitement Thermique				Taux de phase cristalline $X_{cr}$
	Température	Durée	Température		Durée		
Filho et al. [74]	460°C	8h	Nucléation 550°C	Croissance 680°C	Nucléation 150h	Croissance 66-113min	8-100%
El-Ghannam [72]			550-700°C (Chauffage à 3°C/min)		1h		5-83%
Peitl et al. [74]	460°C	8h	Nucléation 520-600°C	Croissance 620-700°C	Nucléation 3-9000 min	Croissance 5-70 min	5-100%
Rajendran et al. [70]	430°C	Refroidissement à 20°C/h					
El Batal et al. [64]	470°C	Refroidissement à 30°C/h	Nucléation 548°C	Croissance 770°C	Nucléation 7h	Croissance 3h	
Chatzistavrou et al. [65]			900,1200 et 1400°C				

**Tableau A-5 : Recuits et traitements thermiques effectués lors de différentes études sur la cristallisation du bioglass® 45S5.**

Etude	[72]	[70]	[67]	[68]	[69]
Vitesse de chauffe	5°C/min	10°C/min	2-25°C/min	10°C/min	10°C/min
Tg	550°C	530°C	550°C	500-550°C	560°C
Tc	608°C		550-597°C	670°C	
Tp	760°C		685°C (25°C/min)	785°C	720°C

**Tableau A-6 : Température de transition vitreuse (Tg), température de début de cristallisation (Tc) et Température du maximum du pic exothermique (Tp) obtenus lors de différentes études sur le Bioglass® 45S5 par ATD à différentes vitesses de chauffe.**

La reconnaissance des phases cristallines en présence dans les échantillons traités thermiquement s'effectue à partir d'analyse de diffraction des rayons X (DRX). La phase majoritaire identifiée est  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  [63-64, 68-70]. El-Ghannam et al. présentent les spectres de diffraction X en fonction de la température du Traitement thermique (Figure 11) ce qui permet de suivre l'évolution de la cristallisation qui commence à 550°C puisqu'ils observent un taux de cristallinité de 5% en volume après un traitement thermique d'une heure.

ElBatal et al. [68] observent une phase secondaire dans la cristallisation du 45S5 qui serait  $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$ . Cette phase a été aussi observée comme phase secondaire d'un bioverre dont la composition est proche du 45S5 [71]. Par ailleurs Hench et al. [75] remarquent à la surface d'un 45S5, à la suite d'un traitement thermique long à 800°C, la cristallisation de phosphate de calcium dont la structure se rapproche de l'HAP.

## Etude bibliographique

Après la transition vitreuse et avant la cristallisation s'opère une séparation de la phase vitreuse [68,72] lors de laquelle apparaissent deux phases vitreuses immiscibles, l'une riche en Si et l'autre riche en P. Cette hétérogénéité influe sur la nucléation de la phase cristalline. El-Batal et al. pensent que la phase riche en P agit comme sites de nucléation alors que El-Ghannam et al. supposent plutôt que la nucléation se fait à partir des agrégats de phase riche en Si. Juste après la séparation de la phase vitreuse, la germination de la phase cristalline principale a lieu. Plus cette étape sera longue plus on observera ensuite une structure cristalline fine et homogène.

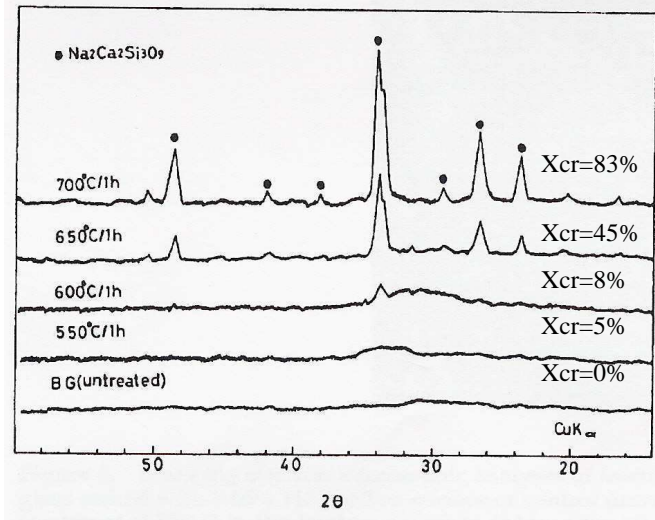


Figure A-11: Spectres de diffraction du bioverre 45S5 traité à 550°C, 600°C, 650°C et 700°C et de la référence non traitée thermiquement. Les spectres font apparaître la formation de  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  avec des taux de cristallinité de 5%, 8%, 45% et 83%.

Les photos (Figure 12) prises à l'aide de microscope optique par O. Peitl Filho [72] montrent ce que l'auteur identifie comme la germination de la phase cristalline le long du traitement thermique à 680°C après une longue étape de nucléation comme indiqué dans le Tableau 6.

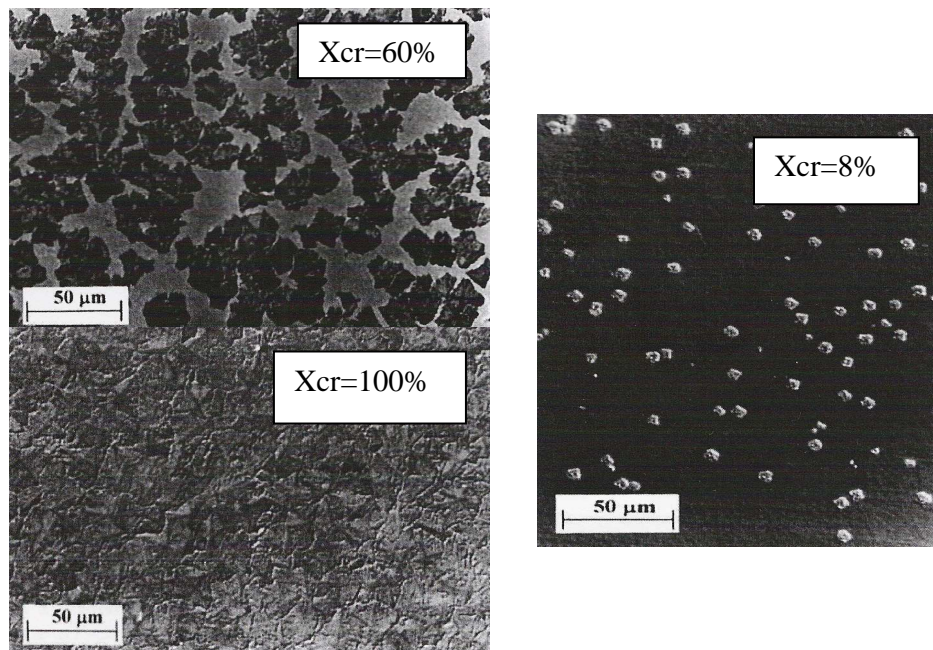


Figure A-12: Photos de bioverres 45S5 après avoir subit un TT de cristallisation à 680°C[67].

## Etude bibliographique

Ce phénomène de séparation des phases vitreuses a aussi pour effet d'augmenter la viscosité du matériau ce qui sera intéressant lors de l'étude du frittage du bioverre 45S5. Il influence également la bioactivité du matériau. D'après El Ghannam et al., le phosphore présent dans la phase riche en phosphore a une tendance plus forte à la dissolution que le phosphore présent dans le verre parent.

Lors de la cristallisation, Ca et Si sont liés à la phase cristalline alors que P reste dans la phase vitreuse (démonstré par analyse EDX de surface partiellement cristallisées [71]). Les ions phosphates emprisonnés dans la phase vitreuse sont plus solubles. Cette observation est générale lors des études du relargage ionique du bioverre 45S5 lors de son immersion dans du SBF. A travers l'analyse du relargage ionique du 45S5 à différents taux de cristallinité (Figure 28) on peut noter que le relargage de Ca et Si diminue avec le taux de cristallinité alors que celui de P augmente même si ce n'est pas significatif. La corrosion étant diminuée, la bioactivité du bioverre est ralentie [72].

Par ailleurs la cristallisation augmente l'électronégativité de la surface ce qui limite l'adsorption de protéines à la surface du bioverre. Or l'adsorption de ces protéines est indispensable pour l'accrochage du tissu osseux au bioverre.

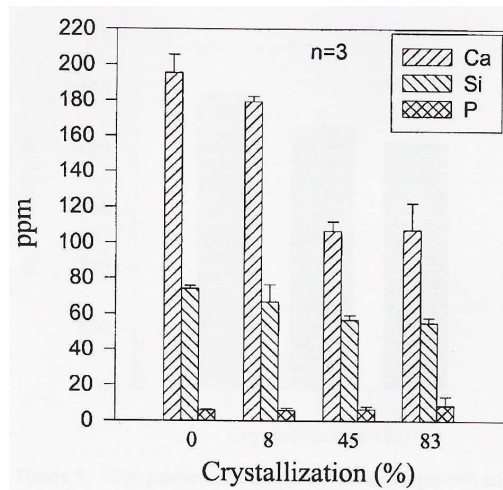


Figure A-13: Concentration en ions Ca, Si et P après immersion de bioverre 45S5 à différents taux de cristallinité dans du SBF durant 24h [72].

La cristallisation du bioglass 45S5 a donc pour effet de retarder la formation de la couche d'HAP mais ne l'inhibe pas. Li et al. [76] remarquent que la couche d'HAC se forme seulement si le bioverre présente plus de 90% de phase amorphe. Cependant Peitl et al. [72] montrent que des échantillons entièrement cristallisés présentent une couche d'HCA à leur surface.

Les études réalisées par Peitl et al. [72-73] montrent bien que l'amorce de la formation de la couche d'HAP est retardée avec le taux de phase cristalline jusqu'à un taux de 60% à partir duquel ce temps reste constant (Figure 14).

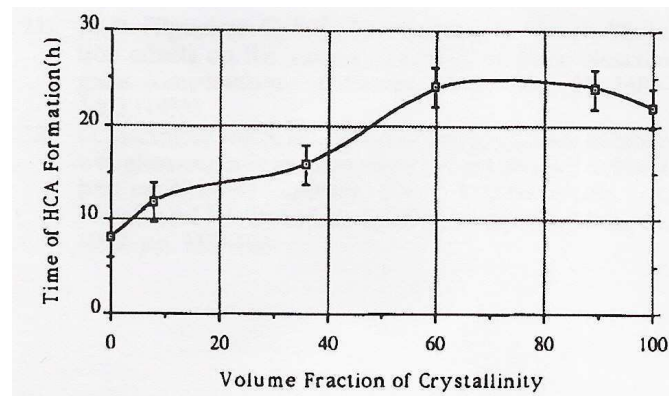


Figure A-14: Temps d'initialisation de la formation d'HAC en fonction du taux de cristallinité du bioverre 45S5.

La cristallisation du bioglass 45S5 retarde la formation de la couche d'HAC mais ne l'inhibe pas. Donc ce n'est pas une barrière au développement de la bioactivité de ce matériau. Par ailleurs le temps d'initialisation de la formation de la couche d'HAC des bioverres reste inférieur à celui de matériaux déjà commercialisés comme les vitrocéramiques A/W ou l'HAP synthétique. Par contre la cristallisation du verre doit largement influencer ses propriétés mécaniques ou son pouvoir de résorption.

---

## Conclusions et perspectives

Cette étude bibliographique montre que malgré les études diverses et variées réalisées sur le bioverre 45S5 depuis une trentaine d'années, beaucoup de points restent peu ou pas étudiés. De plus la plupart de ces études portent sur le bioverre 45S5 sous forme dense ou de particules grossière, peu d'entre elles font mention de particules fines de granulométrie inférieure à 10 microns.

Du point de vue des transformations structurales, la composition réelle des cristaux apparaissant lors du traitement thermique du bioverre 45S5 reste incertaine. A notre connaissance, il n'existe aucune étude détaillée sur les paramètres de maille de la phase cristalline principale proposée et leur évolution avec la température. Il n'y a également aucune donnée disponible quant à la possibilité d'un contrôle totale de la cristallisation. De plus, la position des ions phosphore dans la structure et son influence sur les transformations sont encore inconnues. Enfin, les peu d'études réalisées en ce qui concerne l'influence de la cristallisation sur la bioactivité des bioverres se contredisent. Certaines mentionnent une inhibition totale avec la cristallisation alors que d'autres montrent que cette transformation a peu d'effet sur la bioactivité.

Du point de vue des étapes conduisant à l'élaboration de blocs poreux, aucune étude précise n'a été réalisée sur la dispersion des poudres de bioverre 45S5 et sur leur frittage. L'influence des transformations structurales du bioverre 45S5 sur sa densification n'a jamais été mentionnée. De plus, la totalité des méthodes d'élaboration de blocs poreux utilisant le bioverre obtenus par la méthode traditionnelle, font appel à des particules de polymères pour introduire la porosité ce qui limite les interconnexions entre pores nécessaires à une bonne intégration des substituts osseux.



Enfin, du point de vue de la vérification de la biocompatibilité par culture cellulaire, de bons résultats sont obtenus sur des blocs denses. Ces études mentionnent un prétraitement mais ne l'exposent pas avec précision. Sur des blocs poreux la dissolution est plus importante et peut entraîner un pH trop basique conduisant à une nécrose cellulaire, le prétraitement devrait donc logiquement s'adapter au type d'échantillon utilisé. A notre connaissance il n'existe qu'une étude de culture cellulaire sur des poreux mais les échantillons ne présentent que 59% de porosité alors que celle-ci doit atteindre 90% pour que les blocs soient utilisables en ingénierie tissulaire.

---

## REFERENCES DE LA PARTIE A

- 1- « L'os et le remodelage osseux »  
<http://www.cegep-rimouski.qc.ca/dep/biologie/humain/os/os-html>
- 2- JS. Nyman, M. Reyes, X. Wang. Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone. *Micron*, 2005, vol. 36, pp. 566-582.
- 3- D. Vashishth. Hierarchy of bone microdamage at multiple length scales. *International Journal of Fatigue*, 2007, vol. 29, pp. 1024-1033.
- 4- U. Hansen, S. Masouhos, AA. Amis. Material properties of biological tissue related to joint surgery. *Current Orthopaedics*, 2006, vol. 20, pp. 16-22.
- 5- LJ Gibson and M. Ashby. In: *Cellular solids – Structure and properties second Edition*. Ed DR Clarke, S. Suresh, IM. Wards FRS of Cambridge University Press, 2001, p. 431
- 6- H. Beaupied, E. Lespessailles, CL. Benhamou. Evaluating of macrostructural bone biomechanics. *Joint Bone Spine*, 2007, vol. 74, pp. 233-239.
- 7- DB. Burr, C. Milgrom, D. Fyrhie, M. Forwood, N. Nyska, A. Firestone et al. *In vivo* measurements of human tibial strains during vigorous activity. *Bone*, 1996, vol. 18, pp. 405-410.
- 8- J. Ekenman, K. Halvorsen, P. Westblad, L. Fellander-Tsai, C. Rolf. Local bone deformation at two predominant sites of stress fractures of the tibia: an *in vivo* study. *Foot Ankle International*, 1998, vol. 19, pp. 479-484.
- 9- D. Vashishth, KE. Tanner, W. Bonfield. Fatigue of cortical bone under combined axial-torsional loading. *Journal of Orthopaedic Research*, 2001, vol. 19, pp. 414-420.
- 10- PM. Lind, L. Lind, S. Larsson, J. Örberg. Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus. *Bone*, 2001, vol. 29, pp. 265-270.
- 11- CL. Ford, TM. Keaveny. The dependence of shear failure properties of trabecular bone on apparent density and trabecular orientation. *Journal of Biomechanics*, 1996, vol. 29, pp. 1301-1317.
- 12- TM. Keaveny, XE. Guo, EF. Wachtel, TA. Mc Mahon, WC. Hayes. Trabecular bone exhibits fully linear elastic behaviour and yields at low strains. *Journal of Biomechanics*, 1994, vol. 27, pp. 1127-1136.

## Etude bibliographique

- 13- HH. Bayaktar, EF Morgan, GL. Niebur, GE Morris, EK. Wong, TM Keaveny. Comparison of the elastic and yield properties of human femoral trabecular and cortical bone tissue. *Journal of Biomechanics*, 2004, vol. 37, pp. 1281-1287.
- 14- XN. Dong, XE. Guo. The dependence of transversely isotropic elasticity of human femoral cortical bone on porosity. *Journal of Biomechanics*, 2004, vol. 37, pp.1281-1287.
- 15- TS. Kaneko, MR. Pejdic, J. Tehranzadeh, JH. Keyak. Relationships between material properties and CT scan data of cortical bone with and without metastatic lesions. *Med. Eng. Phys.*, 2003, vol. 25, pp. 445-454.
- 16- ER Myers, SE. Wilson. Biomechanics of osteoporosis and vertebral fracture. *Spine*, 1997, vol. 22 (24 Suppl), pp. 25S-31.
- 17- NJ. Wachter, GD. Krischak, M. Mentzel, MR. Sarkar, T. Ebinger, L. Kinzl, et al.. Correlation of bone mineral density with strength and microstructural parameters of cortical bone *in vitro*. *Bone*, 2002, vol. 31, pp. 90-95.
- 18- MP. Akhter, UT. Iwaniec, MA. Corvey, DM Cullen, DB. Kimmel, RR. Recker. Genetic variations in bone density, histomorphometry and strength in mice. *Calcif Tissue Int.*, 2000, vol. 67, pp. 337-344.
- 19- PE. Goss, S. Qu, RG. Josse, KPH. Pritzker, M. Mendes, H. Hu, et al.. The steroidal aromatase inhibitor exemestane prevents bone loss in ovariectomized rats. *Bone*, 2004, vol. 34, pp. 384-392.
- 20- T. Jämsä, P. Jalovaara, Z. Peng, HK Väänänen, J. Tuukkanen. Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur tibia. *Bone*, 1998, vol. 23, pp. 155-161.
- 21- SM. Tommasini, P. Nasser, MB. Schaffler, KJ. Jepsen. Relationship between bone morphology and bone quality in male tibias: implication for stress fracture risk. *Journal of Bone Mineral Research*, 2005, vol. 20, pp. 1372-1380.
- 22- CY. Li, C. Price, K. Delisser, P. Nasser, D. Laudier, M. Clement et al.. Long term disuse osteoporosis seems less sensitive to biphosphanate treatment than other osteoporosis. *Journal of Bone Mineral Research*, 2005, vol. 20, pp. 117-124.
- 23- CY. Li, MB. Schaffler, HT. Wolde-Semait, CJ. Hernandez, KJ. Jepsen. Genetic background influences cortical response to ovariectomy. *Journal of Bone Mineral Research*, 2005, vol. 20, pp. 2150-2158
- 24- Parfitt AM, Rauch F, Travers R, Glorieux F. Osteonal and hemiosteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Cell Biochem Suppl*, 1994, vol. 55, pp. 273-286.
- 25- Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, 2000, vol. 21, pp. 115-137.
- 26- Marie P. Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Med Sci (Paris)*, 2001, vol.17, pp. 1252-1259.

## Etude bibliographique

- 27- A.R. Vaccaro, K. Chiba, JG. Heller, TC. Patel, JS. Thalgott, E. Truumees, JS Fischgrund, MR. Craig, SC. Berta, JC Wang. Contemporary Concepts In Spine Care- Bone grafting alternatives in spinal surgery. The Spine Journal, 2002, vol. 2, pp. 206-215.
- 28- II. Doron and AL. Ladd. Bone Graft Substitutes. Operative techniques in Plastic and Reconstructive Surgery, 2003, vol. 9, n° 4, pp. 151-161.
- 29- V. Kalageorgiou, D. Kaplan. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. Biomaterials, 2005, pp. 5474-5491.
- 30- DW. Hutmacher. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials, 2000, vol. 21, pp. 2529-5543.
- 31- W. Cao, LL. Hench. Bioactive Materials. Ceramics International, 1996, vol. 22, pp. 493-507.
- 32- LL. Hench. Bioactive Ceramics. In Bioceramics: Materials characteristics versus *in vivo* behavior, vol. 523, ed P. Dusheyne and J. Lemons. Annals of New York Academy of Sciences, New York, 1988, p54.
- 33- LL. Hench. Bioactive ceramics: Theory and clinical application. In bioceramics, vol.7, pp.3-14, 1994.
- 34- AM. Green, JA. Jansen, JPCM Van Der Waerden, AF. Von Recum. Fibroblast response to microtextured silicone surfaces: texture orientation into or out of the surface. Journal of Biomedical Materials Research, 1994, vol. 28, pp. 647-653.
- 35- PE. Keeting, MJ. Ourster, KE. Wiegand, SK Bonde, TC. Spelsberg and BL. Riggs. Zeolite A increases proliferation, differentiation and transforming growth factor  $\beta$  production in normal adult osteoblast-like cells *in vitro* . Journal of Bone and Mineral Research, 1992, vol. 7, pp. 1281-1289.
- 36- CA. Vrouwenvelder, CG. Groot and K. Grood. Histological and biochemical evaluation of osteoblasts cultured on bioactive glass, hydroxyapatite, titanium alloy and stainless steel. Journal of Biomedical Materials Research, 1993, vol. 27, n° 4, pp. 465-475.
- 37- E. Carlisle. In silicon biochemistry. Wiley, New York, 1986, p 123-136.
- 38- LL. Hench. Bioceramics: from concept to clinic. Journal of American Ceramic Society, 1991, vol. 74, n° 7, pp. 1487-1510.
- 39- LL. Hench and GP. Latorre. Reaction kinetics of bioactive ceramics. Part IV: effect of glass and solution composition: In Biomat. 5, ed. T. Yamamuro, T. Koubo, T. Nakamura. Kobonshi Kankokai; Inc. Kyoto, Japan, 1992, p67-74.
- 40- AE. Clark, CG. Pantano, LL. Hench. Auger spectroscopic analysis of bioglass corrosion films. Journal of American Ceramic Society, 1976, vol. 59, n° 1-2, pp. 37-39.
- 41-Laura Nicolodi, E. Sjölander and K. Olsson. Biocompatible ceramics - An overview of applications and novel materials. KTH November 1, 2004 – course 2B1750 – Smart Electronic materials.

## Etude bibliographique

- 42- LL. Hench and OH. Andersson. Bioactive glasses – In an introduction of Bioceramics, ed. LL. Hench and J. Wilson. World Scientific, London, 1993, p239-259.
- 43- U. Gross, R. Kinne, HJ. Schmit and V. Strunz. The response of bone to surface active glass/glass-ceramics. CRC Crit. Res. Biocompat., 1998, vol. 4, p.2
- 44- . Gross and V. Strunz. Interface of various glasses and glass-ceramics in abony implantation bed. Journal of Biomedical Materials Research, 1985, vol. 19, pp. 251-271.
- 45- LL. Hench and OH. Andersson. Bioactive glass coatings– In an introduction of Bioceramics, ed. LL. Hench and J. Wilson. World Scientific, London, 1993, p239-259.
- 46- J. Zhong, G. Latorre, D. Greenspan and LL. Hench. Alumina inhibitory effect on the formation of hydroxyapatite. In Bioceramics 8, ed. J. Wilson, D. Greenspan and LL. Hench. Elsevier science, Oxford, 1995, p 489-492.
- 47- R. Li, AE. Clark and LL. Hench. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing . Journal of Applied Biomaterials, 1991, vol. 2, pp. 231-239.
- 48- LL. Hench and JK. West. The sol-gel process. Chemical Review , 1990, vol. 90, pp. 33-72.
- 49- R. Li, AE. Clark and LL. Hench. Effects of structure and surface area on bioactive powders by sol-gel process. In Chemical Processing of Advanced Material, ed. LL. Hench and JK. West. Wiley and sons, Inc, New York, 1992, p 627.
- 50- MM. Pereira, AE. Clark, LL. Hench. Effect of texture on the rate of hydroxyapatite formation on silica gel surface. Journal of American Ceramic Society, 1995, vol. 78, n° 9, pp. 2463-2468.
- 51- L.L. Hench, « Bioactive glasses and glass-ceramics : a perspective », Handbook of bioactive ceramics, Boca raton-Ann Arbor-Boston: ed. CAC Press, vol.1, p.7-23 (1990).
- 52- A. El Ghannam, P. Ducheyne, IM. Shapiro. A bioactive glass template for the *in vitro* synthesis of bone. Journal of Biomedical Materials Research, 1995, vol. 29, pp. 359-370.
- 53- A. El Ghannam, P. Ducheyne, et IM. Shapiro. Porous bioactive glass and hydroxyapatite ceramic affect bone cell function *in vitro* along different time lines. Journal of Biomedical materials research, 1997, vol. 36, pp.167-180
- 54- A. Ramila, M. Vallet-Regi. Statistic and dynamic *in vitro* study of a sol gel glass bioactivity. Biomaterials, 2001, pp. 2301-2306.
- 55- MD. McKee et A. Nancy. Ultrastructural cytochemical and immunocytochemical studies on bone and dits interfaces ». Cells and Materials, 1993, vol. 3, pp. 219-243.
- 56- T. Kokubo et al., Apatite formation on ceramics, metals and polymers induced by a CaO SiO<sub>2</sub> based glass in a simulated body fluid. In Bioceramics, W. Bonfield, GW Hastings and KE Tanner, Eds 1991, Butterworth-Heinemann: Oxford
- 57- S. Radin, P. Ducheyne, B. Rothman, A. Conti. The effect of *in vitro* modeling condition on the surface réaction on bioactive glass. Journal of Biomedical Materials Research, 1997, vol. 37, pp. 363-375

## Etude bibliographique

- 58- T. Livingston, P. Ducheyne and J. Garino, “ *In vivo* evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering”, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, vol. 62, pp. 1-13.
- 59- J.E. Gough, J.R. Jones; L.L. Hench. Nodule formation and mineralisation of human primary osteoblasts cultures on a porous bioactive glass scaffold. *Elsevier Biomaterials*, 2004, vol. 25, pp. 2039-2046.
- 60- Huipin Yuan, Joost D de Bruijn, Xingdong Zhang, Lemens A. von Blitterswijk, Klass de Groot. Bone induction by porous glass ceramic made from bioglass (45S5). *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, vol. 58, pp. 270-276.
- 61- ID Xynos, A.J. Edgar , L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, vol.55, pp.151-157.
- 62- I. D. Xynos, A. J. Edgar, 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. *Biochemical and Biophysical Research Com.*, 2000, vol. 276, pp. 461-465.
- 63- H. Ylanen, K. H. Karlsson, A. Itala, H. T. Aro. Effect of immersion in SBF on porous bioactive bodies made by sintering bioactive glass microspheres. *Elsevier Biomaterials*, 2000, vol. 275, pp. 107-115.
- 64- K.K. Kaysinger, W.K. Ramp. Extracellular pH modulates the activity of cultured osteoblasts. *Journal of Cell. Biochem*, 1998, vol. 68, pp. 83-89.
- 65- LL. Hench. Bioceramics. *Journal of American Ceramic Society*, 1998, vol. 81, n° 7, pp. 1705-1728.
- 66- HR Stanley, Hall MB, Clark AE, King CJ, Hench LL, Berte JJ. Using 45S5 bioglass cones as endosseous ridge maintenance implants to prevent alveolar ridge resorption: a 5 year evaluation. *The International Journal of oral and maxillofacial implants*, 1997, vol.12, n° 1, pp. 95-105.
- 67- D.C. Clupper, L.L. Hench. Crystallization kinetics of tape cast bioactive glass 45S5. *Biomaterials*, 2003, vol. 318, pp. 43-48.
- 68- H.A. El Batal, M.A. Azooz, E.M.A. Khalil, A. Soltan Monem, Y.M. Hamdy. Characterization of some bioglass-ceramics. *Materials Chem. And Phys.*, 2003, vol. 80, pp. 599-609.
- 69- X. Chatzistavrou, T. Zorba, E. Kontonazaki, K. Chrissafis, P. Koidis, K.M. Paraskevopoulos. Following bioactive glass behaviour melting temperature by thermal and optical methods. *Phys. Stat. Sol. ,* 2004, vol. 201, n°.5, pp. 944-951.
- 70- V. Rajendran, A. Nishara Begum, M.A. Azooz, F.H. El Batal. Microstructural dependence on relevant physical-mechanical properties on SiO<sub>2</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> biological glasses. *Elsevier Biomaterials*, 2002, vol. 23, pp. 4263-4275.
- 71- A.S. Rizkalla, D.W. Jones, D.B. Clark, G.C. Hall. Crystallization of experimental bioactive glass compositions. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1996, vol. 32, pp. 119-124.

## **Etude bibliographique**

72- A. El-Ghannam, E. Hamazawy, A. Yehia. Effect of thermal treatment on bioactive glass microstructure, corrosion behaviour,  $\zeta$  potential, and protein adsorption. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, vol. 55, pp. 387-398.

73- O. Peitl Filho, G. P. La Torre, L.L. Hench. Effect of cristallization on apatite-later formation ef bioactive glass 45S5. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1996, vol. 30, pp. 509-514.

74- O. Peitl, E. D. Zanotto, L.L. Hench. Highly bioactive P2O5-Na2O-CaO-SiO2 glass-ceramics. *Elsevier Biomaterials*, 2001, vol. 292, pp. 115-126.

75- L.L. Hench, R.J. Splinter W.C. Allen, T.K. Greenlee. Bonding mechanism at the interface of ceramic prosthetic material. *Journal of Biomedical Materials Research Symposium*, 1971, vol. 2, pp.117-141.

76- P. Li, F. Zhang, T. Kokubo. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1992, vol. 3, pp. 452

# Techniques Expérimentales

## INTRODUCTION

---

Cette partie traite des techniques expérimentales utilisées dans les différentes étapes nécessaires à l'élaboration et la caractérisation de blocs poreux à base de bioverre. Des procédés couramment employés dans le domaine des céramiques ont été utilisés. Après l'optimisation du procédé de broyage permettant d'obtenir une poudre de granulométrie et morphologie contrôlée, il est nécessaire de caractériser cette poudre, notamment par la connaissance de ses transformations structurales au cours de traitements thermiques et leur influence sur le frittage du matériau. Puis, la poudre doit être mise en suspension. Cette étape nécessite l'optimisation des conditions de dispersion et de stabilité des suspensions. Lorsque toutes ces études ont été réalisées, il est alors possible d'obtenir des blocs poreux par différentes techniques. Quatre méthodes d'élaboration ont été utilisées pour l'obtention de blocs poreux : la réplication de mousse polymère, l'imprégnation de préforme de PMMA, le freeze casting et le gel casting. Les deux premières techniques nécessitent une optimisation du taux de matière sèche à introduire dans les suspensions afin d'assurer la pénétration de celle-ci dans les préforme par exemple, ou d'assurer une quantité optimale de matière sur les parois des mousses. Dans ces techniques, la porosité est induite par la présence du polymère qui sert de matériau sacrificiel. Celui-ci est éliminé par une étape de déliantage qui permet, par pyrolyse, l'élimination du polymère. Ce procédé nécessite une optimisation afin d'éviter une fragilisation des poreux obtenus par un départ trop rapide du polymère. Le Freeze casting est une technique qui permet de créer la porosité, après congélation directionnelle de la barbotine, par sublimation de la glace. La microstructure des blocs poreux peut être contrôlée par les vitesses de congélation et par les taux de matière sèche introduits dans les suspensions initiales. La technique du gel casting, quant à elle, permet d'obtenir des crus facilement usinables. Dans cette technique, la porosité est induite par introduction de billes de polymères. Enfin, la dernière étape du procédé d'élaboration de blocs poreux est une consolidation du matériau par un traitement de frittage qui permet une densification des échantillons dans leur forme finale. L'effet des transformations structurales sur la bioactivité du matériau ainsi que le comportement biologiques des blocs poreux ainsi obtenus sont étudiés par suivi de la formation de la couche d'HAC et par des cinétiques de culture cellulaire. Ces dernières nécessitent la mise au point d'un protocole de culture.

---



## Chapitre B -1 : Synthèse et caractérisation du bioverre 45S5

B-1-I Synthèse des poudres 44

B-1-II Caractérisation du bioverre 45S5 45

1) Caractérisation physico-chimique 45

a) Contrôle de la composition 45

b) Caractérisation physique 46

c) Comportement thermique 47

2) Caractérisation structurale 48

a) Diffraction des rayons X 48

b) Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier 49

3) Caractérisation microstructurale 50

a) Microscopie électronique à balayage 50

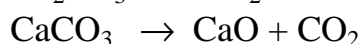
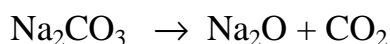
b) Microscopie électronique à balayage environnemental 50

c) Microscopie électronique à transmission 50

---

### **B-1-I Synthèse des poudres**

La synthèse du bioverre se fait par la méthode traditionnelle, c'est-à-dire par fusion d'un mélange de poudres. Les différentes étapes peuvent être visualisées sur le synopsis ci-dessous (figure 1). Des poudres de  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CaCO}_3$  et  $\text{P}_2\text{O}_5$  de haute pureté sont pesées et mélangées afin d'obtenir le bioverre 45S5 (45  $\text{SiO}_2$ , 24.5  $\text{CaO}$ , 24.5  $\text{Na}_2\text{O}$ , 6  $\text{P}_2\text{O}_5$  en %massique). Une étape de décarbonatation est réalisée à  $950^\circ\text{C}$  pendant 5h. Les transformations qui se produisent sont les suivantes:



Le mélange est alors porté à fusion dans un creuset en platine à  $1400^\circ\text{C}$  pendant 4h de façon à homogénéiser le mélange et à baisser significativement sa viscosité afin d'assurer une facilité de trempe. Le fondu est alors trempé dans l'eau, il en résulte des fragments de verre. Ceux-ci sont ensuite broyés dans un broyeur planétaire en milieu liquide afin d'éviter les surchauffes locales pouvant induire la cristallisation du matériau. Nous avons choisi l'éthanol car il ne dissout pas ou très peu les particules de bioverre (contrairement à l'eau) et car ce solvant est plus « propre », que l'acétone par exemple, d'un point de vue environnemental. Les conditions de broyage (temps, type de bille et de jarre, rapport masse de billes sur masse de poudre) ont été optimisées afin d'obtenir une fine poudre de diamètre des particules centré sur  $1,6 \mu\text{m}$  (voir partie « élaboration de blocs poreux », chapitre 1). Un broyeur planétaire (Retsch S100) a été utilisé.

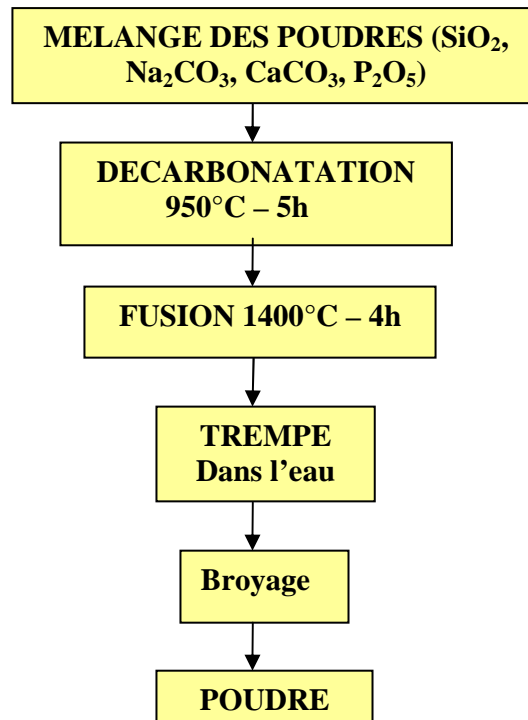


Figure B-1: Synopsis de la synthèse du bioverre

Il est également possible d'obtenir des blocs coulés dense de bioverre en réalisant une trempe à l'air. Pour cette technique le mélange fondu à 1400°C est coulé dans des moules métalliques préalablement préchauffés à 200°C. Ce préchauffage permet d'éviter une fissuration des blocs par choc thermique.

---

## B-1-II Caractérisation du bioverre 45S5

---

### 1) Caractérisation physico-chimique

#### a) *Contrôle de la composition*

La composition des poudres a été vérifiée par spectroscopie à dispersion d'énergie et par couplage torche à plasma-spectrométrie d'émission atomique (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry, ICP-AES Thermoélectronique type 3580).

La spectroscopie à dispersion d'énergie se réalise dans un microscope électronique à balayage à une distance de travail WD de 12 mm et une tension d'accélération des électrons de 20 kV. Elle permet d'enregistrer le spectre d'émission des échantillons de façon à identifier l'ensemble des raies et donc de reconnaître la nature des atomes sources présents dans le volume excité par la source. L'analyse quantitative est obtenue par traitement mathématique du spectre dont tous les éléments sont identifiés. Elle donne la concentration de chaque élément par pourcentage de poids et évalue la concentration de l'oxyde correspondant. Le degré de précision de cette analyse (semi quantitative sans utilisation de témoins) se situe à environ 10 %.

La spectroscopie ICP-AES permet d'identifier et de quantifier tous les éléments de la table périodique dans des solutions à des teneurs très inférieures à 1 µg/l (ppb), elle est donc plus précise que la technique précédente. Elle est fondée sur trois stades principaux : la formation d'atomes, leur excitation et l'émission. Avant excitation, toutes les liaisons atomiques doivent être rompues afin que le spectre d'émission atomique soit exempt d'interférences. L'ICP-AES utilise un plasma comme source d'atomisation et d'excitation. L'analyse quantitative est ensuite conduite en déterminant le spectre d'émission de l'échantillon (caractéristique de chaque atome). La première étape de l'analyse consiste à préparer l'échantillon. Pour analyser le taux de silice présent, les poudres sont traitées par fusion alcaline à 450°C avec un mélange de soude et de nitrate de potassium. Pour le dosage du sodium, du calcium et du phosphore, les poudres sont attaquées dans un bécher en téflon avec un mélange d'acide (acide fluorhydrique, acide perchlorique et acide nitrique). Puis, les acides sont évaporés et les résidus sont repris dans de l'acide nitrique.

### *b) Caractérisation physique*

Les propriétés de surface de la poudre de bioverre sont en grande partie responsables de leur comportement au frittage et de leur bioactivité. Il apparaît donc important de caractériser ces surfaces, entre autre par une mesure de surface spécifique.

Le principe de la méthode de la mesure de la surface spécifique d'un échantillon est fondé sur la détermination du volume gazeux qui serait nécessaire pour former une monocouche de gaz adsorbé à sa surface. On utilise l'adsorption successive en multicouche d'un gaz à très basse température. D'après la théorie de Brunauer-Emmet-Teller (**BET**), l'équation représentative de l'isotherme d'adsorption s'écrit :

$$\frac{P/P_0}{V[1-P/P_0]} = \frac{1}{V_m \cdot C} + \frac{C-1}{V_m \cdot C} \frac{P}{P_0} \quad \text{Eq B-1}$$

Avec, V : volume adsorbé à la pression P

P<sub>0</sub> : pression de vapeur saturante du gaz à la température d'adsorption qui est 77 K

V<sub>m</sub> : volume de la monocouche

C : constante liée aux chaleurs d'adsorption et de liquéfaction du gaz.

La représentation de cette fonction de (P/P<sub>0</sub>) (Equation 1) est linéaire pour des valeurs (P/P<sub>0</sub>) comprises entre 0,05 et 0,35 (domaine de validité du modèle). Ceci permet de déterminer V<sub>m</sub> et donc, de calculer la surface spécifique de l'échantillon par la relation :

$$S = \frac{\sigma V_m N}{V_M} \quad \text{Eq B-2}$$

Avec σ : surface occupée par une molécule du gaz adsorbé

N : nombre d'Avogadro

V<sub>M</sub> : volume molaire.

Cette mesure a été faite par la méthode BET 5 points au moyen d'un appareillage Micromeritics ASAP 2010. L'adsorption est réalisée avec du krypton à la température de l'azote liquide. Avant la mesure, il est nécessaire de dégazer l'échantillon. Cette étape est réalisée 24h à 350°C. Lors de la mesure, le gaz est adsorbé et le volume de gaz adsorbé est traduit en « surface occupée par le gaz adsorbé » et en m<sup>2</sup>. Connaissant la masse initiale de l'échantillon, on remonte

à la surface spécifique exprimée en m<sup>2</sup>/g. Des mesures sur des poudres brutes de 1,6 et 20 microns ont été réalisées, ces tailles de particules étant respectivement utilisées pour l'élaboration de blocs poreux, et pour l'étude du frittage et des transformations structurales du bioverre. Des mesures ont également été réalisées sur des poudres de 20 microns traitées à 5°C/min jusqu'à 700 et 1000°C sans paliers.

La densité absolue du bioverre 45S5 a été mesurée par pycnométrie hélium sur des blocs coulés dense et des poudres traitée et non traitées thermiquement de bioverre. Cette mesure permet de connaître la densité absolue d'un matériau dans le cas où il ne comporte pas de porosité fermée. Elle servira de base aux études sur le frittage.

### c) *Comportement thermique*

Le comportement thermique des poudres de bioverre 45S5 a été déterminé par analyse thermique différentielle (ATD) et analyse enthalpique différentielle (DSC). Ces deux types d'analyse étant couplées à une analyse thermogravimétrique (ATG).

L'analyse thermique différentielle couplée à une analyse thermogravimétrique (SETARAM TG-ATD 92, Caluire, France) a été réalisée sur 20 mg de poudre introduits dans un creuset en alumine et sous une atmosphère de 20% N<sub>2</sub>-80% O<sub>2</sub>. Le comportement globale des poudres de bioverre a été étudié par traitement thermique jusqu'à 1300°C à 5°C/min. L'influence de la taille des grains sur les transformations est étudiée sur des poudres de diamètre de particules de 1,6 µm, 20 µm, 630 µm et 1,5mm dans les mêmes conditions de montée en température. Des cinétiques non isothermes de transformations ont été réalisées jusqu'à 1000°C à des vitesses comprises entre 1 et 20°C/min. Le taux de transformation par cristallisation en fonction de la température a été déterminé par l'équation :

$$\alpha_T(T) = \frac{\int_{T_f}^T H_f(T) \cdot dT}{\int_0^{T_f} H_f(T) \cdot dT} \quad \text{Eq B-3}$$

Où H<sub>f</sub> est le débit de chaleur qui dépend de la différence de température entre l'échantillon et la référence, T la température et T<sub>f</sub> la température de fin de cristallisation

L'analyse enthalpique différentielle couplée à une analyse thermogravimétrique (TG-DSC 111, gaz sweeping circuit) est réalisée sur la même masse de poudre et dans la même atmosphère que ci-dessus pour confirmer le comportement globale des poudres. De plus, des cinétiques isothermes de transformation sont étudiées entre 620°C et 680°C (domaine de cristallisation de la phase principale) sur 10 mg de poudre. Les échantillons sont soumis à un premier chauffage jusqu'à 460°C à 15°C/min, suivi d'un palier de 15 min afin de stabiliser la température et à un second chauffage à 50°C/min jusqu'à la température désirée. Le matériau subit alors un traitement isotherme de 1h30. L'aire totale du pic exothermique de cristallisation est alors mesurée pour chaque température. L'aire du pic à un temps t pour une température donnée normalisée par l'aire totale est calculé afin d'obtenir le degré de cristallisation à température et temps donnés et donc d'établir des courbes TTT (Température-Temps-Transformations). Le degré de transformation à un temps et une température donnés, α<sub>T</sub>(t) est calculé par l'expression suivante:

$$\alpha_T(t) = \frac{\int_0^t H_f(t) \cdot dt}{\int_0^{t_f} H_f(t) \cdot dt} \quad \text{Eq B-4}$$

Où  $H_f$  est le débit de chaleur,  $t$  le temps et  $t_f$  la durée du palier à une température donnée (i.e. 1h30).

## 2) Caractérisation structurale

### a) Diffraction des rayons X

Le broyage du verre est très énergétique et peut induire une cristallisation partielle de la poudre de bioverre, c'est-à-dire la transformation du verre en vitrocéramique. Il apparaît donc nécessaire de contrôler la structure cristalline des poudres obtenues avant traitement thermique par diffraction des rayons X. Puis, après traitement thermique de poudres, il est indispensable d'identifier les phases cristallines en présence et leur évolution avec la température. Le traitement thermique a été réalisé à 5°C/min jusqu'à des températures comprises entre 550°C et 1000°C.

Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de diffraction des rayons X (diffractomètre vertical Rigaku). Les échantillons utilisés sont obtenus par pressage d'un mélange de poudre de bioverre et d'un liant (10% PEG 1500) en comprimé de 1 cm de diamètre. Ces comprimés sont alors analysés entre  $2\Theta = 10^\circ$  jusqu'à  $2\Theta = 90^\circ$  à 5°/min avec un pas de 0,5 pour les poudres traitées et non traitées thermiquement. Puis, pour la détermination plus précise des phases cristallines et de leur évolution, les échantillons sont étudiés dans le même domaine angulaire à 0,2°/min avec un pas de 0,02. Une analyse de Rietveld et le calcul de la taille des cristallites ont été réalisés sur les diffractogrammes obtenus à vitesse lente. La taille des cristallites de la phase principale à différentes températures, a été estimée par l'équation de Scherrer appliquée aux pics de maximum d'intensité:

$$\beta = \frac{k \cdot \lambda}{\zeta \cdot \cos \theta} \quad \text{Eq B-5}$$

Où  $\beta$  est la largeur à mi hauteur du pic corrigé de la largeur expérimentale,  $\zeta$  est la taille des cristallites en mètres,  $\lambda$  la longueur d'onde de la raie  $K_{\alpha 1}$  du cuivre ( $1,5406 \cdot 10^{-10}$  m) et  $k$  la constante de Scherrer égal à 0,89.

L'analyse de Rietveld a été réalisé par l'intermédiaire du logiciel WINPLOTR® afin d'évaluer les paramètres de maille de la phase principale. Les diffractogrammes réalisés à différentes températures ont été comparés au diffractogramme théorique de  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  établi à l'aide de la structure déterminée par Oshato and Maki [1].

La diffraction des rayons X a été utilisée également pour caractériser l'évolution du pourcentage de cristallisation des poudres. Des cinétiques isothermes de cristallisation à 550 et 580°C ont été réalisées sur des compacts de poudre dans un dilatomètre avec une montée de 80°C/min pour des temps de palier allant de 1h à 70h. Les échantillons obtenus sont ensuite

analysés sans ajout de liant par diffraction de rayons X pour remonter au taux de transformation en fonction du temps par l'équation :

$$\alpha_T = \frac{I_{fc}(t) - I_{fc}(am)}{I_{fc}(cris) - I_{fc}(am)} \quad \text{Eq B-6}$$

Avec :  $\alpha_T$  le pourcentage de transformation,  $I_{fc}(t)$  l'intensité du fond continu pour des échantillons traités à un temps  $t$ ,  $I_{fc}(am)$  l'intensité du fond continu du bioverre amorphe et  $I_{fc}(cris)$  l'intensité du fond continu d'un échantillon ayant atteint son maximum de cristallisation possible (80% [2])

### *b) Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier*

La base de la spectroscopie infrarouge est que l'absorption de radiations électromagnétiques dans le domaine infrarouge induit une transition vibrationnelle. En effet, les radiations infrarouges de nombres d'ondes compris entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  sont absorbées par une molécule en tant qu'énergie de vibration moléculaire. Ces absorptions sont quantifiées en mesurant le rapport de l'intensité transmise sur l'intensité incidente en fonction de la fréquence (ou du nombre d'onde); la fréquence d'oscillation dépend des atomes et de la force de la liaison. [3]

Les vibrations peuvent se traduire par:

- Une élévation c'est-à-dire une variation de la distance inter atomique
- Une déformation angulaire, c'est-à-dire une variation de l'angle entre deux liaisons adjacentes.

Les groupes d'atomes où au moins deux atomes sont identiques ont deux modes d'élévation et deux modes de déformation angulaire, symétrique et asymétrique. De plus, les déformations angulaires peuvent être dans le plan ou hors du plan. Les différences de modes vibrationnelle des molécules induisent un positionnement des bandes de vibration différent sur le spectre infrarouge.

Seules les vibrations impliquant une variation de moment dipolaire de la molécule s'observent en infrarouge. En conséquence, les vibrations de liaisons polarisées donneront lieu à des bandes intenses et les bandes de liaisons non polarisées seront peu ou pas visibles sur le spectre.

Un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) (Nicolet Magna-IR 550 spectrometer, Madison, Wisconsin) à été utilisé. Les composés solides sont généralement analysés par l'intermédiaire de pastilles pressées de KBr contenant de l'ordre de 1% de produit à analyser. Cette analyse a été réalisée sur des poudres brutes et traitées thermiquement entre 600 et 1000°C. L'interprétation des spectres se fait par l'intermédiaire de tables donnant la correspondance entre les bandes observées et les liaisons chimiques présentes dans le matériau.

### 3) Caractérisation microstructurale

#### a) *Microscopie électronique à balayage*

Nous avons utilisé un microscope électronique à balayage (MEB, FEI XL30) à 20 kV en mode électrons secondaires pour la caractérisation microstructurale de nos échantillons. De par cette technique, la morphologie et la microstructure des poudres initiales et traitées thermiquement ont été observées. Les poudres ont été visualisées telles qu'elles ainsi qu'après enrobage dans une résine. Afin d'assurer une conductivité électronique correcte et donc d'éviter les phénomènes de charge, les échantillons sont recouverts d'une couche d'or de 25 nm. Pour observer la microstructure interne de grains de poudre traités thermiquement, un amas de poudre est enrobé dans une résine à prise lente, poli au papier SiC (P600-P1200) puis avec des particules de diamant (6-3-1  $\mu\text{m}$ ) et une alumine colloïdale basique. Un dépôt de carbone est ensuite réalisé.

#### b) *Microscopie électronique à balayage environnemental*

L'effet des transformations sur la microstructure d'un grain de poudre a été observé par microscopie électronique à balayage environnemental (ESEM, FEI, XL30, Eindhoven, Pays bas), avec chauffage *in-situ*. Afin de faciliter les observations, des grains de poudre plus gros (de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$ ) sont introduits dans un creuset en platine placé sur une platine chauffante. Ils sont alors traités thermiquement jusqu'à 950°C à 5°C/min, avec un palier de 1h à 460°C pour stabiliser la température, sous atmosphère de vapeur d'eau à 1,9 Torr (250 Pa) dans le microscope. Cette atmosphère permet de faciliter l'imagerie. Cette technique nous a également permis de suivre un phénomène directement lié au frittage, la formation d'un cou entre deux particules. Le cycle de montée en température est le même que précédemment. Des poudres de granulométrie centrées sur 1 et 20  $\mu\text{m}$  ont été utilisées.

#### c) *Microscopie électronique à transmission*

La microscopie électronique à transmission conventionnelle (JEOL 200CX) a été utilisée afin de visualiser l'effet des transformations structurales sur des poudres traitées à 700 et 800°C. Les poudres sont préalablement broyées avec un mortier en alumine monocristalline, puis dispersées dans de l'éthanol. Une goutte est ensuite déposée sur une grille en cuivre recouverte d'un film de carbone. Le séchage laisse des particules individualisées déposées sur le carbone.

## Chapitre B -2 : Elaboration de pièces en bioverre 45S5

- B-2-I Etude de la densification du bioverre 45S5 51
  - 1) Etude dilatométrique 51
    - a) Dilatomètre horizontal 51
    - b) Dilatomètre vertical 52
    - c) Mesure de densité 52
  - 2) Caractérisation mécanique 53
- B-2-II Réalisation et caractérisation des suspensions de poudre 53
  - 1) Mise en suspension 53
  - 2) Caractérisation des suspensions 54
    - a) Comportement rhéologique 54
    - b) Mesures de potentiel zeta 55
    - c) Mesure granulométrique 57
- B-2-III Elaboration et caractérisation des pièces macroporeuses 58
  - 1) Techniques d'élaboration 58
    - a) Imprégnation de mousses 58
    - b) Utilisation de billes de PMMA 59
    - c) Freeze casting 60
    - d) Gel casting 61
  - 2) Caractérisation 61

---

### B-2-I Etude de la densification du bioverre 45S5

---

#### 1) Etude dilatométrique

##### *a) Dilatomètre horizontal*

L'influence des transformations structurales sur le retrait des échantillons a été préalablement étudiée sur des blocs denses obtenus par trempage dans des moules en acier inoxydable préchauffés à 200°C. Ce type d'échantillon, exempt de pores, permet de s'affranchir des processus de frittage. Les mesures ont été réalisées sur un dilatomètre horizontal (Adamel Lhomargy de type DI22). Le support et la tige de ce dispositif sont en silice. Ce dilatomètre



permet donc de travailler jusqu'à des températures de 1000°C sans que le dispositif ne subisse de dilatation significative. Les dimensions des blocs utilisés sont 3x0,5x0,5 cm<sup>3</sup>. Pour s'affranchir au maximum des effets de la transition vitreuse du matériau (enfoncement du palpeur dans les échantillons), température à laquelle la viscosité baisse considérablement, des cales en silice ayant des dimensions semblables à la section verticale de l'échantillon ont été placées entre le palpeur et le bloc de bioverre. Ceci permet de palier à la différence de dimensions entre le palpeur et les échantillons. Le retrait subi par l'échantillon est alors mesuré en fonction de la température jusqu'à 900°C. Avant tout retrait l'échantillon va dans un premier temps subir une dilation dont le coefficient est obtenu par la pente de la droite correspondant au retrait relatif en fonction de la température. Le coefficient de dilatation de la vitrocéramique peut être obtenu de la même manière sur la droite correspondant au refroidissement de l'échantillon.

### *b) Dilatometre vertical*

La dilatométrie verticale (dilatometre vertical SETARAM) a été utilisée pour mesurer le retrait relatif d'un compact de poudre en fonction de la température. La différence principale de cet appareil par rapport au dilatometre horizontal est sa moins bonne précision sur l'obtention des coefficients de dilatation des échantillons. Ceci peut s'expliquer car dans ce dispositif, le support et la tige sont constitués d'alumine. Cette céramique subit une plus grande dilatation thermique que la silice mais permet, en revanche, de travailler à des températures plus élevées. Des comprimés (10 mm de diamètre et 7 mm d'épaisseur) obtenus par pressage uniaxial de poudre à 150 MPa ont été utilisés. Les mesures ont été effectuées sous une atmosphère composée de 80% d'air et 20% d'azote et sous une charge de 5 MPa. Toutes les poudres utilisées pour cette étude ont été préalablement recuites à 460°C pendant 8h, afin de limiter l'effet des contraintes internes présentes dans la poudre suite au broyage.

Dans un premier temps le comportement général au frittage de poudres de bioverre a été étudié sur des poudres de 1,6 microns à 5°C/min jusqu'à 1000°C. Puis, l'influence de la vitesse de chauffe sur le retrait subi par l'échantillon a été étudiée à 1, 10 et 15°C/min. A partir des résultats obtenus, c'est-à-dire du retrait relatif de l'échantillon en fonction de la température, la densité relative à chaque température a été calculée en supposant le retrait isotrope et faible.

$$\rho_T = \frac{m_T}{V_i \left(1 + 3 \frac{\Delta L}{L_0}\right)} \quad \text{Eq B-7}$$

Afin d'étudier l'influence de la taille des grains sur le frittage, des mesures dilatométriques à 5°C/min jusqu'à 1000°C ont été réalisées sur des comprimés obtenus par pressage de poudres ayant une granulométrie de 20 microns. Ces résultats sont alors comparés à ceux obtenus pour des poudres de 1,6 microns.

En outre, des cinétiques isothermes de retrait de 5h ont été réalisées à des températures comprises dans les domaines 550-570°C et 850-920°C par dilatométrie. Ces domaines correspondent aux deux principaux stades de densification du bioverre. Les comprimés de poudre sont portés à 80°C/min à la température désirée, puis un palier de 5h est réalisé.

### *c) Mesure de densité*

Les matériaux frittés ont été caractérisés par mesure de densité géométrique et par la méthode d'Arthur fondée sur le principe d'Archimède. Le taux de densification est donné par le rapport de cette densité sur la densité théorique du matériau lorsque la composition est connue.

$$\tau(\%) = 100 \frac{d_{\text{mesurée}}}{d_{\text{théorique}}} \quad \text{Eq B-8}$$

## 2) Caractérisation mécanique

Les propriétés mécaniques ont été évaluées par essais brésiliens sur des compacts de poudre pressés et traités thermiquement (5°C/min) à différentes températures comprises dans le cycle de densification de blocs poreux. A cet effet, une machine de compression Instron électromécanique 8502, équipée d'une cellule de 5kN a été utilisée. Ce type d'essai permet, en appliquant des forces de compression sur des échantillons sphérique (pastille) posés sur leur tranche, de mesurer les efforts de traction s'appliquant au milieu des échantillons (figure 5).

La contrainte maximale à la rupture s'évalue par l'équation suivante [4] :

$$\sigma_r = \frac{2 \times F_{\text{max}}}{\pi \times L \times \Phi} \quad \text{Eq B-9}$$

Avec  $\sigma_r$  la contrainte maximale à la rupture (en traction)

$F_{\text{max}}$  la force maximale appliquée avant rupture

$L$  l'épaisseur de l'échantillon

$\Phi$  le diamètre des pastilles

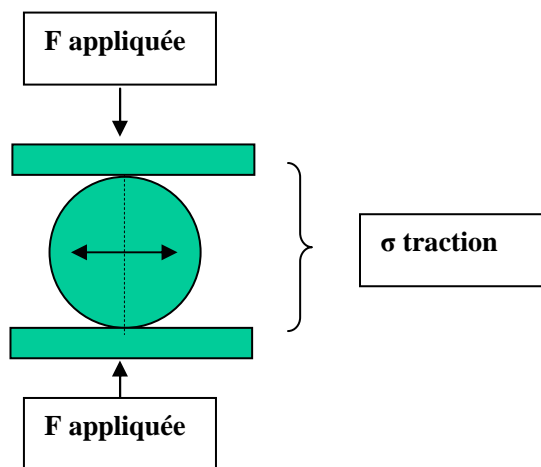


Figure B-2 : principe de la mesure par essai brésilien

## B-2-II Réalisation et caractérisation des suspensions de poudre

### 1) Mise en suspension

Les poudres de bioverre utilisées pour la réalisation ultérieure de blocs poreux sont mises en suspension en milieu aqueux et dans l'éthanol. Ces suspensions sont caractérisées par un pourcentage massique de matière sèche et de milieu (% $M_s$  et % $M_{\text{milieu}}$ ), et une teneur massique en

dispersant D (en % en fonction de la masse de poudre introduite ou en mg d'adjuvant/m<sup>2</sup> de poudre). Le pourcentage de matière sèche est défini par la relation :

$$\%M_s + \%M_{milieu} = 100\% \quad \text{Eq B-10}$$

Les solutions de dispersant ont une concentration de 25% massique. Le calcul des masses de dispersant est alors donnée par :

$$m_D = \frac{m_p \cdot D}{25} \quad \text{Eq B-11}$$

Avec  $m_p$  la masse de poudre introduite et  $m_D$  la masse de dispersant qui rend compte de la masse de molécules actives.

