



Elaboration par voie sol-gel de supports macroporeux à base de verre bioactif pour l'ingénierie tissulaire. Caractérisation par micro-PIXE de leurs réactivités in vitro et in vivo

Joséphine Lacroix

► To cite this version:

Joséphine Lacroix. Elaboration par voie sol-gel de supports macroporeux à base de verre bioactif pour l'ingénierie tissulaire. Caractérisation par micro-PIXE de leurs réactivités in vitro et in vivo. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2013. Français. ⟨NNT : 2013CLF22372⟩. ⟨tel-01065128⟩

HAL Id: tel-01065128

<https://theses.hal.science/tel-01065128v1>

Submitted on 18 Sep 2014

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.



HAL Authorization

UNIVERSITE BLAISE PASCAL – CLERMONT II

UFR Sciences et Technologies

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES N°757

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité chimie, sciences des matériaux

Par

LACROIX Joséphine

(Ingénieur chimiste, Master de chimie des matériaux)

**Elaboration par voie sol-gel de supports macroporeux à
base de verre bioactif pour l'ingénierie tissulaire.
Caractérisation par micro-PIXE de leurs réactivités *in
vitro et in vivo.***

Soutenue publiquement le 16 juillet 2013, devant la commission d'examen.

Président :	M.	G.	MONTAROU	
Examineurs :	Mme.	C.	COMBES	Rapporteur
	M.	E.	JALLOT	Directeur de thèse
	M.	J.	LAO	Co-directeur de thèse
	M.	P.	LAQUERRIERE	
	Mme.	I.	REICHE	Rapporteur

Remerciements

Ce travail de thèse a bénéficié de la contribution de nombreuses personnes que je suis ravie de pouvoir remercier à l'occasion de cette partie. Tout d'abord je tiens à remercier mon directeur de thèse, Edouard Jallot, ainsi que Jonathan Lao, pour leur encadrement et leur accueil. Leur exigence scientifique, leur confiance et leur goût de la recherche m'ont permis de progresser tout au long de cette thèse sans jamais baisser les bras.

Je tiens aussi à remercier Monsieur Gérard Montarou, Directeur de Recherche au Laboratoire de Physique Corpusculaire, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse ainsi que Mesdames Christèle Combes, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques de Toulouse, et Ina Reiche, Directrice de recherche au Laboratoire d'Archéologie Moléculaire et Structurale, pour avoir accepté de rapporter ce travail et pour les commentaires avisés qu'elles m'ont adressés. Je remercie également Monsieur Patrice Laquerrière, Professeur à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien de Strasbourg, pour avoir accepté de participer à ce jury.

J'exprime ma reconnaissance à Messieurs Alain Baldit et Alain Falvard pour leur accueil au sein du Laboratoire de Physique Corpusculaire.

Pour avoir eu la chance de réaliser des expériences au Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan je tiens à exprimer ma gratitude à son directeur, Philippe Moretto, ainsi qu'à tous les membres de l'équipe de la plateforme AIFIRA, et particulièrement à Stéphanie Sorieul, pour l'accueil toujours chaleureux qui nous a été réservé ainsi que pour leur aide précieuse et leur efficacité qui nous a permis de ne jamais repartir bredouille, même en cas de coupure d'électricité ou de faisceau capricieux !

Je voudrais aussi remercier Monsieur Jean-Marie Nedelec, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand pour son accueil à l'ICCF et son aide sur les caractérisations physico-chimiques des matériaux ainsi que pour m'avoir permis d'enseigner à l'ENSCCF pendant mes trois années de thèse. Cette expérience de l'enseignement restera pour moi une part très enrichissante de la thèse grâce notamment au contact avec des enseignants avec qui j'ai partagé les séances de TP et qui ont partagé avec moi un peu de leur

expérience, merci donc à Guillaume Renaudin, Marie-Elisabeth De Roy et Alexandra Pruneyras.

Cette thèse m'a offert la chance de travailler sur des échantillons biologiques grâce à une collaboration avec Monsieur Jean-Michel Sautier, Professeur au Laboratoire de Physiopathologie Orale et Moléculaire, et Monsieur Johny Nohra, doctorant à l'Université Saint Joseph de Beyrouth. Je remercie également les personnes ayant apporté leur aide bienvenue, Christian Bonhomme pour les analyses par RMN du strontium, Mhammed Benbakkar pour l'ICP-AES ainsi que Sandrine Renaudin pour la DRX et Xavier Dieudonné pour la spectroscopie infrarouge ainsi que pour son aide sur la compréhension des relations structure - propriétés des verres au strontium.

A l'heure de finir cette thèse j'ai une pensée pour tous ceux que j'ai croisé au cours de mes six années à Clermont-Ferrand, d'abord à l'ENSCCF puis en thèse. Je ne ferai pas la liste exhaustive de toutes ces personnes (par peur d'en oublier...) mais je leur dit merci pour avoir égayé les séances de TP, les longues journées de cours et les déjeunés au RU, pour les sessions de TLMVPSP et de QPUC entre les cours, pour les pauses thé au labo de chimie, les parties de Civilisation ou de Smallworld et tant d'autres bons souvenirs clermontois... Je pense particulièrement à Alexandre à qui je souhaite bon courage pour sa propre soutenance qui arrivera vite.

Je profite de cette occasion pour adresser un immense merci à ma famille pour leurs encouragements et pour cet esprit d'équipe (encore bien utilisé pour la préparation du pot) qui nous aide tous à avancer. Merci donc à mes parents, à Charlotte, Paul-Maxime et Marie-Alix.

Enfin, Cédric, merci pour tout !

Table des matières

Introduction	11
Partie A Généralités et méthodes.....	17
Chapitre 1 Biomatériaux et verres bioactifs	19
1.1. Les biomatériaux	19
1.1.1. Qu'est-ce qu'un biomatériau ?.....	19
1.1.2. Quels matériaux ? L'importance de la notion de biocompatibilité.....	19
1.1.3. Les matériaux bioactifs.....	20
1.2. Les substituts osseux	20
1.2.1. Description du tissu osseux	20
1.2.2. Description physico-chimique de l'os	23
1.2.3. Les biomatériaux de l'os.....	24
1.3. Les verres bioactifs.....	26
1.3.1. Les verres.....	26
1.3.2. Le processus de bioactivité.....	27
1.3.3. Influence de la composition des verres bioactifs sur leurs propriétés et sur leur réactivité.....	29
1.4. Synthèse de verres par la méthode sol-gel.....	34
1.4.1. Principe de la méthode sol-gel.....	34
1.4.2. Réactions chimiques lors de la polymérisation	35
1.4.3. Avantages et inconvénients de la méthode sol-gel.....	39
Chapitre 2 L'ingénierie tissulaire.....	41
2.1. Principe	41
2.2. Le scaffold.....	42
2.2.1. Ses propriétés.....	42
2.2.2. Les différentes voies de synthèse	44
2.3. Conclusion.....	51
Chapitre 3 Techniques d'analyse.....	53
3.1. Méthodologie de l'étude.....	53
3.2. Analyses chimiques et structurales.....	53
3.2.1. ICP-AES	53
3.2.2. Spectroscopie d'absorption infrarouge	54
3.2.3. Diffraction des Rayons X	55

3.3. Analyses morphologiques par microscopies électroniques.....	56
3.3.1. Production des électrons et optique électronique	56
3.3.2. Microscopie Electronique à Balayage	57
3.3.3. Microscopie Electronique en Transmission.....	58
3.4. Analyse de porosité.....	58
3.4.1. Adsorption d'azote	58
3.4.2. Porosimétrie mercure.....	62
3.4.3. Mesure de porosité par traitement des images MEB	63
3.4.4. Comparaison des deux méthodes	64
3.5. Caractérisation de la bioactivité <i>in vitro</i>	65
3.5.1. Préparation du SBF	66
3.5.2. Protocole pour l'étude de l'interaction entre un matériau et du SBF	66
3.5.3. Préparation des échantillons pour l'analyse par faisceaux d'ions	67
3.6. Imagerie chimique quantitative par micro-faisceaux d'ions.....	68
3.6.1. Procédure analytique	68
3.6.2. Justification du choix de la PIXE par rapport à une autre méthode d'analyse élémentaire	76
3.6.3. Evaluation des effets d'irradiation.....	78
3.6.4. Présentation du dispositif expérimental.....	79
 Partie B Mousses de verre binaire.....	 83
 Chapitre 4 Etude de l'influence de la macroporosité des mousses de verre sur leur réactivité et optimisation du procédé de moussage	 85
4.1. Influence de la macroporosité sur la réactivité	85
4.1.1. Synthèse des mousses de verre bioactif.....	85
4.1.2. Caractérisation des mousses	87
4.1.3. Etude de la réaction de minéralisation en surface des pores par micro- faisceaux d'ions.....	89
4.1.4. Etude du processus de bioactivité de la mousse M75-B	97
4.2. Amélioration du procédé en vue d'éliminer l'acide fluorhydrique	99
4.2.1. Stratégie de remplacement du HF.....	99
4.2.2. Synthèse.....	100
4.2.3. Caractérisation	102
4.2.4. Etude de la réaction de minéralisation dans le SBF	105
4.3. Conclusion.....	109
 Chapitre 5 Mousses méso-structurées : vers une porosité multi-échelle contrôlée ?	 111

5.1. Mésostructuration des verres sol-gel	111
5.1.1. Intérêt des verres mésostructurés.....	111
5.1.2. Méthode d'introduction d'une mésoporosité structurée	111
5.1.3. Structures formées	113
5.2. Moussage avec HF en présence d'un tensioactif supplémentaire	114
5.2.1. Protocole de synthèse	114
5.2.2. Caractérisation de la macroporosité.....	115
5.2.3. Caractérisation de la mésoporosité	115
5.2.4. Etude de l'interaction de la mousse M75-F127 avec du SBF	118
5.3. Moussage sans HF en présence d'un tensioactif supplémentaire	122
5.3.1. Protocole de synthèse	122
5.3.2. Caractérisation	123
5.3.3. Etude de l'interaction avec du SBF	125
5.4. Conclusion.....	131
Chapitre 6 Premiers essais <i>in vivo</i> d'une mousse de verre bioactif... 133	
6.1. Etude histologique	133
6.2. Cartographies élémentaires et images en électrons rétrodiffusés.....	135
6.3. Mesures locales de concentrations	137
6.4. Profil de concentration à l'interface os-« verre ».....	139
6.5. Conclusion.....	140
Partie C Ajout d'un élément thérapeutique : le strontium ..141	
Chapitre 7 Verres au strontium : relation cinétique de réactivité - structure	143
7.1. Poudres de verre au strontium.....	143
7.1.1. Elaboration et caractérisations.....	143
7.1.2. Caractérisation des verres au strontium.....	145
7.2. Comparaison des cinétiques de réactivité	151
7.2.1. Modèle d'évaluation des cinétiques.....	151
7.3. Poudres de verre au strontium obtenues par voie sol-gel catalysée au HF. 155	
7.4. Conclusion.....	159
Chapitre 8 Etude d'une mousse de verre au strontium.....	161
8.1. Elaboration et caractérisation d'une mousse de verre bioactif au strontium... ..	161
8.1.1. Elaboration.....	161
8.1.2. Caractérisation de la texture	161

8.1.3.	Caractérisation de l'ultra-macroporosité	162
8.2.	Etude de l'interaction entre les mousses M75Sr5 et M75-B et le SBF	163
8.2.1.	Evolution de composition du SBF	163
8.2.2.	Cartographies élémentaires.....	165
8.2.3.	Mesures locales de concentrations.....	167
8.3.	Conclusion.....	169
Chapitre 9	Premiers essais d'implantation <i>in vivo</i> de verre au strontium	171
9.1.	Etude des coupes histologiques	171
9.2.	Cartographies élémentaires obtenues par faisceaux d'ions	172
9.3.	Mesures locales de concentrations	173
9.4.	Profils de concentration	176
9.5.	Conclusion.....	178
Partie D	Composites.....	179
Chapitre 10	Scaffolds composites poudre de verre dans une matrice de gélatine	181
10.1.	Vers une démarche biomimétique dans l'élaboration des biomatériaux....	181
10.1.1.	Composites et hybrides	181
10.1.2.	Les polymères biocompatibles.....	182
10.1.3.	Quelle voie de synthèse ?.....	183
10.2.	Etude préliminaire des composites verre-gélatine	184
10.2.1.	Elaboration et caractérisation.....	184
10.2.2.	Etude morphologique	187
10.2.3.	Premiers essais mécaniques	188
10.2.4.	Réactivité et résistance à la dissolution.....	189
10.3.	Conclusion.....	191
Chapitre 11	Etude <i>in vitro</i> du scaffold composite à matrice gélatine réticulée	193
11.1.	Réticulation de la gélatine.....	193
11.2.	Evolution du SBF lors de l'immersion du scaffold composite	195
11.3.	Cartographies élémentaires.....	196
11.4.	Mesures locales de concentration.....	198
11.5.	Conclusion.....	200
Conclusions générales et perspectives	201	

Annexe : Théorie de l'imagerie chimique quantitative par micro-faisceaux d'ions.....	207
1.1. L'interaction ions - matière	209
1.2. Les différentes techniques d'analyse par faisceaux d'ions	210
1.3. Principe de la méthode PIXE	212
1.3.1. Théorie.....	212
1.3.2. Rendement de fluorescence	215
1.3.3. Sections efficaces.....	216
1.3.4. Bruit de fond et interférences spectrales lors d'une analyse.....	219
Bibliographie	225

Introduction

Dans la mythologie grecque, la mère d'Achille, Thétis, souhaitait à tout prix rendre ses enfants immortels, ce qui la conduisit à plonger Achille dans les eaux du Styx, en omettant malheureusement son talon, et la suite est bien connue, il deviendra le point faible d'Achille. Cependant, une autre version de l'histoire existe, elle raconte que pour rendre son fils immortel, Thétis l'enduisit d'ambroisie et le plongea dans le feu pour brûler sa part humaine. Son père le sauva à temps, mais Achille fût brûlé au pied et l'un de ses os en fût endommagé. Le centaure Chiron alla alors déterrer le géant Damysos, connu pour sa grande rapidité, préleva l'os nécessaire et le greffa à Achille qui acquit la vélocité du géant, ce qui explique qu'il soit appelé « Achille au pied léger » dans l'Illiade d'Homère. Ce mythe témoigne de l'idée précoce de transplantation qui germe dans l'esprit humain à laquelle répond, comme un écho, le principe de l'allogreffe qui consiste à prélever un greffon sur un donneur décédé pour l'implanter ensuite et aider à réparer un tissu endommagé chez un patient.

Cependant, la progression des connaissances médicales permet de savoir aujourd'hui que cette solution présente de nombreux inconvénients, dont les principaux sont les risques de rejet et de contamination. Une meilleure solution consiste à prélever le tissu chez le patient qui en a besoin, dans un site autre que celui à traiter (cette méthode est appelée autogreffe) mais rencontre le problème évident de la limitation des quantités disponibles. Une autre idée a alors émergé, celle de ne pas prendre un tissu déjà construit chez le patient, ou sur un donneur, mais de le fabriquer en laboratoire en le faisant pousser à partir de cellules du patient. Il est déjà possible de cultiver de la peau pour traiter les patients atteints de brûlures, sur le même principe les chercheurs ont pour projet de cultiver différents types de cellules afin de synthétiser les différents tissus et organes humains, comme le tissu osseux qui est celui auquel ce travail de thèse s'intéresse.

Cette approche s'appelle l'ingénierie tissulaire et consiste en la culture de cellules d'un patient sur un support, appelé « scaffold », à l'aide de facteurs de croissance. En amont de cette étape de reconstruction, l'apport des physico-chimistes est essentiel pour l'élaboration de ce support qui doit posséder des propriétés spécifiques en fonction de l'organe ou du tissu visé, et c'est sur ce point que porte ce travail de thèse.

Les critères de sélection d'un scaffold sont stricts, le matériau qui le constitue devant avant tout ne représenter aucun risque de toxicité pour les cellules et ensuite pour l'organisme hôte. Les candidats susceptibles de correspondre font partie de la famille des biomatériaux qui regroupe toutes les catégories de matériaux : polymères, métaux, verres et céramiques, matériaux naturels mais aussi composites. Parmi tous ces matériaux, les verres bioactifs sont

particulièrement prometteurs. Ils présentent de nombreux avantages tels que la capacité de se lier à l'os par la formation d'une couche minérale de composition proche de celle de la phase minérale de l'os ou encore leur capacité à être résorbés par un milieu vivant. L'essor des technologies sol-gel a de plus permis d'étendre les domaines de composition envisageables pour ces matériaux en améliorant leur bioactivité et facilite le dopage par des éléments présentant un intérêt physiologique. De plus, l'utilisation de la voie sol-gel permet l'obtention de verres mésoporeux (comportant des pores de 2 à 50 nm). Par ce procédé, cette porosité peut même être organisée et ainsi les propriétés de surface, qui régissent la réactivité des verres, peuvent être ajustées pour contrôler leur bioactivité. De plus, l'existence d'une mésoporosité importante peut permettre l'incorporation de molécules thérapeutiques dans le matériau final pour obtenir un relargage local.

La première partie de ce travail permettra de présenter plus en détail les biomatériaux de l'os et plus particulièrement les verres bioactifs élaborés par voie sol-gel ainsi que le principe de l'ingénierie tissulaire et les voies de mise en forme de scaffolds. Cette partie présentera aussi les différentes techniques qui seront employées pour la caractérisation des matériaux de l'étude et en particulier l'émission de rayons X induite par particules chargées (PIXE).

La deuxième partie portera sur l'étude de mousses de verre bioactif contenant uniquement du SiO_2 et du CaO , cette composition ayant fait ses preuves en termes d'activité biologique. Cette partie s'attachera à déterminer une morphologie prometteuse grâce aux analyses par la méthode PIXE d'échantillons immergés dans un fluide biologique de synthèse. Un deuxième objectif sera de tenter d'améliorer le procédé de synthèse en supprimant un réactif hautement toxique, mais aussi d'améliorer le matériau final par l'organisation de ses mésopores qui permet de contrôler ses propriétés de surface. La méthode PIXE sera ensuite utilisée pour étudier l'interface os - verre après implantation *in vivo* d'une mousse de verre bioactif.

La troisième partie aura pour objectif d'étudier l'effet de l'ajout d'un élément thérapeutique dans le verre : le strontium. Cet élément est capable d'influer positivement sur la régénération osseuse. Son influence sur les propriétés physico-chimiques du verre sera étudiée avant de réaliser une mousse de verre bioactif au strontium dont la réactivité *in vitro* sera étudiée grâce à l'analyse PIXE. Enfin, des premiers résultats de l'étude par la méthode PIXE de l'interface os – verre au strontium après implantation de poudres *in vivo* seront présentés.

La dernière partie de ce travail portera sur une voie différente pour l'élaboration de scaffolds qui permet l'obtention de composites verre-gélatine à la porosité mieux contrôlée que celle obtenue par moussage. Ces matériaux, de par leur nature de composites, devraient présenter

des propriétés mécaniques améliorées par rapport aux scaffolds de verre. Pour finir, la bioactivité *in vitro* de ce matériau sera étudiée par la méthode PIXE.

Partie A Généralités et méthodes

Chapitre 1 Biomatériaux et verres bioactifs

1.1. Les biomatériaux

1.1.1. Qu'est-ce qu'un biomatériau ?

Il n'est pas facile de donner une définition exacte d'un biomatériau, à l'origine défini comme « un matériau non-vivant utilisé dans un système médical destiné à interagir avec des systèmes biologiques »¹, une deuxième définition, plus récente, affine la définition en « un matériau destiné à interagir avec des systèmes biologiques pour évaluer, réparer, augmenter, ou remplacer, n'importe quel tissu, organe ou fonction du corps »².

Il s'agit d'une définition assez large qui regroupe un grand nombre de systèmes aussi différents par la nature des matériaux employés que par leurs fonctions : lentilles de contact, cœur artificiel, vaisseaux sanguins artificiels, prothèses de hanche, fils de suture, prothèses dentaires, etc... Il apparaît donc que la notion de biomatériau recouvre une grande variété de matériaux mais, s'il est une chose primordiale, c'est la notion d'interaction avec le vivant. C'est en fonction de leur interaction avec les tissus vivants que les biomatériaux sont jugés et classés.

1.1.2. Quels matériaux ? L'importance de la notion de biocompatibilité

De nombreux matériaux peuvent être utilisés comme biomatériaux, mais une notion très importante doit être prise en compte, il s'agit de la biocompatibilité. En fonction des réactions ayant lieu à l'interface du matériau et du milieu vivant, différents types de matériaux sont distingués³:

- Les matériaux bioinertes
- Les matériaux bioincompatibles
- Les matériaux biocompatibles

Les matériaux bioinertes ne réagissent pas avec les milieux biologiques et induisent généralement leur encapsulation par du tissu fibreux. Au contraire, les matériaux bioincompatibles sont corrodés par le milieu biologique et libèrent des éléments toxiques. Les matériaux biocompatibles réagissent eux aussi avec le milieu, mais les produits de corrosion ne sont pas toxiques, ou en quantité trop faible pour présenter une action négative sur les tissus. Ces produits de corrosion peuvent même avoir une action positive, par exemple celle de favoriser l'adhésion ou la croissance cellulaire.

1.1.3. Les matériaux bioactifs

En plus de leur biocompatibilité, certains matériaux peuvent être bioactifs, c'est-à-dire qu'ils ont la capacité de se lier aux tissus vivants grâce à une série de réactions biophysiques et biochimiques permettant la création d'une interface plus stable qu'avec les autres biomatériaux⁴. Il existe deux classes de matériaux bioactifs appelées classe A et classe B. Les matériaux de classe B sont uniquement ostéoconducteurs, c'est-à-dire qu'ils permettent la migration des cellules osseuses, ils sont alors progressivement colonisés et se lient lentement à l'os⁵. Les matériaux bioactifs de classe A sont aussi ostéoconducteurs, mais ils sont de plus ostéoinducteurs c'est-à-dire qu'ils induisent la différenciation des cellules osseuses par stimulation biochimique (par les espèces relarguées lors de leur dissolution), ils favorisent la prolifération des cellules osseuses et peuvent ainsi se lier rapidement à l'os, et même aux tissus mous.

1.2. Les substituts osseux

Il existe donc différents matériaux utilisables pour des applications médicales, pour connaître les matériaux adaptés à la réparation du tissu osseux il convient tout d'abord de comprendre comment ce tissu est organisé.

1.2.1. Description du tissu osseux

L'os est un tissu conjonctif rigide. Il possède quatre fonctions dans le corps humain :

- Il sert de support mécanique
- Il permet la locomotion
- Il fournit une protection aux organes (comme les os du crâne ou de la cage thoracique)

- Il constitue un réservoir métabolique en sels minéraux qui seront libérés ou stockés en fonction de leur concentration dans le sang

L'os a une structure complexe sur plusieurs niveaux. Du point de vue macroscopique il existe deux grands types d'os : l'os cortical (os compact) qui est dense et l'os trabéculaire (os spongieux) qui est poreux et donc beaucoup moins dense que l'os cortical. L'os cortical est la partie la plus résistante de l'os, celle qui résiste aux déformations, elle se trouve généralement à la périphérie de l'os alors que l'os poreux se trouve à l'intérieur (Figure 1-1). Bien que dense, l'os cortical est parcouru par des canaux appelés canaux de Havers. L'os cortical est fait de cylindres parallèles entre eux appelés ostéons au centre desquels se trouvent les canaux de Havers qui permettent la vascularisation et donc la survie des cellules osseuses.

A l'échelle microscopique, l'os est principalement composé d'une phase minérale (~70%) et d'une phase organique (~30%) qui est elle-même constituée de collagène à plus de 90%. Le collagène est présent sous forme de fibres. La matrice organique, appelée ostéoïde, est synthétisée par des cellules appelées ostéoblastes et c'est à sa surface que va se produire le processus de minéralisation au terme duquel la phase minérale est obtenue (Figure 1-2). C'est cette minéralisation qui confère à l'os sa dureté et sa rigidité.

Le minéral osseux est un phosphate de calcium qui est souvent considéré comme principalement constitué d'hydroxyapatite, dont la formule est : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Cependant, en toute rigueur d'autres phases peuvent être présentes, telles que le phosphate octocalcique ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ou le phosphate dicalcique dihydraté ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), qui sont d'ailleurs considérés comme des précurseurs possibles au cours de la formation d'apatite. Associé aux fibres de collagène, le minéral permet l'obtention d'un matériau composite dans lequel le collagène est la matrice et le minéral est la charge qui confère ses propriétés mécaniques à l'os. La minéralisation du tissu osseux se fait *via* l'excrétion de vésicules par les ostéoblastes, ces vésicules sont capables de fixer les ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} et vont servir de support au dépôt d'hydroxyapatite. Les cristaux d'apatite croissent ensuite par un phénomène d'accrétion.

L'os n'est pas un matériau figé et la minéralisation n'est pas la fin de son histoire. Il est constamment remodelé grâce aux cellules qui le composent : les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes. Ce remodelage se fait selon les contraintes mécaniques appliquées ce qui permet à l'os de mieux résister aux contraintes auxquelles il est soumis. La première étape de ce processus correspond à une résorption de l'os par les ostéoclastes (de manière simplifiée, les ostéoclastes libèrent des enzymes et des acides qui vont détruire le collagène et libérer les

sels minéraux contenus dans l'os). Les ostéoblastes vont ensuite construire l'ostéoïde et le processus de minéralisation pourra s'opérer de nouveau.

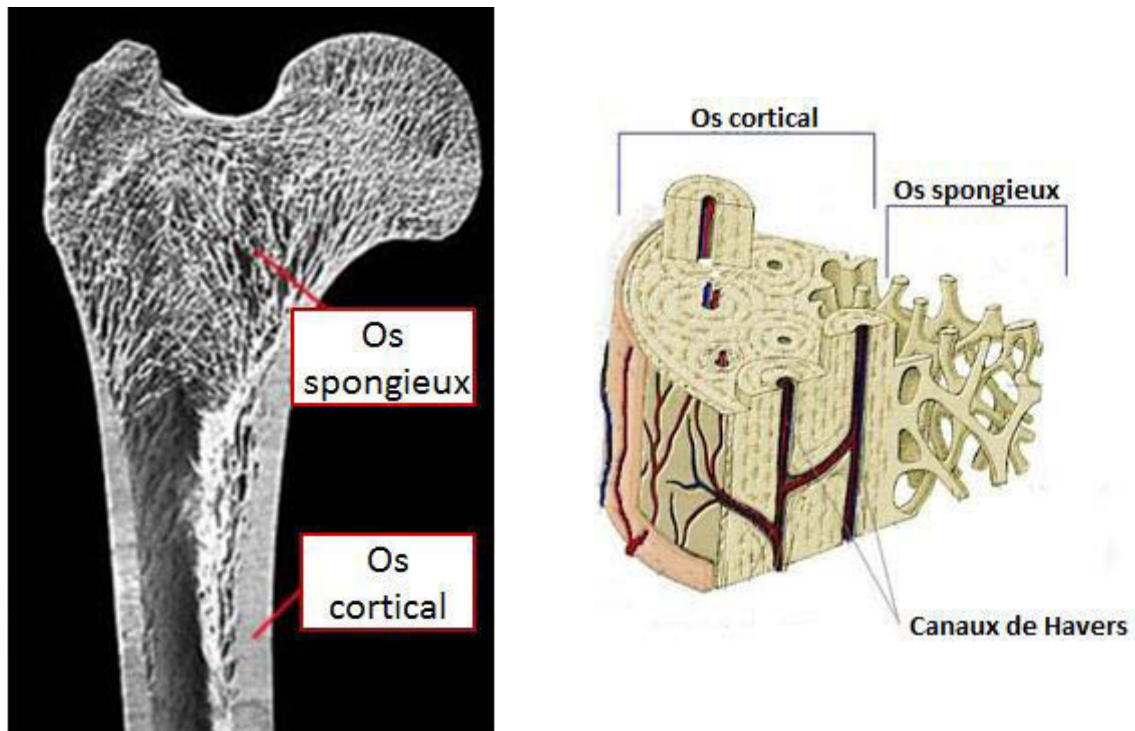


Figure 1-1 : Architecture osseuse⁶ et schéma de la structure osseuse⁷

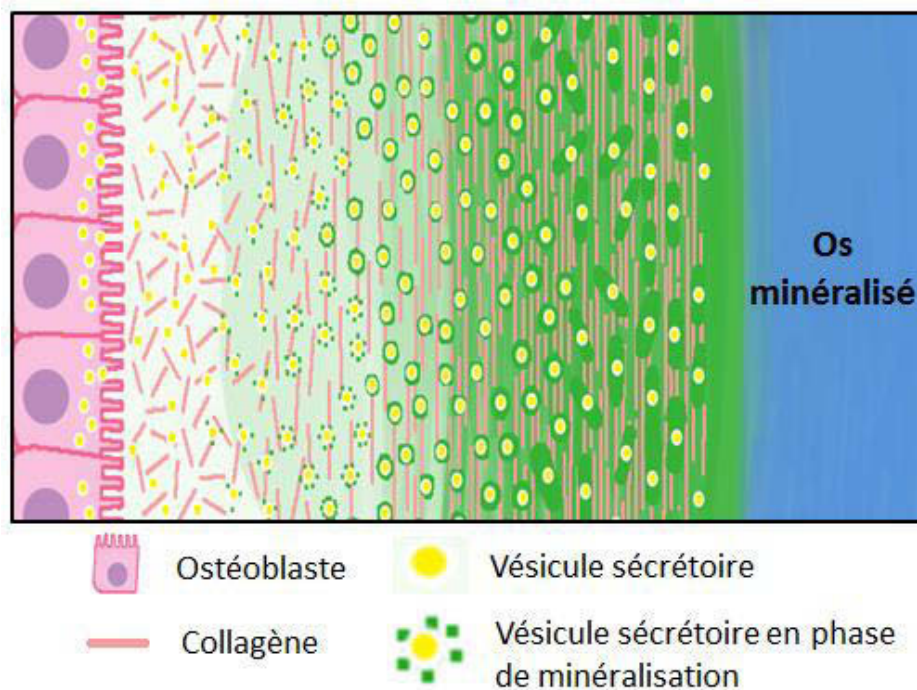


Figure 1-2 : Minéralisation du tissu osseux, d'après Young *et al.*⁸

1.2.2. Description physico-chimique de l'os

Du point de vue chimique les os sont constitués d'éléments majeurs qui sont le calcium et le phosphore (contenus dans l'hydroxyapatite) mais aussi de nombreux autres éléments présents en plus ou moins grande quantité.

Si la formule de l'apatite stœchiométrique est $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, un minéral ayant une telle composition aurait une stabilité chimique trop importante pour permettre le remodelage osseux au cours duquel la phase minérale est dissoute. Le rôle de réservoir métabolique de calcium et de phosphore serait d'ailleurs impossible à tenir. La phase minérale de l'os est donc une « apatite » modifiée, faiblement cristalline, qui incorpore d'autres espèces dans sa structure, et en particulier des ions carbonates, substitués aux groupements phosphates, ce qui lui confère une plus grande solubilité. L'apatite peut aussi incorporer de nombreux autres éléments pouvant se substituer au calcium (Strontium, Magnésium) ou encore aux hydroxydes (Fluor, Chlore). Par ces substitutions, la composition de l'os n'est pas identique d'un individu à l'autre (en fonction du sexe, de l'âge, de l'alimentation) et même d'un os à l'autre chez un individu. Il est donc difficile de donner une description physico-chimique précise de l'os. Le Tableau 1-1 donne une idée des gammes de concentrations en différents éléments et montre la grande variabilité de composition chimique des os.

Tableau 1-1 : Concentrations élémentaires ($\mu\text{g/g}$) dans de l'os cortical humain, d'après Takata *et al.*⁹

Eléments	De 30 à 80 ans		De 60 à 82 ans
	Moyenne	Gamme	Moyenne
Br	$0,67 \pm 0,25 \mu\text{g/g}$	$0,29\text{-}1,12 \mu\text{g/g}$	$4,1 \pm 4 \mu\text{g/g}$
Ca	$22,2 \pm 2,6 \%$	$16,9 - 26,7 \%$	$21 \pm 4 \%$
Cl	$538 \pm 162 \mu\text{g/g}$	$322 - 941 \mu\text{g/g}$	-
K	$572 \pm 205 \mu\text{g/g}$	$237 - 956 \mu\text{g/g}$	-
Mg	$2379 \pm 314 \mu\text{g/g}$	$1951 - 3147 \mu\text{g/g}$	$2600 \pm 400 \mu\text{g/g}$
Na	$5342 \pm 496 \mu\text{g/g}$	$4554 - 6172 \mu\text{g/g}$	$5400 \pm 1000 \mu\text{g/g}$
P	$10 \pm 2,8\%$	$4,49 - 16,9 \%$	$8,8 \pm 2,2 \%$
Sr	$112 \pm 37 \mu\text{g/g}$	$49,8 - 184,6 \mu\text{g/g}$	$62 \pm 18 \mu\text{g/g}$
Zn	$114 \pm 16 \mu\text{g/g}$	$85 - 140,8 \mu\text{g/g}$	$180 \pm 44 \mu\text{g/g}$

1.2.3. Les biomatériaux de l'os

1.2.3.1. Intérêt

Malgré ses formidables capacités de régénération, un organisme n'est pas capable de réparer tous les dommages que peuvent subir les os. En effet, avec l'âge ses capacités de régénération diminuent et la résorption osseuse devient plus importante que la formation ce qui conduit à une diminution de la densité osseuse. Ce phénomène correspond à une maladie appelée ostéoporose qui est très souvent associée aux matériaux pour la régénération osseuse. Et il est vrai que ces matériaux présentent un grand intérêt pour aider à consolider les os des personnes atteintes. Cependant, en plus de l'ostéoporose, d'autres événements peuvent expliquer une perte de masse osseuse comme des traumatismes ou l'opération d'une tumeur. Toutefois, contrairement à l'ostéoporose, qui conduit à une diminution de densité, ces cas conduisent à l'existence de défauts importants qui sont littéralement des trous dans le squelette qui ne peuvent se réparer naturellement, même chez un individu en bonne santé, une greffe osseuse devient nécessaire pour espérer régénérer l'os abimé.

Plusieurs solutions existent pour la réalisation de ces greffes, les deux principales sont l'allogreffe et l'autogreffe. L'allogreffe consiste à prélever de l'os sur un donneur décédé. Le problème de ce type de greffe apparaît alors évident, il présente un risque de rejet et de contamination. L'autogreffe, qui consiste à prélever de l'os dans une partie saine du squelette du patient, est considérée comme la meilleure solution, mais présente deux limitations importantes : la quantité de greffon prélevée est très limitée et pour la réaliser le patient doit subir deux opérations en deux endroits différents ce qui peut être lourd et augmente le temps d'hospitalisation et de récupération¹⁰.

Malgré ces inconvénients et d'après la Haute Autorité de Santé, environ 16000 allogreffes par an ont été réalisées en France entre 2003 et 2008, c'est-à-dire dans des cas où une autogreffe était impossible. La demande en greffons osseux est donc très importante et la possibilité d'avoir des matériaux artificiels ne présentant pas de risque de rejet et disponibles en grandes quantités pour la repousse osseuse justifie l'intérêt croissant qui est porté aux biomatériaux pour la régénération osseuse.

1.2.3.2. Quels matériaux ?

A l'origine les matériaux utilisés en orthopédie appartenaient principalement à la famille des métaux (le titane est particulièrement utilisé, par exemple pour la réalisation de prothèses de

hanche) choisis pour leurs propriétés mécaniques en raison de leur implantation dans des sites sous charge. Ces matériaux peuvent être classés comme bioinertes, ils sont donc destinés à ne jamais être remplacés par de l'os. Cependant, l'avancée des connaissances sur l'os (en médecine et en biologie) et sur les matériaux (en chimie et en physique) et le travail conjoint de chercheurs de disciplines différentes ont permis le développement de matériaux de plus en plus intéressants pour la régénération osseuse. La similarité entre la phase minérale des os et l'hydroxyapatite, une céramique qui peut être obtenue en laboratoire, a conduit certains chercheurs à s'intéresser aux céramiques pour servir en tant que substituts osseux. Parmi les biocéramiques les plus utilisées il existe des matériaux inertes, tels que l'alumine (Al_2O_3), mais les plus intéressantes sont les céramiques bioactives au cœur desquelles les phosphates de calcium tiennent une place importante. Il en existe de nombreux¹¹ mais les plus répandus pour aider à la régénération osseuse sont l'hydroxyapatite et le phosphate tricalcique.

L'hydroxyapatite (HA) étant la phase minérale la plus proche de celle de l'os, il est logique que ce matériau soit parmi les plus étudiés dans le domaine des substituts osseux. Pouvant être utilisée seule ou en tant que revêtement pour des prothèses métalliques, elle est généralement synthétisée en laboratoire. Il est toutefois intéressant de noter que ce matériau, existant dans la nature, peut être obtenu à partir du corail¹² ou par calcination d'os, par exemple bovin, c'est ce qui est fait dans l'étude d'Emadi *et al.*¹³, cependant, l'apatite obtenue par ces chercheurs est ensuite recouverte de verre bioactif afin d'en améliorer la bioactivité et la biodégradabilité. Ce point met en évidence l'inconvénient majeur de l'hydroxyapatite qui est sa très grande stabilité chimique qui limite sa résorption par l'organisme. Le phosphate tricalcique (plus connu sous l'appellation TCP : tricalcium phosphate) est un composé de formule chimique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ qui est, contrairement à l'hydroxyapatite, biodégradable et peut donc être remplacé par de l'os. Cependant, sa vitesse de dégradation est très rapide, parfois trop par rapport à la vitesse de formation du tissu osseux. C'est pour cette raison que des mélanges biphasiques de TCP et d'HA sont souvent réalisés, un matériau présentant la biodégradabilité du TCP atténuée par la présence d'HA¹⁴ peut alors être obtenu. Une autre solution existe pour palier le problème de la faible réactivité rencontré par les biomatériaux à base d'hydroxyapatite, il s'agit de modifier le procédé de synthèse généralement utilisé, qui implique de travailler à haute température, pour travailler à basse température. Il est alors possible d'obtenir des apatites nanocristallines plus proches du minéral osseux qui comportent à leur surface une couche hydratée¹⁵ favorisant la bioactivité et pouvant, de plus, servir de réservoir pour des ions d'intérêt biologique ou encore pour des molécules organiques¹⁶.

Une autre céramique couramment employée est appelée apatite-wollastonite, il s'agit en fait d'une vitrocéramique, un matériau constitué d'une phase amorphe et d'une phase cristallisée qui présente des propriétés mécaniques particulièrement intéressantes¹⁷. Enfin, parmi la famille des biocéramiques, les verres bioactifs découverts en 1969 par Larry Hench¹⁸, sont très intéressants pour leur grande bioactivité. Etant l'objet de cette étude, leur description détaillée sera réalisée dans la suite de cette partie.

1.3. Les verres bioactifs

1.3.1. Les verres

Le verre est un solide non cristallin présentant un phénomène de transition vitreuse. A l'origine obtenu par la fusion d'oxydes suivie d'une trempe, il est donc constitué d'un réseau non organisé d'oxydes qui, selon leur rôle dans ce réseau, vont être répartis en deux catégories. La première est celle des formateurs de réseau (SiO_2 , B_2O_3 , P_2O_5 , GeO_2 , V_2O_5 , Sb_2O_3 , *etc...*) qui forment des polyèdres liés entre eux. Mais les verres de formateurs seuls trouvent peu d'applications, exception faite de la silice, la majorité des verres sont faits en ajoutant d'autres éléments dans la matrice, ces éléments sont appelés modificateurs de réseau (CaO , Na_2O , LiO_2 , BaO , MgO , *etc...*). Ils transforment les oxygènes pontants du réseau en oxygènes non-pontants à l'image du sodium donné en exemple sur la Figure 1-3. De tels changements dans la structure du réseau vont nécessairement induire une modification des propriétés du verre. En effet, la diminution du nombre d'oxygènes pontants va avoir pour conséquence une diminution de la viscosité du verre et va faciliter sa fusion. Mais ces propriétés ne seront pas les seules à découler de l'affaiblissement du réseau, il est aussi à l'origine de l'existence des verres bioactifs. Les verres obtenus par fusion ayant une composition proche de SiO_2 seront ainsi quasiment inertes. En revanche, par l'ajout de modificateurs, Na_2O et CaO , les réactions chimiques qui vont conduire à la liaison du verre avec l'os et à son action bénéfique sur la régénération osseuse deviennent possibles.

Toutefois, il existe une autre méthode d'élaboration des verres appelée méthode sol-gel, qui va donner des verres aux propriétés différentes de ceux obtenus par fusion suivie d'une trempe dont une plus grande réactivité. Etant la voie de synthèse choisie pour ce travail de thèse elle sera détaillée par la suite.

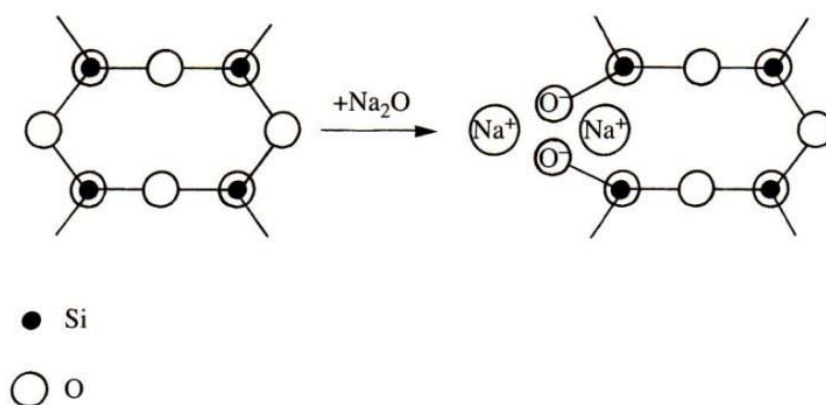


Figure 1-3: Incorporation de l'oxyde de sodium à un réseau vitreux de SiO_2 ¹⁹

1.3.2. Le processus de bioactivité

Les verres bioactifs ont la capacité de se lier au tissu osseux et sont résorbables, ce sont donc des matériaux très intéressants pour la régénération osseuse. Leur capacité à se lier au tissu osseux peut être expliquée par le processus de bioactivité proposé par Hench²⁰. En effet, ce processus concerne à l'origine le Bioglass[®] 45S5, mais la plupart des études sur les verres bioactifs obtenus par la voie sol-gel semblent corroborer ce mécanisme (Figure 1-4). Ce mécanisme correspond à un échange des alcalins et alcalino-terreux contenus dans le verre avec les ions H^+ du milieu conduisant à la formation de groupements $\text{Si}-\text{OH}$. Ces groupements vont ensuite se condenser pour former des liaisons $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ et ainsi donner naissance à une couche riche en silice. Cette couche va alors permettre la suite du processus par l'adsorption des ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} permettant la formation d'une couche phosphocalcique amorphe qui va incorporer des ions OH^- et CO_3^{2-} , va croître et qui va progressivement cristalliser. Des espèces biologiques vont alors s'adsorber dans cette couche qui va servir de support à l'adhésion et à la différenciation des cellules osseuses. Ces cellules vont alors pouvoir former la matrice osseuse qui pourra ensuite minéraliser.

Les cinq premières étapes de ce mécanisme sont donc purement physico-chimiques et ne font pas intervenir de cellules. Cela permet d'expliquer une propriété très particulière des verres bioactifs qui est de former une couche d'apatite lors de l'immersion du matériau dans un milieu de culture acellulaire. Cette propriété a d'ailleurs longtemps été considérée comme une preuve de la bioactivité d'un matériau. En effet, lors de l'immersion dans un milieu de composition chimique minérale identique à celle du plasma sanguin, le SBF (Simulated Body Fluid : simili fluide biologique), une corrélation a été observée entre la capacité d'un matériau à former une couche d'apatite dans ce milieu acellulaire et sa capacité à créer une liaison avec

l'os lors d'essais *in vivo*. De plus, cette réaction peut être reliée au niveau de bioactivité, plus la couche se forme vite dans le SBF plus elle se formera vite *in vivo*²¹.

La réaction dans le SBF des céramiques et des verres utilisés en régénération osseuse a donc pendant longtemps été considérée comme un argument de poids dans l'affirmation de la bioactivité de ce matériau. Toutefois, il existe un nombre non négligeable d'exemples de matériaux formant une couche d'apatite dans le SBF mais ne se liant pas à l'os ou encore des matériaux ne formant pas d'apatite dans le SBF mais capables de se lier à l'os. Kokubo et Takadama²¹ ont compilé des données sur de nombreux matériaux bioactifs, parmi eux, le β -TCP est l'exemple très représentatif d'un matériau ne donnant pas lieu à la formation d'une couche d'apatite dans le SBF et pourtant capable de se lier à l'os.

Ce modèle montre donc certaines limites et ses détracteurs possèdent des arguments pertinents pour justifier de l'impossibilité de la réactivité dans le SBF à prédire la bioactivité d'un matériau. Ces arguments ont été exposés par Böhner et Lemaître²² : le SBF est un milieu sursaturé en calcium et en phosphore, l'ajout d'un matériau dans le milieu peut donc provoquer une précipitation d'apatite sans que celui-ci ne soit bioactif. De plus, ces essais sont réalisés sans contrôle de la pression en CO₂ qui est pourtant constante *in vivo*. Enfin, le SBF comporte des différences de composition très importantes avec le plasma puisqu'il ne contient que des ions et pas de protéines et qu'il contient une quantité importante de TRIS (Tris(hydroxyméthyl)aminométhane), un tampon de pH qui n'est pas présent dans le milieu vivant.

Si certains auteurs préconisent de n'utiliser que les essais *in vitro* cellulaires et les essais *in vivo* pour déterminer la bioactivité d'un matériau à cause des très grandes différences de conditions exprimées précédemment comme Pan *et al.*²³, il n'en demeure pas moins que de nombreuses études font état d'une corrélation entre « test du SBF » et bioactivité. Cet essai reste donc une très bonne première approche dans l'étude d'un candidat potentiel pour une application comme substitut osseux même si les essais en présence de cellules seront toujours nécessaires. De plus, le mécanisme de bioactivité de Hench est alors étudiable, au moins pour les cinq premières étapes du processus, de manière assez simple par l'utilisation du SBF.

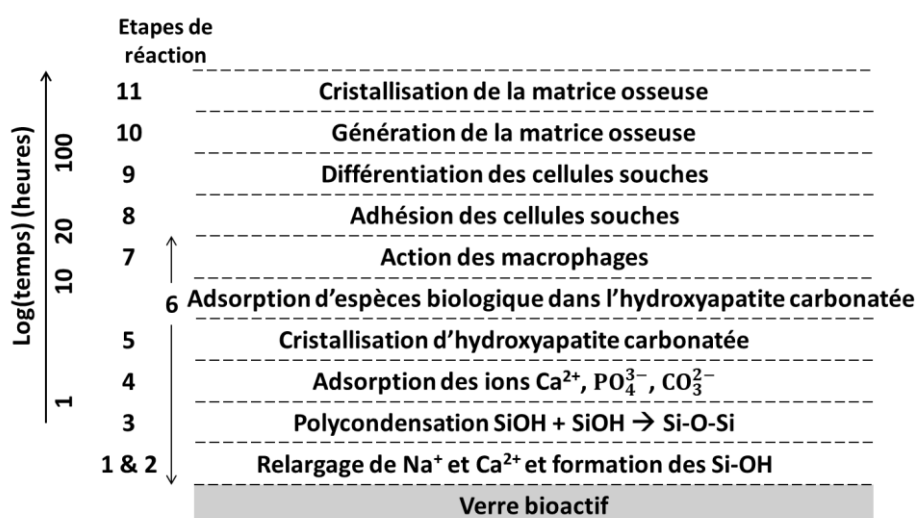


Figure 1-4: Les différentes étapes du processus de bioactivité ayant lieu à la surface d'un verre bioactif, d'après Hench *et al.*²⁰

1.3.3. Influence de la composition des verres bioactifs sur leurs propriétés et sur leur réactivité

1.3.3.1. Les éléments majeurs

La Figure 1-5 montre l'existence de différents domaines présentant des bioactivités différentes en fonction de la composition du verre réalisé par fusion. Le domaine de liaison avec les tissus mous étant assez restreint une variation de composition en élément majeur conduirait rapidement à diminuer la bioactivité du verre bioactif obtenu par fusion. Les verres obtenus par la voie sol-gel présentent une bien plus grande amplitude de bioactivité et permettent donc des variations importantes en éléments majeurs et de nombreuses compositions peuvent alors être étudiées (Tableau 1-2).

Il est intéressant de remarquer que le sodium est rarement utilisé au cours des synthèses de verre par voie sol-gel. En effet, le sodium est un modificateur de réseau. Son rôle principal est de faciliter l'élaboration du verre par abaissement du point de fusion, il permet d'augmenter la réactivité du verre en diminuant la connectivité du réseau. Toujours présent dans les verres issus d'une synthèse par fusion, cet élément n'est pas nécessaire pour l'élaboration de verres sol-gel qui présentent naturellement une plus grande surface spécifique et une plus grande réactivité.

Le silicium est l'élément de base du verre, sa concentration joue sur la réactivité du verre. Mais au-delà de sa contribution aux propriétés physico-chimiques du verre, le silicium

relargué dans le milieu vivant pendant le processus de dissolution a une influence bénéfique sur la régénération osseuse car le silicium est ostéoinducteur. Le silicium est, en effet, un élément essentiel aux processus métaboliques pour la formation et la calcification du tissu osseux²⁴ car il favorise la formation de collagène, la phase organique de l'os, et la différenciation des ostéoblastes. Cela a d'ailleurs conduit à son incorporation dans des biocéramiques comme l'hydroxyapatite dans l'objectif d'applications en régénération osseuse²⁵.

Le calcium, quant à lui, est responsable de la première étape du processus de bioactivité en s'échangeant avec les ions H^+ du milieu mais il a aussi une influence sur les cellules osseuses. En effet, plusieurs études, dont les résultats ont été compilés par Marie²⁶, montrent que les cellules osseuses ont des récepteurs sensibles au calcium et que ces récepteurs régulent le recrutement, la différenciation et la survie des ostéoblastes et des ostéoclastes. De plus, Maeno *et al.*²⁷ ont montré par des études *in vitro* que la réactivité des ostéoblastes dépendait de la concentration en calcium dans le milieu. De faibles concentrations en Ca^{2+} semblent favoriser la prolifération et la différenciation d'ostéoblastes inclus dans des gels de collagène. Une quantité trop importante semble toutefois s'avérer toxique pour les cellules.

En plus de ces deux éléments, de l'oxyde de phosphore est parfois ajouté. Salinas *et al.*²⁸ ont montré qu'un verre contenant uniquement du silicium et du calcium montre une réactivité plus importante que des verres dans lesquels le SiO_2 a été substitué par du P_2O_5 pour lesquels une cristallisation plus rapide de la couche phosphocalcique en apatite est cependant observée. Toutefois, avec le verre binaire l'apatite semble se former plus vite et donner une couche de plus grande épaisseur. Il s'en suit que l'utilisation du phosphore dans les verres bioactifs issus du procédé sol-gel n'est pas nécessaire, ce qui explique le grand nombre de travaux réalisés sur des verres sol-gel composés principalement d'oxyde de silicium et d'oxyde de calcium.

Tableau 1-2 : Exemples de différentes compositions de verres bioactifs obtenus par voie sol-gel étudiées dans la littérature

SiO₂	CaO	P₂O₅	Na₂O	référence
70 mol%	30 mol%	0	0	29
0-25 mol%	20-40 mol%	45 mol%	0-25 mol%	30
60 mol%	35 mol%	5 mol%	0	31
70 mol%	30 mol%	0	0	32
70 mol%	26 mol%	4 mol%	0	

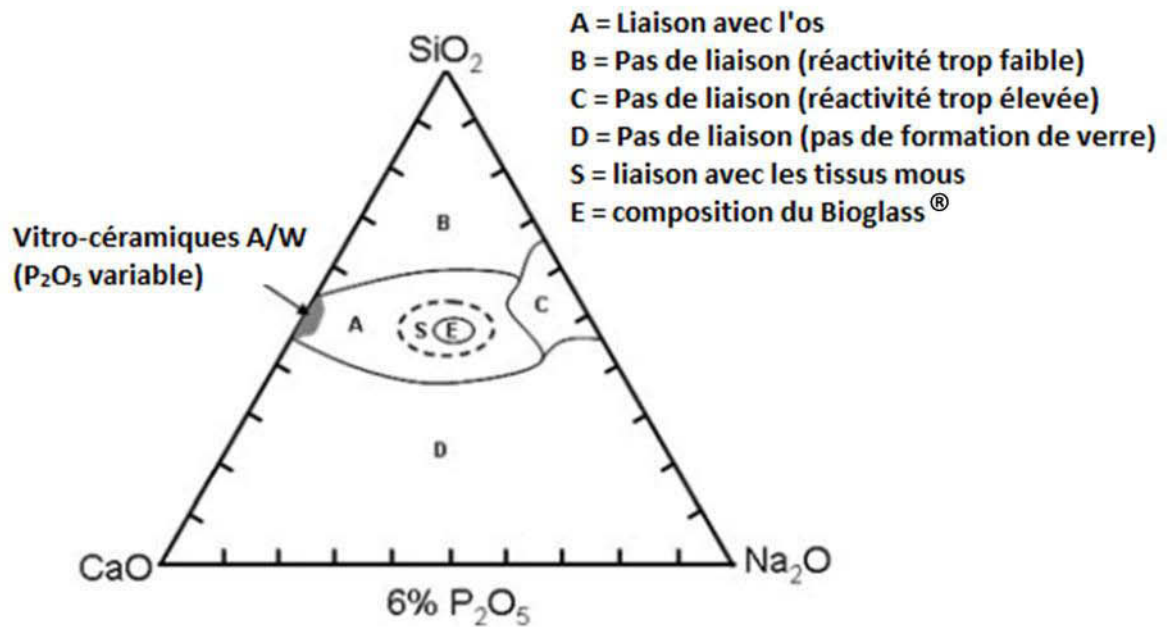


Figure 1-5: Diagramme de bioactivité pour un verre fusion en fonction des pourcentages des différents oxydes de départ SiO_2 , CaO et Na_2O pour un pourcentage en P_2O_5 fixé à 6%¹⁸

1.3.3.2. Les éléments minoritaires et traces

1.3.3.2.1 Généralités

Si les éléments majeurs du verre vont déterminer la tendance générale du comportement de ces verres, le faible ajout d'un autre élément peut avoir des répercussions importantes sur les propriétés finales du matériau, tant du point de vue physico-chimique que biologique³³. De nombreux éléments peuvent être ajoutés dans le verre de l'état de trace jusqu'à quelques pourcents (éléments minoritaires).

A l'image du silicium ou du calcium présentés précédemment, ces éléments peuvent avoir un effet bénéfique sur la régénération osseuse, leur incorporation au verre permettant de les relarguer localement lors de sa dissolution, c'est-à-dire là où ils sont nécessaires. Parmi ces éléments l'un des plus intéressants est le strontium qui sera étudié dans la suite de ce travail. Mais de nombreux autres éléments ont déjà été utilisés pour leurs propriétés bénéfiques lors de l'implantation *in vivo*. Les effets des éléments les plus utilisés sont répertoriés dans le Tableau 1-3.

Tableau 1-3 : Effets biologiques des principaux éléments chimiques utilisés comme dopant dans les biomatériaux osseux²⁴

Eléments	Effets
Zn	- Effet anti-inflammatoire - Stimule la formation osseuse
Sr	- Stimule la formation osseuse - Diminue la résorption osseuse
Mg	- Stimule la formation osseuse - Accroît l'adhésion des cellules osseuses
Cu	- Promeut l'angiogenèse en association avec des facteurs de croissance - Induit la différenciation des cellules mésenchymateuses
Ag	- Effet antibactérien ³⁴

1.3.3.2.2 Le strontium

Le strontium est un élément naturellement présent dans les os, mais en très faible quantité. Il se substitue au calcium dans l'apatite de l'os. La prise régulière de strontium, à l'origine sous forme de lactate de strontium dans les années cinquante, puis sous forme de ranelate, semble présenter un effet antiostéoporotique comme le montre les études reprises par Pors Nielsen³⁵. Le ranelate de strontium diminue la résorption et maintient la formation osseuse *in vivo*. Le strontium permet l'amélioration de la prolifération des ostéoblastes. Cet élément présente donc un intérêt tout particulier pour la conception de matériaux favorisant la régénération osseuse. Un matériau capable de relarguer localement du strontium devrait donc avoir un effet positif sur les ostéoblastes.

Toutefois, pris en trop grande quantité, une part trop importante de calcium des os est remplacée par du strontium. Il peut alors présenter un effet rachitogénique³⁵. Ce risque explique le faible nombre d'études concernant des matériaux bioactifs contenant du strontium jusqu'à il y a quelques années. A l'heure actuelle l'intérêt des chercheurs pour le strontium est ravivé et de plus en plus d'études portent sur l'intégration de strontium dans les matériaux et en particulier dans les verres bioactifs^{36, 37}.

De même que dans les os, dans les verres bioactifs, le strontium a tendance à se substituer au calcium. Il est en effet généralement admis que le strontium est, à l'instar du calcium, un

modificateur de réseau et que la substitution du CaO par du SrO ne devrait pas avoir une grande influence sur la structure du verre. Doweidar n'observe d'ailleurs pas de différence dans le volume des unités structurales d'un verre binaire au calcium ou au strontium, cela semble attester d'un rôle très analogue du calcium et du strontium dans la structure³⁸. Toutefois, plus gros que le calcium, l'atome de strontium devrait entraîner lors de la substitution une dilatation du réseau et ainsi sa déstabilisation comme le souligne Xiang et Du³⁹. La présence de strontium, en plus de son effet sur les ostéoblastes, devrait ainsi promouvoir la dissolution du verre et augmenter sa bioactivité.

Cependant, d'après Goel *et al.*⁴⁰, la force de la liaison Sr-O, plus importante que celle de Ca-O (389 et 351 kJ.mol⁻¹ respectivement), et la plus faible électronégativité du strontium par rapport au calcium, devraient entraîner un échange plus lent des ions Sr²⁺ du réseau avec les ions H⁺ du milieu biologique. Or, cet échange étant à la base de la dissolution du verre et du processus de bioactivité, ces deux phénomènes devraient être ralentis. Cet effet de ralentissement de la vitesse de dissolution du verre a été observé par Lao *et al.*⁴¹ pour des verres bioactifs obtenus par la voie sol-gel.

Toutefois, les études de Fredholm *et al.*⁴² et de O'Donnell et Hill⁴³ sur l'introduction de strontium dans le verre, en substitution du calcium, montrent des propriétés physico-chimiques et des structures très proches pour les verres contenant uniquement du calcium et ceux dans lesquels du strontium lui a été partiellement substitué. La vitesse de dissolution ou de formation d'une couche phosphocalcique ne devrait donc pas être modifiée.

Il ressort de ces différentes études un rôle encore controversé du strontium dans la structure chimique des verres et un désaccord sur son influence sur les vitesses de dissolution du réseau et de précipitation d'une couche phosphocalcique. Néanmoins, un facteur important reste à considérer, parmi les études contradictoires, la méthode et les conditions de synthèse des matériaux diffèrent.

Il est donc envisageable de voir ici un rôle ambivalent du strontium qui pourrait s'introduire de manière différente dans le verre selon les conditions de synthèse et conduire à des propriétés différentes de ces verres une fois immergés dans un fluide biologique.

1.4.Synthèse de verres par la méthode sol-gel⁴⁴

1.4.1. Principe de la méthode sol-gel

La méthode sol-gel a pour point de départ des espèces en solution (a sur la Figure 1-6) qui vont subir une suite de réactions d'hydrolyse et de condensation aboutissant à la formation d'un réseau d'oxydes. Les précurseurs les plus utilisés sont les alcoxydes métalliques (Figure 1-7) même si d'autres précurseurs peuvent être utilisés comme des sels inorganiques⁴⁵. Au début du procédé, lorsque l'hydrolyse des précurseurs a débuté, il se forme des particules solides colloïdales en suspension dans un liquide. Ces particules sont assez petites pour que les forces gravitationnelles ne s'exercent pas et que seules des interactions faibles existent. Cette suspension est appelée sol (b sur la Figure 1-6).

Ces particules vont se condenser en créant des liaisons chimiques ce qui va avoir pour effet d'augmenter la viscosité du sol jusqu'à la formation d'un réseau d'oxydes dans lequel le solvant sera piégé. Ce système comprenant une phase solide continue (le réseau d'oxydes) imbriquée dans une phase liquide continue (le solvant) est appelé gel (Figure 1-6 en c). Après polymérisation le solvant est éliminé par séchage afin de ne conserver que le réseau d'oxydes. Deux modes de séchage principaux existent : le séchage en conditions atmosphérique qui conduit généralement à un effondrement du réseau et donne un verre appelé xérogel (d' sur la Figure 1-6) ; en conditions supercritiques le solvant est éliminé sans effondrement du réseau ce qui donne généralement un verre moins dense appelé aérogel (d sur la Figure 1-6). Etant issu de l'agglomération de particules, les verres sol-gel présentent généralement un degré de condensation plus faible que les verres issus d'une fusion suivie d'une trempe. Ceci explique leur plus grande surface spécifique et leur plus grande réactivité.

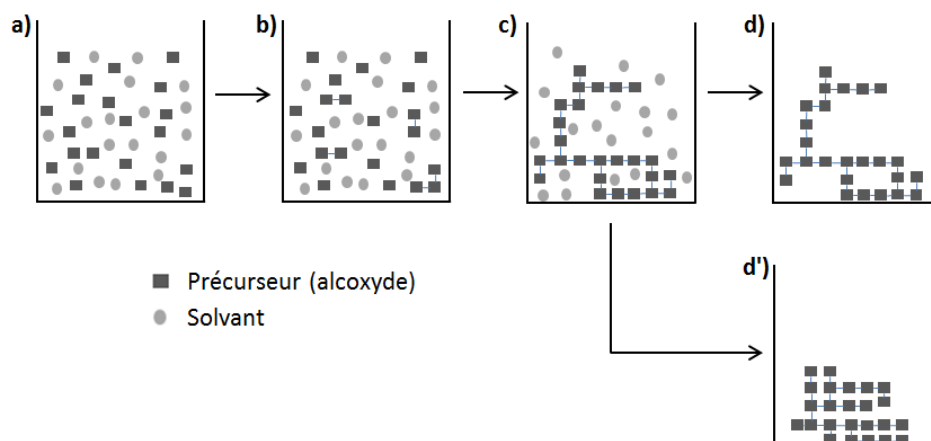


Figure 1-6: Schéma du processus de polymérisation sol-gel a) solution avant hydrolyse b) sol c) gel d) aérogel d') xérogel (d'après⁴⁶)

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac															
La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu			
Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lw			

Figure 1-7: Représentation des éléments de la table périodique qui existent sous forme d'alcoxydes (éléments grisés dans la table)⁴⁷

1.4.2. Réactions chimiques lors de la polymérisation

La formation du réseau de verre résulte de réactions chimiques qui seront détaillées *via* l'exemple des alcoxydes de silicium, qui d'une part correspond au cas le plus largement étudié, et d'autre part est le cas qui concerne les verres bioactifs faits à base de SiO_2 . Le précurseur employé pour la réalisation de verres dans le cadre de ce travail est le TEOS (TetraEthOxySilane ou orthosilicate de tétraéthyle de formule $\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_4$), mais le TMOS (TétraMéthOxySilane ou orthosilicate de tétraméthyle de formule $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$) est aussi fréquemment utilisé. Il est intéressant de noter qu'en comparaison des métaux de transition fréquemment utilisés en synthèse sol-gel (Ti, Zr), le silicium est moins électronégatif et donc moins sujet aux attaques nucléophiles, les vitesses d'hydrolyse et de condensation sont donc plus faibles. Lors de la synthèse par voie sol-gel à partir d'alcoxydes de silicium, des catalyseurs sont donc toujours employés.

1.4.2.1. Réactions d'hydrolyse

Il est à noter que les alcoxydes de silicium ne sont pas miscibles à l'eau, pour réaliser l'hydrolyse un co-solvant de l'eau et de l'alcoxyde est donc généralement utilisé. Il s'agit souvent de l'alcool dont dérive l'alcoxyde. La première étape du processus de polymérisation du TEOS est une étape d'hydrolyse par substitution nucléophile qui dépend de la nature du catalyseur utilisé. En catalyse acide (HCl, HNO₃,...), comme montré sur la Figure 1-8, une étape de protonation ayant pour effet d'augmenter le caractère nucléofuge du groupement partant permet de faciliter l'attaque nucléophile par les molécules d'eau. Toutefois, une exception existe parmi les acides, l'acide fluorhydrique (HF) a une action spécifique qui sera détaillée plus tard. En catalyse basique (NaOH, NH₃, KOH,...), c'est l'ion hydroxyle et non plus l'eau qui est responsable de l'attaque nucléophile (Figure 1-9).

A la fin de la réaction d'hydrolyse, de l'éthanol et une espèce hydroxylée instable sont obtenus. Cette espèce réactive est celle qui va donner lieu à des réactions de condensation. Cette étape d'hydrolyse est fortement influencée par l'utilisation de catalyseurs, acides ou basiques, qui l'accélèrent et la rendent plus complète.

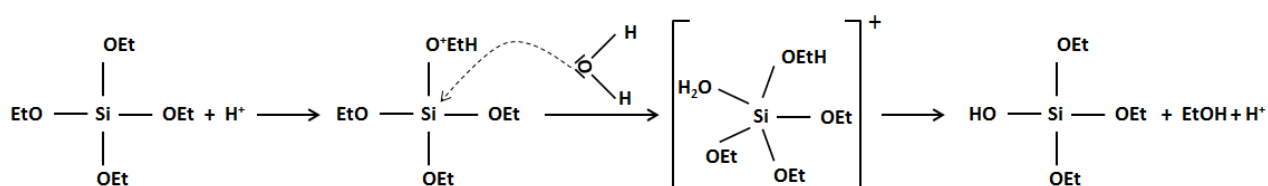


Figure 1-8 : Représentation des réactions s'opérant lors de l'hydrolyse du TEOS en catalyse acide

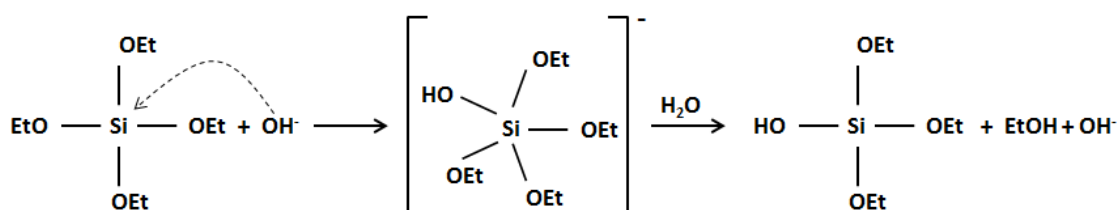


Figure 1-9 : Représentation des réactions s'opérant lors de l'hydrolyse du TEOS en catalyse basique

1.4.2.2. Réactions de condensation

La condensation correspond à l'étape de formation des ponts entre les différentes unités du réseau de verre. Cette réaction commence souvent avant la fin de l'hydrolyse. Deux réactions différentes peuvent donc s'opérer soit par réaction d'une espèce hydroxylée avec une molécule de TEOS, qui forme de l'éthanol en sous-produit (Figure 1-10), soit par réaction de

deux espèces hydroxylées entre elles qui forme de l'eau en sous-produit (Figure 1-11). Ces deux réactions sont appelées alcoxolation et oxolation respectivement.

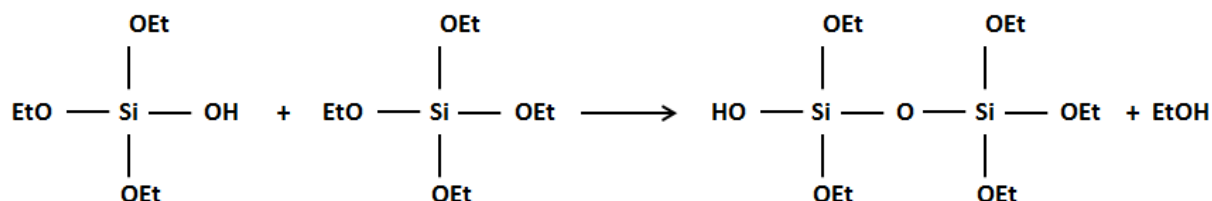


Figure 1-10 : Représentation de la réaction d'alcoxolation

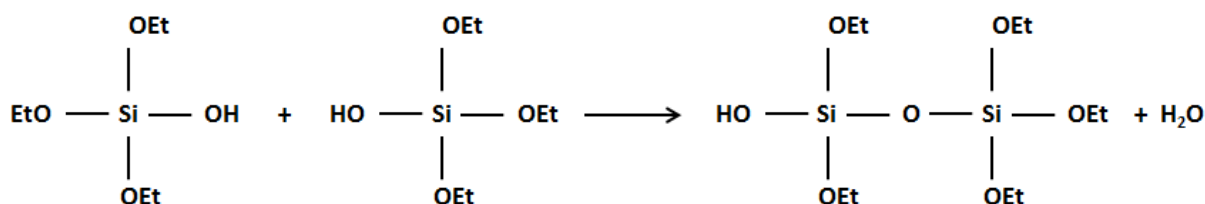


Figure 1-11 : Représentation de la réaction d'oxolation

1.4.2.3. Effet du type de catalyseur sur la structure du gel

En ayant un effet sur les vitesses relatives d'hydrolyse et de condensation, le catalyseur déterminera la morphologie finale du gel. Ainsi, en catalyse acide, l'hydrolyse est plus rapide que la condensation ce qui favorisera la formation de chaînes faiblement réticulées. En catalyse basique les vitesses des réactions d'hydrolyse et de condensation sont assez similaires ce qui conduit à la formation d'amas fortement condensés⁴⁸. Ces différences s'expliquent par l'influence du pH sur la prédominance des réactions d'hydrolyse et de condensation (Figure 1-12). Le pH va en effet avoir une grande influence sur les propriétés du matériau obtenu.

Pour un pH inférieur à 2, l'hydrolyse prédomine sur la condensation, de petites particules fortement hydrolysées sont alors obtenues et la faible solubilité de la silice à ce pH empêche leur ionisation. Ainsi la croissance du gel se fait par agrégation des petites particules, il s'agit d'une agrégation du type amas-amas, ce qui conduit à la formation d'un gel polymérique.

A pH=2, le point de charge de surface nulle et le point isoélectrique (pH auquel la mobilité électrique des particules de silice est nulle) sont très proches.

A pH=7, la solubilité de la silice atteint son maximum et les particules se trouvent ionisées de manière importante.

Pour un pH supérieur à 7, en raison de leur charge, les particules de silice réagissent préférentiellement avec les monomères pour former rapidement des particules de 1-2 nm de diamètre. Il s'agit d'une agrégation de type monomère-amas. La solubilité importante de la silice pour ces valeurs de pH donne alors lieu à un processus de mûrissement d'Oswald et à la reformation continue de monomères : les plus petites particules se dissolvent et servent à la croissance des plus grosses particules. Leur agglomération conduit à l'obtention d'un gel constitué de petites particules qui est appelé gel colloïdal. Ces particules ont une structure compacte. Pour ces valeurs de pH, il est donc possible de réaliser des particules de silice monodisperses, ce procédé s'appelle le procédé Stöber⁴⁹.

Pour un pH compris entre 2 et 7, le comportement est intermédiaire entre les deux cas présentés précédemment et conduit à des structures intermédiaires qui tendent plutôt vers une agrégation en gel polymérique pour un pH inférieur à 4 et plutôt en gel colloïdal pour un pH supérieur à 4.

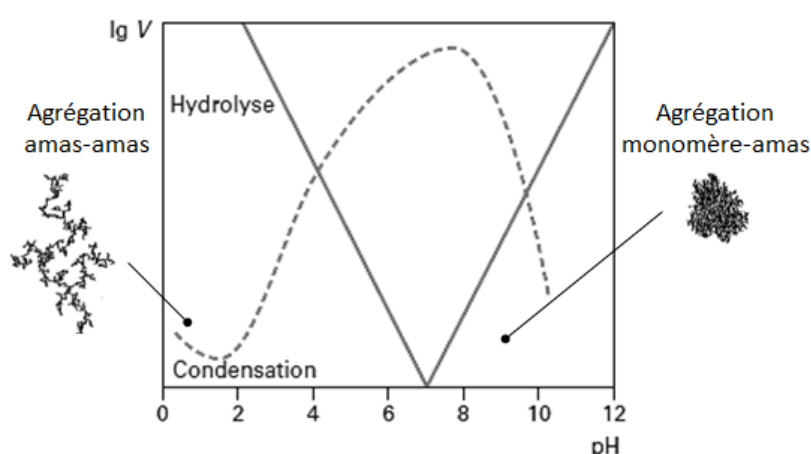


Figure 1-12 : Représentation des vitesses relatives V d'hydrolyse et de condensation en fonction du pH (graphique d'après⁴⁷, modèles d'agrégation d'après⁴⁴)

1.4.2.4. Influence des autres paramètres sur les cinétiques de réactions

En plus du pH, d'autres facteurs vont grandement influencer la structure de la silice obtenue. Ces facteurs sont la proportion d'eau utilisée pour l'hydrolyse, le catalyseur ainsi que sa concentration, le solvant, la température, la pression et la nature des ligands portés par le silicium. Ces facteurs vont en fait eux aussi jouer sur les cinétiques relatives des réactions d'hydrolyse et de condensation comme le montre l'exemple de la quantité d'eau et de la

nature des ligands. Le taux d'hydrolyse r est défini comme le rapport entre la concentration en eau et la concentration en alcoxyde :

$$r = \frac{[H_2O]}{[TEOS]} \quad (1-1)$$

Ce paramètre va avoir une influence importante sur les cinétiques des différentes réactions. La réaction d'hydrolyse en premier lieu sera fortement impactée par une modification de la concentration en eau, mais la prédominance des réactions d'oxolation (Figure 1-11) et l'alcoxolation (Figure 1-10) en sera aussi dépendante. La valeur stœchiométrique de r est de 2 et devrait, en théorie, permettre une hydrolyse complète. Mais même pour $r \gg 2$, la réaction n'est pas totale, l'augmentation de r entraîne une accélération de la vitesse d'hydrolyse. En ce qui concerne la condensation, pour une valeur de $r \ll 2$, la réaction l'alcoxolation est favorisée par rapport à la réaction d'oxolation qui elle est favorisée pour un rapport $r \geq 2$.

La taille du groupement alcoxyde porté par le silicium aura un impact sur la cinétique d'hydrolyse, en effet un groupement plus gros ralentira la réaction d'hydrolyse de cinétique k_H comme le montre l'exemple du Tableau 1-4.

Tableau 1-4 : Cinétiques d'hydrolyse (k_H) en fonction de l'alcoxyde de silicium utilisé comme précurseur⁵⁰

Précurseur	k_H (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹ .[H ⁺])
Si(OC ₂ H ₅) ₄	51.10 ⁻³
Si(O(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₃ CH(CH ₃)CH ₂) ₄	3.10 ⁻³

1.4.3. Avantages et inconvénients de la méthode sol-gel

La méthode sol-gel utilisée pour l'élaboration de verres bioactifs engendre une porosité de surface importante et donc une surface spécifique élevée. Cette porosité de surface est appelée mésoporosité et correspond à des pores compris entre 2 et 50 nm. Des pores de diamètre inférieur seront appelés micropores alors que des pores de diamètre supérieur à 50 nm seront appelés macropores. Les propriétés de surface ont une grande influence sur la bioactivité du verre, leur contrôle possible par le procédé sol-gel est donc un avantage certain dans l'élaboration de matériaux bioactifs. En effet, la mésoporosité dépendra des paramètres de synthèse, il est d'ailleurs possible d'organiser les mésopores grâce à l'utilisation de tensioactifs ce qui permet d'atteindre des surfaces spécifiques très importantes. La synthèse par voie sol-gel est réalisée à basse température, au moins dans un premier temps, ce qui

limite les interactions avec le contenant au contraire de la synthèse à haute température (fusion suivie d'une trempe)⁵¹. De plus, la méthode sol-gel ayant pour point de départ une solution, il est généralement admis qu'elle permet d'obtenir des matériaux plus homogènes.

Toutefois, certains problèmes d'homogénéité peuvent persister en raison des précurseurs choisis. En effet, pour réaliser les verres bioactifs il est nécessaire d'introduire du calcium dans le réseau, les précurseurs les plus courants sont des sels tel que le nitrate de calcium même si d'autres possibilités existent comme l'utilisation d'un précurseur alcoxyde⁵². Lin *et al.* ont montré que l'utilisation de nitrates comme précurseurs ne permettait pas une intégration du calcium pendant la polymérisation du réseau de silice. En effet, la décomposition thermique du nitrate a lieu vers 350-400°C, il est donc nécessaire d'ajouter une étape de calcination pour incorporer le calcium au réseau⁵³ (c sur la Figure 1-13). Lors de la synthèse, les nitrates de calcium solubles restent donc dans la phase liquide du gel. Ils se déposent après séchage sur les particules de silice (b sur la Figure 1-13). La diffusion des nitrates de calcium dans tout le matériau sera un facteur critique, une diffusion insuffisante entraînera l'obtention d'un matériau inhomogène où le calcium sera plus concentré en périphérie. Pour limiter ce problème, les solutions trouvées sont l'utilisation d'un moule à la surface hydrophobe (téflon par exemple) et l'utilisation d'une faible vitesse de séchage pour permettre une bonne diffusion du nitrate²⁹.

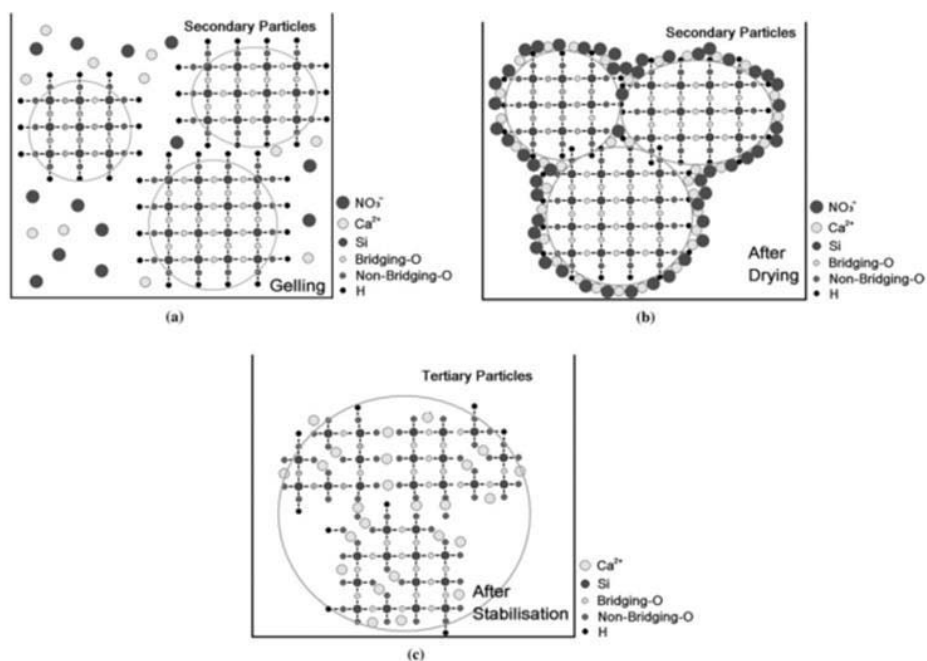


Figure 1-13 : Evolution de la répartition du calcium au cours des différentes étapes du procédé sol-gel (a) pendant la gélification (b) après séchage (c) après calcination⁵³

Chapitre 2 L'ingénierie tissulaire

2.1.Principe

L'ingénierie tissulaire est une méthode de réalisation de greffons osseux basée sur l'association de trois éléments : cellules osseuses, scaffold et facteurs de croissance (Figure 2-1). Les greffons obtenus ne présentent pas de risque de rejet et sont disponibles en quantités importantes.

Les facteurs de croissance sont une famille de protéines impliquées dans le contrôle de l'activité des cellules. De nombreux facteurs de croissance sont impliqués dans la régulation et la différenciation des cellules du tissu osseux tels que⁵⁴ :

- TGF- β : Transforming Growth Factor β (facteur de croissance transformant β)
- IGF : Insulin like Growth Factor (facteur de croissance analogue à l'insuline)
- PDGF : Platelet Derived Growth Factor (facteur de croissance dérivé des plaquettes)
- bFGF : basic Fibroblast Growth Factor (facteur de croissance basique des fibroblastes)
- BMPs : Bone Morphogenic Proteins (protéines morphogéniques osseuses)

De plus, il a été montré qu'une bonne vascularisation de l'implant était nécessaire, ainsi des facteurs de croissance stimulant la croissance de vaisseaux, par exemple le VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor (facteur de croissance vasculaire endothelial), utilisés en addition des facteurs ostéogéniques seraient un avantage certain⁵⁵. Les biologistes travaillent donc activement pour déterminer les facteurs de croissance les plus adaptés à la culture de cellules osseuses.

Le scaffold est le troisième élément essentiel de cette méthode et fait lui aussi l'objet de nombreuses études, cette fois plutôt portées par les physico-chimistes. C'est sur cet élément essentiel pour l'ingénierie osseuse que porte ce travail de thèse. C'est donc sur son élaboration et sa caractérisation que portera la suite de ce rapport.

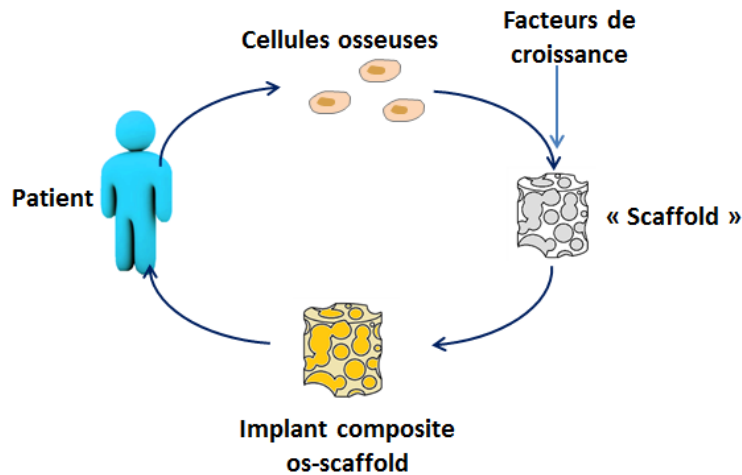


Figure 2-1: Schéma de principe de l'ingénierie tissulaire

2.2. Le scaffold

2.2.1. Ses propriétés

Le scaffold idéal pour l'ingénierie tissulaire devra posséder certaines caractéristiques, à savoir^{56, 57, 58} :

- être biocompatible,
- présenter un réseau de macro-pores interconnectés pour permettre l'invasion cellulaire, la vascularisation et la diffusion des nutriments nécessaires à la survie des cellules,
- former une interface solide avec le tissu hôte,
- avoir des propriétés mécaniques proches de celles du tissu hôte, suffisantes pour supporter l'implantation et les contraintes mécaniques subies *in vivo*,
- se résorber à la même vitesse que l'os se reconstruit sans former de produits de dégradation toxiques,
- pouvoir exister sous différentes formes pour s'adapter à celle du défaut osseux,
- stimuler et supporter la croissance des tissus.

Ces différents prérequis pour l'élaboration d'un scaffold viable en ingénierie tissulaire rencontrent une approbation générale et beaucoup d'entre eux sont satisfaits par les matériaux bioactifs. Il est par contre plus difficile de décrire la porosité optimale même si l'étude de son influence sur la régénération osseuse a donné lieu à de nombreux travaux. Il s'agit d'un

facteur critique, en effet, de nombreuses études, compilées par Karageorgiou et Kaplan⁵⁹, ont montré qu'une porosité importante et des pores de taille importante semblaient favoriser la croissance osseuse et l'ostéointégration de l'implant. Cela provient de la vascularisation, possible grâce aux larges pores, qui est nécessaire à la formation osseuse. Toutefois une porosité importante implique une diminution des propriétés mécaniques du scaffold rendant nécessaire de trouver le compromis entre pores suffisamment grands pour permettre l'invasion osseuse sans dégrader de manière trop importante les propriétés mécaniques.

Cependant, une divergence importante apparaît entre les différents travaux portant sur le sujet lorsqu'il s'agit de donner des valeurs chiffrées de tailles de pores et d'interconnexions minimales (Tableau 2-1). Cette divergence peut s'expliquer tout d'abord par la diversité des matériaux étudiés (verre bioactif, hydroxyapatite, *etc...*) qui peuvent présenter d'importantes différences de comportement. De plus, les études sont menées soit par cultures cellulaires *in vitro* soit par implantations *in vivo*. Mais les conditions expérimentales telles que le site d'implantation, le type de cellules étudiées, *etc...* varient. L'un des grands enjeux de l'ingénierie tissulaire apparaît ici, il s'agit du développement de scaffolds optimisés pour des applications ciblées.

Toutefois une tendance générale peut être dégagée de ce bilan : plus que la taille des pores (qui doit être de quelques centaines de micromètres) il semble que ce soit la taille des interconnexions qui joue le rôle le plus important. Des interconnexions souhaitables devraient avoir un diamètre supérieur à 50 μm voire, si possible, à 100 μm .

Tableau 2-1 : Tableau récapitulatif des valeurs proposées dans la littérature comme porosité visée pour un scaffold

Diamètre de pores	Diamètre d'interconnexions	Porosité	Référence
100-200 μm	-	> 90%	58
> 100 μm	-		60
> 100 μm	-	-	61
-	> 100 μm	-	62
> 100 μm minimum mais mieux si > 300 μm	-	< 90%	59
-	> 100 μm	-	63
> 50-100 μm	> 50-100 μm	-	64
	> 50 μm		65

2.2.2. Les différentes voies de synthèse

D'après Vueva *et al.*⁶⁶ il existe trois grandes voies pour réaliser un réseau macroporeux de verre bioactif : le moussage, l'utilisation d'une empreinte rigide et la séparation de phase. A cela s'ajoute une méthode à l'essor important, le prototypage rapide.

2.2.2.1. Utilisation d'empreinte rigide

Le matériau est mis en forme grâce à un support rigide qui sera éliminé dans un deuxième temps. Dans ce cas, deux stratégies d'introduction de macroporosité sont possibles^{67, 68}. Une première approche consiste à utiliser un support poreux qui est recouvert par le matériau, après son élimination le matériau garde la forme du support, c'est le cas de l'imprégnation des mousses polymères. Une deuxième approche est possible dans laquelle la porosité est créée par l'élimination du support, c'est le cas avec l'utilisation d'empilements de billes.

2.2.2.1.1 Imprégnation de mousses polymères

Une poudre de céramique⁶⁹, de verre obtenu par fusion^{70, 71} ou de verre obtenu par voie sol-gel⁷² est mélangée à une phase liquide pour réaliser une barbotine (une barbotine correspond donc au mélange visqueux obtenu par mise en suspension d'une phase solide divisée dans une phase liquide). Une mousse polymère (généralement en polyuréthane) est ensuite immergée dans la barbotine pour l'imbiber (Figure 2-2). Une calcination est ensuite réalisée pour enlever la mousse polymère et pour fritter le verre / la céramique. Ainsi, une réplique de la mousse de départ (nonobstant une diminution de taille due au retrait qui s'opère pendant le frittage) est obtenue par cette méthode.

Pour réaliser une mousse de verre bioactif dérivé de sol-gel, il est aussi possible d'immerger la mousse polymère directement dans un sol. Ce procédé est très largement utilisé pour l'élaboration de matériaux hiérarchisés méso-macroporeux grâce à un sol contenant un tensioactif permettant l'obtention d'une mésostructuration par le protocole EISA⁷³ qui sera décrit plus loin dans ce rapport (5.1.2, Page 111). Un exemple de la morphologie obtenue est donnée en Figure 2-3.

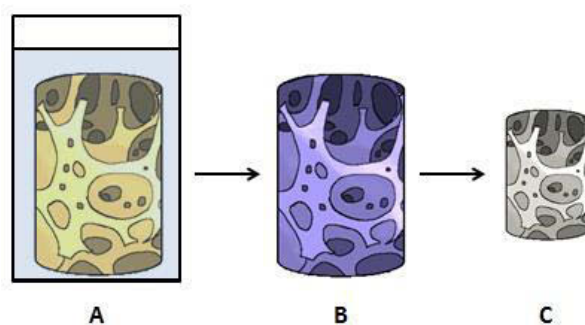


Figure 2-2 : Schéma de principe de l'élaboration de scaffolds par imprégnation d'une mousse polymère. La mousse polymère est immergée dans un sol / une barbotine (A) puis la mousse recouverte de verre/céramique (B) est calcinée (C). L'étape de calcination engendre généralement une rétractation de la structure

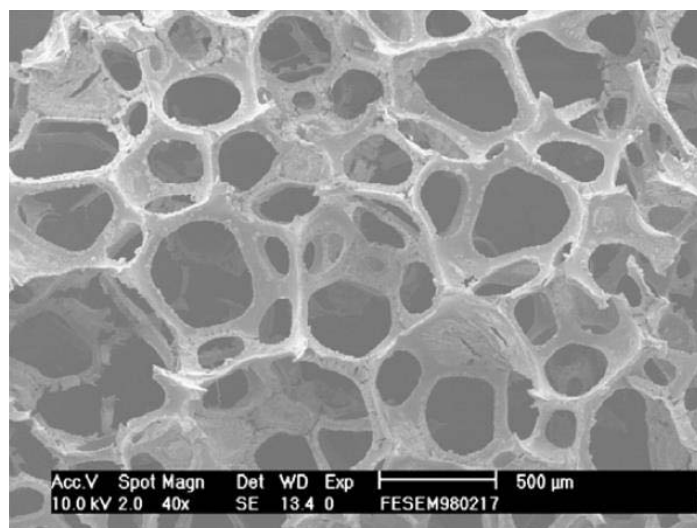


Figure 2-3 : Exemple de morphologie de mousse de verre bioactif ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$) mésostructuré obtenue par imprégnation d'une mousse polymère⁷⁴

2.2.2.1.2 Utilisation d'empilements de billes polymères

Une méthode permettant un bon contrôle des tailles de pores d'un scaffold est l'utilisation d'un assemblage de billes polymère. Cette technique est beaucoup utilisée pour la réalisation de céramiques poreuses et permet d'obtenir une bonne organisation du matériau macroporeux final. Une barbotine de céramique est coulée autour des billes, et en frittant l'ensemble il est alors possible d'éliminer les billes pour obtenir une céramique poreuse (Figure 2-4). De manière à créer de l'interconnexion dans le réseau final, les billes peuvent être soit partiellement dissoutes dans un solvant⁷⁵, soit chauffées⁷⁶ pour créer des points de contact entre elles. L'utilisation de billes de taille importante est possible, jusqu'à plusieurs

millimètres de diamètre pour de l'hydroxyapatite⁷⁷. Différents types de billes peuvent être utilisés, ce sont généralement des polymères tels que le polystyrène⁷⁸, la paraffine⁷⁹, ou encore le polyméthacrylate de méthyle⁷⁵, facilement éliminables par traitement thermique.