Lorsque la morphologie des poudres change, par exemple à cause d'un changement de taille des particules de poudre de bioverre, il est indispensable de connaître la surface spécifique des différentes poudres afin de pouvoir déduire, en fonction de la masse de matière sèche à mettre en suspension ( $m_p$ ), la valeur de surface d'adsorption totale des grains ( $S_T$ ). Le calcul de masse de dispersant est alors donné par :

$$\begin{aligned} S_T &= m_p \times S_{BET} \\ m_D &= S_T \times D = m_p \times S_{BET} \times D \end{aligned} \quad \text{Eq B-12}$$

Avec D exprimé en mg d'adjuvant/m<sup>2</sup> de poudre

Les taux d'eau et d'éthanol contenus dans les solutions de dispersant doivent être comprises dans le taux de milieu (% $M_{milieu}$ )

La mise en suspension correspond à une étape broyage-mélange réalisée en introduisant les constituants (poudre, milieu de dispersion, dispersant) dans une jarre en polyéthylène de 250 ml. Le broyage est assuré dans un premier temps par des billes en agate de 5 mm de diamètre. Le tout est placé sur un broyeur à boulet à des temps définis par l'expérience. Le rapport entre la masse de bille et la masse de poudre est pris constant et égal à 5. Des billes en zircone de 2mm seront ensuite utilisées à cause des résultats obtenus lors des études réalisées.

---

## 2) Caractérisation des suspensions

### a) Comportement rhéologique

Le comportement rhéologique d'une suspension est obtenu en traçant la contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement  $\tau = f(v_c)$ . Pour déterminer expérimentalement la loi  $\tau = f(v_c)$ , un viscosimètre à cylindres coaxiaux (*Haake VT-501*) a été utilisé. Il est constitué d'une cellule type NV comportant un cylindre fixe (stator) et d'un cylindre mobile (rotor), entre lesquels la barbotine est injectée et subit le cisaillement durant la mesure. La contrainte de cisaillement est mesurée pour différentes vitesses de cisaillement imposées par le rotor.

Le cycle de mesures suivant a été adopté :

- rampe de montée en cisaillement de 0 à 1500 s<sup>-1</sup>, en 2 minutes
- 1 minute de mesure à 1500 s<sup>-1</sup>
- descente de 1500 à 0 s<sup>-1</sup> en 2 minutes

Deux types de viscosités peuvent être déduites à partir de ces résultats : la viscosité réelle représentée sur la figure A (pente de la tangente à la courbe  $\tau = f(v_c)$  à une vitesse donnée,  $\delta\tau/\delta v_c$ ), et la viscosité apparente représentée sur la figure B ( angle formé entre l'axe des abscisses et la droite reliant l'origine à la courbe  $\tau = f(v_c)$  à une vitesse donnée,  $\tau / v_c$ ).

Le logiciel de viscosimétrie calcule la viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement.

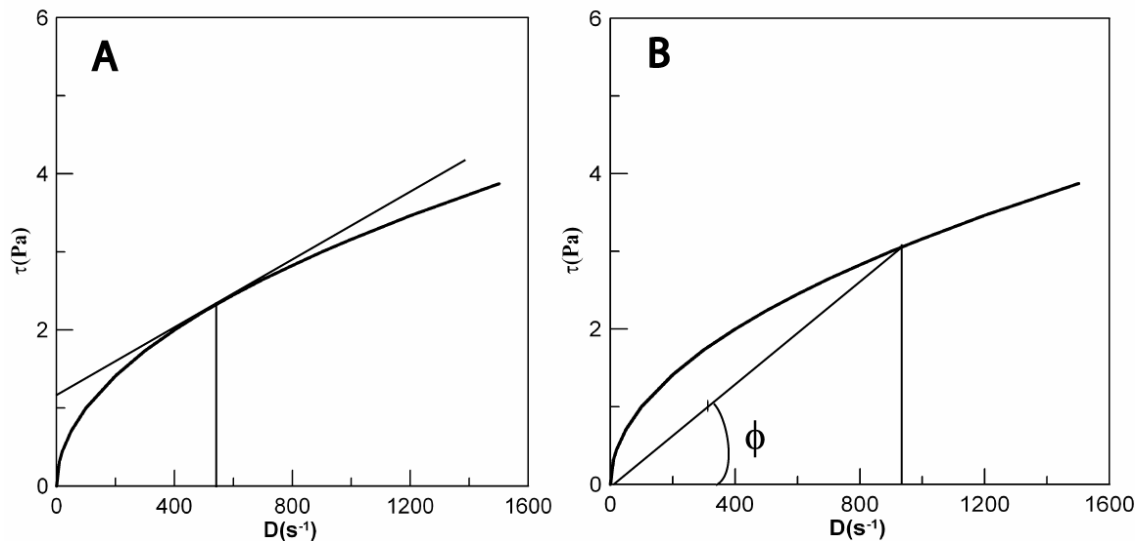


Figure B-3 : Mesure de la viscosité réelle (A) et apparente (B)

### b) Mesures de potentiel zeta

Le potentiel zeta est une mesure des charges à la surface des particules. Les charges des particules peuvent être contrôlées en modifiant la composition chimique du liquide de suspension. Ces modifications incluent, entre autre le changement du pH ou le changement des espèces ioniques en solution. [5]. La mesure du potentiel zéta permet de comprendre et de contrôler les suspensions colloïdales.

Le modèle de la double couche électrique est utilisé pour visualiser l'environnement ionique d'un colloïde chargé et expliquer comment les forces répulsives apparaissent. Il est plus aisé de comprendre ce modèle en tant qu'une séquence d'étapes se déroulant autour d'un unique colloïde chargé négativement lorsqu'il est soudainement dépouillé de ses contre ions. On regarde dans un premier temps l'effet du colloïde sur les ions positifs en solution. Initialement, l'attraction due au colloïde négatif induit la formation d'une couche d'ions positif autour de la surface du colloïde, cette couche est appelé la couche de Stern. Lorsque d'autres ions positifs seront attirés par le colloïde, il y aura répulsion par la couche de Stern ainsi que par d'autres ions positifs qui tentent de s'approcher du colloïde. Cet équilibre dynamique donne alors naissance à une couche diffuse de contre ions. Cette couche, très concentrée près de la surface du colloïde, devient de moins en moins dense lorsque qu'on s'éloigne de la surface jusqu'à ce qu'elle forme un équilibre avec la concentration du contre ion en solution. A l'inverse, à cause des phénomènes de répulsions, il n'y aura aucun ion négatif au voisinage de la surface du colloïde. Leur concentration augmentera progressivement avec la distance, les forces répulsives du colloïde étant écrantées par

les ions positifs, jusqu'à ce que l'équilibre soit de nouveau atteint. La couche diffuse peut être visualisée en tant qu'une atmosphère chargée entourant le colloïde (figure 4).

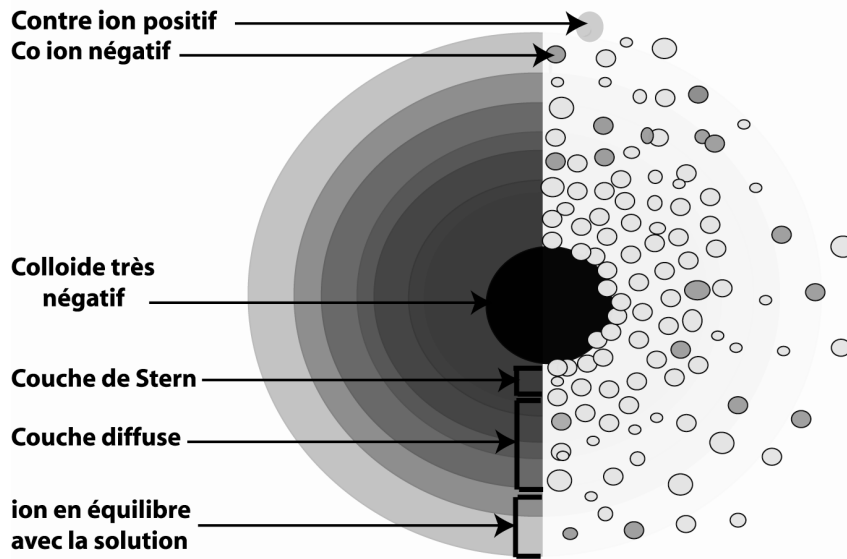
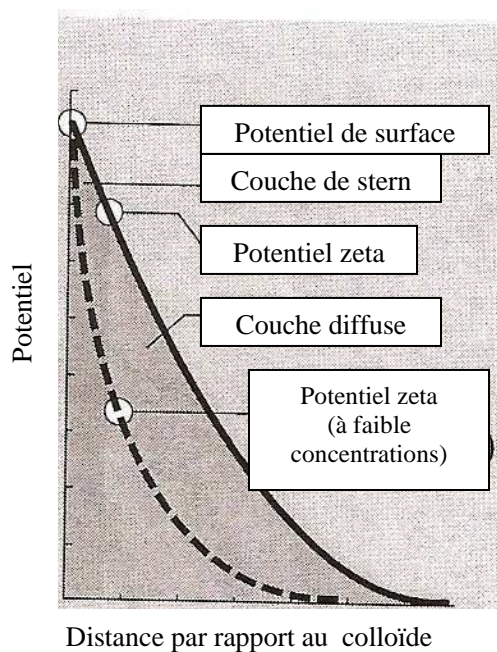


Figure B-4 : Deux visions de la double couche : A gauche, le changement de densité de charge autour du colloïde ; a droite, distribution d'ions positifs et négatifs autour du colloïde chargé

La densité de charge à une distance quelconque de la surface est égale à la différence de concentration des ions positifs et négatifs en ce point. La densité de charge, importante au proche voisinage du colloïde, diminue progressivement jusqu'à s'annuler lorsque les concentrations des ions positifs et négatifs s'égalisent. Les contre ions de la couche de stern et l'atmosphère chargée de la couche diffuse constituent la double couche électronique. L'épaisseur de cette couche dépend du type et de la concentration des ions en solution.

La double couche est formée afin de neutraliser le colloïde chargé. Il existe un potentiel électrocinétique entre la surface du colloïde et un point quelconque dans la masse de la suspension. Cette différence de voltage, de l'ordre du millivolt, est connue en tant que potentiel de surface. L'amplitude de ce potentiel de surface est corrélée aux charges de surface et à l'épaisseur de la double couche. En partant de la surface, ce potentiel diminue quasi linéairement dans la couche de stern, puis exponentiellement à travers la couche diffuse, se rapprochant de zéro au passage de la liaison imaginaire de la double couche. La courbe de potentiel est très utile car elle indique l'intensité des forces électriques entre les particules et la distance à laquelle ces forces rentrent en jeu (Figure 5).

Une particule chargée se déplacera à une vitesse fixe dans un champ de potentiel. La mobilité des particules est reliée à la constante diélectrique, la viscosité de la suspension et au potentiel électrique à l'interface entre les particules en mouvement et le liquide. Cette interface est couramment définie comme le point de jonction entre la couche de Stern et la couche diffuse. La couche de Stern est considérée comme étant rigidement attachée au colloïde alors que la couche diffuse ne l'est pas. Par conséquent, le potentiel électrique à cette interface est reliée à la mobilité des particules et est appelée potentiel zêta ( $\zeta$ ).



**Figure B-5 : Potentiel zéta en fonction du potentiel de surface ; La relation entre le potentiel zeta et le potentiel de surface dépend du taux d'ions en solution**

La mesure du potentiel  $\zeta$  sur des suspensions concentrées a été réalisée par la technique d'accoustophorèse. Les techniques conventionnelles (électrophorèse) mesurent, par des moyens optiques, la vitesse à laquelle les particules se déplacent sous l'action d'un champ électrique. Pour cela, les milieux doivent être suffisamment dilués pour permettre le passage de la lumière. Les résultats sont alors difficilement extrapolables à l'élaboration des céramiques, qui nécessite l'emploi de suspensions à fort taux de matière sèche. L'accoustophorèse, utilisée dans cette étude, permet au contraire d'effectuer des mesures dans des systèmes opaques, à fort taux de matière sèche, car elle mesure la vitesse des particules en recueillant des sons plutôt que de la lumière. En effet, sous l'action du champ électrique, les particules vibrent à une fréquence dépendant de leur charge électrique. Ce mouvement génère des ultrasons, qui permettent de remonter à la vitesse des particules, puis au potentiel zéta [5].

Les mesures ont été réalisées au centre SPIN de l'Ecole de Mines de St Etienne. L'appareil utilisé est un *acoustosizer II, de Colloidal Dynamics*. Lors de cette étude, le taux de matière sèche massique utilisé est de 35 %. Des mesures avec et sans dispersant ont été réalisées. Le taux massique couramment utilisé pour l'élaboration de blocs poreux est de 45 à 55%. On peut donc s'attendre à de légères variations lors de la mise en pratique.

### c) *Mesure granulométrique*

La méthode la plus directe pour caractériser la désagglomération des suspensions est la mesure granulométrique. La présence d'agrégats et/ou d'agglomérats dans les suspensions se visualiserait par une distribution multimodale et/ou une distribution moyenne de taille plus élevée.

Les distributions de taille des particules ont été déterminées par mesures granulométriques sur un granulomètre à diffraction laser *Malvern Mastersizer 2000* en milieu liquide. Il est possible d'obtenir les paramètres caractéristiques de la granulométrie d'une poudre : par exemple, le  $D(0,5)$  la taille médiane des particules, le  $D(0,1)$  et le  $D(0,9)$  la taille au dessous de laquelle se trouve respectivement 10% et 90% du volume de toutes les particules. Le résultat exprimé est une

distribution en volume. Pour une particule donnée, l'appareil donne le diamètre équivalent d'une sphère ayant le même volume. Il est souvent nécessaire de coupler ces mesures à des observations morphologiques de manière à s'affranchir des erreurs dues à des particules à facteurs de forme élevés (ce qui n'est pas le cas dans notre étude).

---

## B-2-III Elaboration et caractérisation des pièces macroporeuses

Ce chapitre vise à présenter les techniques d'élaboration des blocs poreux à base de bioverre qui permettraient de régénérer l'os et d'être facilement manipulables par un chirurgien. La structure idéale doit contenir à la fois des micropores (inférieurs à 1 micron) pour permettre l'accroche des cellules et des macropores (supérieure à 100 microns) afin d'induire l'intégration de l'implant par une possibilité de vascularisation du matériau [6]. La structure doit également être interconnectée pour assurer le transport des nutriments et des cellules lorsque le substitut est implanté [7]. Il existe plusieurs manières d'élaborer des blocs poreux. La plupart de ces techniques font intervenir l'ajout d'un polymère en tant que matériau sacrificiel. Le problème majeur de l'ajout de polymère sous forme de particules indépendantes est l'absence ou la réduction des interconnexions dans les poreux finaux. C'est pour cette raison que nous avons choisi d'utiliser des préformes de polymère telle que des mousses en polyuréthane et mélamine, ainsi que des billes de PMMA frittées. Un autre moyen de création de la porosité est l'utilisation de la technique du freeze casting qui consiste à congeler une barbotine et à sublimer la glace, cette méthode sera développée plus amplement ci-dessous. Malgré les inconvénients de l'ajout de particules de polymère, nous avons essayé aussi cette technique en combinaison avec celle du gel casting puisque cette dernière permet une usinabilité des crus plus facile que les autres techniques.

Le but de cette étude sera de comparer ces différentes techniques d'élaboration de poreux en terme de faisabilité, taux de porosité, taille des pores et architecture. On dégagera notamment les limites expérimentales de ces différents procédés.

---

### 1) Techniques d'élaboration

#### a) *Imprégnation de mousses*

Le principe de cette technique est d'imprégner une mousse polymère avec une barbotine de bioverre. Plus cette barbotine sera visqueuse et plus il y aura de matière qui adhèrera au parois de la mousse. Après déliantage, c'est-à-dire combustion de la mousse, il ne reste plus qu'une réplique en positif de la mousse [8]. Cette structure de faibles propriétés mécaniques doit alors être soumise à un traitement thermique de frittage.

La réalisation de poreux obtenus par cette technique nécessite donc une optimisation de la viscosité des barbotines, de l'imprégnation, du déliantage et du frittage. On tentera également d'optimiser les propriétés mécaniques des poreux par imprégnation successives et en jouant sur les caractéristiques de la barbotine de départ.

Deux types de mousses ont été utilisés : des mousses à base de mélamine (taille des pores de 120 microns) et de polyuréthane. Pour ces dernières, trois tailles de pores, compatibles avec les besoins des substituts osseux, ont été mises en œuvre : 100 à 250 microns (petits pores, 75 ppi), 250 à 500 microns (moyens pores, 45 ppi) et 500 à 1000 microns (gros pores, 20ppi). L'unité

« ppi » généralement utilisée pour définir la porosité des mousses correspond au nombre de pores par unités de longueur, le pouce (inch).

Les mousses de départ ont été imprégnées manuellement. L'excédent de barbotine est enlevé par pressions successives jusqu'à ce que plus aucune matière ne soit susceptible de partir. Cette imprégnation s'effectue trois fois avec un séchage de 10 min entre chaque imprégnation. Le principe de base de l'imprégnation est schématisé sur la figure 6.

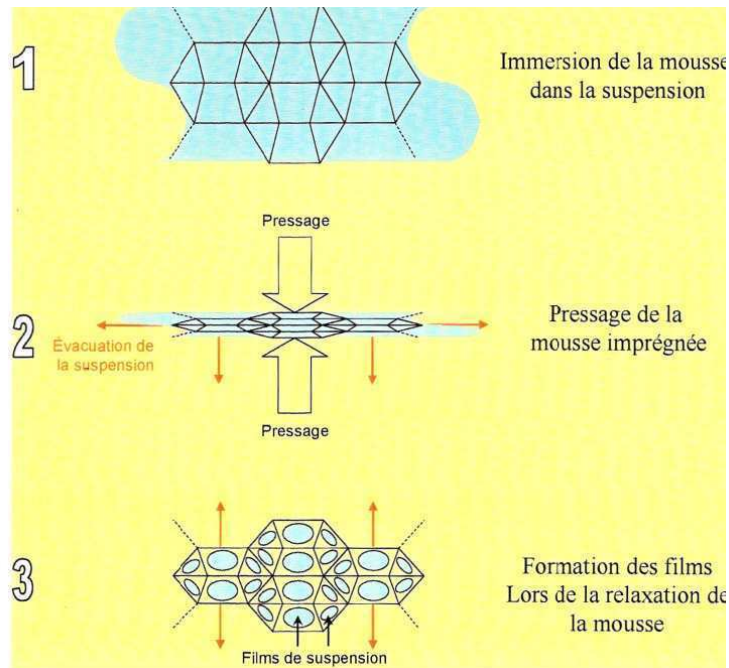


Figure C-6 : Principe de l'imprégnation de mousse

Après 72h de séchage à l'ambiante, les mousses imprégnées sont déliantées. Le cycle de déliantage a été déterminé par l'analyse thermogravimétrique (ATD/ATG) des deux mousses. Les zones d'intérêt sont celles où la perte de masse est la plus rapide. Le contrôle de ces dernières est crucial pour l'intégrité des poreux. L'utilisation d'un mauvais cycle de déliantage induirait une forte fissuration des échantillons dû à un départ trop rapide du polymère.

La température de densification des poreux a été déterminée par l'intermédiaire de l'étude sur la densification des poudres de bioverre.

Enfin, l'optimisation du procédé d'imprégnation de mousses a porté sur :

- l'ajout de liant en vue d'augmenter la viscosité des barbotines et donc de retenir plus de matière sur les parois de la mousse
- le pH de la barbotine pour optimiser la dispersion des poudres
- la double imprégnation en vue de combler les défauts créés par le départ de la mousse. Celle-ci c'est effectué sur des mousses après déliantage et après frittage.

### ***b) Utilisation de billes de PMMA***

Des billes de PMMA de granulométrie comprise entre 600 et 1000 microns ont été utilisées dans un premier temps par mélange simple avec une barbotine. Puis des préformes ont été réalisées.



Les préformes de billes de PMMA peuvent être réalisées de deux manières différentes : par voie chimique ou par voie thermique. La voie chimique consiste, par utilisation d'acétone, à créer une dissolution contrôlée de la surface des billes afin de les coller et ainsi d'obtenir une structure poreuse [9]. La voie thermique, quant à elle, permet de fritter un empilement de billes de PMMA. Après imprégnation de la suspension de bioverre, séchage et déliantage, seule la matière déposée sur les parois de ces empilements reste présente : on obtient un négatif de l'empilement de départ

La voie chimique nécessite une étude approfondie, par manque de temps, nous nous sommes donc essentiellement concentrés sur la seconde voie. La première étape du procédé est l'obtention d'une préforme correcte par optimisation des conditions (température, temps) de frittage.

Puis, il faut optimiser les suspensions avec lesquelles les préformes seront imprégnées. Le cycle de déliantage est défini, dans un premier temps, par l'intermédiaire de l'analyse thermogravimétrique du PMMA à 5°C/min sur 70 mg de billes.

### c) *Freeze casting*

La technique de freeze casting consiste à congeler une barbotine de manière directionnelle, sur un doigt froid placé dans de l'azote liquide, et sublimer ensuite la glace dans un lyophilisateur. Le taux de porosité des poreux peut être modulé par le taux de matière sèche utilisé. La vitesse de refroidissement joue sur la taille des pores et sur l'architecture des poreux [10].

Le montage de base utilisé pour la congélation des barbotines est présenté sur la figure 7.

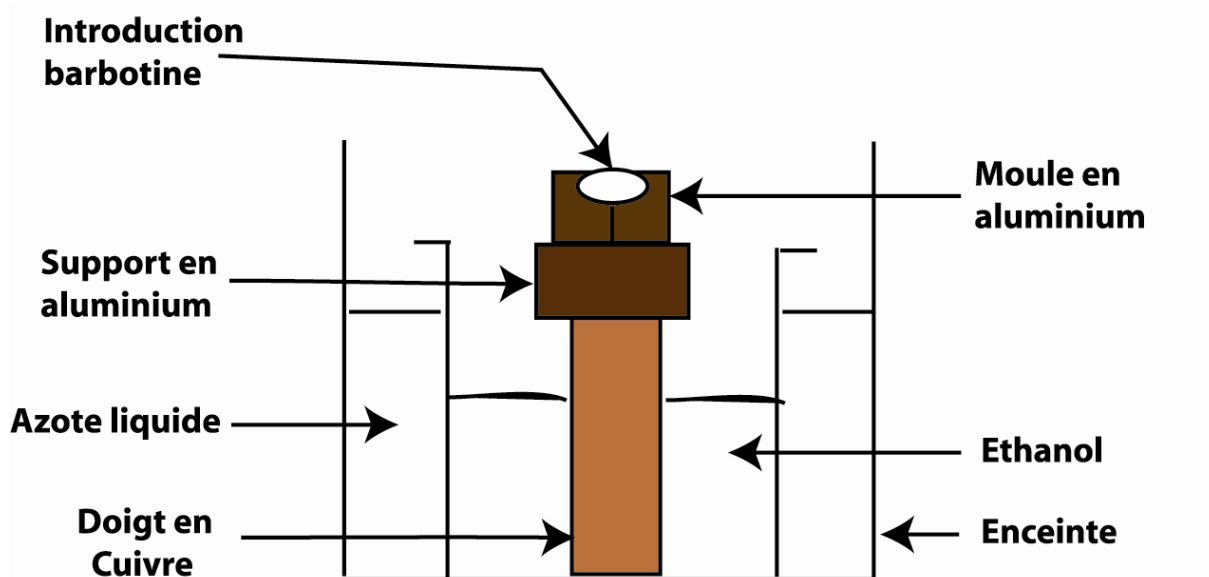


Figure B-7 : Montage utilisé pour la congélation de la barbotine

Des éléments chauffants et des thermocouples relient le support et le moule en aluminium à un dispositif de contrôle de température. Ce dispositif permet de contrôler la vitesse de refroidissement.

Après congélation des barbotines sur le doigt froid, l'eau contenue dans les échantillons est sublimée dans un lyophilisateur. En sortie du lyophilisateur, les poreux subissent un traitement thermique de frittage

#### *d) Gel casting*

Les essais ont été effectués au politechnico de Turin dans le laboratoire dirigé par le professeur Laura Montanaro en collaboration avec Mariangela Lombardi. Ce stage a été financé par une bourse Egide.

Le principe de cette technique est d'introduire dans une suspension de poudre céramique, un agent qui va polymériser, soit par action d'un changement de température, soit par ajout d'un réactif, et qui va conférer une grande tenue mécanique aux crus obtenus [11].

Pour les suspensions à base de bioverre, nous avons choisi d'utiliser de la gélatine animale qui présente l'avantage de n'être pas toxique comme la plupart des autres agents précurseurs de polymérisation.

La gélatine utilisée se présente sous forme de fines poudres mise en suspension à chaud (40°C) dans de l'eau. Elle est constituée de chaînes polypeptidiques qui vont s'arranger en un réseau tridimensionnel lors du refroidissement des suspensions [12]. Cette gélification se produira pour des suspensions ayant un pH inférieur à 10.

Le problème des poudres de bioverre en suspension est leur dissolution qui induit un pH basique (pH = 12) de leur environnement. La suspension est alors trop basique pour permettre la gélification, il est donc nécessaire d'utiliser un tampon. Deux tampons ont été sélectionnés et utilisés :  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Bien que les suspensions présentent globalement un pH inférieur au seuil maximal de gélification, la gélatine ne subit aucun réarrangement de réseau avec la baisse de température, ou si elle en subit un, il est réversible et la gélification n'a donc pas lieu. On observe les mêmes résultats pour des taux de gélatine allant de 1 à 10%. Nous en avons conclu que même en présence d'un tampon, les particules continuent de se dissoudre et ont un pH local de surface au dessus de 10. Pour palier cet inconvénient, nous avons donc choisi de créer un tampon entre une solution d'acide acétique et le sodium des particules de bioverre afin de jouer directement sur la surface des particules. Cette méthode est concluante au point de vue de la gélification des suspensions. Enfin, pour induire la macroporosité des échantillons, cette technique a été mise en œuvre en introduisant des billes de PMMA dans la barbotine ou en combinaison avec l'imprégnation de mousse.

---

## 2) Caractérisation

La porosité des blocs poreux et les tailles de micropores et macropores ont été caractérisées par mesure de densité géométrique et par microscopie électronique à balayage. L'architecture interne (interconnection, réseau poreux, réseau trabéculaire) des poreux a été déterminée par tomographie X.

La tomographie X est une technique non destructive pour la reconstruction tridimensionnelle d'un échantillon. Elle permet d'obtenir des images en transmission de haute résolution et ainsi de reconstituer soit des coupes bidimensionnelles soit l'intégralité de l'architecture 3D des échantillons. Les échantillons ont été analysés grâce au système (modèle V-

TomeX, Phoenix X-rays). Le principe de l'analyse repose sur l'intégration de clichés de densimétrie par rayons X. Le rayonnement source provient d'un tube à émission de rayons X (les paramètres d'émission sont  $U = 65 \text{ kV}$  et  $I = 120 \mu\text{A}$ ) alors qu'un capteur CDD est en charge de la réception du rayonnement transmis. L'échantillon est placé entre la source et le capteur CDD sur un support permettant une rotation de celui-ci. Le grandissement qui contrôle la résolution peut être modulé en faisant varier la distance entre l'échantillon et la source (résolution de  $5 \mu\text{m}$  obtenue). La reconstruction tomographique tridimensionnelle des échantillons est alors calculée à partir des 1000 images de projection.

## Chapitre B -3 : Caractérisation biologique

B-3-I Influence des transformations sur la bioactivité 63

B-3-II Evaluation biologique du bioverre *in vitro* 65

- 1) Mise en place d'un protocole de culture 65
- 2) Culture cellulaire 65

L'effet des transformations sur les propriétés biologiques a été étudié de deux manières :

- d'une part en terme d'influence sur la réactivité chimique du matériau, caractérisée par sa capacité à former une hydroxyapatite carbonatée à sa surface, phénomène lié à sa bioactivité ;
- d'autre part en terme de possibilité de culture d'ostéoblastes, cette étude incluant la mise en place d'un protocole de culture et la culture cellulaire elle-même.

### B-3-I Influence des transformations sur la bioactivité

La bioactivité d'un matériau est défini comme étant sa capacité à favoriser tous les processus de repousse osseuse [13]. Dans le cas du bioverre, cette bioactivité provient des différents processus de dissolution/reprécipitation conduisant à la formation d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée (HAC) [14]. Afin de comparer l'influence des transformations structurales sur la bioactivité, celle-ci a été mesurée par l'établissement de cinétiques de formation d'HAC en milieux aqueux sur des poudres de bioverre brute et traitées thermiquement à différentes températures, ainsi que sur des blocs poreux frittés à 1000°C obtenus par imprégnation de mousses. Les températures de traitement de la poudre ont été choisies à la séparation de phase  $T_s = 580^\circ\text{C}$ , à la fin de la cristallisation de  $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$  ( $750^\circ\text{C}$ ), au début de la cristallisation de la phase phosphate ( $800^\circ\text{C}$ ) et à la fin du traitement thermique appliqué lors du frittage de blocs poreux ( $1000^\circ\text{C}$ ). Le milieu aqueux utilisé est du Simulated Body Fluid (SBF) [15] ayant une composition ionique proche à celle du plasma humain (figure 8).

Ion	Concentration en ion (mM)	
	Plasma sanguin	SBF
$\text{Na}^+$	142.0	142.0
$\text{K}^+$	5.0	5.0
$\text{Mg}^{2+}$	1.5	1.5
$\text{Ca}^{2+}$	2.5	2.5
$\text{Cl}^-$	103.0	147.8
$\text{HCO}_3^-$	27.0	4.2
$\text{HPO}_4^{2-}$	1.0	1.0
$\text{SO}_4^{2-}$	0.5	0.5
pH	7.2-7.4	7.4

Figure B-8 : Concentration ionique du SBF et du plasma humain

Le SBF comme le plasma est une solution saturée. Pour cette raison, quelques sites de nucléation sont suffisants pour observer la nucléation de l'hydroxyapatite à la surface du matériau. Cette formation de couche d'HAP en surface du bioverre va permettre par la suite de diminuer le relargage ionique et donc diminuer le pH lors de la culture cellulaire.

Le tableau 1 récapitule les quantités de réactifs ainsi que l'ordre d'introduction de ceux-ci pour obtenir une solution de SBF. Cette solution doit être réalisée (à 37°C) et conservée dans un bécher en plastique au réfrigérateur afin qu'il n'y ait pas de précipitation des réactifs.

Ordre	Réactifs	Quantité	Pureté (%)	Masse molaire
1	NaCl	8.035 g	99.5	58.4430
2	NaHCO <sub>3</sub>	0.355 g	99.5	84.0068
3	KCl	0.225 g	99.5	74.5515
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0.231 g	99.0	228.2220
5	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.311 g	98.0	203.3034
6	1.0M-HCl	39 ml	-	-
7	CaCl <sub>2</sub>	0.292 g	95.0	110.9848
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.072 g	99.0	142.0428
9	Tris	6.118 g	99.0	121.1356
10	1.0M-HCl	0 – 5 ml	-	-

Tableau B-1 : Ordre, quantités, puretés, et masse molaire des réactifs utilisés pour préparer 1000ml de SBF

Après l'étape 6, le pH doit être au alentour de 2 à 37°C. Le Tris est rajouté afin d'obtenir un pH de 7,45. S'il reste du Tris, on alterne alors entre ajout de HCl jusqu'à un pH maximal de 7,40 et ajout de Tris jusqu'à un pH maximal de 7,45. Le pH final du SBF à 37°C doit être égal à 7,42.

0,5g de poudre sont placés dans 20ml de SBF dans un récipient en plastique (PE) et incubé à 37°C, dans une enceinte thermostatée, pour des temps allant de 1h à 1 mois, le SBF étant changé tous les deux jours pour assurer le renouvellement ionique des solutions. Les poudres sont alors récupérées par filtrage des solutions et lavage à l'acétone pour arrêter la réaction de dissolution. Les poudres sont ensuite observées par microscopie électronique à balayage. La formation d'une hydroxyapatite carbonatée avec le temps d'incubation a été également observée par diffraction de rayons X.

Des blocs (1cmx1cmx1cm) de bioverre à 90% de porosité, obtenus par le procédé d'imprégnation de mousse de 20 ppi, sont introduits dans 20ml de SBF pour des temps allant de 1 jour à 2 mois. Puis les échantillons sont nettoyés à l'acétone, pour arrêter la réaction de dissolution, et étuvé à 55°C. Une fois secs, ils sont introduits dans de la résine et polis dans les mêmes conditions que les poudres traitées thermiquement dont on veut observer la microstructure interne des grains (cf partie B). Après un dépôt de carbone, les échantillons sont observés à l'aide d'un microscope à balayage environnemental couplé à une analyse EDX. Pour chaque temps, les épaisseurs de la couche d'HAC, de la couche riche en silice et du verre restant sont mesurées. La même procédure est réalisée pour des blocs poreux immergés 15 jours dans du SBF et entre 3 et 40 jours dans du milieu de culture (DMEM).

## **B-3-II Evaluation biologique du bioverre *in vitro***

---

### **1) Mise en place d'un protocole de culture**

Le bioverre 45S5 mis en solution induit un pH basique du milieu qui conduit à une nécrose des cellules. La mise en place d'un protocole de culture cellulaire doit donc inclure une maîtrise du pH. La première étape est d'évaluer le pH du milieu de relargage du bioverre dans différentes solutions et différentes concentrations de bioverre. Les essais ont été menés sur de la poudre de bioverre et des blocs poreux traités à 800°C (diamètre moyen des pores compris entre 100 et 500 µm) et à 1000°C (diamètre moyen des pores compris entre 500 et 1000 µm).

La bioactivité du bioverre et donc l'élévation du pH a été suivie dans trois solutions différentes : l'eau, le SBF et le DMEM (milieu de culture cellulaire). La poudre de bioverre a été mise en solution dans ces trois différentes solutions qui ont des compositions ioniques différentes, le SBF et le DMEM étant plus proche de la concentration et du pH plasmatique. La poudre a été mise en solution à raison de 0.1g/ml et 0.01g/ml à 37°C, les solutions ont été changées tous les jours. Le pH a été mesuré tous les jours pendant 16 jours. On regarde alors la solution qui permet de stabiliser le pH en un minimum de temps. Dans le cas des blocs de bioverre, la concentration initiale est de 0,1g/ml. Celle-ci est ensuite adaptée en fonction du pH obtenu.

### **2) Culture cellulaire**

Cette étude a été réalisée dans le laboratoire «Biomatériaux et remodelage matriciel» de l'université Claude Bernard de Lyon I sous la direction du professeur Daniel Hartmann, en collaboration avec Magalie Berthelot (entreprise Nortaker) et Rami Maksoud.

Le but de cette étude est de mettre des cellules en contact avec les blocs de bioverre afin de visualiser les interactions cellules/biomatériaux en microscopie électronique et d'évaluer la cytotoxicité. Etant donné les problèmes de pH basique rencontrés avec des biomatériaux contenant du bioverre, nous avons traité les blocs pour faire diminuer le pH en solution. Cette expérience a pour but de savoir si les cellules prolifèrent sur ces blocs traités.

Dans cette étude, les blocs poreux de bioverre obtenus à 800°C (taille de pores comprise entre 100 et 500 µm ) sont traités dans la solution SBF afin de diminuer le relargage ionique du bioverre. Les blocs sont ensuite mis en contact direct avec les cellules : la prolifération cellulaire est analysée au bout de 7 jours de culture par le test MTT et l'adhésion des cellules sur les blocs est observée en microscopie électronique à balayage.

Les cellules (ostéoblastes et fibroblastes) sont cultivés dans du milieu de culture DMEM (Gibco) (composé principalement en ions inorganiques et en acide aminés) supplémenté en sérum de veau foetal 10 % (Gibco) et en antibiotiques (ciprofloxacine, 10mg/ml, Bayer). Ces cellules adhérentes sont incubées dans une étuve à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Lorsque les cellules sont confluentes, les cellules sont décollées sous l'action de la trypsine puis comptées avec une cellule de Malassez et réensemencées.

Les blocs poreux de bioverre traités dans le SBF sont lavés à l'éthanol et séchés à l'étuve à 50°C. Les blocs de bioverre sont ensuite mis dans une plaque de 24 puits (2 blocs=0.12g par puits) en présence de 1 ml de milieu pendant 3 jours. 50 000 cellules sont ensuite déposées dans les puits, le puit contrôle étant les cellules sans matériaux.

La viabilité cellulaire est évaluée au bout de 7 jours de culture des ostéoblastes MG63 sur les blocs de bioverre en effectuant un test MTT. Le MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) est un sel de tetrazolium très efficace pour la quantification de la viabilité cellulaire. Le MTT est clivé en formazan par l'enzyme succinate de déshydrogénase mitochondriale présente dans les cellules métaboliquement actives. Cette enzyme, par coupure du cycle de tétrazolium, transforme le MTT de couleur jaune en cristaux de formazan bleus insolubles dans l'eau. La mesure du formazan est effectuée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 570 nm.

Pour l'observation des cellules sur les blocs de bioverre en microscopie électronique à balayage, des fibroblastes issus de prélèvements de peau humaine et des ostéoblastes de la lignée MG63 ont été cultivés avec les blocs pendant 13 jours, changeant le milieu de culture tous les deux jours. Les échantillons ont été fixés et deshydratés suivant le protocole suivant :

- 1) Fixation au paraformaldéhyde AFA pendant 2 heures à température ambiante
- 2) 2 rinçages au PBS
- 3) rinçage à l'eau distillée
- 4) Immersion dans l'alcool 30% pendant 10min
- 5) Immersion dans l'alcool 50% pendant 10min
- 6) Immersion dans l'alcool 70% pendant 10min
- 7) Immersion dans l'alcool 95% pendant 10min, 2 fois
- 8) Immersion dans l'alcool 100% pendant 20min, 3 fois
- 9) Laisser sécher sur la nuit
- 10) Les échantillons sont ensuite métallisés

Les différents échantillons sont ensuite observés au microscope électronique à balayage.

Des cinétiques de culture d'osteoblastes ont été également réalisées pour des temps allant de 3 à 40 jours sur des blocs poreux obtenus à partir de mousses de bioverre de 20 et 75 ppi frittés à 1000°C et sur des blocs poreux de HAC/TCP (70/30) de macroporosité moyenne égale à 300 µm. Ces derniers permettront de comparer ces deux matériaux

La caractérisation des blocs et des cellules, fixées par l'intermédiaire de bains d'éthanol, a été réalisée par microscopie électronique à balayage et microscopie confocale. Dans ces essais on s'intéresse à l'accrochage, à la prolifération et à la mobilité cellulaire à travers le volume du bloc poreux. Pour la microscopie confocale, les échantillons doivent subir un marquage. Pour marquer les osteoblastes ensemencées dans les substituts, l'iodure de propidium « IP » a été choisi. C'est un marqueur fluorescent localisé au niveau des noyaux cellulaires, il est donc nécessaire de fixer la culture et de perméabiliser la membrane cellulaire pour que ce marquage soit efficace. Les cultures sont donc rincées en PBS (Phosphate Buffer Saline) et fixées dans de l'AFA (Alcool Formolé Acétique) 0,8% à 4°C pendant 24h. Après un rinçage en PBS, le marquage est réalisé avec de l'IP à 10 µg/mL (Sigma, réf. P-4170) en PBS [solution stock 1 mg/mL dans du PBS BSA 1% (Bovine Sérum Albumine) (Sigma, réf. A 9647) + 0,1% Tween 20 (Sigma, réf. P 7949)] pendant 35 minutes à température ambiante et à l'obscurité.

Pour étudier la capacité des ostéoblastes à synthétiser le collagène I au sein des substituts, le collagène a été marqué par anticorps spécifique. Entre chaque étape pendant le marquage, les cellules ont été rincées en PBS une fois rapidement et une fois pendant 10 mn à la température

## Techniques expérimentales – Caractérisation biologique

ambiante et en atmosphère humide. L'anticorps primaire (anti-collagène humain) dilué dans du PBS/BSA 3% (à une dilution 1/40) a été ajouté dans les puits et laissé pendant 45 mn. Puis l'anticorps secondaire, couplé à la FITC ( fluoresceine isothiocyanate) et dilué dans du PBS/BSA 3% au 1/100, a été ajouté après l'enlèvement de l'anticorps primaire et le rinçage et laissé pendant 45mn. Enfin un rinçage rapide en PBS a été effectué puis les puits ont été enlevés et rincés en PBS avec quelques gouttes de bleu Evans pendant 10mn. La glycérine tamponnée est appliquée sur la lame qui est recouverte par une autre lame pour l'observation au microscope à fluorescence.



---

## REFERENCES DE LA PARTIE B

- 1- Oshato H, Maki I. Structure of  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ . Acta Cryst., 1985, vol. C41, pp.1575-1577.
- 2- QZ. Chen, ID. Thompson, AR. Boccaccini. 45S5 Bioglass® -derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterial, 2006, vol. 27, pp. 2414-2425.
- 3- [www.chimie.umontreal.ca](http://www.chimie.umontreal.ca)
- 4- A. Aydin et A. Basu. Technical note : The use of Brazilian Test as a quantitative Measure of Rock Weathering. Rock Mech. Rock Engng, 2006, vol. 39, n° 1, pp.77-85.
- 5- <http://www.zeta-meter.com/5min.pdf>
- 6- Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. Journal of Biochem, 1997, vol.121, pp.317-24.
- 7- J. Lu, B. Flautre, K. Anselme, A. Gallur, M. Descamps, B. Thierry, P Hardouin. Role of the porous interconnections in porous bioceramics on bone recolonization *in vitro* and *in vivo*. Journal of Material Science and Material Medecine, 1999, vol. 10, pp. 111-120.
- 8- J. Saggio-Woyanski, CE Scott. Processing of porous ceramics. American Ceramic Society Bulletin, 1992, vol. 71, n° 11, pp. 1675-1682.
- 9- A. Pardini, C. Mercier, J. C. Hornez, M. Descamps, C. Follet-Houttemane, G. Moreau, A. Leriche. Elaboration d'un verre bioactif macroporeux. Proceedings of Matériaux 2006, Dijon, Novembre 2006.
- 10- S. Deville, E. Saiz et AP. Tomsia. Ice templated porous alumina structures. Acta mater. (2007), vol.55, n°6, pp. 1965-1974.
- 11- Giuliano Tari, Gel casting ceramics: a review.American Ceramic society Bulletin, 2003, vol.82, n°4, pp. 43-46.
- 12- L.J Vendeperre, A.M. de Wilde, J. Luyten. Gelatine gelcasting of ceramic components. Journal of materials processing Technology, 2003, vol. 135, pp. 312-316.
- 13- Hench LL, Anderson O, Bioactive glasses. In: Hench LL, Wilson J. editors. An introduction to bioceramics. Singapore:World scientific;1993, p41
- 14- Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanism at the interface of ceramic prosthetic material. Journal of Biomededical Materials Research Symposium, 1971, vol. 5, pp.117.
15. T. Kokubo et al.. Apatite formation on ceramics, metals and polymers induced by a  $\text{CaO SiO}_2$  based glass in a simulated body fluid. In Bioceramics, W. Bonfield, GW Hastings and KE Tanner, Eds 1991, Butterworth-Heinemann: Oxford

# Partie C

## Elaboration de blocs poreux

## INTRODUCTION

---

Cette partie présente le cœur de cette thèse, c'est à dire l'optimisation des différentes étapes conduisant à l'élaboration de blocs poreux.

Le premier chapitre sera consacré d'une part à l'optimisation du broyage des fragments de poudres obtenus après trempe, et d'autre part, à la caractérisation physico chimique des poudres. Les résultats obtenus montreront que la poudre synthétisée est bien du bioverre 45S5 sous forme amorphe ainsi que certaines caractéristiques telle que la surface spécifique des poudres, la densité absolue, et la morphologie des particules. Ces caractéristiques serviront de base à la discussion des résultats sur le frittage et la dispersion des poudres.

Puis, dans le second chapitre, les transformations structurales du bioverre seront étudiées dans la gamme de température compatible avec le procédé d'élaboration de blocs poreux. Les analyses seront menées *in situ* et sur poudres traitées afin de connaître précisément les transformations structurales du matériau lors de traitements thermiques. La transformation du bioverre en vitrocéramique sera étudiée par l'intermédiaire de cinétiques de cristallisation qui permettront de mettre en place des courbes Température-Temps-Transformations.

Le chapitre 3 étudiera le comportement au frittage des poudres de bioverre 45S5. Cette étude sera réalisée par analyse dilatométrique et microscopie électronique, et permettra de dégager l'influence des transformations identifiées en chapitre 2 sur la densification du matériau. On étudiera notamment, par modélisation analytique, les différents mécanismes de frittage. Des cinétiques isothermes de frittage couplées à des analyses DRX permettront de compléter les courbes TTT mises en place dans le chapitre précédent.

Le chapitre 4 présentera dans un premier temps l'optimisation de la mise en barbotine des poudres de bioverre, étape préliminaire indispensable à l'élaboration de blocs poreux. On étudiera notamment la rhéologie des suspensions dans l'eau et dans l'éthanol. L'utilisation d'un dispersant, dont la quantité sera optimisée, sera nécessaire pour obtenir une barbotine exempte d'agglomérats. L'influence du pH sera examinée par l'intermédiaire de mesures de potentiel zeta. Dans un second temps, on présentera les poreux obtenus lors de l'élaboration par différentes techniques. On dégagera la faisabilité des procédés d'élaboration et notamment leur marge d'application, c'est-à-dire le taux et la structure de pores que l'on peut obtenir pour chaque technique. Le cycle de frittage sera discuté à l'aide des résultats de l'étude précédente et des contraintes techniques relatives à chaque méthode d'élaboration. On déterminera également les caractéristiques de ces blocs et on comparera les techniques en termes de microstructure finale obtenue et possibilité d'adaptation en fonction des sites osseux à remplacer

---

## Chapitre C - 1 : Obtention des poudres et caractérisation

### C-1-I Optimisation du broyage des poudres 71

- 1) Influence de la composition de la jarre et des billes 71
- 2) Influence du taux et du type de billes 72
- 3) Influence temps de broyage 73
- 4) Conclusion 74

### C-1-II Caractérisation physico chimique des poudres 75

- 1) Vérification de la composition et de l'état structural des poudres 75
- 2) Caractérisation physique 77

## **REFERENCES DU CHAPITRE 1 PARTIE C 78**

---

Le bioverre 45S5 est obtenu par fusion d'un mélange de poudres constitutives à 1400°C. Après 4h à cette température, le mélange est homogène et présente une viscosité suffisamment basse pour être trempé rapidement dans l'eau. Des fragments de verre sont ainsi obtenus. Dans une première partie nous optimiserons le broyage de ces fragments, notamment en étudiant l'influence de la composition et de la taille des billes utilisées. Puis, dans une seconde partie, les poudres obtenues seront caractérisées chimiquement et physiquement pour vérifier la composition et l'état structural du matériau et afin de servir de base à la réalisation et l'interprétation des études conduisant à l'élaboration de blocs poreux.

---

### **C-1-I Optimisation du broyage des poudres**

Le broyage des fragments de bioverre a été réalisé dans une jarre cylindrique introduite dans un broyeur planétaire. 40g de fragments de bioverre y sont introduits avec des média de broyage (billes). Après broyage, les poudres obtenues sont tamisées. Cette partie est dédiée à l'optimisation des conditions de broyage. Le but étant d'obtenir des particules de taille proche de 1 µm exemptes de pollution. Plus on s'approchera de cette taille et plus on assurera la stabilité des suspensions de bioverre.

---

#### **1) Influence de la composition de la jarre et des billes**

Le broyage planétaire est une opération très énergétique permettant de casser des particules. Il met en jeu cinq types de chocs : particule-particule, particule-jarre, bille-bille, particules-billes, jarre-bille. A cause de ces chocs, les billes et la jarre utilisées sont susceptibles de subir des détériorations pouvant déboucher sur la présence de particules issues des billes et/ou

de la jarre dans les poudres broyées. Ce transfert peut donc induire une pollution du matériau. Pour remédier à ce problème, le matériel doit donc être de composition proche des particules que l'on veut broyer et/ou posséder une très grande ténacité pour éviter la formation de débris.

Nous avons donc choisi d'utiliser des billes et une jarre en agate. L'agate est une variété de quartz, intégralement composée de silice. Les raisons de notre choix sont d'une part la grande dureté de l'agate par rapport au bioverre 45S5 (car elle contient un taux de silice plus important), et d'autre part qu'une infime pollution à la silice ne pourrait pas altérer les propriétés biologiques et mécaniques du bioverre, contrairement à une pollution par l'alumine ou l'acier, autres média de broyage disponibles. Des billes en zircon ont également été utilisées, et ne provoquent pas non plus de pollution de la poudre grâce à leur ténacité élevée.

### 2) Influence du taux et du type de billes

Pour cette étude, les fragments de bioverre ont été broyés pendant 10h à 250 tours par minutes avec différents rapports masse bille sur masse poudre ( $mb/mp = 1, 2, 3, 4, 5$ ). Des billes en agate de 0,5 cm de diamètre ont été utilisées. Le volume de jarre libre jouant un grand rôle sur l'efficacité du broyage, les rapports utilisés ont été choisis pour ne pas excéder 50% du volume libre de la jarre. La granulométrie laser a été utilisée pour caractériser la taille des particules obtenues. La figure 1 montre les résultats de cette étude.

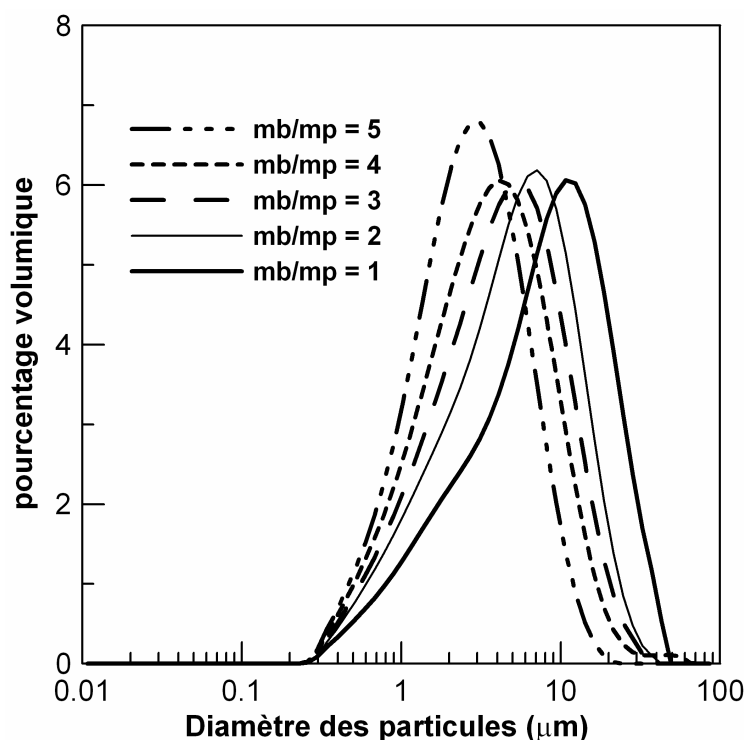


Figure C-1 : influence du taux de bille sur la granulométrie des poudres

Plus le rapport  $mb/mp$  augmente, plus la distribution granulométrique est fine et centrée sur les petites tailles de particules. Pour exemple, le  $D(0,5)$  varie de  $10 \mu\text{m}$  à  $3 \mu\text{m}$  lorsque le rapport passe de 1 à 5.

L'étude de l'influence de la taille et du type de billes a été réalisée par broyage de poudres de bioverre avec des billes en agate et en zircone, de 20, 5 et 1 mm, pendant 5h ( $mb/mp = 3$ ). Le choix des billes en zircone est motivé par le fait qu'il n'existe pas dans le commerce, à notre connaissance, de billes en agate de diamètre inférieur à 0,5 cm et que la zircone est un matériau de haute dureté et biocompatible.

La figure 2 montre l'influence du type de billes sur le broyage. On observe que plus la taille de bille est petite, plus le diamètre des particules diminue. On remarque également qu'après 5h de broyage, des billes en zircone de 0,1 cm ont permis d'obtenir une distribution fine centrée sur  $1,6 \mu m$ . Ceci provient à la fois de la taille de ces billes mais aussi de leur densité ( $6,1$  et  $2 \text{ g/cm}^3$  respectivement pour la zircone et pour les billes en agate) : la petite taille des billes de zircone augmente le nombre de contacts et de chocs, alors que leur densité importante rend le broyage plus énergétique (par rapport à des billes en agate de même taille). Il est cependant important de noter que le rendement de broyage obtenu avec des billes en zircone de 1 mm de diamètre est plus faible qu'avec des billes en agate.

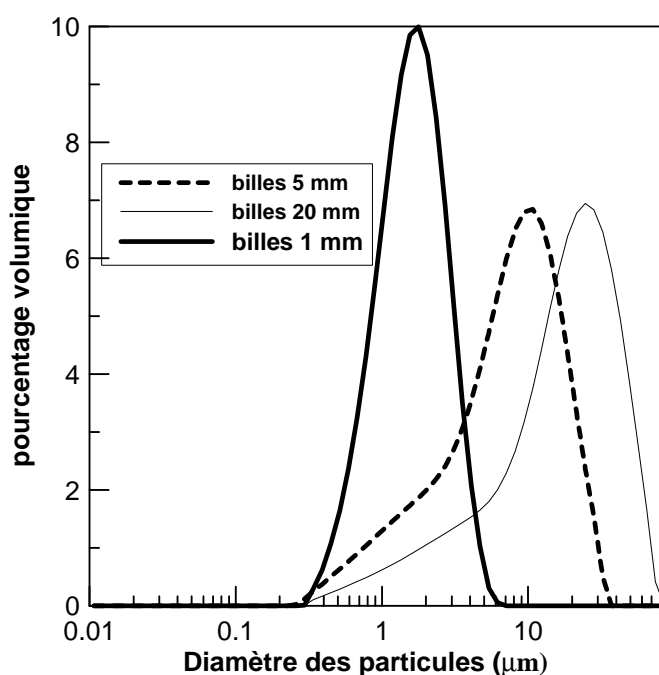


Figure C-2 : mesures granulométrique obtenues sur des poudres broyées avec différentes taille de bille

### 3) Influence temps de broyage

Le temps de broyage a été optimisé afin d'obtenir des particules proche de  $1 \mu m$  de diamètre. Des billes de diamètre 0,5 cm en agate ont été utilisées avec un rapport  $mb/mp = 5$ .

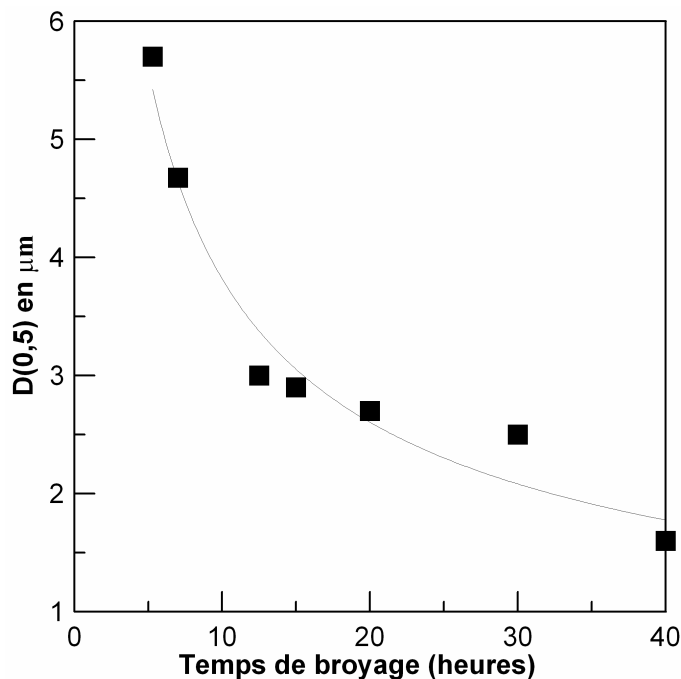


Figure C-3 : Influence du temps de broyage sur la granulométrie des poudres

La figure 3 montre que la taille des particules de bioverre diminue très vite jusqu'à 12h de broyage. Puis, l'efficacité du broyage diminue car les grains de bioverre sont trop petits pour être broyés de façon efficace par des billes de 0,5cm de diamètre. Le temps de broyage pour obtenir des particules d'environ 1,6 µm est de 40 h. On a vu précédemment que 5h de broyage seulement sont nécessaire pour obtenir la granulométrie souhaitée en utilisant des billes de zircone. Pour des raisons de gain de temps considérable, il apparaît nécessaire d'utiliser ce type de billes pour broyer les particules de bioverre. Par contre, on sait que la zircone inhibe ou ralentit la formation de la couche d'HAC à la surface du bioverre et malgré l'absence de pollution par la zircone, il peut paraître préférable d'éviter ce type de billes.

#### 4) Conclusion

L'étude de l'influence des différents paramètres sur le broyage de fragments de bioverre nous a permis de mettre en place un protocole de broyage. Pour obtenir de bonne conditions de broyage et un rendement élevé (peu de résidus), les billes doivent être d'une taille du même ordre de grandeur que les particules que l'on veut broyer. La taille des particules étant évolutive avec le temps de broyage, une taille de bille polymodale est conseillée. Nous avons préféré éviter les pollutions et utiliser des billes en agate. Dans un premier temps, les fragments de bioverre sont broyés 5h avec des billes en agate de 0,5 et 2 cm de diamètre (50%/50%) et un rapport mb/mp = 5. Puis, des billes de 0,5 cm sont utilisées seules pendant 37h, le rapport mb/mp restant constant. On obtient alors des particules de diamètre proche de 1 µm. Après obtention des poudres de bioverre, celles-ci sont caractérisées de manière à s'assurer de leur composition et de leur structure, ces deux paramètres pouvant être influencés par le procédé de broyage.

## C-1-II Caractérisation physico chimique des poudres

La littérature est très détaillée en ce qui concerne la caractérisation du bioverre 45S5 brut, ces données nous ont permis de vérifier la nature des poudres synthétisées. [1-3].

### 1) Vérification de la composition et de l'état structural des poudres

La première étape entreprise pour caractériser le bioverre obtenu est l'analyse de sa composition chimique. Celle-ci s'effectue par spectrométrie d'émission atomique à couplage plasma (ICP-AES) et par analyse EDX. Les échantillons de bioverres analysés contiennent les mêmes éléments et au mêmes taux que le bioverre 45S5 de L.L. Hench (45% SiO<sub>2</sub>, 24.5% Na<sub>2</sub>O, 24.5% CaO et 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en masse).

Le spectre obtenu par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (figure 4) est identique à celui trouvé dans la littérature [1-3].

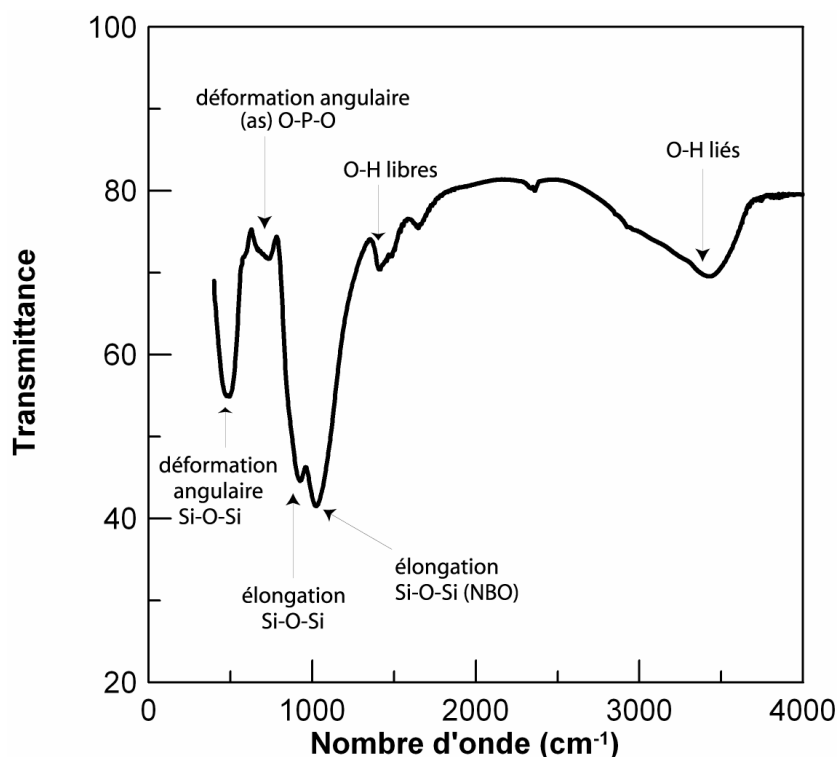


Figure C-4 : Spectre Infra Rouge d'une poudre de bioverre broyée 5h

Une analyse des différentes bandes se trouve en Tableau 1.

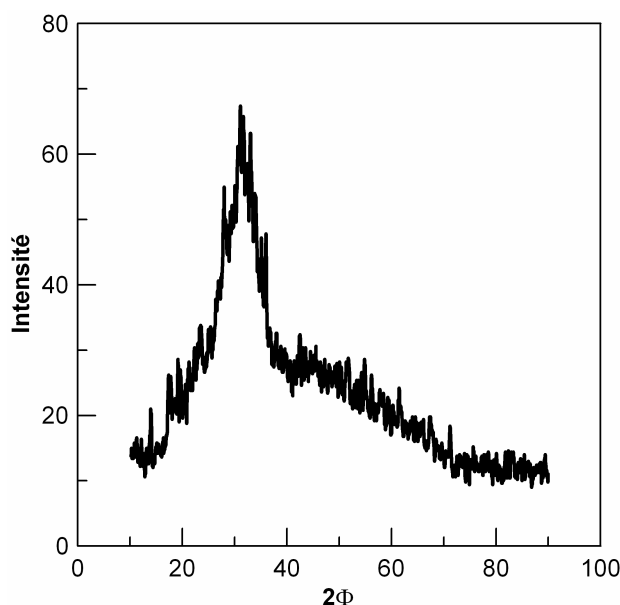


Longueur D'onde (cm <sup>-1</sup> )	Liaisons Concernées
3400 cm <sup>-1</sup>	Elongation des liaisons O-H liés
1600 cm <sup>-1</sup>	Elongation des liaisons O-H non liés
1024 cm <sup>-1</sup>	Elongation asymétrique de la liaison Si-O-Si des oxygènes pontants à l'intérieur des tétraèdres
926 cm <sup>-1</sup>	Elongation de la liaison Si-O-Si des oxygènes non pontant.
732 cm <sup>-1</sup>	Elongation symétrique de la liaison Si-O-Si des oxygènes pontant dans les tétraèdres SiO <sub>4</sub> .
600 cm <sup>-1</sup>	Déformation angulaire asymétrique liaison O-P-O amorphe
480 cm <sup>-1</sup>	Déformation angulaire Si-O-Si entre les tétraèdres SiO <sub>4</sub>

**Tableau C-1 : Bandes Infra Rouge caractéristiques et correspondances pour le bioverre 45S5.**

Les bandes à 1024 et 480 cm<sup>-1</sup> sont caractéristiques de la phase amorphe d'un verre silicaté [4]. On distingue également une bande large à 3400 cm<sup>-1</sup> caractéristique des anions hydroxydes OH<sup>-</sup> liés par liaison hydrogène et une bande petite et fine à 1600 cm<sup>-1</sup> correspondant aux OH<sup>-</sup> non liés. Ce résultat montre que de l'eau est présente dans nos échantillons.

La structure de la poudre de bioverre synthétisée a été déterminée par diffraction de rayons X ; le diffractogramme est représenté sur la figure 5.



**Figure C-5 : Diffractogramme de rayon X du bioverre 45S5 après broyage**

On distingue une bosse caractéristique d'un échantillon amorphe mais aucun pic de cristallinité. Le broyage des fragments de bioverre n'a donc pas entraîné de cristallisation non contrôlée du matériau. Néanmoins, cette bosse n'a pas une forme commune. Le PEG introduit pour obtenir une bonne tenue après pressage des échantillons augmente le caractère amorphe des échantillons.

## 2) Caractérisation physique

La distribution granulométrique des poudres obtenues après l'optimisation des conditions de broyage est présentée en figure 6. Ces poudres, utilisées par la suite dans le cadre de l'élaboration de blocs poreux, ont une taille moyenne de particules de  $1,6 \mu\text{m}$ . La distribution de taille est monomodale.

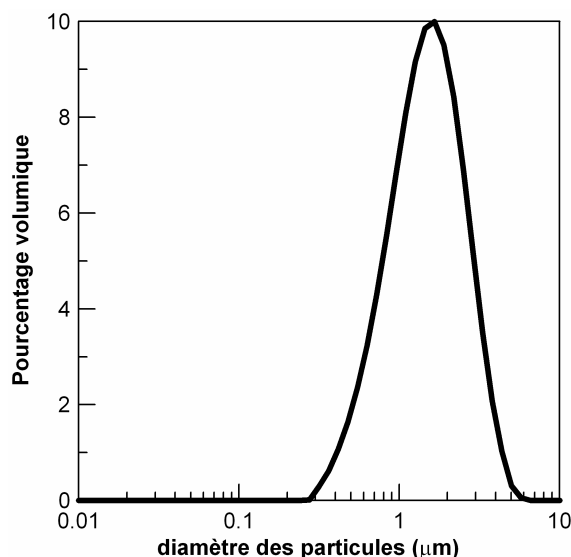


Figure C-6 : Mesure granulométrique de la poudre obtenue après broyage

Le cliché de microscopie (figure 7) montre une morphologie des particules non régulière. La poudre a tendance à former des agglomérats

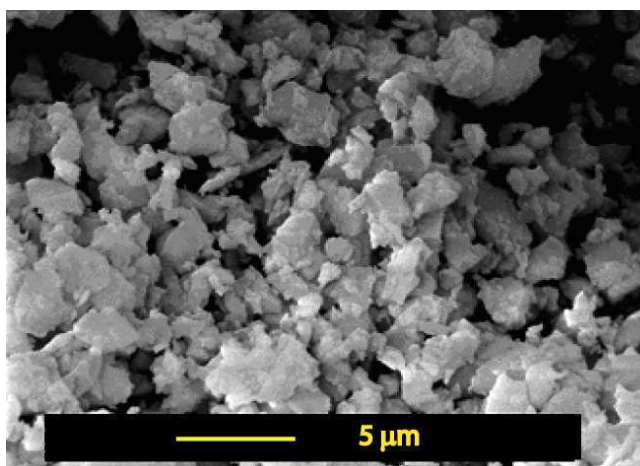


Figure C-7 : cliché de microscopie électronique à balayage d'une poudre brute de bioverre broyée

Les surfaces spécifiques des poudres de  $20 \mu\text{m}$  et  $1,6 \mu\text{m}$  sont respectivement égales à  $0,8$  et  $2,4 \text{ g/m}^2$ . On voit donc que la surface spécifique diminue lorsque la granulométrie des poudres augmente. Enfin, la densité absolue du bioverre est de  $2,7 \text{ g/cm}^3$  dans le cas de la poudre et de

blocs denses ce qui signifie que les grains de poudre ne comporte pas de porosité fermée. Jones et al. [5] trouvèrent sur des particules de 3,4 microns, une surface spécifique de 2,7 m<sup>2</sup>/g par adsorption d'azote et une densité de 2,7g/cm<sup>3</sup>.

Ces caractéristiques seront utilisées ultérieurement notamment dans l'étude du frittage des poudres.

---

## REFERENCES DU CHAPITRE 1 PARTIE C

1. QZ. Chen, K. Rezman, D. Armitage, SN. Nazhat and AR. Boccaccini. The surface functionalization of 45S5 Bioglass ® -based glass-ceramic scaffolds and its impact on bioactivity. *J. Mater. Sci.:Mater. Med.*, 2006, vol. 17, pp. 979-987.
2. X. Chatzistavrou, T. Zorba, E. Kontonazaki, K. Chrissafis, P. Koidis, K.M. Paraskevopoulos. Following bioactive glass behaviour melting temperature by thermal and optical methods. *Phys. Stat. Sol.*, 2004, vol. 201, n° 5, pp. 944-951.
3. QZ. Chen, ID. Thompson, AR. Boccaccini. 45S5 Bioglass ® -derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2006, vol. 27, pp 2414-2425.
4. MR. Filgueiras, G. Latorre, LL. Hench. J. Biomed. Mater. Solution effects on the surface reactions of a bioactive glass. *Res.*, 1993, vol. 27, pp. 445-453
5. JR. Jones, P. Sepulvera, LL Hench. Dose dependent behavior of bioactive glass dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)*, 2001, vol. 58, pp. 720-726.

## Chapitre C - 2: Caractérisation des transformations structurales du bioverre 45S5

C-2-I Etude des transformations *in-situ* 79

- 1) Analyse Thermique 79
- 2) Microscopie en montée de température 81

C-2-II Etude des transformations sur poudres traitées thermiquement 83

C-2-III Cinétiques isothermes de cristallisation 92

C-2-IV Cinétiques non isothermes de cristallisation 95

C-2-V Résumé des transformations 96

---

La majeure partie de la littérature existante sur les transformations du bioverre 45S5 montre que des traitements thermiques au dessus de 600°C induisent la formation de  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  en tant que phase cristalline principale [1-5]. Une seconde phase minoritaire,  $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$ , est souvent suggérée pour correspondre à la stoechiométrie du verre de départ [6]. Pour certains auteurs [7-8], une augmentation de température jusqu'à 800°C et un palier de longue durée à cette température donnent lieu au développement de cristaux de phosphate de calcium de structure similaire à l'hydroxyapatite. Cependant, la composition réelle des cristaux apparaissant lors du traitement thermique du bioverre 45S5 reste incertaine. Par exemple, Lin et al. [9] propose  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  au lieu de  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  en tant que phase cristalline principale. De plus, à notre connaissance, il n'existe aucune étude détaillée sur les paramètres de maille de la phase cristalline principale proposée et leur évolution avec la température. Enfin, la position des ions phosphore dans la structure et son influence sur les procédés de transformation sont encore inconnues.

---

### C-2-I Etude des transformations *in-situ*

---

#### 1) Analyse Thermique

La Figure (8) correspond à la courbe ATD/ATG du bioverre 45S5 effectué à 5°C/min sur des poudres de granulométrie centrée sur 1,6  $\mu\text{m}$ . L'ATG montre 2.8% de perte de masse, pouvant être divisée en deux principaux stades, à 100 et 400°C. Ils sont dûs respectivement au départ d'eau libre et de groupes -OH liés par liaisons hydrogène. La faible perte de masse observée à 610°C est une perturbation du signal dû au début de la cristallisation. La courbe d'ATD montre un léger effet endothermique à  $T_{g1}=550^\circ\text{C}$  dû à la transition vitreuse du matériau, suivi par un pic exothermique de cristallisation commençant à  $T_{c1} = 610^\circ\text{C}$ . Ces deux évènements ont déjà été identifiés dans la littérature [1, 3, 8].

Un second effet endothermique de faible amplitude est observé à  $T_{g_{app}}=850^{\circ}\text{C}$ . Cet effet a été également observé précédemment [3,8], mais non expliqué dans la littérature. Finalement, la fusion du matériau se déroule entre  $1070$  et  $1278^{\circ}\text{C}$ . On observe deux pics endothermiques (maxima respectivement à  $T_{m1}=1192^{\circ}\text{C}$  and  $T_{m2}=1235^{\circ}\text{C}$ ) pouvant être attribués à la fusion de deux phase cristallines différentes.

Chatzistavrou et al. [8] ont montré par spectroscopie Infrarouge qu'à  $1200^{\circ}\text{C}$ , température de fusion du bioverre, une succession de processus de fusion/cristallisation apparaissent engendrant deux nouvelles phases : la pseudo-wollastonite ( $\alpha\text{-CaSiO}_3$ ) prédominante et la wollastonite ( $\beta\text{-CaSiO}_3$ ).

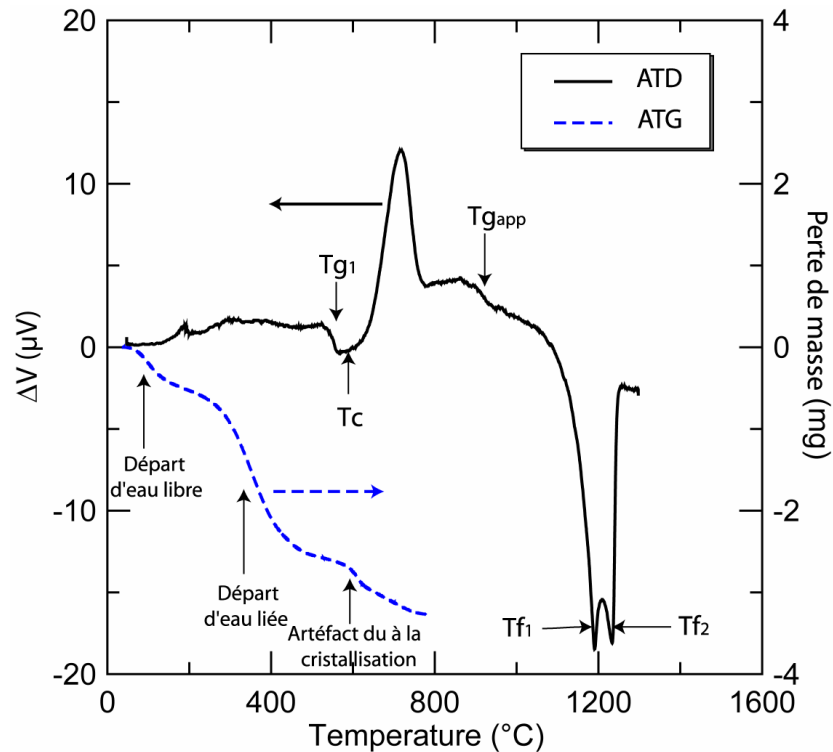


Figure C-8 : Thermogramme de la poudre de bioverre

La figure 9 montre l'influence de la taille des grains de bioverre sur les différentes transformations. Plus les poudres de bioverre sont grossières, plus le pic exothermique de cristallisation est décalé vers les plus hautes températures. Les températures de transition vitreuse sont identiques mais l'intervalle de température entre la transition vitreuse et la cristallisation augmente lorsque les grains sont plus gros.

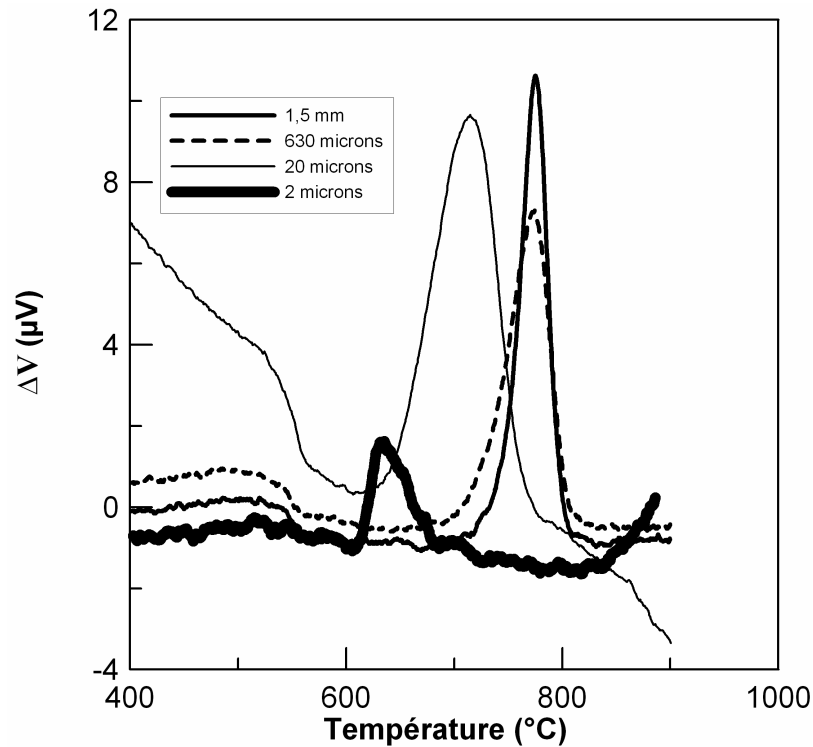


Figure C-9 : influence de la granulométrie des poudres de bioverre sur les transformations par ATD

## 2) Microscopie en montée de température

La Figure (10) montre des clichés d'ESEM pris à faible grandissement sur un grain de bioverre 45S5 lors d'une montée en température *in-situ* de l'ambiante à 950°C. Trois photographies ont été sélectionnées afin de montrer l'évolution de morphologie d'un grain avec la température: à l'ambiante (Figure 10.a), vers  $T_{g1}=550^{\circ}\text{C}$  (Figure 10.b) et  $T_{gapp}=850^{\circ}\text{C}$  (Figure 10.c). Ces clichés montrent deux étapes d'arrondissement du grain à  $T_{g1}$  et  $T_{app}$ . Entre  $T_{g1}$  et  $T_{app}$  ce phénomène semble diminuer d'intensité. Ces deux températures peuvent donc être attribuées à deux transitions vitreuses. Ces observations confirment les résultats obtenus par analyse thermique.

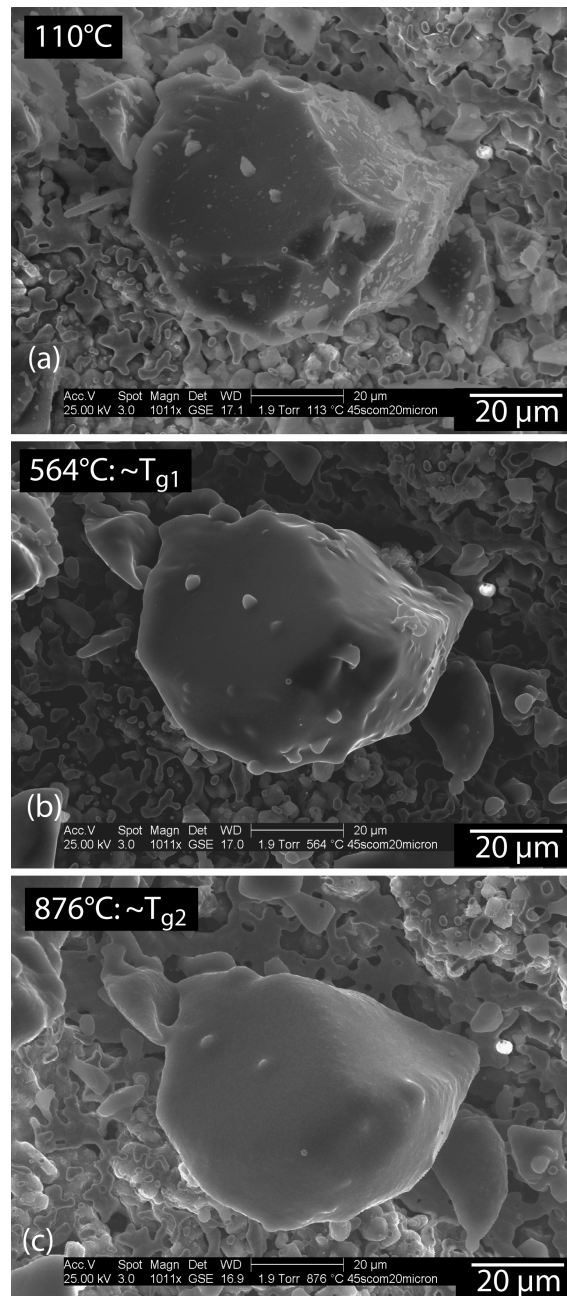


Figure C-10 : Clichés microscopiques à faible grandissement montrant l'évolution d'une particule de bioverre avec la température

La Figure (11) montre des clichés d'ESEM effectués à fort grandissement de la surface du même grain. La Figure (11.a), avant transformation, montre le caractère irrégulier des grains de poudre broyés. La Figure (11.b), prise à  $T = 560^{\circ}\text{C}$ , juste au dessus de  $T_{g1}=550^{\circ}\text{C}$ , montre une modification significative de la morphologie. Le grain devient plus arrondi, confirmant le passage par la transition vitreuse du matériau. Un évènement supplémentaire est observé à  $T_s=570^{\circ}\text{C}$  (Figure 11.c), avant la cristallisation, non détecté sur le thermogramme: la surface, devenue totalement lisse après la transition vitreuse, présente une morphologie spécifique avec l'apparition de domaines. Ceci peut être attribué à la séparation de phases vitreuses qui est attendue lorsque deux ions de valence élevée tels que  $\text{Si}^{4+}$  and  $\text{P}^{5+}$  sont présents simultanément dans un verre [10-11]. Chaque type d'ion tend à se concentrer dans des phases différentes. Cela signifie que le verre n'est plus homogène mais est constitué de deux phases immiscibles. La viscosité d'un verre

silicaté comprenant une séparation de phase est généralement plus élevée que celle d'un verre homogène de même composition, à cause de la grande viscosité de la phase riche en silice qui domine le comportement de l'écoulement [11]. La viscosité faible à partir de  $T_{g1}=550^{\circ}\text{C}$  semble augmenter vers  $T_s=570^{\circ}\text{C}$ , indiquant une diminution de la mobilité dans le matériau.

La formation de domaines riche en phosphate lors de la séparation de phase vitreuse devrait avoir un effet catalytique sur la nucléation de la phase cristalline principale à  $T_{c1}=610^{\circ}\text{C}$  en abaissant l'énergie nécessaire à la germination des nuclei riches en silice environnant (la surface des domaines riche en phosphate jouent le rôle de sites de germination hétérogène).

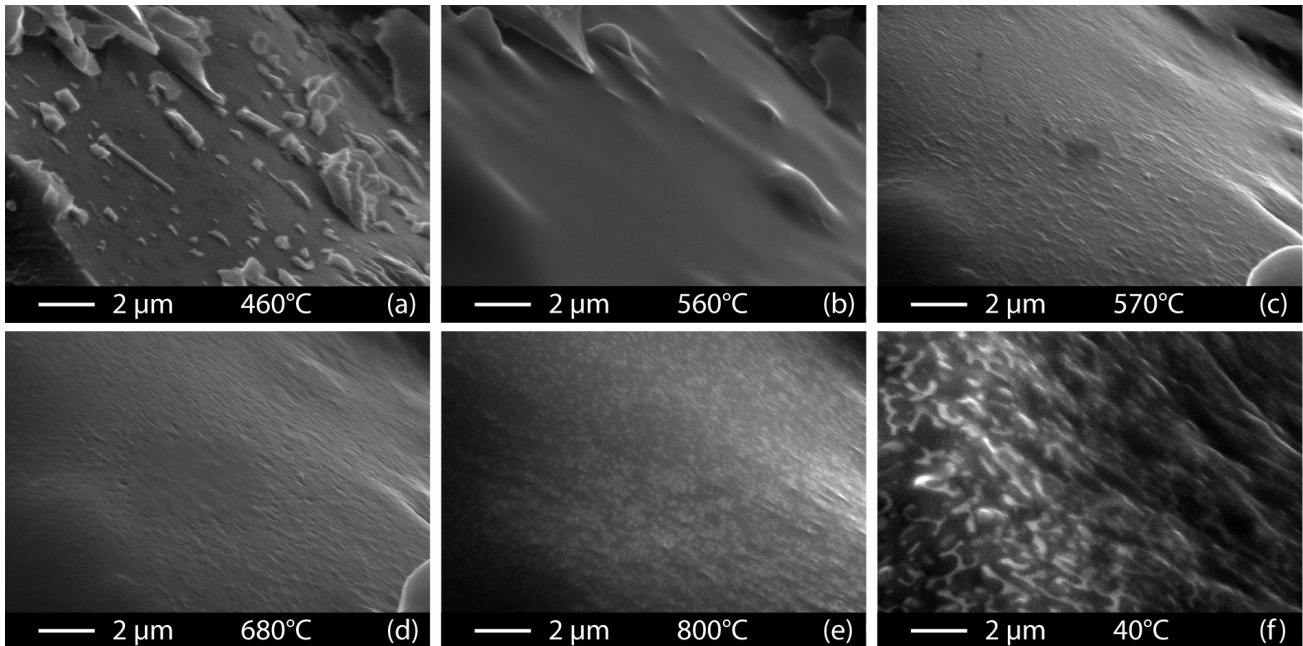


Figure C-11 : Clichés microscopiques montrant l'évolution de la surface d'une particule de bioverre avec la température

La Figure (11.d), prise à  $680^{\circ}\text{C}$  montre le résultat de la cristallisation, avec la formation de cratères à la surface. Ces cratères sont dus à la densification des domaines riches en silice qui accompagne leur cristallisation. A  $800^{\circ}\text{C}$ , la figure 11.e montre la migration d'une seconde phase de structure et de morphologie différente. Ce cliché a été obtenu en mode « charge contrast imaging », qui rend compte des variations de conductivité électrique à la surface de l'échantillon. La dernière figure (11.f) montre la surface résultant d'un traitement thermique à  $950^{\circ}\text{C}$  (le cliché a été obtenu à l'ambiante, après refroidissement, afin d'assurer une stabilité thermique et de meilleurs contraste et résolution). Sur ce cliché, la séparation entre deux types de domaines est alors plus prononcée, avec une morphologie de type spinodale. Quelques gros grains de l'ordre de  $500\text{ nm}$  sont observés. Ils proviendraient d'une croissance hétérogène de grains à température élevée (mûrissement d'Ostwald).

## C-2-II Etude des transformations sur poudres traitées thermiquement

La figure 12 montre les poudres obtenues après des traitements thermiques allant jusqu'à  $1000^{\circ}\text{C}$ . On remarque que les poudres traitées de  $460$  à  $700^{\circ}\text{C}$  présentent une couleur grise alors



que la poudre initiale est blanche. A partir de 800°C, les poudres redeviennent blanches progressivement.



Figure C-12 : poudres traitées thermiquement

La figure 13 montre les clichés MEB obtenus sur ces poudres. On observe des grains quasi sphériques à la surface des particules de bioverre dont la taille augmente avec la température de traitement. A 700°C, les grains ont une taille de 40 à 60 nm, à 800°C de 60 à 150 nm et à 1050°C de 300 à 500 nm.

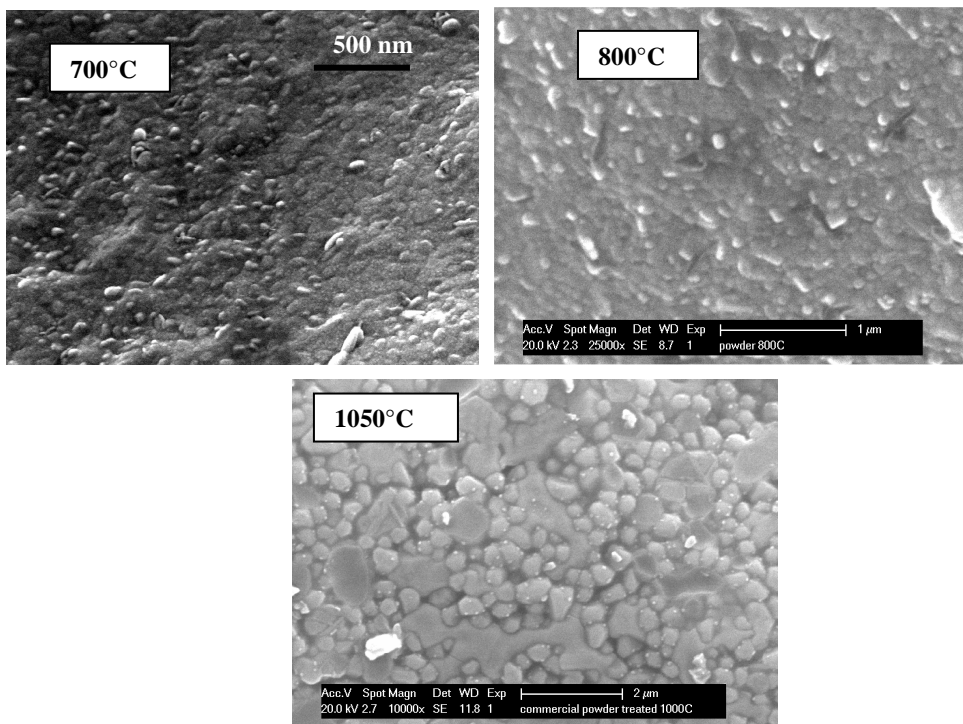


Figure C-13 : microstructure des poudres traitées à 5°C/min à 700, 800 et 1050°C

La figure 14 montre l'évolution de la masse volumique absolue et du taux de cristallisation en fonction de la température. Les deux courbes ont même allure ce qui montre que l'augmentation significative de la masse volumique est directement liée à la cristallisation du bioverre. Les masses volumiques de la phase principale et du bioverre traité à 900°C étant respectivement de 2,796 et 2,78 g.cm<sup>-3</sup>, on en conclut que le bioverre 45S5 après un traitement thermique de 900°C n'est pas entièrement cristallisé. Dans le cas où la composition du verre parent est la même que celle de la phase cristalline, le taux massique de transformation  $\alpha$  peut être exprimé par la relation [12] :

$$\alpha = 100 \frac{\frac{1}{\rho_g} - \frac{1}{\rho_T}}{\frac{1}{\rho_g} - \frac{1}{\rho_C}} \quad \text{Eq C-1}$$

Avec  $\rho_g$  : masse volumique du bioverre 45S5 ( $2,7 \text{ g.cm}^{-3}$ )

$\rho_t$  : masse volumique de la vitrocéramique ( $2,78 \text{ g.cm}^{-3}$ )

$\rho_c$  : masse volumique de la phase  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  ( $2,796$ ) (le choix de la phase  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  sera justifié ultérieurement).

En considérant que la phase cristalline est de même composition que le verre parent, on trouve en utilisant l'équation 1 qu'à  $900^\circ\text{C}$ , lorsque les processus de cristallisation sont terminés, qu'il reste environ 16% de phase vitreuse.

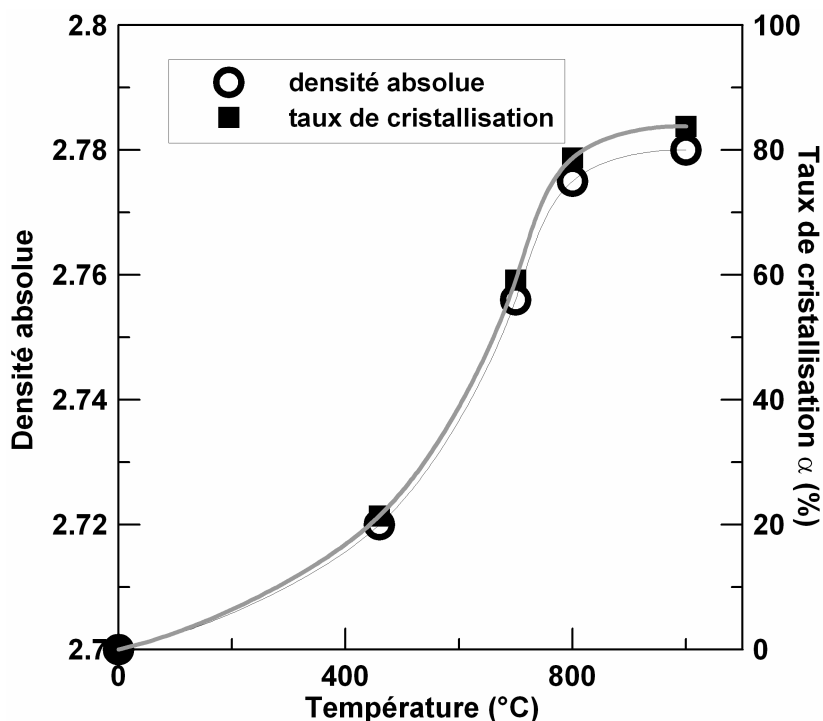


Figure C-14 : densité absolue du bioverre 45S5 et taux de cristallisation en fonction de la température de traitement thermique

Les mesures BET réalisées sur des poudres de granulométrie centrée sur 20 microns et traitées thermiquement à  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  à  $700$  et  $1000^\circ\text{C}$  montrent que la cristallisation du bioverre 45S5 s'accompagne d'une diminution de la surface spécifique des poudres. En effet, en partant d'une surface spécifique égale à  $0,8 \text{ m}^2/\text{g}$  pour la poudre brute, on trouve  $0,6 \text{ m}^2/\text{g}$  à  $700^\circ\text{C}$  et  $0,25 \text{ m}^2/\text{g}$  à  $1000^\circ\text{C}$ .

La Figure (15) montre les diffractogrammes de rayons X obtenus sur la poudre de bioverre avant et après traitement thermique entre  $550^\circ\text{C}$  et  $950^\circ\text{C}$ .

Les résultats obtenus sur la poudre brute confirment le caractère amorphe du bioglass® après trempe et broyage. La cristallisation est observée à  $600^\circ\text{C}$ , ce qui concorde avec les résultats

obtenus par ATD-ATG. La phase cristalline est identifiée comme étant  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  (JCPDS 77-2189) au lieu de  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ , ce qui a été montré précédemment par Lin et al. [9]. La phase  $\text{Na}_2\text{CaSi}_6\text{O}_{16}$  mentionnée dans d'autres études n'est pas observée dans notre matériau.

Un élargissement du pic d'intensité maximale (à  $2\theta = 33.75^\circ$ ) apparaît à  $750^\circ\text{C}$ , qui est en fait le début de la séparation de deux pics, attribués à la phase  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ . Cette séparation devient clairement visible à  $800^\circ\text{C}$  et s'intensifie à plus hautes températures. Parallèlement, dans le domaine  $800^\circ\text{C}$ - $950^\circ\text{C}$ , un nouveau pic de faible intensité est observé (flèche) ; suggérant qu'une phase phosphate cristalline secondaire apparaît. Cette dernière est identifiée en tant que silicorhenanite ( $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ , JCPDS 32-1053).

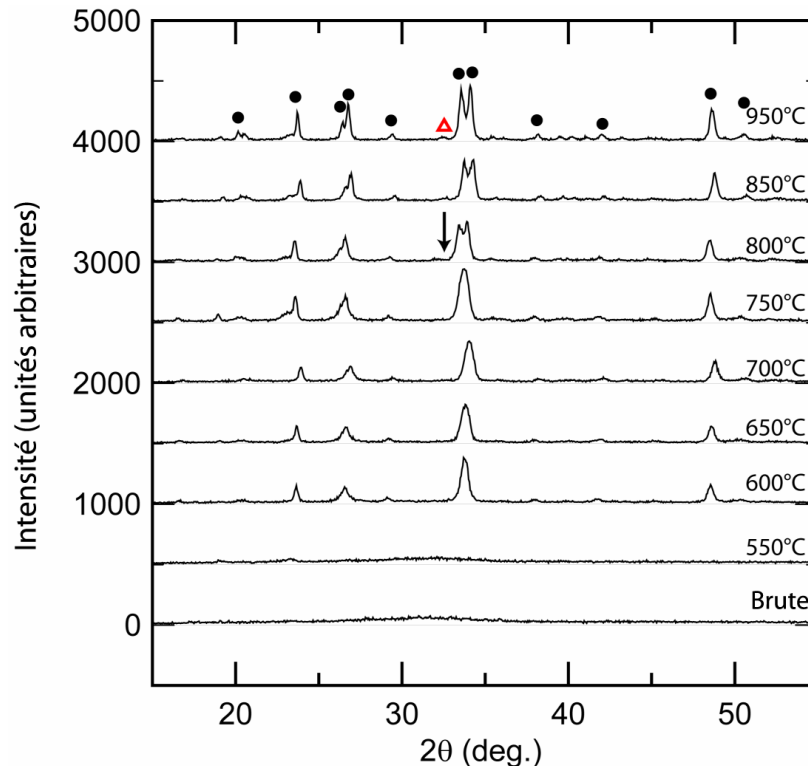


Figure C-15 : Diffractogrammes de rayon X de poudres traitées thermiquement et non traitées

Dans le but de comprendre la séparation des deux pics de maximum d'intensité, une analyse DRX plus précise (à vitesse de scan plus faible et à meilleur résolution angulaire) a été entreprise sur les poudres traitées entre  $750^\circ\text{C}$  et  $950^\circ\text{C}$ . Les diffractogrammes entre  $33^\circ$  et  $34,5^\circ$  ont été approximés par deux fonctions Pseudo-Voigt, et la distance entre les deux pics calculée pour chaque température.

La Figure (16) montre la séparation de ces deux pics ( $\Delta 2\theta$ ) en fonction de la température. Une dépendance linéaire est observée. Ainsi, on peut penser que la séparation des pics est due à une variation de paramètres de maille plutôt qu'à un changement de phase.

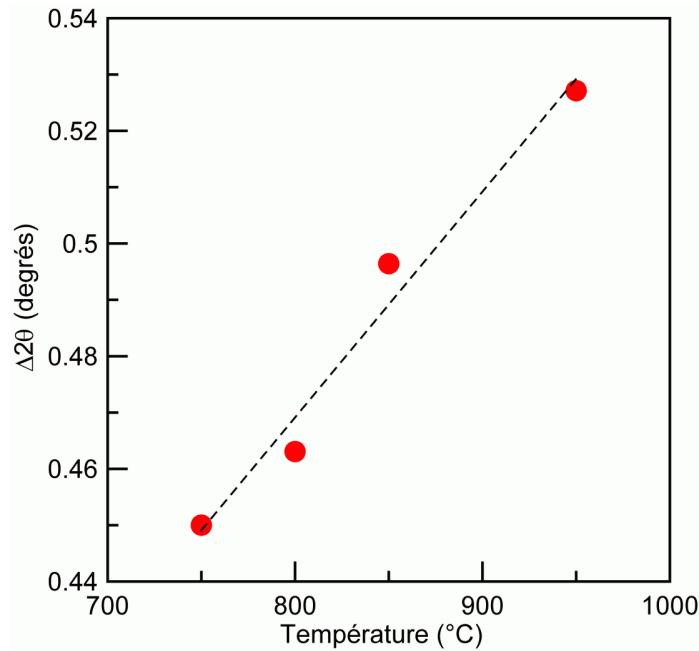


Figure C-16 : Séparation des deux pics de maximum d'intensité en fonction de la température

Un affinement de Rietveld a été appliqué aux différents diffractogrammes afin de mesurer les paramètres de maille ( $a$  et  $c$ ). Leur évolution est présentée sur la figure (17).

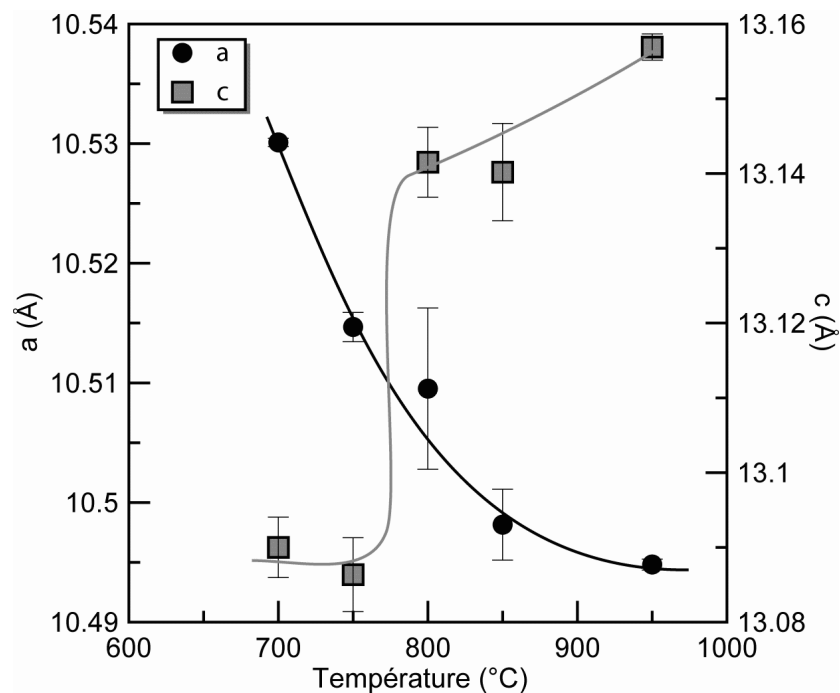


Figure C-17 : Evolution des paramètres de maille  $a$  et  $c$  de  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  en fonction de la température

Cette figure montre que  $a$  diminue progressivement avec la température, alors qu'une augmentation abrupte de  $c$  est observée vers 800°C, lorsque la phase secondaire apparaît. L'augmentation de  $c$  coïncide avec le départ des ions phosphate de la phase principale. Le Tableau (2) résume la taille des cristallites de  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  évaluée par DRX, calculée via l'équation de Scherrer. Elle varie de 15 nm à 41 nm entre 650°C et 950°C.

Température (°C)	650	750	800	850	950
Taille des cristallites (nm)	18	15	36	35	41

Tableau C-2: Evolution de la taille des cristallites de  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  en fonction de la température

Ces valeurs permettent de conclure que les grains observés par microscopie électronique à balayage à la surface d’une particule de bioverre au refroidissement ne sont pas des monocristaux.

$\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  est iso-structurale à la forme haute température de  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  (2 ions Na remplacent 1 Ca) ce qui peut expliquer pourquoi on pensait précédemment que le verre 45S5 cristallisait sous la forme  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  [13]. Deux arguments sont en faveur de  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  au lieu de  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ . Premièrement, la composition du bioglass® est plus proche de  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ . Deuxièmement, L’analyse de Rietveldt montre que les données expérimentales de diffraction se superposent mieux à celles calculées pour  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$

Les spectres de FTIR effectués sur la poudre avant et après traitement thermique à 800°C apparaissent sur la figure (18).

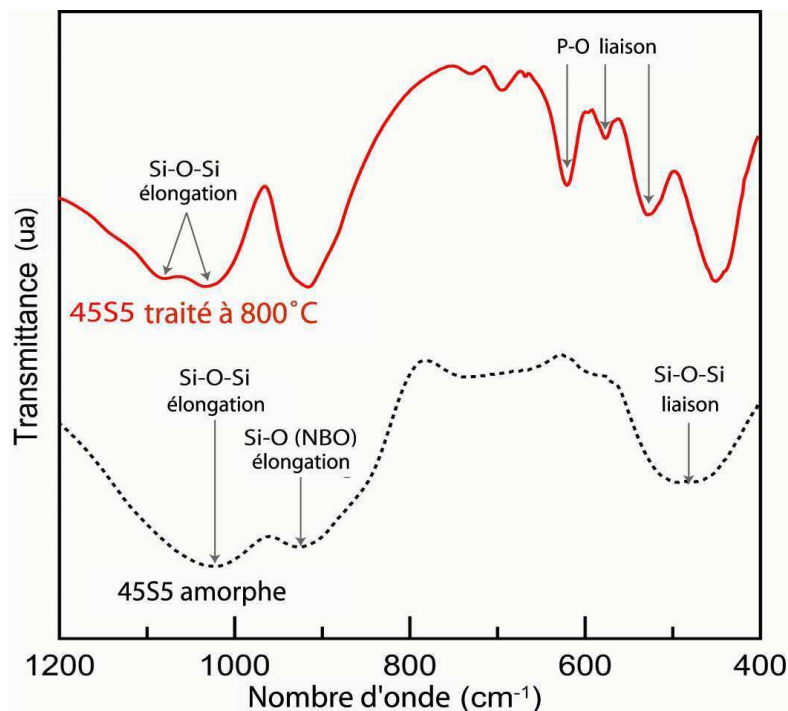


Figure C-18 : Spectre FTIR de poudre brute et traitée à 800°C de bioverre

Les principales bandes d’absorption du bioglass® amorphe sont observées à 1024  $\text{cm}^{-1}$ , 926  $\text{cm}^{-1}$  et 480  $\text{cm}^{-1}$ . Elles sont communément attribuées respectivement aux vibrations d’élargissements des liaisons Si-O-Si et Si-O et aux vibrations en flexion des liaisons Si-O-Si. Ces bandes sont observées généralement pour des verres de silice amorphes [14-15]. La bande à 600

$\text{cm}^{-1}$  est attribuée au phosphate amorphe. Le spectre FTIR de la poudre traitée à  $800^\circ\text{C}$  montre une transformation de la large bande à  $1024\text{ cm}^{-1}$  en deux bandes : lors de la cristallisation des tétraèdres  $\text{SiO}_4$  précédemment isolés se combinent. Parallèlement, la bande à  $926\text{ cm}^{-1}$ , attribuée à la vibration de liaison de Si-O avec des oxygènes non pontant, augmente en intensité. Cette augmentation est due à la cristallisation de la phase principale  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  [7], en accord avec les données de la DRX. La présence d'une phase phosphate cristalline est suggérée par l'apparition des bandes à  $620\text{ cm}^{-1}$ ,  $580\text{ cm}^{-1}$  et  $530\text{ cm}^{-1}$  [8]. Ceci est également en accord avec les résultats de la DRX et l'identification de la phase silicorhénanite.

La phase phosphate identifiée est isostructurale à l'apatite et n'a jamais été identifiée précédemment pour des traitements thermiques court du Bioglass<sup>®</sup> à  $800^\circ\text{C}$ . Lin et al. [9] montre par analyse Raman que dans le verre 45S5, le phosphore se comporte comme dans de la silice pure. Il tend à dépolymériser le réseau de silice par insertion en tant que cation tétravalent. Cependant, McMillan [16] pensait que la double liaison oxygène/Phosphore (P=O) est favorable à la formation d'une phase phosphate dans un réseau de silice augmentant ainsi sa tendance à la cristallisation. Elgayar et al. [17] montre par analyse RMN (résonance magnétique nucléaire) que dans le verre 45S5 amorphe, 75% des ions phosphore sont dans un environnement orthophosphatique ( $\text{PO}_4^{2-}$ ), alors que 25% sont sous la forme diphosphate ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ). Après cristallisation, en utilisant l'intensité relative des pics de diffraction on trouve qu'environ 4% du matériau est constitué de phase phosphate cristallisée. Ceci indique que 75% des ions phosphore présents dans le matériau se trouvent dans la phase phosphate cristalline. Une cohérence apparaît si l'on tient compte du fait que dans la silicorhénanite, le phosphore se présente sous la forme d'orthophosphate. C'est pourquoi nous concluons que dans le verre 45S5 les ions orthophosphates permettent la formation de la phase cristalline alors que les espèces diphosphates restent sous forme amorphe. L'augmentation significative du paramètre de maille  $c$  vers  $800^\circ\text{C}$  est attribuée au départ d'orthophosphate en insertion dans le réseau de silice et à leur remplacement par des groupes  $\text{SiO}_4$ . Les espèces orthophosphate vont alors former la phase phosphate cristalline.

On pense qu'après la germination de la phase cristalline principale, un grossissement de grain hétérogène apparaît conduisant à un mûrissement d'Ostwald où les plus gros cristallites grossissent au dépend des petits. Puis, la phase phosphate amorphe migre autour des plus gros cristallites de  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ . Il est alors possible d'imaginer que la nouvelle interface ainsi formée joue le rôle de catalyseur à la cristallisation de la phase phosphate (la surface des grains de  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  joue le rôle de site de germination de la silicorhénanite).

Höland et al. [18] ont étudié l'influence de la cristallisation de rhénanite dans des verres bioactifs (contenant 6%  $\text{P}_2\text{O}_5$ , 58%  $\text{SiO}_2$ , 22.8%  $\text{Na}_2\text{O}$ , 12.9  $\text{CaO}$  et 0,3% F en masse) sur la cristallisation d'une hydroxyapatite carbonatée à leur surface. Ils ont conclu que cette phase joue le rôle de nuclei hétérogène dans la cristallisation de HCA et ainsi pourrait augmenter la bioactivité du matériau. D'un autre côté, l'état des ions phosphore influence la bioactivité: des vitro-céramiques (obtenus à partir de verres composés de  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$  et  $\text{CaO}$ ) contenant une phase phosphate cristallisée sont beaucoup moins réactifs que les matériaux contenant le phosphore en solution solide [5], et leur aptitude à la dissolution et à la bioactivité diminuent. Les différences de comportement pourraient provenir des compositions de verres étudiés, notamment de la présence de fluor dans l'étude réalisée par Höland et al. et des phases phosphates cristallisées qui sont différentes dans les deux études. Parallèlement, El Ghannam et al. [3] ont montré que dans le bioverre 45S5, la phase vitreuse riche en phosphore engendrée par la séparation de phase vitreuse a une proportion à la dissolution dans du SBF plus importante que le verre parent. De plus, pour des températures inférieures à  $700^\circ\text{C}$ , la concentration en phosphore augmente dans le SBF lorsque le taux de cristallisation augmente. On vérifiera l'influence de la cristallisation de silicorhénanite sur la bioactivité du bioverre 45S5 dans la partie D de ce manuscrit et on comparera notamment les comportements de la silicorhénanite et la rhénanite.

La figure 19 montre des coupes en volume de grains (enrobés, polis et attaqués mécano chimiquement) de poudre (20 $\mu$ m) traités thermiquement à 650°C, 800°C et 1000°C. A 650°C, lorsque la cristallisation est entamée, on observe des domaines probablement créés par la séparation de phase vitreuse. Cette transformation paraît être incomplète puisqu'un amas homogène localisé de phase vitreuse reste présent. On remarque sur certains bords du grain des microstructures aciculaires pouvant correspondre à un début de cristallisation. À 800°C, lorsque la cristallisation de la phase principale est terminée, deux types de microstructures apparaissent : au centre, les domaines vu précédemment, et, à la surface du grain, un anneau de même microstructure que la zone cristallisée à 650°C. A 800°C, la surface des grains de bioverre est donc totalement cristallisée. A 1000°C, le grain a une microstructure correspondant à celle observée après refroidissement en ESEM avec montée de température in situ. On observe des domaines de composition.

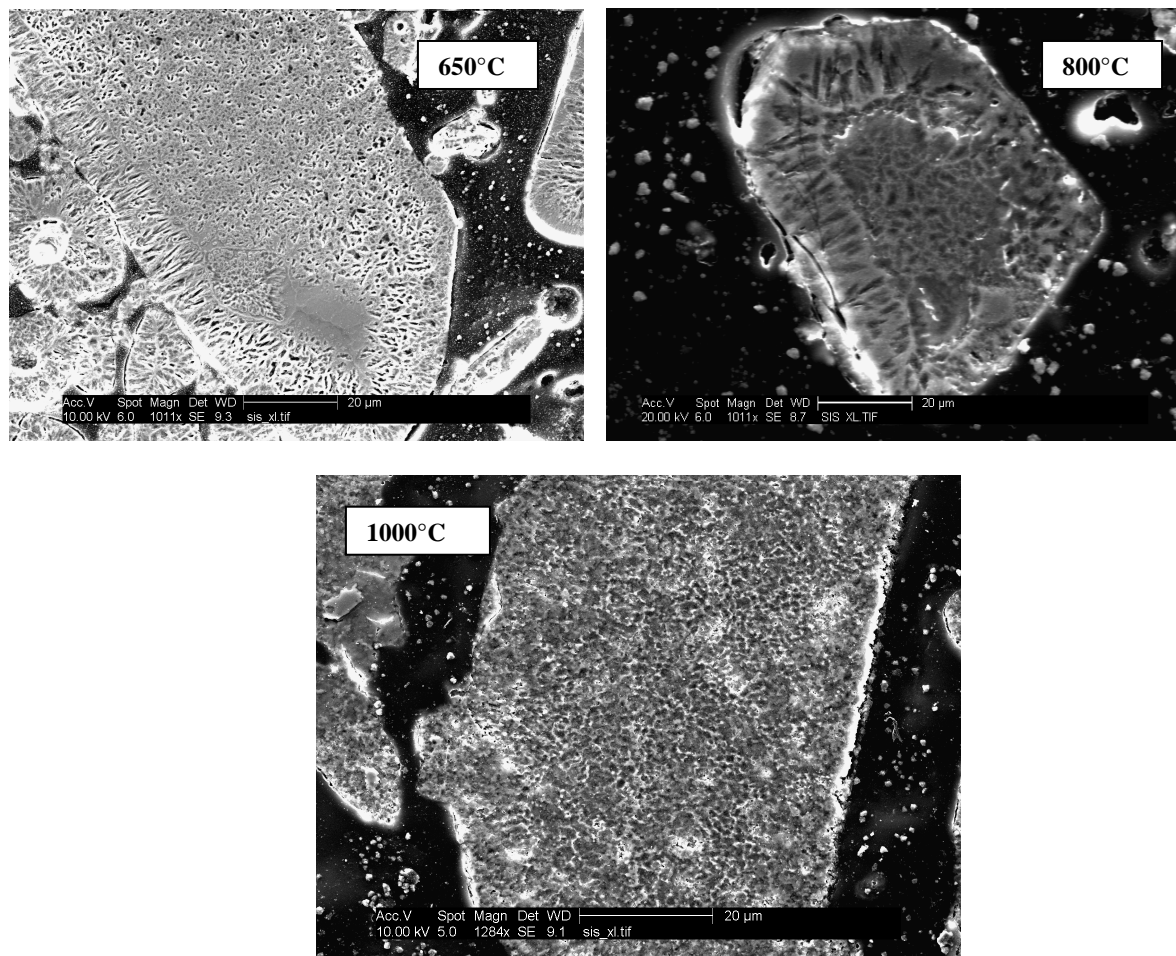


Figure C-19 : grains de bioverre 45S5 traités à 650, 800 et 1000°C enrobés, polis et attaqués mécano chimiquement.

Les figures 20 et 21 montrent les clichés obtenus par microscopie électronique en transmission, en champ clair et les clichés de diffraction associés. Sur les grains traités à 700°C, fin de la cristallisation de la phase principale et 800°C, température de cristallisation de la phase phosphate, on observe que les grains de bioverre ne sont pas totalement cristallins et qu'une importante quantité de phase vitreuse est toujours présente. De plus, les clichés de diffraction montrent qu'à 800°C, la quantité de cristaux est plus importante qu'à 700°C. Ceci vient du fait

qu'à 800°C la cristallisation de la phase principale est terminée alors qu'à 700°C, le bioverre se trouve dans les derniers stades de cristallisation de la phase principale.

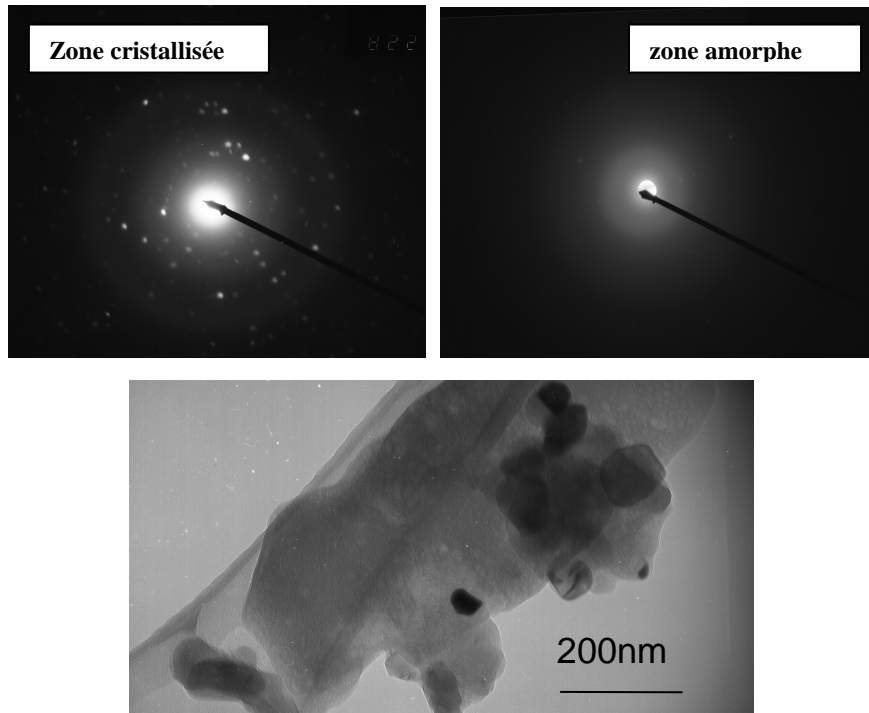


Figure C-20 : clichés obtenus par microscopie électronique en transmission d'une poudre traitée thermiquement à 700°C accompagné des clichés de diffraction correspondants à une zone cristallisée et une zone amorphe.

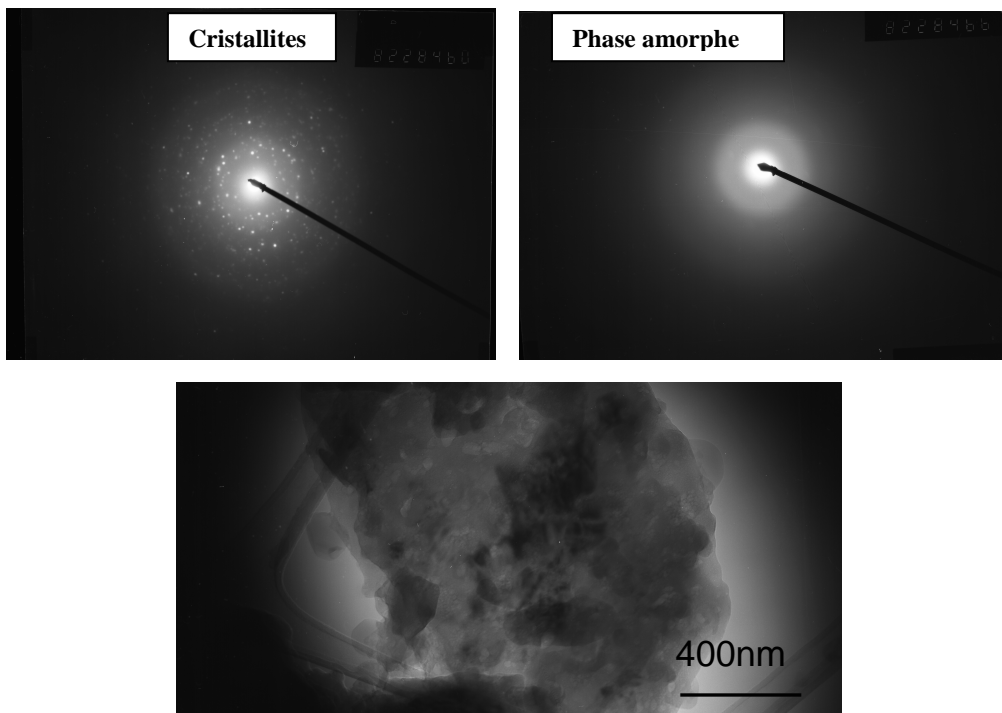


Figure C-21 : clichés obtenus par microscopie électronique en transmission d'une poudre traitée thermiquement à 800°C accompagné des clichés de diffraction correspondants à une zone cristallisée et une zone amorphe.