Ce procédé peut être adapté aux verres bioactifs soit en réalisant une à base de poudre de verre obtenue par fusion⁸⁰ ou par voie sol-gel, soit en immergeant les billes directement dans le sol avant gélification. L'immersion dans le sol est généralement réalisée avec des billes de petite taille (allant de la centaine de nanomètres jusqu'au micromètre)^{81, 82, 83}. Avec ces tailles de billes les diamètres de macropores obtenus ne seront pas suffisants pour l'application visée. Les exemples d'utilisation de billes de taille plus importantes immergées dans le sol sont plus rares⁸⁴.

Ce principe d'empilement a été utilisé avec des particules de NaCl pour réaliser un verre bioactif poreux⁸⁵ ou avec des particules de sucre pour la réalisation d'un organogel poreux⁸⁶. Il a été montré que l'utilisation de particules sphériques était plus intéressante que des particules angulaires (cubiques par exemple). En effet, les particules sphériques permettent d'obtenir un volume poreux plus important ainsi que des distributions de tailles de pores et d'interconnexions plus homogènes^{87, 88}. Un exemple de la morphologie du matériau obtenu est présenté en Figure 2-5.

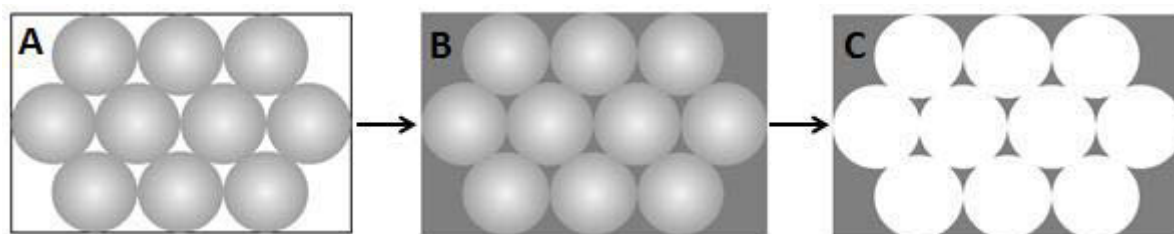


Figure 2-4 : Schéma de principe de l'élaboration de scaffolds par empreinte inverse d'un empilement de billes polymères. Les espaces vides de l'empilement de billes (A) sont comblés par une barbotine ou un sol (B) et après élimination des billes un scaffold de verre ou de céramique est obtenu (C)

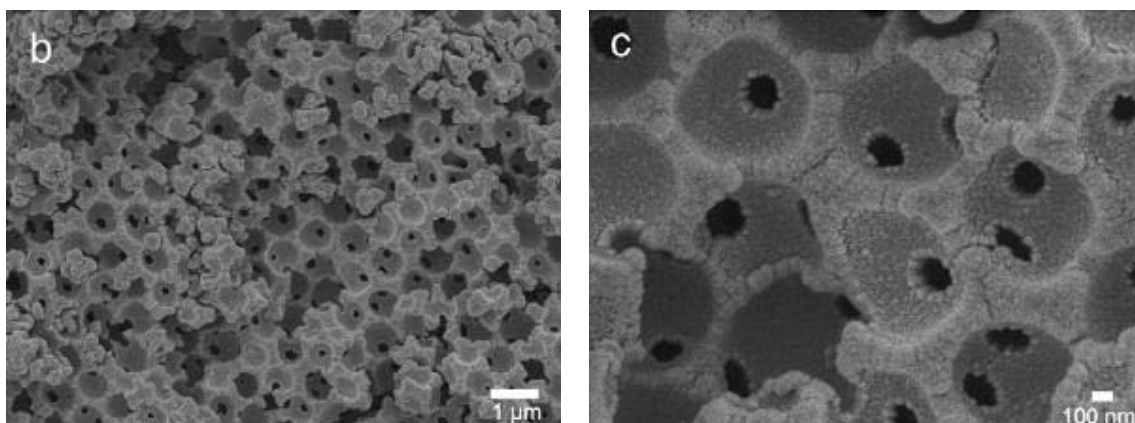


Figure 2-5 : Exemple de morphologie d'un verre bioactif ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$) mésostructuré macroporeux obtenu par empreinte inverse d'un empilement de billes de polystyrène⁸⁹

2.2.2.1.3 Autres empreintes rigides

Selon le même principe que l'imprégnation de mousse ou de billes polymères, d'autres procédés, plus anecdotiques, existent. Il est par exemple possible d'utiliser des matériaux naturels qui présentent différents avantages comme le prix, l'abondance, le respect de l'environnement et l'existence de structures complexes comme support. Il est ainsi possible d'obtenir des pores de 80 à 200 μm par imprégnation de tiges d'artichaut⁹⁰.

2.2.2.2. Séparation de phase

La séparation de phase repose sur l'utilisation de polymères organiques (PEO : polyéthylène oxyde, PEG : polyéthylène glycol ou du PAA : polyacrylique acide) mis dans un solvant contenant un précurseur de silice le plus souvent. Pendant la polymérisation du réseau de silice, le mélange déstabilisé va subir une décomposition spinodale le séparant en deux phases distinctes : une phase organique et une phase vitreuse⁹¹. L'ajustement des paramètres expérimentaux permet d'équilibrer les réactions de décomposition et de polymérisation de manière à obtenir deux réseaux imbriqués d'un dans l'autre. Ce procédé peut être utilisé pour l'élaboration de verre bioactif dérivé de sol-gel qui constitue la phase inorganique⁹², le traitement thermique permettra de retirer la phase organique introduisant une porosité importante dans le matériau final qui est visible sur l'exemple donné en Figure 2-6.

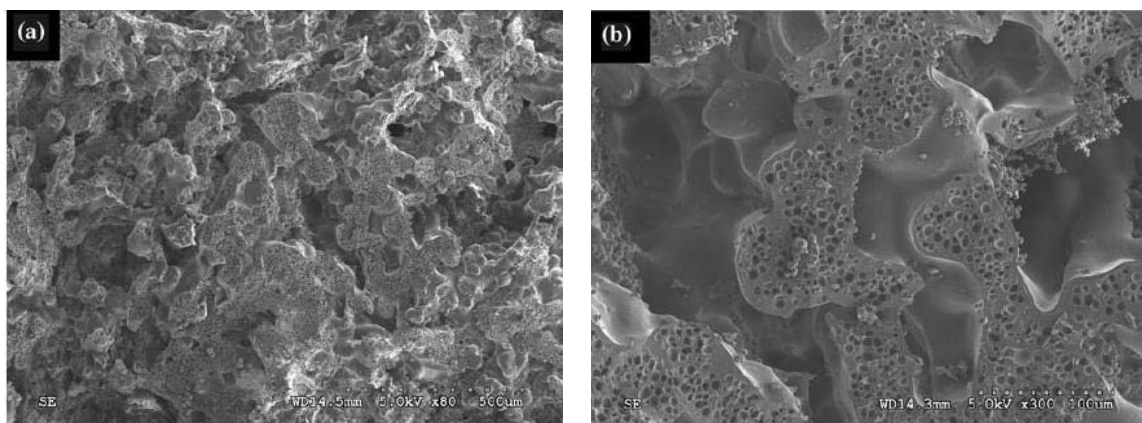


Figure 2-6 : Exemple de morphologie d'un verre bioactif de composition 70% SiO_2 - 30% CaO (% molaire) obtenue par séparation de phase par ajout de PEO⁹³

2.2.2.3. Prototypage rapide

Une alternative à l'utilisation de voies chimiques traditionnelles est la synthèse d'objets tridimensionnels assistée par ordinateur⁹⁴. Le principe général de cet ensemble de techniques repose sur la construction pas-à-pas d'un objet grâce à l'utilisation de la CAO (Conception Assistée par Ordinateur). La manière la plus répandue pour utiliser ce système consiste à faire passer une barbotine, ou un mélange d'une poudre de verre ou de céramique et d'un polymère, à travers une buse d'injection dont le déplacement est contrôlé par ordinateur. Le matériau désiré est ainsi réalisé couche après couche (Figure 2-7). De nombreux exemples de l'application de cette méthode pour l'élaboration de scaffolds pour l'ingénierie osseuse existent dans la littérature^{95, 96, 97}. Un exemple de la morphologie du matériau obtenu est présenté en Figure 2-8.

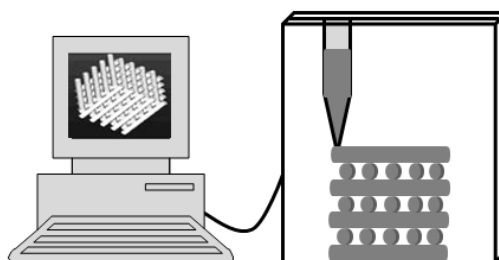


Figure 2-7 : Représentation du principe de l'élaboration d'un scaffold par prototypage

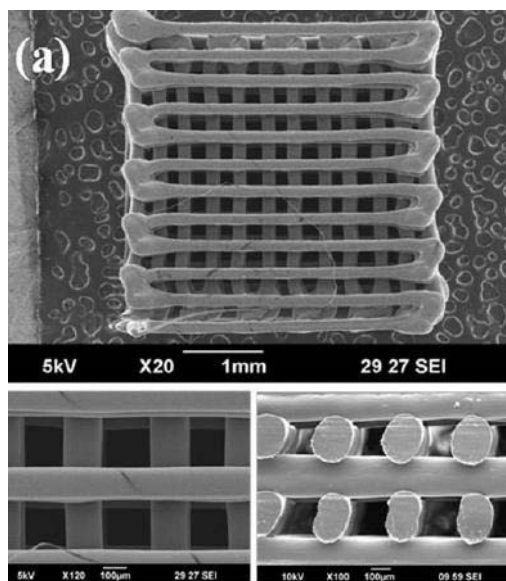


Figure 2-8 : Exemple de morphologie d'un scaffold macroporeux polymère (polycaprolactone et acide lactique co-glycolique) obtenu par prototypage rapide⁹⁸

2.2.2.4. Moussage

2.2.2.4.1 Principe

Le principe de moussage mis en place par Sepulveda et Binner consiste à l'origine en un moussage d'une barbotine de céramique en présence d'un tensioactif et figé par polymérisation *in situ* de monomères⁹⁹.

Cette technique, appelée « gel casting », est utilisée pour la mise en forme des céramiques et peut être utilisée de la même manière en formant une barbotine à partir de poudre de verre formé par fusion¹⁰⁰. Cependant, cette technique peut aussi directement être adaptée au procédé sol-gel¹⁰¹, comme cela a été fait par Sepulveda, Jones et Hench, en introduisant l'étape de moussage avant la gélification, le sol pouvant être polymérisé, il n'est alors plus nécessaire d'utiliser des monomères. Néanmoins, la polymérisation du sol serait trop lente pour avoir un temps de moussage raisonnable sans l'aide d'un catalyseur puissant. Afin d'accélérer la gélification de l'acide fluorhydrique (HF) est ajouté. Le moussage est optimisé grâce à la présence d'un agent moussant, généralement le teepol^{102, 103}.

2.2.2.4.2 Rôle du HF dans la synthèse

Le choix de l'acide fluorhydrique comme catalyseur lors de la synthèse de mousses de verre bioactif n'est pas anodin, en effet, afin de conserver la structure poreuse il est nécessaire que la gélification du TEOS s'amorce pendant le moussage. Le catalyseur le plus efficace est le

HF (Tableau 2-2), il est le seul à permettre d'avoir un temps de moussage raisonnable pour la réalisation de la synthèse. L'acide fluorhydrique donne lieu à un mécanisme de catalyse différent des autres catalyseurs acides dans lequel l'ion fluorure joue un rôle analogue à celui des ions hydroxyles en catalyse basique (Figure 2-9).

Tableau 2-2 : Efficacité des catalyseurs lors de la gélification du TEOS d'après⁴⁴

Catalyseur	Rapport molaire catalyseur : TEOS	pH initial de la solution	Temps de gel (h)
HF	0,05	1,90	12
HCl	0,05	0,05	92
HNO ₃	0,05	0,05	100
H ₂ SO ₄	0,05	0,05	106
HOAc	0,05	3,70	72
NH ₄ OH	0,05	9,95	107
Sans catalyseur	-	5,00	1000

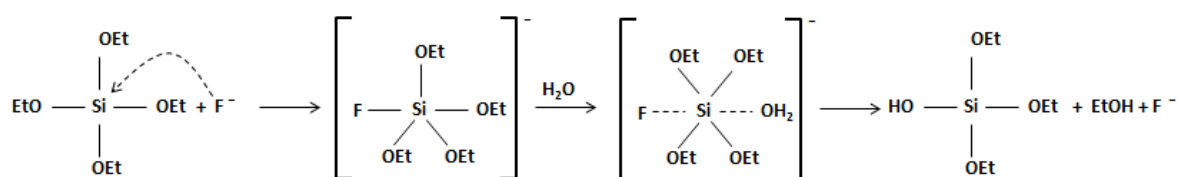


Figure 2-9 : Mécanisme de la réaction d'hydrolyse du TEOS catalysée par du HF

2.2.2.4.3 Influence des paramètres

La concentration en tensioactif joue un rôle très important sur la taille des macropores (mais pas sur celle des mésopores) puisque le tensioactif permet de diminuer la tension de surface de l'interface air-liquide stabilisant ainsi les bulles d'air qui sont à l'origine des macropores¹⁰⁴. En dehors du tensioactif, d'autres paramètres sont importants pour l'élaboration de mousses de verre. La température induit une gélification plus rapide ce qui fait diminuer le temps d'agitation, le volume de mousse et la taille des pores¹⁰⁵. Une température de 25°C semble optimale pour le moussage. La concentration de l'agent de gélification (HF) détermine le temps de gélification et influence la taille de mésopores. La quantité d'eau est un paramètre critique pour le moussage car elle permet la stabilisation du film formé grâce au tensioactif¹⁰⁶.

La température de calcination a aussi une influence importante sur les propriétés de la mousse : pour des températures supérieures à 700°C, la surface spécifique ainsi que la taille

des mésopores diminuent de manière importante, jusqu'à la perte de mésoporosité à 1000°C lorsque le verre commence à cristalliser. Cette diminution importante de la surface spécifique entraîne alors une diminution de la bioactivité. De plus, une élévation de la température de calcination entraîne une diminution de la taille des macropores, toutefois sans trop d'impact sur la taille de leurs interconnexions, et ainsi une augmentation de la résistance à la compression des mousses de verre a été observée par augmentation de l'épaisseur des murs de la mousse¹⁰⁷. La température la plus adaptée pour la calcination semble être de 700 à 800°C.

2.3.Conclusion

De toutes les techniques présentées précédemment pour l'élaboration d'un support macroporeux pour l'ingénierie tissulaire, aucune n'est reconnue comme étant la plus prometteuse. Elles présentent toutes un certain nombre d'avantages mais aussi d'inconvénients. L'imprégnation de mousses polymères est une synthèse comportant généralement de nombreuses étapes d'imprégnation séparées par des phases de séchage de plusieurs heures. La séparation de phase se montre généralement limitée dans les tailles de pores qu'il est possible d'obtenir et le prototypage rapide demande un équipement important.

Pour ces différentes raisons, le moussage qui est plus rapide à mettre en œuvre et qui permet d'obtenir des porosités très intéressantes est la technique qui a été choisie pour ce travail de thèse.

Les empilements de billes représentent aussi une voie de synthèse très intéressante pour le contrôle précis de la porosité qu'elle permet. Cependant, comme exposé précédemment, elle est difficilement applicable à la synthèse directe de scaffolds de verre ayant une porosité suffisante pour l'ingénierie tissulaire. Cette voie a donc été retenue dans la dernière partie de ce travail, lorsque le verre est utilisé sous forme de poudre pour la réalisation d'architectures composites.

Chapitre 3 Techniques d'analyse

3.1.Méthodologie de l'étude

Pour caractériser les différents scaffolds de ce travail ainsi que leurs bioactivités, différentes techniques ont été nécessaires, ce chapitre a pour objectif de les exposer. La méthode et les techniques qui ont été utilisées au cours de ce travail pour déterminer l'intérêt des scaffolds obtenus pour l'application visée sont détaillées dans la Figure 3-1.

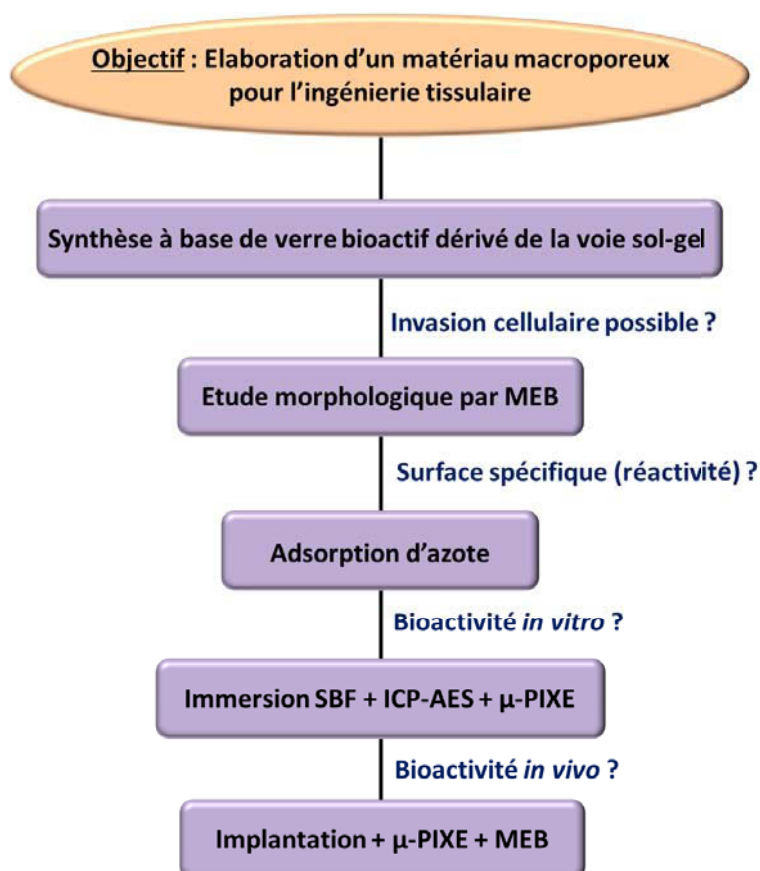


Figure 3-1 : Méthodologie de l'étude des scaffolds à base de verre bioactifs réalisés au cours de ce travail

3.2.Analyses chimiques et structurales

3.2.1. ICP-AES

La spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif ou ICP-AES (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy) est une méthode d'analyse

des concentrations dans la globalité d'un échantillon. Elle va donc permettre au cours de ce travail de déterminer la composition des verres étudiés ainsi que celle des fluides mis à leur contact. Cette technique repose sur le fait qu'un atome libre excité émettra, en se désexcitant, une radiation caractéristique. Ces radiations sont des radiations UV-visible (généralement avec une longueur d'onde comprise entre 160 et 770 nm)¹⁰⁸.

Les échantillons sont introduits dans une lampe à plasma *via* un système de nébulisation. Cela impose donc de travailler avec des échantillons sous forme liquide. Si l'on souhaite analyser des échantillons solides il convient donc de les mettre en solution.

Dans ce système, le plasma a deux fonctions essentielles : il permet de casser les liaisons moléculaires de l'échantillon à analyser de manière à obtenir des atomes libres et il sert à exciter ces atomes.

Les rayonnements émis par les différents atomes de l'échantillon vont ensuite passer à travers un système dispersif qui permet d'isoler les différentes raies d'émission, puis ils vont être dirigés vers un détecteur qui transforme les photons en un signal électrique et permet ainsi de mesurer l'intensité des raies d'émission. Ces intensités sont comparées aux intensités mesurées pour des étalons de référence, il est ainsi possible de déterminer les concentrations des différents éléments constitutifs de l'échantillon à analyser.

Au cours de ce travail des échantillons liquides et solides ont été analysés. Les échantillons liquides ne demandent pas de préparation particulière. En revanche, les éléments constitutifs des échantillons solides doivent être passés en solution. Pour cela, le principe de fusion alcaline est utilisé : un mélange de 500 mg de métaborate de lithium LiBO_2 et de 100 mg de poudre de verre est chauffé à 1100°C à l'aide d'un four à induction magnétique. Le LiBO_2 sert de fondant et permet d'obtenir un mélange liquide homogène en composition appelé « perle » en abaissant le point de fusion de l'échantillon. Cette perle est ensuite dissoute dans 200 mL d'acide nitrique à 1 mol/L de manière à réaliser une solution facilement analysable par l'appareil et de manière à neutraliser la solution rendue très alcaline par le lithium.

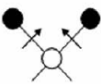
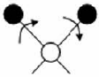
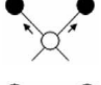
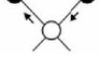
3.2.2. Spectroscopie d'absorption infrarouge

La spectroscopie infrarouge est une spectroscopie vibrationnelle au même titre que la spectroscopie Raman. Elle repose sur l'interaction des molécules constitutives de l'échantillon avec un rayonnement ayant une longueur d'onde de l'ordre du micromètre qui va entraîner le passage de ces molécules de leur état fondamental vers un état d'énergie excité. Le domaine des radiations absorbées en infrarouge (avec un nombre d'onde qui est compris entre 400 et

4000 cm^{-1}) correspond aux énergies de vibration des molécules. L'atténuation du faisceau infrarouge envoyé sur l'échantillon va alors permettre de détecter les modes de vibration des différents groupes fonctionnels et ainsi de les identifier. Puisque les verres bioactifs sont principalement composés d'un réseau de silice, les modes de vibration principaux de la silice sont donnés dans le Tableau 3-1. L'existence de bandes de vibration Si-NBO provient de l'existence d'oxygènes non pontants (NBO : Non-Bridging Oxygen) dans le réseau qui résulte, entre autre, de l'incorporation de calcium au réseau, deuxième élément majoritaire entrant dans la composition des verres bioactifs.

Les échantillons ont été analysés sous forme de poudre en préparant une pastille de l'échantillon dilué dans du KBr.

Tableau 3-1 : Principales bandes de vibration de la silice¹⁰⁹

Bande de vibration	Nombre d'onde (cm^{-1})	
Si-O-Si déformation	760 - 850	
Si-O-Si balancement	450 - 490	
Si-O-Si étirement symétrique	1000-1300	
Si-O-Si étirement asymétrique	1000-1300	
Si-NBO étirement	890-975	-
Si-2NBO étirement	840	-

3.2.3. Diffraction des Rayons X¹¹⁰

Lorsqu'une onde de type rayon X est envoyée sur un échantillon, il se produit un phénomène de diffusion dû à l'interaction avec les électrons des atomes constitutifs de l'échantillon. Cette diffusion peut conduire à l'obtention d'un rayonnement de même longueur d'onde que le rayonnement de départ, il s'agit d'une diffusion élastique. Elle peut aussi conduire à un rayonnement de longueur d'onde plus importante (car il y a perte d'énergie), il s'agit dans ce cas de diffusion inélastique. La diffusion élastique engendrée par un seul atome de l'échantillon n'a pas une intensité importante, cependant, les ondes diffusées par des atomes distribués périodiquement peuvent donner lieu à des interférences constructives. Dans ce cas l'intensité du phénomène de diffusion augmente et le phénomène de diffraction a lieu. La

diffraction a donc lieu lors de l'interaction des photons incidents avec des plans d'atomes organisés dans le matériau à analyser.

Ces plans sont appelés plans réticulaires et sont notés grâce aux indices de Miller : h, k et l. Dans un repère constitué par un nœud du réseau cristallin comme origine et de trois axes de même direction que les vecteurs unitaires **a**, **b** et **c** de la maille, les plans réticulaires croiseront ces axes à une distance égale à une fraction entière des paramètres de la maille soit : **a**/h, **b**/k et **c**/l. Dans certaines directions de l'espace le matériau peut donc être considéré comme une succession de plans parallèles entre eux et équidistants séparés d'une longueur notée d_{hkl} .

Lorsque des photons X d'une longueur d'onde λ provenant d'un tube à rayons X rencontrent un plan d_{hkl} , il y a diffraction pour un angle d'incidence θ du faisceau si la loi de Bragg est satisfaite :

$$2d_{hkl}\sin\theta = n\lambda \quad (3-1)$$

Où n est un entier positif non nul correspondant à l'ordre de diffraction.

La diffraction des rayons X permet donc l'étude des plans réticulaires, et donc l'étude de l'organisation des cristaux, il s'agit d'une méthode d'analyse structurale qui permet d'identifier les familles de plans appartenant à une maille et ainsi d'identifier une phase cristalline. Lors de ce travail, cette méthode va permettre de vérifier la présence éventuelle et la nature des phases organisées qui peuvent résulter d'une cristallisation partielle du verre.

3.3. Analyses morphologiques par microscopies électroniques¹¹⁰

3.3.1. Production des électrons et optique électronique

Il existe plusieurs sources utilisées pour la production d'un faisceau d'électrons incident en microscopies électroniques. La plus courante consiste en un filament de tungstène (cathode) chauffé qui produit alors des électrons qui sont accélérés grâce à une différence de potentiel entre la cathode et l'anode.

La condition nécessaire à l'utilisation d'un faisceau d'électrons pour la microscopie est l'existence de lentilles permettant d'agir sur ce faisceau pour le focaliser et le diriger. Des lentilles électromagnétiques sont utilisées puisqu'un champ électromagnétique va influencer sur la trajectoire des électrons en mouvement. Ce sont en fait des bobines parcourues par un

courant, ce qui crée un champ magnétique symétrique autour de l'axe z de la lentille. Ce système va permettre de faire converger un faisceau d'électrons arrivant selon cet axe. A cause des aberrations importantes qui existent en optique électronique, des diaphragmes sont utilisés pour éliminer les électrons qui s'éloignent de l'axe du faisceau. Ce système permet ainsi d'obtenir un faisceau d'électrons qui va servir à analyser l'échantillon.

Deux grandes techniques de microscopies électroniques existent, en MEB (Microscopie Electronique à Balayage) le faisceau est envoyé sur un échantillon massif et les émissions de rayonnements en surface qui résultent de l'interaction avec la matière constitutive de l'échantillon sont analysées. En MET (Microscopie Electronique en Transmission), l'échantillon est préparée sous forme de coupe fine et le faisceau d'électron est étudié après passage à travers l'échantillon.

3.3.2. Microscopie Electronique à Balayage

Cette technique de microscopie électronique repose sur les différentes émissions qui peuvent résulter de l'interaction des électrons et de la matière à analyser lorsque celle-ci est balayée par un faisceau d'électrons. Lorsque des électrons sont envoyés à la surface d'un échantillon ils pénètrent dans la matière et s'y propagent dans toutes les directions sur quelques micromètres délimitant une « poire » d'interaction, dont la taille dépend de la masse des atomes de la cible. A l'intérieur de cette « poire » différentes émissions vont résulter de l'interaction des électrons avec la matière constitutive de l'échantillon : émission d'électrons Auger, d'électrons secondaires, d'électrons rétrodiffusés, de fluorescence X et de photons lumineux. Chaque émission permet d'avoir accès à des informations différentes, mais chacune d'elle requiert l'utilisation d'un détecteur adapté. Au cours de ce travail deux émissions différentes ont été étudiées.

L'émission d'électrons secondaires provient principalement de l'ionisation des atomes de la cible. Cette émission n'est observable que sur les premiers nanomètres de la « poire » d'interaction à cause de la faible énergie des électrons secondaires (< 50 eV) qui empêche ceux émis en profondeur de sortir du matériau. Elle est donc très sensible à la topographie de l'échantillon et permet son étude.

L'émission d'électrons rétrodiffusés correspond à des électrons d'un faisceau primaire d'énergie importante qui ont subi une diffusion à un angle supérieur à 90° suite à une interaction de type Coulombienne avec le noyau des atomes présents dans l'échantillon. Plus

les atomes de la cible seront lourds (Z élevé) et plus la quantité d'électrons rétrodiffusés sera élevée. Ce type d'émission permet donc de faire de l'imagerie de contraste chimique.

Pour observer ces émissions, les échantillons à étudier sont collés sur un support conducteur à l'aide de scotch carbone puis observés à l'aide d'un mini-MEB Hirox. Les clichés de topographie des scaffolds sont réalisés à une tension d'accélération de 5 kV. A cette tension, une métallisation des échantillons n'a pas été nécessaire. Les observations des coupes histologiques par électrons rétrodiffusés ont été réalisées à 10 kV après déposition d'une couche de carbone à la surface des coupes.

3.3.3. Microscopie Electronique en Transmission

Comme expliqué précédemment, des électrons d'un faisceau incident sont envoyés à travers un échantillon fin, les interactions entre les électrons et l'échantillon vont permettre d'obtenir une image de l'échantillon avec une excellente résolution (de l'ordre du nanomètre). Les électrons sont produits par le canon à électrons, un jeu de lentilles électromagnétiques permet d'ajuster la taille du faisceau et d'ajuster le grandissement. Avec cette méthode, il est possible d'obtenir une image par contraste de diffusion des électrons transmis et/ou par diffraction dans le cas de matériaux organisés.

Les échantillons pour la microscopie électronique à transmission sont broyés pour obtenir une poudre fine qui est ensuite incluse en résine dans un tube eppendorf. Des coupes ultrafines (de l'ordre de 100 nm d'épaisseur) sont préparées à l'ultramicrotome et déposées sur une grille en cuivre.

3.4. Analyse de porosité

3.4.1. Adsorption d'azote

3.4.1.1. Notation des pores en fonction de leur taille

Les pores sont généralement classés en plusieurs catégories en fonction de leur taille. Les pores de taille inférieure à 2 nm sont appelés micropores alors que les pores supérieurs à 50 nm sont appelés macropores. Les pores de taille intermédiaire sont appelés mésopores.

3.4.1.2. Principe général

L'adsorption d'azote est une méthode d'analyse qui repose sur le fait que la surface d'un solide est capable d'adsorber des molécules de gaz qui forme une couche à sa surface. En connaissant la pression partielle de gaz il est alors possible de déterminer le nombre de molécules adsorbées et, par connaissance de la taille des molécules de gaz, il est possible de déduire la surface qu'elles recouvrent et donc la surface spécifique du matériau. La connaissance de cette surface présente un grand intérêt pour l'étude des matériaux bioactifs puisqu'elle représente la surface de contact entre le matériau et le milieu biologique, elle va donc fortement influencer sa réactivité. Le gaz qui s'adsorbe est appelé adsorbat et l'échantillon solide est appelé adsorbant.

Selon les interactions qui se forment entre adsorbant et adsorbat, deux types d'adsorption sont distingués. Des interactions de Van der Waals ou de type électrostatique donneront lieu à une adsorption totalement réversible appelée physisorption. A l'inverse, des liens chimiques entre adsorbant et adsorbat donneront lieu à une adsorption beaucoup moins réversible voir irréversible, elle est alors qualifiée de chimisorption. L'analyse par adsorption d'azote repose sur le principe de physisorption¹¹¹.

3.4.1.3. Isothermes d'adsorption

Lors d'une analyse par adsorption d'azote, l'azote est en équilibre entre la phase gazeuse et la phase adsorbée. A température constante, il est possible d'obtenir une isotherme d'adsorption qui est déterminée par l'ensemble des états d'équilibre compris entre zéro et la pression de vapeur saturante du diazote. Le phénomène de physisorption étant réversible il est possible d'étudier la désorption des molécules de gaz. Cela permet d'obtenir une isotherme représentant la quantité de gaz adsorbée par unité de masse de l'adsorbant en fonction de la pression relative P/P^0 composée d'une branche d'adsorption et d'une branche de désorption.

Au cours de ce travail, les analyses ont été réalisées par adsorption d'azote à 77 K (appareils Quantachrom Autosorb 1 et Micromeritics Tristar). Les échantillons ont été dégazés sous vide à 120°C pendant une nuit pour enlever les molécules physisorbées. Les isothermes d'adsorption / désorption sont enregistrées. La forme de la courbe ainsi obtenue renseigne sur la porosité du matériau étudié, six familles d'isothermes existent (Figure 3-2)¹¹².

Les isothermes de type I correspondent à des adsorbants microporeux (tels que des charbons actifs ou des tamis moléculaires). Les micropores se remplissent à des pressions faibles d'où l'apparition rapide d'un palier de saturation.

Les isothermes de type II sont observées pour des adsorbants non-poreux ou macroporeux. La quantité d'azote adsorbée croît rapidement jusqu'à la fin de la formation d'une monocouche à la surface, puis elle croît de manière linéaire pendant l'adsorption par multi-couches.

Les isothermes de type III et V se rencontrent rarement et correspondent à des cas très spécifiques présentant peu d'intérêt ici.

Les isothermes de type IV correspondent à des échantillons mésoporeux qui donnent lieu à un phénomène de condensation capillaire à l'intérieur des pores. Ce phénomène n'étant pas totalement réversible, les isothermes d'adsorption et de désorption ne sont pas identiques d'où l'existence d'une boucle d'hystérésis.

Les isothermes de type VI représentent une adsorption par paliers correspondants aux multicouches d'adsorption se formant sur une surface uniforme et non-poreuse.

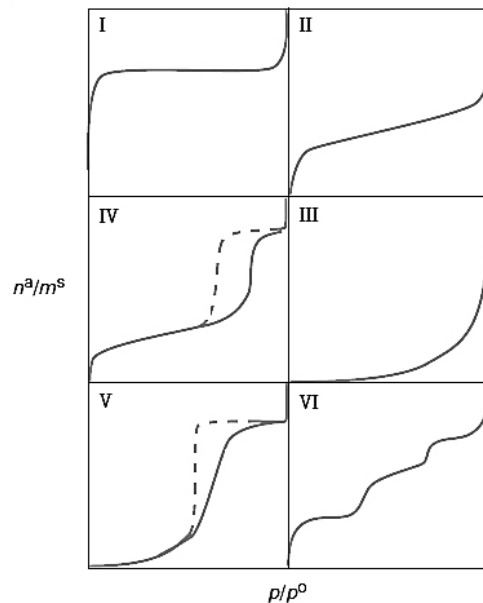


Figure 3-2 : Classification des isothermes selon leur forme (les branches de désorption sont représentées par des lignes pointillées), d'après¹¹³

3.4.1.4. Calcul de surface spécifique par la méthode BET

Pour déduire la surface spécifique d'un matériau à partir de l'isotherme d'adsorption, la méthode la plus courante est l'utilisation du modèle développé par Brunauer, Emmett et Teller, dit modèle BET¹¹⁴. Il permet d'exprimer le volume adsorbé sur une monocouche :

$$(V_{ads} \cdot \frac{P^0}{P} - 1)^{-1} = \frac{1}{V_{mono} \cdot C} + (\frac{C-1}{V_{mono} \cdot C}) \frac{P}{P^0} \quad (3-2)$$

Où : V_{mono} est le volume de gaz nécessaire pour recouvrir la surface de l'adsorbant par une monocouche

V_{ads} est le volume de gaz adsorbé

P est la pression partielle de l'échantillon

P^0 est la pression de vapeur saturante de l'adsorbat

C est la constante BET

Le terme $\left(V_{ads} \cdot \frac{P^0}{P} - 1\right)^{-1}$ est connu grâce à l'isotherme d'adsorption, en traçant la fonction $\left(V_{ads} \cdot \frac{P^0}{P} - 1\right)^{-1} = f\left(\frac{P}{P^0}\right)$, une droite de pente $\frac{C-1}{V_{mono} \cdot C}$ et d'ordonnée à l'origine $\frac{1}{V_{mono} \cdot C}$ est obtenue. V_{mono} peut alors être calculé, et en connaissant le volume et la surface occupés par une molécule d'adsorbat, la surface spécifique peut être déduite :

$$S_{BET} = \frac{V_{mono} \cdot N_A \cdot A_M}{V_M} \quad (3-3)$$

Où : S_{BET} est la surface spécifique déterminée par la méthode BET

N_A est le nombre d'Avogadro

A_M est la section utile de l'adsorbat (16,2 Å² pour l'azote)

V_M est le volume molaire de l'adsorbat liquide (34,7 cm³/mol pour l'azote)

3.4.1.5. Etude de la distribution des tailles de mésopores par la méthode BJH

Une première méthode d'estimation de la taille des pores assimile les pores à des cylindres de rayon moyen $\bar{r}_p$, ce rayon peut être estimé par la formule suivante :

$$\bar{r}_p = \frac{2V_p}{S_{BET}} \quad (3-4)$$

Où : S_{BET} est la surface spécifique déterminée par la méthode BET

V_p est le volume poreux total, déterminé à la pression relative $P/P^0=0,995$.

Cette méthode ne permet cependant que d'approximer une taille de pore moyenne qui n'a pas forcément de réalité physique si la distribution des tailles de pores est importante. Le phénomène de condensation capillaire qui a lieu dans les mésopores (isotherme de type IV) peut être utilisé pour estimer la distribution de taille des mésopores. La méthode qui permet de réaliser cette estimation à partir des isothermes d'adsorption et de désorption s'appelle la méthode BJH du nom de ses inventeurs : Barrett, Joyner et Halenda¹¹⁵.

Les mésopores sont considérés comme des tubes capillaires dans lesquels l'adsorbat se condense à la pression P , la loi de Kelvin, qui permet d'exprimer cette pression en fonction du rayon de courbure r_k du ménisque liquide qui se forme, peut alors être appliquée :

$$P = P^0 \exp\left(-\frac{2\gamma.V_M}{R.T.r_k}\right) \quad (3-5)$$

Où : γ est la tension superficielle de l'adsorbat liquide à la température d'adsorption T

V_M est le volume molaire de l'adsorbat liquide

R est la constante des gaz parfaits

Si le gaz utilisé est le diazote à 77K, la loi de Kelvin s'écrit alors :

$$r_k = \frac{-0,415}{\log(P/P^0)} \quad (3-6)$$

Il est ainsi possible de connaître la valeur de r_k . Pour en déduire la valeur du rayon de pores r_p , il est nécessaire de connaître l'épaisseur de la couche multimoléculaire qui recouvrait déjà la surface interne du mésopore avant que le phénomène de condensation capillaire ne se produise (Figure 3-3). Dans le cas de pores cylindriques, comme sur le schéma, r_p s'exprime de la manière suivante :

$$r_k = r_p + t \quad (3-7)$$

L'épaisseur t peut être déterminée par l'équation de Harkins et Jura :

$$t(nm) = \left(\frac{0,1399}{0,034 - \log(P/P^0)}\right)^{0,5} \quad (3-8)$$

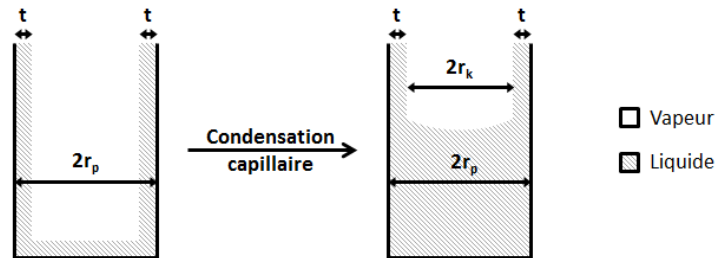


Figure 3-3 : Représentation de la condensation capillaire de l'adsorbat dans des pores cylindriques

3.4.2. Porosimétrie mercure

La porosimétrie mercure est une méthode de caractérisation qui va permettre de mesurer la porosité d'un matériau à différentes échelles (de quelques nanomètres à quelques centaines de micromètres) qui repose sur le fait qu'un liquide non-mouillant peut, sous l'effet d'une pression, envahir les pores d'un matériau. Plus le rayon de pore sera petit et plus il faudra appliquer une pression importante selon l'équation de Washburn et Jurin¹¹⁶:

$$pr = -2\gamma\cos\theta \quad (3-9)$$

Où : p est la pression appliquée au liquide

r est le rayon du pore

γ est la tension superficielle du liquide, ici le mercure

θ est l'angle de mouillage du liquide avec le matériau

En connaissant l'angle de mouillage, la tension superficielle du mercure et la pression appliquée il est alors possible de déterminer le rayon de pores.

Cette méthode est la plus répandue pour la caractérisation des macropores, et peut permettre d'accéder à de nombreuses informations telles que la distribution de tailles de pores, la porosité totale, la densité apparente ainsi que la surface spécifique. Toutefois, cette technique possède un certain nombre de limitations dont la plus importante est qu'elle ne mesure pas vraiment des tailles de pore mais le diamètre de l'ouverture la plus large qui permet d'accéder à ce pore depuis la surface, par conséquent la porosimétrie mercure montrera toujours des tailles de pore plus petites que le MEB¹¹⁷. De plus, elle est généralement limitée, en fonction de l'appareil de mesure, à des pores d'un diamètre de 200 à 350 micromètres. Ces deux limitations rendent plus difficile l'étude de matériaux ultra-macroporeux par cette technique.

3.4.3. Mesure de porosité par traitement des images

MEB

La détermination des tailles des ultra-macropores et de leurs interconnexions (c'est-à-dire les ouvertures qui permettent le passage d'un pore à l'autre) directement par l'étude des images d'un matériau poreux obtenues par MEB est régulièrement utilisée pour déterminer une taille moyenne de pores^{118, 119, 120}. Afin de réaliser une distribution des tailles de pores et d'interconnexions un grand nombre de mesures sont nécessaires, le logiciel ImageJ¹²¹ a donc été utilisé pour faciliter ce travail. Des images ont été réalisées par MEB en différents endroits du matériau et les pores et les interconnexions visibles sur ces images ont été mesurés (Figure 3-4). Les distributions de diamètres de pores sont calculées sur environ 100 valeurs mesurées alors que les distributions des diamètres d'interconnexions sont calculées sur environ 50 valeurs mesurées.

Les distributions ainsi obtenues ne représentent pas les distributions réelles de taille de pore et d'interconnexions mais ont tendance à minimiser ces valeurs en fonction du plan de coupe par rapport au diamètre des pores comme le soulignent Jones *et al.*¹²².

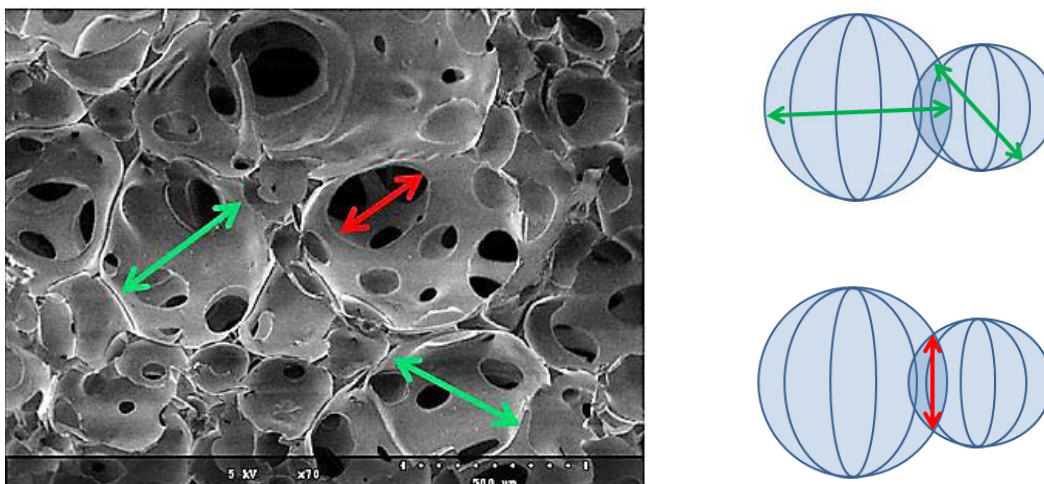


Figure 3-4 : Cliché MEB et représentation des mesures des diamètres de pores et d'interconnexions

3.4.4. Comparaison des deux méthodes

Pour réaliser cette comparaison la porosimétrie mercure ainsi que la mesure de porosité par traitement des images MEB ont été utilisées sur les mêmes échantillons. La Figure 3-5 montre la superposition des résultats des deux méthodes d'analyse pour la mousse M75-B (4.1, Page 85). Si la méthode de mesure directe par MEB est critiquée, c'est qu'elle dépend de l'axe de coupe qui, s'il n'est pas sur le diamètre des pores provoque une minimisation de la taille de pores. Cette méthode permet donc de mettre en évidence l'existence de pores supérieurs à 300 μm de diamètre (qui ne sont pas étudiables par porosimétrie mercure) qui semble plus cohérente avec les mesures d'interconnexions pour la mousse M75-B. Les résultats pour la mousse M75-A montrent la même tendance avec de plus faibles tailles de pores déterminées par porosimétrie mercure qui occultent une partie de la porosité de la mousse. Toutefois, les deux méthodes s'accordent sur le fait qu'il existe une différence dans la distribution des tailles de pore entre M75-A et M75-B. En effet, la porosimétrie mercure donne un diamètre de pore moyen de 34 μm et de 123 μm pour M75-A et M75-B respectivement alors que la méthode de mesure par traitement des images MEB donne un diamètre de pore moyen de 161 μm et de 356 μm pour M75-A et M75-B respectivement. La méthode d'observation directe en MEB permet en plus d'obtenir un diamètre moyen d'interconnexion de 38 μm pour M75-A et de 136 μm pour M75-B. Ainsi, si aucune des deux méthodes ne semble parfaitement adaptée à l'étude de la distribution de la porosité elles permettent toutes les deux de comparer des matériaux aux macroporosités différentes. Devant la plus grande simplicité de mise en œuvre de l'observation directe par MEB qui présente l'avantage d'être non destructive et qui en plus

permet de caractériser les pores de quelques centaines de micromètres, qui sont les plus intéressants pour l'ingénierie tissulaire, cette méthode sera utilisée pour caractériser l'ultra-macroporosité des scaffolds dans la suite de ce travail.

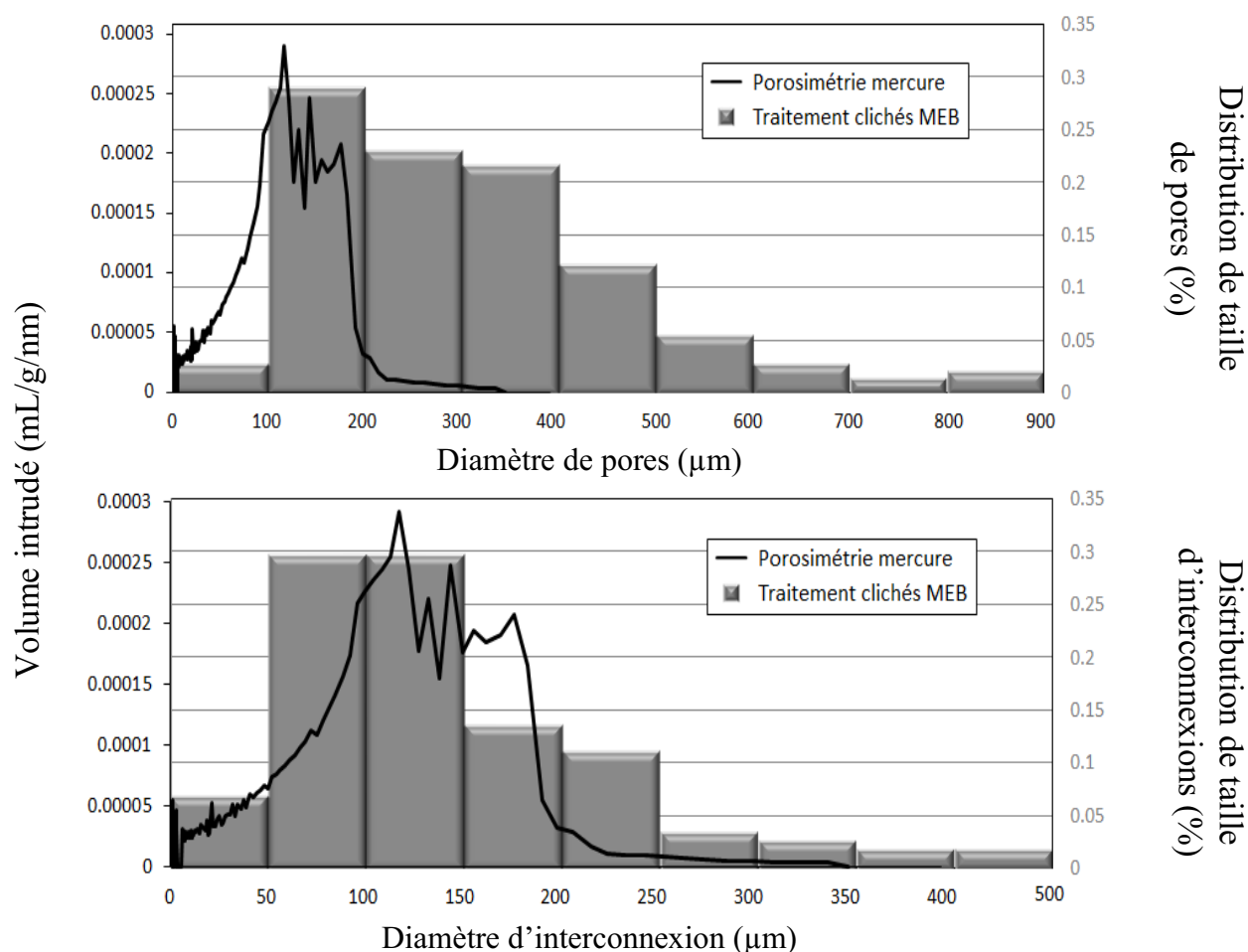


Figure 3-5 : Distributions de tailles de pores et d'interconnexions par porosimétrie mercure et par traitement des clichés MEB pour la mousse M75-B

3.5. Caractérisation de la bioactivité *in vitro*

Comme il a été montré précédemment (1.3.2, Page 27), il existe une corrélation forte entre la capacité d'un verre à induire la précipitation d'une couche d'apatite à sa surface lorsqu'il est immergé dans du SBF et sa bioactivité. Afin d'avoir une première idée du comportement des matériaux destinés à des applications de régénération osseuse il est donc intéressant de regarder leur comportement au contact du SBF.

3.5.1. Préparation du SBF

Dans le but d'éviter la précipitation de phosphate de calcium dans le SBF qui serait préparé trop longtemps à l'avance les recommandations de Bohner et Lemaître²² ont été suivies, c'est-à-dire que deux solutions différentes ont été préparées, la première contenant tous les sels nécessaires à l'exception du calcium qui sera dans la seconde solution. Toutefois, le tampon de pH préconisé par Kokubo²¹ sera conservé : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS). Pour les deux solutions de chacune 500 mL, soit pour l'élaboration de 1 L de SBF, le protocole suivi est le même, 350 mL d'eau distillée et 1 mL d'acide chlorhydrique à 2 N sont thermostatés à 37°C puis les différentes poudres sont ajoutées successivement en attendant la dissolution complète de chacune d'elle avant l'ajout de la suivante. Les natures des produits solides de départ ainsi que les quantités utilisées sont données dans le Tableau 3-2. Quand le dernier solide est dissout, le pH est ajusté à 7,4 à l'aide d'acide chlorhydrique à 2 N et le volume de chaque solution est ajusté à 500 mL. Les solutions sont ensuite conservées au réfrigérateur dans des bouteilles en polypropylène.

Tableau 3-2 : Produits et quantités utilisés pour l'élaboration de SBF¹²³

Solides de départ		Masse de solide ajoutée (g)	
Formule	Pureté	Solution A	Solution B
NaCl	99,5%	8,035	0
KCl	99%	0,225	0
K₂HPO₄.3H₂O	99%	0,231	0
MgCl₂.6H₂O	99%	0,311	0
Na₂SO₄	99%	0,072	0
NaHCO₃	99,5%	0,355	0
CaCl₂	97%	0	0,292
TRIS	99%	3,059	3,059

3.5.2. Protocole pour l'étude de l'interaction entre un matériau et du SBF

Au moment de lancer les interactions matériau / SBF, le SBF est préparé en mélangeant les solutions A et B selon un rapport 1:1. Les échantillons de verre (sous forme de poudre ou de scaffold) sont placés dans des flacons et du SBF est ajouté selon un rapport 1 mL de SBF pour 1 mg de solide. Les flacons sont ensuite placés sur un agitateur à plateau dans une étuve à

37°C. Lorsque la durée souhaitée d'interaction est atteinte, le liquide est prélevé et filtré avec un filtre de 0,2 µm puis analysé rapidement par ICP-AES.

En cas d'interaction avec un scaffold, le matériau est récupéré et lavé à l'acétone afin d'éviter que la réaction ne se poursuive et afin d'éviter le dépôt de sels tels que NaCl après évaporation du liquide qui pourraient perturber l'observation éventuelle d'une couche de phosphate de calcium.

3.5.3. Préparation des échantillons pour l'analyse par faisceaux d'ions

Les mesures réalisées par ICP-AES apportent des informations sur les concentrations dans la globalité de l'échantillon. Afin d'obtenir une évaluation plus fine du processus de bioactivité, des observations et des mesures à l'échelle locale (de l'ordre du micromètre) ont été effectuées par micro-faisceau d'ions. Dans le but de réaliser ces analyses, les scaffolds récupérés après immersion dans le SBF sont lavés, séchés puis inclus en résine. Des coupes qui permettront l'observation de la surface mais aussi de l'intérieur des scaffolds peuvent ainsi être réalisées. Deux modes de préparations ont été utilisés pour préparer les coupes. Les coupes de 500 µm d'épaisseur (utilisées dans les Parties 4.1, 5.2 et 8.2) ont été réalisées à l'aide d'une scie diamantée à faible vitesse (Figure 3-6), pour les coupes de 50 µm (pour les échantillons des Parties 4.2 et 5.3) et de 20 µm (pour les échantillons des Chapitres 10 et 11) un microtome a été utilisé (Leica RM 2145).

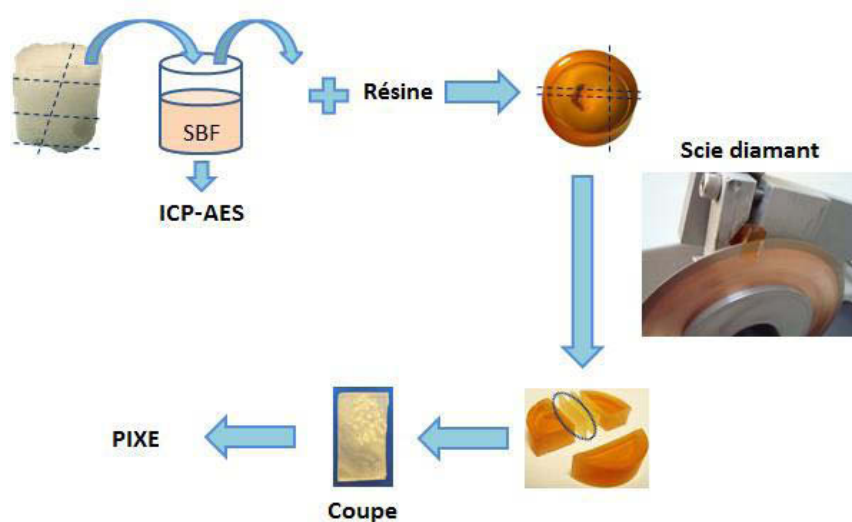


Figure 3-6: Représentation schématique de la préparation des cibles de 500 µm pour l'analyse par PIXE

3.6.Imagerie chimique quantitative par micro-faisceaux d'ions

L'imagerie chimique quantitative par micro-faisceau d'ions a été largement utilisée au cours de ce travail en raison de son intérêt important pour l'étude des phénomènes biomimétiques. En effet, l'étude du processus de bioactivité requiert une analyse locale permettant de comprendre les phénomènes de dissolution et de précipitation dans toute l'épaisseur du matériau. De plus, la grande sensibilité de ces techniques permet l'étude des éléments traces qui peuvent avoir une grande influence sur les systèmes biologiques. Le principe théorique de cette méthode est décrit en Annexe, page 207.

3.6.1. Procédure analytique

3.6.1.1. Méthode d'obtention des spectres et des cartographies

Le faisceau de particules incidentes est utilisé afin de balayer la surface de l'échantillon. A chaque point (qui correspond à la taille du faisceau) les fluorescences émises sont détectées ce qui permet de connaître la répartition des éléments dans l'échantillon sur la surface balayée. La résolution de l'image obtenue dépend directement du diamètre du faisceau mais aussi de l'homogénéité de l'échantillon en profondeur puisque la pénétration des ions dans la matière implique une analyse sur une profondeur de plusieurs micromètres jusqu'à la centaine de micromètres. Dans le cadre de cette étude, une taille de faisceau de 1 μm sera suffisante. Puisque l'analyse est faite par balayage, à chaque point de la cartographie correspond un spectre. A la fin de l'analyse le spectre somme de tous les points est obtenu.

Afin de représenter les cartographies et de réaliser des analyses qualitatives et quantitatives par la suite, il convient dans un premier temps d'identifier les éléments. Pour cela un étalonnage en énergie est réalisé sur un échantillon standard ce qui permet d'identifier les raies caractéristiques des différents éléments. Lorsque les éléments sont identifiés, une cartographie de la répartition d'un élément peut être obtenue en isolant le pic d'émission caractéristique à l'aide du logiciel Supavisio comme montré sur la Figure 3-7: la contribution du silicium au spectre total est isolée et permet d'obtenir la cartographie de répartition du silicium sur la zone balayée par le faisceau.

De plus, grâce au logiciel Supavisio, il est possible de définir des régions d'intérêt appelées ROI (Region Of Interest) grâce à des masques dessinés sur les cartographies, ces masques permettent d'isoler le spectre de fluorescence correspondant à cette zone. La Figure 3-8 montre en **a)** la ROI délimitée par le masque représenté en vert, le spectre total correspondant à la zone délimitée est alors le spectre représenté en gris en **b)**. L'intérêt de définir ces ROI est d'isoler le spectre correspondant à des zones différentes comme par exemple des couches de phosphate de calcium dans notre cas pour étudier la bioactivité des matériaux. Les spectres ainsi obtenus seront ensuite traités pour obtenir des mesures de concentrations (3.6.1.2, Page 70). Mais cela peut aussi servir à déterminer la composition d'une impureté dans un matériau, la composition élémentaire des différentes phases d'un matériau, etc...

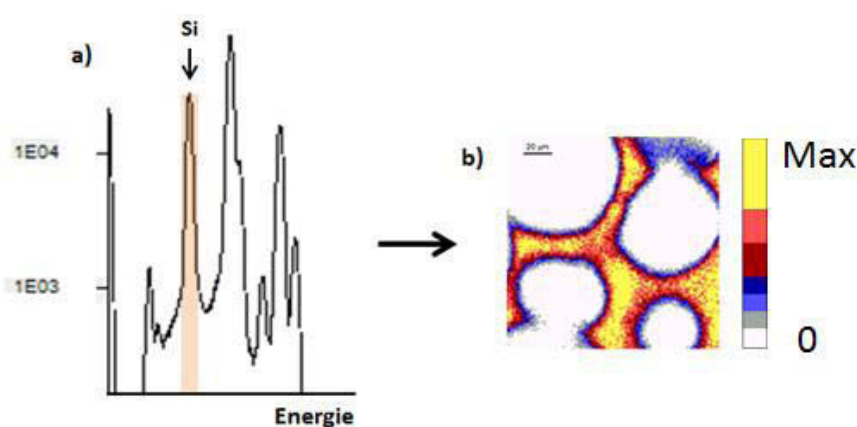


Figure 3-7 : Représentation de la méthode d'obtention des cartographies élémentaires pour le silicium. **a)** La plage d'énergie correspondant à la raie d'émission du silicium est sélectionnée de manière à isoler cet élément sur la totalité de la zone balayée par le faisceau. **b)** La distribution du silicium sur cette zone peut alors être obtenue

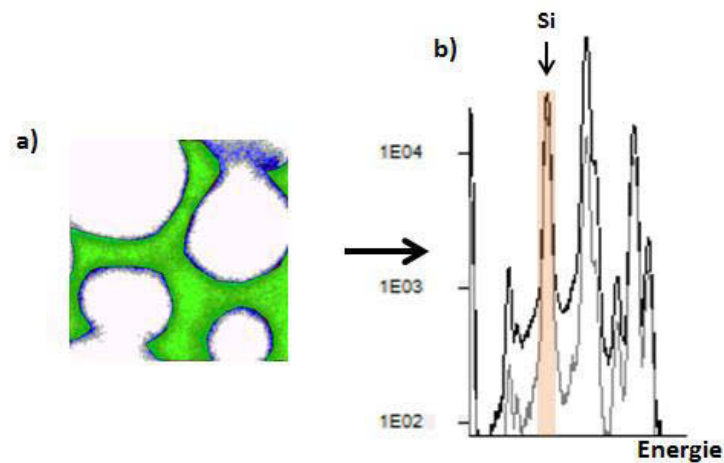


Figure 3-8 : Représentation de la méthode d'obtention des spectres PIXE pour une région donnée. **a)** une cartographie d'un élément chimique (ici le silicium) est utilisée pour délimiter les zones d'intérêt (ROI en vert) sur la zone balayée par le faisceau. **b)** Le spectre correspondant (gris) peut alors être isolé du spectre total (noir) de la zone balayée par le faisceau.

3.6.1.2. Analyse quantitative

3.6.1.2.1 Calcul des concentrations

Dans la partie précédente il a été montré qu'il est possible d'avoir des informations qualitatives sur les éléments constitutifs de l'échantillon. Il devient alors nécessaire à partir du spectre d'être capable d'évaluer quantitativement la composition. La surface d'un pic est proportionnelle à la quantité de photons X émis par l'élément correspondant, qui est elle-même proportionnelle à la quantité de cet élément dans l'échantillon. Pour connaître la composition de l'échantillon il faut donc convertir le nombre de photons détectés en concentration élémentaire.

Le nombre de photons émis dans un élément d'épaisseur dx de l'échantillon dans lequel a lieu l'interaction est donné par la relation :

$$dN_Z^X = N_p \cdot N_Z \cdot \sigma_S^X \cdot dx \quad (3-10)$$

Où : N_Z est la concentration de l'élément de numéro atomique Z que l'on cherche à quantifier en atome/cm³

N_p est le nombre de particules incidentes

σ_S^X est la section efficace totale de production des rayons X (Annexe 1.3.3.2, Page 218)

Il est possible d'exprimer la concentration N_Z en concentration massique, dans ce cas la formule précédente devient :

$$dN_Z^X = N_p \cdot \frac{\mathcal{N}_A \cdot C_Z}{A_Z} \cdot \sigma_S^X \cdot dx \quad (3-11)$$

Où : $\mathcal{N}_A$ est le nombre d'Avogadro ($\mathcal{N}_A = 6,023 \cdot 10^{23}$ atomes/mol)

C_Z est la concentration massique de l'élément de numéro atomique Z (en g/cm³)

A_Z est la masse atomique de l'élément

Toutefois, tous les photons émis par l'échantillon ne sont pas détectés, un certain nombre de phénomènes imposent la prise en compte de paramètres d'atténuation, de détection et de comptage qui conduisent à un nombre de photons détectés différent du nombre de photons produits :

$$dN_Z^X = N_p \cdot \sigma_S^X \cdot T_{tot} \cdot \varepsilon \cdot \frac{\Omega}{4\pi} N_Z \cdot dx \quad (3-12)$$

Où : Ω est l'angle solide de détection

ε est l'efficacité du détecteur

T_{tot} est un paramètre lié à l'atténuation des photons par les différents matériaux se trouvant sur leur trajet. Il possède deux contributions, une liée à l'atténuation dans l'échantillon ($T_{éch}$) et l'autre liée à des filtres absorbants (T_{abs}) éventuels placés devant le détecteur.

$$T_{tot} = T_{abs} \cdot T_{éch} \quad (3-13)$$

$$T_{tot} = e^{-\mu_{abs} \cdot t_{abs}} \cdot e^{-\mu_{éch} \cdot t_{éch}} \quad (3-14)$$

Où : μ représente le coefficient d'atténuation linéaire

t est l'épaisseur de matière traversée

La concentration N_Z de l'élément à quantifier peut alors être déterminée à partir de la connaissance du nombre de photons mesurés dN_Z^X qui provient de l'intégration du pic caractéristique de l'élément Z . Il faut toutefois faire attention puisque, au cours de ce rapport, tous les échantillons étudiés le sont sous forme de coupes épaisses. Par conséquent, il faut prendre en compte les deux principaux effets de matrice qui sont la perte d'énergie des protons dans la matière (ralentissement voire arrêt) et l'atténuation des rayons X émis en profondeur.

Pour cela, il est nécessaire de faire intervenir le pouvoir d'arrêt : $\frac{dE}{dx} = S(E)$, l'équation 3-10 devient alors :

$$N_Z^X = N_p \cdot N_Z \cdot x \cdot T_{abs} \cdot \varepsilon \cdot \frac{\Omega}{4\pi} \cdot \int_{E_0}^0 \frac{\sigma_S^X(E) \cdot T_{éch}(E)}{S(E)} dE \quad (3-15)$$

Différentes approches sont possibles pour connaître les valeurs des différents termes de l'équation telles que l'utilisation d'un étalon de référence ou encore d'un étalon interne. Une troisième méthode, appelée absolue, consiste à utiliser des logiciels de traitement contenant des valeurs tabulées des différents paramètres. Cette dernière méthode sera celle employée dans la suite de ce travail, le logiciel de traitement est le logiciel GUPIX.

3.6.1.2.2 Utilisation du code GUPIX

Le logiciel GUPIX permet de déterminer les concentrations des différents éléments constitutifs de l'échantillon à partir du spectre PIXE isolé grâce aux masques. Pour cela, le logiciel détermine l'intensité des pics caractéristiques en utilisant un spectre simulé construit à partir de données expérimentales et tabulées puis cherche à reproduire au mieux, en plusieurs itérations, le spectre expérimental en suivant la méthode des moindres carrés. Les données tabulées concernent les énergies des raies caractéristiques ainsi que les rendements de fluorescence et les intensités relatives de raies qui sont modifiées de manière à prendre en compte l'efficacité du détecteur, les effets d'absorption et les effets de matrice¹²⁴.

Cependant, le bruit de fond continu ne peut pas être modélisé, le spectre simulé ne contient donc que les pics caractéristiques. La stratégie utilisée pour pallier cette difficulté consiste en l'application au spectre expérimental d'une fonction filtre symétrique appelée « chapeau haut de forme » (Top-hat filter) composée d'un lobe supérieur central positif UW (Upper lobe Width) et de deux lobes externes négatifs LW (Low lobe Width). Cette fonction filtre est représentée sur la Figure 3-9 qui montre que ce traitement permet d'éliminer complètement le bruit de fond linéaire.

Le spectre peut alors être modélisé et ainsi, les intensités des pics correspondants aux différents éléments peuvent être déterminées. Un exemple de modélisation est donné en Figure 3-10, les pics du spectre simulé débarrassés de la contribution du bruit de fond permettent de connaître les intensités des pics du spectre expérimental. Il est alors possible de calculer les concentrations élémentaires par la formule :

$$C_Z = \frac{I_Z^X}{I_t \cdot Q \cdot H \cdot \varepsilon_i \cdot T_{abs}} \quad (3-16)$$

Où : C_Z est la concentration de l'élément de numéro atomique Z

I_Z^X est l'intensité expérimentale de la raie X d'émission de l'élément Z

I_t est l'intensité théorique calculée obtenue à la fin des itérations

Q est la charge déposée par le faisceau

H est un paramètre instrumental

ϵ_i est l'efficacité intrinsèque du détecteur

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

Le paramètre instrumental H dépend de la présence ou non de filtres devant le détecteur. En leur absence, il représente l'angle solide et peut être exprimé de la manière suivante :

$$H = 2\pi(1 - \cos\alpha) \approx \frac{S}{d^2} \quad (3-17)$$

Où : α est l'angle d'ouverture du détecteur sur l'échantillon

S est la surface du détecteur

d est la distance entre la cible et le détecteur

Si un filtre absorbant est utilisé, H ne représente plus l'angle solide et sa valeur varie en fonction de l'énergie des photons X analysés. Une calibration est alors nécessaire, elle est réalisée à l'aide d'un étalon de composition connue et qui contient à peu près les mêmes éléments que les échantillons à analyser.

Malgré cette calibration, la bonne connaissance de tous les paramètres reste difficile, notamment pour la valeur de la charge déposée. Pour s'affranchir de ce phénomène, et parce que les éléments constitutifs des échantillons analysés sont bien connus, il est possible de normaliser les concentrations à 100%. En faisant cela, les valeurs de charge déposée et l'efficacité intrinsèque du détecteur peuvent être éliminées de l'équation 3-16. Un point important doit cependant être considéré avec vigilance, certains éléments ne sont pas détectables (carbone, oxygène, hydrogène) mais ne doivent pas être oubliés dans la composition du matériau. Le logiciel GUPIX est toutefois capable de les gérer en tant qu'éléments invisibles associés aux éléments visibles, dans la mesure où ils forment des composés stœchiométriques connus avec ceux-ci.

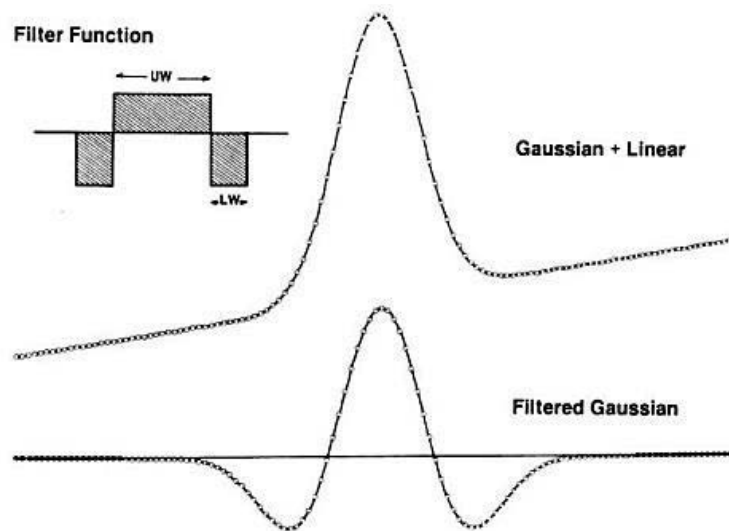


Figure 3-9: Représentation de la fonction filtre Top-hat et de son effet sur un spectre comprenant un pic Gaussien et un bruit de fond linéaire¹²⁵

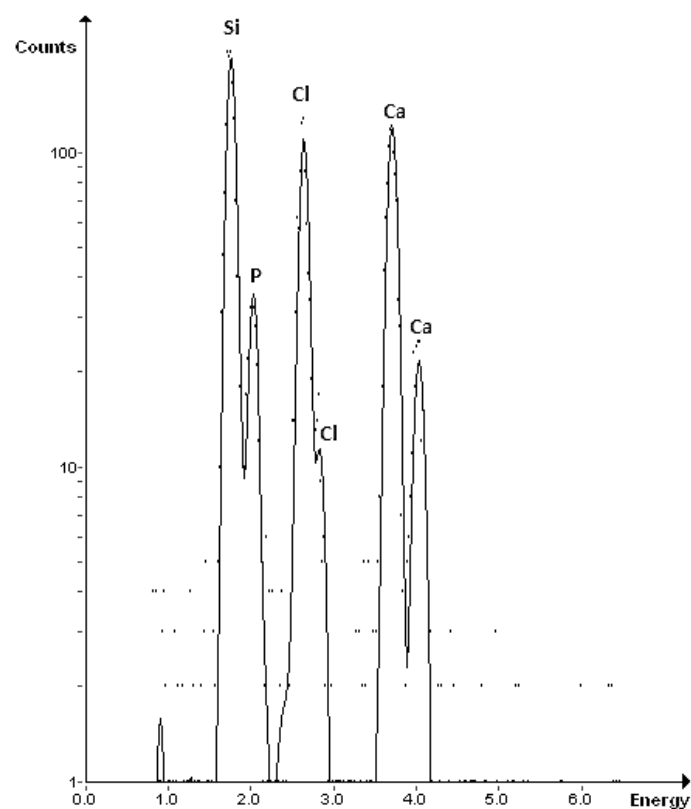


Figure 3-10 : Spectre expérimental (en pointillés) et spectre simulé par GUPIX (en trait plein) obtenus sur la couche phosphocalcique se formant à la surface d'une mousse de verre $\text{SiO}_2\text{-CaO}$

3.6.1.3. Utilisation de filtres absorbants (funny filter)

Il a été exposé précédemment qu'il était possible d'utiliser un filtre absorbant à l'entrée du détecteur ce qui induisait la nécessité d'une calibration supplémentaire. Malgré cet inconvénient, l'utilisation de filtres absorbants peut être d'une aide précieuse pour l'analyse d'éléments lourds présents à l'état de traces. L'interposition d'un filtre entre l'échantillon et le détecteur permet d'atténuer la composante basse énergie du spectre et d'améliorer la détection des éléments lourds. Ceci sera nécessaire pour l'analyse des échantillons biologiques qui contiennent des traces de Zn et de Sr dans une matrice de calcium et de phosphore principalement, et pour les verres dans lesquels du SrO a été ajouté dans une matrice de silicium, calcium et phosphore. De plus, le chlore présent dans la résine en quantité importante pourrait aussi participer aux phénomènes parasites.

Néanmoins, les échantillons à analyser peuvent aussi contenir des éléments traces de faible numéro atomique qu'il est intéressant de pouvoir doser, c'est le cas du magnésium par exemple. L'utilisation d'un filtre absorbant empêcherait l'étude de cet élément. Une manière de concilier les différentes exigences présentées est l'utilisation d'un filtre percé d'un trou en son centre qui est appelé « funny filter ».

L'utilisation de ce filtre permet de diminuer l'intensité des raies de basse énergie, mais laisse passer, grâce au trou, un nombre suffisant de photons provenant des éléments traces pour en permettre la détection avec un taux de comptage acceptable. Les photons de plus hautes énergies qui sont émis par les éléments lourds à l'état de traces ne sont quasiment pas affectés par la présence du filtre¹²⁶.

L'utilisation de « funny filter » est donc très appréciable pour la détection d'éléments lourds à l'état de trace comme le strontium. Cependant, comme expliqué en 3.6.1.2.2, Page 72, le facteur instrumental H va être impacté par l'utilisation de ces filtres, il devra donc être déterminé expérimentalement grâce à la réalisation d'une calibration sur un échantillon standard connu (NIST (Standard Reference Materials) NBS 620). Un exemple de l'évolution de H en fonction de l'énergie des photons X, déterminée grâce à l'échantillon standard, est donnée en Figure 3-11.

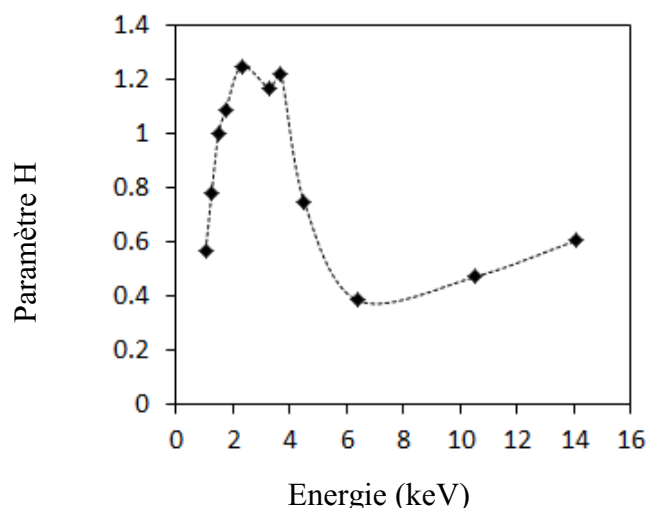


Figure 3-11 : Evolution du paramètre H en fonction de l'énergie des photons X pour un "funny filter" en aluminium de 100 μm d'épaisseur et percé d'un trou de 2 mm de diamètre

3.6.1.4. Résumé des paramètres choisis

D'après les différentes considérations exposées précédemment deux cas différents vont se présenter pour l'analyse de l'ensemble des échantillons de ce rapport : les échantillons contenant des éléments lourds à l'état de trace (principalement le strontium) et ceux n'en contenant pas. Ainsi deux jeux de conditions expérimentales seront possibles :

- Faisceau de protons de 1,5 MeV pour les verres binaires sans « funny filter »
- Faisceau de protons de 3 MeV pour les verres contenant du strontium ainsi que pour les coupes d'échantillons biologiques et un « funny filter » d'aluminium de 100 μm d'épaisseur avec un trou de 2 mm de diamètre

Il faut noter que les conditions expérimentales proposées pour les échantillons au strontium peuvent parfaitement être utilisées pour les échantillons n'en contenant pas, le contraire n'est pas vrai. La première configuration ne sera donc utilisée que pour des sessions d'analyse ne comportant aucun échantillon contenant du strontium ou du zinc.

3.6.2. Justification du choix de la PIXE par rapport à une autre méthode d'analyse élémentaire

La méthode d'analyse PIXE est l'une des trois méthodes d'analyse liées à l'émission de rayons X due à une irradiation. Alors que la PIXE fait appel à l'utilisation des ions pour exciter les atomes à analyser et provoquer une émission, les deux autres méthodes utilisent

pour l'une des électrons (EDXS : Energy-Dispersive X rays Spectrometry) et pour l'autre des photons (XRF : X-Ray Fluorescence).

Le premier avantage de l'utilisation d'un faisceau de protons et non d'électrons est que le faisceau d'ions reste directif à la traversée de l'échantillon comme le montre la Figure 3-12.

Mais l'atout principal de la PIXE, en comparaison des autres méthodes, est sa grande sensibilité. En première approche, la sensibilité se définit comme la concentration minimale détectable et les détecteurs Si(Li) peuvent détecter le signal émis par de très faibles quantités d'un élément (de l'ordre de 10^{-6} g/g). Cependant, les éléments traces se trouvent toujours contenus dans une matrice qui génère un bruit de fond (Annexe 1.3.4.1, Page 219) essentiellement constitué du Bremsstrahlung. L'existence de bruit de fond va de fait imposer une limite à la sensibilité qui devient la capacité d'un pic caractéristique de l'élément trace à se distinguer de manière significative du bruit de fond. La condition de détection d'un élément est alors donnée par la relation :

$$N_P \geq 3\sqrt{N_B} \quad (3-18)$$

Où : N_P est le nombre d'impulsions détectées contenues dans le pic de l'élément

N_B est le nombre d'impulsions dans le bruit de fond contenu dans un intervalle de largeur égale à la largeur à mi-hauteur du pic.

La Figure 3-13 représente les concentrations minimales détectables et montre de manière très intéressante qu'il est possible d'optimiser la détection de la plupart des éléments pour une énergie de faisceau incident de 2-3 MeV. De plus, la quasi-totalité des éléments peut être observée à une concentration de l'ordre de quelques ppm.

La grande sensibilité de la PIXE en fait donc son intérêt dans de nombreux domaines d'application où les éléments traces revêtent une importance particulière tels que l'art, l'archéologie ou encore la géologie. Dans le cadre de ce travail de thèse, et plus généralement dans le cadre biomédical¹²⁷, la possibilité d'étude des éléments traces représente un atout majeur en raison du rôle important que jouent ces éléments au sein des organismes vivants.

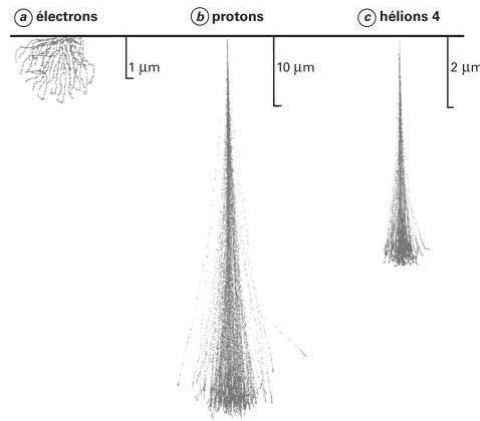


Figure 3-12: Représentation du parcours des particules incidentes dans l'échantillon en fonction du type de faisceau utilisé¹²⁸

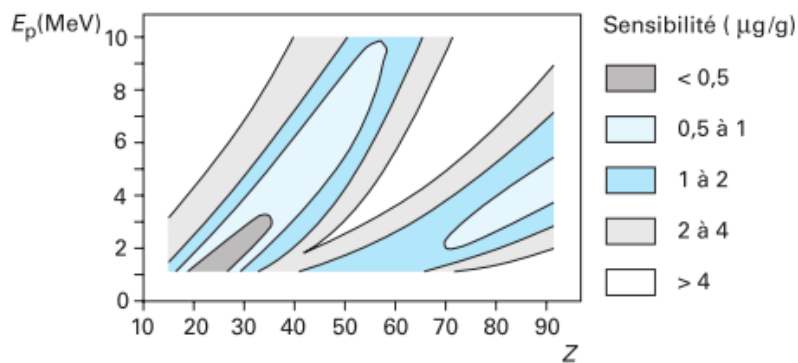


Figure 3-13: Représentation des concentrations minimales détectables en PIXE en fonction du numéro atomique de l'élément et de l'énergie des particules incidentes¹²⁸

3.6.3. Evaluation des effets d'irradiation

Le bombardement des échantillons par le faisceau de protons peut entraîner des dommages à la surface du matériau en particulier il est possible d'observer une perte en éléments légers (H, C, N, O). La variation de composition de la cible au cours de l'analyse qui résulte de ce phénomène risque de perturber les mesures de concentration réalisées. Pour vérifier l'importance de ce phénomène, la variation de composition d'un échantillon au cours d'une analyse a été vérifiée. La Figure 3-14 montre de légères fluctuations ($< 6\%$) dans les concentrations mesurées qui peuvent être dues à la perte d'éléments légers mais également à un déplacement de l'échantillon lors de l'analyse (dû principalement à des variations de température au niveau de la chambre d'analyse). Les mesures de concentrations au sein de

l'échantillon sont toutefois peu impactées par la durée de l'analyse et le courant utilisé qui est de l'ordre de 100 pA sur cible.

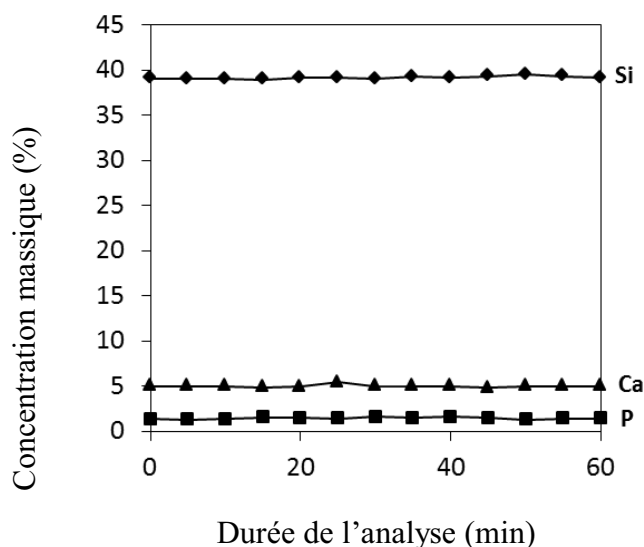


Figure 3-14 : Evolution des concentrations en Si, Ca et P en fonction de la durée de l'analyse par μ -PIXE avec des protons de 1,5 MeV (courant sur cible de l'ordre de 100 pA) de la partie interne des murs d'une mousse de verre bioactif de composition SiO_2 -CaO immergée 5 jours dans du SBF

3.6.4. Présentation du dispositif expérimental

Les analyses par PIXE ont été réalisées au CENBG (Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan CNRS/IN2P3 UMR 5797) sur la plateforme AIFIRA (Applications Interdisciplinaires de Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine). Cette plateforme se compose de différentes lignes d'analyse aux propriétés spécifiques qui permettent de multiples applications telles que l'analyse d'échantillons de taille importante (ne pouvant être découpés) grâce à la ligne de faisceau extrait, cela permet, notamment, l'analyse d'objets archéologiques.

La ligne nano-faisceau qui a été utilisée au cours de ce travail sera décrite par la suite contrairement aux autres lignes qui n'ont pas été utilisées. Seule la partie commune (production, accélération et sélection de particules), située en amont de l'aimant d'analyse (Figure 3-15) sera décrite. L'aimant d'analyse permet de diriger le faisceau de particules vers la ligne souhaitée, il est intéressant de noter que le faisceau ne peut être dirigé que vers une seule ligne et qu'il n'est donc pas possible d'en utiliser plusieurs en même temps.

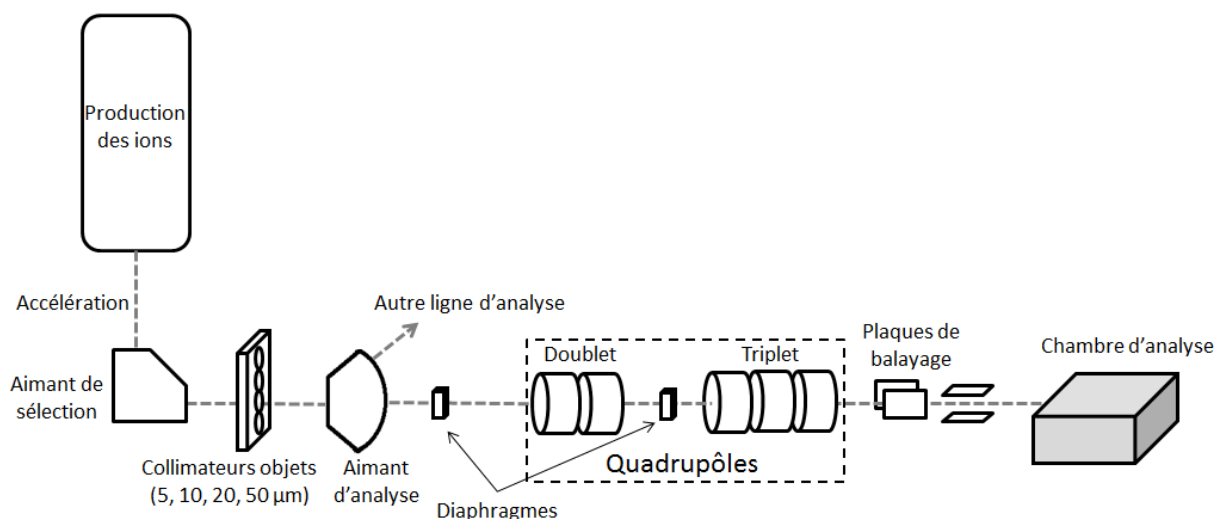


Figure 3-15 : Représentation schématique de la ligne nano-faisceau du CENBG

3.6.4.1. Production, accélération et sélection des particules

Les particules sont produites par un accélérateur électrostatique 3,5 MV - Singletron¹²⁹. Cet accélérateur permet de travailler avec différents ions (H^+ , D^+ et He^+) et à des énergies comprises entre 800 keV et 3,5 MeV¹³⁰. L'accélérateur permet de produire un faisceau à la stabilité énergétique et à la brillance nécessaires à l'existence de lignes haute résolution et donc plus particulièrement à la ligne nano-faisceau qui a été utilisée au cours de ce travail de thèse.

En sortie d'accélérateur des particules de natures et d'énergies différentes sont récupérées, un aimant de sélection permet d'isoler le type et l'énergie des particules nécessaires à l'analyse. En effet, les ions de même rapport charge / masse vont être défléchis selon une trajectoire dont le rayon de courbure dépend également de l'énergie. L'aimant d'analyse va ensuite permettre de diriger le faisceau vers la ligne nano-faisceau.

3.6.4.2. La ligne nano-faisceau^{131,132}

3.6.4.2.1 Acheminement du faisceau jusqu'à la chambre d'analyse

Les particules sélectionnées grâce à l'aimant de sélection sont dirigées par l'aimant d'analyse vers la ligne nano-faisceau où le faisceau va être focalisé et envoyé sur l'échantillon. La ligne fait 9,2 m de long et est fixée sur un bloc de granite qui permet d'éviter les vibrations parasites. Le faisceau est focalisé en utilisant un système de 5 quadrupoles magnétiques

répartis en un doublet et un triplet. Cette étape permet l'obtention d'un faisceau de diamètre égal ou inférieur au micromètre en fonction des conditions d'analyse. En analyse STIM cette ligne a déjà atteint une résolution de 200 nm¹³³, cependant, dans le cadre de cette étude, au regard de l'épaisseur des échantillons et des processus étudiés, une telle résolution n'est pas utile, un faisceau d'1 µm de diamètre est suffisant. Cette plus faible exigence sur la résolution permet de travailler avec un collimateur objet plus large (20 µm de diamètre) et donc d'avoir un signal plus important lors de l'analyse.

Le faisceau ainsi focalisé va pouvoir être envoyé sur l'échantillon, toutefois il doit encore pouvoir être déplacé afin de balayer la surface de l'échantillon, c'est dans ce but que des plaques de balayages électrostatiques sont installées après le triplet.

3.6.4.2.2 *Chambre d'analyse*

La chambre d'analyse est équipée d'un porte-échantillon motorisé permettant de déplacer l'échantillon dans les 3 directions de l'espace ainsi que de deux microscopes permettant d'observer l'échantillon en réflexion pour l'un et en transmission (échantillon fin) pour l'autre. Ce système permet donc un repérage facile sur la surface de l'échantillon à analyser.

La caméra permettant l'observation en transmission (MT sur la Figure 3-16) se situe sur un porte objet motorisé comprenant aussi une cage de Faraday (CF) ainsi qu'un détecteur d'ions transmis (STIM) ce qui permet de les échanger automatiquement et sans avoir à ouvrir la chambre. La chambre a été créée de manière à pouvoir y placer 4 détecteurs de rayons X différents ce qui permettra dans les années futures de réduire le temps d'analyse.