## C-2-III Cinétiques isothermes de cristallisation

Peu de données existent dans la littérature sur les cinétiques de cristallisation du bioverre 45S5 [6-8]. Notamment, des courbes TTT, indispensables en tant que base à l'élaboration et aux traitements thermiques des blocs poreux, n'ont jamais été établies.

La figure (22) montre les pics exothermiques de cristallisation obtenus par DSC lors des différents plateaux isothermes effectués entre 620 et 680°C. En accord avec ce qui est attendu lorsqu'un seul mécanisme de cristallisation est impliqué dans un certain domaine de température, l'intensité du pic augmente avec la température alors que son aire demeure constante. L'enthalpie de cristallisation est donnée par l'aire des pics, elle est constante ( $84 \pm 10$  J/g), indépendante de la température

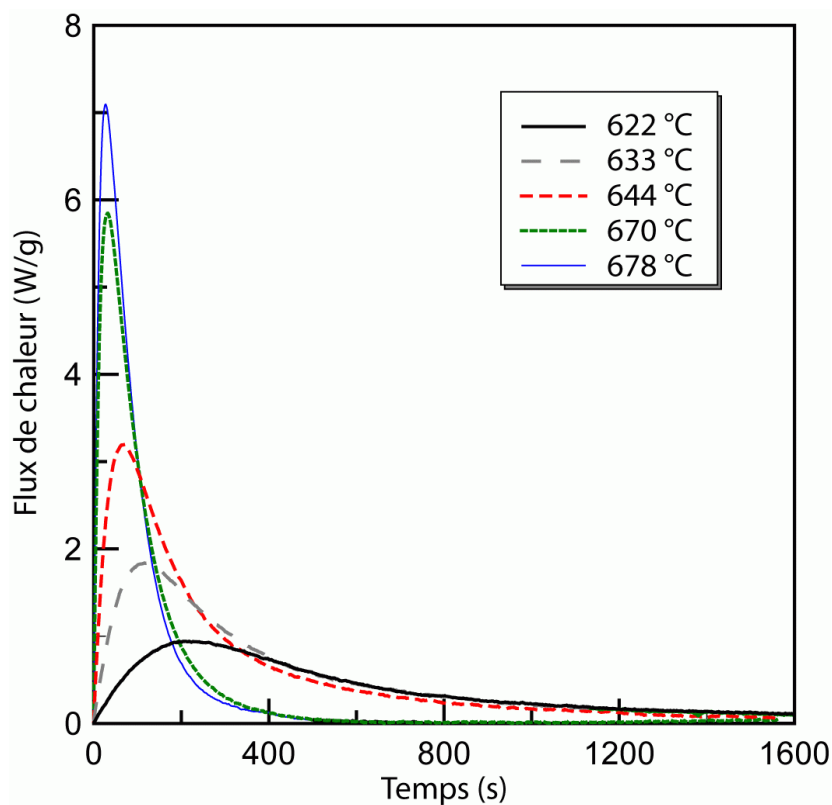


Figure C-22 : Pics exothermiques de cristallisation obtenus sur des isothermes se trouvant dans le domaine de cristallisation

Le tracé de  $\alpha_T(t)$  en fonction du temps obtenu par l'équation 4 de la partie B pour chaque température est donné en figure (23). La connaissance du degré de transformation ( $\alpha_T(t)$ ) calculé à une température et un temps donnés permet le tracé des courbes TTT montrées en figure (24).

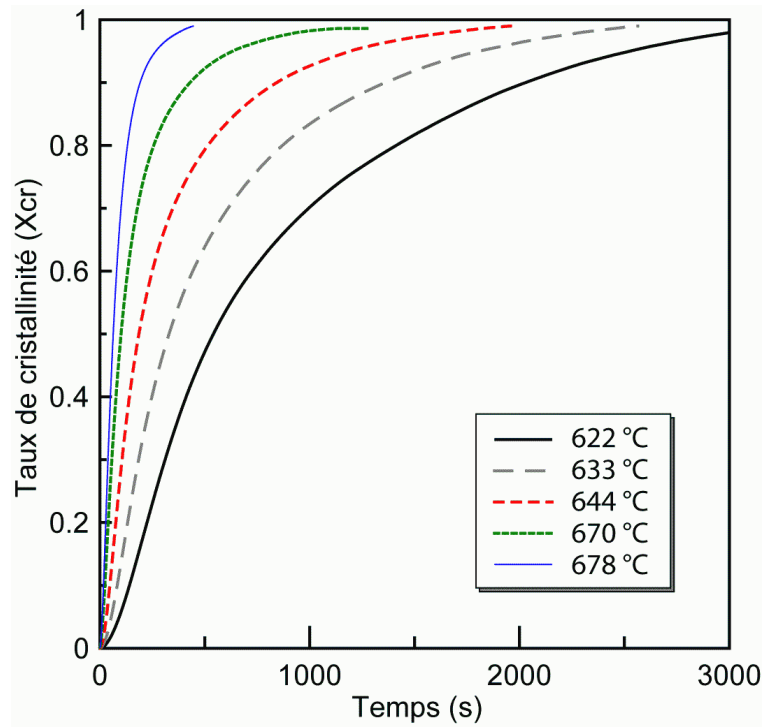


Figure C-23 : Taux de transformation en fonction du temps sur des isothermes comprises dans le domaine de cristallisation du bioverre.

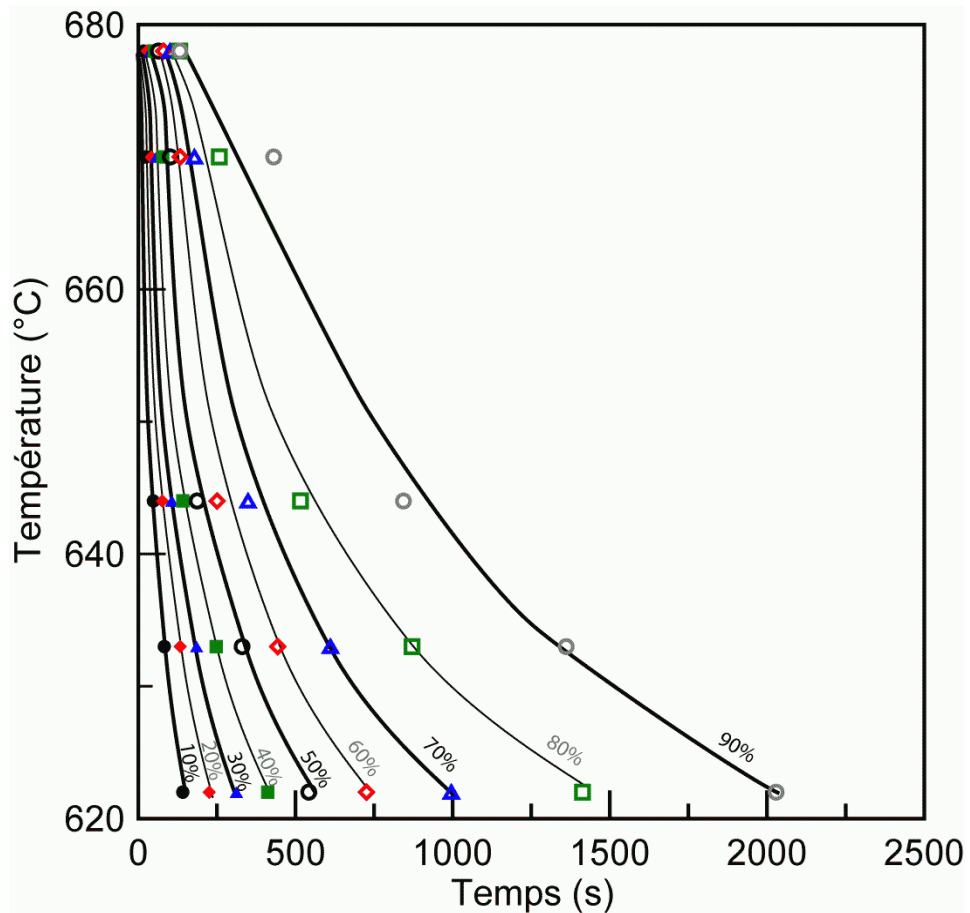


Figure C-24 : Courbe TTT de la cristallisation du bioverre 45S5

Les cinétiques de cristallisation du bio verre ont été précédemment analysées par des méthodes se basant sur l'équation d'Avrami [19]:

$$\alpha_T(t) = 1 - \exp\left(-(bt)^n\right) \quad \text{Eq C-2}$$

Où b est donné par la relation d'Arrhenius:

$$b = b_0 \cdot \exp\left(-\frac{Q_{\text{crist}}}{RT}\right) \quad \text{Eq C-3}$$

Où  $b_0$  est une constante,  $Q_{\text{crist}}$  l'énergie d'activation apparente et R la constante des gaz parfaits. L'exposant d'Avrami est obtenu par le tracé de  $\ln\left(\ln\left(\frac{1}{1-\alpha}\right)\right)$  en fonction de  $\ln(t)$  et l'énergie d'activation apparente par le tracé de  $\ln(b)$  en fonction de  $\frac{1}{T}$ .

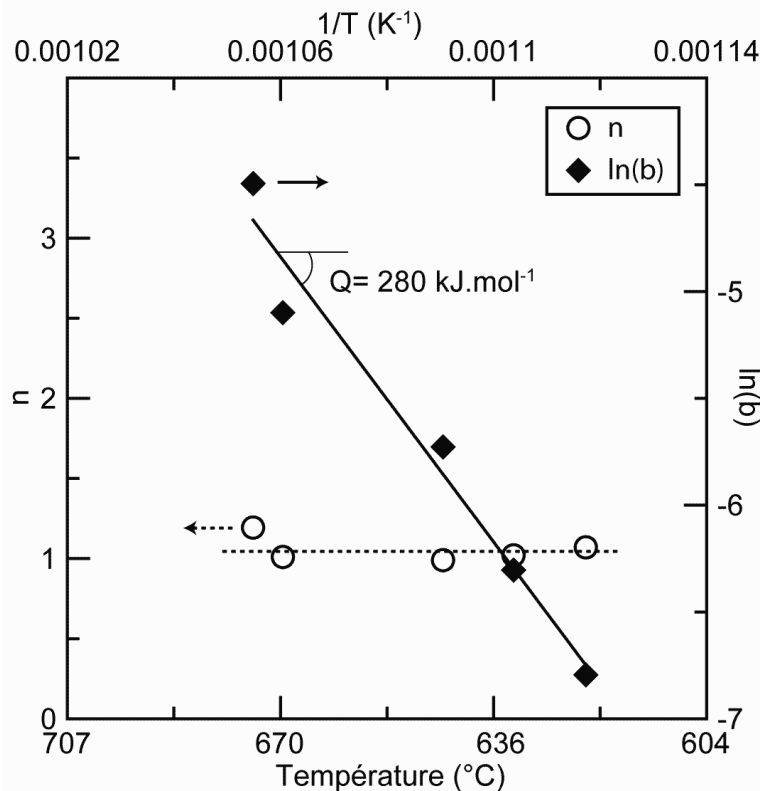


Figure C-25 : valeurs obtenues de n et ln(b) en fonction de la température d'isotherme

La Figure 25 résume les valeurs obtenues pour n et ln(b) pour chaque température. La connaissance de n peut donner une première idée du mécanisme impliqué lors de la cristallisation (cristallisation en surface ou en volume). En accord avec l'étude réalisée par Clupper et Hench [19], conduite sur des cinétiques en non isothermes, la valeur moyenne de n est de 1 et suggère donc que la cristallisation se réalise principalement en surface ce qui est cohérent avec nos observations (figure 19). L'énergie d'activation apparente est de 280 kJ/mol. Les énergies

d'activation nécessaire à la rupture des liaisons Si-O et P-O sont respectivement égales à 443 et 463 kJ/mol. Ces liaisons sont donc trop fortes pour être cassées lors de la cristallisation. Les liaisons Ca-O et Na-O, quant à elles, présentent des énergie d'activation plus basses, respectivement 111 et 84 kJ/mol et seraient donc préférentiellement impliquées.

La cristallisation de surface de la phase principale dans le bioverre est en accord avec les résultats de Koga et al. [20], qui étudièrent le mécanisme de cristallisation de  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  dans le système  $\text{Na}_2\text{O-CaO-2SiO}_2$  et en déduisirent que pour des petites taille de particules (inférieure à  $100\mu\text{m}$ ) la nucléation se fait par un mécanisme de surface.

## C-2-IV Cinétiques non isothermes de cristallisation

La figure 26 montre les thermogrammes de poudres de bioverre effectués par ATD à 5, 10, 15 et  $20^\circ\text{C}/\text{min}$ . Plus la vitesse de chauffe augmente, plus le pic exothermique de cristallisation est intense et large. L'analyse thermique différentielle met en évidence une variation d'enthalpie en mesurant la différence entre la température d'un échantillon et la température d'une référence. La forme et la taille des pics obtenus nous informent sur la nature de l'échantillon et les échanges thermiques produits. Dans notre cas, la nature des poudres étant identique, on en conclut que soit les échanges thermiques soit les formes cristallines synthétisées sont influencées par la vitesse de chauffe. Pour des traitements thermiques à  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  nous avons identifié la phase cristalline principale par DRX en tant que  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ . D'après d'autres études, un traitement à  $2^\circ\text{C}/\text{min}$  permettrait d'obtenir la phase  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  [21]. Ces deux phases étant isostructurales, il se pourrait qu'elles soient toutes les deux présentes dans le bioverre cristallisé mais en proportions différentes en fonction de la vitesse de chauffe. Cela pourrait expliquer les différences de forme et taille des pics observées.

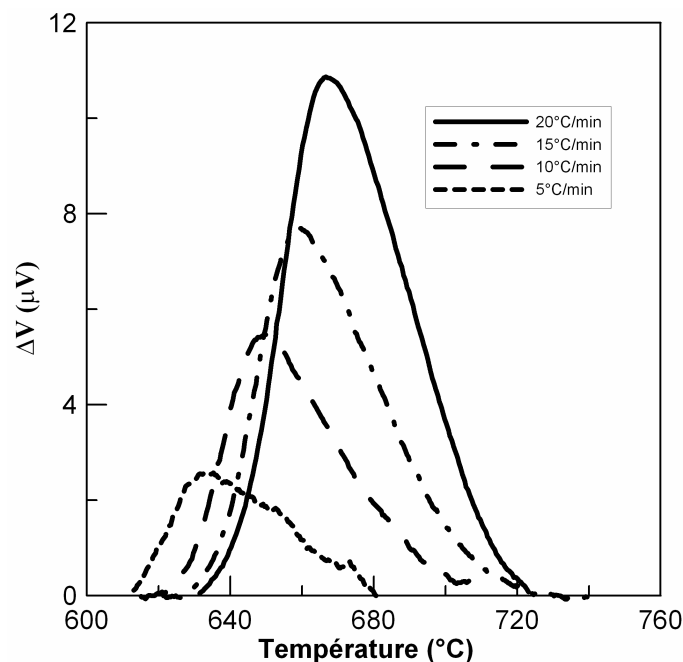


Figure C-26 : pics exothermiques obtenus par ATD à différentes vitesses de chauffe

Le tracé de  $\alpha_T(T)$  en fonction de la température obtenu par l'équation 6 partie B est donnée en figure 27 et permet de déterminer le pourcentage de phase cristalline à une température donnée et pour toutes les vitesses de chauffe compatible avec le procédé d'élaboration de blocs poreux. Plus la vitesse de chauffe augmente, plus le processus de cristallisation est décalé vers les hautes températures.

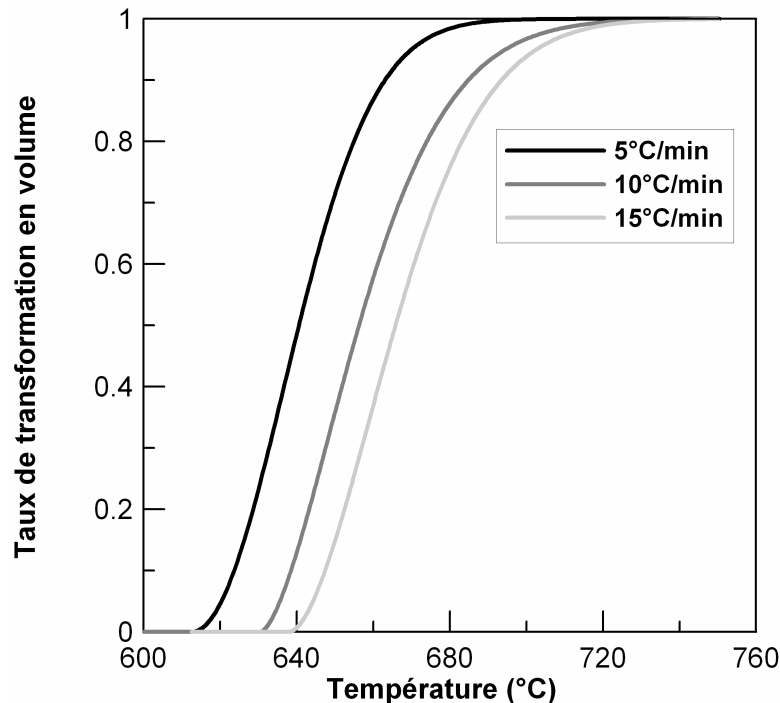


Figure C-27 : taux de transformation en fonction de la température pour différentes vitesses de chauffe

## C-2-V Résumé des transformations

Les observations réalisées sur le bioverre 45S5 par différentes techniques nous permettent de proposer un scénario possible des transformations structurales se déroulant lors d'un traitement thermique de l'ambiante à 950°C (figure 28). La première étape est la transition vitreuse à  $T_{g1}=550^{\circ}\text{C}$  où la viscosité du verre diminue significativement. Cette étape a été bien décrite dans la littérature. Elle est suivie par une démixtion autour de  $T_s=570^{\circ}\text{C}$ , c'est-à-dire que le verre se sépare en deux phases, l'une riche en silice et l'autre en phosphore. Cette transformation a pour effet de durcir la surface des particules. A 610°C, la phase vitreuse riche en silice se transforme partiellement en vitrocéramique avec un mécanisme de cristallisation en surface. La phase cristalline a été identifiée comme  $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$ . A 800°C, et probablement suite à un mûrissement d'Ostwald, la phase vitreuse riche en phosphore remonte en surface et donne lieu à la cristallisation d'une phase silicorhénanite. Puis, à 850°C, une seconde diminution de viscosité est observée, due à une transition vitreuse apparente de la phase amorphe riche en silice restante. Enfin, la fusion se déroule dans l'intervalle 1070-1280°C. Les deux pics endothermiques observés sur le thermogramme sont reliés à la fusion des deux phases cristallines. Enfin, des cinétiques isothermes et non isotherme de cristallisation ont été réalisées. Celles-ci permettront, par l'intermédiaire de courbes TTT et des courbes reliant le taux de transformation à la température

pour différentes vitesses de chauffe, de connaître l'état structural exact du matériau à une température donnée lors du procédé d'élaboration de blocs poreux.

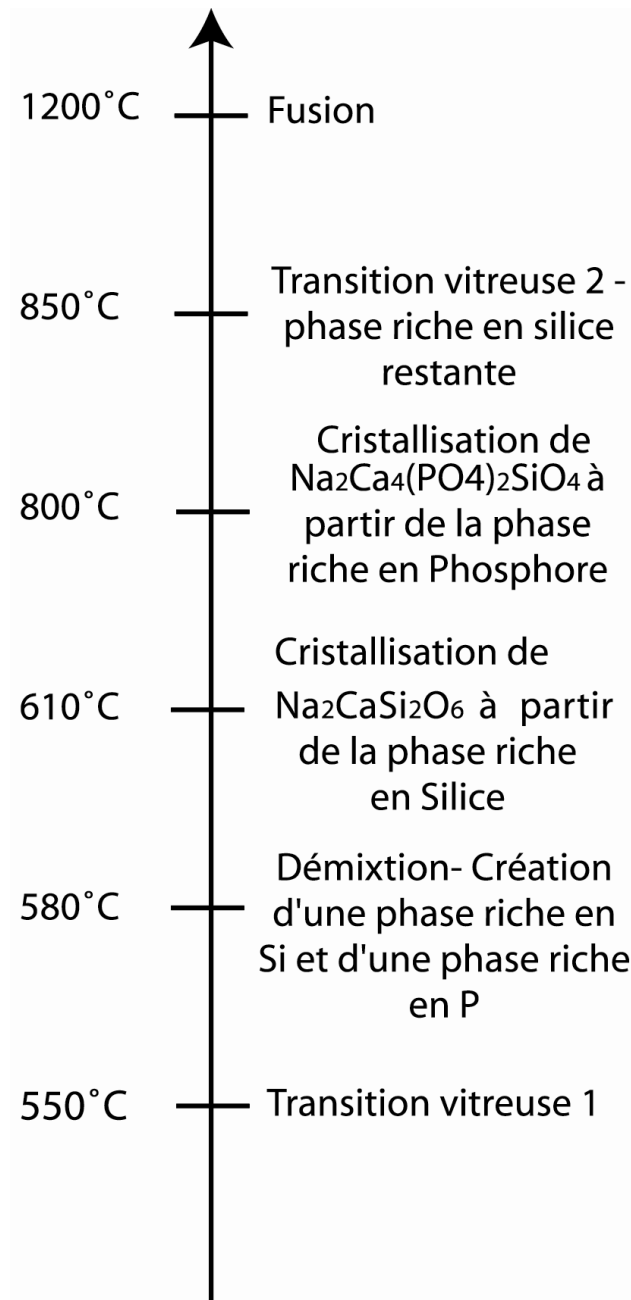


Figure C-28 : Résumé des transformations structurales du bioverre 45S5 traité thermiquement

---

## REFERENCES DU CHAPITRE 2 PARTIE C

1. H.A. El Batal, M.A. Azooz, E.M.A. Khalil, A.Soltan Monem and Y.M. Hamdy. Characterization of some bioglass ceramics. *Materials Chem. and Phy.*, 2003, vol. 80, pp. 599-609.

2. D.C. Clupper and L.L. Hench. Crystallization kinetics of tape cast bioactive glass 45S5. *Biomaterials*, 2003, vol. 318, pp. 43-48
3. A. El Ghannam, E. Hamazawy and A. Yehia. Effect of thermal treatment on bioactive glass microstructure, corrosion behaviour,  $\zeta$  potential, and protein adsorption. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, vol. 55, pp. 387-398.
4. O. Peitl Filho, G.P. La Torre and L.L. Hench. Effect of crystallization on apatite layer formation on bioactive glass 45S5. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1996, vol. 30, pp.509-514.
5. O. Peitl, E.D. Zanotto and L.L. Hench. Highly bioactive  $P_2O_5$ - $Na_2O$ - $CaO$ - $SiO_2$  glass-ceramics. *Biomaterials*, 2001, vol. 292, pp. 115-126.
6. A. S. Rizkalla, D.W. Jones, D.B. Clark and G.C. Hall. Crystallization of experimental bioactive glass compositions. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1996, vol. 32, pp.119-124.
7. L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen and T.V. Greenlee. Bonding mechanism at the interface of ceramic prosthetic material. *Journal of Biomedical Materials Research Symposium*, 1991, vol. 2, pp. 117-141.
8. X. Chatzistavrou, T. Zorba, E. Kontonasaki, K. Chrissafis, P. Koidis and K.M. Paraskevopoulos. Following bioactive glass behaviour beyond melting temperature by thermal and optical methods. *Phys. Stat. Sol.*, 2004, vol. (a) 201, n° 5, pp. 944-951.
9. C.C. Lin, L.C. Huang, and P. Shen.  $Na_2CaSi_2O_6$ - $P_2O_5$  based bioactive glasses. Part 1: Elasticity and structure. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2005, pp. 1-9.
10. R.H Doremus. *Glass science*. New York: wiley, 1994, p48.
11. H. Rawson. *Inorganic glass forming systems*. New York: Academic; 1967, p11.
12. A. Karamanov and M. Pelino. Evaluation of the degree of crystallization in glass-ceramics by density measurements. *Journal of the European Ceramic Society*, 1999, vol. 19, pp. 649-654.
13. H. Ohsato et Y. Takéuchi. Structure of  $Na_4Ca_4[Si_6O_{18}]$ . *Acta Cryst*, 1986, vol. C42, pp. 934-937.
14. M.R. Filgueiras, G. La Torre, and L.L. Hench. Solution effects on the surface reactions of three bioactive glass compositions. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1993, vol. 27, pp. 445-453.
15. E. Kontonasaki, T. Zorba, L. Papadopoulou, X. Chatzistavrou, K. Paraskevopoulos, and P. Koidis. Hydroxy carbonate Apatite formation on particulate bioglass *in vitro* as a function of time. *Cryst. Res. Technol.*, 2002, vol. 37, pp. 1165-1171.
16. P.W. McMillan, in: J.P. Roberts, P. Popper (Eds.), *Glass ceramics*, 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press, New york, 1979, p76.

17. k J. Elgayar, A.E Aliev, A.R. Boccaccini, R.G. Hill. Structural analysis of bioactive glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2005, vol. 351, pp. 173-183.
  18. M. Holand, A. Dommann, W. Holand, E. Apel, and V. Rheinberger. Microstructure formation and surface properties of a rhenanite type glass-ceramic containing 6.0 wt% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. *Glass Science and Technology*, 2005, vol.78, n° 4, pp. 153-158.
  19. D.C. Clupper, L.L. Hench. Crystallization kinetics of tape cast bioactive glass 45S5. *Journal of non Crystalline Solids*, 2003, vol. 318, pp. 43-48.
  20. N. Koga, J. Sestak and Z. Strnad. Kinetics of crystallization in the soda lime silica system. Part 1: Na<sub>2</sub>O-CaO-2SiO<sub>2</sub> and Na<sub>2</sub>O-CaO-3SiO<sub>2</sub> glasses by TDA. *Thermochim. Acta*, 1992, vol. 203, pp. 361-372.
  21. QZ Chen, AR. Boccaccini. Coupling mechanical-competence and bioresorbability in Bioglass®- derived tissue engineering scaffolds, *Adv. Eng. Mater.*, 2006, vol. 8, pp 285-289.
-



## Chapitre C-3 : Etude du frittage

C-3-I Introduction 100

C-3-II Comportement général 101

C-3-III Modélisation 105

- 1) Modélisation du premier stade de retrait 105
- 2) Modélisation du second stade de retrait 109

C-3-IV Cinétiques de frittage 111

- 1) Influence de la vitesse de chauffe 111
- 2) Cinétiques isothermes de retrait 116
  - a) Cinétiques Isothermes du premier stade 117
  - b) Cinétiques Isothermes du second stade 120

C-3-V Propriétés mécanique en fonction du taux de densification 121

### Résumé de l'influence des transformations structurales de poudres de bioverre sur leur frittabilité. 122

---

#### C-3-I Introduction

Le procédé d'élaboration de blocs poreux met en jeu des températures allant de 20°C à 950°C. La première étape d'optimisation du procédé est l'étude des transformations structurales du bioverre au cours des traitements thermiques qui lui sont appliqués. C'est l'objet du chapitre précédent où nous avons identifié précisément toutes ces transformations et où nous avons montré la possibilité d'un contrôle de la cristallisation de la phase principale ( $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ ) via des courbes température-temps-transformation (TTT) et des cinétiques non isothermes. La seconde étape de l'élaboration de blocs poreux, objet du présent chapitre, est une connaissance approfondie du comportement des poudres de bioverre lors du frittage, c'est-à-dire la densification de compacts de poudre, et l'influence des transformations structurales identifiées précédemment.

Aucune donnée n'existe dans la littérature sur le frittage du bioverre 45S5. Nous avons donc dû faire appel à des études sur d'autres types de verre qui montrent que le frittage de ce type de matériau se fait par flux visqueux rendu possible quand le verre est porté à une température supérieure à sa température de transition vitreuse [1].

Cette étude montrera entre autre le comportement général au frittage de compacts de poudre lors de montée en température. On comparera par la suite ces résultats aux modèles existant dans la littérature. Ceci nous permettra de mieux comprendre les mécanismes de frittage du bioverre. Cette compréhension une fois acquise, nous discuterons de l'influence de différents paramètres sur le frittage : des cinétiques isothermes et non isothermes de retrait seront étudiées ainsi que l'influence de la taille des grains de poudres. Les techniques employées pour étudier ces cinétiques seront la dilatométrie et la microscopie électronique à balayage en montée de température. Cette dernière technique nous permettra notamment d'observer l'évolution du cou se

formant entre deux particules lors du frittage. Les résultats obtenus seront intimement liés aux transformations structurales identifiées dans le chapitre précédent. On montrera notamment, l'effet des mécanismes de cristallisation et de séparation de phase sur le frittage de verre. Enfin, on identifiera les mécanismes de frittage du bioverre dans la gamme de température compatible avec le procédé d'élaboration de blocs poreux.

### C-3-II Comportement général

Trois étapes principales de densification peuvent être observées lors du traitement thermique (figure 29). La première, entre 550°C et 620°C suit la transition vitreuse identifiée dans le chapitre précédent. La dérivée de la courbe dilatométrique montre que, dans cet intervalle de température, à 595°C, la vitesse de frittage diminue bien qu'il y ait toujours des pores dans l'échantillon. Dans le chapitre précédent nous avons montré qu'autour de cette température (vers 580°C), a lieu la formation de domaines de composition qui pourrait donner lieu à un durcissement de la surface par la formation de domaines riche en silice qui domineraient le flux visqueux en baissant la viscosité. Ceci expliquerait la diminution de vitesse observée à 595°C. Cette transformation doit apparemment être dans un stade avancé pour induire la diminution de la vitesse de retrait. Lors de la seconde étape, entre 620°C et 675°C, une densification mineure apparaît. Ce domaine de température correspond à celui de la cristallisation de la phase principale ( $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ ) identifiée dans le chapitre précédent. Puis, le frittage s'arrête complètement jusqu'à 850°C. Enfin, à cette température, une troisième étape de densification commence, probablement suite à la seconde transition vitreuse observée précédemment. Le frittage du bioverre 45S5 à 1000°C et à 5°C/min permet d'obtenir une densité relative finale de 85%. Il semblerait que les compacts de poudre de bioverre 45S5 doivent aller jusqu'à la fusion pour pouvoir densifier à 100%.

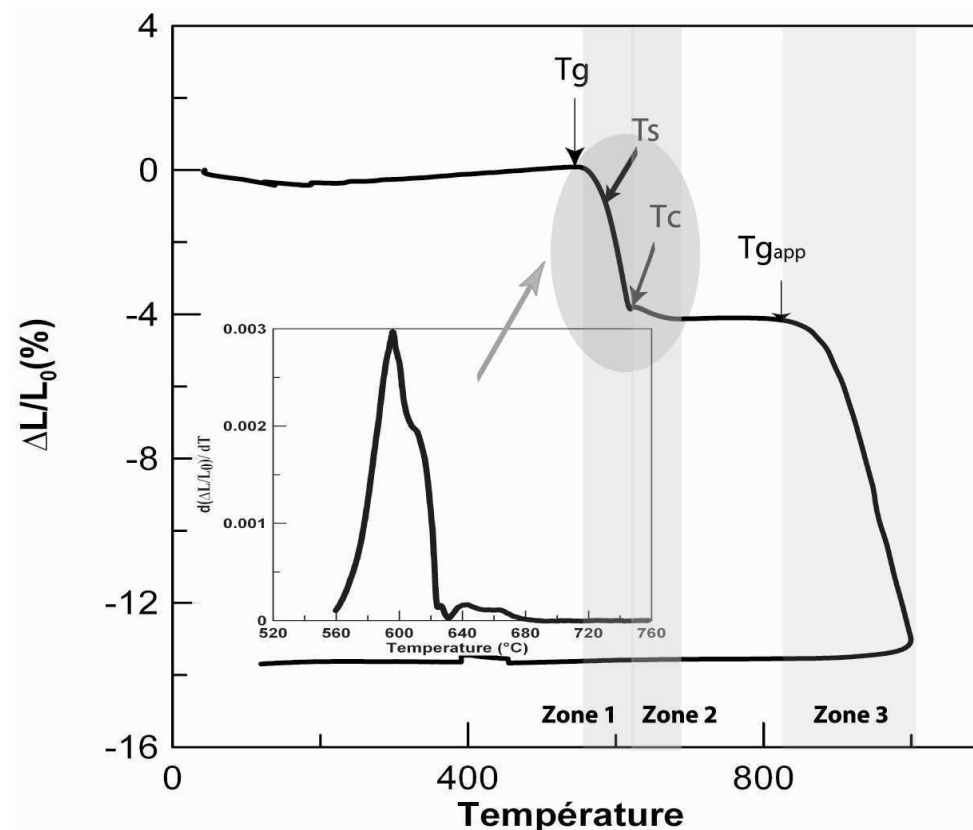


Figure C-29 : courbe dilatométrique du bioverre 45S5 accompagnée de sa dérivée et réalisée à 1°C/min

## Elaboration de blocs poreux – Etude du frittage

Le degré d'anisotropie de la densification peut être quantifié par un facteur d'anisotropie de frittage ( $K$ ), défini par [2]

$$K = \frac{\Delta L / L_0}{\Delta D / D_0} \quad \text{Eq C-4}$$

Où,  $\Delta L / L_0$  est le retrait relatif linéaire et  $\Delta D / D_0$  le retrait relatif radial.

Nous avons mis en évidence une faible anisotropie ( $K=1,12$  en moyenne) qui peut être due à la charge appliquée sur l'échantillon lors des mesures dilatométrique [3] ainsi qu'au pressage uniaxial utilisé pour obtenir les échantillons. Cette anisotropie explique pourquoi avec une densité à cru de 60% et un retrait total de 13%, on obtient une densité finale de 85% au lieu de 98% dans le cas d'un retrait isotrope.

La figure 30 montre des clichés MEB obtenus sur la surface et sur des faciès de rupture de compacts de poudre traités à 600 et 1000°C. On observe que la porosité, très présente dans les compacts de poudre brute, diminue progressivement avec la température de traitement. Ce résultat concorde avec les mesures de densités effectuées sur ces échantillons avant observation. En partant d'une densité de 60% de la densité théorique obtenue par pycnométrie hélium, à 5°C/min on arrive à 72% à 600°C et 85 % à 1000°C. A 600°C, à la fin du premier stade, les grains commencent à fusionner mais de multiples pores intergranulaires sont toujours présents. La cohésion du système n'est pas suffisante. Par contre, à 1000°C, les grains ont fusionné et seuls quelques pores isolés sont observés. On confirme donc bien l'importance relative des deux stades de densification les plus importants, suivant les deux transitions vitreuses, sur le procédé de frittage de compacts de poudre de bioverre.

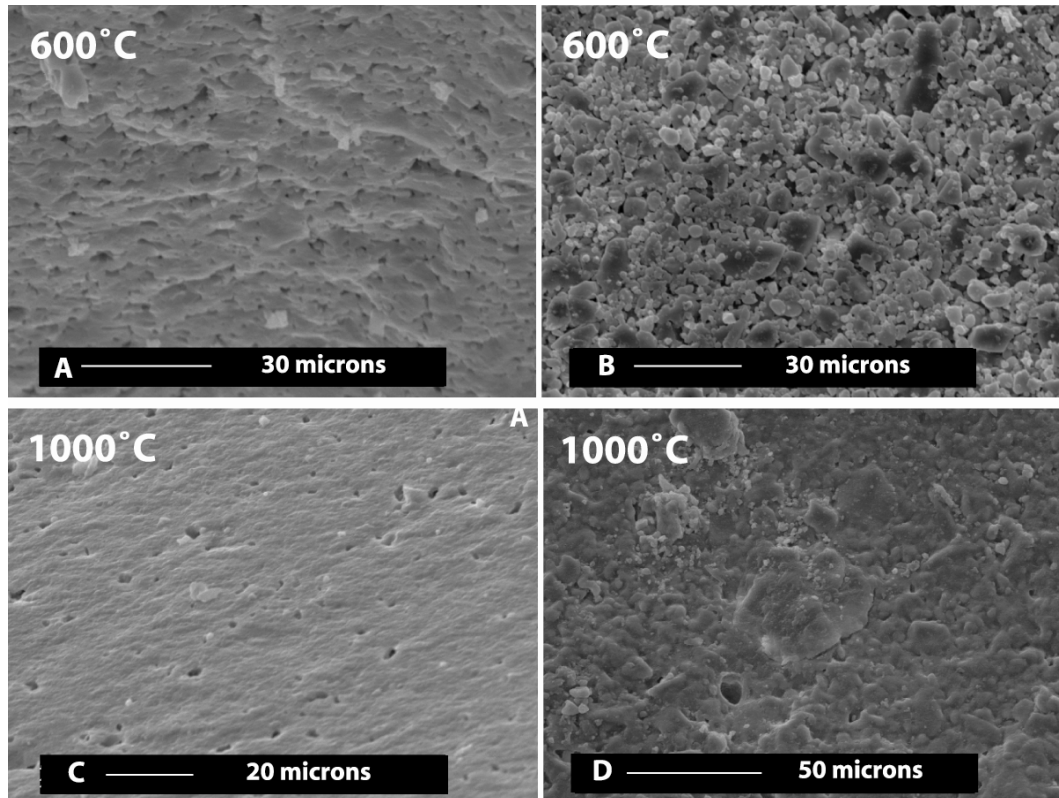


Figure C-30 : surface (A et C) et faciès de rupture (B et D) de compacts de poudres traités thermiquement à 600 et 1000°C

Afin de confirmer le rôle des deux transitions vitreuses sur les deux densifications prépondérantes, le comportement de deux particules en température et d'un amas de poudre tassé et fritté ont été observés par microscopie.

La figure 31, qui montre l'évolution du diamètre du cou formé entre deux particules lors d'un traitement thermique effectué à 5°C/min, confirme les trois étapes observées précédemment, leurs domaines de températures correspondent à ceux observés par dilatométrie. A 550°C, un flux visqueux se crée entre les deux particules engendrant la formation d'un cou. Le diamètre de ce cou augmente jusqu'à 650°C. A cette température et jusqu'à 850°C, aucune variation n'est observée. Puis, un second flux visqueux est créé qui permet d'augmenter ce cou. A 950°C, les deux particules ont fusionné pour n'en former qu'une.

De plus, contrairement à la courbe obtenue par dilatométrie, cette courbe montre que le premier stade de formation du cou paraît être plus important que le second. Ceci peut être dû à la régulation de température de la platine chauffante et au fait que le comportement de deux particules n'est pas représentatif d'un compact pressé.

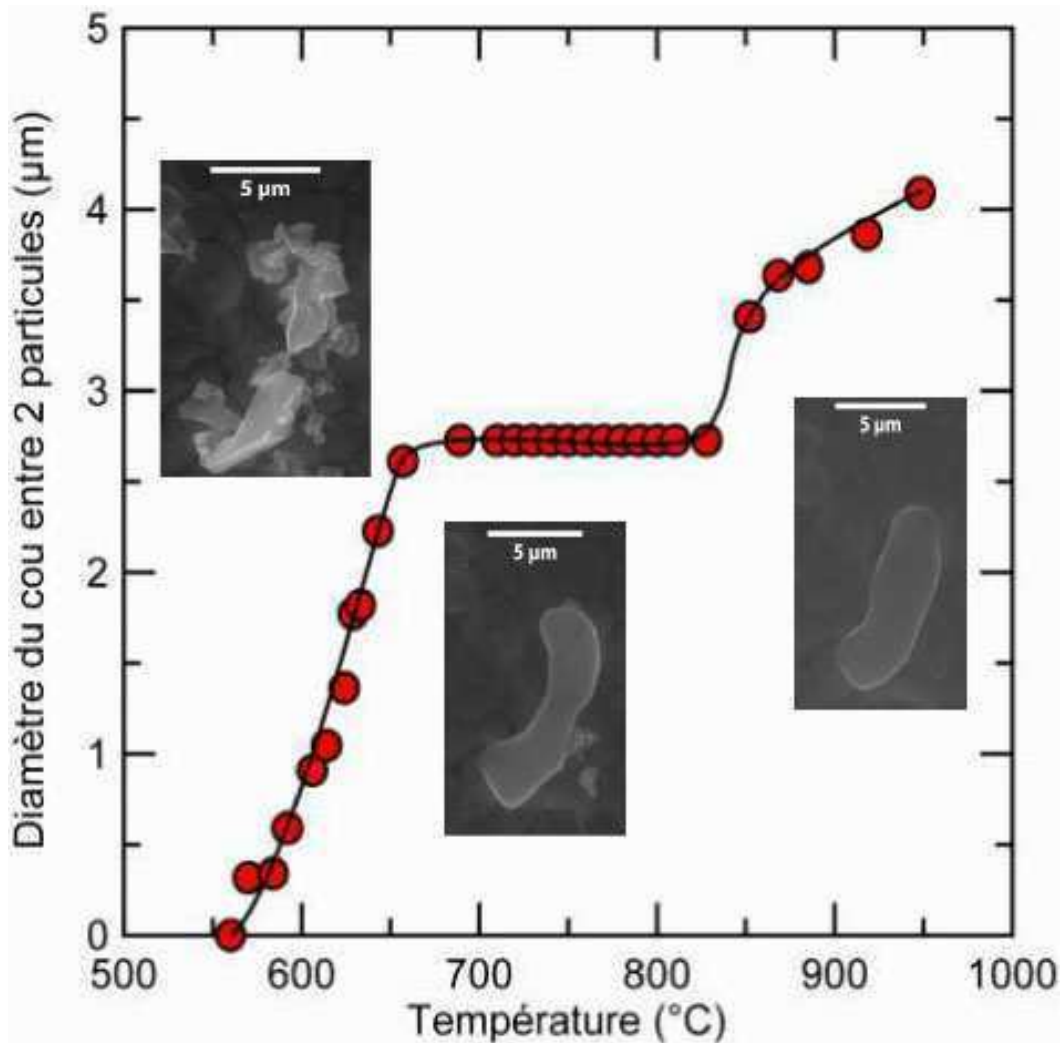


Figure C-31 : Diamètre du cou formé entre deux particules en fonction de la température à 5°C/min avec micrographies associées

La structure finale d'un amas de poudre de bioverre tassé après un traitement thermique de 700°C (figure 32) montre la formation de cous entre les particules.

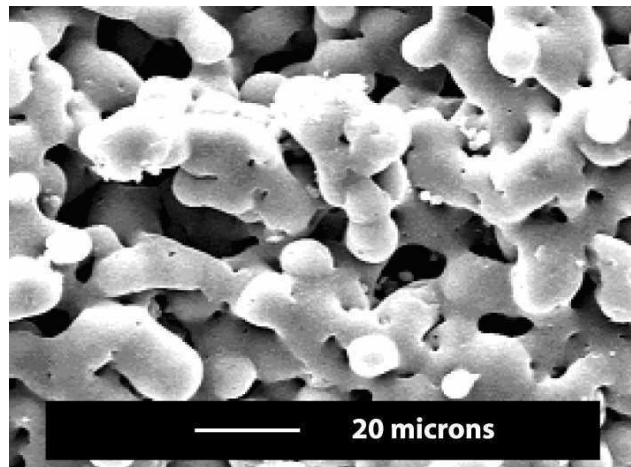


Figure C-32 : structure d'un amas de poudre tassé obtenu après un traitement thermique de 700°C à 5°C/min

La figure 33 montre les diffractogrammes réalisés sur le bioverre brut, et sur le bioverre fritté à la fin de la première étape et juste avant la troisième étape. Avant frittage, le matériau est amorphe. A  $T_c$ , un pic commence à apparaître aux alentours de  $2\theta = 34^\circ$  indiquant le début de la cristallisation. Cependant, la phase amorphe reste prédominante. A la fin du plateau, les échantillons sont cristallisés.

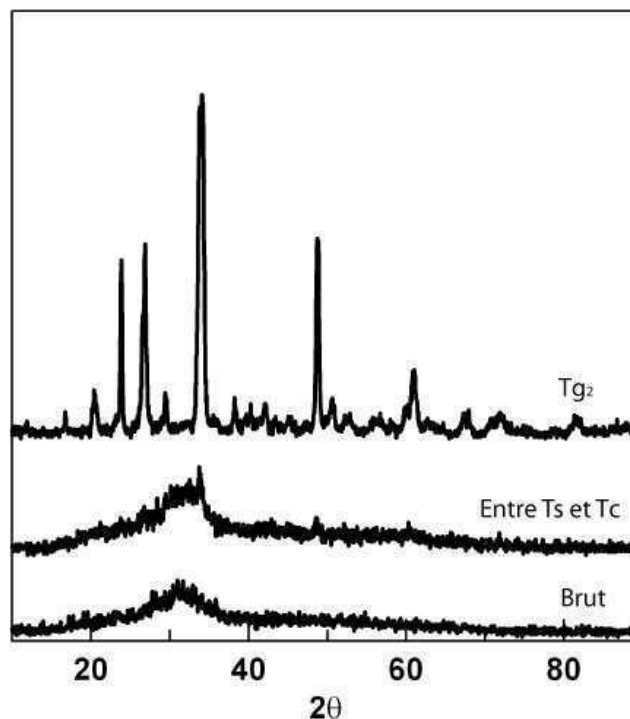


Figure C-33 : Diffractogramme de rayon X réalisés avant frittage, à la fin du premier stade et à  $T_{g2}$

L'influence de la cristallisation sur le frittage de verres a été démontré dans la littérature. Scherer [4] a montré que si il y avait cristallisation durant le frittage, le flux visqueux était perturbé. Lorsque toutes les surfaces de particules sont cristallisées, le frittage par flux visqueux

cesse et un matériau poreux entièrement ou partiellement cristallisé est obtenu. Muller et al. [5] ont remarqué que la plupart des poudres de verre ont une tendance à cristalliser en partant de la surface externe lorsqu'elles sont traitées thermiquement, et que chaque fraction de surface qui cristallise arrête le frittage en limitant le flux visqueux. Ils ont pensé également que, indépendamment du modèle de frittage, la vitesse de densification devrait diminuer en proportion de la fraction de surface de verre restant après cristallisation [6]. De plus, Zanotto et al. [7] ont montré que lors d'une cristallisation concurrente, ou dans le cas de particules réfractaires préexistantes (ou de cristaux) sur la surface des particules, le nombre de contacts particule - particule disponible pour un flux visqueux diminue.

Zarzycki a noté que la densification et la cristallisation sont dépendantes toutes deux de la viscosité à part égale, ainsi, une baisse de viscosité cause la même accélération dans les deux procédés [8]. A cause de cela, Scherer a montré que la vraie compétition se déroule entre les forces motrices de frittage et de cristallisation [9].

Lorsque la cristallisation est terminée et qu'on n'observe plus de densification, Karamanov et al. ont observé que les pores présents dans le matériau pouvaient s'élargir et que de nouveaux pores pouvaient apparaître, certainement à cause de la cristallisation de phases plus denses que le verre parent [10]. De plus, lors du processus de frittage, les pores coalescent ce qui permet de diminuer le nombre de pores et d'augmenter leur taille.

---

### C-3-III Modélisation

---

#### 1) Modélisation du premier stade de retrait

La première étape de densification a été étudiée en utilisant un des modèles de flux visqueux existant dans la littérature [11]. Etant donné que la densification linéaire due à la première transition vitreuse n'excède pas 10% de retrait linéaire, nous avons choisi d'utiliser le modèle de Frenkel qui décrit les premiers stades du frittage de particules sphériques et monodisperse (pour des compacts de densité à cru de 0,6 jusqu'à des densité de 0,8).

Il considère que la force motrice du frittage est la réduction de l'énergie de surface des particules et que les déplacements de matière s'effectuent par flux visqueux [12]. Ce modèle permet de calculer la vitesse de densification de deux particules identiques dont les centres se rapprochent l'un de l'autre en fonction de la viscosité du verre. Il est exprimé par l'équation :

$$\frac{\Delta L}{L_0} = \frac{3\gamma}{8rq} \int_{T_g}^T \frac{1}{\eta(T)} dT \quad \text{Eq C-5}$$

Où  $\Delta L/L_0$  est la densification linéaire relative des compacts de poudre de verre,  $\gamma$  l'énergie de surface (estimée à environ  $1 \text{ J/m}^2$ ),  $r$  le rayon des particules,  $q$  la vitesse de chauffe, et  $\eta(T)$  la viscosité (dépendante de la température).

Puisque nos particules ne sont pas sphériques, l'utilisation du modèle de Frenkel devrait être proscrite. Cependant, Scherer a démontré dans son modèle plus complexe prenant en compte l'architecture poreuse que les résultats modélisés sont virtuellement insensibles aux

## Elaboration de blocs poreux – Etude du frittage

caractéristiques des particules, notamment à leur géométrie, et que ses résultats étaient similaires à ceux de Frenkel pour les premiers 10% de densification linéaire relative [13].

La variation de la viscosité du verre en fonction de la température, sur la plage de température concernée par le frittage, peut être décrite par une équation du type Arrhénius [20]:

$$\eta = \eta_0 \exp\left(-\frac{Q_{vis}}{RT}\right) \quad \text{Eq C-6}$$

où  $\eta_0$  est une constante,  $Q_{vis}$  l'énergie d'activation, R la constante des gaz parfaits et T la température absolue.

En dérivant l'équation de Frenkel et en y intégrant l'expression de la viscosité, on obtient la vitesse de densification exprimé par :

$$\frac{d\frac{\Delta L}{L_0}}{dT} = \frac{3\gamma}{8rq\eta_0 \exp\left(-\frac{Q_{vis}}{RT}\right)} \quad \text{Eq C-7}$$

Le logarithme népérien de la vitesse de densification est alors:

$$\ln\left(\frac{d\frac{\Delta L}{L_0}}{dT}\right) = \ln\left(\frac{K}{\eta_0}\right) + \frac{Q_{vis}}{RT} \quad \text{avec } K = \frac{3\gamma}{8rq} \quad \text{Eq C-8}$$

Cette relation est valide lorsque le bioverre 45S5 est traité entre  $Tg_1$ , température de transition vitreuse, et  $T_s$ , température de séparation de phase. C'est-à-dire lorsque son comportement au frittage n'est pas encore perturbé par ses transformations. Dans ce cas, on peut déduire la viscosité du verre des courbes de dilatométrie.

Le tracé de  $\ln\left(\frac{d\frac{\Delta L}{L_0}}{dT}\right)$  en fonction de  $\frac{1}{T}$  (figure 34) permet d'obtenir une droite de la forme

$$\ln\left(\frac{d\frac{\Delta L}{L_0}}{dT}\right) = C_1 + \frac{C_2}{T} \quad \text{où : } C_1 = \ln\left(\frac{K}{\eta_0}\right) \quad \text{et} \quad C_2 = \frac{Q_{vis}}{R} \quad \text{Eq C-9}$$

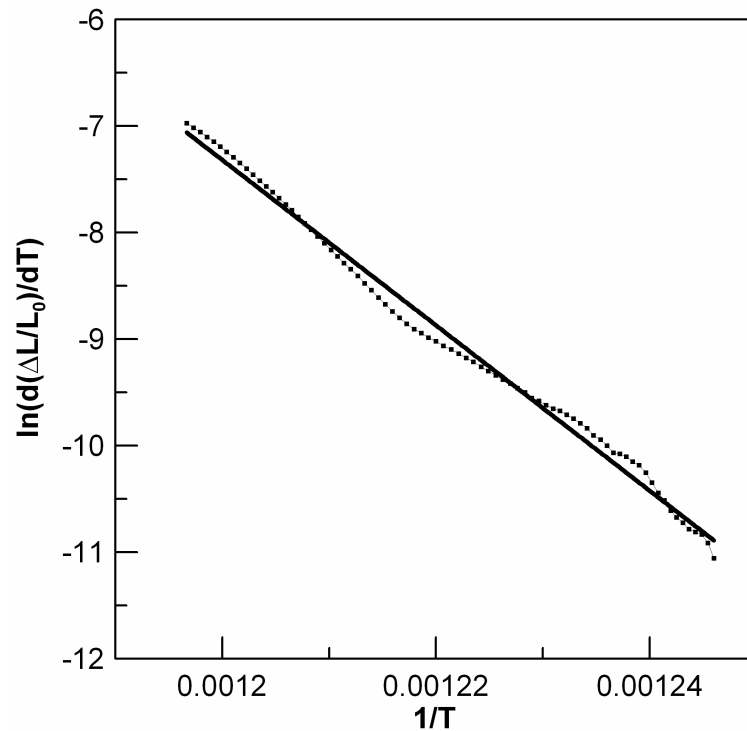


Figure C-34 :  $\ln(d(\Delta L/L_0)/dT)$  en fonction de  $1/T$  sur courbe dilatométrique effectuée à  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  entre  $T_{g1}$  et  $T_s$

Les équations ci-dessus permettent de calculer l'énergie d'activation du flux visqueux de compacts de poudre de bioverre à partir de  $T_{g1}$  et avant transformations.

Dans le cas d'un traitement thermique à  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ , on trouve une énergie d'activation de la viscosité de  $686 \text{ kJ/mol}$  ce qui indique que la variation de viscosité, et donc le frittage de particules de bioverre, est plus dépendante de la température que la cristallisation de  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  ( $Q_{\text{crist}} = 280 \text{ kJ/mol}$  [14]). Cette valeur est du même ordre de grandeur que l'énergie d'activation du flux visqueux trouvé expérimentalement pour un verre sodo-calcique de haute viscosité [15].

L'énergie libérée par la diminution de surface est utilisée pour le flux visqueux, qui est responsable du transport de masse qui produit la densification [7]. En conditions non isothermes et considérant une cristallisation en surface probable du verre, Prado et al.[16] ont décrit la variation de densification relative linéaire en fonction de la température par l'équation:

$$\frac{\Delta L}{L_0} = \frac{3\gamma}{8rq} \int_{T_g}^T \frac{(1-\alpha_s)}{\eta(T)} dT \quad \text{Eq C-10}$$

Avec  $\alpha_s$ , le taux de blocage de la surface. Cette relation suppose que la viscosité « globale » du matériau est proportionnelle à la quantité de phase vitreuse. Cette hypothèse n'est pas entièrement vérifiée puisqu'il pourrait y avoir percolation de la phase cristalline ce qui perturberait la viscosité de façon plus importante.

Nous avons vu précédemment que la vitesse de densification du bioverre 45S5 baisse considérablement au passage de la température de séparation de phase  $T_s$ , avant toute cristallisation. Nous avons donc considéré que le rôle de cette transformation dans le blocage de la surface était prédominant par rapport à la cristallisation.



Le taux de blocage de surface dû à la séparation de phase vitreuse peut être exprimé par une relation phénoménologique du type :

$$\alpha_s = 1 - \exp(-b_s(T - T_0)^n) \quad \text{Eq C-11}$$

Avec  $T$ , la température ;  $b_s$ ,  $n$  et  $T_0$  des constantes. Cette relation traduit la dépendance sigmoïdale de  $\alpha_s$  avec la température.  $T_0$  est la température de début de séparation ( $T_0 = T_s$ ).

Le modèle de Frenkel, modifié pour inclure le blocage de la surface des particules à partir de  $T_s$ , a été appliqué à une courbe dilatométrique obtenue à  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  afin de déterminer  $b$ ,  $T_0$  et  $n$ . On trouve  $b = 0,041 \pm 0,004 \text{ K}^{-1}$ ,  $T_0 = 552 \pm 10 \text{ K}^{-1}$  et  $n = 2,1 \pm 0,04$ .

Enfin, le modèle de Frenkel a été modifié pour inclure la densification due à la cristallisation volumique par l'équation

$$\frac{\Delta L}{L_0} = \frac{3\gamma}{8rq} \int_{T_s}^T \frac{(1 - \alpha_s)}{\eta(T)} dT + \frac{\alpha_c}{3} \frac{\Delta\rho}{\rho_0} \quad \text{Eq C-12}$$

où  $\alpha_c$  est le taux d'avancement de la cristallisation,  $\Delta\rho$  la différence de densité entre le matériau cristallisé au maximum et amorphe, et  $\rho_0$  la densité initiale du cru. Le taux d'avancement de la cristallisation ( $\alpha_c$ ) a été déduit des cinétiques non isothermes effectuées par ATD.

La figure 35 montre la superposition du modèle aux données expérimentales obtenues pour le premier stade de frittage de compact de poudre de bioverre traité à  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ . Les variations des taux de séparation de phase et de cristallisation y sont également visibles. Ces courbes montrent l'influence de la séparation de phase et de la cristallisation sur le flux visqueux. Le modèle de Frenkel pur, valide dans les dix premiers pourcents de retrait linéaire, montre que la densification devrait continuer à augmenter à cause de la diminution de la viscosité. La modification de ce modèle en y incluant l'effet des transformations permet de modéliser les résultats expérimentaux convenablement. Le modèle de Frenkel pur s'applique au tout début de la courbe. Lorsque la séparation de phase apparaît, on dévie de ce modèle et il faut alors y inclure l'effet de cette dernière. Lorsque la séparation de phase se termine, elle est immédiatement suivie par la cristallisation qui induit un léger retrait.