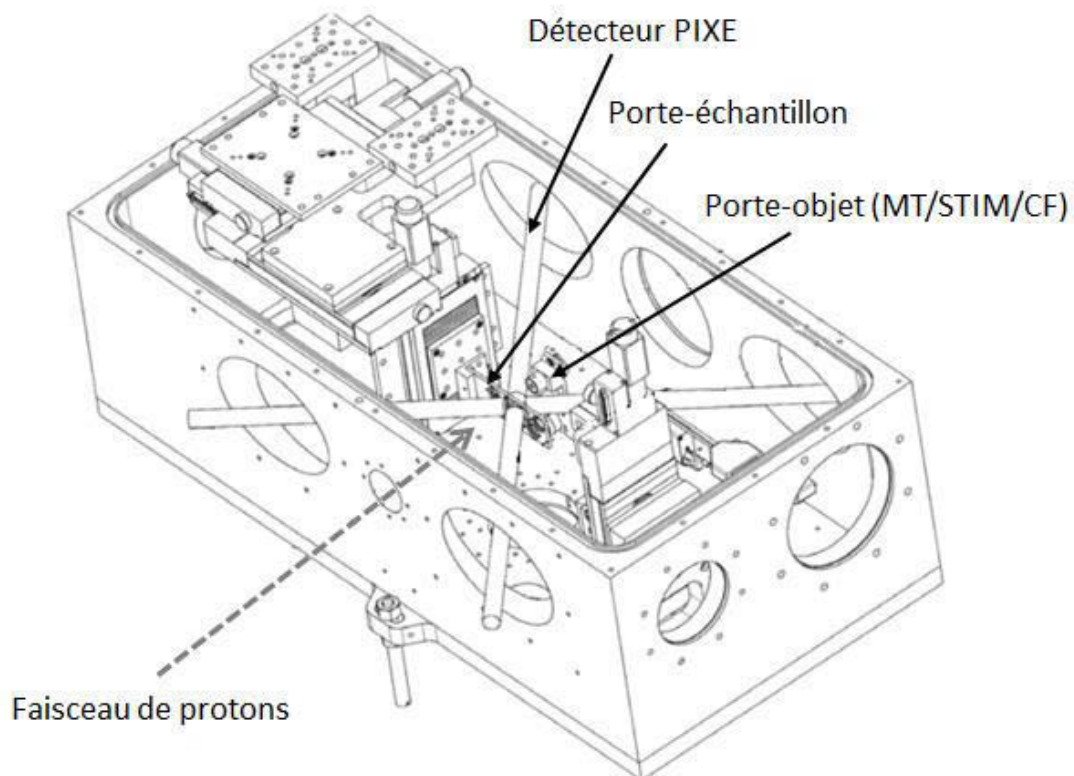


Figure 3-16 : Représentation schématique de la chambre d'analyse de la ligne nano-faisceau (MT : microscope optique à transmission, STIM : détecteur pour la microscopie ionique à transmission, CF : cage de Faraday)¹³²

3.6.4.2.3 Détecteurs

Les photons X émis par l'échantillon qui a été frappé par le faisceau de protons vont être détectés grâce à un spectromètre à dispersion d'énergie (EDS : Energy Dispersive Spectroscopy). Les rayons X passent d'abord à travers une fenêtre en béryllium de 12 μm d'épaisseur qui permet la détection des éléments à partir du sodium. Ils arrivent ensuite sur un semi-conducteur de silicium dopé au lithium et y créent des paires électron-trou dont le nombre est proportionnel à l'énergie des photons X. Un analyseur multicanal permet de trier les différents événements et de reconstituer le spectre. La résolution de ce détecteur est proche de 150 eV dans la gamme des énergies utilisées au cours de ce travail. Les mesures ont été réalisées avec un détecteur placé à 135° par rapport à l'axe du faisceau.

Partie B Mousses de verre binaire

Chapitre 4 Etude de l'influence de la macroporosité des mousses de verre sur leur réactivité et optimisation du procédé de moussage

4.1. Influence de la macroporosité sur la réactivité

4.1.1. Synthèse des mousses de verre bioactif

Les différents paramètres expérimentaux de la synthèse ont une influence sur la porosité finale du matériau (2.2.2.4.3, Page 50). En particulier, la quantité de tensioactif semble être un paramètre très influant. Deux mousses de verre bioactif de composition massique 75% SiO₂ – 25% CaO ont été synthétisées par le procédé développé par Sepulveda *et al.*¹³⁴ en faisant varier la quantité de tensioactif.

La synthèse est effectuée selon le protocole détaillé en Figure 4-1 en respectant les quantités de réactifs indiquées dans le Tableau 4-1. Du TEOS est ajouté sous agitation forte à un mélange d'eau et d'acide chlorhydrique (HCl) de manière à forcer le contact entre le TEOS et l'eau (qui ne sont en principe pas miscibles), et à permettre l'hydrolyse du TEOS. En effet, la synthèse sol-gel comporte généralement l'utilisation d'un co-solvant (souvent l'éthanol) qui permet de rendre miscibles l'eau et le TEOS. Pour le moussage l'utilisation d'éthanol est impossible puisqu'il s'agit d'un anti-moussant. Du nitrate de calcium (Ca(NO₃)₂·4H₂O) est ensuite ajouté. Après une heure d'agitation, un tensioactif (Teepol) et un catalyseur, l'acide fluorhydrique (HF), sont ajoutés et le sol est agité vigoureusement de manière à y incorporer des bulles d'air. L'opération est menée en conservant toujours la température à 25°C à l'aide d'un bain thermostaté afin d'avoir un temps de moussage avant gélification reproductible. Au fur et à mesure du moussage la viscosité du sol augmente et lorsque le point de gélification est

approché, la mousse est versée dans des pots en téflon qui sont alors hermétiquement fermés et mis à l'étuve à 60°C pendant 72 h puis à 125°C pendant 48 h.

Des cylindres de mousse sont récupérés et calcinés dans un four tubulaire selon le programme suivant : 20 → 300°C (1°C/min), 300°C durant 2 h, 300 → 450°C (1°C/min), 450°C durant 2 h, 450 → 600°C (1°C/min), 600°C durant 2 h, 600 → 700°C (2°C/min), 700°C durant 24 h, 700 → 20°C. Un programme de calcination lent est utilisé pour éviter la création de contraintes importantes qui engendreraient une fissuration du matériau. Les deux mousses ainsi obtenues sont présentées en Figure 4-2.

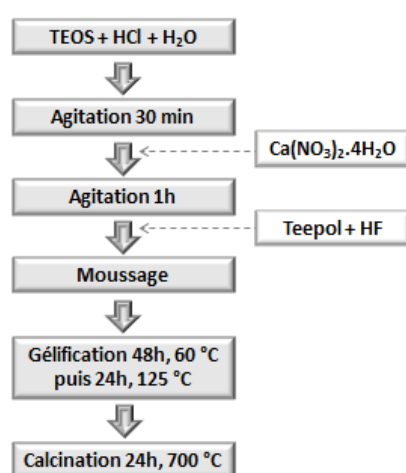


Figure 4-1 : Représentation schématique de la synthèse de mousses de verre bioactif

Tableau 4-1 : Quantités de réactifs utilisées pour la synthèse des mousses de verre

	TEOS (mL)	H ₂ O (mL)	HCl 2N (mL)	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (g)	Vol. Teepol (mL)	Vol. HF (mL)
M75-A	13,94	13,48	2,25	5,2637	0,25	0,75
M75-B	13,94	13,48	2,25	5,2637	0,5	0,75

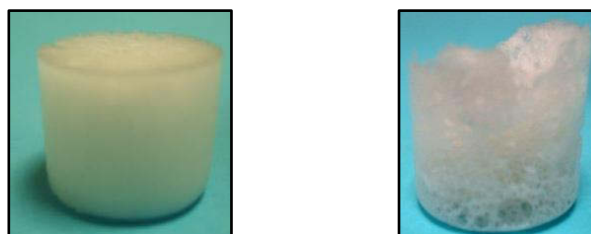


Figure 4-2 : Photographies des mousses obtenues après calcination (M75-A à gauche et M75-B à droite)

4.1.2. Caractérisation des mousses

4.1.2.1. Porosité totale

La porosité totale (P) des mousses est déterminée par la formule suivante :

$$P = 100 \times \frac{(\rho_{réel} - \rho_{app})}{\rho_{réel}} \quad (4-1)$$

Où : ρ_{app} est la densité apparente de la mousse, obtenue par pesée de plusieurs cylindres de mousse et mesure géométrique du volume de ces cylindres.

$\rho_{réel}$ est la densité réelle du verre de composition massique 75 % SiO_2 – 25 % CaO , elle a été déterminée par pycnométrie hélium comme étant de $2,36 \pm 0,01 \text{ cm}^3/\text{g}$ sur de la poudre obtenue après broyage des mousses.

La mousse M75-A présente une porosité totale de $83 \pm 4 \%$ et M75-B de $88 \pm 2 \%$ ce qui montre qu'il n'y a pas de différence significative du point de vue de la porosité totale.

4.1.2.2. Etude de la texture par adsorption d'azote

Les surfaces spécifiques, volumes poreux et diamètres de pores moyens (Tableau 4-2) sont comparables pour les deux mousses et les distributions de taille de pores (Figure 4-3) sont assez similaires. M75-A et M75-B possèdent donc des propriétés de surface identiques.

Tableau 4-2 : Comparaison de la texture des deux mousses (chaque synthèse a été répétée une seconde fois et caractérisée dans les mêmes conditions que la mousse d'origine afin d'affiner les valeurs)

	Surface Spécifique (m^2/g)	Volume poreux total (cm^3/g)	Diamètre de pores moyen (nm)
M75-A	158 ± 12	$0,50 \pm 0,05$	$6,3 \pm 0,2$
M75-B	152 ± 16	$0,50 \pm 0,03$	$6,7 \pm 0,3$

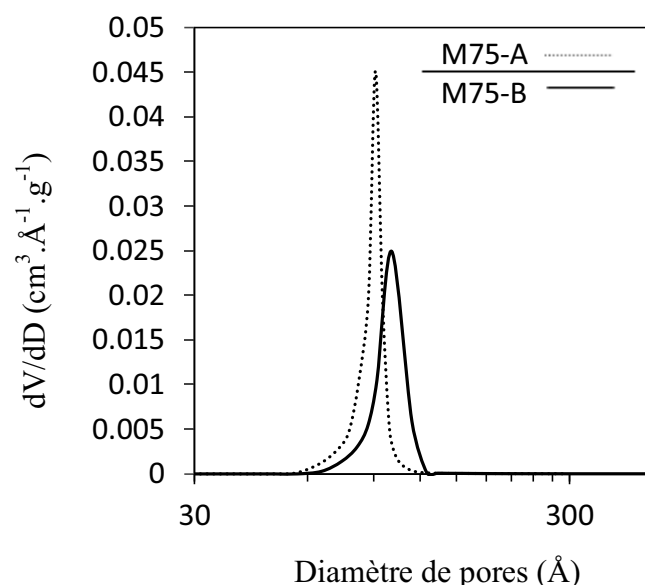


Figure 4-3: Distributions de tailles de pores des deux mousses obtenues par la méthode BJH sur la branche de désorption

4.1.2.3. Comparaison des ultra-macroporosités des deux mousses

Puisque les deux mousses ont des mésoporosités identiques et un même volume poreux total, il reste à vérifier si la répartition de l'ultra-macroporosité est différente, ce qui semble être le cas sur les clichés MEB (Figure 4-4). Les mesures de distribution de tailles de pores et d'interconnexions réalisées par traitement des images MEB montrent des différences significatives entre ces deux mousses (Figure 4-5). En effet, M75-A présente 57% de pores ayant un diamètre compris entre 100 et 300 μm et 4% de pores ayant un diamètre supérieur à 300 μm contrairement à M75-B qui présente 33% de pores avec un diamètre compris entre 100 et 300 μm et 64% de pores supérieurs à 300 μm . Du point de vue des interconnexions une tendance identique se retrouve puisque M75-A possède 76% d'interconnexions ayant un diamètre inférieur à 50 μm et 22% d'interconnexions comprises entre 50 et 100 μm . M75-B possède 10% d'interconnexions avec un diamètre inférieur à 50 μm et 59% d'interconnexions supérieures à 100 μm .

De cette étude, il ressort que M75-B possède des pores de taille importante et que M75-A semble plus dense, avec de plus petits pores et de plus petites interconnexions. Des pores et des interconnexions plus petits devraient conférer de meilleures propriétés mécaniques au scaffold, toutefois, une porosité trop étroite pourrait empêcher l'invasion cellulaire. En vue de la réalisation d'essais *in vivo* sur ces mousses, une étude préalable a été réalisée en milieu

acellulaire *in vitro* pour tenter de déterminer la plus prometteuse des deux mousses ce qui permettrait de diminuer le nombre d'essais en milieu vivant.

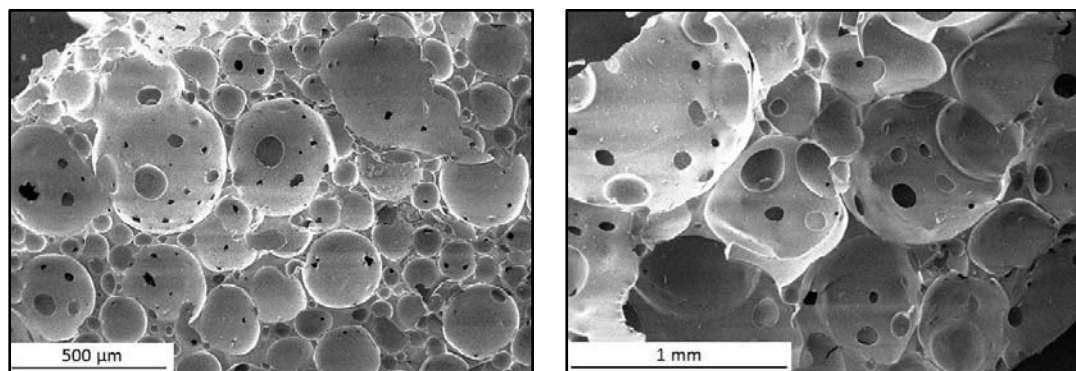


Figure 4-4 : Clichés MEB des mousses de verre bioactif (M75-A à gauche et M75-B à droite)

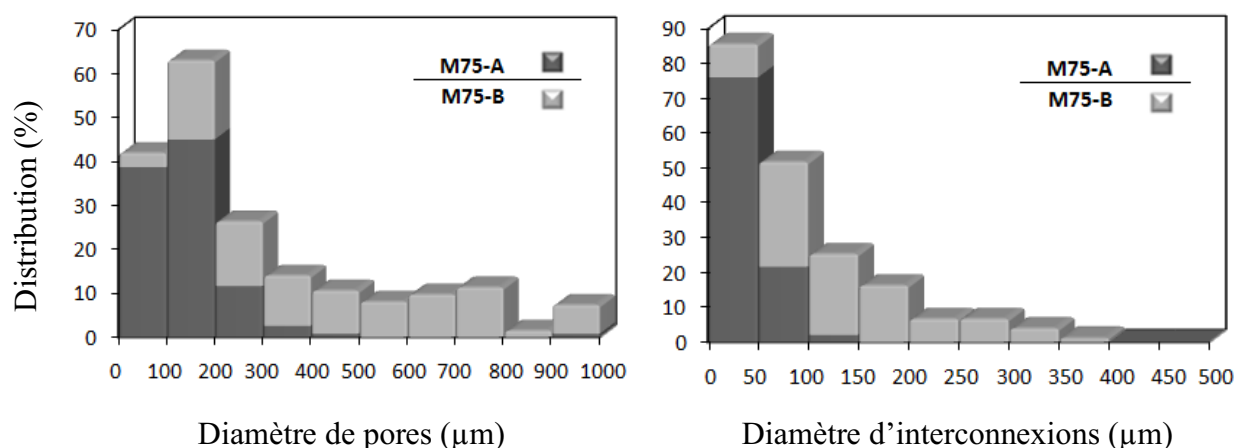


Figure 4-5 : Distribution des tailles de pores et d'interconnexions pour les mousses M75-A et M75-B

4.1.3. Etude de la réaction de minéralisation en surface des pores par micro-faisceaux d'ions

4.1.3.1. Variations de la composition du SBF au cours de l'immersion des mousses M75-A et M75-B

Les deux mousses M75-A et M75-B sont immergées dans du SBF pendant 15, 30 et 45 minutes, 1 et 5 heures et 1,2 5 et 10 jours. Une fois immergées dans le SBF, les deux mousses conduisent à des variations similaires de composition ionique de la solution (Figure 4-6). Les concentrations en calcium et en silicium augmentent rapidement et après 1 jour d'interaction

il n'y a plus de variation significative ni de la concentration de ces deux espèces ni entre les deux mousses. Les valeurs moyennes de ces paliers sont de 57 ± 2 ppm pour le silicium et de 250 ± 4 ppm pour le calcium. Les concentrations en phosphore et en magnésium diminuent au cours de l'immersion des mousses dans le SBF pour atteindre un palier à $0,5 \pm 0,1$ ppm après 5 jours d'immersion pour le phosphore et de $53,0 \pm 0,4$ ppm pour le magnésium après 2 jours d'immersion. Ces diminutions semblent montrer un processus de précipitation d'une couche de phosphate de calcium qui incorporerait du magnésium. Ce processus semble similaire pour les deux mousses, ce qui est cohérent avec l'observation de propriétés texturales équivalentes.

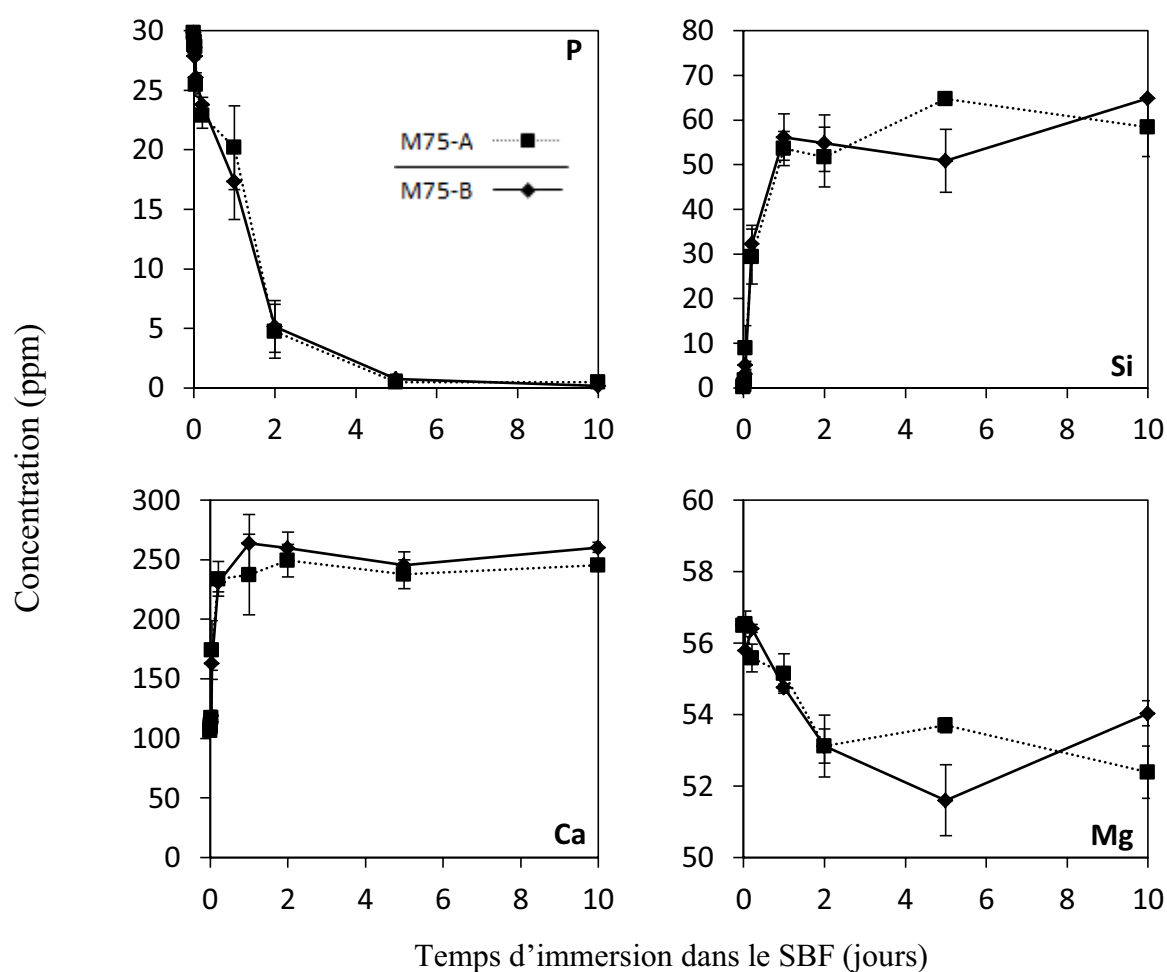


Figure 4-6 : Evolution des concentrations déterminées par ICP-AES en phosphore, silicium, calcium et magnésium dans le SBF au cours de l'interaction avec les mousses de verre bioactif M75-A et M75-B

4.1.3.2. Cartographies élémentaires

Les échantillons obtenus après immersion pendant 1 et 5 heures et 1,2 5 et 10 jours ainsi que les mousses avant immersion sont étudiées par PIXE. Les cartographies du calcium et du silicium à 0 jour d'immersion (Figure 4-7) montrent une composition homogène des mousses de verre. Les cartographies élémentaires à 10 jours d'immersion montrent des comportements très différents entre les deux mousses. Le processus de bioactivité devrait conduire à une minéralisation homogène à la surface des pores comme c'est le cas pour M75-B (Figure 4-8) avec la formation d'une couche de phosphate de calcium d'environ 5 μm d'épaisseur. A l'inverse, pour M75-A (Figure 4-9) la minéralisation ressemble plus à la réaction d'un bloc (monolithe) qui se transformerait progressivement depuis l'extérieur de la mousse vers l'intérieur. Cela donne lieu à une réaction inhomogène.

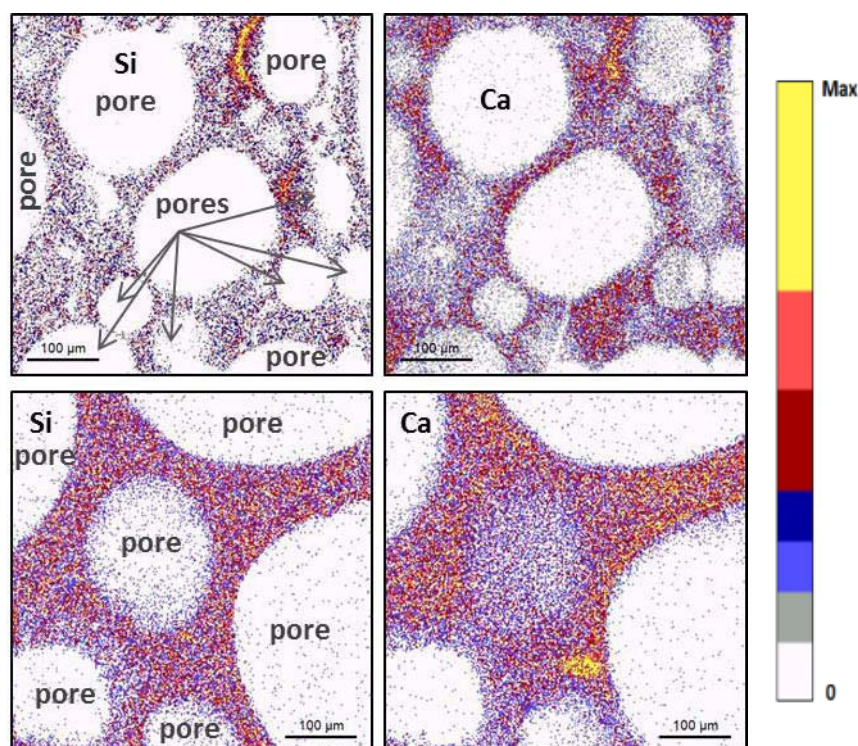


Figure 4-7 : Cartographies élémentaires des mousses M75-A (haut) et M75-B (bas) avant immersion (0 jour) dans le SBF. Ces cartographies élémentaires obtenues sur des sections de mousse montrent en blanc des zones ne contenant pas de Si ou de Ca, c'est-à-dire des zones sans verre. Il s'agit des pores dont la forme sphérique est caractéristique. Les zones colorées contiennent du Ca et du Si, c'est-à-dire du verre. Il s'agit des murs de la mousse.

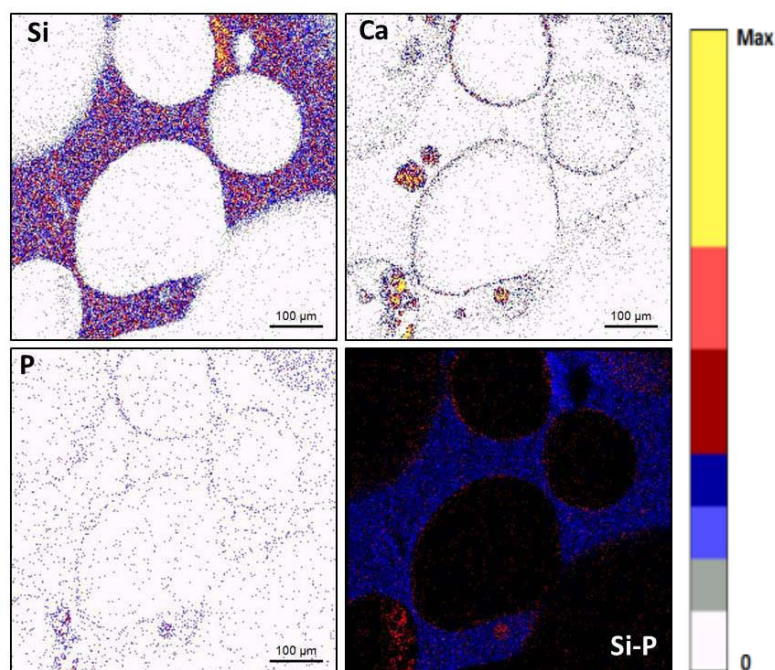


Figure 4-8 : Cartographies élémentaires de la mousse M75-B après 10 jours d'immersion dans le SBF et superposition des cartographies du silicium (bleu) et du phosphore (rouge)

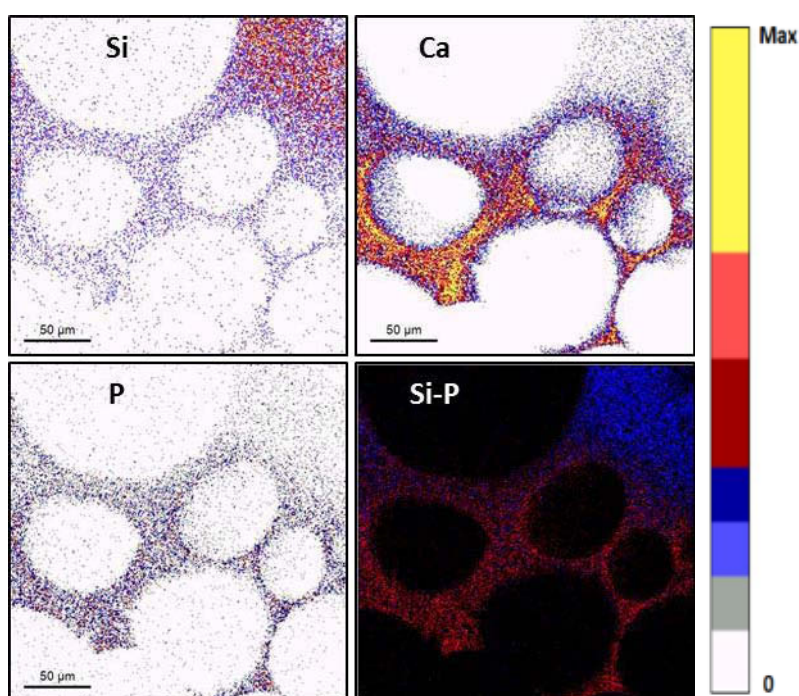


Figure 4-9 : Cartographies élémentaires de la mousse M75-A après 10 jours d'immersion dans le SBF et superposition des cartographies du silicium (bleu) et du phosphore (rouge)

4.1.3.3. Mesures locales de concentrations

L'évolution de la concentration en calcium dans la partie interne des murs (Figure 4-10) montre une décroissance rapide de la concentration en calcium au cours des premiers instants de réaction. Elle résulte de la dissolution du verre et est en accord avec le relargage de calcium observé dans le SBF. Dans le même temps, une augmentation concomitante de silicium est observée du fait de la normalisation des concentrations. Après 2 jours d'immersion, la concentration en calcium remonte faisant diminuer la concentration en silicium. De plus, du phosphore est détecté dans les murs ce qui permet de mettre en évidence un processus de diffusion de la périphérie du verre (qui est en contact avec le fluide contenant du phosphore) vers l'intérieur des murs. De très faibles quantités de magnésium sont aussi détectées ce qui conforte la discussion précédente sur le processus de diffusion.

Les mesures de concentration à la périphérie des murs (Figure 4-11) montrent une diminution de la concentration en silicium ainsi qu'une augmentation des concentrations en calcium et en phosphore témoignant de la précipitation de phosphates de calcium avec un rapport molaire de concentration Ca/P tendant vers celui de l'apatite (1,667) (Figure 4-12). Dans les deux mousses, la quantité de magnésium augmente à la périphérie du verre puisqu'il est incorporé en tant qu'élément trace dans le phosphate de calcium qui se dépose.

De plus, ce dépôt progresse plus rapidement vers sa composition finale pour la mousse M75-B que pour la mousse M75-A. Cela provient vraisemblablement de la réaction plus homogène à la surface de la mousse M75-B, qui conduit à l'obtention d'une couche de phosphate de calcium sur la majorité de la surface des pores alors que l'autre mousse possède des zones de sa surface ayant moins réagi que d'autres. Dans les premiers instants de réaction, il est difficile de déterminer des régions d'intérêt puisque la couche d'apatite n'est pas encore clairement identifiable. Des mesures sur des zones de la mousse M75-A ayant peu réagi conduisent donc à une diminution de la valeur moyenne des concentrations en calcium et en phosphore. Quand la zone riche en phosphore devient plus facile à identifier, la différence entre les deux mousses s'estompe.

Il est intéressant de remarquer que l'incertitude sur la composition de l'intérieur des murs est plus faible que pour la périphérie du matériau qui présente une forte incertitude (Figure 4-11). Cela provient d'une inhomogénéité de réaction sur toute la surface de la mousse, cette incertitude est d'ailleurs généralement plus importante pour la mousse M75-A ce qui est significatif étant donné l'inhomogénéité de réaction en fonction de la zone considérée qui a été mise en évidence par l'étude des cartographies élémentaires.

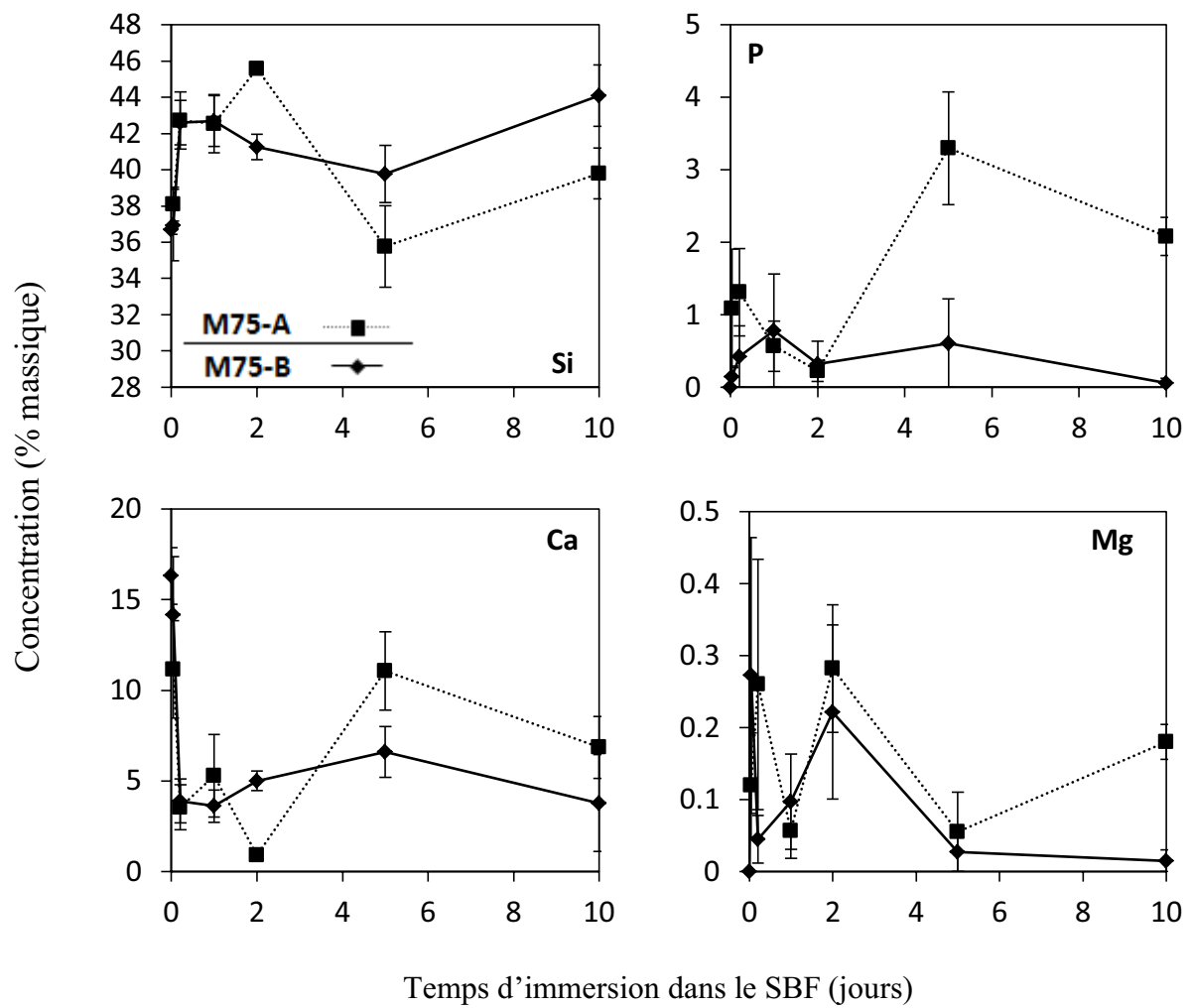


Figure 4-10 : Evolution de la composition de l'intérieur des murs des mousses M75-A et M75-B lors de l'immersion dans le SBF

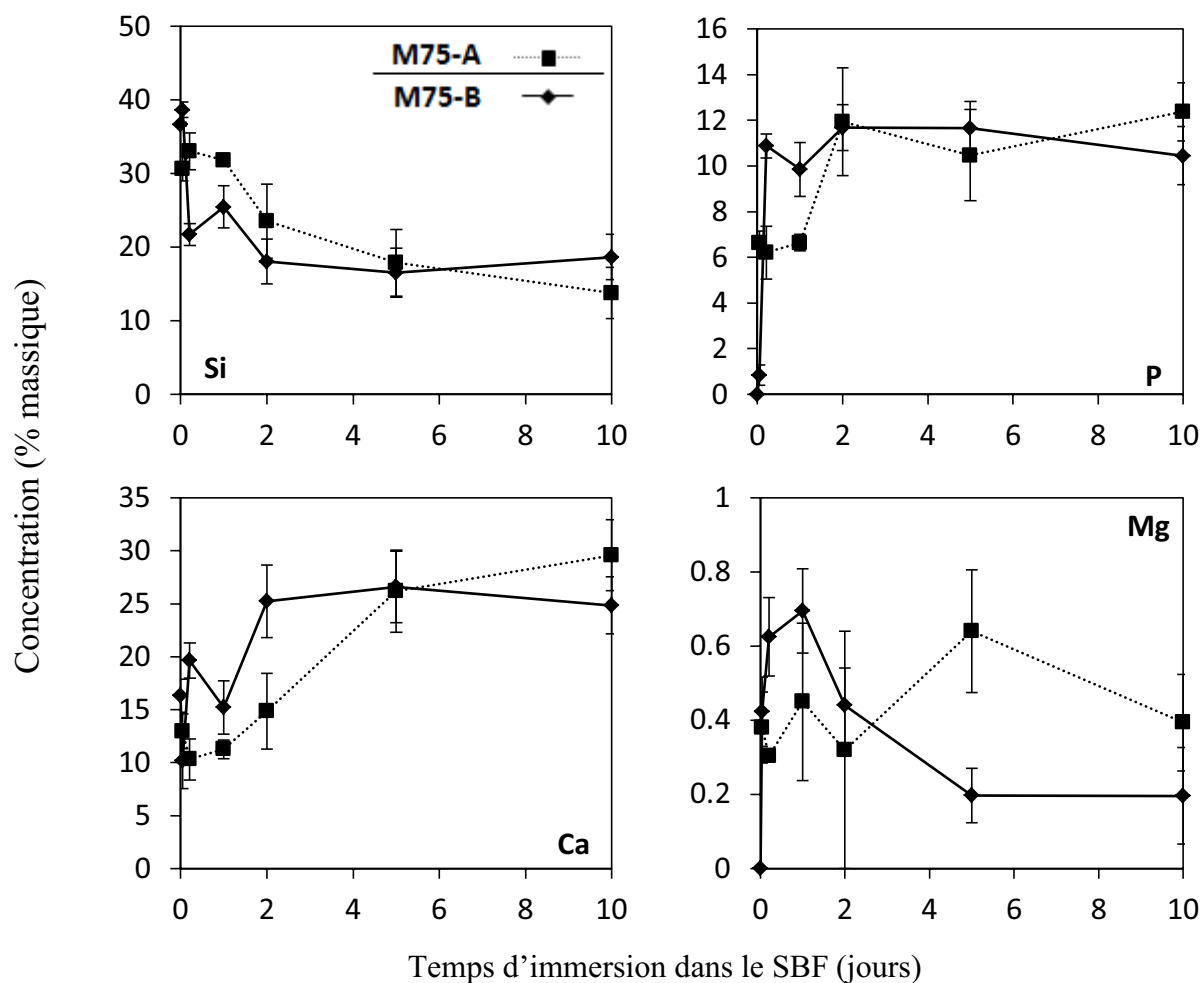


Figure 4-11 : Evolution de la composition de la périphérie des mousses M75-A et M75-B lors de l'immersion dans le SBF

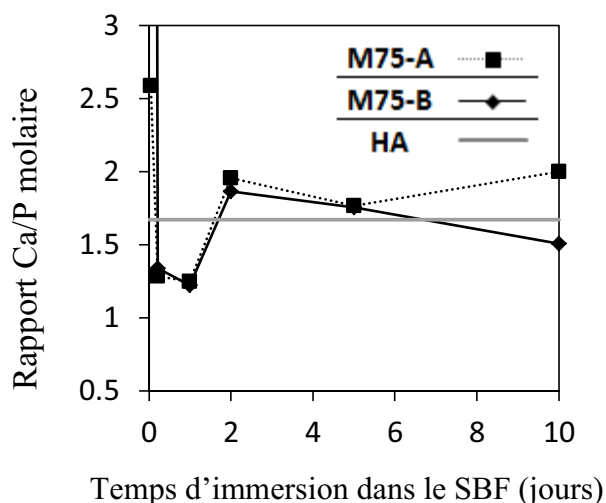


Figure 4-12 : Evolution du rapport Ca/P molaire de la couche de phosphate de calcium à la surface des mousses M75-A et M75-B lors de l'immersion dans le SBF (HA : Hydroxyapatite)

4.1.3.4. Etude de la circulation du fluide biologique dans les pores

Les observations réalisées précédemment sur les deux mousses montrent des réactivités très différentes : la mousse M75-B est conforme aux attentes car elle induit une précipitation à la surface des pores. Par contre, une réactivité inégale à la surface de M75-A pourrait impliquer que le fluide biologique ne pénètre pas à l'intérieur de la mousse. Pour le vérifier, un premier essai a été conduit : les mousses ont été immergées dans du SBF dans lequel de l'encre noire a été ajoutée afin de suivre l'imprégnation des mousses par le fluide biologique (Figure 4-13). Les deux mousses témoignent d'une perméabilité au SBF.

Un deuxième essai a été réalisé pour déterminer la circulation du SBF à l'intérieur des pores, les mousses ont été immergées comme précédemment dans du SBF auquel de l'encre avait été ajoutée, mais cette fois il s'agit d'encre bleue, l'encre noire est ajoutée 5 minutes après et les flacons sont laissés sous agitation durant 3 heures. Le résultat après séchage et découpe des mousses est montré sur la Figure 4-14, cet essai indique qu'il existe une différence notable entre les deux matériaux. En effet, la mousse M75-B est entièrement noire alors que la mousse M75-A présente une coloration interne bleue et une coloration externe noire. La coloration bleue à l'intérieur de M75-A confirme les résultats du premier test, à savoir que le SBF est effectivement capable de pénétrer à l'intérieur de la mousse, toutefois, ce SBF n'est pas renouvelé, dans le cas contraire l'intérieur de la mousse serait noir comme pour M75-B. Ce comportement semble pouvoir être relié à la perméabilité des scaffolds qui correspond à la capacité d'un milieu poreux à conduire un fluide, il a déjà été montré qu'elle dépend de la taille des pores et de la porosité¹³⁵. En effet, une augmentation de la porosité ou de la taille des pores induit une augmentation de la perméabilité d'un matériau poreux.

Ainsi, ces tests mettent en évidence une perméabilité différente pour les deux mousses due à leurs porosités différentes. Les deux semblent pouvoir être imprégnées par un fluide biologique. Néanmoins, là où la mousse M75-B permet la circulation du fluide à l'intérieur des pores et l'échange possible avec le milieu extérieur, la mousse M75-A donne lieu à un confinement du liquide ce qui risque de poser problème pour la colonisation de l'implant par des cellules osseuses.



Figure 4-13: Protocole d'étude de la pénétration du fluide dans les mousses



Figure 4-14: Photographie de l'intérieur des mousses après immersion (M75-B à gauche et M75-A à droite)

4.1.4. Etude du processus de bioactivité de la mousse M75-B

La minéralisation inhomogène de la mousse M75-A semble en faire un matériau moins prometteur pour des applications en ingénierie tissulaire puisque l'invasion de l'implant serait limitée. En revanche, la mousse M75-B donne lieu à la formation d'une couche de phosphate de calcium à la surface des pores (Figure 4-15) selon un processus traditionnel pour un verre bioactif. La superposition des cartographies du phosphore et du silicium semble montrer une superposition d'une partie de la zone riche en phosphore avec la limite de la zone riche en silicium.

Afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu, un profil de concentration est réalisé en définissant différentes régions d'intérêt depuis la surface de la couche CaP et jusqu'à 30 μm de profondeur dans le matériau (Figure 4-16). La couche riche en phosphore n'est pas homogène en composition mais elle est plus riche en phosphate de calcium en surface et plus riche en silicium vers l'intérieur. La couche de surface correspond effectivement à une couche riche en phosphore et en calcium mais elle semble intimement liée au verre puisqu'elle contient une concentration importante en silicium au moins à l'intérieur. Cette observation n'est pas très surprenante si l'on considère que le processus de bioactivité correspond à la précipitation de phosphates de calcium après la formation d'un gel de silice en surface du verre.

De plus, il est intéressant de remarquer que la partie interne des murs de verre montre une concentration légèrement plus faible en calcium à l'approche de la couche CaP. En effet, entre 25 et 30 μm de profondeur le verre contient $6,0 \pm 0,2$ % massiques de calcium alors qu'il en contient $4,1 \pm 0,2$ % entre 9 et 18 μm . Le calcium semble avoir été drainé depuis l'intérieur du verre et la zone la plus proche de la couche se retrouve apparemment appauvrie en calcium pour alimenter la formation et la croissance des précipités phosphocalciques au sein de la couche.