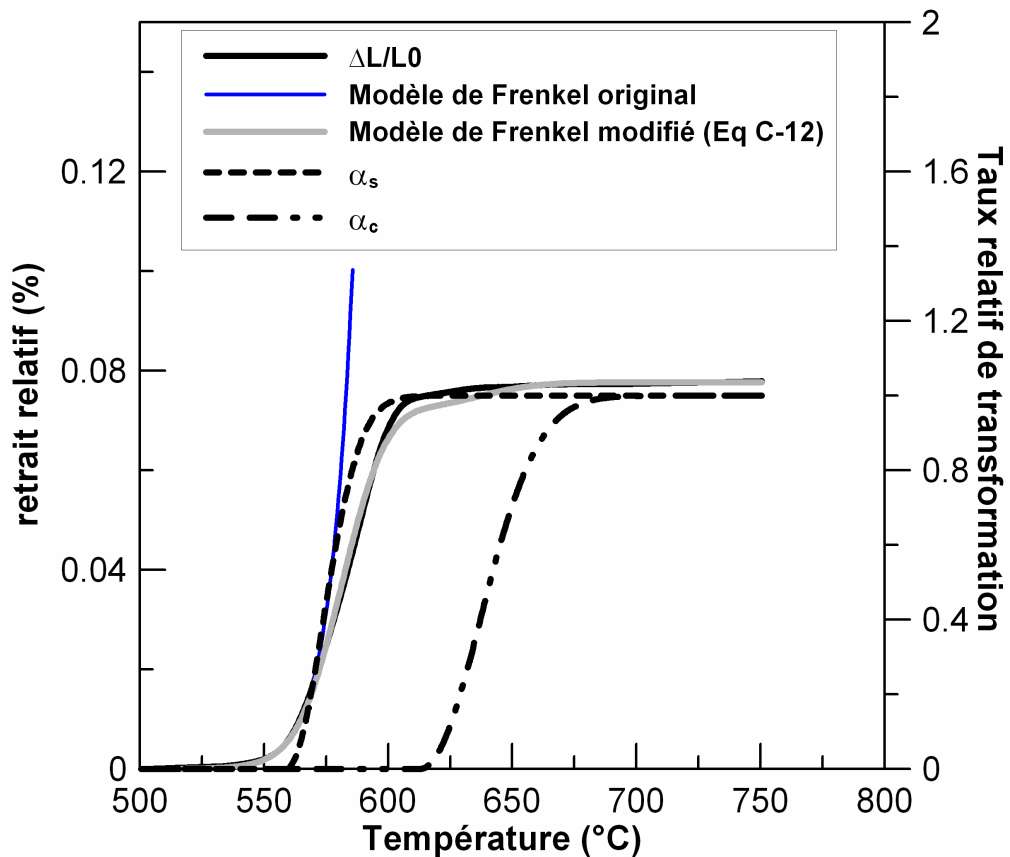


Figure C-35 : Modélisation du premier retrait à 5°C/min par le modèle de Frenkel

## 2) Modélisation du second stade de retrait

Nous avons tenté de modéliser le second retrait en utilisant le modèle de Frenkel et en supposant que ce stade de densification est également dû à un flux visqueux. Aucune transformation ayant pour effet un durcissement de surface n'étant identifiée dans ce domaine de température, le modèle de base a été utilisé. Ce modèle ne s'applique pas à nos résultats, peut-être à cause du grossissement de grain observé dans le chapitre précédent. Puis nous avons imaginé que le retrait observé était dû à un frittage en phase liquide puisqu'à la fois une phase vitreuse et une phase cristalline étaient présentes. Pourtant les modèles proposés dans la littérature ne concordent pas non plus avec nos expériences.

Afin de mieux comprendre les mécanismes amenant au second retrait nous avons effectué divers traitements thermiques de compacts de poudre entre 560 et 800°C. Ces traitements ont été effectués dans un dilatomètre. Après traitement, les échantillons sont refroidis et broyés au mortier. De nouvelles pastilles sont alors obtenues de ces échantillons concassés et sont traitées dans le dilatomètre jusqu'à 1000°C. La figure 36 montre les résultats obtenus.

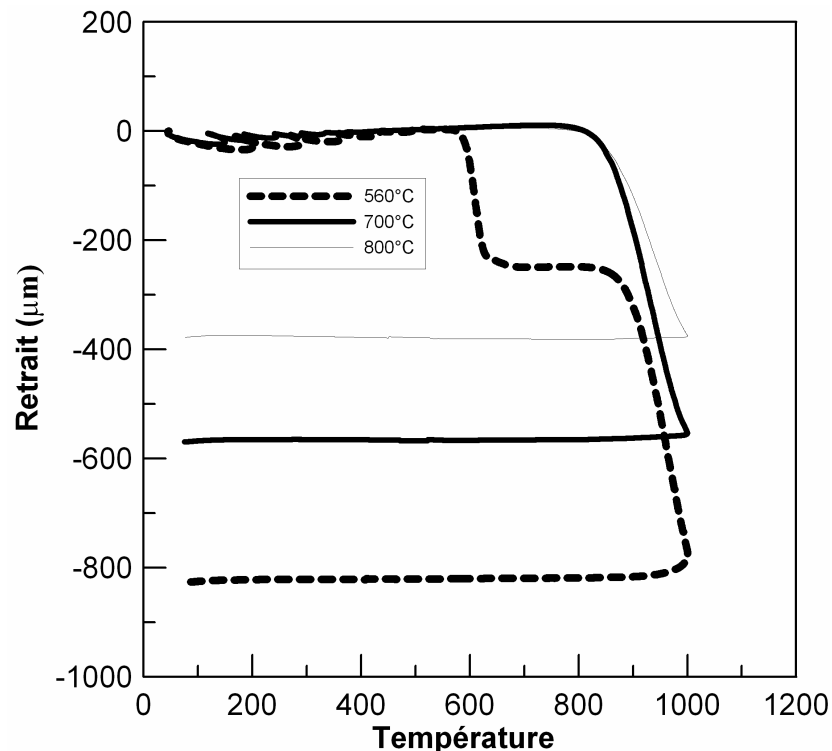


Figure C-36 : Courbes dilatométriques de compacts de poudre traités à 560, 700 et 800°C, concassés et pressés.

Les compacts de poudre traités à 560°C après concassage et pressage reproduisent la même courbe dilatométrique qu'un cru. Les mêmes retraits finaux sont observés. Par contre les compacts de poudre traités à 700°C et 800°C et re-broyés ne présentent qu'un seul stade de retrait commençant à 750°C. La  $Tg_2$  est donc située 100°C plus tôt que ce qui était mesuré sur les compacts non re-broyés. Ce résultat provient certainement du fait que lors du concassage des compacts de poudres traités, on casse les cous formés entre les particules et donc leurs coquilles cristallines. Le retrait plus important pour la poudre à 700°C vient certainement du fait que les poudres ne sont pas parvenues à leur maximum de cristallisation contrairement à celles traitées à 800°C.

Grâce à ces observations on peut imaginer un scénario possible de transformation entre la fin de la cristallisation et 1000°C. Il est possible que la seconde transition vitreuse se déroule à 750°C mais que l'enveloppe cristalline créée autour des grains de poudre empêche la phase vitreuse d'arriver en surface et d'engendrer un flux visqueux. Une augmentation de température de 100°C lui permettrait soit de casser l'enveloppe par une augmentation de pression interne, soit de remonter en surface par capillarité, sa viscosité diminuant. Cette hypothèse est cohérente avec le fait que la phase phosphate cristalline apparaît à 800°C. Pour qu'une cristallisation ait lieu il faut une certaine mobilité des atomes qui serait engendrée par cette transition vitreuse.

La figure 37 montre une courbe dilatométrique effectuée à 5°C/min sur un bloc coulé dense de bioverre, accompagnée de sa dérivée. Cette courbe permet de connaître l'influence des transformations sur le retrait des échantillons puisque aucun phénomène de frittage ne peut avoir lieu.

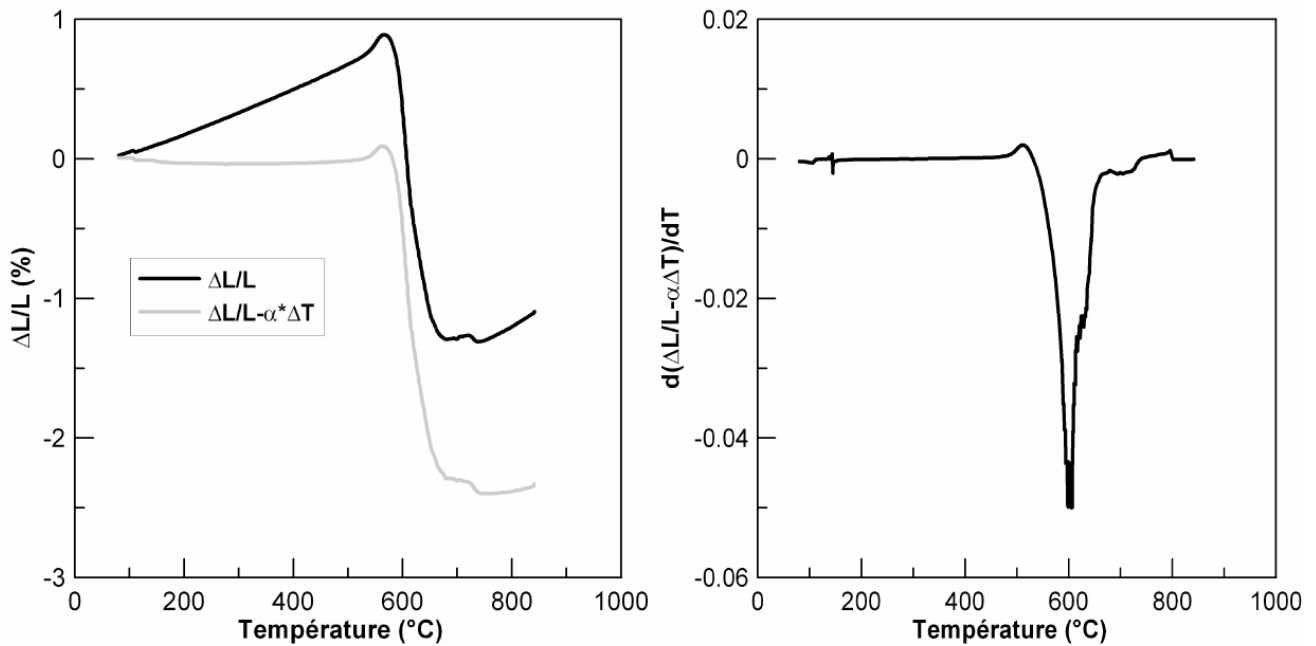


Figure C-37 : courbe dilatométrique d'un bloc de bioverre coulé dense

La courbe montre un premier retrait au alentour de  $T_{g1} = 550^{\circ}\text{C}$  qui correspond à un fluage sous charge dû à l'enfoncement de la tige dilatométrique dans le bloc de bioverre. A  $600^{\circ}\text{C}$ , la vitesse du flux visqueux diminue à cause de la séparation de phase vitreuse. Puis, vers  $650^{\circ}\text{C}$ , la densité du matériau augmente à cause de la cristallisation. A  $750^{\circ}\text{C}$ , un retrait mineur est observé qui pourrait être dû à la seconde transition vitreuse.

Enfin la figure 37 permet d'obtenir les coefficients de dilatation du verre et de la vitrocéramique traitée à  $850^{\circ}\text{C}$  par les pentes de la courbe avant la  $T_{g1}$  et après  $T_{g2}$ . On trouve  $\alpha$  (verre) =  $1,63 \cdot 10^{-5}$  et  $\alpha(\text{cristal}(850^{\circ}\text{C})) = 1,50 \cdot 10^{-5}$ . Les résultats montrent que les coefficients de dilatation varient très peu avec la cristallisation. Le coefficient de dilatation et le module d'Young des matériaux étant liés à la force des liaisons, on peut penser que le module d'Young ne varie que faiblement avec la cristallisation du bioverre.

## C-3-IV Cinétiques de frittage

### 1) Influence de la vitesse de chauffe

Par la connaissance de la densité initiale du compact de poudre avant traitement thermique, et en supposant une densification isotrope donc que la faible anisotropie observée précédemment est due uniquement à la pression exercé par la tige du dilatomètre, la densité est reportée en fonction de la température pour des vitesses de chauffe allant de 1 à  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$  sur la Figure 38. Lorsque la vitesse de chauffe augmente, la première étape de densification par flux visqueux devient plus importante mais la densité finale à  $1000^{\circ}\text{C}$  diminue.

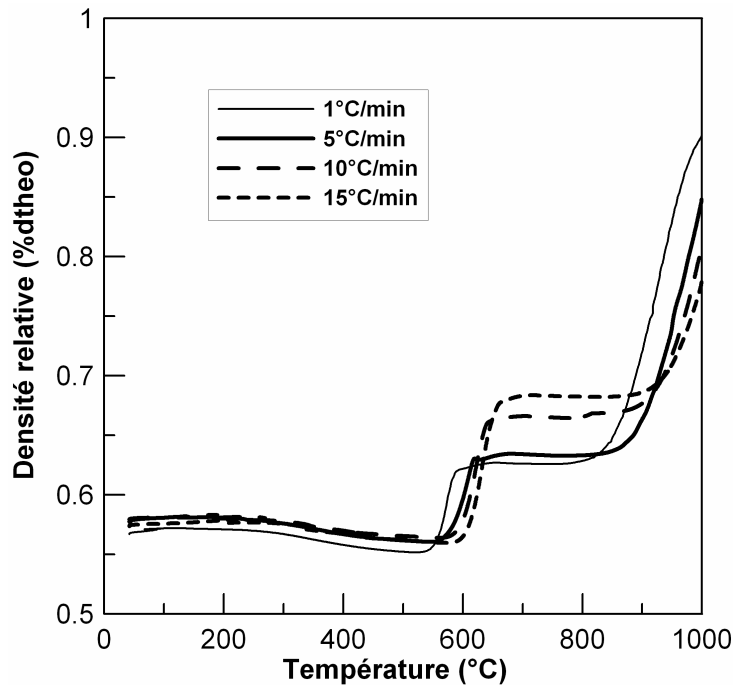


Figure C-38 : densité en fonction de la température pour des vitesses de chauffe allant de 1 à 15°C/min

Dans le cas d'une cristallisation, Boccaccini et al. ont montré sur des poudres de verre Ba-Mg-Al-Si-O que des vitesses de chauffe élevée favorisent le frittage au détriment de la cristallisation sans apporter d'explication précise[17].

La figure 39 montre la dispersion de résultats obtenus sur la fin du premier retrait en fonction de la vitesse de chauffe.

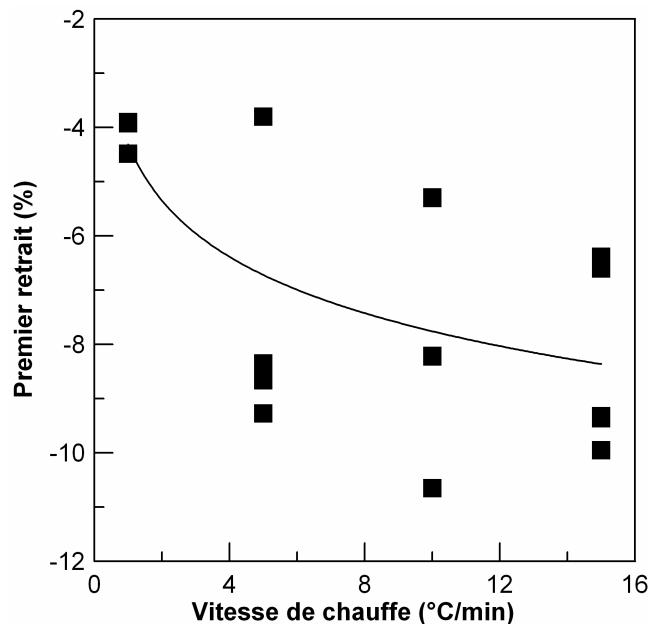


Figure C-39 : dispersion obtenue sur le retrait obtenu à la fin du premier stade

Bien qu'il y ait une grande dispersion des résultats, le premier retrait augmente globalement avec la vitesse de chauffe.

Le tableau 3 donne le récapitulatif des valeurs C1, C2,  $\eta_0$  et  $Q_{vis}$  obtenues par application du modèle de Frenkel à chaque cinétique non isotherme.

	1°C/min	5°C/min	10°C/min	15°C/min
<b>C1</b>	72	85	51	87
<b>C2 (10<sup>3</sup>K)</b>	-65941	-78477	51188	83032
<b><math>\eta_0</math>(Pa.s)</b>	2 E-25	2,7E-31	7,3E-17	1,2E-32
<b>Q (kJ/mol)</b>	-750	-686	-774	-778

Tableau C-3 : Résumé des valeurs obtenues en utilisant le modèle de Frenkel entre Tg et Ts

On trouve une énergie d'activation de la viscosité moyenne de  $750 \pm 100$  kJ/mol. Cependant, une forte dispersion des résultats est constatée malgré des densités à cru identiques.

La figure 40 montre l'évolution de la viscosité du verre en fonction de la température pour différentes vitesses de chauffe. Cette viscosité dérive de la modélisation par Frenkel de nos résultats.

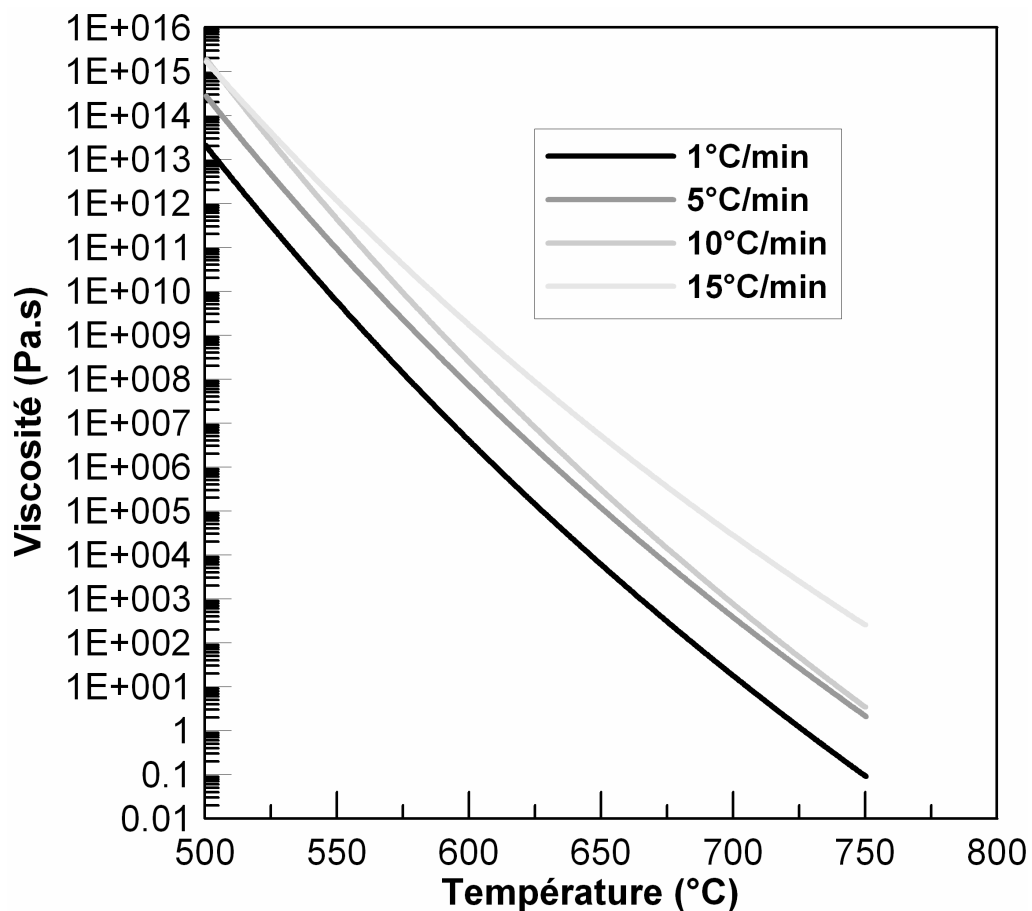


Figure C-40 : variation de la viscosité du verre en fonction de la vitesse de chauffe

Le modèle de Frenkel, incluant le blocage de la surface des particules à partir de  $T_s$  et jusqu'à  $750^\circ\text{C}$ , a été appliqué à nos cinétiques non isothermes afin de déterminer  $b$ ,  $T_0$  et  $n$ . Les résultats sont reportés dans le tableau 4.

	1°C/min	5°C/min	10°C/min	15°C/min
<b>b (K<sup>-1</sup>)</b>	0,049±0,004	0,041 ±0,004	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,01
<b>T<sub>0</sub> (°C)</b>	545 ± 9	552 ± 10	572 ± 8	591 ± 9
<b>n</b>	2,4 ± 0,3	2,05 ± 0,004	1,76 ± 0,01	1,75 ± 0,02

Tableau C-4 : Récapitulatif des caractéristiques du mécanisme de séparation de phases vitreuses

La figure 41 montre le taux d'avancement de la séparation de phase vitreuse en fonction de la température pour différentes vitesses de chauffe. Les données ont été calculées à partir des cinétiques non isothermes de frittage modélisées par le modèle de Frenkel modifié (Eq C-12). On observe que plus la vitesse de chauffe augmente, plus la séparation de phase vitreuse est décalée vers les hautes températures.

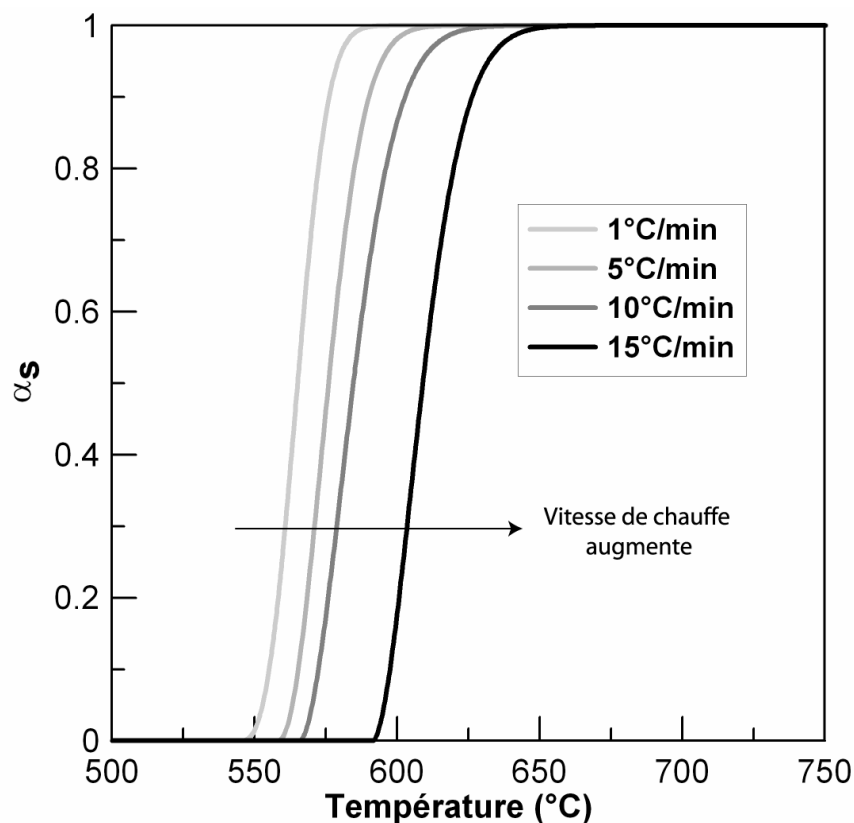


Figure C-41 : Evolution de la séparation de phase vitreuse en fonction de la température, pour différentes vitesses de chauffe.

La Figure 42 montre l'influence des vitesses de chauffe sur les principales températures de transformations. Les températures des deux transitions vitreuses ont été déterminées par la température à laquelle la courbe dilatométrique commence à dériver de sa ligne de base. La température de séparation de phase apparente ( $T_s(\text{app})$ ) désigne la température à partir de laquelle

la séparation de phase a pour effet de diminuer la vitesse de densification. Celle-ci, est déterminée par l'intermédiaire des dérivées des courbes dilatométriques effectuées à différentes vitesses de chauffe. Enfin, la température de cristallisation a été déterminée par le début du retrait mineur apparaissant suite au premier stade sur les courbes dilatométriques et par le début du pic exothermique de cristallisation sur les courbes ATD.

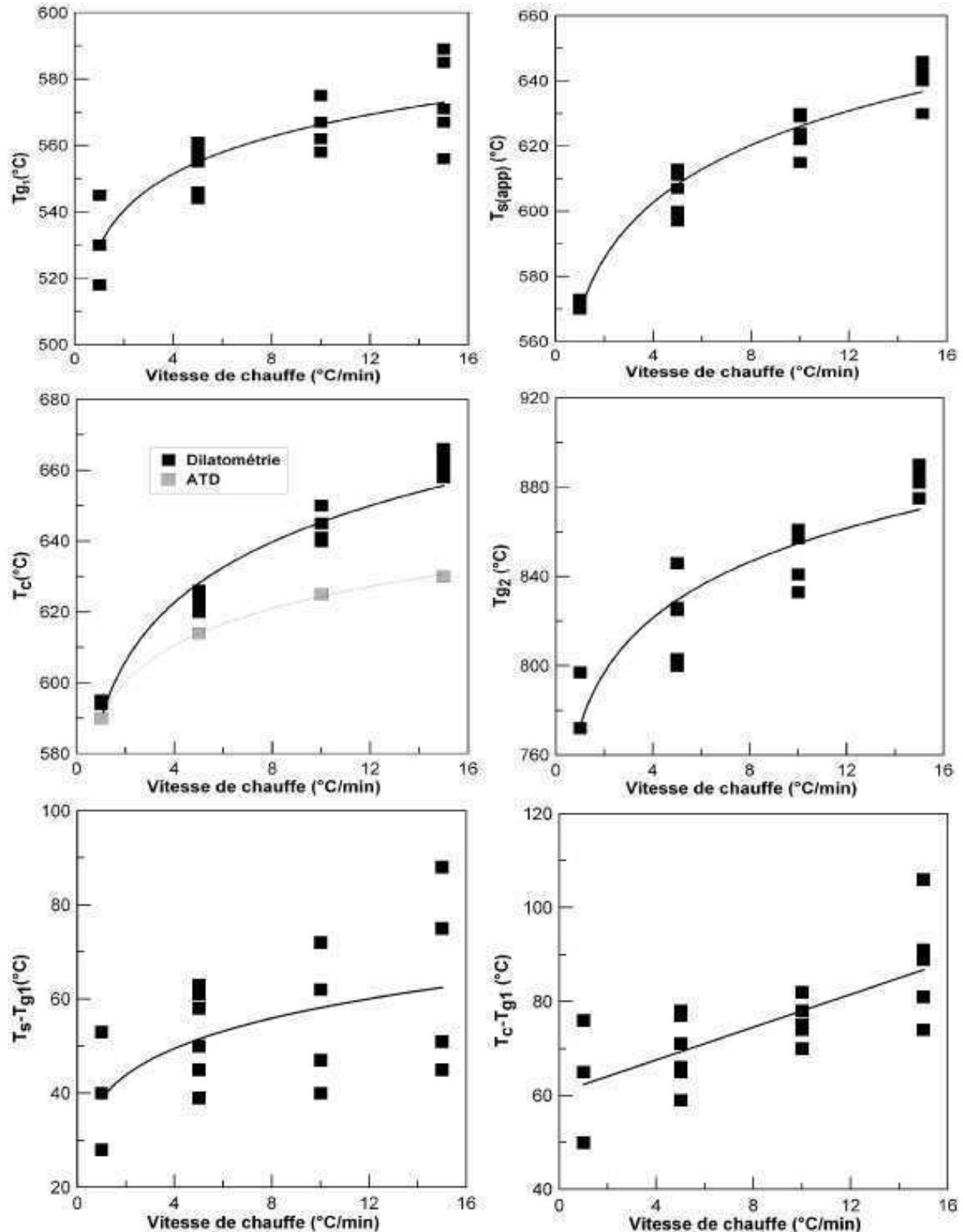


Figure C-42 : Influence de la vitesse de chauffe sur  $T_{g1}$ ,  $T_s$ ,  $T_c$  et  $T_{g2}$



Les températures des deux transitions vitreuses et de la cristallisation de la phase principale augmentent avec la vitesse de chauffe. Ces observations sont en accord avec les cinétiques non isothermes effectuées par analyse thermique différentielle sur l'évolution du pic exothermique de cristallisation avec la vitesse de chauffe. Cependant les températures de cristallisation mesurées par ATD et par dilatométrie ne correspondent pas. Ceci peut s'expliquer par le fait que le retrait mineur observé sur les courbes dilatométriques correspond à une densification due à une cristallisation en volume, hors la cristallisation commence en surface donc à des températures inférieures. L'augmentation de l'écart entre  $T_{g1}$  et les températures de séparation de phase vitreuse et de cristallisation avec la vitesse de chauffe pourrait être la raison de l'augmentation de retrait observée. Plus on chauffe rapidement et plus la plage de température où le flux n'est pas influencé par les transformations structurales du bioverre est importante. De plus, on remarque que les températures de transitions vitreuses, à une vitesse de chauffe donnée, sont plus dispersées que les températures de séparation de phase et de cristallisation ce qui induit des intervalles  $T_{g1} - T_s$  différents. Cette constatation expliquerait la dispersion inhabituelle des résultats pour des matériaux céramiques constatée ci-dessus.

L'évolution de la taille des cristallites de la phase principale  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  avec la vitesse de chauffe est montrée sur la figure 43. Plus le traitement thermique est lent, plus les cristallites sont gros. En effet, les échantillons restent plus longtemps à basse température et ainsi ont plus de temps de germer. Par conséquent, des cristallites plus gros (ils ont aussi plus de temps pour croître) et plus nombreux sont créés induisant plus de cristallinité. Cet effet est d'autant plus marqué que l'intervalle de température entre  $T_{g1}$  et  $T_c$  augmente avec la vitesse de chauffe.

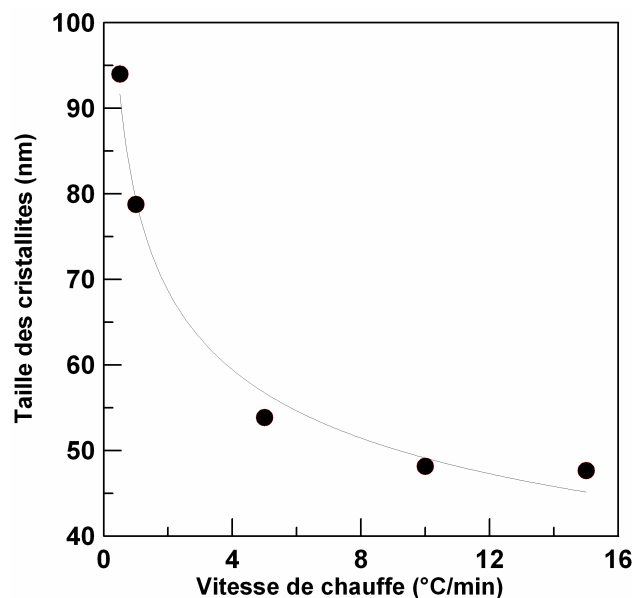


Figure C-43 : Tailles des cristallites à 1000°C de la phase principale  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  en fonction de la vitesse de chauffe

## 2) Cinétiques isothermes de retrait

Afin de compléter l'étude du frittage de compacts de poudre, des cinétiques isothermes ont été réalisées dans le domaine de température compatible avec l'élaboration de blocs poreux, c'est-à-dire pour des températures comprises dans les deux stades prédominant du frittage du verre 45S5. Les échantillons sont portés rapidement (80°C/min) à la température désirée et la

densification est mesurée pendant 5h. Les échantillons obtenus à des températures comprises dans le premier stade de densification sont analysés par rayon X afin de déterminer le taux de transformation en fonction du temps, et ainsi de compléter les courbes TTT mises en place dans le chapitre précédent. Grâce a ces résultats, on pourra alors répondre à la question : peut-on densifier significativement un compact de bioverre en évitant la cristallisation ?

a) *Cinétiques Isothermes du premier stade*

La figure 44 montre la densité relative obtenue en fonction du temps de traitement pour différentes températures comprises dans le premier stade de retrait.

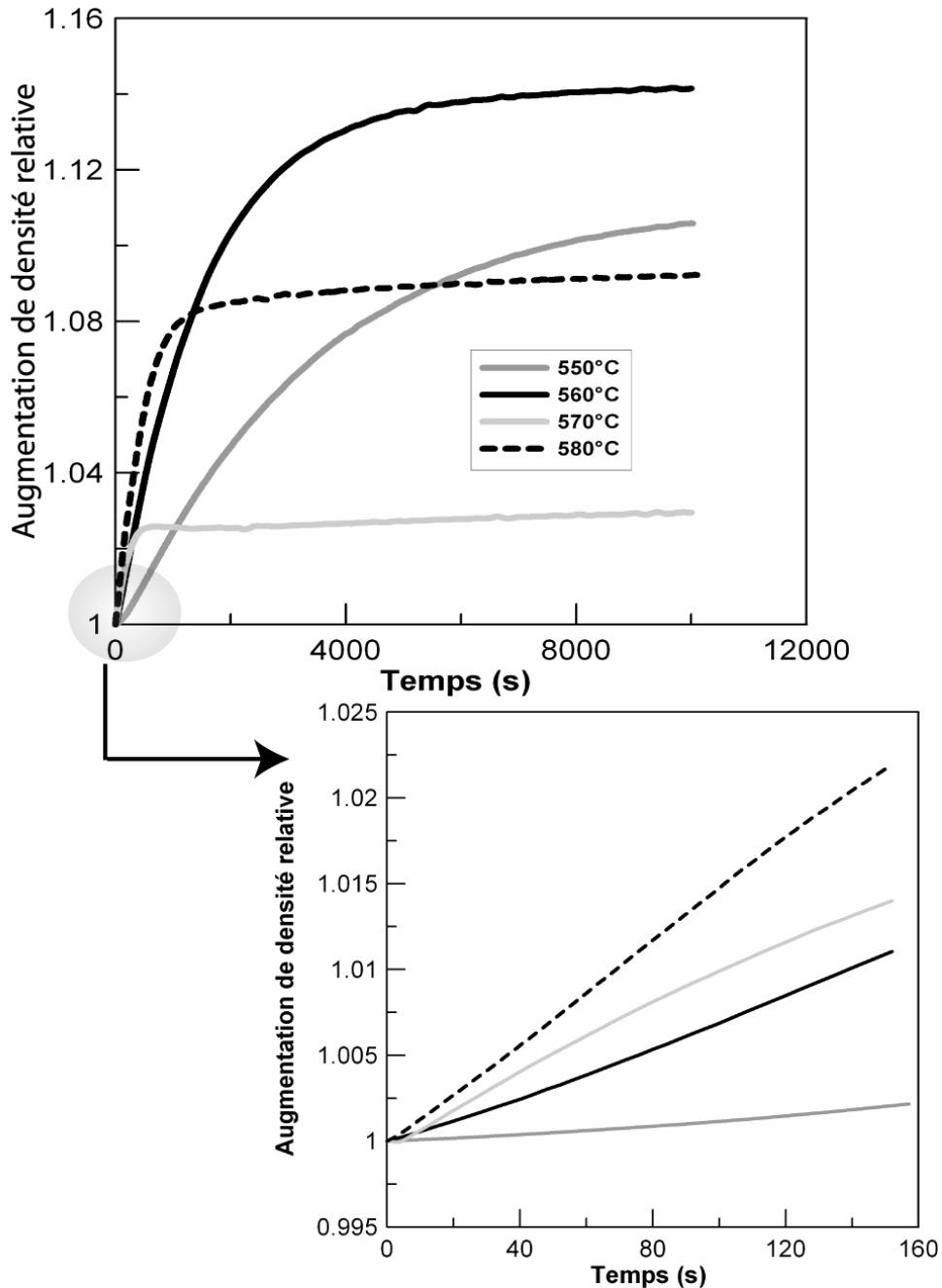


Figure C-44 : densité relative (par rapport à la densité absolue du bioverre 45S5) en fonction du temps pour des températures d'isothermes comprises dans le premier retrait.

On observe que plus la température est élevée, plus la vitesse de densification est grande. L'intégralité des échantillons obtenue présente un faible tenu mécanique. Le profil des courbes peut nous renseigner sur les mécanismes du frittage. On voit pour l'intégralité des courbes que la vitesse, très élevée au départ, diminue considérablement avec le temps.

Le modèle de Frenkel en mode isotherme est exprimé par la relation :

$$\frac{\rho(t)}{\rho_0} = \left( 1 - \frac{3\gamma t}{8\eta(T)r} \right)^{-3} \quad \text{Eq C-13}$$

Avec  $\rho(t)$ , la densité du matériau à un temps  $t$  ;  $\rho_0$  la densité initiale du matériau ( $2,7 \text{ g/cm}^3$ ).

Ce modèle s'applique au tout début de la courbe ci-dessus, lorsque la vitesse de densification augmente. Nous avons vu ci-dessus que le flux visqueux engendré par le passage de température au dessus de  $T_{g1}$  était perturbé par la séparation de phase induisant un arrêt progressif de la densification. C'est ce qu'on observe ici mais par rapport au temps pour toutes les courbes isothermes. Plus la température d'isotherme est élevée, plus cette perturbation survient précocement. La cinétique de retrait effectuée à  $550^\circ\text{C}$  montre que le flux visqueux est perturbé après 30 min d'isotherme. En effet, un écart à la loi de Frenkel est observé.

Un des moyens de densifier en évitant le plus possible de cristalliser le matériau est de se placer en isotherme à  $T_{g1}$ . Pour voir les limites de cette méthode, des cinétiques isothermes de retrait ont été réalisées à  $550^\circ\text{C}$  entre 1h et 70h. A titre de comparaison, la même expérience a été réalisée à  $580^\circ\text{C}$ .

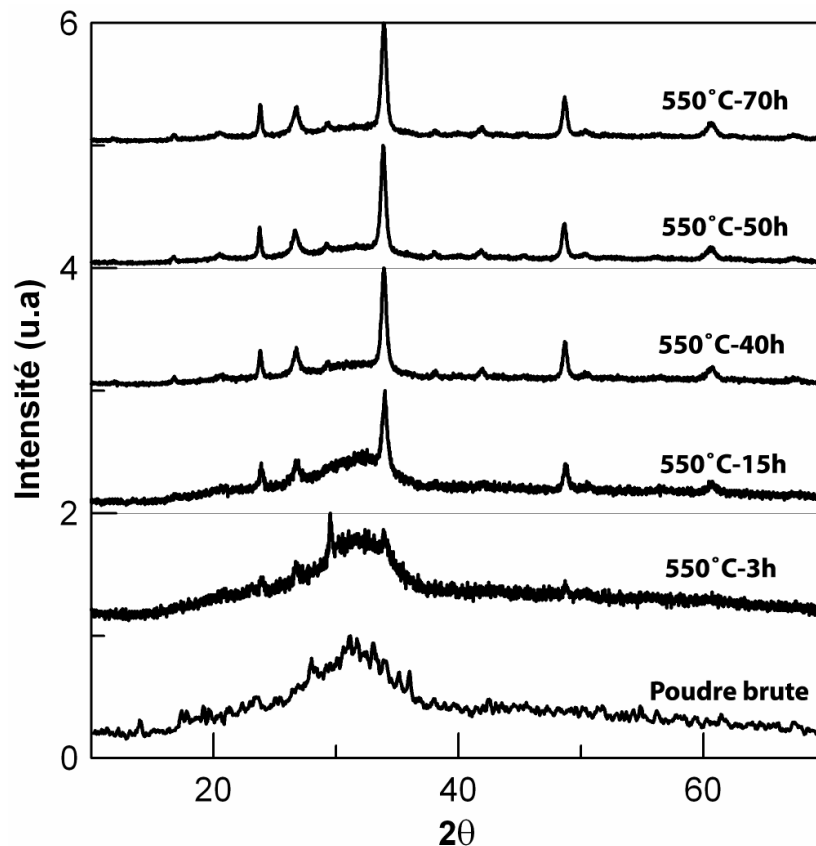


Figure C-45 : diffractogramme réalisés sur les compacts de poudres traités en isotherme à  $550^\circ\text{C}$  pour différents temps

La figure 45 montre que les compacts de poudres traités à 550°C sont amorphes jusqu'à 1h de traitement. La perturbation observée sur la figure 15 après 30 min n'est donc pas due à la cristallisation. Cela confirme le rôle de la séparation de phase sur l'augmentation de viscosité dans les compacts. Après 15h, le bioverre commence à cristalliser mais la phase amorphe reste prépondérante. De plus, entre 50 et 70 h de traitement à 550°C, les diffractogrammes varient très peu, indiquant l'arrivée sur un palier.

L'intensité du fond continu pour chaque temps d'isotherme a été utilisé pour calculer le taux de transformation en fonction du temps pour des isothermes à 550 et 580°C.

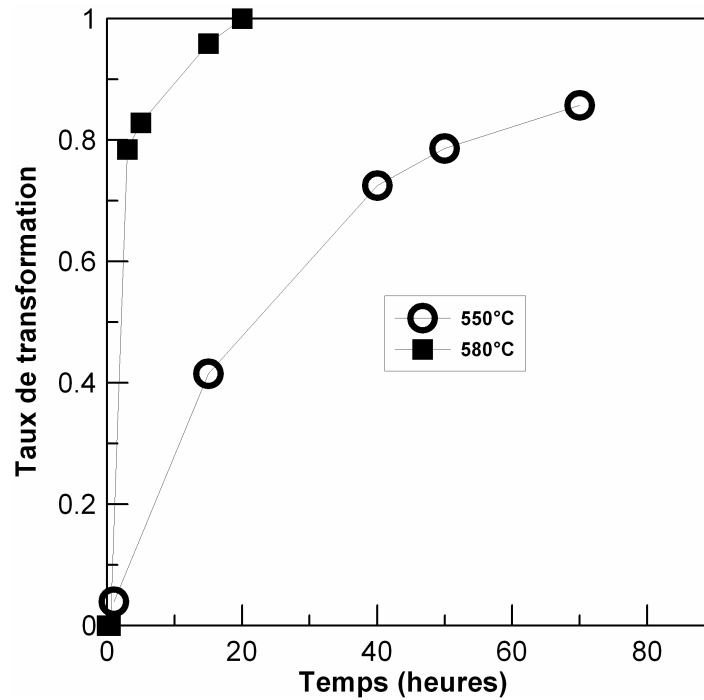


Figure C-46 : taux de transformation en fonction du temps à 550 et 580°C

La figure 46 montre qu'après 70h le bioverre traité à 550°C cristallise à 80% et semble atteindre un palier, tandis qu'à 580°C, 15 h suffisent pour atteindre 100% de la cristallinité possible. Ces résultats ont été analysés par l'équation de Mehl-Avrami-Johnson déjà utilisée dans le chapitre précédent. Cette loi s'applique bien à nos résultats pour les cinétiques à 550°C mais un faible écart est observé avec les résultats obtenus à 580°C. Les paramètres  $b$ ,  $X_0$  et l'exposant d'avrami  $n$  trouvés sont reporté sur le tableau 5.

	$b$	$n$	$X_0$
550°C	$1. 10^{-5}$	0,92	0,92
580°C	$4. 10^{-1}$	0,98	0,96

Tableau C-5 : Paramètres obtenus pour des cinétiques de cristallisation isothermes à 550 et 580°C par la loi de Mehl-Avrami-Johnson

On confirme le mécanisme de cristallisation identifié dans le chapitre précédent ( $n$  proche de 1).

Les résultats obtenus lors des cinétiques isothermes à 550 et 580°C permettent de compléter la courbe TTT mise au point dans le chapitre 2. (Figure 47).

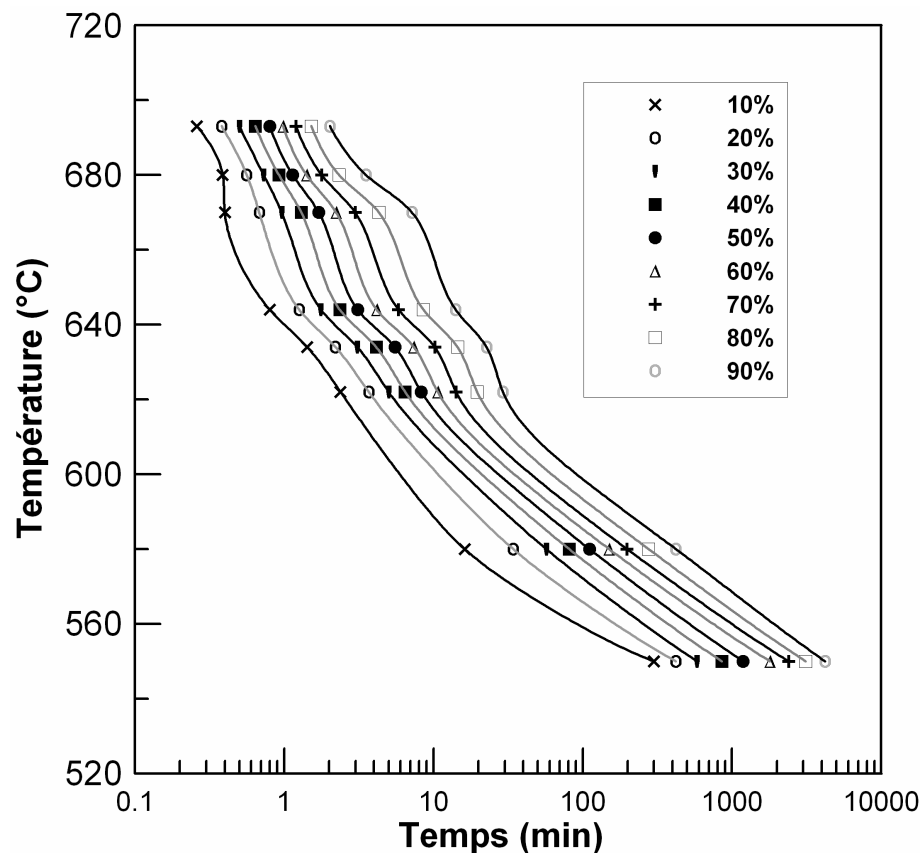


Figure C-47 : Courbe TTT finale

Les échantillons obtenus à 550°C ont une faible tenue mécanique, on voit donc qu'il est impossible de densifier correctement tout en évitant la cristallisation. Par contre, une phase amorphe plus importante que dans le cas des échantillons complètement cristallisés est présente. L'augmentation de vitesse de chauffe est donc une meilleure solution pour densifier un maximum avant la cristallisation.

### b) Cinétiques Isothermes du second stade

La figure 48 montre les résultats obtenus dans le cas de cinétiques isothermes effectuées entre 850°C et 920°C, températures comprises dans le second stade de retrait.

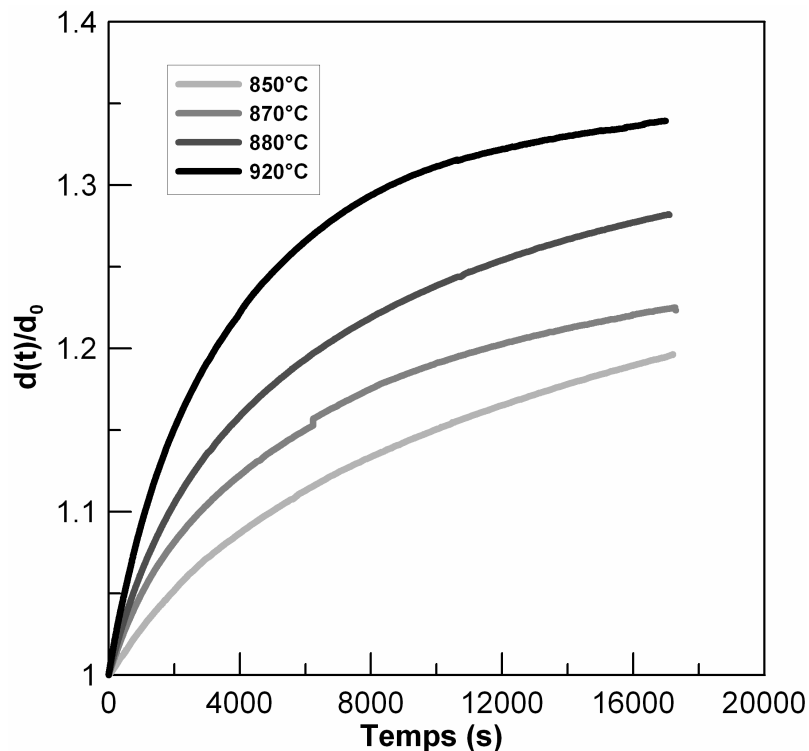


Figure C-48 : densité relative en fonction du temps pour différentes températures d'isothermes comprises dans le second stade de frittage (avec  $d_0$  la densité à la température d'isotherme à  $t=0$ ).

Comme dans le cas précédent, on observe que la vitesse de densification augmente avec la température. Ici, la forme des courbes montre une baisse de vitesse qui serait plutôt due à la disparition progressive de la microporosité dans les échantillons, donc à une diminution de la force motrice du frittage.

### C-3-V Propriétés mécanique en fonction du taux de densification

La figure 49 montre les résultats obtenus par essais brésiliens sur des compacts de poudres de bioverre traités thermiquement à 5°C/min. On observe qu'entre 600°C et 800°C,  $\sigma_R$  augmente faiblement alors qu'au dessus de 850°C, elle augmente significativement. Ces résultats sont compatibles avec les différentes étapes de densification vues précédemment.

A partir de 600°C, début de cristallisation, les particules de bioverre ont déjà subi une séparation de phase ayant pour effet de durcir leur surface. Le flux visqueux s'en trouve fortement diminué, voir stoppé. Nous avons vu précédemment que la cristallisation de  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  induisait un faible retrait. La faible augmentation de  $\sigma_R$  entre 600°C et 800°C serait donc due à la réorganisation du réseau vitreux entraînant sa densification. La porosité reste constante puisque le frittage est arrêté.

Entre 800°C et 1000°C, une seconde transition vitreuse apparaît qui donne lieu à une densification importante des compacts de poudre. Cette transformation permet de densifier quasi complètement les échantillons et donc d'augmenter significativement  $\sigma_R$ . Dans ce cas  $X_{cr}$  est constant et la porosité diminue.

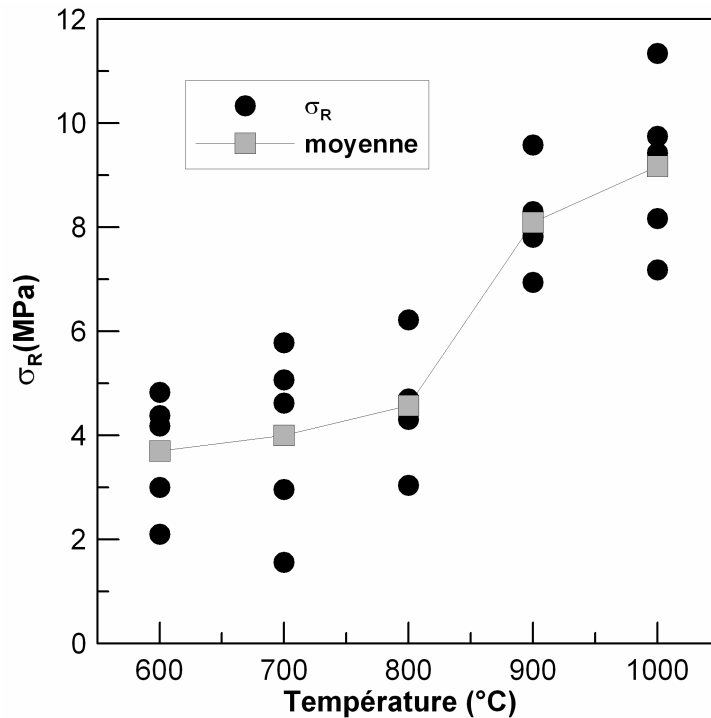


Figure C-49 : contrainte maximale à la rupture par traction ( $\sigma_R$ ) de compacts de poudre en fonction de la température

## Résumé de l'influence des transformations structurales de poudres de bioverre sur leur frittabilité.

Les différentes observations réalisées sur les compacts de poudre de bioverre couplées aux transformations identifiées dans le chapitre précédent nous permettent de proposer un scénario possible explicitant l'influence des transformations structurales sur le comportement au frittage du matériau.

Le processus de frittage du bioverre 45S5 est composé de trois principales étapes: une densification rapide au dessus de 550°C ( $T_{g1}$ ), puis un plateau de 610°C ( $T_{c1}$ ) à 850°C ( $T_{gapp}$ ), suivi par une seconde densification importante au dessus de 850°C. C'est pourquoi, la densification par un mécanisme de frittage est significative entre  $T_{g1}$  et  $T_{c1}$  et après  $T_{g2}$ . Dans le bioverre 45S5, comme dans une large variété de systèmes vitreux, le procédé physique qui contrôle les cinétiques de densification d'échantillons de verre poreux en réduisant leur surface sont bien connus. En effet, l'énergie de surface des particules est la force motrice tandis que le flux visqueux créé au passage de la transition vitreuse du verre gère la cinétique de frittage [12].

La première densification se déroule après la première transition vitreuse, lorsque la viscosité du verre est suffisamment basse pour permettre le frittage par flux visqueux. Les particules commencent à se relier par des cous.

A  $T_s=570^\circ\text{C}$ , le verre subit une séparation de phase qui engendre deux phases vitreuses, l'une riche en silice et l'autre en phosphore. Cela signifie que le verre n'est plus homogène mais

est constitué de deux phases immiscibles. La viscosité d'un verre constitué de silice et d'autres formateurs de réseaux après une séparation de phase est généralement plus élevée que celle d'un verre homogène de même composition, à cause de la viscosité élevée de la phase riche en silice qui domine le comportement du flux visqueux[18]. Ceci est en accord avec la baisse de vitesse de densification observée sur la dérivée de la courbe dilatométrique d'un compact de poudre de bioverre et les observations ESEM effectuées au chapitre précédent, qui montrent que l'arrondissement des particules qui commence à  $T_g=550^\circ\text{C}$  paraît diminuer vers  $T_s=570^\circ\text{C}$ , indiquant une baisse de mobilité dans le matériau.

A  $T_{c1} = 610^\circ\text{C}$ , une cristallisation partielle du matériau a lieu à partir de la surface des particules [19-20]. La formation de domaines riches en phosphate lors de la séparation de phase vitreuse pourrait avoir un effet catalytique sur la nucléation de la phase principale en baissant l'énergie nécessaire à la nucléation de germes riches en silice (les surfaces des domaines riches en phosphate jouent le rôle de sites de germination hétérogène). L'apparition de la phase  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  arrête rapidement le flux visqueux en bloquant la surface des particules. Ceci est mis en évidence par l'observation MEB de poudres traitées à  $800^\circ\text{C}$ , dans le chapitre précédent, où un anneau cristallisé est observé à la surface des particules.

De plus, la première étape de densification est dépendante de la vitesse de chauffe. L'augmentation du retrait linéaire avec la vitesse de chauffe peut être expliquée par le fait que plus la vitesse de chauffe augmente, plus l'écart entre  $T_g$  et  $T_s$  augmente. La densification du matériau se produit donc sur un domaine de température plus étendu.

La modélisation des résultats a permis de mettre en place un nouveau modèle qui devrait s'appliquer aux verres ayant les mêmes transformations que le bioverre 45S5. Ce modèle nous a permis de connaître plus précisément l'effet de la séparation de phase et son mécanisme. Une énergie d'activation du flux visqueux en a été déduite. On trouve  $Q_{\text{vis}} = 750 \pm 100 \text{ kJ/mol}$ . L'énergie d'activation de la cristallisation étant de  $Q_{\text{crist}} = 280 \text{ kJ/mol}$ , on en conclut que le phénomène de cristallisation est moins dépendant de la température que la viscosité du verre.

A  $T_{g2} = 850^\circ\text{C}$ , une seconde étape de densification de compact de poudre de bioverre est observée. Nous avons mis en évidence que la seconde transition vitreuse du verre restant commençait plutôt vers  $750^\circ\text{C}$ . On pense que la phase vitreuse, piégée à l'intérieur du grain, remonte à la surface soit par l'action de la température et l'augmentation de pression interne, soit par mûrissement d'Ostwald accompagnée par une migration vers la surface, soit par capillarité.



---

## REFERENCES DU CHAPITRE 3 PARTIE C

- 1- MO Prado, ED Zanotto. CR chimie 5 (2002) 773-786 (a changer)
- 2- Exner HE., Giess EA. Anisotropic shrinkage of cordierite type glass powder cylindrical compacts. Journal of Material Research, 1998, vol. 3, pp. 122-125.
- 3- AR Bocaccini, Shrinkage anisotropy of glass powder compacts sintered in dilatometers, Journal of Material Research, 1998, vol.13, pp. 1693-1697.
- 4- GW Scherer. Sintering of sol-gel films. Journal of Sol-gel Science Technology, 1997, vol. 8, pp. 353-363
- 5- Muller R., Zanatto ED., Fokin VM. Surface crystallization of silicate glasses: nucleation sites and kinetics. Journal of Non Crystalline Solids, 2000, vol. 274, n° 1-3, pp. 208-231.
- 6- R Muller, M Kirch, H Lorenz, Proc. XVth Congress on glass, Leningrad, Vol.3, 1989, p334
- 7- ED Zanotto, MO Prado. Model for sintering polydispersed glass particles. Phys. Chem. Glasses, 2001, vol. 42, n° 3, pp. 191-198
- 8- J. Zarzycky, Advances ceramics, Vol.4, Am. Ceram. Soc., Columbus, OH, 1982, p204-216
- 9- GW Scherer, Journal of Sol-gel Science Technology 8 (1997) 353 (c'est la ref 4- a changer)
- 10- A Karamanov, L. Arriza, I Matekovits, M pelino, ceram int 30 (2004) 2119 et DU Tulyaganov, S Agathopoulos, JM Ventura, MA Karakassides, O Fabrichnaya, JMF Ferreira, J. Eur. Ceram. Soc. (in press)
- 11- modèle flux visqueux dans littérature
- 12- MO Prado, ED Zanotto. CR chimie 5 (2002) 773-786
- 13- Frenkel J. Viscous flow of crystalline bodies under the action of surface tension. J. Phys. (USSR), 1945, vol. IX, n° 5, pp. 385-391.
- 14- Lefebvre L., J. Chevalier, L. Gremillard, R. Zenati, G. Thollet, Bernache-Assolant D., Govin A. Structural transformation of bioactive glass 45S5 with thermal treatments. Acta Matee. (2007), doi: 10.1016/j.actamat.2007.01.029
- 15- Doremus RH. Melt Viscosities of silicate glasses. American Ceramic Society Bulletin, 2003, Vol. 82, n°3, pp..
- 16- Prado MO., Fredericci Catia, Zanotto ED. Non-isothermal sintering with concurrent crystallization of polydispersed soda-lime-silica glass beads. Journal of Non Crystalline Solids, 2003, vol. 331, issues 1-3, pp 157-167. (vérifier
- 17- AR Bocaccini, W Stumpfe, DM Rtaplin, CM Ponton. Densification and crystallization of glass powder compacts during constant heating rate sintering. Mater. Sci. Eng., 1996, vol A 219, pp. 26-31.

18- H. Rawson. Inorganic glass forming systems. New York:Academic Press; 1967, p11

19- A. Clifford, R. Hill, A. Rafferty, P. Mooney, D. Wood, B. Samunera et al. J. Mater. Sci. Mater. Med. (2001) 12, p 461-469.

20- A.Costantini, R. Fresa, A. Buri, F. Branda. Devitrification behavior of  $\text{CaO} \cdot 0,1\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 0,9\text{SiO}_2$  glass. Thermochem. Acta, 1996, vol. 280/281, pp. 237-242.

---

## Chapitre C - 4 : Elaboration de blocs poreux

C-4-I	Mise en suspension des poudres.....	126
1)	Optimisation des conditions de dispersion des poudres de bioverre.....	127
a)	Choix du milieu.....	127
b)	Optimisation de la quantité de dispersant .....	129
c)	Influence du taux de matière sèche .....	130
d)	Optimisation du pH des suspensions dans l'eau .....	131
e)	Influence du temps d'homogénéisation.....	132
f)	Comportement des barbotines.....	132
C-4-II	Elaboration de blocs poreux .....	133
1)	Imprégnation de mousses .....	133
a)	Choix du type de mousse et Imprégnation .....	133
b)	Cycle de déliantage .....	135
c)	Cycle de frittage .....	136
d)	Caractérisation des poreux et optimisation du procédé d'imprégnation .....	137
e)	Optimisation de la formulation des barbotines .....	140
f)	Double imprégnation.....	143
g)	Combinaison gel casting et imprégnation de mousse .....	145
2)	Utilisation de billes de PMMA comme porogènes .....	145
a)	Par mélange .....	145
b)	Par imprégnation de préformes .....	146
3)	Freeze casting .....	148
4)	Résumé et conclusion.....	149

---

D'après les études réalisées précédemment, il nous est désormais possible de contrôler l'état et la structure du bioverre 45S5 (transformation, frittage) à une température donnée. Dans ce chapitre, nous allons passer à la mise en œuvre des différents procédés d'élaboration de blocs poreux exposés dans la partie B. Nous exposerons les avantages et les limites de chacun d'eux. Préalablement, une étape de mise en suspension des poudres est indispensable.

---

### C-4-I Mise en suspension des poudres

La dispersion de poudres dans une barbotine, pour la réalisation de pièces crues est une technique souvent utilisée dans le domaine des céramiques. Une barbotine de coulage est une

suspension contenant à la fois de la poudre, un milieu liquide et des adjuvants de dispersion. Bien que la porosité puisse être introduite dans un verre par bullage, nous appliquerons la technique de la mise en barbotine à l'élaboration de blocs poreux à base de bioverre car elle présente l'avantage d'utiliser des particules très petites et donc plus réactives chimiquement que le verre dense.

L'ajout d'un additif adapté (dispersant) permet de contrôler l'équilibre entre les forces attractives et répulsives existant entre les particules pour obtenir globalement une répulsion des particules. L'additif s'adsorbe directement à leur surface changeant ainsi leurs caractéristiques. La répulsion créée par le dispersant peut être de nature stérique et/ou électrostatique.

Pour pouvoir être utilisée dans l'élaboration de blocs poreux la barbotine doit :

- être coulable, c'est-à-dire que la barbotine doit avoir une viscosité inférieure à environ 60 Pa.s.
- être bien dispersée, c'est-à-dire être exempte d'agglomérats.
- être concentrée, c'est-à-dire que le pourcentage de matière sèche doit être le plus élevée possible
- ne pas comporter d'adjuvants nocifs incompatibles avec une application *in vitro* et/ou *in vivo* après traitement thermique
- Conduire à des crus possédant une résistance mécanique élevée et une densité à cru élevée, conditions nécessaires à de bonnes propriétés lors du frittage.

Pour satisfaire ces différents critères, une étape d'optimisation est nécessaire. Ce sera l'objet de cette étude. On mettra notamment en évidence les effets du type de milieu, du pH, du temps d'homogénéisation, du taux de dispersant et de matière sèche.

---

### 1) *Optimisation des conditions de dispersion des poudres de bioverre*

Les poudres utilisées ont une granulométrie centrée sur 1,6  $\mu\text{m}$ . L'homogénéisation a été faite avec un broyeur à boulet, méthode utilisée en routine pour désagglomérer les poudres.

#### a) **Choix du milieu**

Deux types de milieux ont été utilisés, l'eau et l'éthanol. Le premier présente l'avantage d'être disponible facilement et d'être écologique. Cependant, le bioverre en milieu aqueux se dissout et crée ainsi des charges à la surface des particules et un milieu basique. Cette dissolution interdit la mise en suspension de plus de 55% massique de poudre dans la solution. Au dessus de ce pourcentage, on obtient une pâte non dispersée. Pour palier cet inconvénient et augmenter le taux de matière sèche, nous avons également testé des dispersions dans l'éthanol. Ce milieu présente l'avantage de ne pas induire de dissolution du bioverre et d'être facilement disponible.

#### b) **Optimisation de la quantité de dispersant**

##### - Dans l'eau

La dispersion des poudres de bioverre dans l'eau a été réalisée par ajout d'un dispersant, le Darvan C. Celui-ci, de part sa structure (figure 50) à la propriétés d'agir de manière électrostatique et électrostérique.

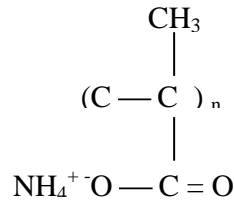


Figure C-50: Structure du Darvan C

L'adsorption du Darvan C sur la surface des particules de bioverre s'accompagne d'une création d'ammoniaque.

La figure 51 montre la viscosité des barbotines en fonction du pourcentage de dispersant à taux de matière sèche constant (30%). La courbe obtenue passe par un minimum correspondant à un ajout de 0,5% en masse de dispersant, soit  $8,3 \cdot 10^{-3} \text{ g/m}^2$ . C'est donc à cette valeur que la dispersion est idéale dans les conditions de l'essai. Il est cependant important de noter que les valeurs de viscosité avec et sans dispersant sont peu différentes pour de faible taux de matière sèche. L'écart devrait s'accroître lorsqu'on augmente ce taux. La forte hausse de viscosité au-dessus de 0,5% en masse de Darvan C est probablement due aux effets stériques et de charges induits par les molécules de dispersant qui ne réagissent pas avec les grains de poudre de bioverre.

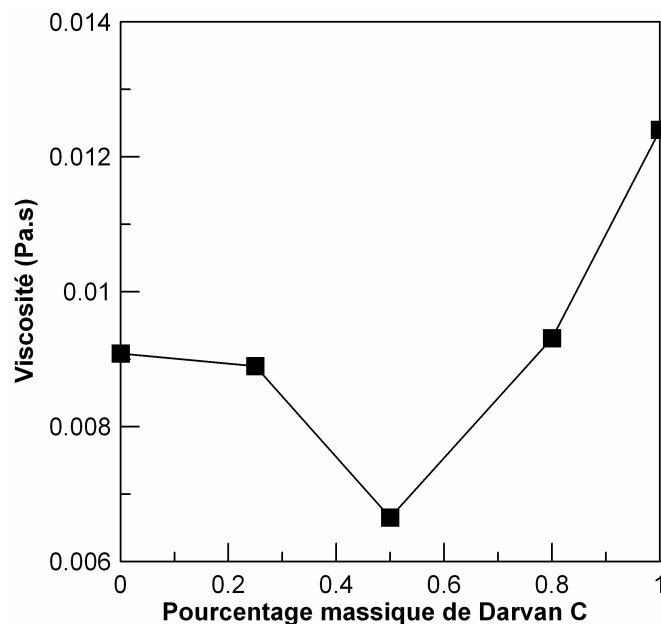


Figure C-51 : Viscosité des suspensions de bioverre en fonction du pourcentage massique de dispersant à  $208 \text{ s}^{-1}$ .

- Dans l'éthanol

La dispersion des poudres de bioverre dans l'éthanol a été réalisée par ajout de Beycostat C213. Ce type de dispersant permet de stabiliser efficacement beaucoup de poudres céramiques dans l'éthanol. C'est un ester phosphorique composé à 50% d'un monoester et à 50% d'un diester. Celui-ci, de part sa structure (figure 52) à la propriétés d'agir par combinaison de répulsions électrostatique et stérique. Les chaînes moléculaires viennent s'adsorber à la surface des particules, développant une charge de surface (répulsion électrostatique) et s'étendant dans le solvant peu polaire (répulsion stérique).

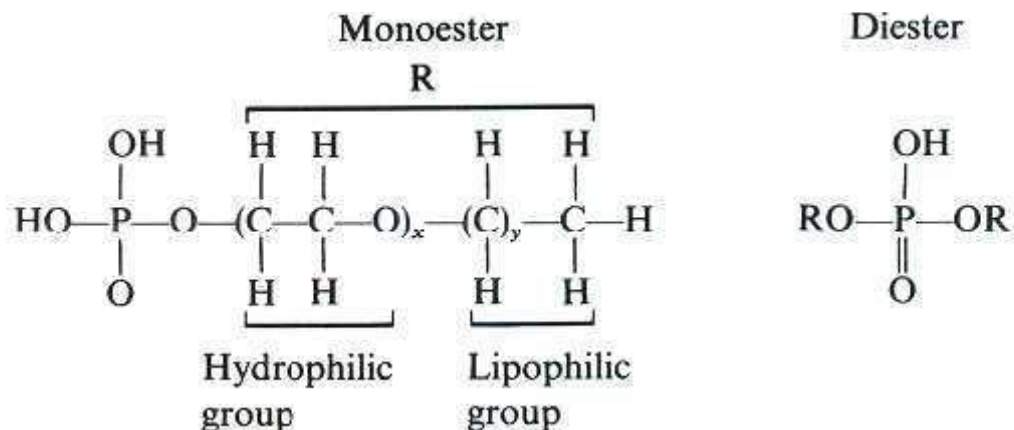


Figure C-52 : Structure du Beycostat C213

La figure 53 montre la viscosité des barbotines dans l'éthanol en fonction du pourcentage de dispersant à taux de matière sèche constant (50%). La courbe obtenue passe par un minimum correspondant à un ajout de 1,7 % en masse de Beycostat C213, soit  $2,8 \cdot 10^{-2} \text{ g/m}^2$ . C'est donc à cette valeur que la dispersion dans l'éthanol est idéale dans les conditions de l'essai. Pour des taux de beycostat C213 plus élevée, la viscosité ne s'écarte que très peu de celle observée à 1,7% en masse.

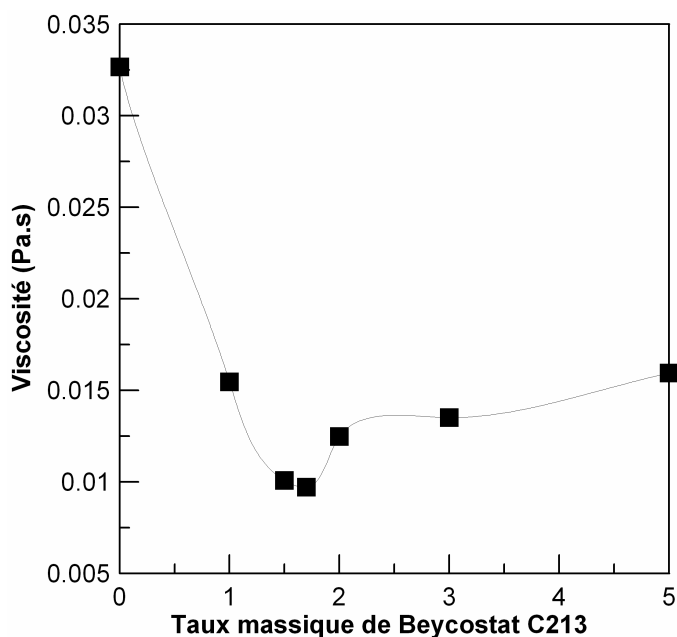


Figure C-53 : Viscosité des suspensions de bioverre dans l'éthanol en fonction du pourcentage massique de dispersant à  $208 \text{ s}^{-1}$

**c) Influence du taux de matière sèche**

La figure 54 montre l'influence du pourcentage de matière sèche sur la viscosité des barbotines contenant 0,5% massique de Darvan C dans l'eau et 1,7% de beycostat C213 dans l'éthanol. Dans les deux cas, la viscosité augmente avec le taux de poudre introduit. Avec des taux

supérieurs à 55% en masse de matière sèche les suspensions obtenues dans l'eau sont trop visqueuses pour les mesurer avec le dispositif utilisé.

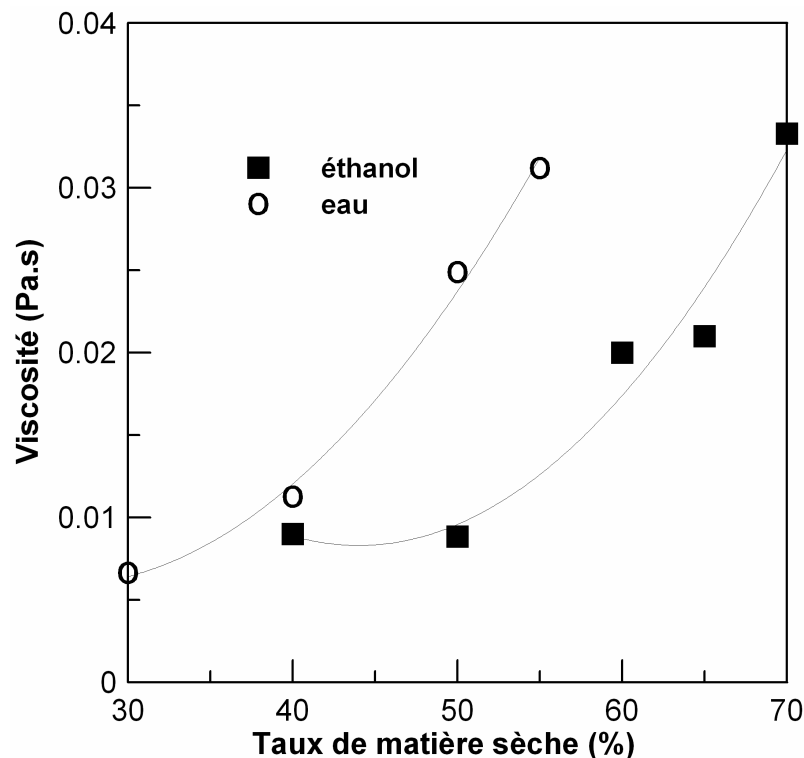


Figure C-54 : Influence du taux massique de matière sèche sur la viscosité d'une barbotine de bioverre avec 0,5% massique de darvan C dans l'eau et 1,7% massique de Beycostat C213 dans l'éthanol

La viscosité des barbotines à 55% de matière sèche dans l'eau est supérieure à celle observée à 65% de matière sèche dans l'éthanol. Il est donc possible d'augmenter le taux de matière sèche des suspensions en utilisant de l'éthanol.

### d) Optimisation du pH des suspensions dans l'eau

L'optimisation du pH des suspensions a été réalisée par mesure de potentiel zeta. Les suspensions, de pH naturel 13,5, ont été acidifiées avec de l'acide nitrique jusqu'à un pH de 8. Les mesures sont effectuées juste après acidification.

La figure 55 montre la variation de potentiel zeta avec le pH des suspensions de bioverre. Le point isoélectrique est identifié dans un domaine de pH compris entre 8,7 et 9,15. La valeur de potentiel zeta la plus élevée en valeur absolue détermine le pH où la dispersion est de meilleure qualité. Ici on trouve un pH de 9,25. Expérimentalement, on remarque que la viscosité des suspensions à pH 9,25 est inférieure à celle non acidifiée. Cependant, la courbe obtenue n'est pas courante et pourrait être due au caractère instable de notre matériau. En effet, le potentiel zéta après le point isoélectrique devrait augmenter et non pas stagner.

Les pH inférieurs à 8 n'ont pas été étudiés à cause de la dissolution du bioverre qui rend ces barbotines difficiles à mettre en œuvre. En effet, les suspensions de poudre de bioverre tendent à revenir continuellement à leur pH d'équilibre qui dépend de leur concentration.

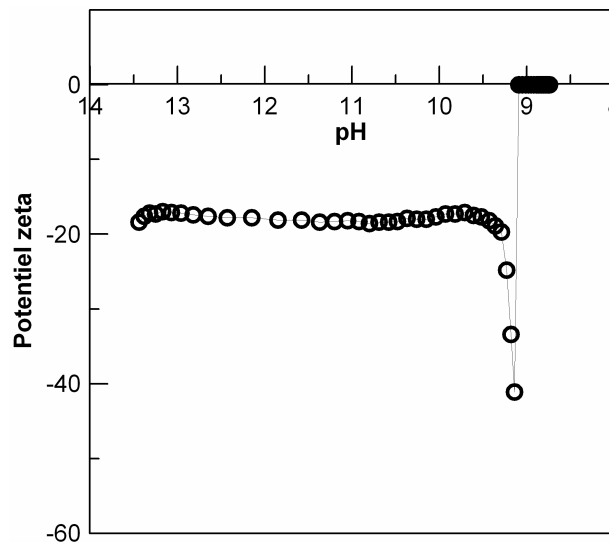


Figure C-55 : Potentiel zeta en fonction du pH obtenue par titrage avec de l'acide nitrique d'une suspension à 35% de matière sèche et avec dispersant

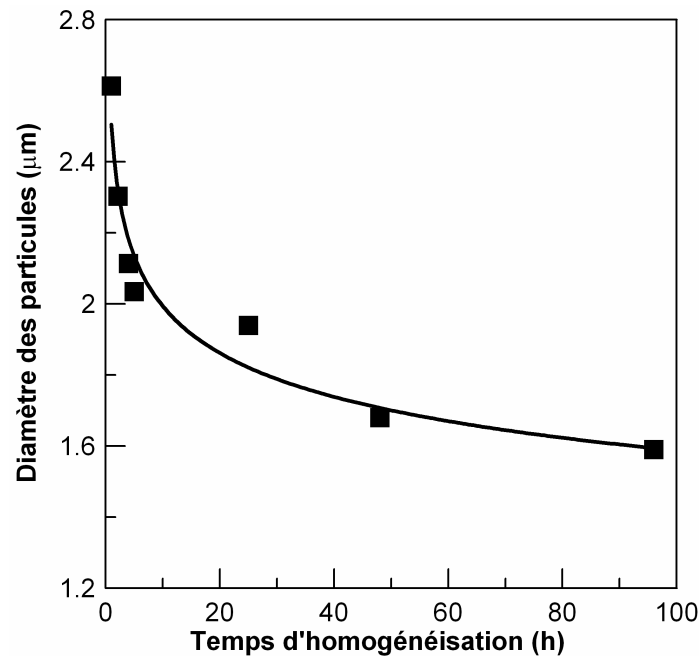
Expérimentalement, pour mettre en œuvre ces résultats lors de la réalisation d'une barbotine et tenant compte de la dissolution du bioverre, nous avons tenté dans un premier temps d'ajuster le pH de l'eau de départ à pH neutre ( $\text{pH} = 7$ ) et pH acide ( $\text{pH} = 3$ ). Après mélange avec la poudre (55% massique de poudre) et 4h d'agitation, le pH est égale à 12,5 dans les deux cas et les mesures granulométriques effectuées montrent qu'il y a agglomération puisqu'on trouve un  $D(0,5)$  de 3,3 microns. La barbotine sans acidification est donc mieux dispersée. Nous en avons déduit qu'il fallait que les poudres aient subi un certain degré de dissolution avant que la barbotine soit acidifiée. Après 6h d'agitation d'une barbotine constituée d'eau, de darvan C et de poudre nous avons alors ajusté le pH à 8,5. Après 2h d'homogénéisation additionnelle, le pH est remonté spontanément à 9,25. Il est donc impossible d'obtenir des barbotines stables dans le temps à pH inférieur à 9

### e) Influence du temps d'homogénéisation

La figure 56 montre l'évolution de la granulométrie des poudres en fonction du temps d'homogénéisation dans l'eau, à 55% de matière sèche, et en présence de 0,5% de Darvan C. Des billes en agate de 0,5 cm de diamètre ont été utilisées avec un rapport  $\text{mb}/\text{mp} = 5$ .

On retrouve la granulométrie de départ ( $1,6 \mu\text{m}$ ) après 96h d'homogénéisation mais la barbotine semble très visqueuse. On remarque expérimentalement qu'après 10h d'homogénéisation, la barbotine devient plus visqueuse. Ce phénomène est certainement dû à la formation de HAC sur les particules bioverre. Il est possible également qu'il y ait évaporation du milieu. La dissolution des poudres devrait amplifier la diminution de taille observée. Pour la suite de l'étude, un temps d'homogénéisation de 6h a été choisi pour ne pas altérer de façon trop importante la structure du matériau et sa composition.





FigureC-56: D(0,5) des poudres en fonction du temps d'homogénéisation au tourne jarre

**f) Comportement des barbotines**

Les barbotines réalisées dans l'eau et dans l'éthanol ont un comportement rhéofluidifiant (figure 57) c'est-à-dire que ce sont des liquides pour lesquels la contrainte de cisaillement n'est pas proportionnelle à la vitesse de déformation. Leur viscosité diminue lorsque la vitesse de déformation augmente. Ce genre de fluide peuvent être décrit par une loi de puissance dite loi d'Ostwald :  $\tau = KD^n$  avec  $n < 1$ . Le tableau 6 récapitule les valeurs de K, n et du coefficient de corrélation obtenu pour ces deux types de barbotines. On trouve bien un n inférieur à 1 qui indique d'après la loi de Herschel Bulkley que le comportement des barbotines est rhéofluidifiant.

	Dans l'eau avec 0,5 % de darvan C	Dans l'éthanol avec 1,5% de beycostat C213
K	0,034	0,07
n	0,73	0,66
R	0,998	0,995

Tableau C-6 : paramètres obtenus par application de la loi Ostwald

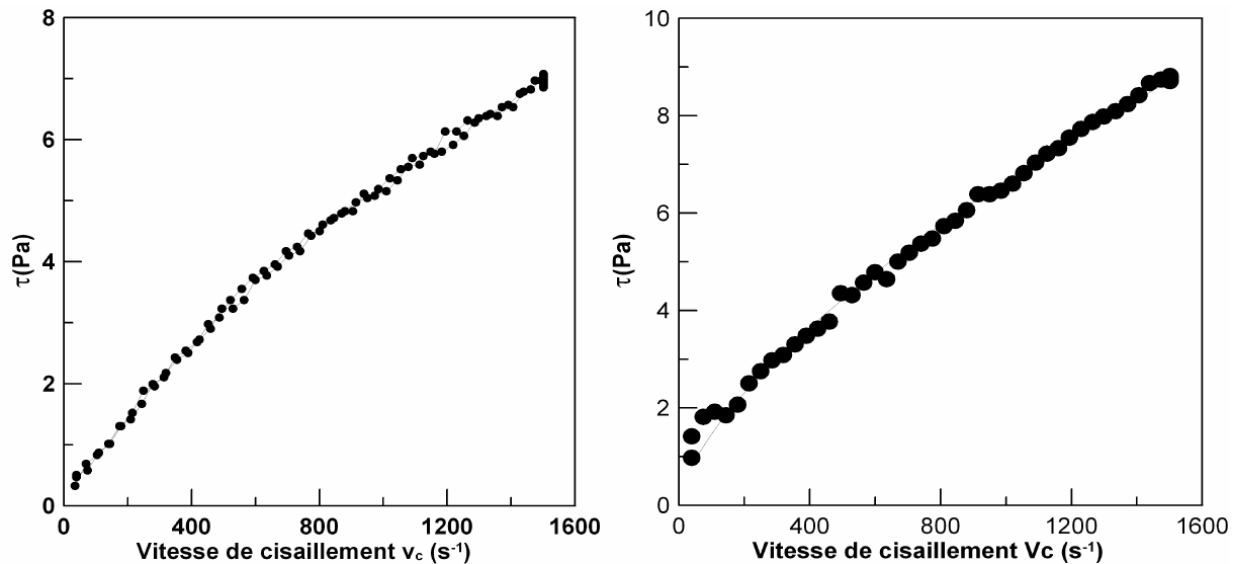


Figure C-57 : Contrainte en fonction de la vitesse de cisaillement pour une suspension avec ajout de (gauche) 0,5% de Darvan C dans l'eau (droite) 1,5% de beycostat dans l'éthanol

Ce type de comportement sera mis à profit lors de la mise en forme de blocs poreux à base de bioverre.

---

## C-4-II Elaboration de blocs poreux

---

### 1) Imprégnation de mousses

#### a) *Choix du type de mousse et Imprégnation*

Deux types de mousses ont été sélectionnés (figure 58) à base de mélamine et de polyuréthane. Nous allons examiner les principaux critères retenus pour notre choix qui sont la taille des cellules et leur reproductibilité, les possibilités d'adaptation du procédé en terme de taille de pores et, enfin l'homogénéité des poreux obtenus.

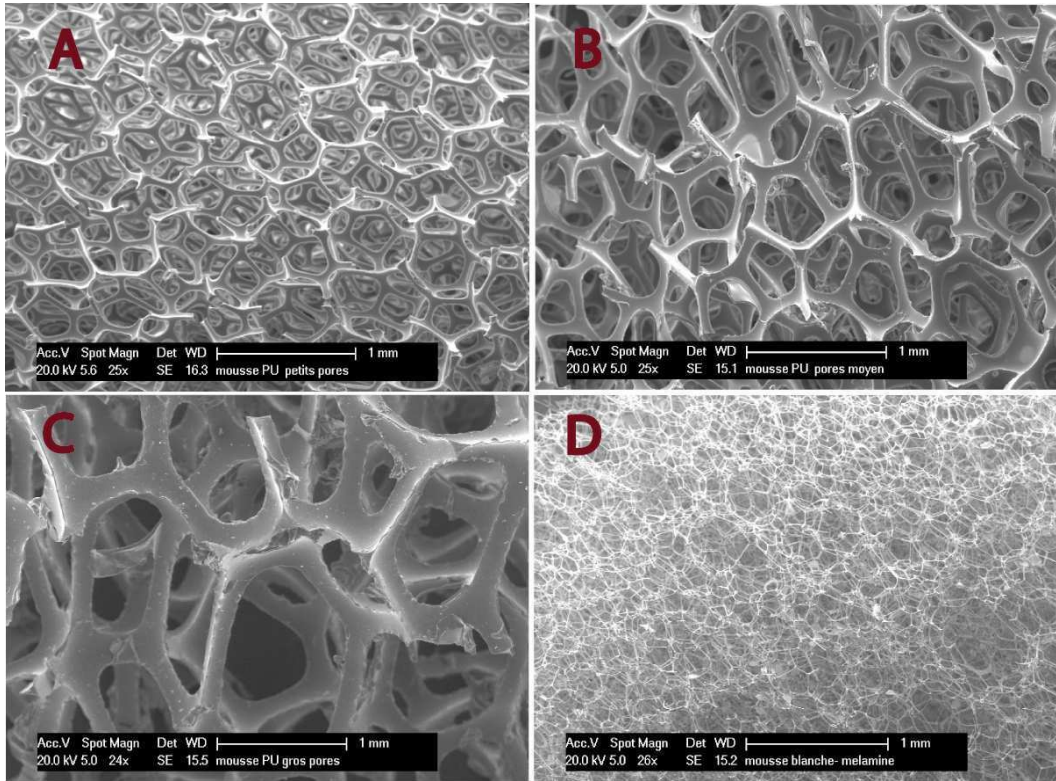


Figure C-58 : A, B et C :mousses polyuréthane respectivement à gros (GP), moyen (MP) et petits pores (PP) ; D : mousse de mélamine

La forme particulière des cellules constituant un réseau polymérique d'une mousse a été étudiée par Gibson et Ashby [2]. Chaque cellule peut être schématisée par une entité géométrique de base, le tétrakaïdécaèdre (figure 59). Cette modélisation de la cellule unité du réseau organique est celle privilégiée dans la majorité des études puisqu'elle permet de relier la structure physique des mousses à leurs propriétés physicochimiques et mécaniques [3]

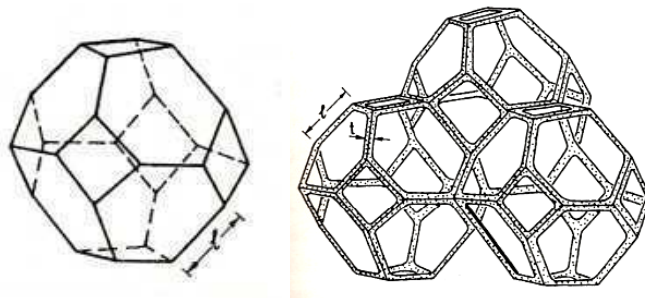


Figure 59 : modèle de cellule unité des mousses polymérique et de leur agencement d'après Gibson et Ashby [2]

Le tétrakaïdécaèdre est une figure géométrique contenant 8 hexagones de côté  $l$  et 6 carrés, soit un nombre total de faces égale à 14. Les trabécules constitutives de ce réseau présentent une largeur  $t$  et serait creuses en leur centre. La densité relative d'un agrégat de cellules de ce type peut être déduit de l'expression [2] :

$$\frac{\rho^*}{\rho} = 1,18 \frac{t}{l} \quad \text{Eq C-13}$$

## Elaboration de blocs poreux

Avec  $\rho^*$  la densité de la mousse,  $\rho$  la densité absolue du matériau constitutif de la mousse,  $t$  la largeur des trabécules et  $l$  la longueur des côtés des hexagones.

L'analyse des clichés microscopique a permis de caractériser la morphologie de chaque mousse en fonction de sa porosité. Les résultats sont reportés sur le tableau 7.

Type et porosité	Taille moyenne des trabécules du réseau ( $\mu\text{m}$ )	Taille moyenne des pores ( $\mu\text{m}$ )	Densité relative calculée
Mélamine	$6 \pm 5$	$120 \pm 47$	0,07
PU PP	$52 \pm 13$	$316 \pm 37$	0,23
PU MP	$81 \pm 20$ ,	$457 \pm 130$	0,19
PU GP	$169 \pm 36$	$971 \pm 378$	0,16

Tableau C-7 : caractéristiques des mousses de départ obtenues par analyse d'image

Ces mousses ont été imprégnées par immersion dans une barbotine à 55% de matière sèche et contenant de l'eau et 0,5% de Darvan C. L'eau a été choisie comme milieu de dispersion car la viscosité de ce type de barbotine est supérieure à celle contenant de l'éthanol après 24h d'homogénéisation. Pour cette application, il est indispensable d'avoir une suspension pas trop fluide pour quelle puisse adhérer aux parois de la mousse. L'excès de suspension a été retiré en pressant les mousses à la main. Nous avons utilisé pour cette étude le taux maximum de poudre possible afin que la barbotine de bioverre soit bien dispersée et qu'elle se dépose le plus possible sur les parois. Le comportement rhéofluidifiant est ici intéressant : la faible viscosité de la barbotine lors de la déformation lui permet de circuler facilement dans la mousse lors des étapes d'immersion et d'évacuation du surplus. De plus, la viscosité plus importante au repos lui permet de ne pas trop couler le long des trabécules lors du séchage.

### b) Cycle de déliantage

Le cycle de déliantage a été déterminé par l'analyse thermogravimétrique des deux mousses (figure 60). Les zones d'intérêt sont celles où la perte de masse est la plus rapide. Le contrôle du déliantage est crucial pour l'intégrité des poreux. L'utilisation d'un mauvais cycle induirait une forte fissuration des échantillons due à un départ trop rapide du polymère.

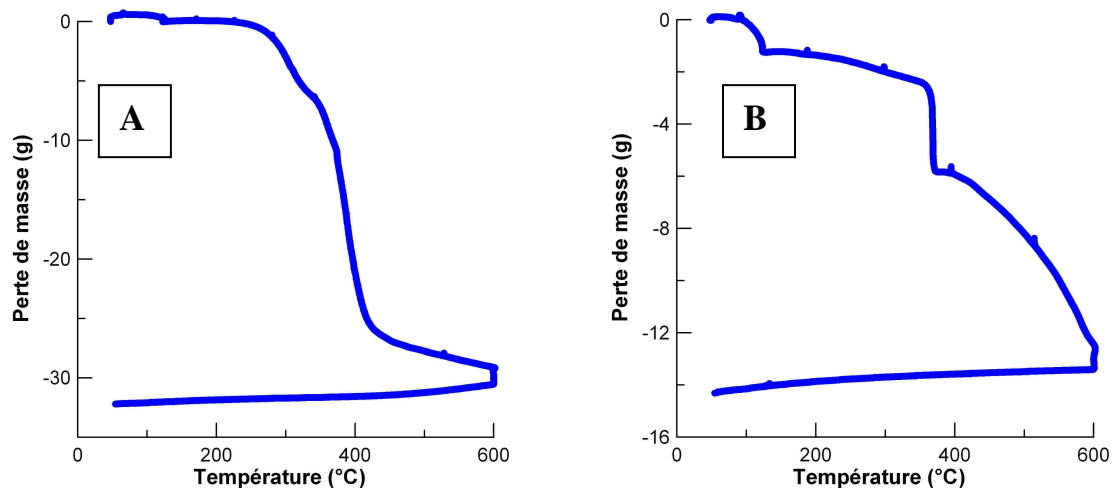
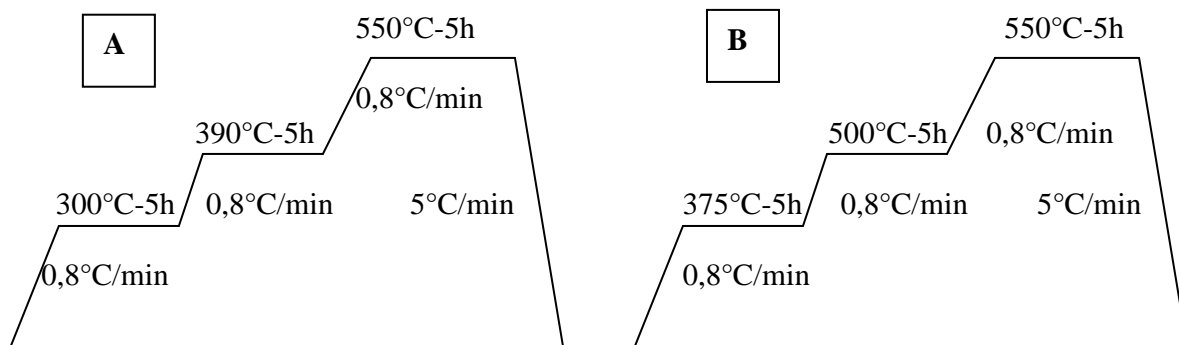


Figure C-60 : Thermogramme d'une mousse de polyuréthane (A) et d'une mousse de mélamine (B)

Les cycles utilisés pour la mousse de polyuréthane et de mélamine sont présentés sur la figure 61.



Outre le cycle utilisé, le passage du bioverre 45S5 par sa température de transition vitreuse vers la fin des cycles de déliantage, permet de maintenir une certaine cohésion des poreux. Malgré tout, après déliantage ceux-ci présentent une faible tenue mécanique.

### c) Cycle de frittage

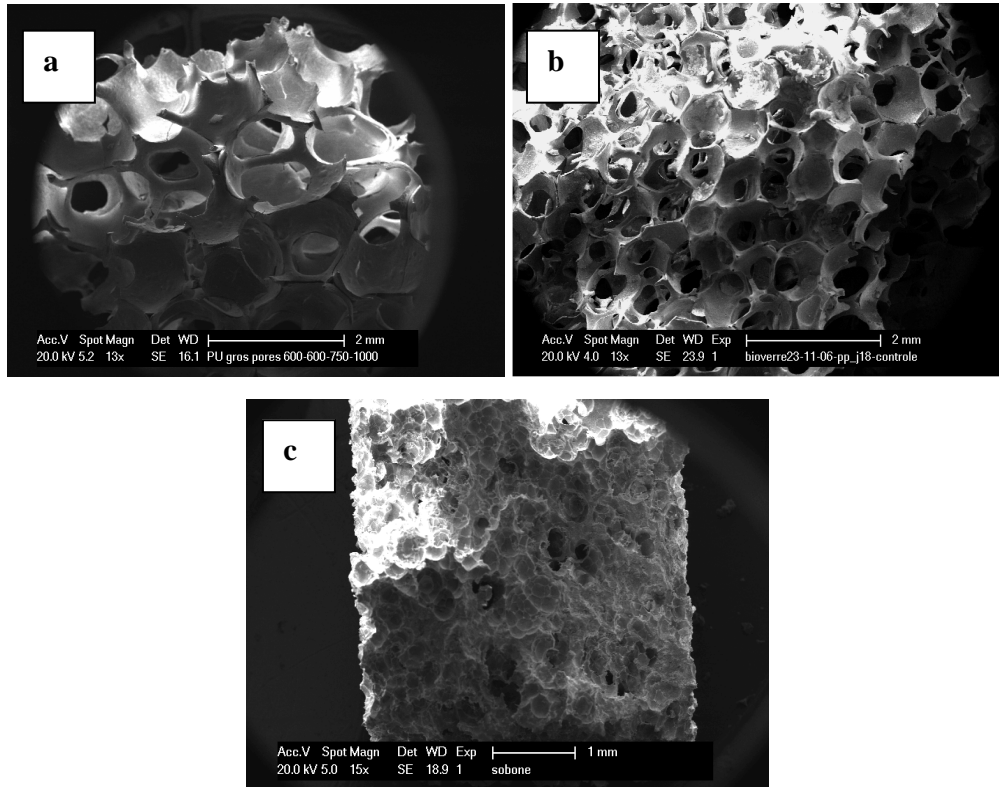
L'étude réalisée précédemment sur le frittage de compacts de poudre de bioverre montre que ce processus est composé de plusieurs étapes qui sont reliées aux transformations structurales subies par le matériau lors de ces traitements thermiques. Juste après la première température de transition vitreuse, la viscosité est suffisamment basse pour que les échantillons entament leur première étape de densification. Ce frittage se fait par flux visqueux et son intensité est dépendante de la vitesse de chauffe. Plus on va vite et plus on densifie. Puis, au passage de la température de séparation de phase, la vitesse de densification diminue jusqu'à la température de cristallisation de la phase principale. A cette température, la densification due au flux visqueux s'arrête et on observe un retrait dû à la cristallisation en volume. Lorsque la phase cristalline principale est entièrement formée, un palier de densification est observé jusqu'à la température de seconde transition vitreuse. Au passage de cette transformation, un troisième retrait apparaît. Celui-ci permet de densifier complètement le matériau. A haute température, plus la vitesse de chauffe est basse et plus le matériau devient dense à une température donnée.

Le cycle de déliantage utilisé pour la pyrolyse des mousses prévoit des températures allant jusqu'à 550°C à 0,8°C/min et est composé de trois paliers de 5h aux températures de maximum de perte de masse du polymère. Ce cycle de déliantage est donc incompatible avec une densification correcte sans cristallisation puisque, d'une part, on a vu qu'il fallait chauffer rapidement pour augmenter la première densification et que, d'autre part, comme il a été vu précédemment sur les cinétiques isothermes de frittage, un palier de 5h à 550°C entraînait une cristallisation.

Les échantillons obtenus après déliantage présentant une faible tenue mécanique, un autre traitement thermique paraissait indispensable. Nous avons donc fritté les échantillons à 1°C/min jusqu'à 1000°C.

*d) Caractérisation des poreux et optimisation du procédé d'imprégnation*

La figure 62 montre les poreux obtenus par imprégnation de mousse de polyuréthane et de mélamine.



**Figure C-62 : poreux obtenus par imprégnation de mousses de (a) polyuréthane gros pores (b) polyuréthane petits pores (c) mélamine**

Les poreux obtenus par imprégnation de mousses de mélamine présentent une forte hétérogénéité en volume, et beaucoup de pores sont totalement bouchés tandis que ceux obtenus par imprégnation de mousses de polyuréthane présentent une structure fortement interconnectée et plus homogène. Les différences observées proviennent des propriétés d'absorption de la barbotine qui sont plus élevées pour les mousses de mélamines que pour celle de polyuréthane. Les mousses de mélamine retiennent plus la barbotine. Nous avons donc choisi d'utiliser pour le reste de l'étude des mousses de polyuréthane qui présentent également l'avantage d'être disponibles en différentes tailles de pores permettant d'adapter les implants au site osseux auquel il est destiné.

La figure 63 montre les matériaux poreux obtenus après frittage à 1000°C à partir de mousses de polyuréthane de petits et gros pores.

## Elaboration de blocs poreux



Figure C-63 : poreux obtenus par imprégnation de mousse polyuréthane à petit pores (gauche) et gros pores (à droite)

La figure 64 montre les clichés MEB obtenus sur des poreux élaborés via des mousses polyuréthane à gros pores et frittés à 1000°C. Le taux de porosité est de 90%. On distingue sur les clichés des trous dans les trabécules du poreux correspondant au chemin d'évacuation des mousses lors du déliantage. Ces zones représentent des défauts du poreux et sont responsable de leurs faibles tenus mécaniques.

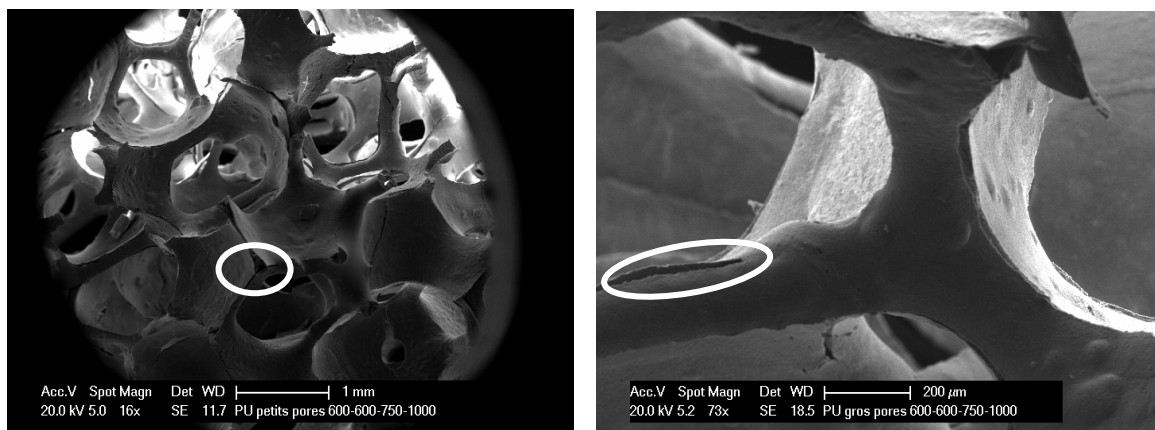


Figure C-64 : clichés MEB obtenus sur des poreux obtenus par imprégnation de mousses polyuréthane gros pores et frittés à 1000°C

La figure 65 montre des clichés tridimensionnels de tomographie X obtenus sur des mousses polyuréthane à petits et gros pores. La tomographie X nous permet d'observer la structure tridimensionnelle des poreux. Les défauts dus au départ de la mousse y sont également observés. Les mousses de polyuréthane à gros pores permettent d'obtenir une structure plus homogène que celles à petits pores.

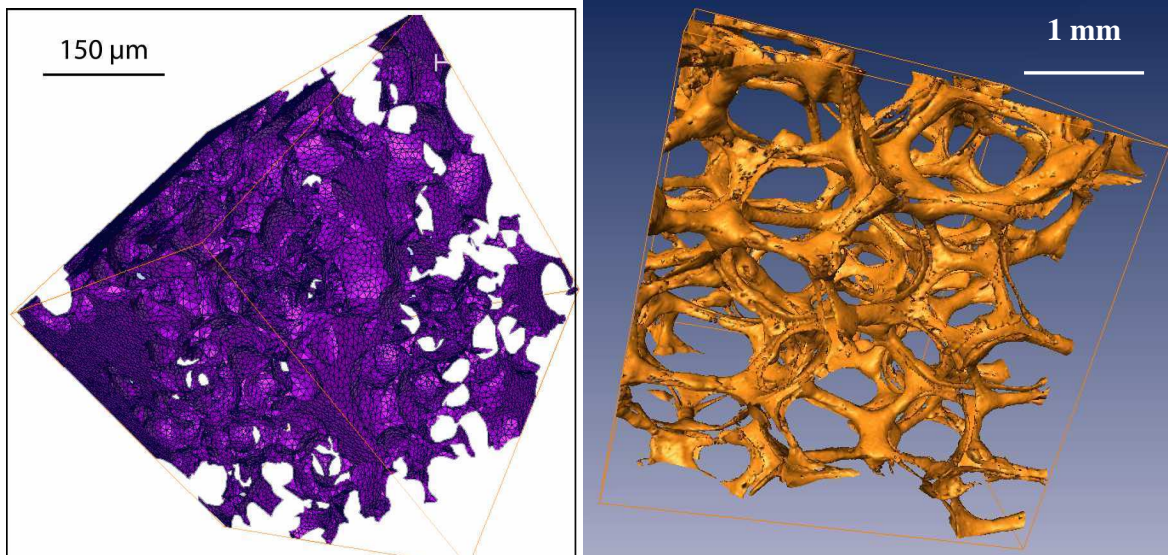


Figure C-65 : tomographie X tridimensionnelle effectuée sur poreux à petits pores (gauche) et gros pores (droite)

La figure 66 montre des vues bidimensionnelles de coupes d'un poreux à petits pores. Les zones claires présentes sur les coupes 2D sont significatives d'un excès de matière qui pourrait contenir des pores de faible taille et isolés, donc dépourvus d'interconnexions avec des pores adjacents. La présence de ces îlots de matière est le principal inconvénient évoqué dans la littérature concernant la méthode d'élaboration de pièces macroporeuses céramiques par imprégnation de mousses polymériques [4].

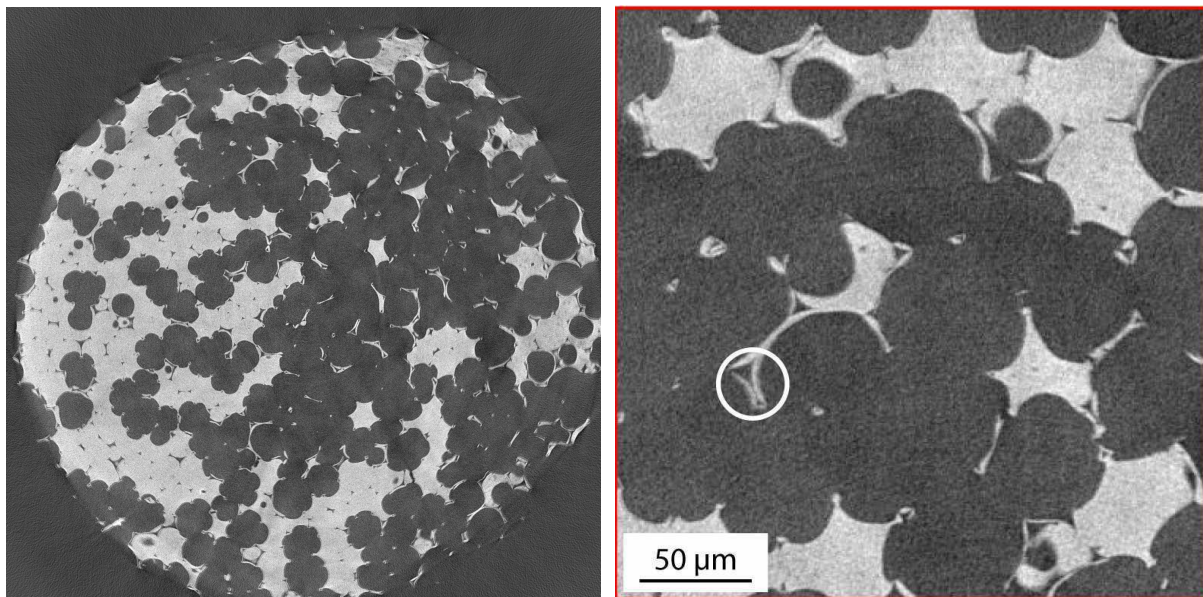


Figure C-66 : vues bidimensionnelles de coupes d'un poreux à petit pores

Le taux de porosité obtenu dans les poreux fins étant très élevé, nous avons tenté d'optimiser le procédé d'imprégnation afin de baisser ce taux et donc d'augmenter la tenue mécanique des poreux. Trois solutions sont possibles :



## Elaboration de blocs poreux

- 1- Conserver la structure de la mousse et obtenir le positif de la mousse de départ.
- 2- Saturer totalement la mousse de barbotine pour ne conserver qu'un réseau poreux, négatif de la mousse de départ.
- 3- Saturer partiellement les cellules des mousses

La première méthode permet d'obtenir des poreux comprenant 95% de porosité. La seconde méthode engendre des taux d'environ 30% de porosité. La figure 67 montre les poreux obtenus par saturation complète des mousses. Les échantillons obtenus présentent une relative bonne tenue mécanique mais l'ensemble des cellules est obstrué par le bioverre sans formation d'un réseau poreux, réplique de la mousse de départ. Les poreux obtenus ne satisfont donc pas le cahier des charges des substituts osseux. Enfin, la troisième méthode permet d'obtenir des échantillons de 80% à 90% de porosité. Cette méthode est donc peu reproductible en terme de taux de porosité mais permet d'obtenir des échantillons de meilleure tenue mécanique que la première grâce à l'obstruction de certains pores

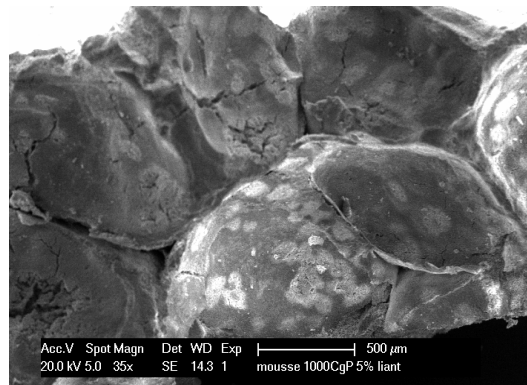


Figure C-67 : Poreux obtenu par saturation complète des mousses

### *e) Optimisation de la formulation des barbotines*

#### Effet du pH des barbotines

Nous avons vu précédemment qu'un pH des barbotines de bioverre égal à 9,25 permettait d'augmenter considérablement leur dispersion. Nous avons donc utilisé ce type de barbotine pour imprégner les mousses de polyuréthane. Le pH naturel des suspensions dans l'eau étant de 12, nous les avons acidifiées avec de l'acide nitrique après 6h de dispersion au tourne jarre afin d'obtenir un pH de 9,25 après 2h d'agitation additionnelle. Après un séchage de 48h, les mousses sont ensuite déliantées suivant les conditions de traitement indiquées précédemment. Après ce traitement thermique, les poreux obtenus ne présentent aucune cohésion et sont complètement effondrés. De plus, la couleur des particules de bioverre est blanche alors qu'au pH naturel de la barbotine, celle-ci est grise.

Pour comprendre ces résultats et l'effet du pH sur la dégradation des mousses de polyuréthanes, celles-ci sont placées 2h dans une solution alcaline composée d'eau et de soude à des pH de 9 et 11. Après séchage, les mousses sont analysées par ATD/ATG.

La figure 68 montre les résultats obtenus. L'analyse thermique différentielle montre des mécanismes de dégradation très peu différents en fonction du pH, seul un léger décalage de températures est observé. Les pertes de masses lors du cycle de déliantage se déroulent

approximativement aux mêmes températures et avec la même intensité. Ces résultats ne permettent pas de comprendre la différence de comportement observée expérimentalement.

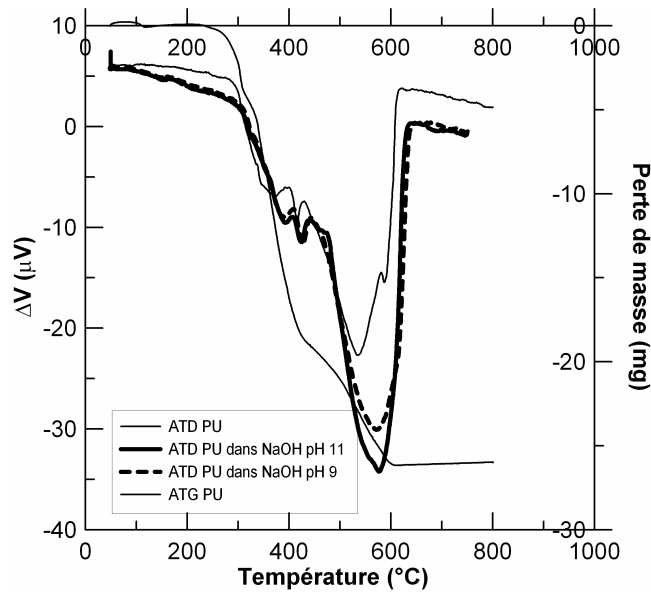


Figure C-68 : Thermogramme de mousses de polyuréthane(PU) immergées dans une solution de NaOH à différents pH

Nous nous sommes ensuite concentrés sur les espèces ioniques présentes dans la barbotine à cause du dispersant. Le Darvan C réagit avec le bioverre par relargage d'ions  $\text{NH}_4^+$  dans la solution. Nous avons donc reproduit la même expérience que ci-dessus mais en induisant un changement de pH de l'eau par ajout de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . La figure 69 montre les résultats obtenus.

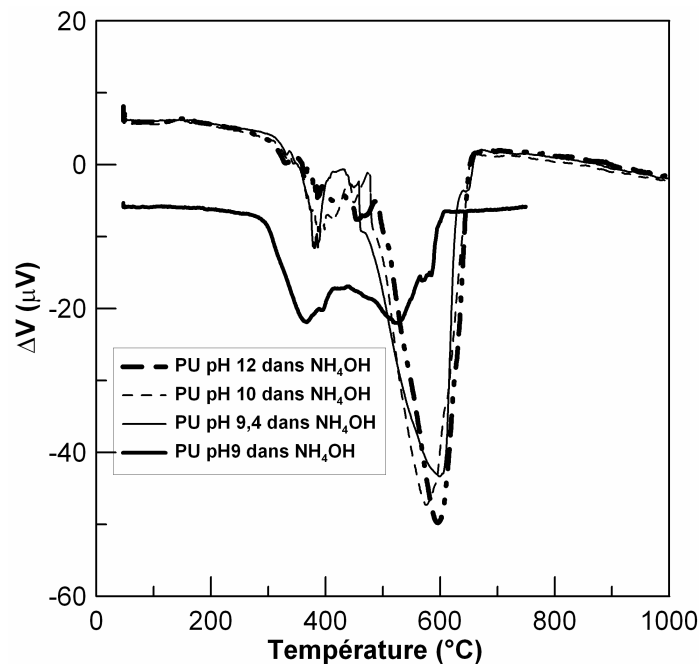


Figure C-69 : Thermogramme de mousses de polyuréthane(PU) immergées dans une solution de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à différents pH

## Elaboration de blocs poreux

L'analyse ATD montre très peu d'évolution des mécanismes de dégradation thermique pour des pH entre 12 et 10. Par contre, à partir de 9,4 en pH, la dégradation est considérablement différente. Pour des pH supérieurs à 10, la mousse est dégradée thermiquement par un mécanisme endothermique prédominant de maximum d'intensité à 600°C et par un mécanisme mineur à 400°C. A un pH de 9, deux pics principaux de dégradation sont observés, l'un à 350°C et l'autre à 525°C. Globalement, la dégradation se termine à des températures inférieures à celles obtenues pour des pH de 10 à 12.

La composition chimique exacte des mousses n'étant pas connue, il nous est difficile d'expliquer ces résultats par un mécanisme réactionnel. Néanmoins, nous pouvons émettre quelques hypothèses. Les mousses de polyuréthane sont obtenues par réaction entre des polyols et des isocyanates (rapport 1/1). Industriellement, on ajoute des isocyanates en excès pour obtenir des mousses thermiquement plus résistantes. En présence de  $\text{NH}_4^+$  dans les suspensions aqueuse, d'après le pKa du couple  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  (pKa = 9,2), à pH inférieur à 9,2 ces espèces se transforme en  $\text{NH}_3$  qui peuvent agir sur les isocyanates introduits en excès. Ceci pourrait expliquer les résultats observés.

C'est donc bien l'ajout de Darvan C qui induit l'effondrement des poreux par dégradation chimique des mousses de polyuréthane lorsque le pH est ajusté à 9,2. Trois solutions peuvent alors être envisagées :

- L'utilisation d'un autre dispersant
- L'optimisation du cycle de déliantage lors de l'utilisation de barbotines pH 9
- Travail à pH naturel des barbotines

Nous avons choisi la troisième solution, les deux première nécessitant des études plus approfondies.

### Utilisation d'un épaississant

Plus une barbotine est visqueuse, plus elle est susceptible de se fixer aux parois des mousses. Cependant, pour obtenir des poreux homogènes et de bonne tenue mécanique, les suspensions doivent être bien dispersées ce qui serait incompatible avec une floculation des barbotines. Le mode d'action envisagé, le pourcentage maximal de matière sèche possible étant déjà mis en œuvre, est l'ajout d'un épaississant.

Du PEG 6000, a donc été introduit dans les barbotines à des pourcentages compris entre 5 et 15% de matière sèche. Les mousses ont été imprégnées de ces suspensions et traitées thermiquement. Malgré la haute masse moléculaire du PEG, aucun effet n'est constaté. Les poreux ont la même taille de macroporosité et la même tenue que les poreux obtenus sans liant. La figure 70 montre les microstructures obtenues avec différents taux de PEG 6000. Bien que l'ajout d'épaississant ne permette pas de retenir plus de matière sur les parois, il induit de la microporosité et celle-ci augmente avec le taux d'adjuvant. L'ajout de PEG 6000 n'a donc aucun intérêt malgré sa haute masse moléculaire.

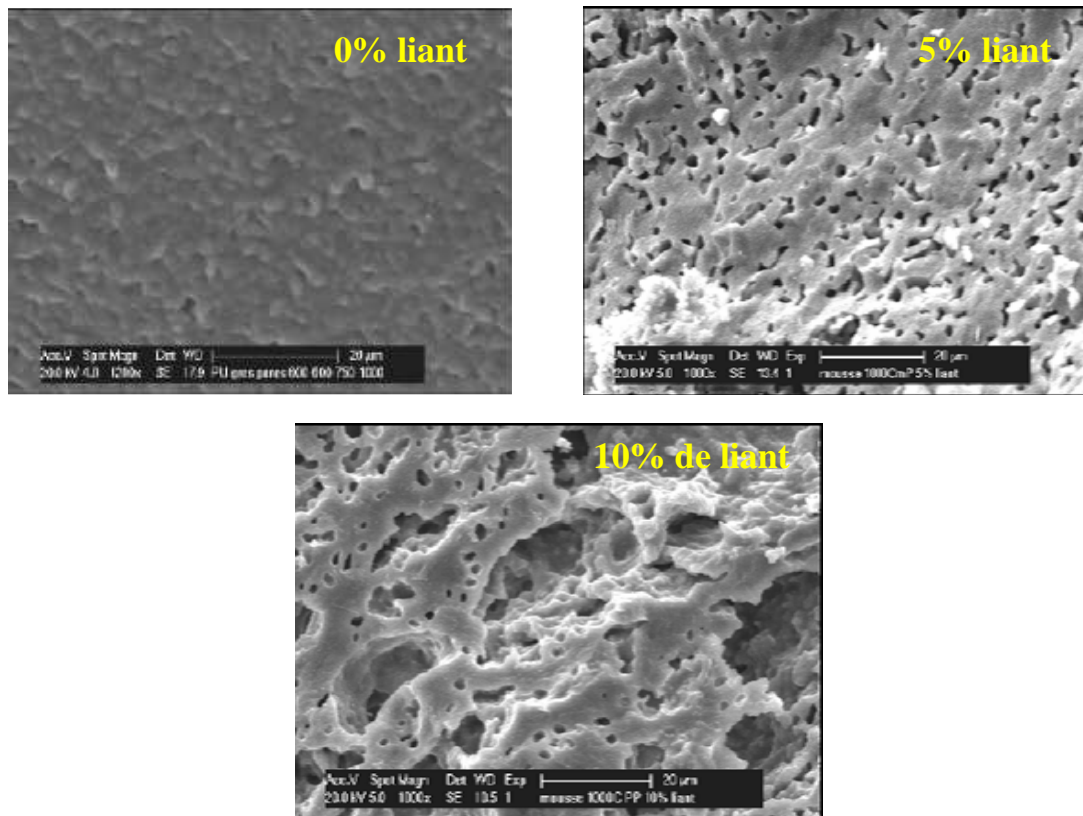


Figure C-70 : Clichés microscopique de la surface de poreux obtenus par imprégnation de mousse et ajout de liant (PEG 6000).