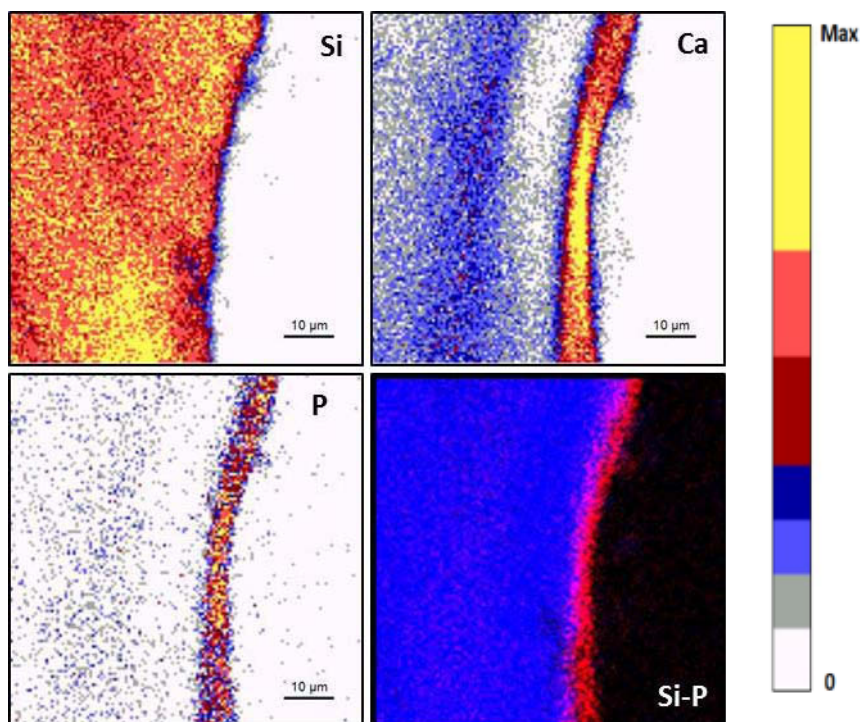


Figure 4-15 : Cartographies élémentaires de la surface d'un pore de la mousse M75-B après 5 jours d'immersion dans le SBF et superposition des cartographies du silicium (bleu) et du phosphore (rouge)

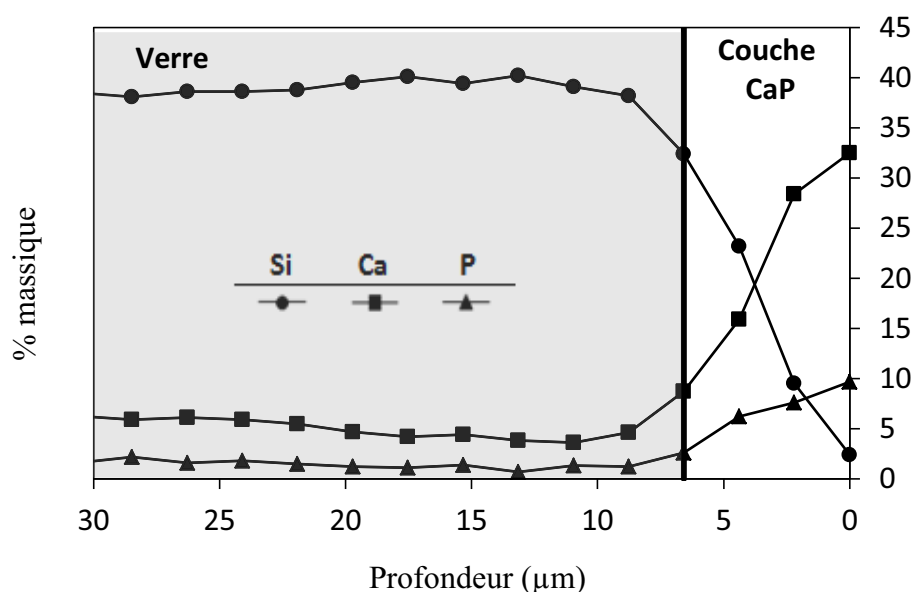


Figure 4-16 : Profil de concentration à la surface de la mousse M75-B après 5 jours d'immersion dans le SBF

4.2. Amélioration du procédé en vue d'éliminer l'acide fluorhydrique

4.2.1. Stratégie de remplacement du HF

L'élaboration de mousses de verre bioactif par le procédé de moussage développé par Sepulveda *et al.* semble donc permettre l'obtention de scaffolds très intéressants. Cependant, comme le soulignent Wang et Jain¹³⁶, l'utilisation de HF lors de la synthèse risque de laisser des résidus fluorés potentiellement toxiques tels que le CaF_2 qui a été observé dans les verres synthétisés avec du HF par Yu *et al.*¹³⁷. De plus, le HF est un réactif chimique hautement toxique qu'il serait préférable de ne pas avoir à manipuler. Son remplacement dans la synthèse de mousses de verre bioactif serait donc très souhaitable d'autant plus que le procédé de moussage, en tant qu'agitation turbulente d'une solution, donne lieu à des projections, augmentant ainsi le risque pour l'opérateur.

Une démarche similaire à celle adoptée par Chen *et al.*¹³⁸ ou Ortega *et al.*¹³⁹ peut être envisagée ici. Leurs travaux portent sur la substitution de monomères, utilisés dans la synthèse par polymérisation *in situ* dans une barbotine de céramique, par de la gélatine qui sert d'agent gélifiant. La gélatine constitue une alternative intéressante puisqu'elle n'est pas toxique et facilement disponible. De plus, la gélatine a déjà montré des propriétés d'agent

moissant et de stabilisation lors de moussages ayant pour objectif l'élaboration de composites gélatine-céramique¹⁴⁰. Le moussage d'un sol contenant de la gélatine a déjà été tenté pour l'élaboration d'hybride gélatine-SiO₂¹⁴¹ mais le HF était conservé. Le moussage d'un sol contenant de la gélatine utilisée en remplacement du HF n'a jusqu'à maintenant pas été tenté et sera étudié au cours de cette partie. Il est intéressant de noter que si la gélatine peut jouer le rôle d'agent moussant, elle ne semble pas permettre l'obtention de tailles de pores suffisantes à elle seule¹⁴² le teepol sera donc conservé et seul le HF sera remplacé.

4.2.2. Synthèse

Une mousse sans HF, de composition 75% SiO₂ – 25% CaO (pourcentages massiques), est réalisée selon le protocole suivant (Figure 4-17) : 6,74 mL d'eau déionisée et 1,125 mL d'HCl à 2N sont mélangés, 6,97 mL de TEOS sont ajoutés et le mélange est fortement agité pendant 30 minutes afin de maximiser la surface de contact entre les deux phases non miscibles et de permettre l'hydrolyse du TEOS. 2,632 g de nitrate de calcium tétrahydraté sont ensuite ajoutés. La solution est ensuite laissée sous agitation pendant 48 heures. 1,5 g de gélatine et 2 mL d'eau sont ajoutés et le mélange est agité pendant 10 min pour permettre la dissolution de la gélatine. La solution ainsi obtenue est vigoureusement agitée afin d'y incorporer des bulles d'air (moussage) et après 30 secondes, 0,25 mL de teepol sont ajoutés. La solution est moussée pendant encore 30 minutes puis l'agitation est arrêtée et le bécher est laissé à l'air libre pendant 72 heures pour permettre en premier lieu le séchage de la gélatine, puis la gélification du TEOS en réseau de verre. Ensuite, le scaffold « hybride » est calciné selon le programme suivant : 20 → 300°C (1°C/min), 300°C pendant 12 h, 300 → 450°C (1°C/min), 450°C pendant 4 h, 450 → 600°C (1°C/min), 600°C pendant 2 h, 600 → 700°C (2°C/min), 700°C pendant 12 h, 700 → 20°C.

Cette étape de calcination permet d'éliminer la gélatine ainsi que le teepol et les nitrates provenant du précurseur du calcium. La mousse ainsi obtenue est notée MG75 (Mousse Gélatine 75% SiO₂).

Afin de comprendre les effets des différents paramètres expérimentaux trois autres synthèses sont réalisées en faisant varier certains paramètres (Tableau 4-3) : le temps de vieillissement du sol avant moussage qui modifie la viscosité du sol et donc les propriétés finales de la mousse obtenue, la quantité d'eau ajoutée avec la gélatine qui est un paramètre important impliqué dans la stabilisation des bulles d'air incorporées à la mousse. Enfin, la température

ayant un effet important sur les cinétiques de gélification, l'influence de ce paramètre a aussi été regardée.

- Au lieu de laisser la solution vieillir 48 heures avant l'ajout de la gélatine, une mousse est réalisée après 24 heures de vieillissement du sol. La mousse ainsi formée est appelée MG75-24h
- La gélatine est ajoutée seule, sans eau, la mousse obtenue est appelée MG75-sH₂O
- Le moussage est réalisé à une température de 50°C au lieu des 35°C utilisés pour les autres synthèses pour obtenir la mousse MG75-50°C

Les clichés optiques des mousses MG75 et MG75-24h avant et après calcination (Figure 4-18) montrent à première vue des structures à la porosité importante, particulièrement pour MG75-24h. Après calcination la morphologie des mousses semble conservée.

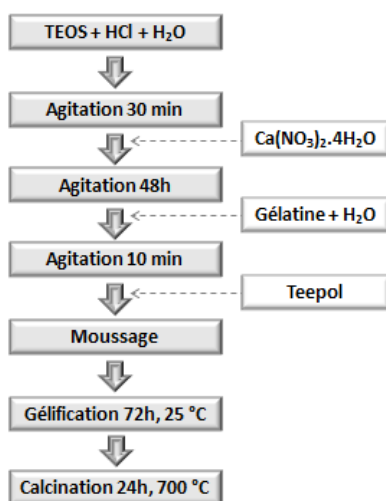


Figure 4-17 : Représentation schématique de la synthèse de mousse binaire sans HF par le biais d'une empreinte de gélatine formée *in situ*

Tableau 4-3 : Tableau récapitulatif des synthèses réalisées en faisant varier différents paramètres expérimentaux. Remarque : les temps de moussage sont donnés à titre indicatif puisqu'ils dépendent de la forme et de la nature de l'agitateur et du contenant

	Temps de vieillissement	Volume eau (mL)	Température moussage	Temps de moussage
MG75	48h	2	35°C	30 min
MG75-24h	24h	2	35°C	30 min
MG75-sH₂O	48h	0	35°C	16 min
MG75-50°C	48h	2	50°C	11 min

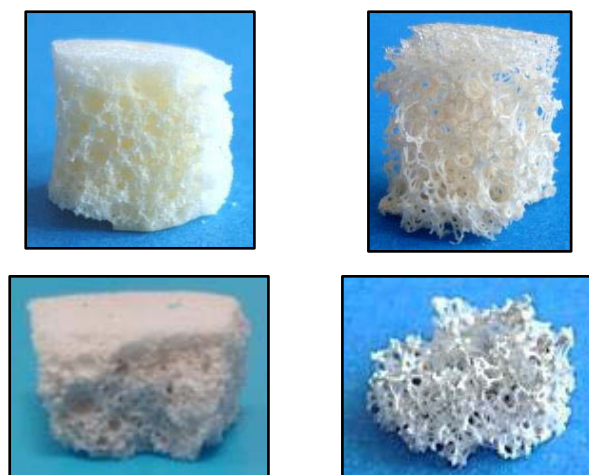


Figure 4-18 : Clichés optiques de fragments des mousses MG75 (gauche) et MG75-24h (droite) obtenus avant calcination (haut) et après calcination (bas)

4.2.3. Caractérisation

4.2.3.1. Morphologie

Les clichés MEB des mousses obtenues après calcination (Figure 4-19) montrent que les murs ne semblent pas fissurés ce qui aurait pu être le cas lors de l'élimination du support de gélatine. Les différentes mousses présentent une porosité importante et de nombreuses interconnexions, elles semblent très prometteuses pour des applications en ingénierie tissulaire. Les mousses MG75, MG75-50°C et MG75-sH₂O présentent des pores et des interconnexions de forme sphérique donnant lieu à une morphologie proche de celle obtenue par le procédé de moussage développé par Sepulveda *et al.* La mousse MG75-24h présente une morphologie plus proche de celles obtenues par imprégnation de mousses polymères (2.2.2.1.1, Page 44). Ces observations montrent que les modifications des paramètres expérimentaux au cours de cette synthèse permettent d'obtenir des matériaux aux porosités très différentes. Ce procédé est donc particulièrement intéressant dans l'objectif de la réalisation de scaffolds à la porosité ajustable.

Les distributions de tailles de pores (Figure 4-20 et Figure 4-21) montrent que 29% des pores de MG75 ont un diamètre compris entre 300 et 500 μm et 49% entre 100 et 300 μm alors que MG75-24h possède des pores qui ont tous un diamètre supérieur à 300 μm et qui dépassent le millimètre pour 44% d'entre eux. 55% de la porosité de MG75-sH₂O est inférieure à 100 μm et 44% se situe entre 100 et 300 μm . MG75-50°C présente une porosité relativement similaire avec 63% de pores inférieurs à 100 μm de diamètre et 35% entre 100 et 300 μm .

En ce qui concerne les interconnexions, la différence est, là encore, très notable puisque les interconnexions de la mousse MG75 sont majoritairement inférieures à 100 μm de diamètre et 17% sont supérieures. MG75-24h présente une large distribution de tailles d'interconnexions allant jusqu'à plus de 500 μm pour 5% d'entre elles. Les mousses MG75-sH₂O et MG75-50°C présentent toutes deux des interconnexions de faibles diamètres, respectivement 67 et 80% d'interconnexions inférieures à 50 μm et quasiment pas d'interconnexions supérieures à 100 μm .

Sans chercher à réaliser une étude complète de l'influence des différents paramètres impliqués dans la synthèse, cette étude montre qu'il est possible de jouer sur l'ultra-macroporosité finale des mousses en ajustant les paramètres. Ce résultat est très intéressant au vu de la nécessité d'avoir un procédé d'élaboration de scaffolds qui permette d'ajuster la porosité en fonction de l'application visée.

Les deux mousses les plus représentatives et les plus intéressantes en termes de macroporosité sont donc MG75 et MG75-24h. Les deux autres mousses (MG75-sH₂O et MG75-50°C), qui ont une morphologie très proche de MG75, mais des tailles de pores et d'interconnexions un peu faibles, sont laissées de côté pour la suite de l'étude.

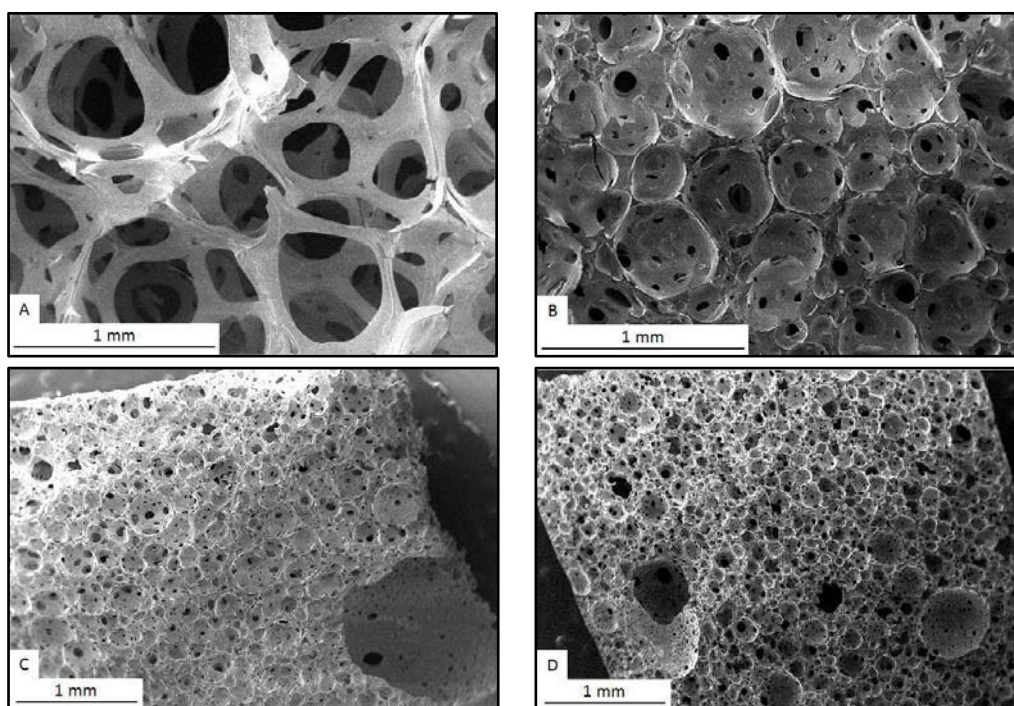


Figure 4-19: Clichés MEB des mousses MG75-24h (A), MG75 (B), MG75-sH₂O (C) et MG75-50°C (D) après calcination

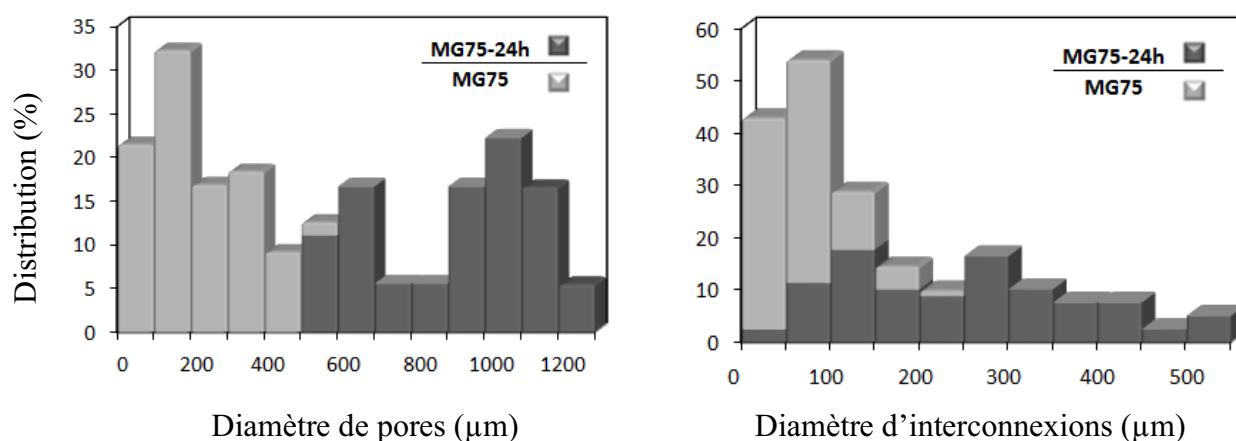


Figure 4-20 : Distribution des tailles de pores et d'interconnexions des mousses MG75-24h et MG75

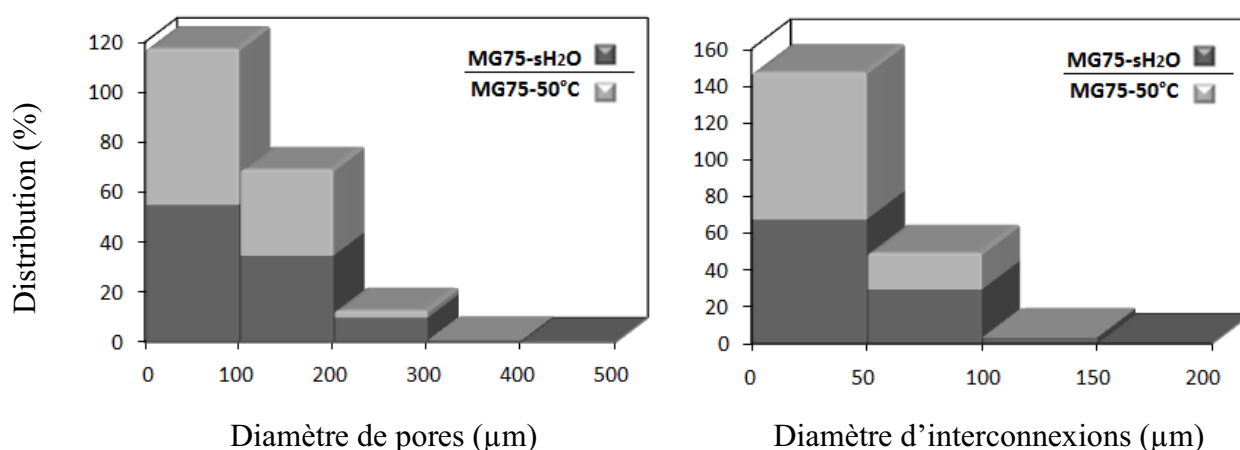


Figure 4-21: Distribution des tailles de pores et d'interconnexions des mousses MG75-sH₂O et MG75-50°C

4.2.3.2. Texture

Les deux mousses étudiées adsorbent peu d'azote, voir quasiment pas pour MG75-24h. Les surfaces spécifiques mesurées par application de la méthode BET sont donc très faibles : 1,5 m²/g et 0,03m²/g pour MG75 et MG75-24h respectivement.

L'isotherme de la mousse MG75 (Figure 4-22) semble montrer une large distribution de tailles de pores ce qui est confirmé par la distribution de tailles de pores obtenue par la méthode BJH. De plus, l'isotherme ne présente pas d'hystérésis ce qui semble montrer qu'il n'y a pas de mésoporosité. Une diminution de la surface spécifique par rapport aux mousses obtenues par le procédé de Sepulveda *et al.* (qui ont une surface spécifique d'environ 100-150 m²/g) n'est pas étonnant puisque le HF a une influence sur la surface spécifique comme observé par Almeida *et al.*¹⁴³. Leurs synthèses de scaffolds de verre bioactif par séparation de

phase, réalisée avec et sans HF, montrent une surface spécifique environ deux fois plus élevée pour les verres faits avec HF. Toutefois, cela n'explique que partiellement la faible surface spécifique qui devrait vraisemblablement avoisiner les 30-50 m²/g. Ces résultats surprenant de 0,03 et 1,5 m²/g pour un verre bioactif semblent provenir de la gélatine.

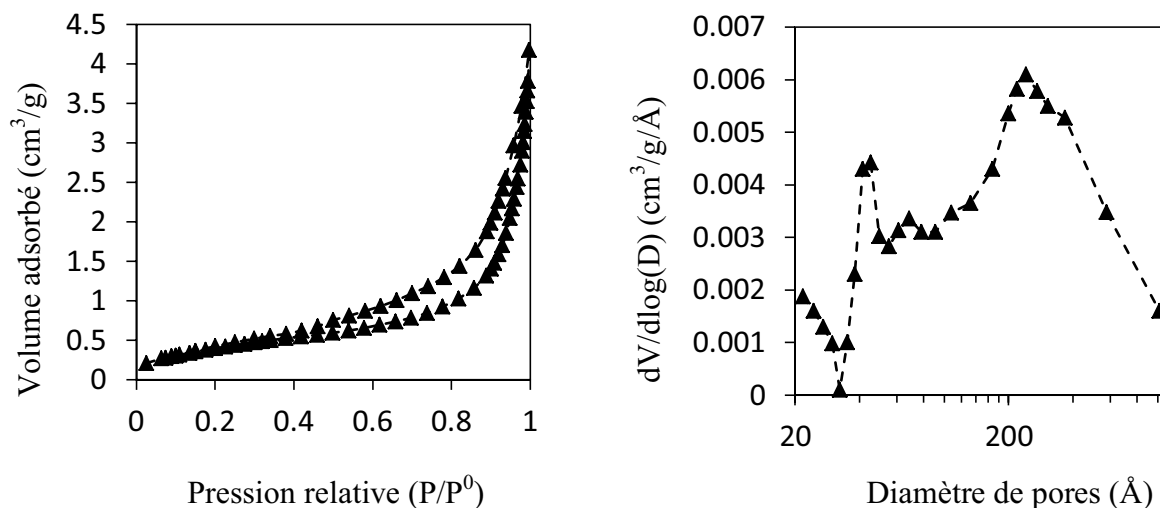


Figure 4-22 : Isotherme d'adsorption (gauche) et distribution de tailles de pores obtenue par la méthode BJH (droite) pour la mousse MG75

4.2.4. Etude de la réaction de minéralisation dans le SBF

4.2.4.1. Etude préliminaire de la bioactivité

Les matériaux obtenus possèdent des surfaces spécifiques très faibles en comparaison des mousses de verres précédemment élaborées. Avant de réaliser une étude complète de la réactivité de ces matériaux dans le SBF par ICP-AES et PIXE, une première évaluation de la bioactivité de ces matériaux a été réalisée pour déterminer l'intérêt éventuel d'une étude plus poussée.

Ainsi, les deux mousses de morphologies différentes ont été immergées dans du SBF pour des délais de 1 jour et 7 jours pour vérifier la dissolution du réseau et déterminer s'il y a diminution de la quantité de phosphore dans le SBF qui donnerait une indication sur la précipitation d'une couche de phosphate de calcium. Les mesures ICP-AES (Figure 4-23) montrent dans les deux cas une diminution de la quantité de phosphore ainsi qu'une augmentation de la quantité de silicium et de calcium dans le milieu. Cela semble témoigner d'un processus de dissolution précipitation, apparemment plus rapide pour MG75 qui atteint

un minimum de concentration en phosphore dans le milieu de 3 ppm contre 9 ppm pour MG75-24h à 7 jours d'immersion.

Les mousses ayant interagité 7 jours sont ensuite récupérées et observées par MEB afin de vérifier la formation de précipités à la surface des mousses (Figure 4-24). Les clichés montrent bien la présence de précipités à la surface des mousses¹⁴⁴. Cependant, si ces précipités se retrouvent sur la grande majorité de la surface de la mousse MG75, ils sont très disséminés sur la surface de MG75-24h. De plus, des trous sont visibles sur la surface de MG75-24h, probablement du fait de la corrosion du verre. Il semble donc que la très faible surface spécifique de ce verre ne permette pas de recouvrir la surface d'une couche de phosphate de calcium. Ce résultat est de mauvais augure pour l'application visée puisque cette couche est nécessaire à l'établissement d'une interface avec les cellules osseuses. La morphologie de la mousse MG75-24h semble donc inadaptée, celle de MG75 paraît plus prometteuse.

De manière à vérifier l'homogénéité du dépôt sur la mousse MG75 à une échelle plus faible, des morceaux de MG75 et de MG75 immergés 10 jours dans du SBF sont préparés pour une analyse par micro-PIXE.

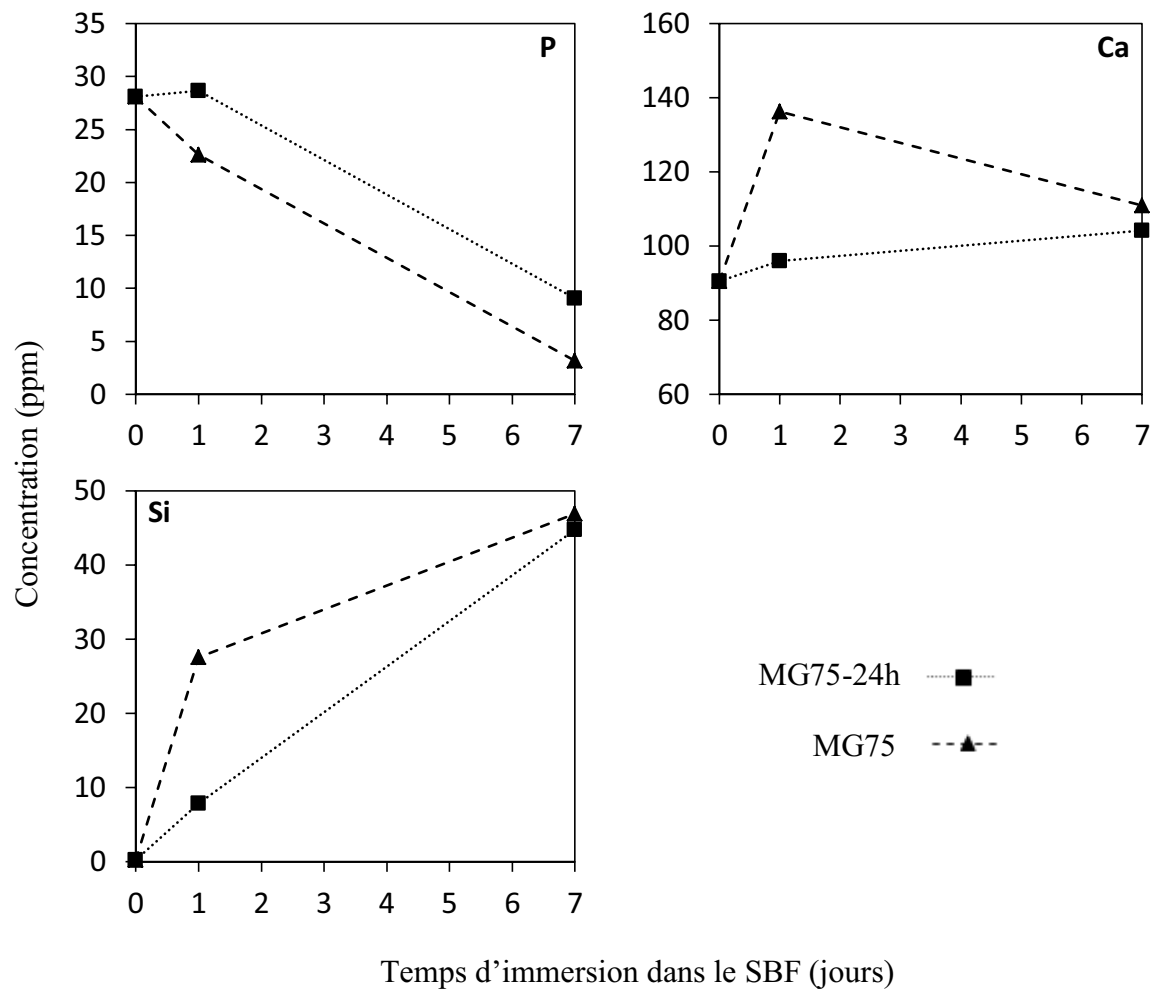


Figure 4-23: Evolution des concentrations déterminées par ICP-AES en phosphore, calcium et silicium du SBF lors de l'immersion des mousses MG75 et MG75-24h

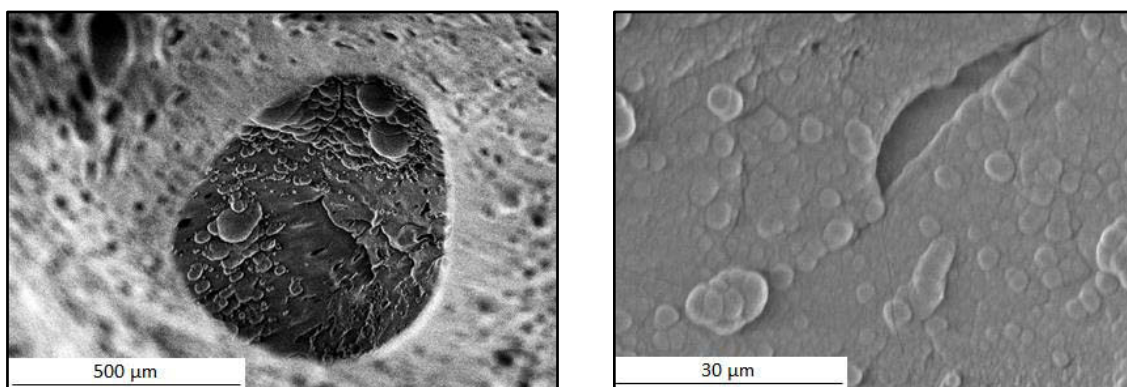


Figure 4-24: Clichés MEB de la surface des mousses MG75-24h (gauche) et MG75 (droite) après 7 jours d'immersion dans le SBF

4.2.4.2. Etude de la bioactivité de la mousse MG75

Les cartographies élémentaires du silicium et du calcium (Figure 4-25) montrent que la mousse MG75 semble homogène en composition avec une structure différente des mousses obtenues par le procédé de moussage de Sepulveda *et al.* qui présentaient des murs plus compacts (4.1.3.2, Page 91). Ici, l'élimination de la gélatine semble créer des zones sans matière au sein des murs de la mousse. Toutefois, cet aspect particulier des scaffolds n'est pas forcément un inconvénient du point de vue de l'application visée. En effet, cette porosité supplémentaire permet d'obtenir deux échelles différentes de macroporosité : l'une de quelques micromètres à l'intérieur des murs et l'autre, une ultra-macroporosité issue du moussage, de plusieurs centaines de micromètres de diamètre.

Après 10 jours d'immersion dans le SBF (Figure 4-26), les cartographies élémentaires confirment la formation de précipités de phosphates de calcium à la surface du matériau. Cependant, même si du phosphore est détecté sur une grande partie de la surface, ces précipités semblent se concentrer dans des zones disséminées à la surface de la mousse. Ils ne donnent pas naissance à une réelle couche de phosphate de calcium et donc, une fois implantée *in vivo* la mousse risque d'être limitée dans la création d'une réelle interface entre le matériau et l'os. Ce problème de réactivité est très probablement le résultat de la faible surface spécifique du matériau, afin d'améliorer la bioactivité il convient donc de modifier le procédé dans le but d'accroître la surface spécifique.

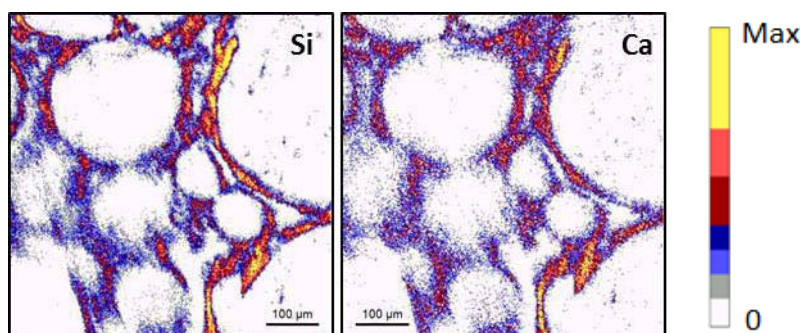


Figure 4-25 : Cartographies élémentaires de la mousse MG75 avant immersion dans le SBF

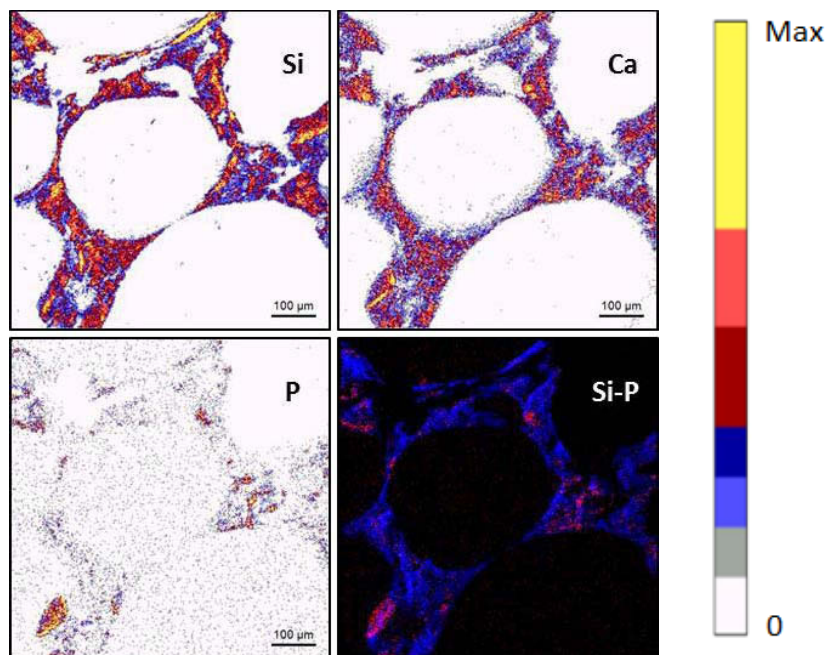


Figure 4-26 : Cartographies élémentaires de MG75 après 10 jours d'immersion dans le SBF et superposition des cartographies du silicium (bleu) et du phosphore (rouge)

4.3.Conclusion

L'étude comparative réalisée sur les deux mousses M75-A et M75-B conduit à deux conclusions principales. La première concerne l'intérêt de l'imagerie par micro-faisceaux d'ions pour l'étude des mousses. En effet, la mise en évidence de la différence de minéralisation n'a été possible que grâce à l'utilisation d'une technique de mesure locale¹⁴⁵.

La deuxième conclusion qui découle de ce travail est que la mousse M75-A, si elle devrait logiquement présenter de meilleures propriétés mécaniques que la mousse M75-B, semble moins prometteuse du point de vue de l'invasion cellulaire puisque sa minéralisation est inhomogène et que les fluides biologiques, apportant les nutriments nécessaires à la survie des cellules, ne pourraient être renouvelés à l'intérieur de l'implant.

De plus, un nouveau procédé d'élaboration de mousses de verre bioactif a été développé avec succès. Ce nouveau procédé possède l'avantage de proposer une alternative à l'utilisation de HF qui est un composé chimique extrêmement dangereux¹⁴⁴. La surface spécifique obtenue est faible pour un verre bioactif dérivé de la voie sol-gel, ce qui altère sa bioactivité comme l'ont montré les études *in vitro*. Des essais d'augmentation de la surface spécifique et de mésostructuration seront donc proposés dans le chapitre suivant.

Chapitre 5 Mousses méso-structurées : vers une porosité multi-échelle contrôlée ?

5.1.Mésostructuration des verres sol-gel

5.1.1. Intérêt des verres mésostructurés

Les verres issus de la méthode sol-gel possèdent une mésoporosité intrinsèque, ce qui constitue d'ailleurs l'un de leurs avantages par rapport aux verres fusion. Cependant, cette mésoporosité est anarchique car elle est constituée de pores aux tailles variables et non ordonnés. Or, une organisation des pores conduirait à une plus grande surface spécifique et devrait donc améliorer la bioactivité ou encore permettre l'adsorption de molécules médicamenteuses et *in fine* leur délivrance localisée. En effet, les verres mésostructurés présentent une plus grande capacité de stockage de molécules thérapeutiques ainsi qu'un relargage plus lent que les verres non mésostructurés^{146, 147}. De plus, des pores aux tailles plus régulières constitueraient une surface plus homogène pour la nucléation de précipités d'apatite et permettrait un contrôle de la réactivité.

Dans le but de contrôler avec finesse les propriétés du scaffold, et plus particulièrement celles de sa surface, de manière à pouvoir s'adapter aux exigences des différents sites d'implantation et contrôler la bioactivité si nécessaire, il peut être intéressant d'essayer de réaliser la mésostructuration des mousses de verre bioactif.

5.1.2. Méthode d'introduction d'une mésoporosité structurée

La mésostructuration est engendrée grâce à l'utilisation de tensioactifs qui ont la capacité de s'organiser (Figure 5-1). En effet, il existe une concentration de tensioactif en solution aqueuse au-delà de laquelle le tensioactif tend à isoler sa partie hydrophobe en formant des structures sphériques ou cylindriques appelées micelles, cette concentration est appelée Concentration Micellaire Critique (CMC). Si la concentration en tensioactif croît encore, ces

micelles vont à leur tour s'organiser en phases cubiques, hexagonales ou lamellaires. Ces phases organisées peuvent alors servir d'architecture pour la formation d'un matériau dans lequel une porosité organisée sera obtenue après élimination du tensioactif (Figure 5-2).

Cependant, il n'est pas nécessaire de partir d'une solution suffisamment concentrée en tensioactif pour contenir des micelles organisées. L'approche généralement utilisée, connue sous le nom de procédé EISA (Evaporation Induced Self-Assembly ou auto-organisation induite par évaporation), prend pour point de départ une solution de tensioactif, en concentration inférieure à la CMC, et les précurseurs inorganiques du matériau voulu dans un mélange d'eau et d'éthanol. L'évaporation de l'éthanol va progressivement concentrer la solution conduisant à l'auto-organisation du tensioactif autour duquel va se former le matériau souhaité au fur et à mesure de la réaction des précurseurs¹⁴⁸.

Pour mettre en œuvre cette synthèse, différents tensioactifs peuvent être employés, à l'origine il s'agit surtout de tensioactifs ioniques tels que le CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)¹⁴⁹. Cependant, ces tensioactifs posent deux problèmes principaux : 1) la finesse importante des murs obtenus pour le matériau final et 2) une limitation dans les tailles de pores obtenues¹⁵⁰. D'autres tensioactifs ont alors été proposés pour résoudre ce problème, il s'agit de tensioactifs non ioniques, des copolymères triblocs (PEO-PPO-PEO : polyoxyde d'éthylène - polyoxyde de propylène - polyoxyde d'éthylène)¹⁵¹. Les deux tensioactifs de ce type les plus utilisés sont le F127¹⁵² et le P123¹⁵³ employés seuls ou en association avec d'autres tensioactifs^{154, 155}.

A l'origine principalement utilisée pour l'élaboration de silices mésoporeuses, cette voie de synthèse a été appliquée avec succès à d'autres matériaux tels que des oxydes : TiO_2 , ZrO_2 , Nb_2O_5 , Al_2O_3 , SiAlO_y , Al_2TiO_y ¹⁵⁶ ou encore des carbures : composite TiC-C ¹⁵⁷ et des verres bioactifs^{158, 159}.

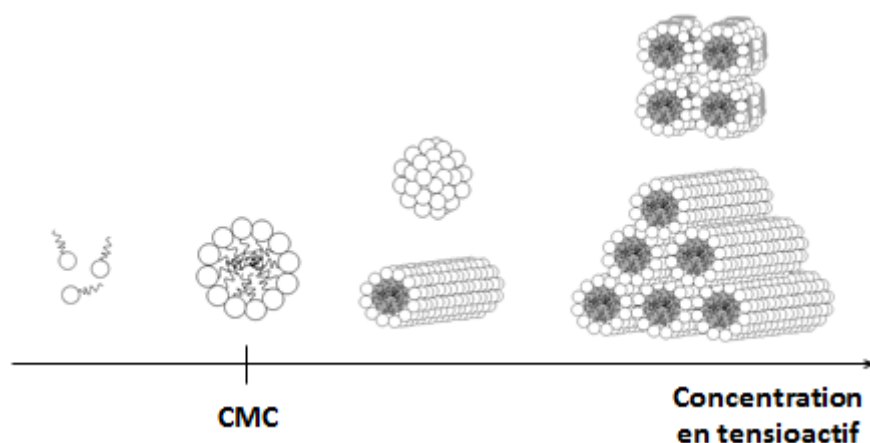


Figure 5-1 : Représentation de l'évolution de l'organisation d'un tensioactif avec l'augmentation de sa concentration

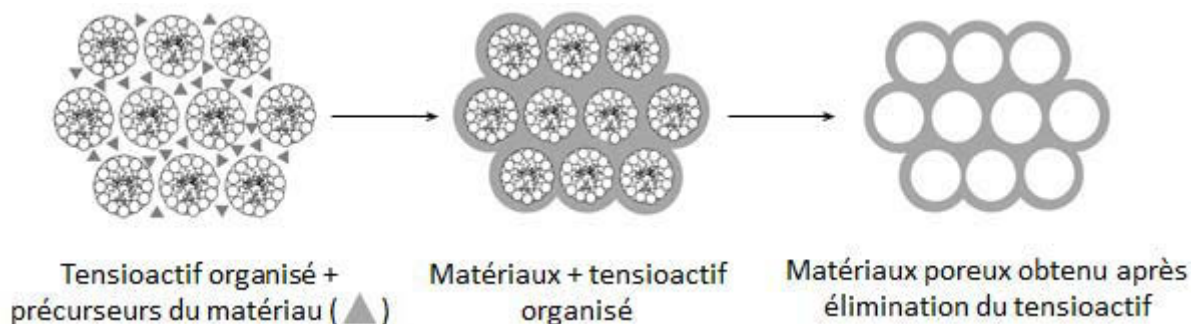


Figure 5-2 : Représentation de la synthèse de matériaux mésoporeux à partir d'un empilement organisé de micelles

5.1.3. Structures formées

Différentes organisations peuvent être obtenues par l'utilisation du procédé EISA. Elles dépendent du type de tensioactif utilisé puisque l'utilisation de P123 est souvent rapportée comme conduisant à une organisation hexagonale des pores de type $P6mm$ ¹⁶⁰, alors que l'utilisation de F127 conduit à une organisation cubique de type $Im\bar{3}m$ ¹⁶¹. Toutefois, Grosso *et al.* ont obtenu des silices mésostructurées hexagonales en utilisant du F127¹⁶². La porosité finale du matériau (taille de pores, organisation ...) dépend donc des différents paramètres expérimentaux tels que le type de tensioactif, sa concentration¹⁶³ ou encore des solvants utilisés.

5.2. Moussage avec HF en présence d'un tensioactif supplémentaire

5.2.1. Protocole de synthèse

Pour que le procédé EISA puisse s'opérer il faut qu'il y ait une surface de contact importante entre le verre et l'air de manière à permettre l'évaporation progressive du solvant. Cela ne devrait pas poser de problème puisque la mousse, grâce à sa grande porosité et à la finesse de ses murs, devrait présenter une surface de contact importante avec l'air. La plus grande difficulté provient de l'impossibilité d'utiliser de l'éthanol comme co-solvant puisque l'éthanol empêcherait le moussage. Pour régler ce problème un sol est réalisé suivant le protocole de Sepulveda *et al.*, il est laissé sous agitation une nuit puis thermostaté à 40°C. 5,7059 g de F127 et 2 mL de HCl à 2N sont ensuite ajoutés. L'élévation de température du sol et l'acide supplémentaire facilitent la dissolution du F127 dans le sol qui est rendue difficile par l'absence d'éthanol. Le mélange est agité pendant 4 heures avant de réaliser l'étape de moussage avec 0,75 mL de HF et 0,5 mL de teepol. Le mélange est moussé dans un bécher pendant 10 min puis le bécher est mis à l'étuve pendant 48 heures à 60°C. De manière à avoir évaporation du solvant la mousse obtenue n'est pas placée dans un conteneur hermétiquement fermé. L'étuve est ensuite réglée à 125°C pendant 24 heures pour finaliser le séchage. Une étape de calcination similaire à celle précédemment réalisée pour les mousses M75-A et M75-B (4.1.1, Page 85) permet d'éliminer le teepol, le HF résiduel, les nitrates et le F127. La mousse obtenue par ce procédé (Figure 5-3) est appelée M75-F127.