### *f) Double imprégnation*

Afin d'améliorer la tenue mécanique des poreux, ceux-ci sont imprégnés une seconde fois après déliantage ou frittage avec une barbotine à 40% de matière sèche. L'excès de suspension est ensuite enlevé par secousses successives. Après séchage de 48h, les poreux sont frittés à 1000°C. Le taux de poudre de bioverre choisi est justifié par le fait que la suspension doit être assez fluide pour ne pas être trop retenue par la structure poreuse et donc boucher trop de pores. Ce procédé de double imprégnation a été réalisé sur des poreux à gros pores après déliantage ou après frittage.

D'une manière générale, pour les deux type de blocs imprégnés, le procédé à pour effet d'augmenter grandement la tenue mécanique des édifices grâce à l'infiltration de la barbotines dans les défauts créés par le départ de la mousse dans la structure initiale (figure 71)

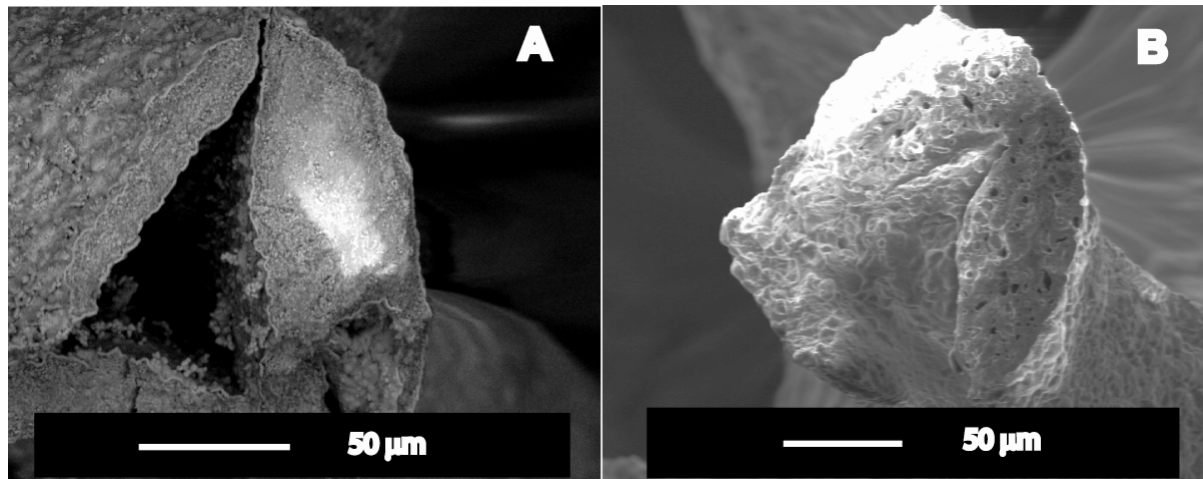


Figure C-71 : clichés MEB montrant le comblement des défauts des poreux par le procédé de double imprégnation.(A) avant et (B) après double imprégnation

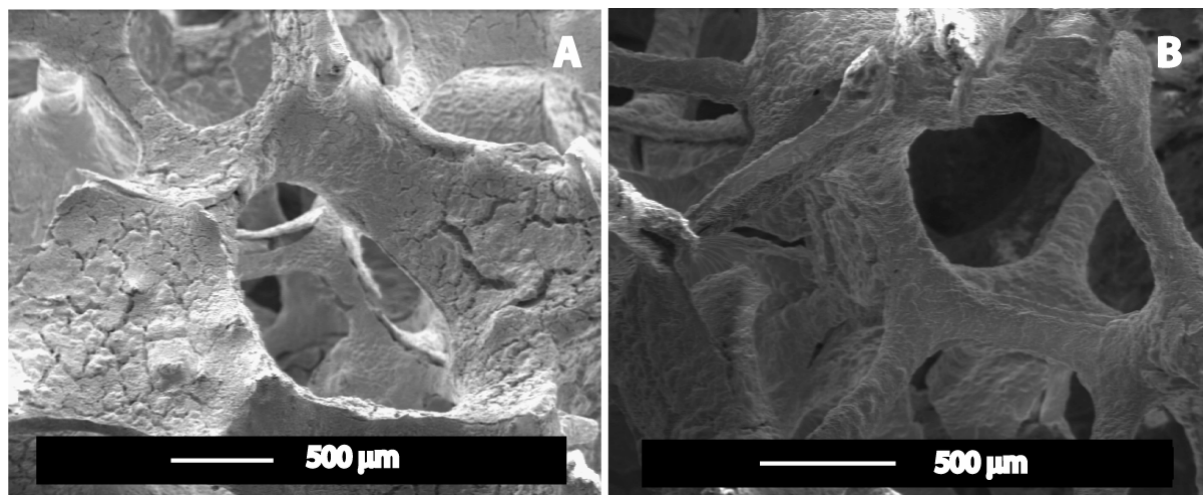


Figure C-72 : poreux obtenus après double imprégnation (a) après frittage (b) après déliantage

La figure 72 montre les poreux obtenus après imprégnation de blocs déliantés et de blocs frittés. Après frittage, la double imprégnation sur blocs frittés à 1000°C engendre des blocs frittés à cause d'un frittage différentiel trop important entre la structure poreuse initiale et le dépôt de bioverre amorphe sur ses parois. En revanche, les poreux obtenus par imprégnation d'un bloc poreux délianté ne présentent pas ces fissures. Le frittage différentiel est donc limité ce qui confirme la faible importance du premier stade de frittage sur la densification du bioverre.

Lors du procédé de double imprégnation, lorsque l'excès de barbotine est enlevé, il est préférable d'utiliser des structures frittées à 1000°C pour garder l'intégralité des structures initiales. En effet, l'application de ce procédé à des structures après déliantage est délicate puisqu'elle fracture en partie les poreux et l'obtention d'échantillon de forme géométrique est difficile. Nous avons donc choisi d'utiliser ce procédé sur des blocs frittés.

La seconde couche déposée peut ensuite être frittée avec un total contrôle de son état structural et de sa densification grâce aux études réalisées précédemment. Dans ce cas, une densification totale n'est probablement pas nécessaire à l'obtention d'une bonne tenue mécanique puisque l'obstruction des défauts de la structure initiale par le bioverre joue déjà ce rôle. Cette

## Elaboration de blocs poreux

technique devrait présenter l'avantage d'avoir une bioactivité évolutive des poreux finaux sans affecter leurs propriétés mécaniques.

### *g) Combinaison gel casting et imprégnation de mousse*

Afin d'augmenter la tenue mécanique des poreux une des solutions est de déposer plus de matière sur les parois des mousses. Ceci peut être réalisé par combinaison de l'imprégnation de mousse et du gel casting. L'imprégnation de mousse avec un mélange de barbotine et d'une solution de gélatine à chaud permettra de retenir la barbotine sur les parois des mousses et d'éviter leur sédimentation grâce à un refroidissement rapide. En effet, au refroidissement, la gélatine va se gélifier en formant un réseau tridimensionnel qui va emprisonner la suspension de bioverre au niveau des parois de la mousse.

Les mousses de polyuréthane ont été imprégnées d'une solution de bioverre mélangé à de l'acide acétique et à une solution de gélatine. L'acide acétique est utilisé pour créer un tampon avec le sodium contenu dans le bioverre 45S5 afin que la gélatine soit en présence d'un milieu où elle peut gélifier.

La figure 73 montre les poreux obtenus après déliantage de mousses de polyuréthane imprégnées d'une suspension de bioverre combinée à une solution de gélatine.



**Figure C-73 : poreux obtenus par combinaison de l'imprégnation de mousse de polyuréthane avec la technique du gel casting**

Seule la surface externe des poreux est déliantée. Le carbone se concentre au centre des échantillons. Une décohésion complète entre la surface et le cœur des poreux est observée. Après frittage à 1000°C, la pyrolyse du carbone n'est toujours pas complète. L'ajout de gélatine ou la réaction entre le bioverre 45S5 et l'acide acétique a pour effet de retenir le carbone dans les poreux. La technique du gel casting n'est donc pas adaptée à l'imprégnation de mousses par des suspensions de bioverre.

---

## 2) Utilisation de billes de PMMA comme porogènes

### *a) Par mélange*

#### Comportement du mélange

## Elaboration de blocs poreux

Lorsque des billes de PMMA individuelles sont mélangées à une barbotine de bioverre, elles flottent à la surface de la suspension. Il n'est donc pas possible d'obtenir des poreux homogène avec cette technique.

### Combinaison avec gel casting

Afin d'éviter la flottaison des billes de PMMA, il est possible de combiner ce mélange à une suspension de gélatine. Au refroidissement, par gélification, les billes de PMMA sont emprisonnées dans la structure des échantillons et vont induire, après déliantage, une porosité répartie dans tout l'échantillon.

La figure 74 montre les poreux obtenus par combinaison avec ces deux techniques.



Figure C-74 : poreux obtenus après frittage à 1000°C par combinaison de l'ajout de billes de PMMA et du gel casting.

Comme dans le cas de la combinaison de l'imprégnation de mousse avec le gel casting, on observe que seule la surface des échantillons est déliantée. Le carbone est retenu au cœur des blocs. De plus, de gros défauts sont observés du au départ des billes de PMMA.

### *b) Par imprégnation de préformes*

#### Obtention de préforme et imprégnation

La température de transition vitreuse du PMMA étant de 116°C, les préformes ont été obtenues par introduction des billes dans un moule et traitement thermique à 150°C pendant 1h. La figure 75 montre les préformes obtenues, on remarque que les billes forment des cous de 100 microns de diamètre entre elles.

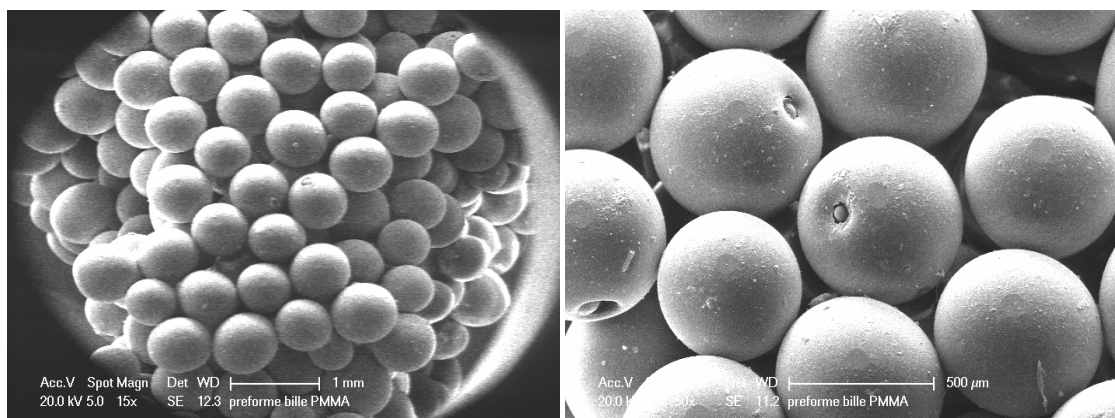


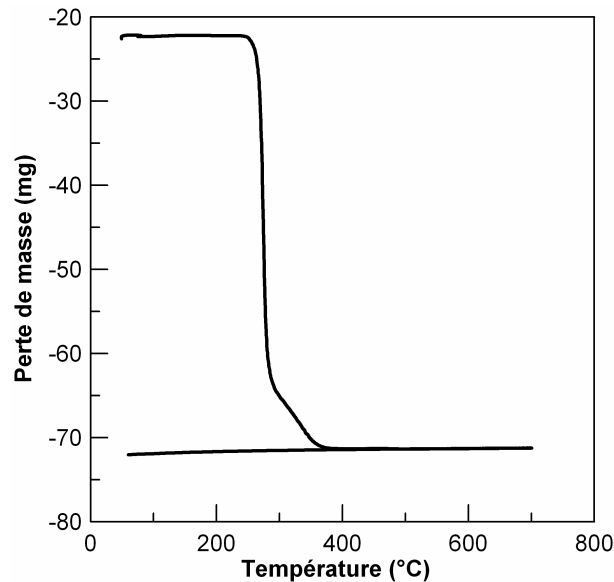
Figure C-75 : Préforme de PMMA obtenue à 150°C pendant 1h

## Elaboration de blocs poreux

L'imprégnation à été effectuée par immersion des préformes dans une barbotines pendant 30 min. Les préformes imprégnées sont alors séché pendant 48h.

### Cycle de déliantage

Le cycle de déliantage a été défini par l'intermédiaire de l'analyse thermogravimétrique (Figure 76)



FigureC-76 : ATG billes de PMMA

Le déliantage s'effectue à 0,8°C/min avec des paliers de 5h aux températures où la vitesse de départ est maximum ( $T= 275^{\circ}\text{C}$  et  $330^{\circ}\text{C}$ ). On observe alors une « explosion » des échantillons due aux contraintes excessives créées par le départ des billes. Nous avons alors décidé de réaliser des palier de 10h tous les 20°C, à partir de la température de début de perte de masse, jusqu'à 600°C. Ce nouvel essai engendre les mêmes conséquences que précédemment. Enfin, un troisième essai, incluant la fusion préalable du polymère permet d'obtenir un poreux mais effondré. Cette fois la mouillabilité des suspensions sur les billes, les interconnexions entre billes du réseau initial et la quantité de barbotine dans les préformes sont mises en cause.

### Poreux finaux et caractéristiques

Les poreux obtenus sont frittés à 1000°C à 1°C/min. La figure 77 montre les résultats obtenus.



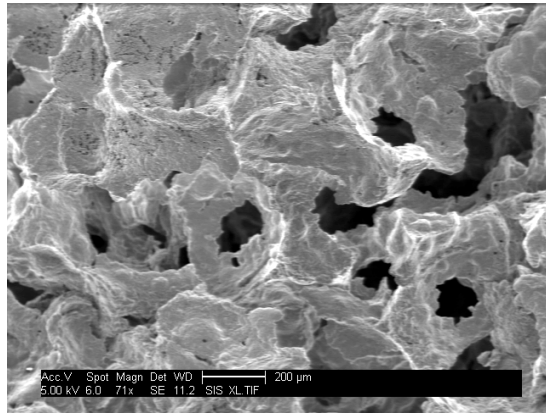
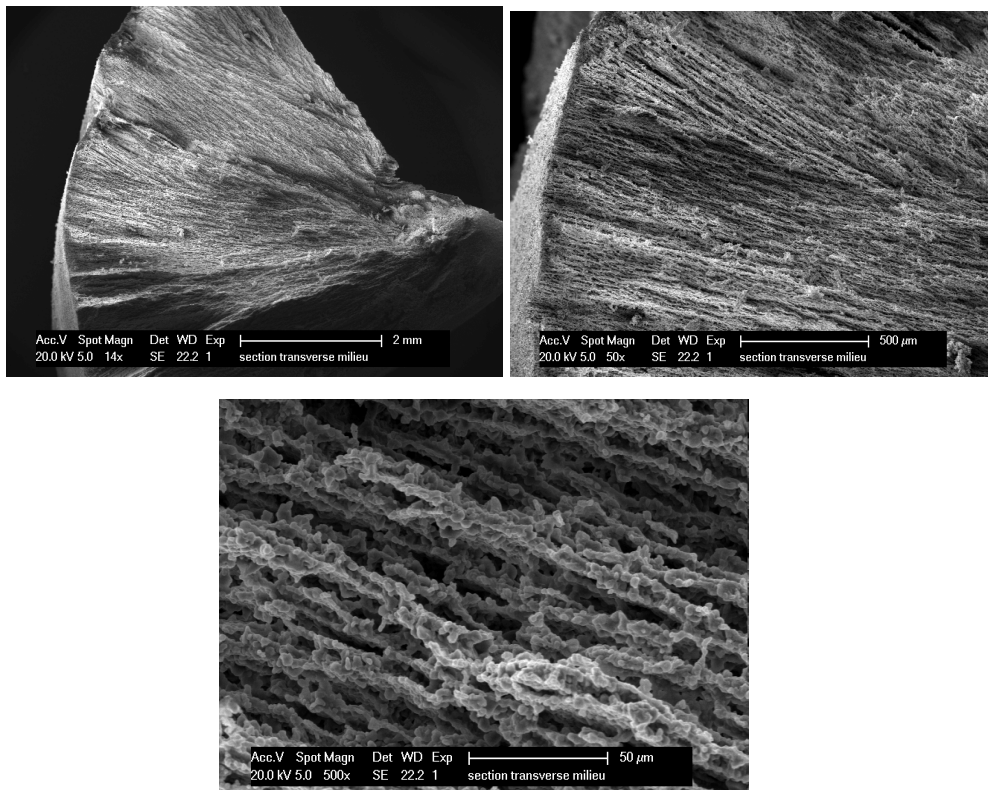


Figure C-77 : poreux obtenus par imprégnation de billes de PMMA

Cette technique permet d'obtenir une macroporosité ouverte et interconnectée. La taille des interconnexions dépend de la taille des cou formés entre billes de PMMA. Le procédé doit encore être optimisé pour obtenir des formes de dimensions précises et homogènes.

### 3) Freeze casting

La figure 78 montre les poreux obtenus après lyophilisation.



FigureC-78 : poreux obtenus par freeze casting

Ces poreux présentent une macroporosité ouverte et interconnectée. Les macropores se présentent sous forme allongée et avec une taille d'environ 50 μm. Cette taille peut être

augmentée par contrôle de la vitesse de refroidissement. Deville et al. dans leurs travaux sur l'obtention de poreux d'hydroxyapatite avec cette technique arrivent à des tailles de macropores allant jusqu'à 150  $\mu\text{m}$  [5].

L'avantage de cette technique est qu'elle ne nécessite pas de cycle de déliantage. La densification et les transformations du bloc poreux peuvent donc être contrôlées sur tout le cycle de frittage. Il est donc possible d'adapter les propriétés mécaniques des blocs poreux au site osseux à combler.

---

#### 4) Résumé et conclusion

Nous sommes parvenus à obtenir des blocs poreux satisfaisants par l'intermédiaire de deux techniques, l'imprégnation de mousse et le freeze casting. Les blocs obtenus sont homogènes, de porosité ouverte et interconnectée. Les techniques utilisant des billes de PMMA avec le gel casting ou l'imprégnation de préforme de billes frittées ne sont pas un succès et nécessitent des études plus approfondies notamment sur la formulation des barbotines.

Dans la technique de l'imprégnation de mousse, le polyuréthane a été choisi plutôt que la mélamine car ce type de mousses permet d'obtenir une structure plus homogène et reproductible. De plus, ces mousses sont disponibles dans le commerce avec différentes tailles de pores. L'avantage de cette technique est que les structures obtenues sont fortement interconnectées et peuvent être à porosité variable en combinant des mousses à petits et gros pores par exemple. Elles peuvent également être mise en œuvre avec des géométries contrôlées.

Par contre, l'inconvénient majeur de cette technique est qu'il n'est pas possible, à cause du cycle de déliantage, d'obtenir des poreux résistants sans cristallisation. Un traitement thermique de frittage à 1000°C est indispensable pour que les structures aient une bonne tenue mécanique. De plus, les défauts créés par le départ de la mousse affaiblissent les poreux. Nous avons vu qu'il était possible de combler ces défauts par double imprégnation mais ce procédé est délicat et il est difficile de ne pas casser les structures lors de la seconde imprégnation. Nous avons également évoqué la possibilité d'une bioactivité évolutive des poreux. Enfin, pour une même taille de pore, le contrôle du taux de porosité tout en gardant une structure homogène est difficile. Ainsi pour les gros pores, des porosités relatives de 90% sont obtenues. Baisser ce taux reviendrait à boucher certains pores et donc diminuer l'accessibilité aux cellules lors de la colonisation *in vivo* du matériau.

Parallèlement, la technique du freeze casting permet d'obtenir également des structures homogènes et à porosité interconnectée. Un contrôle du taux relatif de porosité est a priori possible en variant le taux de matière sèche des barbotines. Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet un contrôle complet du cycle de frittage. Il est donc théoriquement possible de densifier les poreux sans cristalliser. De plus, la taille des pores peut être modulée par la vitesse de congélation. Par contre il n'est pas encore possible d'obtenir des macropores de taille supérieure à 150 microns.

## **REFERENCES DU CHAPITRE 4 PARTIE C**

1. Characterization of ceramics , Ronald E. Loehman, 1993, p6
  2. LJ. Gibson et MF Ashby (1988). Cellular solids, structures and properties. Ed. DR. Clarke, S. Sureh, IM Ward. Oxford, Pergamon Press
  3. JT. Richardson, Y. Peng et D. Remue. Properties of ceramic foam Catalyst support :Pressure drop. Appl. Catal., 2001, vol. 204-A, pp. 19-32
  4. SN. Jayasinghe et MJ Edirisinghe. A novel method for forming open cell ceramic foam. Journal of Porous Materials, 2002, vol. 9, pp. 265- 273.
  5. S. Deville, E. Saiz et AP. Tomsia. Ice templated porous alumina structures. Acta mater. (2007), doi : 10.16/j.actamat.2006-11-003
-

# Partie D

## Evaluation biologique

## **INTRODUCTION**

t

---

Cette partie présente l'évaluation biologique des matériaux à base de bioverre 45S5 tant au niveau de leur bioactivité, caractérisée par la précipitation d'une hydroxyapatite carbonatée (HAC) à leur surface, qu'au niveau de leurs biocompatibilité caractérisée par la tolérance de cellules, les ostéoblastes, à être mises en contact avec ce type de matériaux.

Le premier chapitre sera consacré à l'étude de la formation de la couche d'HAC à la surface de poudre et de blocs poreux à base de bioverre. Cette étude sera réalisée par l'intermédiaire de cinétiques de formation. On mettra notamment en évidence l'influence des transformations structurales sur la bioactivité du matériau.

Le second chapitre présentera les essais in vitro de cinétiques de culture cellulaire réalisés sur les blocs poreux précédemment utilisés. Un des problèmes majeurs de la mise en contact statique de ce type de substituts osseux avec des cellules dans un fluide biologique, est le pH basique induit par la dissolution du matériau. Ce pH conduit à une nécrose cellulaire. Un protocole de culture cellulaire sera donc préalablement mis en place, le but étant de pré traiter les blocs poreux afin de former une couche d'HAC à leur surface qui stabilisera leur dissolution, diminuera l'alcalinisation du milieu, et permettra la culture des cellules.

Enfin, le troisième chapitre présentera les premiers résultats obtenus lors de l'implantation des blocs poreux à base de bioverre dans des lapins

## Chapitre D-1 : Etude de la bioactivité du bioverre 45S5 et influence de ses transformations

D-1-I	Bioactivité des poudres.....	153
D-1-II	Bioactivité des blocs poreux.....	156

### REFERENCES DE LA PARTIE D CHAPITRE 1..... 160

#### D-1-I Bioactivité des poudres

La figure 1 montre les résultats des cinétiques de formation de la couche d'HAC obtenues par DRX sur des poudres de 1,6 µm traitées thermiquement à 750, 850 et 950°C.

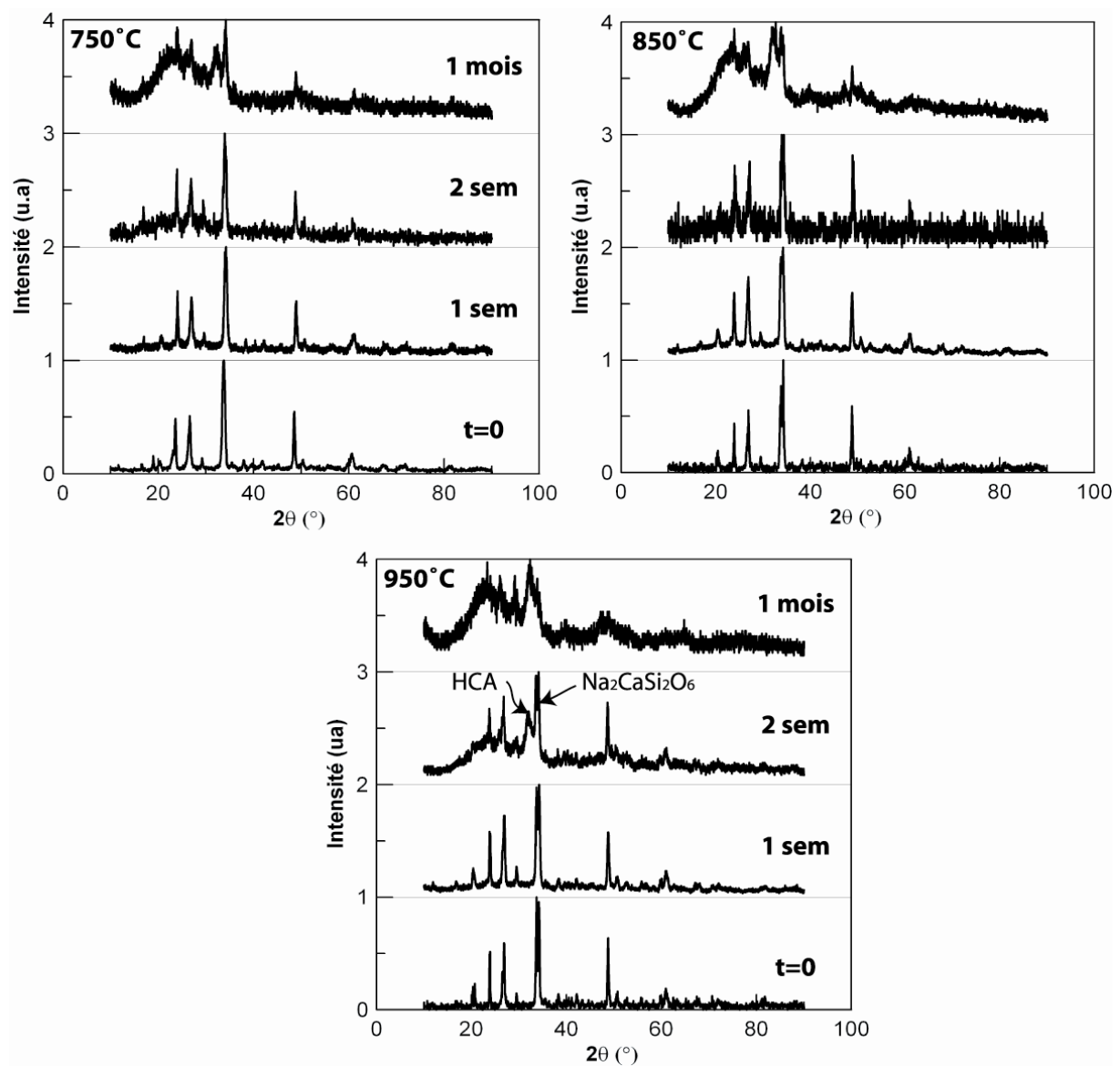
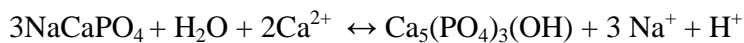


Figure D-1 : Diffractogrammes de poudres traitée à 750, 850 et 950°C après immersion dans le SBF à 0,025 g/ml pendant différents temps

Après 1 mois de traitement, on note la présence d'hydroxyapatite (JCPDS 9-432) sur la surface de toutes les poudres cristallisées. D'après l'intensité relative des pics de maximum d'intensité correspondant à l'HAC et à  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ , on note que la proportion d'hydroxyapatite synthétisée augmente avec la température de traitement. De plus, à  $950^\circ\text{C}$ , le pic correspondant à l'HAC apparaît après 2 semaines d'immersion dans du SBF alors que pour les autres poudres, ce pic apparaît seulement après 1 mois d'immersion. Ces résultats confirment ceux obtenus par Clupper et al.[1] sur des poudres de bioverre traitées à 800, 900 et  $1000^\circ\text{C}$  qui montrent que la réponse bioactive des poudres traitées à  $1000^\circ\text{C}$  est supérieure à celle des autres poudres.

Nous avons identifié précédemment (partie C chapitre 2) qu'à partir de  $800^\circ\text{C}$ , une phase phosphate, la silicorhénanite, commence à cristalliser. D'après Höland et al. [2] qui ont étudié l'influence de la cristallisation de rhénanite dans des verres bioactifs sur la cristallisation d'HAC à leur surface, la rhénanite joue le rôle de nucléis hétérogènes dans la cristallisation de HAC et ainsi pourrait augmenter la bioactivité du matériau. Ramselaar et al. [3,4] montrent que la phase rhénanite participe au processus de corrosion par la réaction suivante :



En mélangeant des particules de HA et de rhénanite avec de la gélatine et en les introduisant dans les alvéoles de dents de chien pour des périodes de 3 et 6 mois, ces auteurs montrent que l'intégralité de la rhénanite se transforme en apatite.

D'après nos résultats on peut conclure que la silicorhénanite favorise la formation d'HAC, cette phase joue donc le même rôle que la rhénanite en augmentant la bioactivité du matériau.

L'analyse EDX des poudres cristallisées montre que le rapport Ca/P varie entre 1,6 et 4. Après 1 mois, ce rapport est proche de 2 pour les poudres traitées à  $750^\circ\text{C}$  et  $850^\circ\text{C}$ , et égale à 1,6 pour la poudre traitée à  $950^\circ\text{C}$ . La plupart des études de formation réalisées sur le bioverre 45S5 amorphe montre des rapports Ca/P compris entre 1,5 et 2 [5-7]. L'écart à la stœchiométrie ( $\text{Ca/P} = 1,5$ ) est due à l'incorporation de  $\text{CO}_3^{2-}$  en substitution des ions  $\text{PO}_4^{3-}$  dans la maille d'apatite qui tend à augmenter le rapport Ca/P. Dans nos résultats, les fortes valeurs de Ca/P obtenues proviendraient également de la présence de la phase cristalline résiduelle de la vitro céramique. Kaufmann et al.[8] trouvent un rapport  $\text{Ca/P} = 3,7$  sur des blocs poreux frittés de bioverre comportant 59% de porosité, ce qui confirme notre hypothèse.

La variation de l'intensité du fond continu des diffractogrammes montre que les poudres cristallisées deviennent de plus en plus amorphes avec le temps avant de former de l'hydroxyapatite. Ce résultat confirme les observations réalisées par Chen et al.[9]. Ces auteurs expliquent cette amorphisation par un mécanisme de bioactivité en quatre étapes. Lorsqu'une vitro céramique bioactive est immergée dans du SBF, la première étape est une dissolution préférentielle aux interfaces verre/ cristaux. Puis, la solution entre dans les trous créés entre la matrice vitreuse et les cristallites ce qui induit, en troisième étape, une décomposition des cristallites en particules plus fine. Pendant ce temps la matrice vitreuse continue à se dissoudre. Enfin, la structure cristalline est dégradé graduellement par l'augmentation du nombre de défauts ponctuels créés lors de l'échange ionique. Finalement, une phase amorphe est formée et une couche D'HAC cristallisée se dépose.

La figure 2 montre les clichés obtenus par microscopie électronique à balayage sur une poudre de bioverre traitée à  $950^\circ\text{C}$  et immergée un mois dans du SBF. On observe de petits cristaux d'HAC en forme d'aiguille à la surface des grains de poudre. Cette forme de cristaux à été constatée dans plusieurs études portant sur le suivi de la formation d'HAC [10,11] et est identique à la phase minérale de l'os naturel [12].

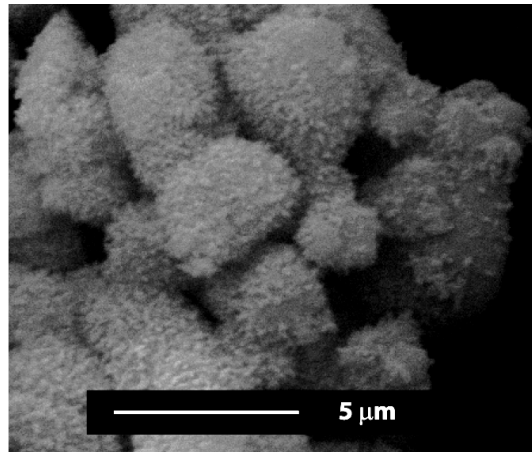


Figure D-2 : formation de cristaux d'HAC à la surface des grains de poudre de bioverre traités thermiquement à 950°C et immergés un mois dans du SBF.

A titre de comparaison, des poudres brutes et traitées à 580°C, juste au dessus de la température de séparation de phase vitreuse et au tout début de la cristallisation, ont été immergées dans du SBF avec la même concentration (0,025 g/ml) que les poudres cristallisées. La figure 3 montre les résultats obtenus.

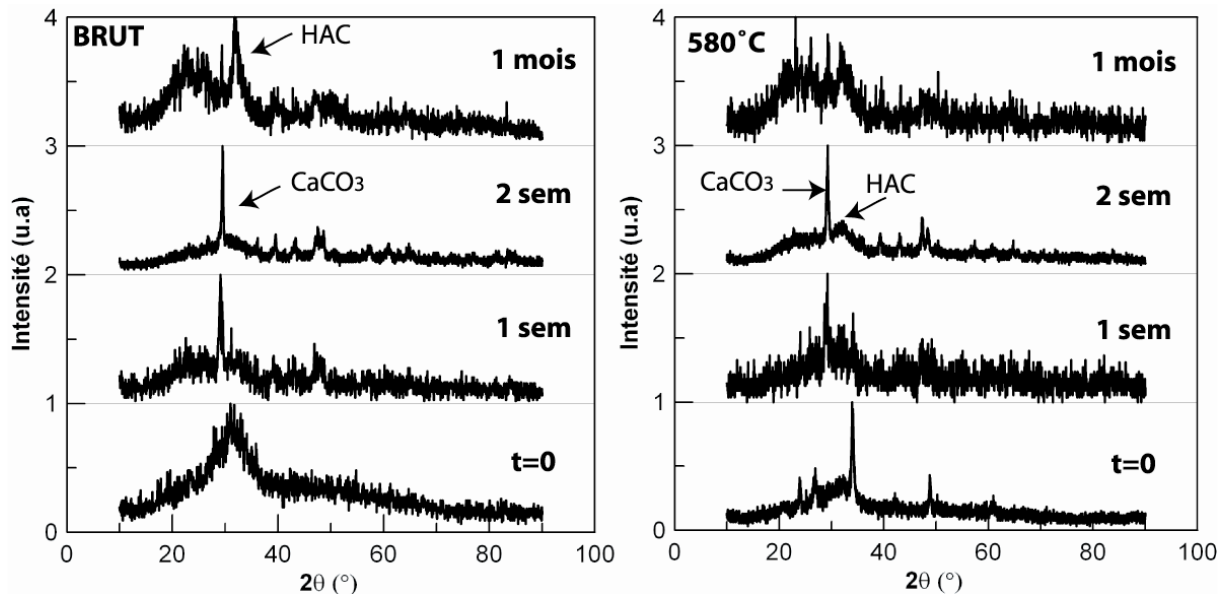


Figure D-3 : Diffractogrammes de poudres brute et traitée à 580°C après immersion dans le SBF pendant différents temps

Après 1 semaine d'immersion, on observe un mélange d'hydroxyapatite et de calcite sur les deux types de poudre. Après 2 semaines, la poudre traitée à 580°C et partiellement cristallisée ( $\alpha_{\text{crist}} = 25\%$ ) ne présente plus la présence de  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ . La poudre à 580°C est donc plus réactive que les poudres cristallisées étudiées ci dessus ce qui confirme les résultats obtenus par Peitl et al. [18,19]. Au bout de 1 mois d'immersion, la phase apatite devient prépondérante. La précipitation d'apatite permet donc de diminuer le relargage des poudres de bioverre, de diminuer le pH et donc de favoriser la précipitation de HCA.



Filgueiras et al. [13] ont montré que la couche amorphe riche en  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  commence à se former dans les 5 à 10 minutes d'immersion dans du SBF dans le cas du bioverre 45S5 dense, alors que la couche cristalline d'HAC apparaît seulement après 90 à 360 min d'immersion. Rehman et al. [14] ont montré que la phase amorphe de  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  commence à cristalliser après 6 à 24h d'immersion.

Jones et al.[15] ont montré, sur des poudres de bioverre 45S5 amorphe de  $5\mu\text{m}$ , que la dissolution des ions actifs dans la solution de SBF et le pH augmente avec la concentration de poudre. Par contre, l'intensité du pic relatif à la formation d'HAC diminue. Ces auteurs montrent que pour des concentrations de poudre de bioverre 45S5 supérieures à  $0,002\text{g/ml}$  de SBF, la formation de calcite  $\text{CaCO}_3$  est favorisée par rapport à celle d'hydroxyapatite carbonatée. Nos résultats confirment ces observations jusqu'à 2 semaines d'immersion. Cerruti et al. [16] ont montré sur des particules de  $2\mu\text{m}$  que la compétition entre la formation de calcite et d'HAC est dépendante du pH. Des pH supérieurs à 8 favorisent l'apparition de calcite tandis qu'un pH de 8 favorise l'apparition d'HAC. Ceci peut être expliqué par le fait que la solubilité de  $\text{CaCO}_3$  diminue lorsque le pH augmente [17]. En effet, les ions  $\text{CO}_3^{2-}$  sont plus importants à pH élevé dû à la dissolution du  $\text{CO}_2$  de l'atmosphère. Ces auteurs montrent également que la séquence de réaction conduisant à la formation d'HAC sur des particules de  $2\mu\text{m}$  ne peut être considérée comme une somme de différentes étapes puisque le relargage de cation, la formation d'un gel de silice et la réprécipitation de phosphate de calcium se déroulent simultanément.

Cette étude montre que la cristallisation des poudres de bioverre diminue leur réactivité mais ne l'inhibe pas. La réactivité chimique des poudres dérivées du bioverre est liée au relargage ionique se produisant lors de leur mise en solution et donc à la bioactivité du matériau. Dans le cas des poudres brutes et traitées à  $580^\circ\text{C}$ , la concentration de poudre est inadaptée à cause de leur relargage ionique trop élevée. A des concentrations plus faibles, ces dernières se transformeraient en HAC plus rapidement que les poudres de cristallinité plus élevée. De plus, d'un point de vue de la réactivité chimique et donc de la bioactivité, il apparaît préférable lors de l'élaboration de blocs poreux de fritter les échantillons à des températures inférieure à celle de la cristallisation de la phase principale ou supérieure à celle de l'apparition de la phase silicorhénanite. Cette dernière permettant d'augmenter la vitesse de formation de la phase d'HAC en participant au processus de corrosion. Enfin, nos résultats montre que pour des poudres traitées thermiquement au dessus de  $750^\circ\text{C}$ , il est possible de travailler à des concentrations en poudre supérieures à celle de la poudre amorphe dans du SBF.

---

## D-1-II Bioactivité des blocs poreux

Les blocs poreux utilisés ont été obtenus par imprégnation de mousse et frittage à  $1000^\circ\text{C}$ . Dans un premier temps, les cinétiques de formation de la couche d'HAC ont été réalisées sur des blocs à gros pores dans du SBF.

Les mesures de cinétiques de formation d'hydroxyapatite carbonatée dans du SBF montrent qu'après 3 semaines d'immersion, d'après les analyses EDX, le verre parent est quasiment entièrement dissout. Deux zones peuvent être observée (figure 4). La zone externe (épaisseur = 2 à 5 microns) qui est composée intégralement de phosphate et de calcium ( $\text{Ca/P} = 1,77$ ) tandis que la seconde, plus en profondeur contient, outre ces derniers, de la silice (35%)

(Ca/P=1,9). Cette dernière zone montre la présence d'une forte porosité due à la dissolution du verre.

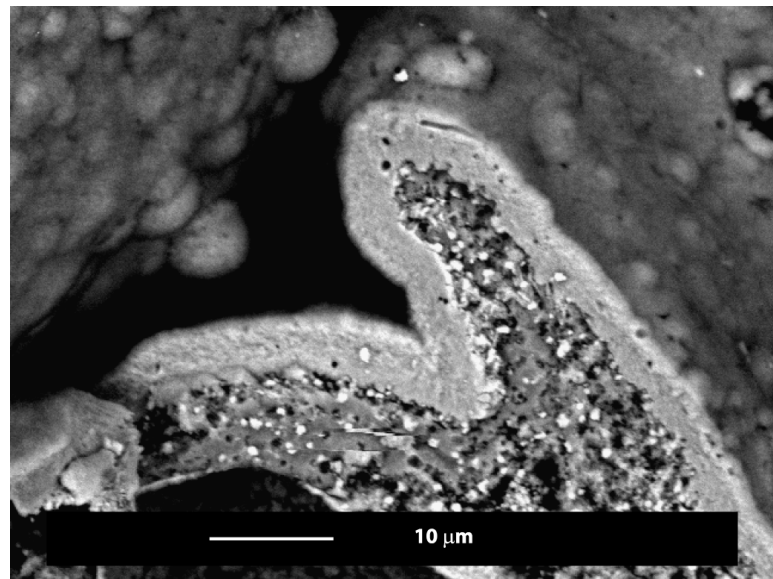


Figure D-4 : Blocs poreux après 3 semaine d'immersion

A deux mois d'immersion, l'épaisseur de la couche de phosphate de calcium est de 8 microns. Le rapport Ca/P mesuré est de 5 à la surface d'une trabécule et de 1,3 en son centre. La quantité maximale de silice détectée au centre est de 19% massique, le verre est donc pratiquement entièrement dissout et transformé en couche d'hydroxyapatite carbonatée dont le rapport Ca/P diffère grandement de celui de l'os.

Bien que la solution de SBF utilisée ait une composition proche de celle du plasma humain, les cinétiques de formation de la couche d'HAC ne reproduisent pas totalement les conditions réunies lors d'essai *in-vivo*. En effet, outre le fait que les implants sont soumis à un flux continu de plasma humain, la présence de certaines protéines peut influencer la composition et la stabilité de la couche d'HAC se formant sur les blocs poreux à base de bioverre.

Nous avons mentionné précédemment, dans la partie A « étude bibliographique », qu'un des problème majeur pour la validation des blocs poreux à base de bioverre en tant que substitut osseux par étude *in-vitro*, était le pH trop basique des échantillons introduits dans un milieu de culture. En effet ce pH trop basique induit une mort cellulaire importante. Pour palier à ce problème, un protocole de culture cellulaire a été mis au point par l'entreprise Noraker et sera exposé dans le chapitre suivant. Ce protocole inclut un prétraitement de 15 jours des blocs poreux dans du SBF avec changement régulier de la solution.

Pour vérifier l'influence de la présence de protéines sur la formation de la couche d'HAC, des blocs poreux à gros et petits pores obtenus par imprégnation de mousse ont été prétraités 15 jours dans du SBF, puis immergés entre 3 et 40 jours dans du milieu de culture DMEM supplémenté en sérum de veau foetal 10 % (Gibco) et en antibiotiques (ciprofloxacine, 10mg/ml, Bayer).

La figure 4 montre le faciès de rupture observé sur un bloc poreux de bioverre fritté à 1000°C et immergé 15 jours dans le SBF puis 15 jours dans le milieu de culture.

Le cliché obtenu en mode électrons rétrodiffusés montre trois zones de composition distinctes sur ce faciès de rupture. Les résultats obtenus en EDX sur chacune de ces zones sont reportés dans le tableau 1. En surface (zone 1), on observe une zone très claire correspondant à la couche d'hydroxyapatite. Cette couche a un rapport Ca/P moyen de 1,5 mais cette valeur varie de 1,3 à 1,7 avec de petits îlots à Ca/P=2 en surface. La précipitation des phosphates de calcium n'est donc pas homogène.

La zone 2 correspondant à la couche riche en silice est relativement dense tandis que la zone 3, le verre restant, est très poreuse à cause de la dissolution. L'analyse de composition effectuée sur cette zone par EDS montre que la vitrocéramique restante est appauvrie en sodium. C'est donc cet élément qui part le premier du matériau lorsqu'il est immergé dans du SBF.

Si on compare les clichés de la figure 5, on s'aperçoit que sur un même échantillon, la quantité de verre restant varie avec l'épaisseur des trabécules du poreux.

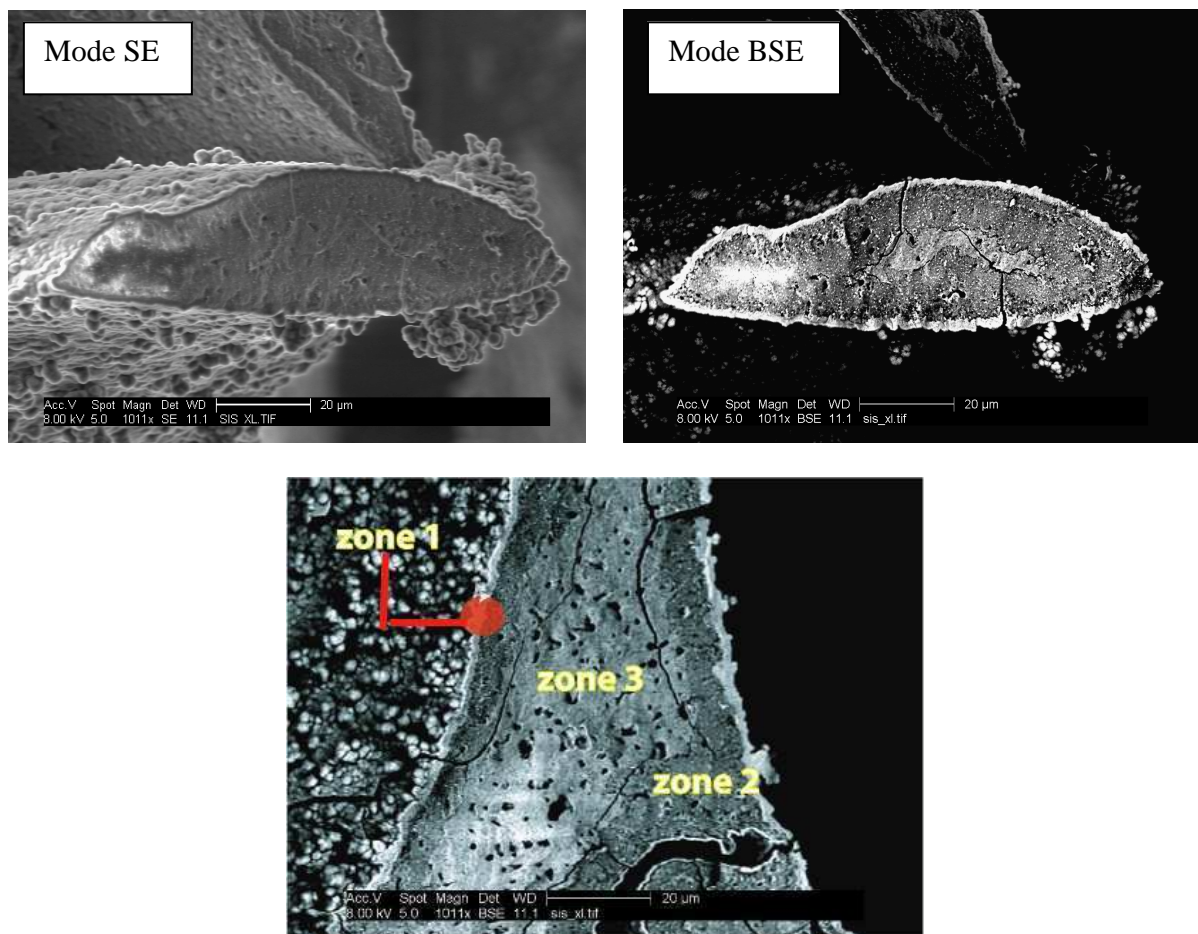


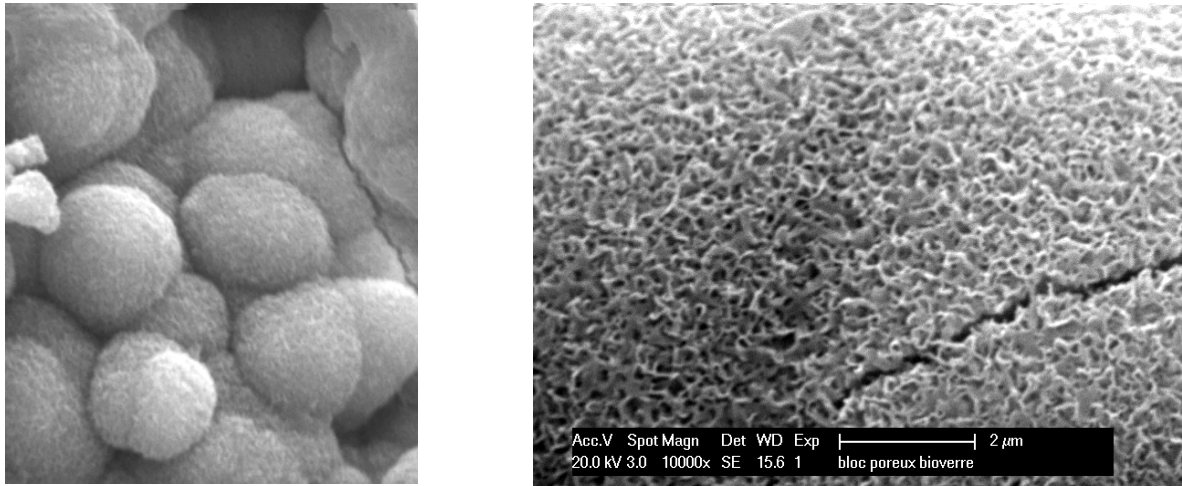
Figure D-5 : faciès de rupture d'une paroi de blocs poreux à base de bioverre fritté à 1000°C et placé 15 jours dans du SBF et 15 jours dans le milieu de culture

	Na <sub>2</sub> O (%massique)	SiO <sub>2</sub> (%massique)	CaO (%massique)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%massique)	Ca/P (%atomique)	MgO (%massique)
<b>Zone 1</b>	2	1,5	53,2	42,4	1,5	1
<b>Zone 2</b>	1	93,2	2,5	3	1	0,4
<b>Zone 3</b>	12,5	54,8	25,5	6,9	-	0
<b>45S5</b>	24,5	45	24,5	6	5	0

**Tableau D-1: compositions des différentes zones observées sur les faciès de rupture**

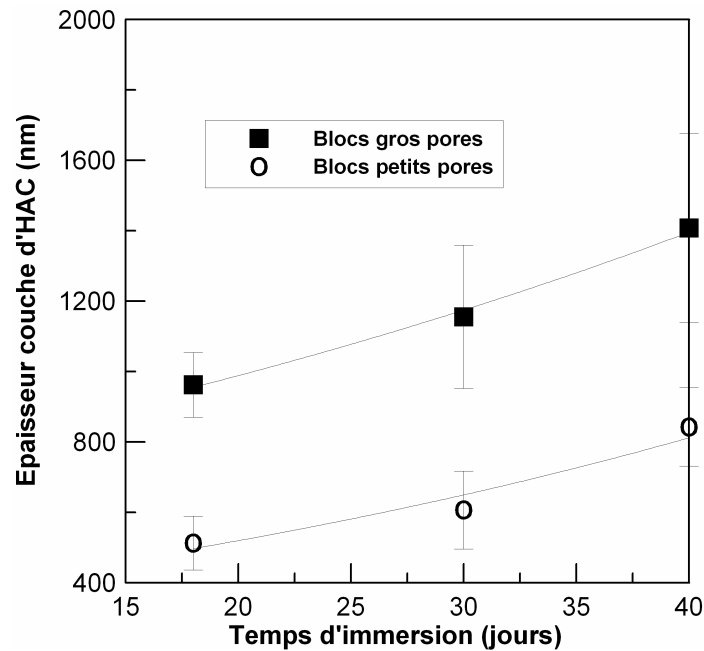
Le MgO présent en surface du matériau provient de la solution de SBF. D'autres analyses de compositions réalisées sur le même échantillon à des distances différentes de la surface montrent que le passage d'une zone à l'autre se fait par changement de composition progressif.

La figure 6 montre la surface des blocs immergés observée à fort grandissement. Les cristaux d'hydroxyapatite forment une couche microporeuse à la surface des grains de bioverre, avec une microstructure typique en forme de « Corn Flakes » déjà observée dans le cas de l'immersion de poudres traitées thermiquement.



**Figure D-6 : Couche d'hydroxyapatite observée sur un bloc poreux fritté à 1000°C et immergé 15 jours dans du SBF et 15 dans du milieu de culture.**

La figure 7 montre l'évolution de l'épaisseur de la couche d'HAC pour des blocs poreux à gros et petits pores prétraités 15 jours dans du SBF et immergé avec la même concentration dans du milieu de culture entre 3 et 40 jours



**Figure 7 : Evolution de l'épaisseur de la couche d'HAC à la surface de blocs poreux de bioverre à petit et gros pores prétraités 15 jours dans du SBF et après immersion à différents temps dans du milieu de culture.**

On observe que l'épaisseur de la couche d'HAC augmente pour les deux types de blocs. Celle-ci est plus importante sur les blocs poreux à gros pores que sur les blocs à petits pores. Ceci vient du fait que pour des pores plus petit, la surface totale de pores est plus grande et donc que la concentration de SBF par surface de pores est plus petite.

La présence de protéines permet donc de contrôler et de ralentir les processus de dissolution/reprécipitation se déroulant à la surface des échantillons puisqu'on retrouve à 1 mois d'immersion, contrairement au cas précédent (blocs dans du SBF), les différentes couches identifiées par Hench (cf « Etude bibliographique »). Ce résultat confirme les observations réalisées par Radin et al. [11] qui montrent, après étude de la formation d'HAC par immersion du bioverre 45S5 dans différents milieux, que l'HAC apparaît plus tard mais de façon plus homogène lorsqu'on utilise des solutions contenant du serum. De plus, on montre que l'épaisseur de la couche d'HAC augmente et est fonction de la surface d'échantillon disponible à la dissolution.

---

## REFERENCES DE LA PARTIE D CHAPITRE 1

- 1- DC. Clupper, JJ. Mecholsky, JP LaTorre, DC. Greenspan. Bioactivity of tape cast and sintered bioactive glass-ceramic in simulated body fluid. *Biomaterials*, 2002, vol. 23, pp. 2599-2606.
- 2- M. Holand, A. Dommann, W. Holand, E. Apel, and V. Rheinberger. Microstructure formation and surface properties of a rhenanite type glass-ceramic containing 6.0 wt% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. *Glass Science and Technology*, 2005, vol.78, n° 4, pp. 153-158.

- 3- MMA. Ramselaar, PJ. Van Mullem, W. Kalk, FCM Driessens, JR. Dewijn, ALH. Stols. In vivo reactions to particulate rhenanite and particulate hydroxyapatite after implantation in tooth sockets. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 1993, vol. 4, pp 311-317.
- 4- MMA. Ramselaar, FCM. Driessens, W. Kalk, JR. De wijn, PJ. Van Mullem. Biodegradation of four calcium-phosphate ceramics: In vivo rates and tissue interactions. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 1991, vol. 2, pp. 63-70.
- 5- C. Pritsos, E. Kontonasaki, X. Chatzistavrou, L. Papadopoulou, F. Pappas, P Koidis, KM Paraskevopoulos. Studying morphological characteristics of thermally treated bioactive glass ceramic using image analysis. *J. European Ceram. Soc.*, 2005, vol. 25, pp. 891-897.
- 6- E. Kontonasaki, T. Zorba, L. Papadopoulou, E. Pavlidou, X. Chatzistavrou, K. Paraskevopoulos. Hydroxy carbonate apatite formation on particulate bioglass in vitro as a function of time. *Cryst. Res. Technol.*, 2002, vol. 37, n°11, pp. 1165-1171.
- 7- HB. Wen, J. Moradian-Oldak, AG. Fincham. Modulation of apatite crystal growth on Bioglass® by recombinant amelogenin. *Biomaterials*, 1999, vol.20, pp. 1717-1725.
- 8- EAB. Kaufmann, P. Ducheyne, IM. Shapiro. Effect of varying physical properties of porous surface modified bioactive glass 45S5 on osteoblast proliferation and maturation. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, vol. 52, pp. 783-796.
- 9- QZ Chen, K Rezwan, V. Françon, D. Armitage, SN. Nazhat, FH. Jones, AR. Boccaccini. Surface functionalization of Bioglass®-derived porous scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 2007, vol. 3, pp. 551-562.
- 10- JP. Zhong, DC Greenspan, JW Feng. A microstructural examination of apatite induced by Bioglass® in vitro. *J. Mater. Sci.: Mater. in Med*, 2002, vol. 13, pp. 321-326.
- 11- S. Radin, P. Ducheyne, B. Rothman, A. Conti. The effect of in vitro modeling conditions on the surface reactions of bioactive glass. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997, vol. 37, pp 363-375.
- 12- FS. Kaplan, WC. Hayes, TM. Keaveny, A. Boskey, JP. Iannotti, In *Orthopaedic Basic Science*, edited by SR. Simon (American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994), p127.
- 13- MR. Filgueiras, G. Latorre, LL. Hench. Solution effects on the surface reactions of a bioactive glass. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1993, vol. 27, pp. 445-453
- 14- I Rehman, JC. Knowles, W. Analysis of in vitro reaction layers formed on Bioglass® using thin-film X-ray diffraction and ATR-FTIR microspectroscopy . *Bonfield. J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, vol. 41, pp. 162-166.
- 15- JR. Jones, P. Sepulveda, LL. Hench. Dose dependent behavior of bioactive glass dissolution. *J. Biomed. Mater. Res. 'Appl. Biomater.'*, 2001, vol. 58, pp. 720-726.
- 16- M. Cerruti, D. Greenspan, K. Powers. Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, pp. 1665-1674.

17- Y. Song, H.H. Hahn, E. Hoffmann. Effects of solution conditions on the precipitation of phosphate for recovery: A thermodynamic evaluation. Chemosphere, 2002, vol. 48, pp. 1029-1034.

18- O. Peitl Filho, G. P. La Torre, L.L. Hench. Effect of cristallization on apatite-later formation ef bioactive glass 45S5. Journal of Biomedical Materials Research, 1996, vol. 30, pp. 509-514.

19- O. Peitl, E. D. Zanotto, L.L. Hench. Highly bioactive P2O5-Na2O-CaO-SiO2 glass-ceramics. Biomaterials, 2001, vol. 292, pp. 115-126.