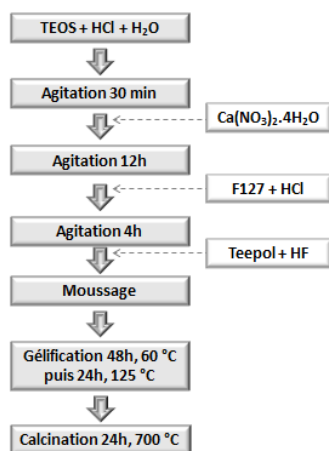


Figure 5-3 : Représentation schématique du protocole d'élaboration de la mousse M75-F127

5.2.2. Caractérisation de la macroporosité

Les observations par microscopie électronique à balayage (Figure 5-4) attestent de l'obtention d'une structure macroporeuse interconnectée pour la mousse M75-F127. La Figure 5-5 montre des distributions de tailles de pores et d'interconnexions assez similaires à M75-A. En effet, 31% des pores de M75-F127 sont inférieurs à 100 μm et seulement 8% sont supérieurs à 300 μm . 69% de ses interconnexions ont des diamètres inférieurs à 50 μm et il n'y en a que 3% supérieurs à 100 μm .

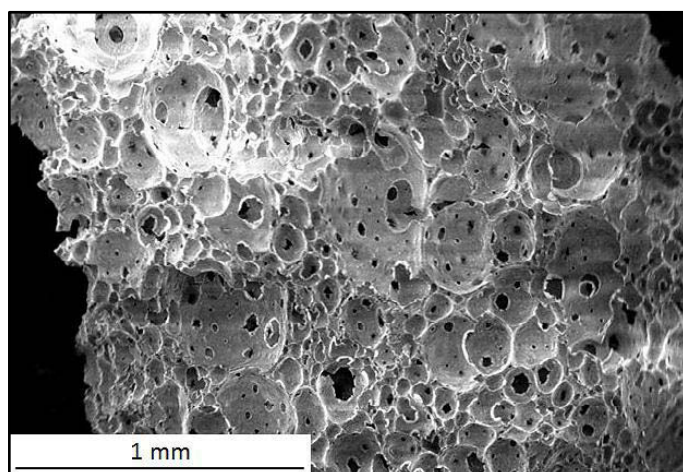


Figure 5-4 : Cliché MEB de la mousse M75-F127

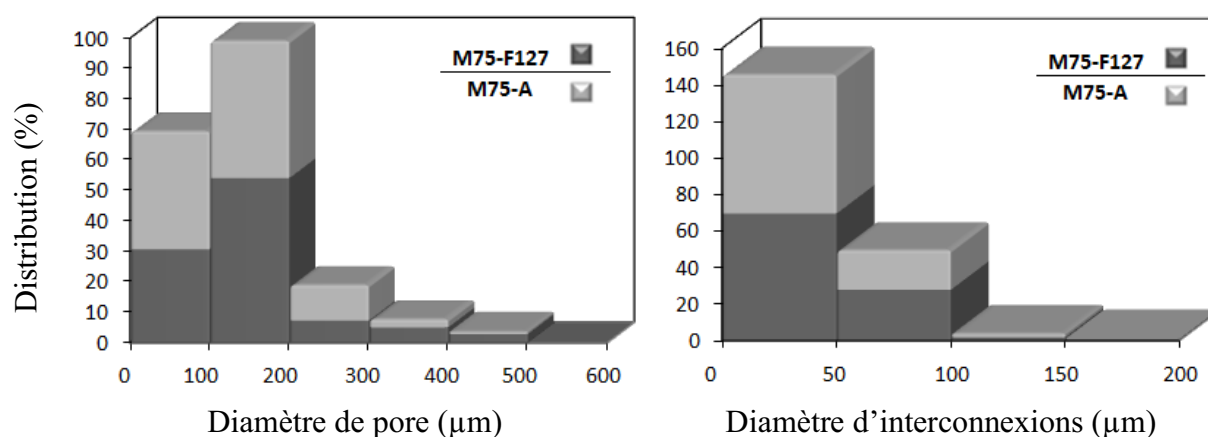


Figure 5-5 : Distribution de tailles de pores (gauche) et d'interconnexions (droite) des mousses M75-F127 et M75-A

5.2.3. Caractérisation de la mésoporosité

5.2.3.1. Caractérisation par adsorption d'azote

Les isothermes d'adsorption d'azote ne semblent pas montrer de mésoporosité (Figure 5-6), pourtant ce matériau possède une grande surface spécifique ($410 \pm 30 \text{ m}^2/\text{g}$). Il semble donc qu'il y ait une porosité multi-échelle comme en témoigne l'allure de la distribution des tailles de pores obtenue par la méthode BJH. Contrairement à l'objectif visé, il ne semble pas y avoir de distribution monomodale de la mésoporosité mais plutôt l'existence d'une multitude de pores aux tailles différentes. La forte surface spécifique associée à ce résultat conduit à chercher un moyen de caractérisation supplémentaire pour mieux comprendre la porosité de ce matériau, pour cela des observations par microscopie électronique à transmission sont réalisées.

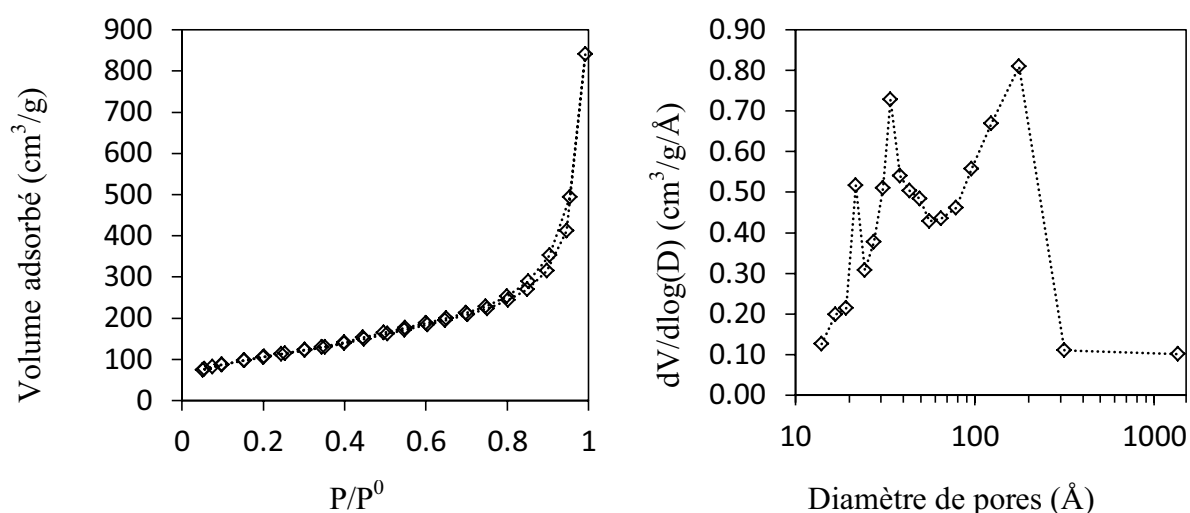


Figure 5-6 : Isotherme d'adsorption et distribution de tailles de pores pour la mousse M75-F127

5.2.3.2. Observations par MET

Malgré la forte surface spécifique observée, les clichés obtenus par microscopie électronique à transmission (Figure 5-7 et Figure 5-8) confirment l'absence d'organisation de la mésoporosité. Par comparaison avec une mousse similaire réalisée sans le tensioactif F127 : M75-B (Chapitre 4, Page 85), il est intéressant de noter que les murs de la mousse M75-F127 présentent un aspect moins dense et plus fragmenté. L'existence d'espaces de l'ordre de quelques nanomètres à quelques centaines de nanomètres pourrait expliquer la forte surface spécifique de M75-F127. En effet, il s'agit d'une porosité inter-granulaire dans laquelle les molécules d'azote vont se condenser, cette porosité est d'ailleurs probablement à l'origine des pores de fort diamètre visibles sur la distribution obtenue par la méthode BJH.

Cette morphologie, certes différente de celle espérée, devrait engendrer une réactivité différente de celle des mousses binaires précédemment réalisées. L'étude de l'interaction de la mousse M75-F127 avec du SBF a donc été réalisée.

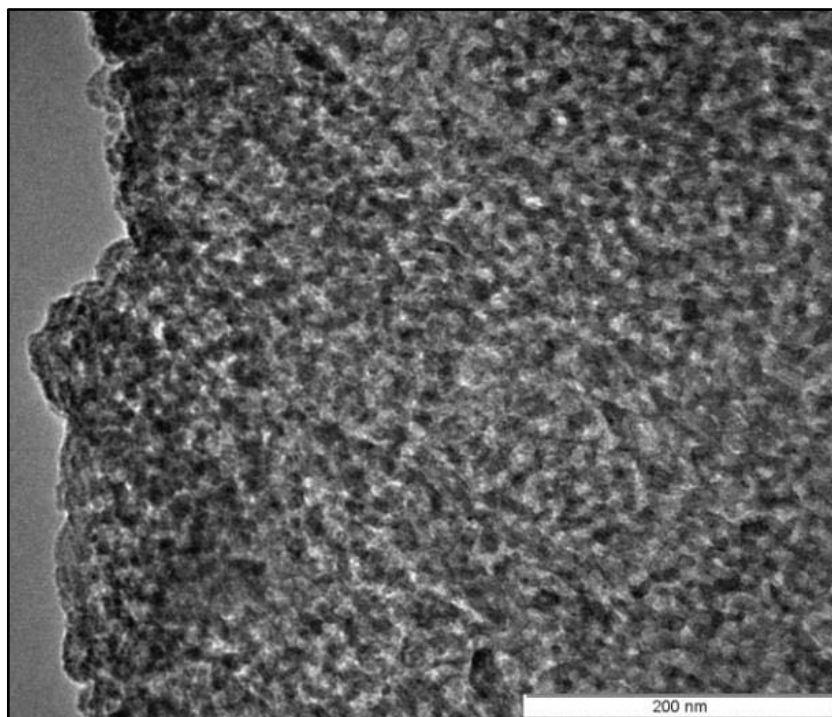


Figure 5-7 : Cliché MET de la mousse M75-B

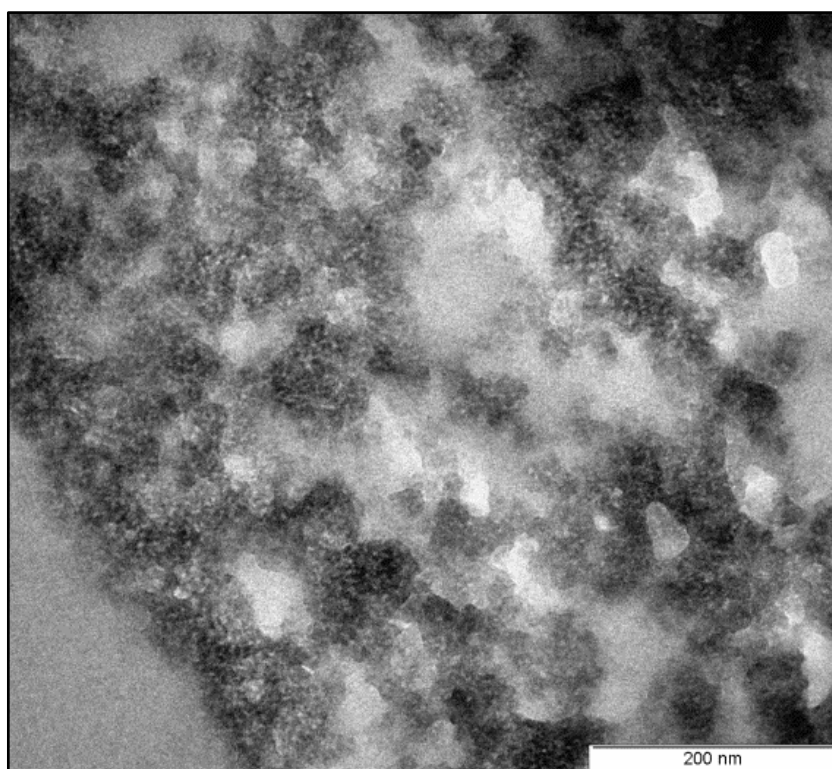


Figure 5-8 : Cliché MET de la mousse M75-F127

5.2.4. Etude de l'interaction de la mousse M75-F127 avec du SBF

5.2.4.1. Variation de composition du milieu

Afin de caractériser le comportement *in vitro* de la mousse M75-F127, des morceaux de mousse ont été immergés dans du SBF pendant 30 minutes, 1 heure, 5 heures et 1 jour. Les variations de composition du SBF sont présentées sur la Figure 5-9. Comparées à celles des mousses binaires sans F127, les évolutions de composition du milieu sont très différentes pour M75-F127. En effet cette mousse montre une dissolution du réseau de silicium beaucoup plus rapide que les mousses M75-A et M75-B qui engendraient une concentration d'environ 30 ppm de silicium après 5 heures d'immersion alors que pour M75-F127 cette concentration est de 48 ppm. Plus encore que la cinétique de dissolution, la vitesse de précipitation d'une couche d'apatite semble très rapide à en juger par la décroissance de la concentration en phosphore dans le milieu. Après 1 jour d'interaction une part très importante du phosphore initialement présent dans le SBF a déjà été consommée (dans la limite de solubilité de l'apatite formée), le même résultat était observé seulement après 5 jours d'immersion des mousses M75-A et M75-B. Ces résultats confirment l'importance de la surface spécifique dans la vitesse de réaction des verres bioactifs.

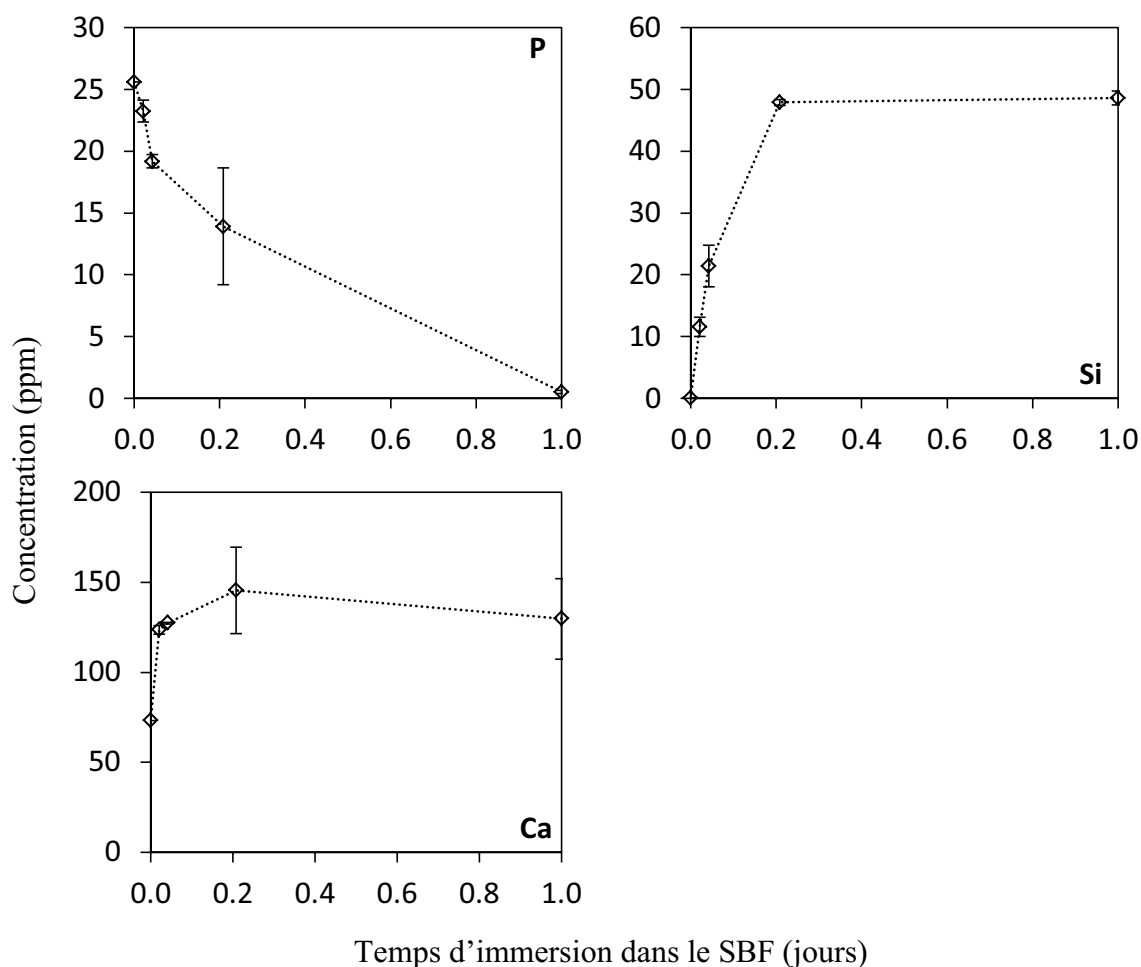


Figure 5-9 : Evolution des concentrations mesurées par ICP-AES en phosphore, silicium et calcium dans le SBF lors de l'immersion de la mousse M75-F127

5.2.4.2. Cartographies élémentaires

Les cartographies du silicium et du calcium sur la mousse M75-F127 avant immersion dans le SBF (Figure 5-10) montrent une répartition homogène des deux éléments. De manière cohérente avec l'observation d'une ultra-macroporosité comparable, M75-F127 semble réagir de la même manière que M75-A (Figure 5-11) c'est-à-dire de manière inhomogène et par transformation progressive des murs et non pas sur toute la surface des pores.

La Figure 5-12 montre les cartographies élémentaires du matériau après 1 jour d'immersion dans le SBF. Contrairement aux mousses ayant une plus faible surface spécifique, une couche ou une zone de phosphate de calcium n'est plus clairement visible. Les murs de la mousse semblent être totalement touchés par la transformation en phosphate de calcium puisqu'il y a du phosphore jusqu'au cœur des murs comme le montre la correspondance des cartographies du silicium et du phosphore.

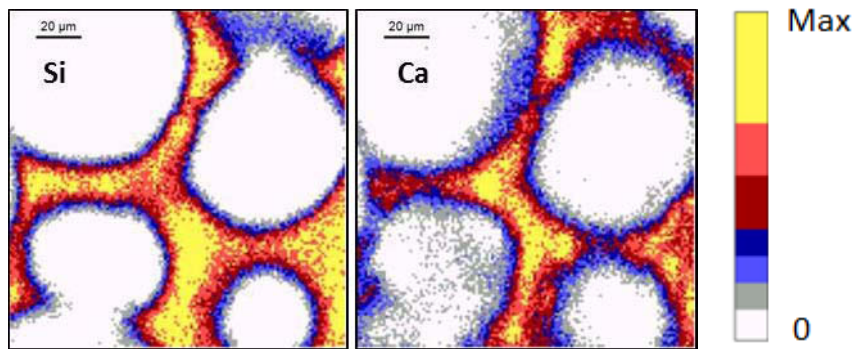


Figure 5-10: Cartographies élémentaires de la mousse M75-F127 avant immersion dans le SBF (0 jour)

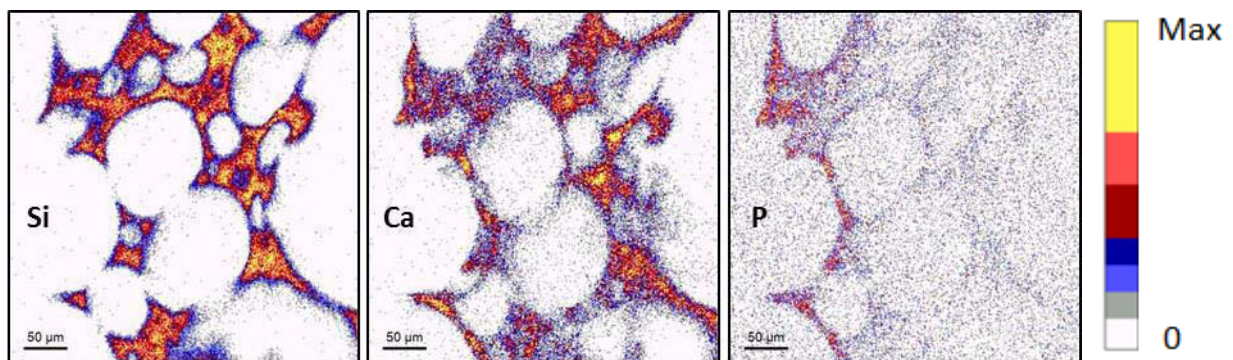


Figure 5-11 : Cartographies élémentaires de la mousse M75-F127 après 30 minutes d'immersion dans le SBF

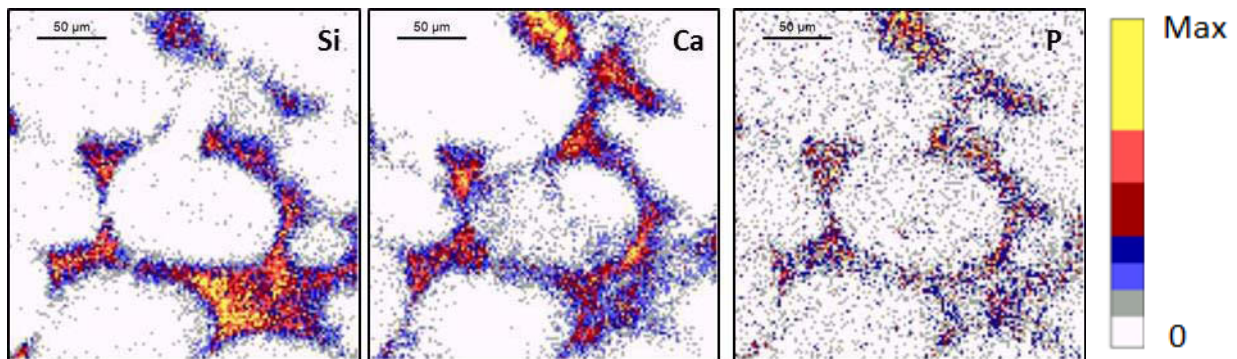


Figure 5-12 : Cartographies élémentaires de la mousse M75-F127 après 1 jour d'immersion dans le SBF

5.2.4.3. Mesures locales de concentrations

Aux premiers instants de l'immersion dans le SBF, la concentration en calcium décroît au niveau de la périphérie des murs en contact avec le fluide biologique (Figure 5-13). Ce phénomène s'accompagne logiquement d'une augmentation de la concentration en silicium à

cause de la normalisation des concentrations à 100%. Dans le même temps, la précipitation rapide de phosphate de calcium, dont témoigne l'augmentation des concentrations en calcium et en phosphore à la périphérie, conduit à la formation d'une couche contenant 8% de phosphore et 18% de calcium après seulement 30 minutes d'immersion. La quantité de calcium à l'intérieur des murs décroît très rapidement pour atteindre $5,0 \pm 0,7\%$ massique après 1 heure d'interaction. Ce résultat paraît logique étant donné la très grande surface spécifique. Ainsi la diffusion depuis l'intérieur du matériau vers la périphérie et le SBF se fait très bien. La concentration en phosphore croît rapidement à l'intérieur des murs pour atteindre une concentration proche de celle de la périphérie. Cela témoigne d'une diffusion importante du phosphore à l'intérieur du matériau, probablement grâce à la mésoporosité. Ainsi la mousse M75-F127 atteint, après seulement 1 jour d'immersion dans le SBF, une composition identique au cœur et à la périphérie.

Une incorporation de magnésium à la couche phosphocalcique est aussi observée ainsi qu'une diffusion vers l'intérieur du verre.

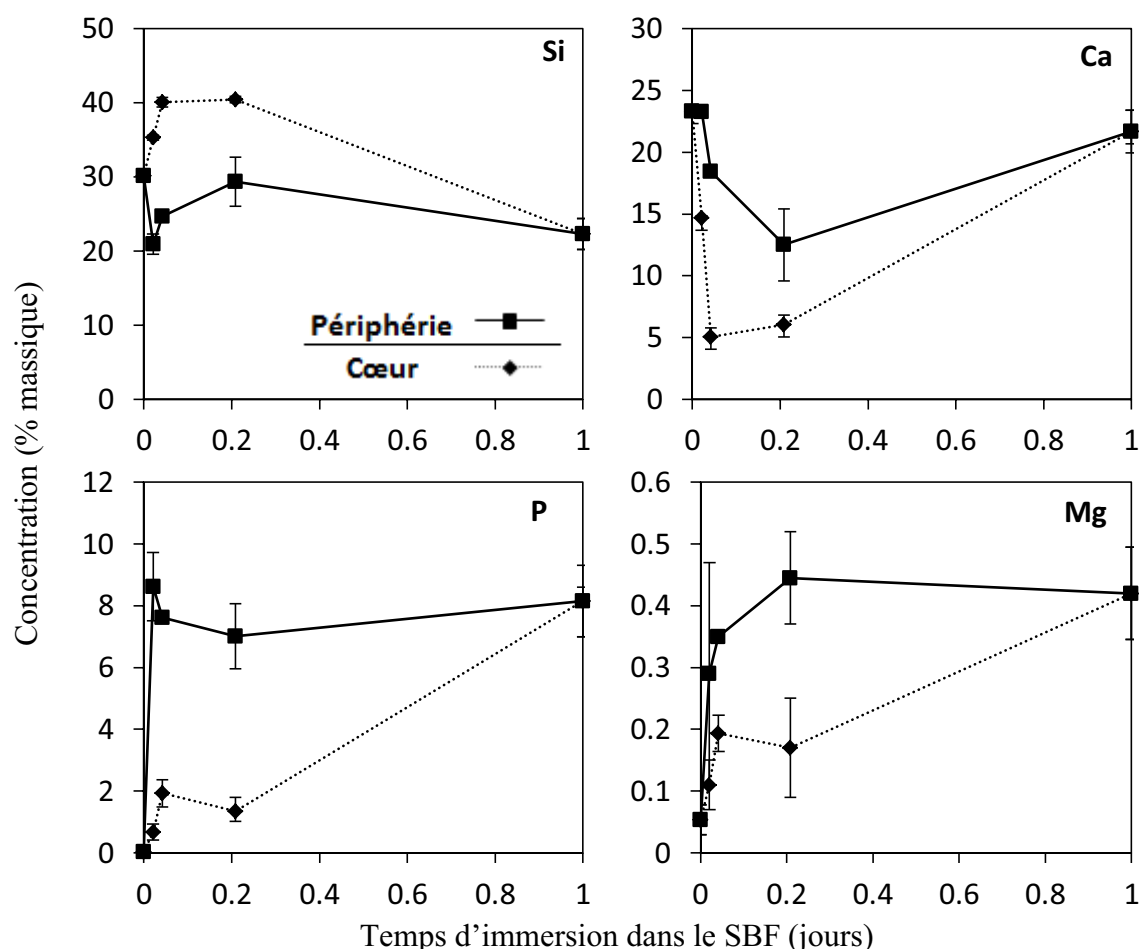


Figure 5-13: Evolution des concentrations locales à la périphérie et au cœur des murs de la mousse M75-F127

5.3. Moussage sans HF en présence d'un tensioactif supplémentaire

5.3.1. Protocole de synthèse

Pour améliorer la bioactivité des mousses sans HF, l'utilisation d'un deuxième tensioactif, tel que le F127, en plus du teepol apparaît intéressante. Le protocole de synthèse est donc modifié pour incorporer du F127 lors de la synthèse (Figure 5-14). 6,74 mL d'eau déionisée et 1,125 mL d'HCl à 2N sont mélangés, 6,97 mL de TEOS sont ajoutés et le mélange est fortement agité pendant 30 minutes afin de maximiser la surface de contact entre les deux phases non miscibles et de permettre l'hydrolyse du TEOS. 2,632 g de nitrate de calcium sont ensuite ajoutés.

La solution est laissée sous agitation pendant 12 heures. 2,85 g de F127 sont dissouts dans le sol thermostaté à 40°C ainsi que 1 mL d'HCl supplémentaire pour faciliter la dissolution. Après 30 min d'agitation, 1,5 g de gélatine et 1 mL d'eau sont ajoutés et le mélange est agité pendant 10 min pour permettre la dissolution de la gélatine. La solution ainsi obtenue est moussée pendant 30 secondes et 0,25 mL de teepol sont ajoutés. La solution est moussée pendant 7 minutes puis l'agitation est arrêtée et le béccher est laissé à l'air libre pendant 24 heures puis placé 24 heures dans une étuve à 60°C. La calcination est réalisée selon le même programme que celui décrit précédemment (4.2.2, Page 100).

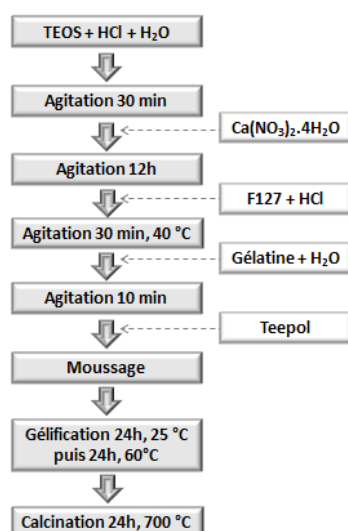


Figure 5-14 : Représentation schématique de la synthèse d'une mousse de verre binaire sans HF (MG75-F127) aux propriétés de surface améliorées

5.3.2. Caractérisation

5.3.2.1. Morphologie

Les clichés MEB de la mousse MG75-F127 (Figure 5-15) montrent une structure poreuse et interconnectée. Après calcination, de nombreux débris et quelques fractures qui n'existaient pas avant calcination montrent que l'ajout de F127 lors de la synthèse rend le matériau final plus fragile qu'une mousse similaire obtenue sans F127. De plus, l'ajout de F127 a aussi une influence sur la porosité du matériau (Figure 5-16). En effet, la mousse MG75-F127 possède 58% de pores d'un diamètre inférieur à 100 μm , les 42% restant étant compris entre 100 et 300 μm . De plus, 90% des interconnexions ont un diamètre inférieur à 50 μm .

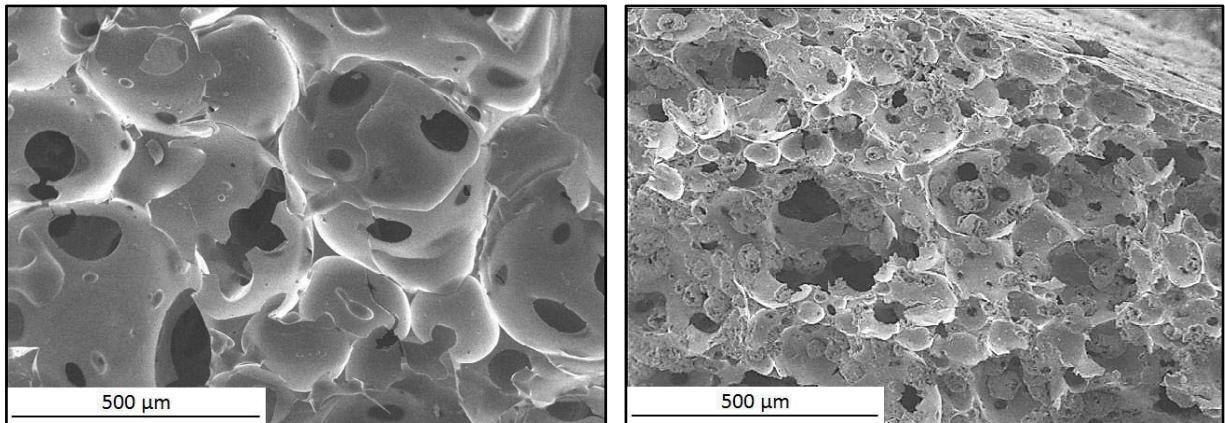


Figure 5-15 : Clichés MEB de la mousse MG75-F127 avant (gauche) et après (droite) calcination

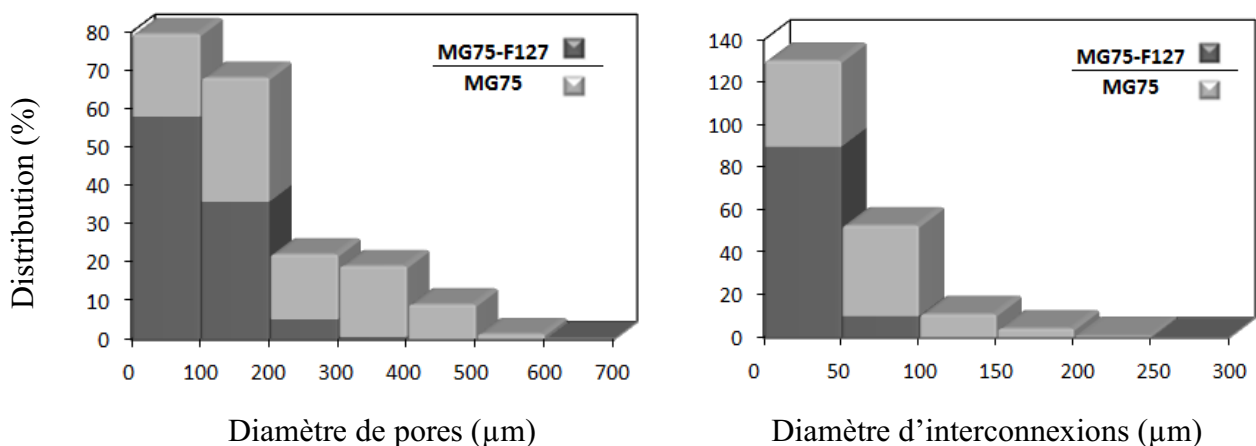


Figure 5-16 : Distribution de tailles de pores et d'interconnexions des mousses MG75 et MG75-F127

5.3.2.2. Texture

L'isotherme d'adsorption de la mousse MG75-F127 (Figure 5-17) témoigne de propriétés de surface très différentes de celles de MG75. En effet, la courbe obtenue présente une hystérèse caractéristique d'un matériau mésoporeux ainsi qu'un volume adsorbé plus important. La surface spécifique mesurée par la méthode BET pour MG75-F127 est de 49 m²/g ce qui montre l'efficacité du F127 dans l'amélioration des propriétés de surface du matériau (Tableau 5-1). De plus, l'ajout de F127 donne une distribution monomodale de mésopores centrée autour de 3,8 nm (Figure 5-17).

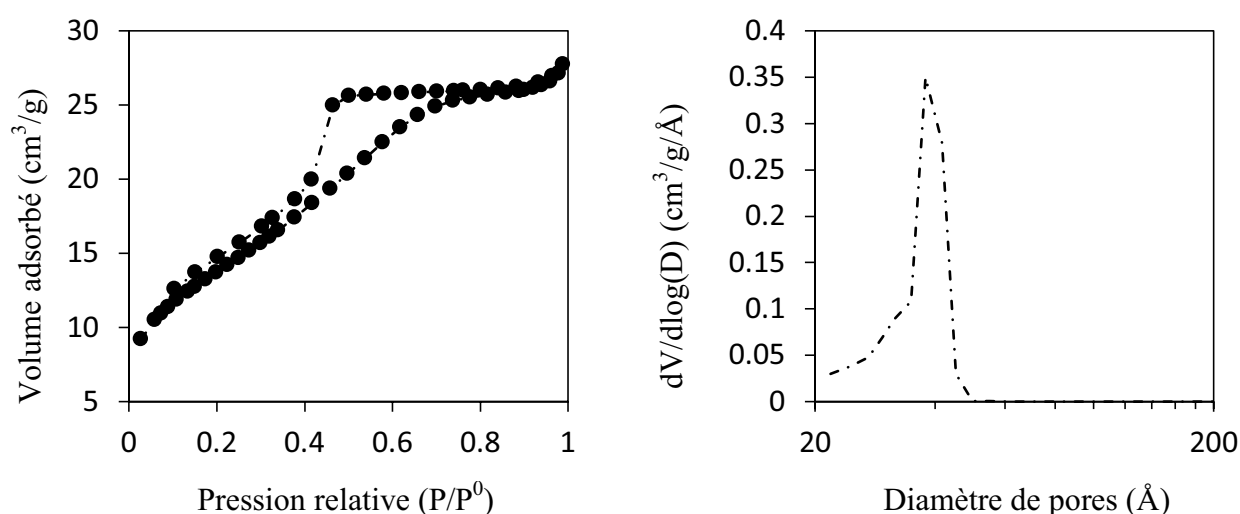


Figure 5-17 : Isothermes d'adsorption des mousses et distribution de tailles de pores obtenue en appliquant la méthode BJH sur la branche de désorption pour la mousse MG75-F127

Tableau 5-1 : Comparaison des résultats obtenus par adsorption d'azote pour les mousses MG75 et MG75-F127

	Surface Spécifique (m ² /g)	Volume poreux (cm ³ /g)	Diamètre de pore moyen (nm)
MG75	1,5	0,005	12,5
MG75-F127	49	0,043	3,5

5.3.2.3. Observation par MET

Au vue de la distribution très resserrée des mésopores il est intéressant de réaliser des observations par microscopie électronique à transmission. Ces observations montrent une distribution régulière des tailles de pore ainsi que leur organisation qui donne lieu à l'existence de plans, visibles sur les clichés MET (Figure 5-18). Les transformées de Fourier

des clichés confirment cette organisation selon des distances régulières entre plans. La taille moyenne des pores sur les clichés MET est de $4,7 \pm 0,2$ nm ce qui est plutôt cohérent avec les tailles de pore mesurées par la méthode BJH.

L'organisation de la porosité de la mousse MG75-F127 s'avère assez surprenante compte tenu de la surface spécifique d'environ $50 \text{ m}^2/\text{g}$ alors que les verres mésostructurés atteignent des surfaces de plusieurs centaines de m^2/g ^{164, 165}. Il semble qu'une grande partie de cette porosité ne soit pas accessible aux molécules de N_2 utilisées lors de l'analyse par adsorption. Cela pourrait être dû à un dépôt de résidus organiques bouchant une partie de la porosité de surface.

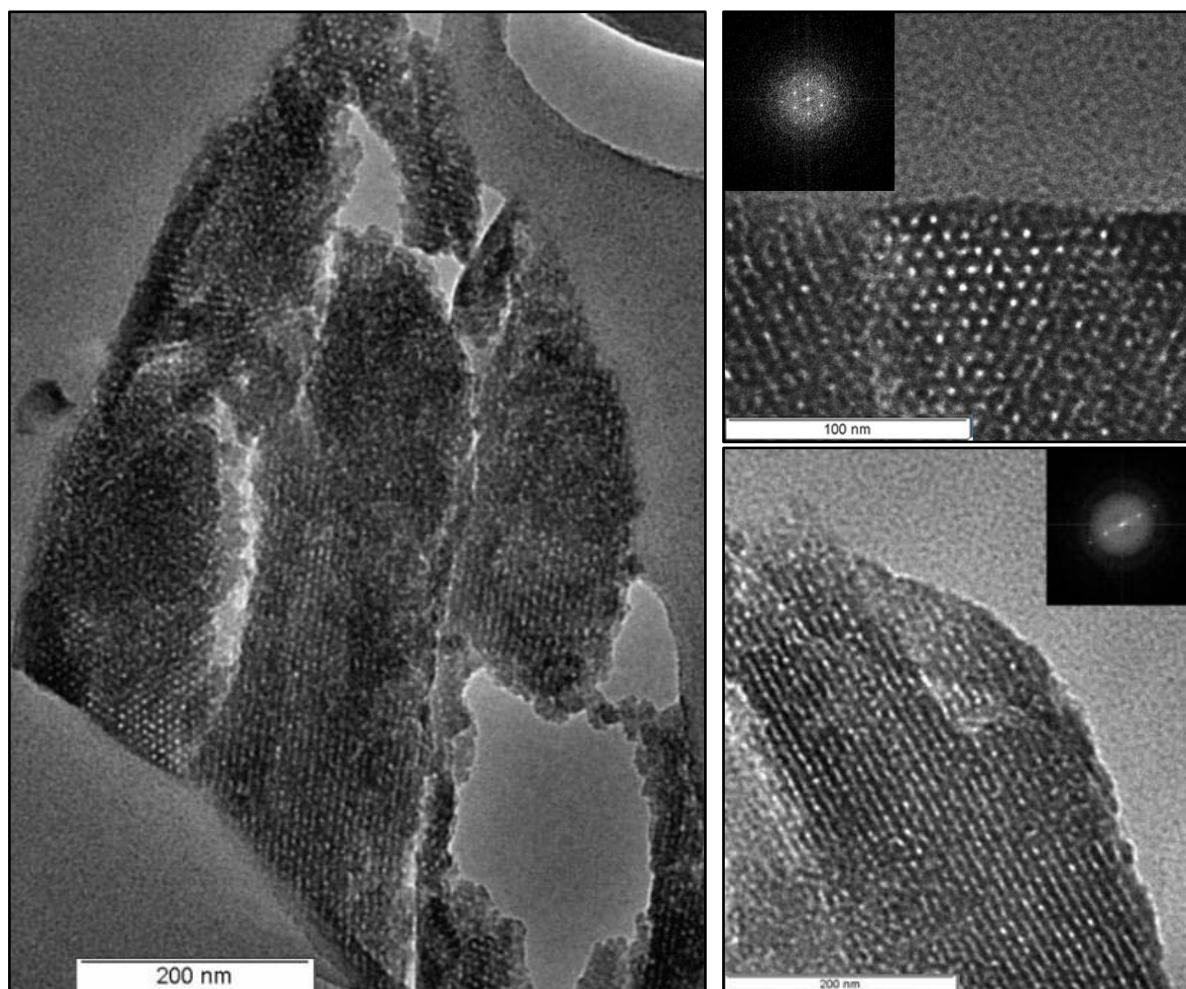


Figure 5-18 : Clichés MET de la mousse MG75-F127, les inclusions correspondent aux transformées de Fourier

5.3.3. Etude de l'interaction avec du SBF

5.3.3.1. Evolution du SBF

Les évolutions de composition du SBF (Figure 5-19) montrent une augmentation plus rapide de la concentration en calcium dans le milieu pour la mousse MG75-F127 que pour MG75 ce qui est cohérent avec la surface de contact plus importante entre MG75-F127 et le milieu. Après deux jours d'immersion dans le milieu, la concentration en calcium semble se stabiliser pour MG75-F127 alors qu'elle diminue jusqu'à 10 jours d'immersion pour MG75 après être passée par un maximum à 1 jour. L'évolution de la concentration en silicium dans le milieu est assez similaire pour les deux mousses, bien qu'un peu plus rapide aux premiers instants pour MG75-F127 ce qui est en accord avec les courbes d'évolution de la concentration en calcium. Ensuite, la dissolution du réseau de verre semble ralentir pour MG75-F127, probablement à cause de la formation rapide d'une couche de phosphate de calcium en surface. En effet, la concentration en phosphore diminue plus vite au contact de la mousse MG75-F127 qu'au contact de MG75 pour atteindre un minimum après 2 jours et 10 jours d'interaction respectivement témoignant d'une précipitation rapide à la surface de MG75-F127.

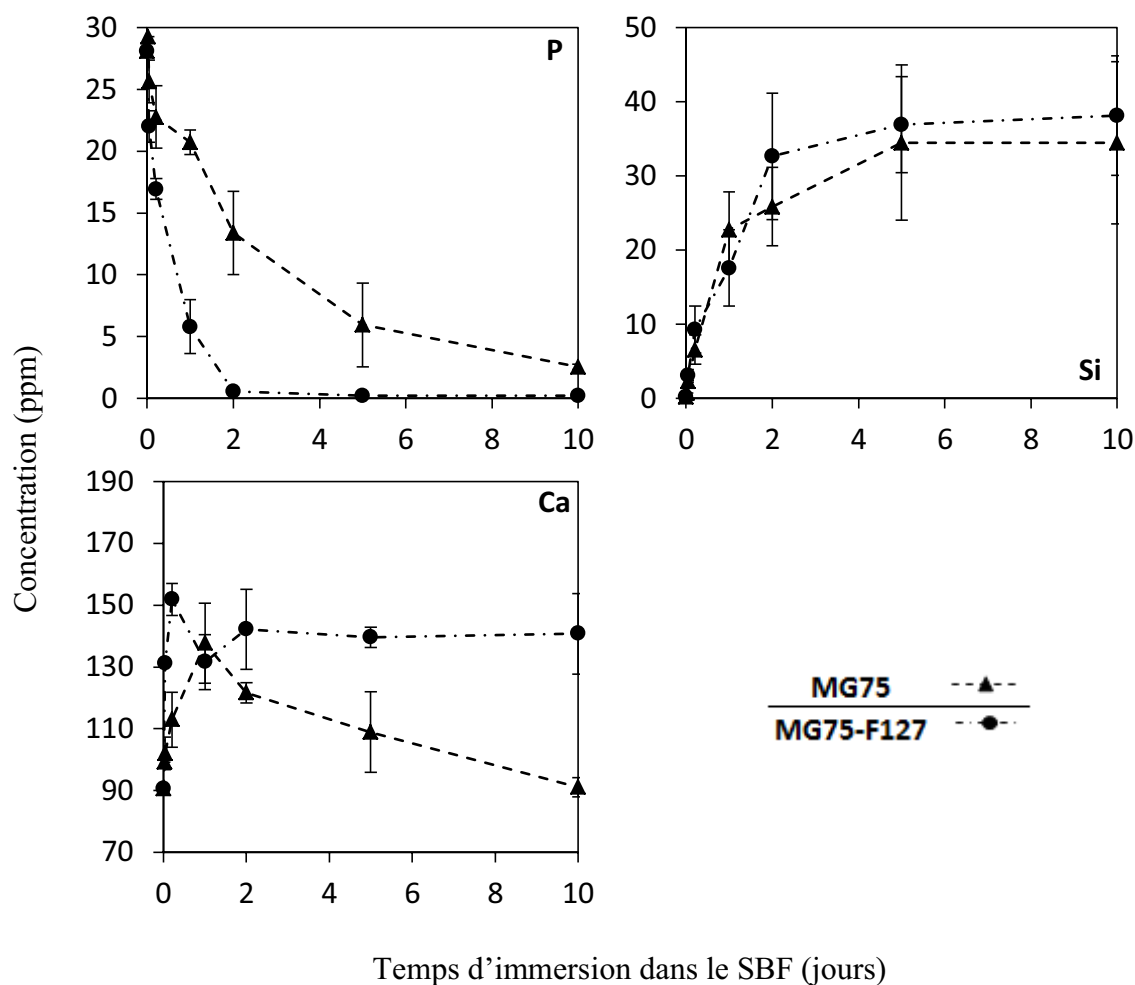


Figure 5-19: Evolution des concentrations mesurées par ICP-AES en phosphore, silicium et calcium dans le SBF en fonction du temps d'immersion des mousses MG75 et MG75-F127

5.3.3.2. Cartographies élémentaires

Les cartographies élémentaires de la mousse MG75-F127 (Figure 5-20) montrent la même structure que pour MG75, c'est-à-dire des murs partiellement fragmentés qui contiennent donc aussi une porosité de l'ordre de quelques micromètres.