## Chapitre D-2 : Culture cellulaire

1. Mise en place d'un protocole de culture cellulaire .....	163
a. Contrôle de la dissolution des poudres de bioverre.....	163
b. Contrôle de la dissolution des blocs de bioverre.....	165
2. Culture cellulaire .....	168
a. Blocs poreux frittés à 800°C .....	168
b. blocs poreux frittés à 1000°C, de taille de pores comprise entre 500 et 1000 µm	170

---

La mise en solution du bioverre 45S5 induit, par ses processus de dissolution, un pH basique toxique (supérieur à 9) pour les cellules et qui conduit à leur nécrose. Pour que la culture de cellules soit possible, une étape de contrôle de cette dissolution et donc une maîtrise du pH est indispensable. Ce chapitre s'intéressera dans un premier temps au suivi du relargage d'ions du bioverre 45S5 dans différentes solutions et avec différentes concentrations de poudre. Le but étant le choix d'une solution et d'une concentration qui permettra de stabiliser le pH en un minimum de temps. Le cas de blocs poreux frittés à 800 et 1000°C sera également examiné, les vitro céramiques ayant une cinétique de dissolution différente des poudres brutes. Un protocole de prétraitement sera alors mis au point qui permettra la mise en contact et la prolifération des cellules sur le matériau. Des cinétiques de prolifération cellulaire seront alors réalisées sur des blocs frittés à 1000°C. Parallèlement, des cinétiques seront également réalisées sur un poreux composé d'HAP/TCP. L'influence de la taille des pores sera examinée.

---

### D-2-I Mise en place d'un protocole de culture cellulaire

---

#### 1. Contrôle de la dissolution des poudres de bioverre

La figure 8 montre l'évolution du pH de la poudre de bioverre amorphe (granulométrie centrée sur 1,6 µm) à 0,1g de bioverre/mL dans différentes solutions. Les solutions sont changées tous les jours.



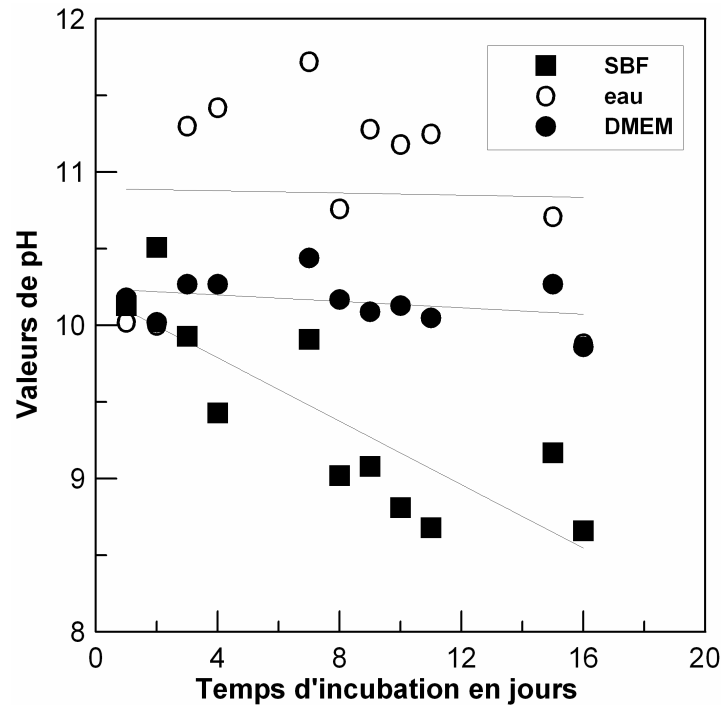


Figure D-8 : Evolution du pH de la poudre de bioverre à 0,1g/ml dans différentes solutions

Le pH diminue le plus rapidement dans la solution SBF mais est toujours élevé (pH de 8,7) après 15 jours de traitement

La figure 9 montre l'évolution du pH de la poudre de bioverre à 0,01 g/mL dans différentes solutions.

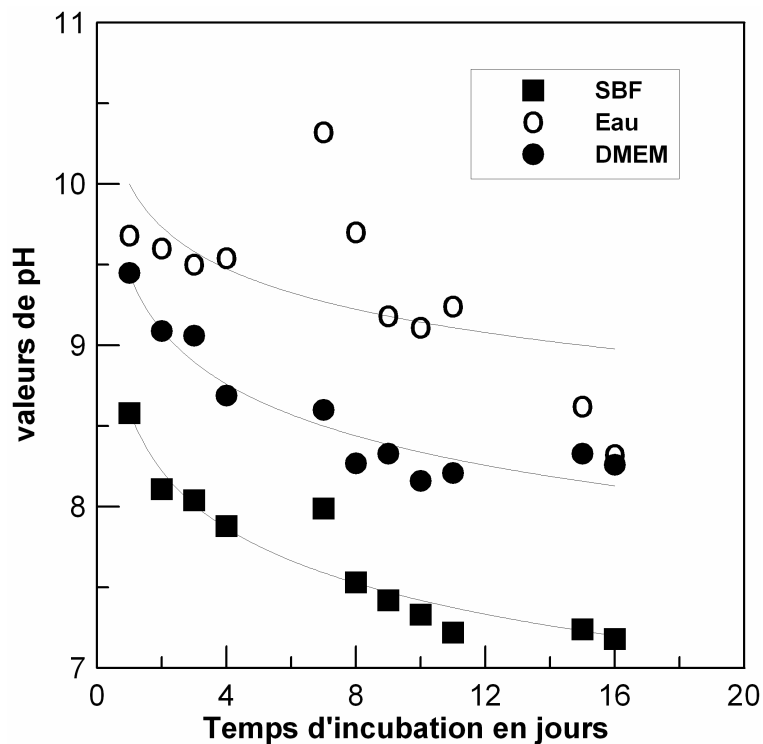


Figure D-9 : Evolution du pH de la poudre de bioverre à 0,01 g/ml dans différentes solutions

Comme dans le cas de solutions plus concentrées, le pH diminue le plus rapidement dans la solution SBF. Par contre, contrairement à précédemment, au bout de 10 jours de traitement le pH est stable à 7,2. Ce pH est proche du pH physiologique ( $7,4 \pm 0,2$ ).

En conclusion, les conditions de traitement sur poudre pour obtenir un pH stable proche du pH physiologique sont donc :

- incubation dans le SBF à 37°C en changeant le milieu tous les jours
- concentration de poudre de bioverre à 0,01g de bioverre /mL de SBF
- durée du traitement entre 11 et 16 jours.

La poudre de bioverre ainsi traitée a été mise en solution à une concentration plus élevée de 0,1 g/mL dans du milieu de culture. Le pH après 1 jour à 37°C est de 8.

---

## **2. Contrôle de la dissolution des blocs de bioverre**

### **- Bloc poreux fritté à 800°C**

Les blocs poreux frittés à 800°C, de taille de pores comprise entre 100 et 300  $\mu\text{m}$ , ont été dans un premier temps immergés dans une solution de SBF à 0,1g de blocs poreux/mL de SBF. Cette concentration initiale est supérieure à celle des poudres car la surface spécifique des blocs poreux est inférieure à celle des poudres. Ici, le matériau est semi cristallin et présente donc une dissolution moins rapide que dans le cas du matériau amorphe. Les conditions de prétraitement des blocs poreux traités à 800°C ont été adaptées en fonction du pH obtenu (tableau 2).

<b>Période d'incubation</b>	<b>Poids (en g)</b>	<b>Volume de SBF</b>	<b>Concentration de la solution de dissolution</b>
De J-1 à J-30	4,82	48,2 ml	~ 0,1 g/ml
De J-30 à J-32	4,82	24,1 ml	~ 0,2 g/ml
De J-32 à J-36	4,82	10 ml (~1bloc/ml)	~ 0,48 g/ml

**Tableau D-2 : Conditions de traitement des blocs poreux frittés à 800°C**

La figure 10 montre l'évolution du pH de la solution de dissolution de blocs frittés à 800°C. Les concentrations en matériau évoluent suivant le tableau 1.

Entre 30 et 32 jours de traitement, après avoir changé la concentration des solutions de 0,1 à 0,2 g/ml, on note un pH de 7,5 qui est compatible avec la culture cellulaire. Après 32 jours de traitement une augmentation significative du pH est observée, dû à un manque de changement de milieu et une concentration plus élevée de vitrocéramique. Cette augmentation est observée toutes les fins de semaines. On remarque que lorsque le milieu est changé tous les jours, le pH ne varie que très peu.

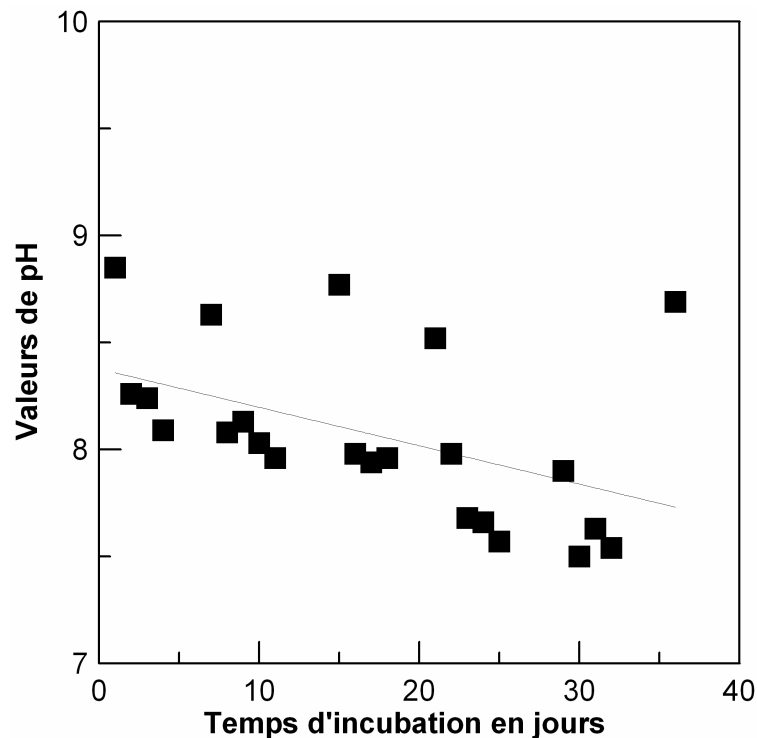


Figure D-10 : Evolution du pH de la solution de dissolution de blocs poreux frittés à 800°C immergés dans du SBF avec une concentration initiale de 0,1 g/ml

D'après Hlavac et al.[1], afin d'éviter l'augmentation de concentration en  $Ca^{2+}$  et de pH du à la dissolution du bioverre qui peut influencer la formation de la couche d'HAC et les interactions solide/liquide, un changement continu ou périodique de la solution d'immersion est recommandé. Greenspan et Zong [2] appliquent cette substitution de solution à des intervalles de temps de 6h, 24h puis tous les deux jours pour des verres de compositions incluses dans le système  $CaO-P_2O_5-SiO_2$ .

En conclusion, les conditions de traitement des blocs poreux frittés à 800°C pour obtenir un pH entre 7,5 et 8 sont :

- incubation dans le SBF à 37°C en changeant le milieu tous les jours
- concentration des blocs: commencer à 0,1g/ml et adapter en fonction du pH
- durée du traitement entre 30 et 36 jours

- Blocs poreux frittés à 1000°C à gros pores

La même étude a été réalisée sur des blocs poreux à gros pores (500 à 1000  $\mu m$ ) frittés à 1000°C. Quatre blocs de dimensions  $3*2*1 cm^3$  sont immergés dans 100 ml de SBF au départ soit une concentration de 0,15g de bioverre /mL de SBF. Le volume de solution est diminué au fur et à mesure que le pH redescend aux environs de 7. Les volumes de solution utilisés et les pH obtenus sont résumés dans le tableau 3.

	29/06/2006		30/06/2006		03/07/2006		04/07/2006		05/07/2006		06/07/2006	
	pH	T°C	pH	T°C	pH	T°C	pH	T°C	pH	T°C	pH	T°C
<b>Mousse 1000°C</b>	7,93	33,7	8,2	31,5	8,15	35	8,07	26,8	8,06	34,9	8	33,6
<b>Volume SBF</b>	100 ml		50ml									

07/07/2006		10/07/2006		11/07/2006		12/07/2006		13/07/2006	
pH	T°C	pH	T°C	pH	T°C	pH	T°C	pH	T°C
7,94	33,8	8,01	33,1	7,85	32,5	7,78	31,8	7,78	32,7
				25ml		10ml			

Tableau D-3 : Conditions des mesures et pH obtenus pour le traitement de blocs à gros pores frittés à 1000°C

La figure 11 montre les mesures de pH obtenus au cours du traitement des blocs poreux frittés à 1000°C dans le SBF.

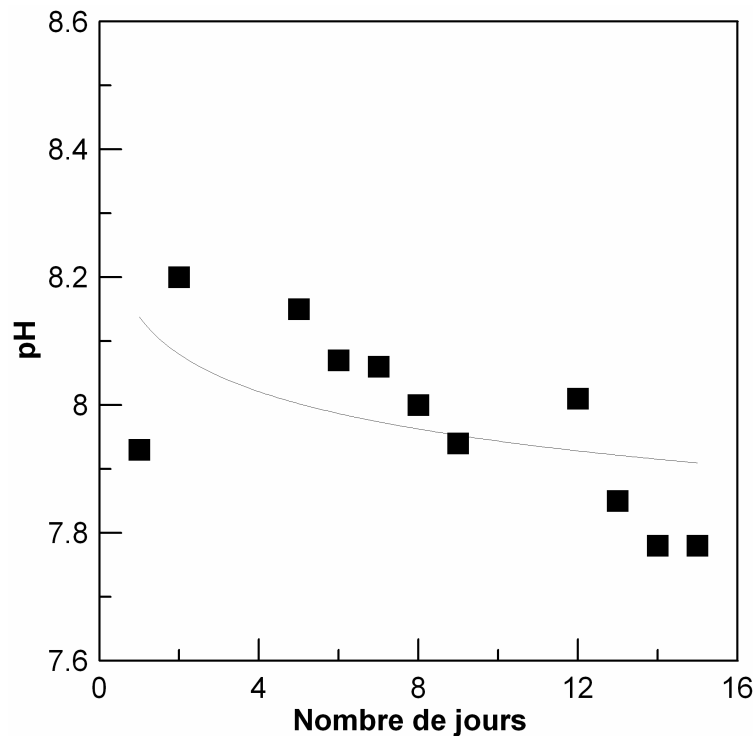


Figure D-11 : mesures de pH obtenus lors du traitement de blocs à gros pores traités à 1000°C

On remarque que la hausse de pH est moins importante que dans le cas des blocs poreux frittés à 800°C. Ceci peut s'expliquer par le fait que la surface disponible à la dissolution est plus importante pour des petites tailles de pore car il y a plus de surface en contact avec la solution. Au début de l'immersion des blocs, le pH atteint 8,2 alors que dans le cas précédent il était de 8,8. De plus, l'augmentation de pH lorsque la solution n'est pas changée est moins importante. Ceci est dû au fait que la surface spécifique du bioverre à 1000°C est moins importante qu'à 800°C, mais également à cause de la réaction de formation d'HAC à partir de silicorhénanite qui relargue des H<sup>+</sup>.

Après 15 jours de traitement et dans un volume de 10 ml de SBF (1,5g de bioverre dans 1mL de SBF), le pH est de 7,78. Ce pH est compatible avec la culture de cellules.

En conclusion, cette étude montre qu'il est possible de contrôler le pH basique dû à la dissolution du bioverre par un traitement adapté à chaque cas. Les temps de traitement et les concentrations sont fonction de la forme du matériau (poudre, blocs denses et blocs poreux) et des traitements thermiques qu'il a subis précédemment.

Après cette étude permettant le contrôle du pH des solutions, la seconde étape, avant la culture de cellules à proprement parlé, sera d'évaluer la cytotoxicité des extraits de bioverre par l'intermédiaire de tests MTT.

---

### D-2-II Culture cellulaire

Les cultures cellulaires ont été réalisées par R. Maksoud et M. Berthelot (Noraker) dans le laboratoire du professeur D. Hartmann. La caractérisation MEB a été réalisée par notre laboratoire.

Le but de cette étude est de mettre des cellules en contact avec les blocs de bioverre afin de visualiser les interactions cellules/biomatériaux en microscopie électronique et d'évaluer la cytotoxicité. Etant donné les problèmes de pH basique rencontrés avec des biomatériaux contenant du bioverre, nous avons utilisé des blocs préalablement traités selon le protocole exposé au paragraphe précédent pour faire diminuer le pH en solution. Cette expérience a pour but de savoir si les cellules prolifèrent sur ces blocs traités.

---

#### 1. Blocs poreux frittés à 800°C

Dans cette étude, les blocs poreux de bioverre sont préalablement traités dans la solution SBF afin de diminuer le relargage du bioverre. Les blocs sont ensuite mis en contact direct avec les cellules : la prolifération cellulaire est analysée au bout de 7 jours de culture par le test MTT et l'adhésion des cellules sur les blocs est observée en microscopie électronique à balayage.

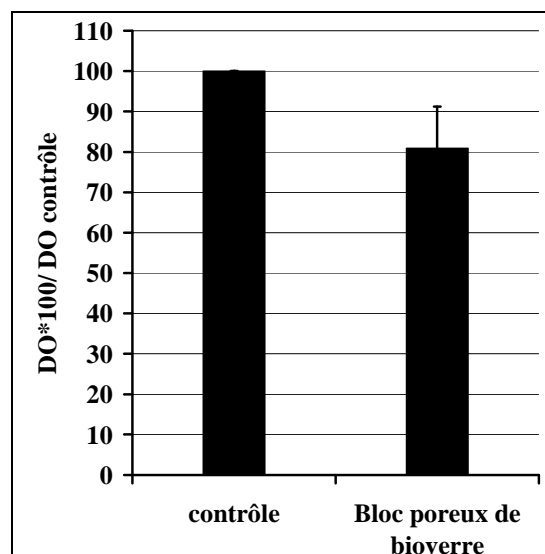


Figure D-12 : Pourcentage de viabilité cellulaire des blocs poreux frittés à 800°C à 7 jours de culture.

## Evaluation biologique – Culture cellulaire

Les résultats de la figure 12 montrent que les blocs de bioverre sont peu toxiques pour les cellules par rapport au contrôle.

Les blocs sont alors mis en contact avec les cellules pendant 13 jours. Au cours de cette expérience, on observe des cellules vivantes au fond du puit permettant de contrôler que les conditions utilisées permettent aux cellules de proliférer. On note une différence entre le puit avec les fibroblastes et le puit avec les ostéoblastes. En effet, les fibroblastes semblent moins proliférer que les ostéoblastes (ce qui est déjà le cas dans la culture sans matériaux). Dans le puit avec les fibroblastes, le milieu change légèrement de couleur ce qui suggère un pH légèrement basique. Le puit avec les ostéoblastes, les cellules prolifèrent et semblent tamponner le milieu de culture (indication par la couleur du milieu : le milieu avec les blocs est initialement rose et vire au orange). L'activité régulatrice des cellules sur l'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a été précédemment démontré par plusieurs études [3-5]

Les échantillons sont ensuite retirés du milieu de culture et préparés pour des observations au MEB. La figure 13 représente les photos des trois échantillons.

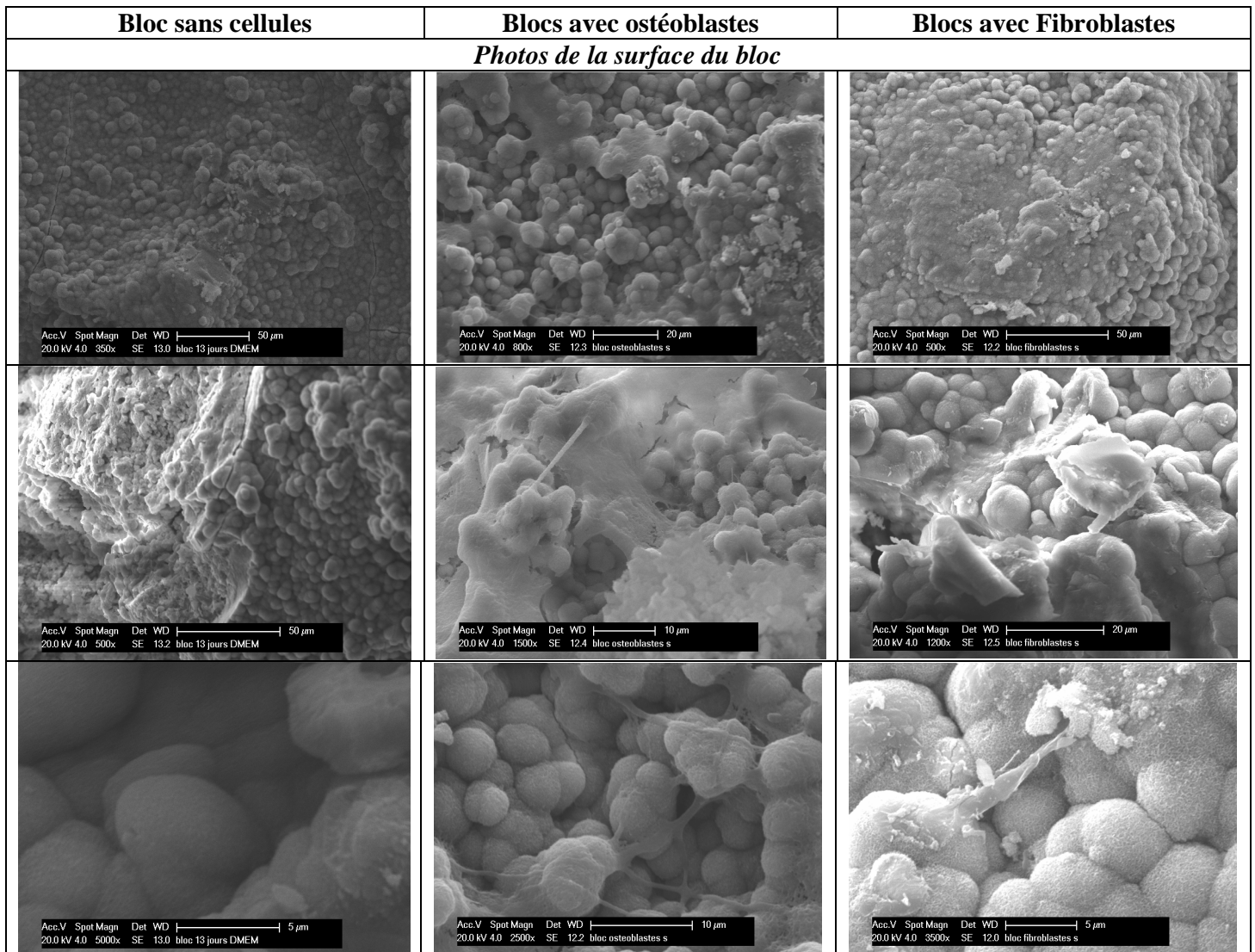


Figure D-13 : Observation MEB des blocs poreux frittés à 800°C et mis en contact avec les cellules pendant 13 jours

Les photos MEB montrent que les ostéoblastes ont colonisé la surface du bloc. A plus fort grossissement, on remarque que les cellules ont proliféré et se répartissent sous forme de couche cellulaire à la surface des grains de bioverre. D'après Hench [6], ce sont la formation de la couche d'HAP et le ralongage de silice soluble qui conduisent à l'ancrage et à la prolifération des ostéoblastes sur la surface du verre, ainsi qu'à l'ostéointégration.

Sur le bloc avec les fibroblastes, on observe moins de cellules. En effet, on observe des plages localisées de cellules comme le montre la première photo (bloc + fibroblastes). Ce résultat confirme ceux de Silver et al. [7] qui montrent que l'effet métabolique du bioverre 45S5 est plus faible dans les fibroblastes que dans les ostéoblastes.

Au niveau des granules de bioverre, la différence d'observation est nette entre le bloc sans cellules où les grains de bioverre sont recouverts d'HAP, le bloc avec les ostéoblastes sur lequel on observe des cellules qui font des prolongements cytoplasmiques entre elles et le bloc avec les fibroblastes où on observe quelques cellules.

Cette étude réalisée par l'entreprise Noraker, nous a permis de démontrer que la culture de cellules est possible sur des blocs poreux frittés à 800°C traités au SBF pour diminuer le pH basique. Que ce soit les ostéoblastes ou les fibroblastes, les cellules poussent et colonisent la surface du bloc.

---

## **2. blocs poreux frittés à 1000°C, de taille de pores comprise entre 500 et 1000 µm**

Cette étude a été réalisée sur des blocs poreux à base de bioverre obtenus par imprégnation de mousse et fritté à 1000°C. Deux type de porosité ont été étudiées : 100 à 250 µm (PP) et 500 à 1000 µm (GP). En parallèle, des blocs poreux de porosité supérieure à 75 ppi à base d'hydroxyapatite ont été utilisés comme témoin. Chaque type de poreux obtenus par imprégnation de mousse à été placé dans un puit avec du milieu de culture et sans cellules pour servir de contrôle au test.

La figure 14 montre l'évolution de pH obtenue pour chaque type de blocs en fonction du temps. La solution dans laquelle les blocs utilisés comme contrôle sont plongés ont un pH supérieur à ceux qui sont en présence de cellules. Ces dernières, de par leur activité métabolique peuvent tamponner le milieu. De plus, on remarque que plus les pores sont petits, plus le pH est élevé. Ce phénomène est dû à une surface disponible pour la dissolution plus importante dans le cas des petits pores que dans le cas des gros pores. Enfin, les pH obtenus pour les poreux à gros pores sont très peu différents de ceux obtenus pour l'HAP malgré une taille de pore plus petite de ce dernier. Cela signifie que l'HAP a une aptitude à la dissolution inférieure à celle de la vitrocéramique obtenue par traitement thermique du bioverre.

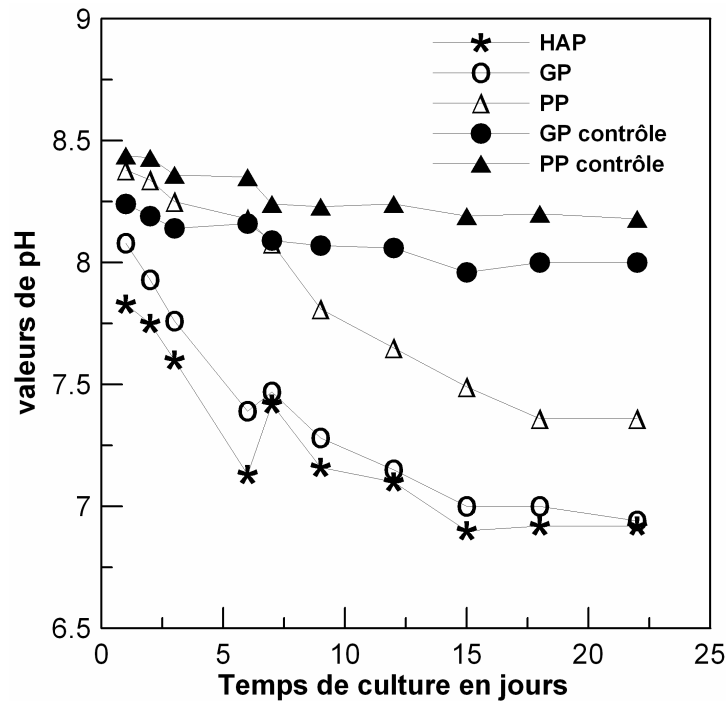


Figure D-14 : évolution du pH du milieu de culture en fonction du temps de culture pour l'HAP, les blocs à petits pores (PP) et les blocs à gros pores (GP)

Ces changements de pH sont visibles par la coloration du milieu de culture. Celui-ci contient du rouge de phénol qui permet de surveiller son pH (figure 15).

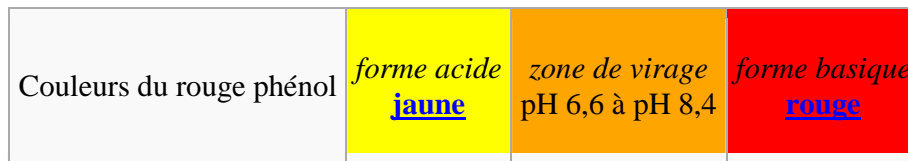


Figure D-15 : Code couleur du rouge de phénol dans le milieu de culture

La figure 16 montre les clichés MEB qui retracent l'évolution du tapis cellulaire en fonction du temps de culture.

On observe que les cellules recouvrent progressivement l'intégralité de la surface des blocs poreux. Les osteoblastes prolifèrent sur les blocs poreux à base de bioverre.



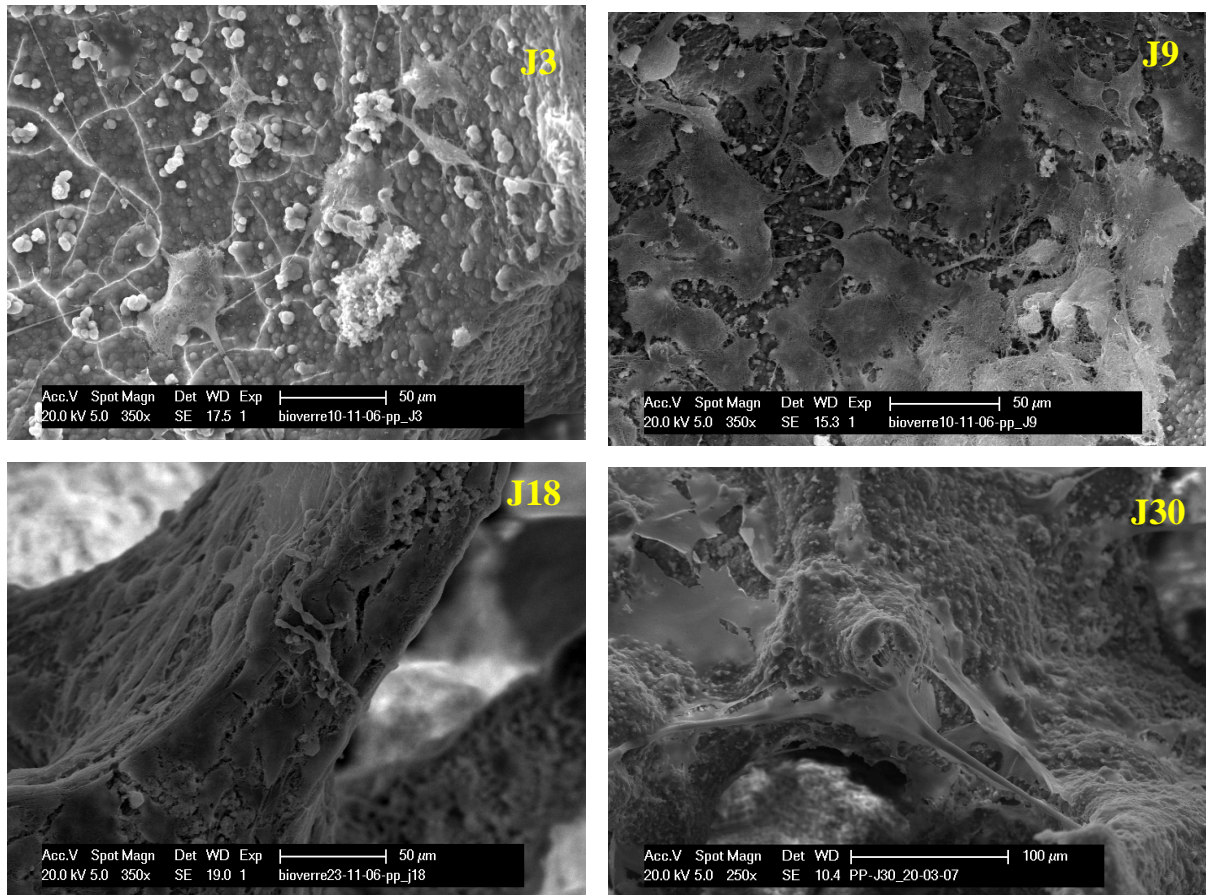


Figure D-16 : clichés MEB montrant l'évolution du tapis cellulaire avec le temps de culture.

La figure 17 montre des clichés MEB effectués à 18 jours de culture cellulaire sur des poreux à gros pores en profondeur du matériau. On observe des nodules qui pourraient correspondre à ceux observés après 14 jours de culture par El Ghannam et al.[8]. Dans leur étude ils ont observé des fibrilles de collagène calcifiées et liées entre elles par des nodules minéralisés de Ca/P = 1,67-1,69.

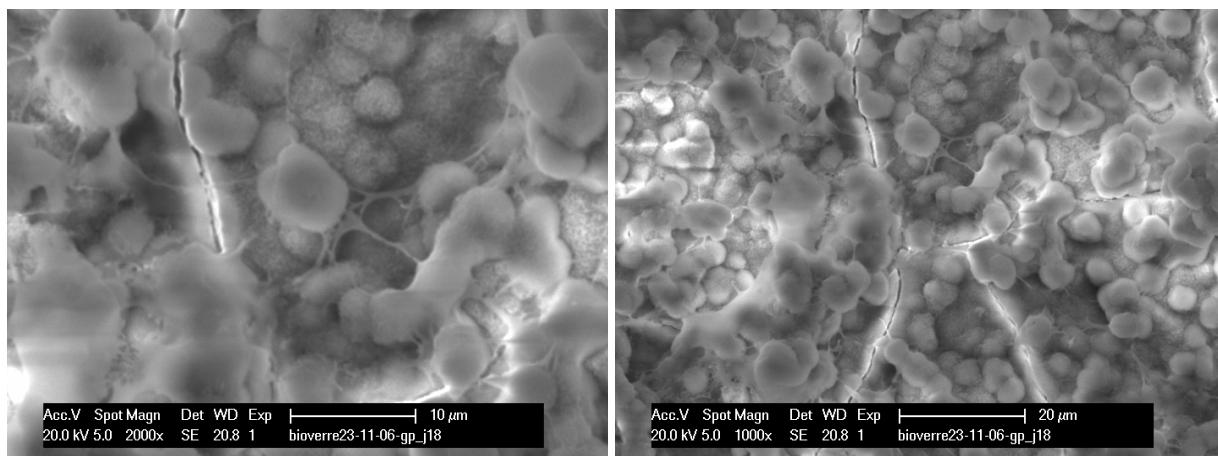
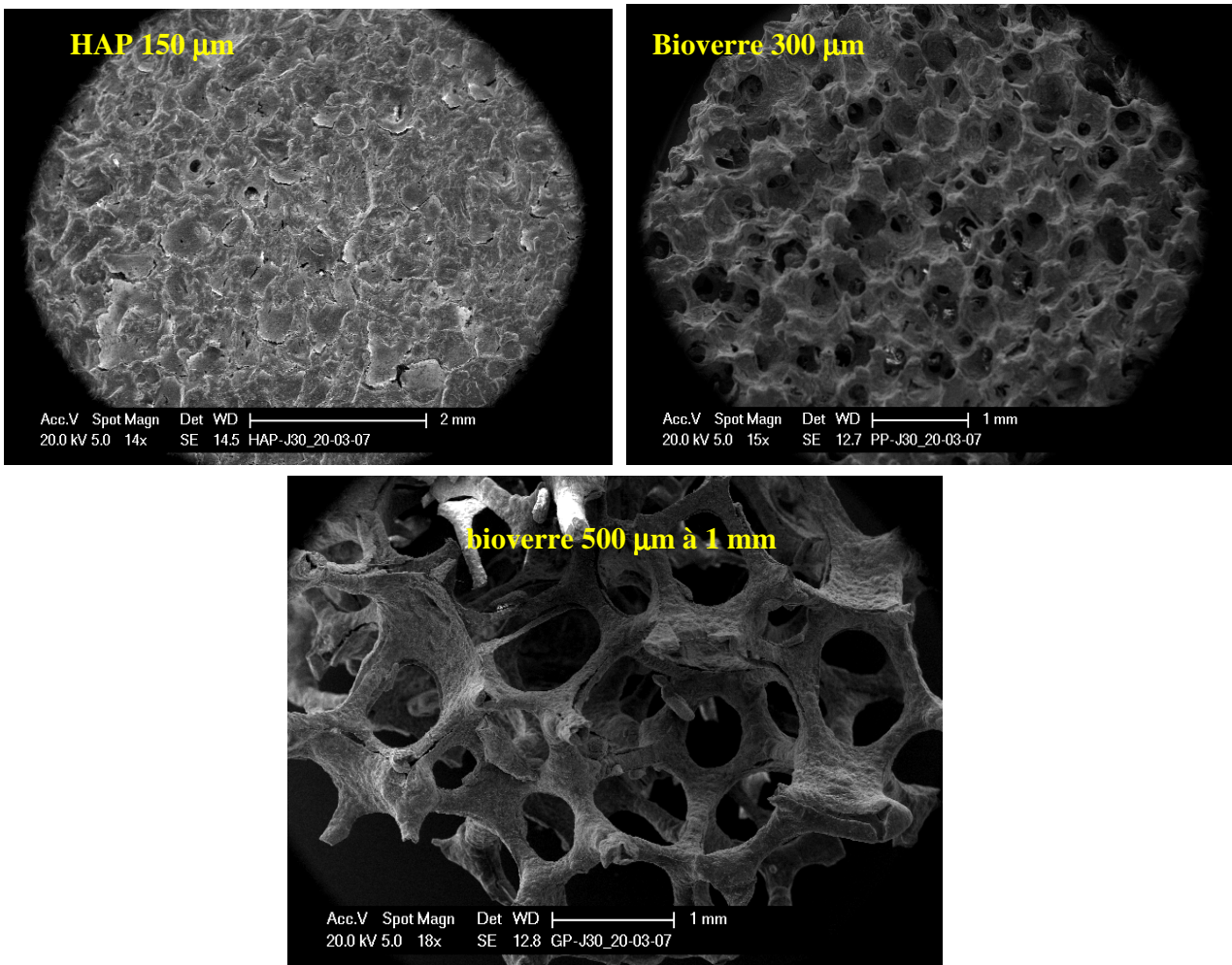


Figure D-17 : clichés MEB en profondeur de poreux à gros pores après 18 jours de culture

La figure 18 montre l'influence de la taille des pores sur la colonisation cellulaire des poreux à 30 jours de culture. Plus la taille des pores est petite et plus les cellules recouvrent la surface. Dans le cas des blocs poreux à gros pores ( $> 500\mu\text{m}$ ), les cellules colonisent tout le volume du matériau.



**Figure D-18 : surface de blocs poreux après 30 jours de culture – influence de la taille des pores sur la colonisation cellulaire**

La figure 19 montre les clichés obtenus en microscopie confocale sur des blocs poreux mis en contact avec les cellules pendant différents temps. La couleur verte correspond à la fluorescence du collagène type I, le gris à la réflexion du substitut et le rouge à la fluorescence des cellules. A 9 jours, du collagène type I est déjà formé. Avec le temps la colonisation cellulaire continue à la surface et commence à gagner la profondeur alors que la synthèse du collagène s'intensifie et devient plus importante. Cela aboutit à la formation d'un tapis qui recouvre la surface du substitut et commence à combler les pores en commençant par les micropores.



**Figure D-19 : clichés obtenus par microscopie confocale sur des blocs poreux de bioverre mis en contact avec les cellules pendant différents temps**

Vrouwenvelder et al. [9,10] observent qu'après 6 jours de culture, les ostéoblastes forment une couche confluyente dense sur la surface du bioverre 45S5 et commencent à synthétiser du collagène type I après 12 jours. Ce temps est plus faible dans notre étude certainement à cause du prétraitement. En effet, El Ghannam et al [8,11] ont montré que l'adhésion cellulaire ainsi que les fonctions des cellules et leur différenciation sont améliorés significativement lorsque le verre bioactif subit une modification de surface conduisant à la formation d'une couche d'HAC recouverte de protéines de sérum.

Avec un long temps de culture les observations nous montrent que les cellules pénètrent en profondeur des poreux après avoir bien colonisé la surface. La profondeur maximale d'observation de la pénétration des cellules est de 659  $\mu\text{m}$  pour les poreux à gros pores et 620  $\mu\text{m}$  pour les poreux à petits pores. Cette profondeur correspond à la limite d'observation par microscopie confocale. La profondeur de pénétration maximum observable des cellules dans les blocs d'HA/TCP est de 467  $\mu\text{m}$ . Ce résultat est à relier à l'architecture des poreux. Les blocs d'HA/TCP sont réalisés par ajout de grains de polymères, les structures résultantes sont donc moins interconnectées que celles obtenues avec le bioverre par imprégnation de mousse. De plus, la taille des pores est plus petite pour les blocs d'HAC/TCP.

Effah Kaufmann et al. [12] qui ont réalisé des cultures d'ostéoblastes sur des blocs poreux à base de bioverre ont montré que les cellules pénètrent les échantillons jusqu'à des distances comparables à la dimension des pores. De plus, ils ont montré que les cellules mises en contact avec les blocs poreux présentent un haut niveau d'activité de la phosphatase alcaline et produisent une matrice extracellulaire qui se minéralise pour former une apatite carbonatée non stoechiométrique avec inclusion de protéines. Ishaug et al. [13] ont étudié la formation d'os *in vitro* par culture de cellules de la moelle dans des structures 3D biodégradable à base de poly(DL-Lactic-co-glycolic-acid). Trois structures polymère de 90% de porosité avec des tailles de pores de 150-300  $\mu\text{m}$ , 300-500  $\mu\text{m}$ , et 500-710  $\mu\text{m}$  ont été examinés sur 56 jours de culture. Les auteurs ont mesurés un maximum de pénétration des cellules de  $240 \pm 82 \mu\text{m}$  pour des pores de 300-500  $\mu\text{m}$ . Contrairement à ces deux dernières études, El Ghannam et al. et Ducheyne et al. [14-16] ont montré une grande déposition de tissus osseux à travers l'intégralité des échantillons poreux de bioverre par culture d'ostéoblastes provenant du haut de la boîte crânienne de rats. La différence entre ces résultats peut provenir du type de cellule, la composition de surface des verres, l'architecture des blocs poreux utilisés et de la technique d'observation.

### Chapitre D-3 : Implantation in vivo

Les implantations in vivo ont été réalisées par l'entreprise Noraker en collaboration avec l'école vétérinaire de Lyon.

#### - Implantation en intra-musculaire et en sous-cutanée

Les matériaux implantés en intramusculaire et en sous-cutané sont des blocs de bioverre et de l'hydroxyapatite sous forme de granules. La durée d'implantation est de 4 semaines. La photo représente le dos du lapin au bout de 4 semaines.

L'implantation en intramusculaire et en sous-cutanée des blocs de bioverre a été faite pour vérifier l'innocuité de ces matériaux. Les résultats de l'implantation sur 3 lapins au bout de 4 semaines, suivant le schéma ci-dessous, montrent qu'il n'y a pas de signes apparents d'infection ni d'inflammation. Les analyses des matériaux implantés sont en cours.

Tête	
Gauche, Intramusculaire	Droite, sous-cutanée
Bioverre	Bioverre
Hydroxyapatite	Hydroxyapatite
Bioverre +	Bioverre +
Queue	



Figure D-1 : Représentation des implantations effectuées chez le lapin.

#### - Implantation en site osseux

Des implantions de blocs de bioverre poreux frittés à 800°C ont été implantés dans le fémur de lapin pendant 2, 8 et 12 semaines. Les analyses histologiques des blocs implantés sont en cours.

---

## REFERENCES DU CHAPITRE D2

- 1- J. Hlavac, D. Rohanova, A. Helebrant. The effect of tris buffer on the leaching behavior of bioactive glass-ceramics. *Ceram-Silikati*, 1994, vol. 38, pp. 119-122
- 2- JP Zhong, DC. Greenspan, JW. Feng. A microstructural examination of apatite induced by Bioglass® in vitro. *J. Mater. Sci.: Mater. In Med.*, 2002, vol. 13, pp. 321-326.
- 3- DT. Yamaguchi, JT Huang, D. Ma. Regulation of gap junction intercellular communication by pH in MC3T3-E1 osteoblasts cells. *J. Bone Miner. Res.*, 1995, vol.10, pp. 1891-1899.
- 4- HS. Lon, M. Hughes-Fulford, M. Kumugawa, AC Pitts, KW. Snowdowne. Cytoplasmic pH influences cytoplasmic calcium in MC3T3-E1 osteoblast cells. *J. Bone Miner. Res.*, 1993, vol. 8, pp. 725-732.
- 5- J. Green, DT. Yamaguchi, CR. Kleeman, S. Muallem. Cytosolic pH regulation in osteoblasts. Interaction of Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> with the extracellular and intracellular faces of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J. Gen. Physiol.*, 1998, vol. 92, pp. 239-261.
- 6- LL. Hench. Bioactive ceramics: theory and clinical applications. In: OH. Anderson, A. Yli-Urpo, editors. *Bioceramics*, vol. VII. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1994, p. 3-14.
- 7- IA Silver, J. Deas, M. Erecinska. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass®, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials*, 2001, vol. 22, pp. 175-185
- 8- A. El-Ghannam, P. Ducheyne, IM. Shapiro. Formation of surface reaction products on bioactive glass and their effects on the expression of the osteoblastic phenotype and the deposition of mineralized extracellular matrix. *Biomaterials*, 1997, vol. 19, pp. 295-303.
- 9- WCA. Vrouwenvelder, CG. Groot, K. De Groot. Behavior of fetal rat osteoblasts cultured in vitro on bioactive glass and non reactive glasses. *Biomaterials*, 1992, vol. 13, pp.382-392
- 10- WCA. Vrouwenvelder, CG. Groot, K. De Groot. Better histology and biochemistry for osteoblasts cultured on titanium-doped bioactive glass: bioglass 45S5 compared with iron-, fluorine- and boron-containing bioactive glasses. *Biomaterials*, 1994, vol. 15, pp.97-106
- 11- A. El-Ghannam, P. Ducheyne, IM. Shapiro. Effect of serum proteins on the surface modified bioactive glass and hydroxyapatite. *J. Orthop. Res.*, 1999, vol. 17, pp. 340-345.
- 12- EAB. Effah Kaufmann, P. Ducheyne, IM. Shapiro. Effect of varying physical properties of porous, surface modified bioactive glass 45S5 on osteoblast proliferation and maturation. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, vol.52, pp. 783-796
- 13- SL. Ishaug, GM. Crane, MJ. Miller, AW. Yasko, MJ. Yaszemski, AG. Mikos. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997, vol. 36, pp. 17-28.

14- A. El-Ghannam, P. Ducheyne, JM. Shapiro. A bioactive glass template for the in vitro synthesis of bone. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1995, vol. 29, pp. 359-370.

15- P. Ducheyne, A. El Ghannam, I. Shapiro. Effect of bioactive glass templates on osteoblast proliferation and in vitro synthesis of bone like tissue. *J. Cell. Biochem.*, 1994, vol. 56, pp. 162-167.

16- A. El Ghannam, P. Ducheyne, I. Shapiro. A new bioactive glass template for the synthesis of a bone like tissue in vitro. In: P. Ducheyne, D. Christiansen, editors. *Bioceramics 6*. Oxford, United Kingdom: Butterworth-Heinemann Ltd, 1993, p143-150.

## CONCLUSION GENERALE

En vue d'obtenir une totale maîtrise du protocole d'élaboration des blocs poreux à base de bioverre, une démarche d'optimisation allant du broyage des poudres jusqu'aux conditions de frittage, en passant par les conditions de dispersion, a été entreprise.

La méthode choisie pour la synthèse est la méthode traditionnelle par fusion d'un mélange de poudres inorganiques. Après trempe à l'eau on obtient des fragments de bioverre qui doivent être transformés en poudre. L'optimisation des conditions de broyage a donné lieu à des poudres de granulométrie proches de 1 $\mu$ m.

Le procédé d'élaboration de blocs poreux implique des températures pouvant aller jusqu'à 1000°C. Nous avons donc identifié les transformations structurales subies par le matériau et leur impact sur le frittage de compacts de poudres dans ce domaine de température. Des observations en montée de température in situ dans un microscope électronique à balayage environnemental ont notamment été réalisées. Un contrôle des transformations a été réalisé par l'intermédiaire de cinétiques isothermes et non isothermes.

Lorsqu'on traite thermiquement le bioverre à  $T_{g1} = 550^\circ\text{C}$ , le verre passe par sa transition vitreuse. Il devient alors de moins en moins visqueux et induit une densification qui est identifiée comme « premier stade » de frittage. La densification entre 550°C et 580°C peut être modélisée par le modèle de Frenkel décrivant le frittage des verres par flux visqueux. Vers  $T_s = 580^\circ\text{C}$ , le bioverre 45S5 subit une séparation de phase vitreuse qui engendre une phase riche en silice et une riche en phosphate. Ce phénomène entraîne un arrêt progressif du frittage. Le frittage entre le début et la fin de la séparation de phase peut être modélisée par le modèle de Frenkel adapté par Prado en présence d'une transformation concurrente au frittage. Cette modélisation nous a permis de connaître précisément  $T_s$  ce qui n'est pas possible avec la plupart des techniques physico-chimiques classiques, ainsi qu'avec la diffusion de la lumière puisque le silicium et le phosphore ont des numéros atomiques très proches. Nous avons montré également que ce premier stade de frittage augmentait avec la vitesse de chauffe dû à un écart entre  $T_{g1}$  et  $T_s$  plus important. Puis, vers 620°C, lorsque la séparation de phase se termine, la phase riche en silice cristallise directement sous forme de  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  avec des ions  $\text{PO}_4^{2-}$  en insertion dans le réseau. Nous sommes parvenus à mettre en place des courbes Température-Temps-Transformation permettant de suivre cette cristallisation. Après cristallisation, les grains de bioverre sont constitués d'une coquille cristalline renfermant la phase vitreuse. Vers 800°C, une nouvelle phase cristallise, la silicorhénanite, grâce aux ions  $\text{PO}_4^{2-}$  en insertion dans le réseau de silice de la phase cristalline principale. Cette phase n'a jamais été identifiée auparavant. Elle fait suite à une seconde transition vitreuse de la phase amorphe restante vers 750°C qui entraîne une mobilité des atomes favorables à un réarrangement. Cette dernière transformation n'induit un second stade de frittage à partir de  $T_{g2} = 850^\circ\text{C}$ . Ce retard de densification est attribué au fait que la phase vitreuse restante est emprisonnée dans les grains de poudres par une coquille cristalline. On pense que cette phase amorphe remonte en surface des grains par mûrissement d'Ostwald. Le frittage continue jusqu'à la fusion du matériau, vers 1100°C. Le frittage des poudres de bioverre 45S5 se déroule donc en deux étapes principales : entre  $T_{g1}$  et  $T_c$ , et entre  $T_{g2}$  et la fusion de la vitro-céramique. Le premier stade qui correspond à un pourcentage de retrait linéaire est globalement moins important que le second. Des cinétiques isothermes à 550°C réalisées sur des poudres montrent qu'il n'est pas possible de densifier correctement le matériau sans cristallisation partielle de la phase amorphe.

Les différentes transformations structurales et leur influence sur le frittage du bioverre étant identifiées, les poudres brutes doivent être mise en suspension et la barbotine optimisée. La dispersion des poudres de bioverre a été étudiée dans l'eau et dans l'éthanol. Ceci implique

## Conclusion générale

l'utilisation d'un dispersant adapté à chaque type de milieu dont la quantité a été optimisée. Toutes les barbotines réalisées présentent un comportement rhéofluidifiant qui a été mis à profit lors de l'élaboration de blocs poreux.

Nous sommes parvenus à obtenir des blocs poreux à base de bioverre par l'intermédiaire de deux techniques, l'imprégnation de mousse de polyuréthane et le freeze casting. Les blocs obtenus sont homogènes, de porosité ouverte et interconnectée. Les techniques utilisant des billes de PMMA avec le gel casting ou l'imprégnation de préforme de billes frittées ne sont pas un succès et nécessitent des études plus approfondies notamment sur la formulation des barbotines. La technique de l'imprégnation de mousse permet d'obtenir des poreux de tailles de pores et de formes variables. L'avantage de cette technique est que les structures obtenues sont fortement interconnectées et peuvent être à porosité évolutive en combinant des mousses à petits et gros pores par exemple. Par contre, l'inconvénient majeur de cette technique est qu'il n'est pas possible d'obtenir un poreux résistant sans cristallisation. Un traitement thermique de frittage à 1000°C est indispensable pour que les structures aient une bonne tenue mécanique. De plus, les défauts créés par le départ de la mousse affaiblissent les poreux. Nous avons vu qu'il était possible de combler ces défauts par double imprégnation mais ce procédé est délicat et il est difficile de ne pas casser les structures lors de ce procédé. Nous avons également évoqué la possibilité d'une bioactivité évolutive des poreux. Enfin, pour une même taille de pore, le contrôle du taux de porosité tout en gardant une structure homogène est difficile. Ainsi pour les gros pores, des porosités relatives de 90% sont obtenues. Baisser ce taux reviendrait à boucher certains pores et donc diminuer l'accessibilité des cellules lors de la colonisation *in vivo* du matériau. Parallèlement, la technique du freeze casting permet d'obtenir également des structures de toute formes, homogènes et interconnectées. Un contrôle du taux relatif de porosité est alors possible en variant le taux de matière sèche des barbotines. Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet un contrôle complet du cycle de frittage puisque aucun déliantage n'est nécessaire. Il est donc possible de densifier les poreux sans cristalliser. De plus, la taille des pores peut être modulée par la vitesse de congélation. Par contre il n'est pas encore possible d'obtenir des macropores de taille supérieure à 150 microns.

La bioactivité du bioverre sous forme de poudre traitée ou non thermiquement et sous forme de bloc poreux a été étudiée. On voit que la transformation du bioverre en vitrocéramique a pour effet de diminuer la vitesse de formation de la couche d'HAC mais ne l'inhibe pas. Après 1 mois de traitement, toutes les poudres étudiées présentent le même diffractogramme de rayons X montrant la transformation totale du matériau en hydroxyapatite. Nous avons montré que les poudres cristallisées deviennent de plus en plus amorphe avec le temps d'immersion dans du SBF avant de donner lieu à une hydroxyapatite cristallisée.

Enfin, un protocole de culture cellulaire a été mis en place afin de palier à la nécrose cellulaire observée lorsque les blocs poreux sont introduit directement dans le milieu de culture en présence d'ostéoblastes. Ce protocole consiste à pré traiter les blocs poreux dans du SBF afin de former une couche d'HAC à leur surface qui stabilisera leur dissolution et donc permettra de diminuer l'alcalinisation du milieu. Ce prétraitement a permis la réalisation de cinétiques de cultures cellulaires. Nous avons montré que les ostéoblastes adhéraient aux blocs poreux, proliféraient et créaient de la matrice extracellulaire. De plus la structure interconnectée des blocs permet la migration des cellules dans le volume du matériau.



### Perspectives :

Suite à ce projet de thèse, il existe différentes perspectives qui sont soit spécifiques à ce travail, soit constituent un élargissement du sujet.

Concernant ce travail, du point de vue de l'élaboration de blocs poreux, il serait intéressant d'optimiser les différentes techniques mise en œuvre dans cette thèse, notamment celle concernant l'imprégnation de préformes de PMMA. Suite à cette optimisation des procédés d'élaboration, une évaluation des propriétés mécaniques et biologiques en relation avec l'architecture des poreux devrait permettre d'obtenir une architecture idéale. En ce qui concerne la caractérisation biologique des poreux de bioverre 45S5, des cultures de cellule sous charge permettrait de vérifier les capacités d'osteoinduction de ces matériaux en tant que support à l'ingénierie tissulaire.

Enfin, il ne faut pas oublier que le bioverre 45S5 et la vitrocéramique qui en dérive sont des matériaux fragiles qui ne peuvent être implantés sur des sites porteurs. Afin de ce rapprocher le plus possible des propriétés mécaniques de l'os naturel, un composite vitrocéramique/polymère doit être créé. Les poreux obtenus lors de ce travail de thèse pourrait donc servir de base à l'imprégnation de polymère.

FOLIO ADMINISTRATIF

THESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

NOM : LEFEBVRE	DATE de SOUTENANCE : 5/11/2007
Prénoms : Leïla	
TITRE : Développement de bioverre poreux osteoinducteurs pour application à l'orthopédie et à l'ingénierie tissulaire	
NATURE : Doctorat	Numéro d'ordre : 05 ISAL
Ecole doctorale : Ecole Doctorale Matériaux de Lyon	
Spécialité : Génie des matériaux	
Cote B.I.U. - Lyon : T 50/210/19 / et bis	CLASSE :
<b>RESUME :</b>	
<p>Ce mémoire porte sur le développement de substituts osseux macroporeux à base de bioverre 45S5. Ce verre est obtenu par fusion de poudre inorganique et trempe. Sa haute teneur en sodium et calcium ainsi que la présence de phosphore rendent ce matériau instable en présence de solutions aqueuses, ce qui lui confère une bioactivité élevée, c'est-à-dire une grande capacité à favoriser les processus conduisant à la genèse d'un os. Cette bioactivité est mise en évidence par la précipitation d'Hydroxyapatite carbonatée (HAC) à la surface des particules.</p> <p>Le procédé d'élaboration de blocs poreux nécessite une étape de consolidation, frittage, mettant en jeu des températures allant jusqu'à 1000°C. Dans cet intervalle de température, le bioverre 45S5 subit différentes transformations structurales qui peuvent influencer ce processus ainsi que ses propriétés biologiques. Cinq transformations sont identifiées : une transition vitreuse, une démixtion engendrant une phase riche en silice et une phase riche en phosphore, la cristallisation de la phase riche en silice, la cristallisation de la phase riche en phosphore, une seconde transition vitreuse et la fusion de la vitro céramique. L'étude de ces transformations conduit à une meilleure connaissance du comportement thermique du bioverre 45S5 et apporte la possibilité d'un contrôle de la cristallisation par la mise en place de courbes TTT. Après identification précise de ces transformations, leur influence sur le frittage est mise en évidence, notamment par modélisation : un nouveau modèle a été mis au point pouvant s'appliquer à tous les verres subissant une démixtion préalable à la cristallisation. Des cinétiques isothermes de frittage montrent qu'il est impossible d'obtenir une tenue mécanique élevée en évitant la cristallisation, le traitement thermique doit obligatoirement se faire au dessus de 850°C, second stade significatif de frittage. Afin de connaître l'influence des transformations sur la bioactivité du verre, des cinétiques de formation d'HAC ont été réalisées. Celle-ci montrent que lorsque le degré de cristallisation de la phase <math>\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6</math> augmente, la bioactivité diminue mais reste encore présente. Par contre l'effet inverse est observé dans le cas de la cristallisation de la phase phosphate qui participerait donc au processus de corrosion du matériau.</p> <p>Des blocs poreux ont été réalisés par différentes techniques. Des blocs macroporeux de structure homogène et interconnectée ont été obtenus par freeze casting et par imprégnation de mousse. Cette dernière technique permet d'obtenir des substituts osseux de forme et de taille de pores variable. On montre que ces blocs sont également bioactifs et que l'épaisseur de la couche d'HAC formée à leur surface augmente avec le temps d'immersion. Ces blocs sont ensuite testés in vitro par l'intermédiaire de cultures cellulaires. Nous avons montré que des ostéoblastes pouvaient s'accrocher, proliférer et synthétiser de la matrice extracellulaire sur des blocs poreux à base de bioverre 45S5.</p>	
MOTS-CLES : bioverre, frittage, bioactivité, biomédical, substituts osseux	
Laboratoire (s) de recherche : MATEIS – UMR CNRS 5510, INSA Lyon	
Directeurs de thèse: J. Chevalier et D. Bernache-Assolant	
Président de jury : D. Hartmann	
Composition du jury : J. Chevalier, L. Gremillard, R. Zenati, D. Bernache-Assolant, AR. Boccaccini, A. Lerich, J. Michel, D. Hartmann	