Les cartographies élémentaires après 10 jours d'immersion dans le SBF (Figure 5-21) montrent la présence d'une couche de phosphate de calcium à la surface du matériau, ainsi que la transformation presque totale des murs les plus fins. Cette réactivité beaucoup plus homogène que pour la mousse MG75 témoigne de l'importance des propriétés de surface dans la réactivité des verres bioactifs.

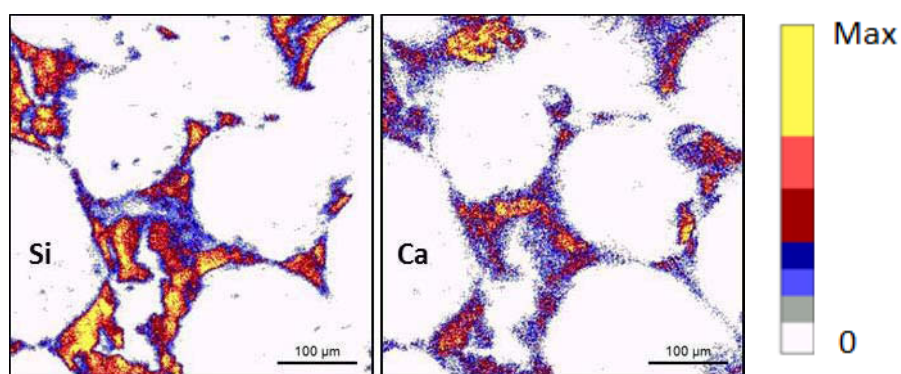


Figure 5-20 : Cartographies élémentaires de la mousse MG75-F127 avant immersion dans le SBF

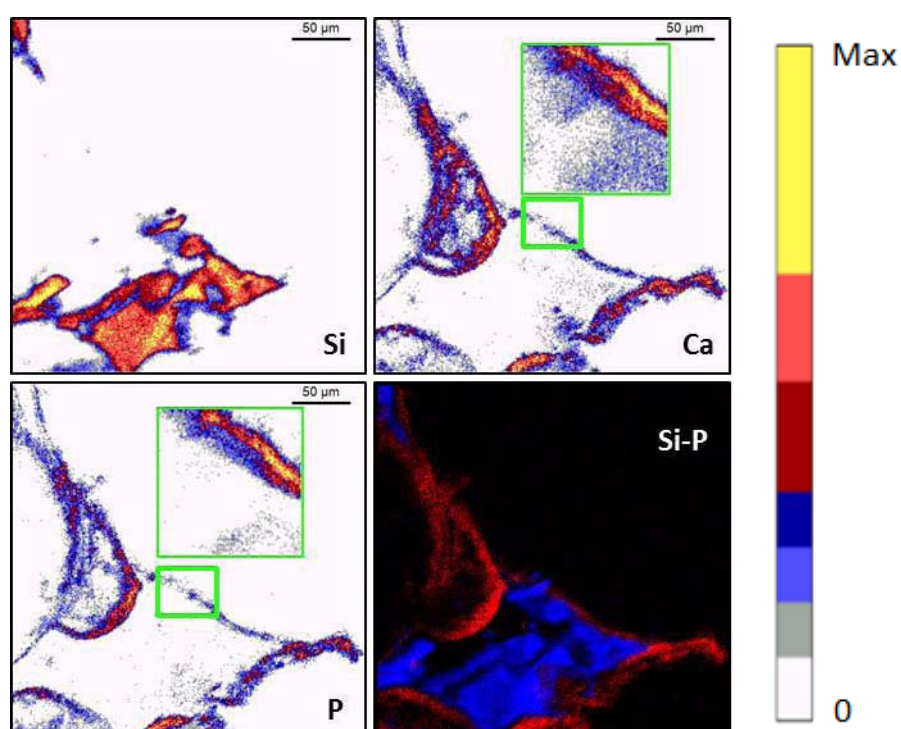


Figure 5-21 : Cartographies élémentaires de la mousse MG75-F127 après 10 jours d'immersion dans le SBF et superposition des cartographies du silicium (bleu) et du phosphore (rouge). Les cartographies dans le cadre vert correspondent à des images 70 μm $\times$ 70 μm de la couche phosphocalcique

5.3.3.3. Mesures locales de concentrations

L'évolution de composition de l'intérieur des murs (Figure 5-22) indique des comportements assez différents pour les deux mousses. La composition interne varie assez peu pour MG75 alors que la concentration en calcium diminue fortement pour MG75-F127 passant de 12 à 2% massique après 10 jours et s'accompagnant logiquement d'une augmentation de la concentration en silicium. Cela semble témoigner d'un phénomène de drainage du calcium de l'intérieur du matériau vers la surface pour participer à la formation de la couche de phosphate de calcium. Il est intéressant de noter que l'apport en calcium drainé depuis l'intérieur du matériau peut expliquer la stabilisation de la concentration en calcium dans le SBF. En effet, l'apport en calcium pour la formation de la couche de CaP de la mousse MG75 semble provenir principalement du milieu, alors qu'il semble venir pour une part importante de l'intérieur du matériau pour MG75-F127.

Globalement, les concentrations en phosphore à l'intérieur des murs sont très faibles et sont probablement le résultat d'une diffusion du phosphore qui reste néanmoins limitée par les surfaces spécifiques assez faibles des verres en comparaison des mousses de Sepulveda *et al.* L'hypothèse d'une mésoporosité occluse semble donc se confirmer pour MG75-F127, surtout si l'on compare avec les concentrations à l'intérieur des murs observée précédemment pour M75-F127.

L'évolution de la composition de la périphérie des murs des mousses (Figure 5-23) montre globalement, dans les deux cas, une diminution de la concentration en silicium et une augmentation des concentrations en calcium et en phosphore cohérente avec un processus de bioactivité. Toutefois, cette évolution est plus rapide pour MG75-F127 qui montre même dans un premier temps une diminution de la concentration en calcium à sa surface, en accord avec le relargage rapide de cet élément observé dans le SBF. De plus, la concentration en phosphore augmente plus vite à la surface de MG75-F127 de même qu'elle diminuait plus rapidement dans le SBF. Ces résultats s'expliquent par la plus grande surface spécifique de la mousse MG75-F127 qui donne lieu à un échange plus important avec le milieu, donc une dissolution plus rapide, mais aussi à plus de sites de nucléation, d'où une précipitation plus rapide et plus homogène. En conséquence, la mousse MG75-F127 montre que l'augmentation de la surface spécifique, même de quelques dizaines de m^2/g , permet d'avoir une bioactivité suffisante pour espérer la formation d'une interface efficace entre le verre et les cellules osseuses.

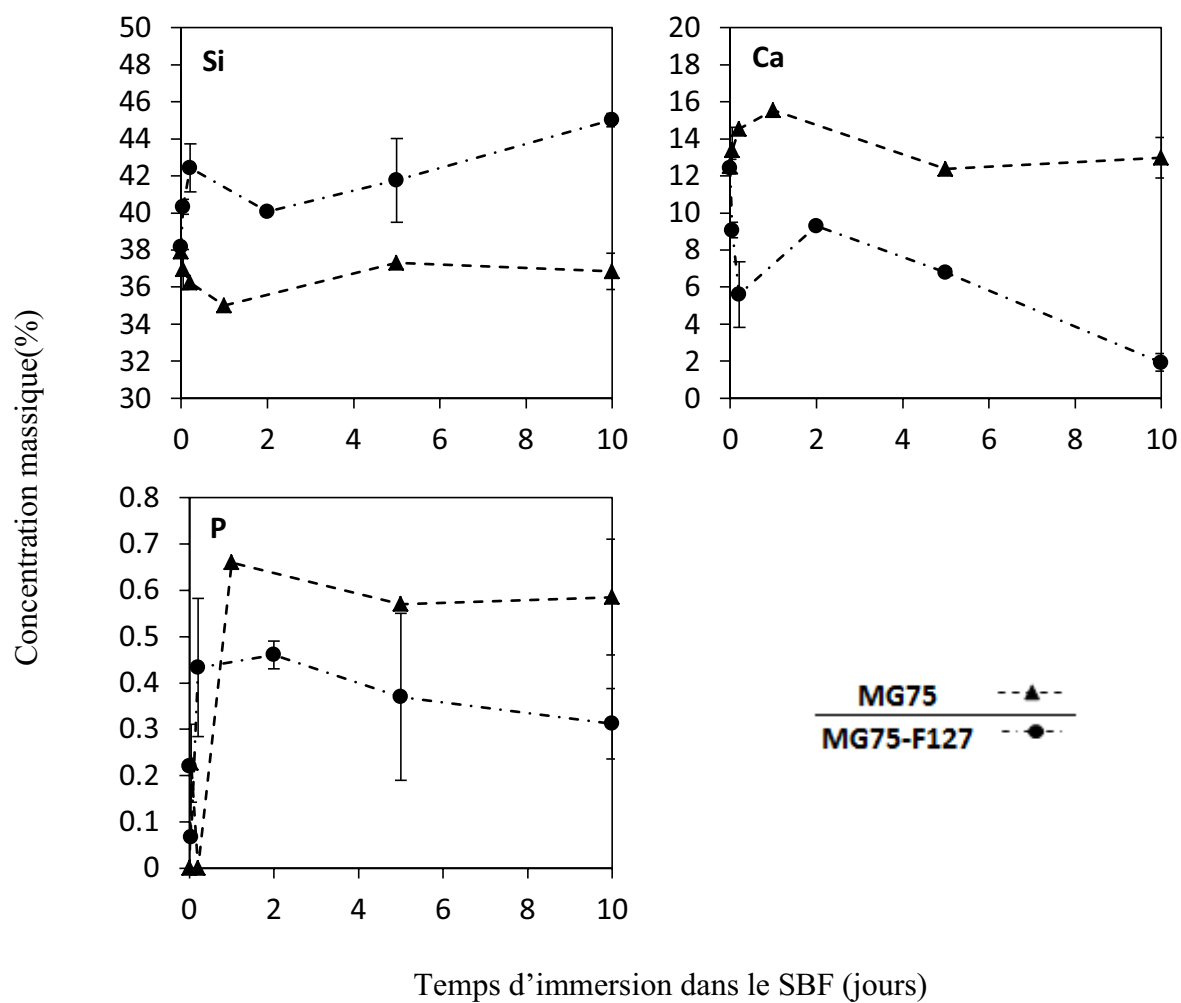


Figure 5-22 : Evolution de la composition de l'intérieur des murs des mousses MG75 et MG75-F127

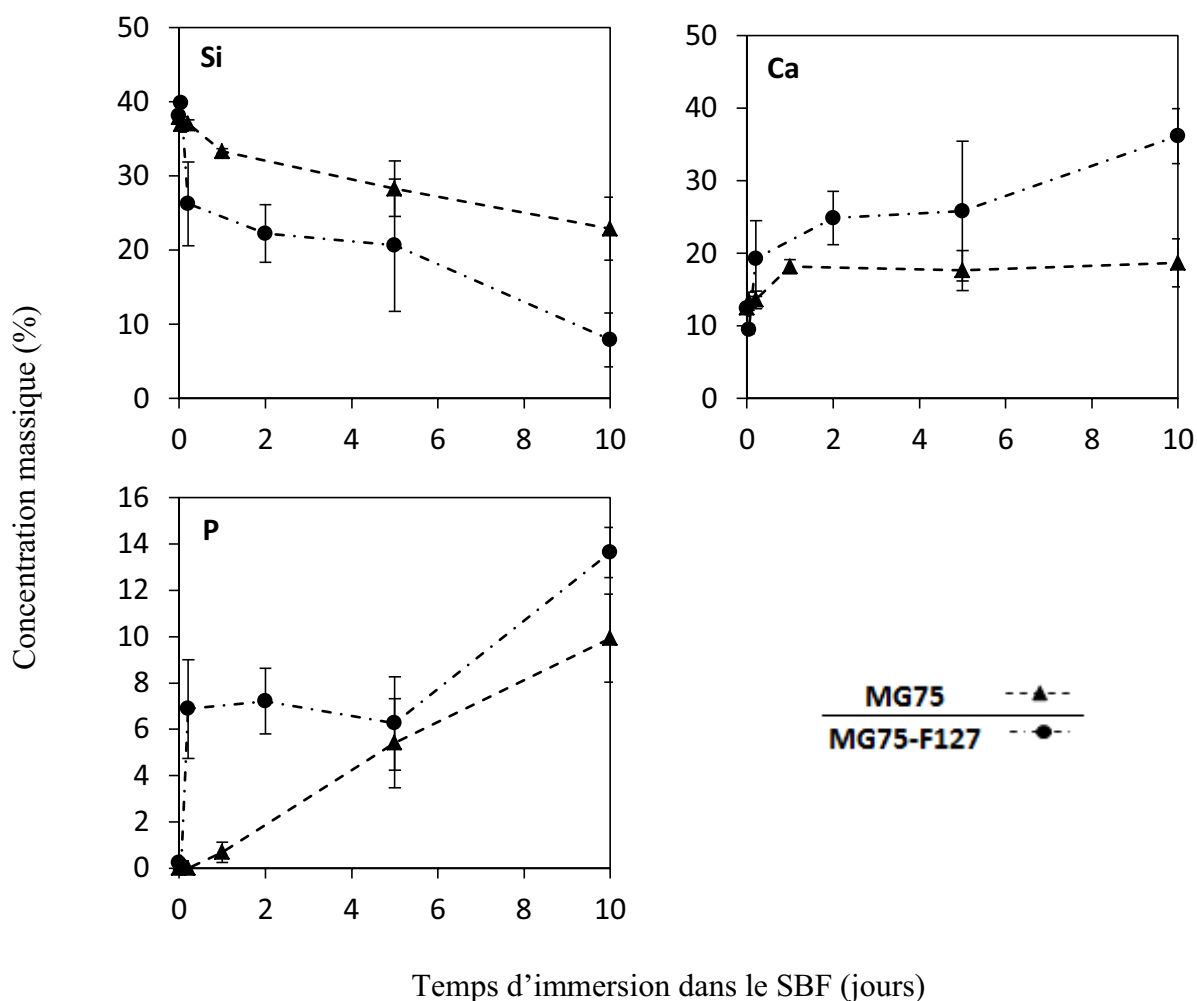


Figure 5-23 : Evolution de la composition de la périphérie des murs des mousses MG75 et MG75-F127

5.4. Conclusion

L'organisation des mésopores des mousses de verre bioactif par le procédé EISA n'a pas pu être réalisée avec succès pour les mousses synthétisées avec du HF. Il est vraisemblable que l'acide fluorhydrique, nécessaire à la gélification du TEOS et au maintien de l'architecture macroporeuse, fige le réseau de silice avant que l'évaporation du solvant ne commence et que le tensioactif puisse s'organiser en micelles. L'utilisation du F127 permet toutefois d'augmenter de manière importante la surface spécifique du verre et des essais *in vitro* ont montré la grande bioactivité de la mousse ainsi obtenue confirmant la possibilité de contrôler la réactivité des mousses.

Malgré cela, il semble que la grande surface spécifique vienne en partie de l'existence d'une porosité supplémentaire (de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres) résultant

d'un fractionnement des murs de la mousse. Par conséquent, le risque de dégradation des propriétés mécaniques est important.

Dans le nouveau procédé proposé sans HF, la gélification du verre n'est pas encore réalisée à la fin du moussage, puisque c'est la gélatine qui se solidifie et sert de support à la formation d'un réseau de verre macroporeux. Le procédé EISA peut donc s'opérer permettant ainsi de réaliser une structuration des mésopores qui a été confirmée par microscopie électronique à transmission.

La surface spécifique du matériau obtenu est, de manière surprenante, assez faible ($49 \text{ m}^2/\text{g}$) pour un verre mésostructuré ce qui conduit à penser que la calcination de la gélatine et du F127 laisse des résidus organiques. En effet, ces résidus se déposeraient en surface du matériau et pourraient obstruer les pores et ainsi les rendre inaccessibles à la mesure par adsorption d'azote. Avec une surface accessible de $49 \text{ m}^2/\text{g}$, la mousse MG75-F127 présente une réactivité bien plus prometteuse pour une application en ingénierie tissulaire que MG75. Toutefois, au vue de la structure organisée de MG75-F127, il semble que la surface réelle soit plus importante. Une amélioration de l'élimination des phases organiques devrait donc permettre, en conservant la même synthèse, d'obtenir des matériaux à la réactivité encore améliorée. Pour cela un lavage à l'aide d'un solvant ou une optimisation du traitement thermique sont des solutions envisageables. Il serait même peut-être possible d'avoir une réactivité suffisante pour la mousse MG75, qui présente une macroporosité plus intéressante et une surface sans fracturations.

Chapitre 6 Premiers essais *in vivo* d'une mousse de verre bioactif

6.1. Etude histologique

Après avoir déterminé que la mousse M75-B semblait plus apte à permettre l'invasion cellulaire que la mousse M75-A (4.1, Page 85), cette mousse a été taillée pour réaliser des cylindres implantables dans des mandibules de mouton. Des implantations ont été réalisées en collaboration avec le Laboratoire de Physiopathologie Orale et Moléculaire de l'Université Paris Diderot et L'Université Saint Joseph de Beyrouth. Des mousses de verre ont été taillées en cylindres pour combler un défaut osseux de dimensions $10 \times 5 \times 4 \text{ mm}^3$ réalisé dans une mandibule de mouton. Le sacrifice a été réalisé après 6 semaines. Après récupération, les échantillons sont fixés dans un tampon neutre de formaldéhyde à 10% puis sont enrobés dans une résine après déshydratation à l'éthanol. Des coupes sont réalisées et polies jusqu'à une épaisseur d'environ $60 \text{ }\mu\text{m}$ et colorées au Giemsa-Paragon pour des observations histologiques en microscopie optique. Les coupes observées sont ensuite repolies pour éliminer la coloration afin de pouvoir les analyser par PIXE sans que les éléments de la coloration interfèrent avec les mesures.

Les coupes histologiques (Figure 6-1) obtenues après implantation de la mousse M75-B pendant 6 semaines montrent des grains noirs, qui sont les vestiges de la mousse de verre, et le tissu osseux apparaît coloré en rose. Du tissu osseux est visible au centre de l'implant ce qui témoigne d'une bonne invasion de la mousse par les cellules osseuses.

La Figure 6-2, qui est un agrandissement de la zone encadrée dans la Figure 6-1, montre deux teintes différentes de rose, la partie rose pâle correspond à de l'os ancien qui va jusqu'aux pointillés jaunes, cette ligne délimite la partie de l'os qui a été enlevée afin de créer le défaut osseux pour l'implantation. Ce défaut a été comblé avec la mousse M75-B, de l'os récemment formé s'y est développé et est visible en rose vif à droite de la ligne en pointillés jaunes.

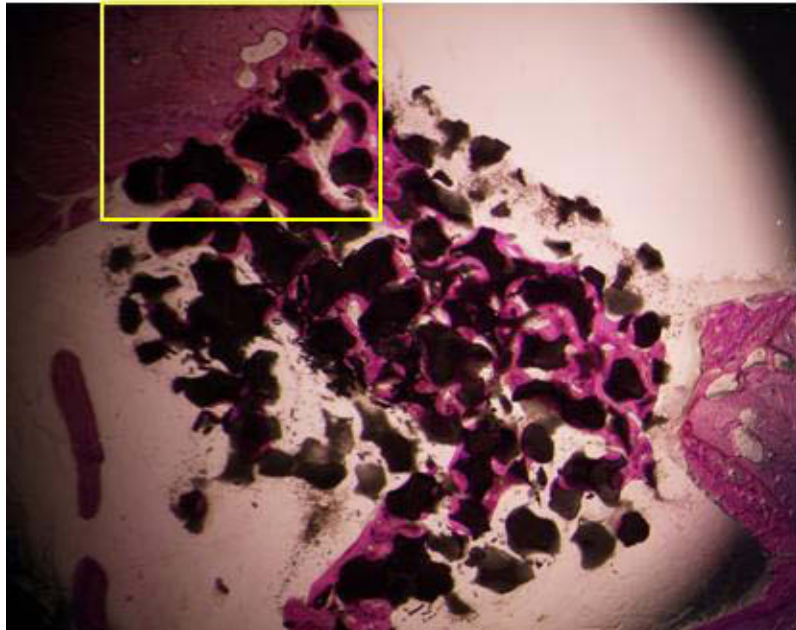


Figure 6-1 : Cliché obtenu par microscopie optique sur une coupe histologique après 6 semaines d'implantation de la mousse M75-B dans une mandibule de mouton (grossissement $\times 4$)

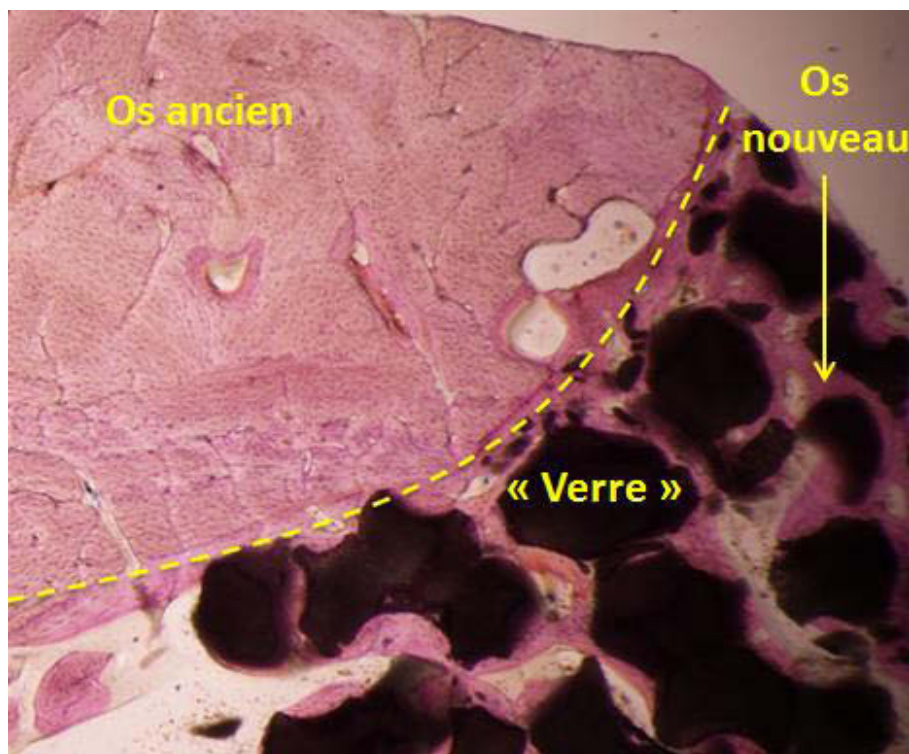


Figure 6-2 : Cliché obtenu par microscopie optique sur une coupe histologique après 6 semaines d'implantation de la mousse M75-B dans une mandibule de mouton (grossissement $\times 10$)

6.2. Cartographies élémentaires et images en électrons rétrodiffusés

La Figure 6-3 montre les détails de la texture de la mousse après 6 semaines d'implantation, une porosité importante est observée, elle est probablement le résultat des étapes de dissolution du verre et de la précipitation d'une phase minérale. Les cartographies chimiques réalisées par l'analyse PIXE sur les coupes histologiques ne permettent pas de distinguer de zone contenant du silicium, pouvant être identifiées comme du verre. Cependant, des formes régulières contenant du calcium et du phosphore se retrouvent sur ces cartographies, c'est-à-dire des zones sont plus riches en ces deux éléments que le reste de l'échantillon (Figure 6-4). Ces zones ont une géométrie très proche des zones noires observées sur les coupes histologiques et des zones blanches poreuses en électrons rétrodiffusés, il s'agit donc de ce qui était à l'origine la mousse M75-B. La matrice riche en phosphore et en calcium qui entoure ces zones correspondrait donc à de l'os. L'image obtenue par électrons rétrodiffusés sur la même zone fait apparaître les vestiges de mousse plus clairs que l'os environnant ce qui confirme une quantité plus importante d'éléments « lourds » (Ca et P) qui les composent et une densité plus élevée comparé à l'os. L'os contient lui aussi une quantité importante de phosphore et de calcium, mais il contient aussi, pour une part non négligeable, une phase organique (collagène) qui se compose d'éléments légers. Ainsi, les observations de ces différentes cartographies montrent que les vestiges de mousse contiennent plus de phase minérale que l'os. Le verre s'est transformé en une phase minérale mais il n'est pas encore transformé en véritable tissu osseux.

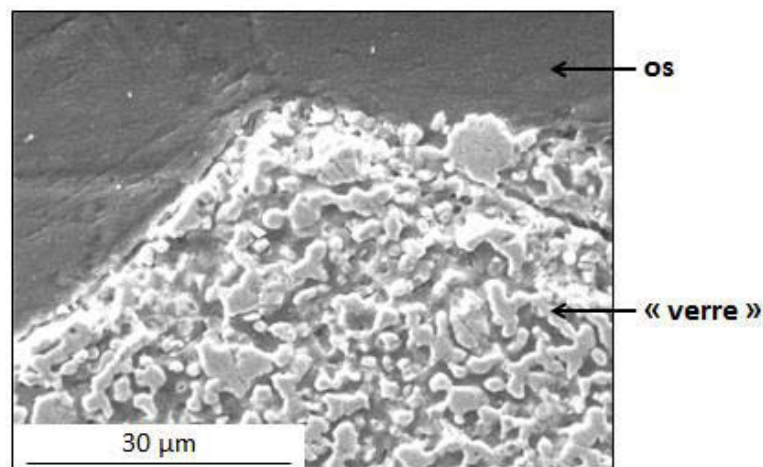


Figure 6-3 : Cliché MEB de la mousse M75-B après implantation 6 semaines dans une mandibule de mouton

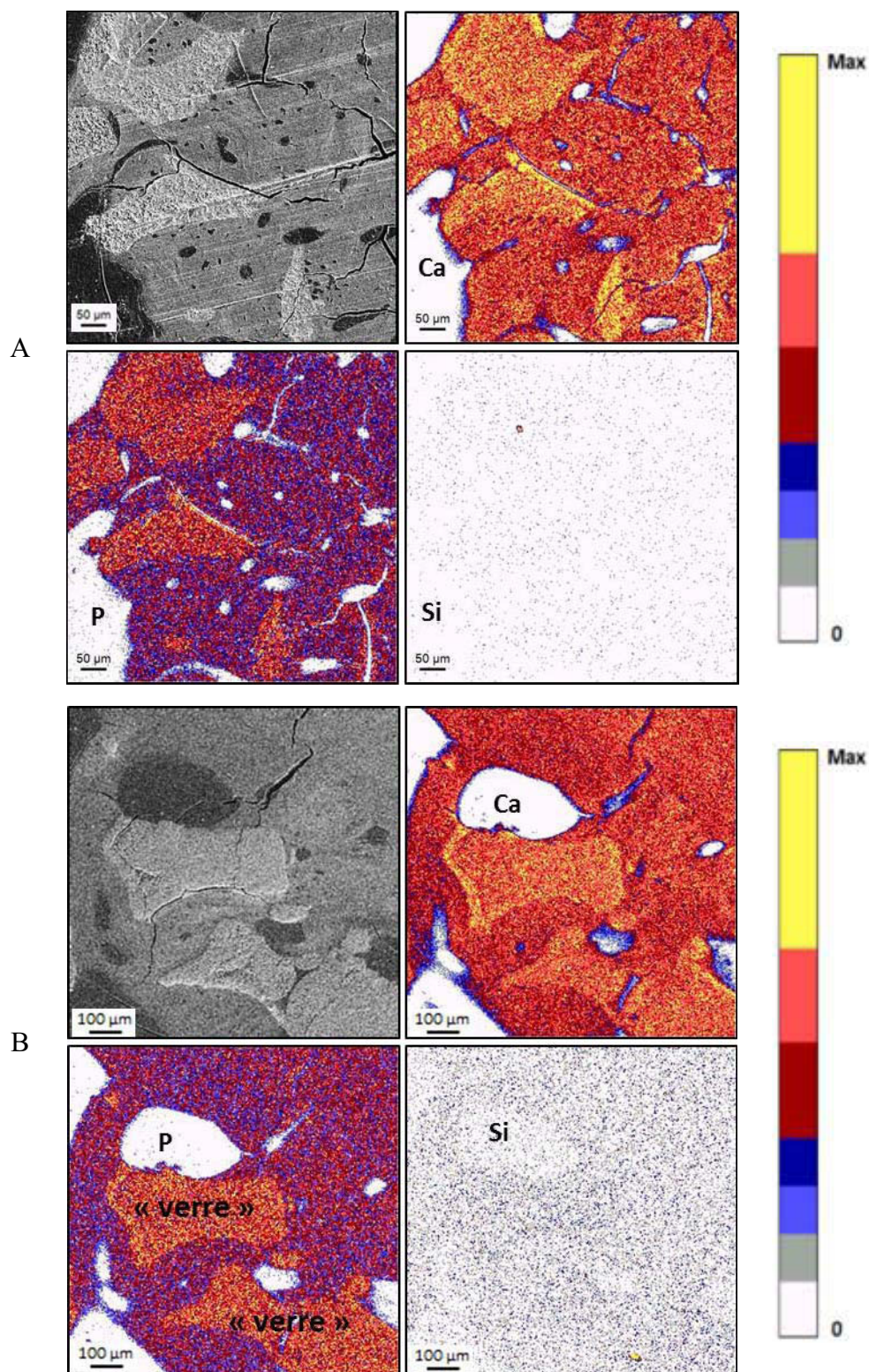


Figure 6-4: Cartographies élémentaires et cartographie par électrons rétrodiffusés de deux coupes histologiques (A et B) de la mousse M75-B implantée *in vivo*

6.3. Mesures locales de concentrations

Des mesures locales de concentration sont réalisées sur les deux zones d'intérêt présentées dans la partie précédente, à savoir les vestiges de la mousse de verre M75-B (notés « verre ») et l'os environnant, c'est-à-dire l'os qui a poussé au contact du verre bioactif dans le défaut créé avant implantation du matériau (os nouveau). De plus, d'autres cartographies ont été réalisées sur une troisième zone d'intérêt, plus éloignée du défaut, celle de l'os mature (os ancien).

Les résultats des mesures locales de concentrations en éléments majeurs et mineurs (Figure 6-5) montrent que le « verre » et l'os nouveau contiennent moins de calcium et plus de phosphore que l'os ancien. Il n'est donc pas surprenant que ces deux zones présentent des rapports molaires Ca/P plus faibles que celui de l'os ancien. Le rapport Ca/P de l'os nouveau est de $1,64 \pm 0,10$, très proche de celui de l'apatite, alors que celui de l'os ancien est plus élevé à $1,82 \pm 0,01$. Le rapport est relativement faible pour le verre, $1,48 \pm 0,05$. Ces différences ne sont pas inquiétantes dans la mesure où le rapport Ca/P varie en fonction du site, du sexe et de l'âge. En effet, Zaichick et Tzaphlidou¹⁶⁶ ont réalisé des mesures au niveau de l'os cortical du col du fémur sur des patients d'âge et de sexe différents, ils obtiennent ainsi une variation non significative du rapport Ca/P entre 1,55 et 1,96. De plus, les valeurs mesurées sur les coupes histologiques sont plutôt cohérentes avec la transformation de scaffolds de verres bioactifs (45S5 et 13-93) en apatite observée par Bi *et al.* lors de l'implantation dans des calvarias de rat. Ils obtiennent un rapport Ca/P inférieur à 1,67 pour l'os néoformé (de 1,5 à 1,55) et pour le « verre » (de 1,36 à 1,6)¹⁶⁷.

Les concentrations en magnésium montrent une différence significative entre l'os, qu'il soit ancien ou nouveau, et les vestiges du verre d'origine, l'os incorpore plus de magnésium que le verre.

En regardant les concentrations en éléments traces (Figure 6-6), l'hypothèse faite précédemment d'une quantité de phase minérale plus importante dans le « verre » que dans l'os se voit confirmée par la très faible teneur en soufre dans le « verre ». A l'inverse, les concentrations en soufre dans l'os sont plus importantes puisqu'il contient une phase organique. Le soufre provient par exemple des ponts disulfures présents entre les chaînes de collagène. D'autres différences intéressantes apparaissent clairement au niveau des concentrations en éléments traces puisque l'os, ancien ou nouveau, incorpore du zinc en quantités comparables alors que le « verre » en incorpore environ deux fois moins. De plus, le

« verre » contient des traces plus importantes de silicium, reste de la composition de départ de la mousse M75-B. Les mesures montrent que le silicium a été efficacement éliminé du site d'implantation, seules quelques traces subsistent, qui peuvent avoir un effet ostéoinducteur. Il a en effet été montré par Xynos *et al.*¹⁶⁸ que les produits de dégradation des verres bioactifs, dont le silicium, stimulaient la prolifération des cellules osseuses. Enfin, le « verre » et l'os nouveau incorporent des quantités comparables de strontium alors que l'os ancien en a incorporé environ deux fois plus.

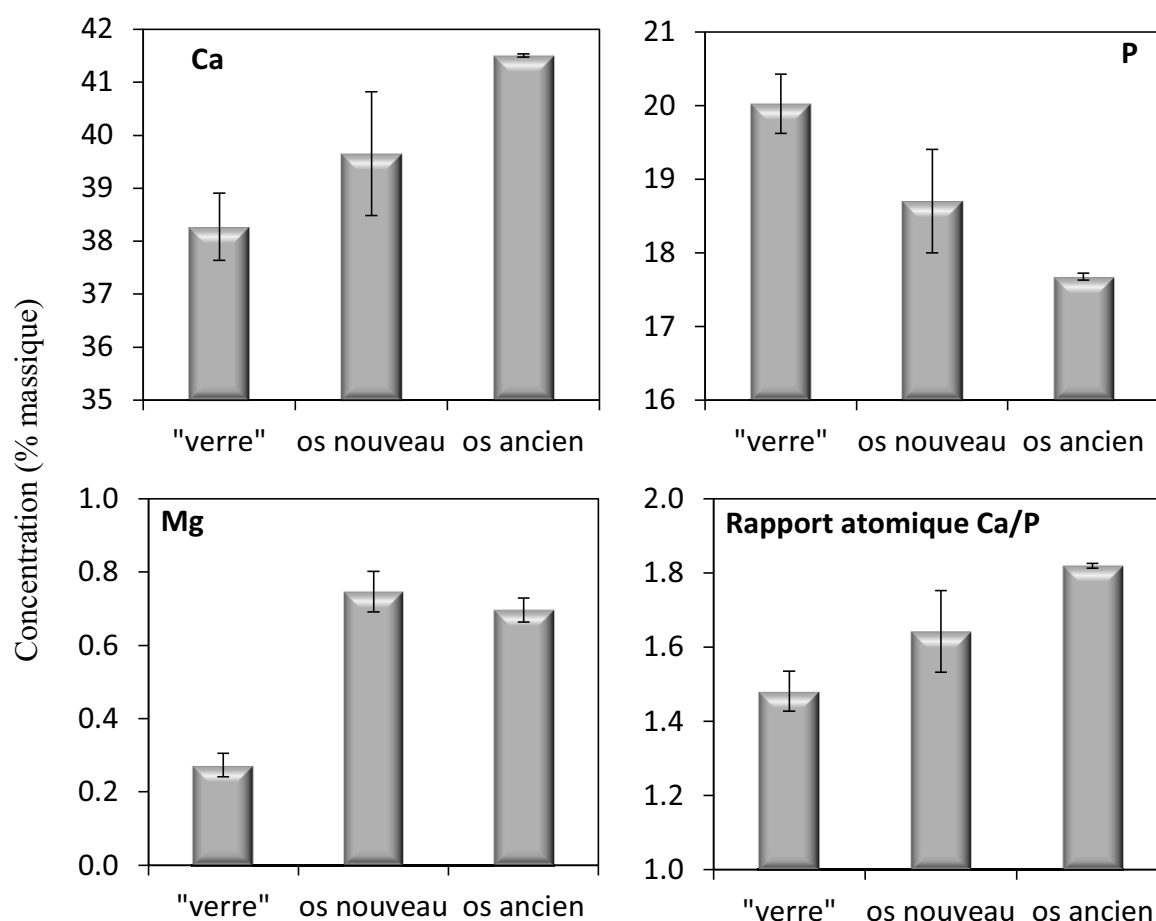


Figure 6-5 : Mesures locales de concentration en éléments majeurs et mineurs et rapports atomiques Ca/P dans les différentes zones d'intérêt sur les coupes histologiques

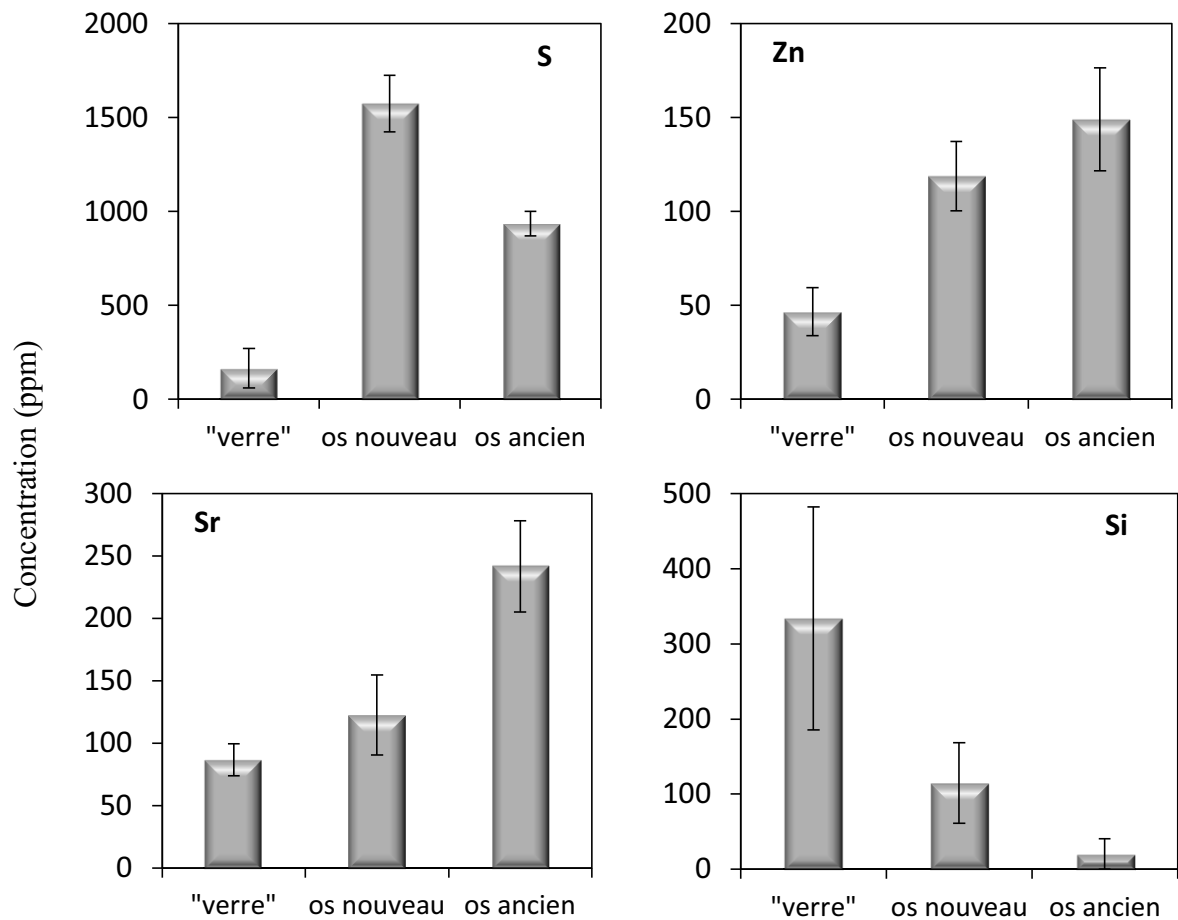


Figure 6-6 : Mesures locales de concentration en éléments traces dans les différentes zones d'intérêt sur les coupes histologiques

6.4.Profil de concentration à l'interface os- « verre »

Les profils de concentration en calcium et en phosphore à l'interface os-mousse M75-B (Figure 6-7) ne semblent pas montrer de différence majeure entre le matériau minéral qui était la mousse de verre à l'origine et l'os qui l'entoure. Cette observation confirme la transformation très avancée du matériau qui est difficilement discernable de l'os environnant du point de vue du calcium et du phosphore. La très bonne intégration du matériau au tissu osseux implique l'absence d'une frontière nette entre les deux zones.

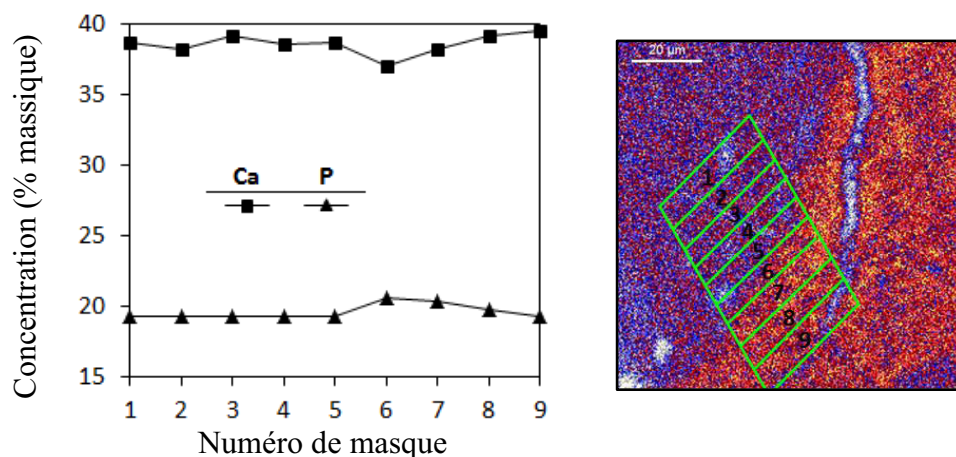


Figure 6-7 : Profil de concentration à l'interface os-mousse de verre bioactif après implantation *in vivo* (Les masques ont une dimension de 35 μm $\times$ 7 μm)

6.5. Conclusion

La mousse M75-B a donc montré sa biocompatibilité et une ultra-macroporosité suffisante pour permettre l'invasion cellulaire jusqu'au cœur du matériau et donc jusqu'au cœur du défaut. Après 6 semaines d'implantation le processus de bioactivité a transformé le verre en phosphate de calcium qu'il est chimiquement difficile de distinguer de l'os. La nature purement minérale du matériau obtenu permet de le distinguer de l'os (qui contient une phase organique et des cellules) par coloration des coupes histologiques ou par imagerie en électrons rétrodiffusés. Toutefois, si les compositions chimiques en éléments majeurs sont très proches, la grande sensibilité de la méthode PIXE a permis de mettre en évidence des différences au niveau des éléments mineurs et même des éléments traces. Ces résultats ont pu être comparés à la composition de l'os mature et ont mis en évidence des différences significatives avec l'os néoformé. L'absence de limite nette entre le matériau et l'os a été confirmée par la réalisation d'un profil de concentration en éléments majeurs. La réalisation d'un profil de concentration en éléments traces ne donnerait pas de résultats précis en raison de la trop faible taille des masques.

Ces résultats montrent donc que la mousse M75-B semble très bien s'intégrer à l'environnement vivant et se transforme pour atteindre une composition proche de celle du minéral osseux, témoignant de sa bioactivité. Ce matériau apparaît donc très prometteur pour des applications en implantation directe, mais aussi en ingénierie tissulaire puisqu'il permet l'invasion cellulaire.

Partie C Ajout d'un élément thérapeutique : le strontium

Chapitre 7 Verres au strontium : relation cinétique de réactivité - structure

7.1.Poudres de verre au strontium

7.1.1. Elaboration et caractérisations

Il a été exposé précédemment que l'ajout de strontium dans les verres bioactifs présentait un intérêt certain en raison de son effet bénéfique sur la croissance osseuse (1.3.3.2.2, Page 32). Son incorporation dans des mousses de verre bioactif permettra son relargage local et devrait avoir un effet bénéfique sur la régénération osseuse. Cependant, les différentes sources bibliographiques, qui correspondent à des matériaux ou des voies de synthèses différents, se contredisent sur l'influence du strontium sur les propriétés physico-chimiques du verre. Il est donc primordial de comprendre spécifiquement les effets de l'ajout de strontium sur les verres étudiés au cours de ce travail. Afin d'étudier l'influence de l'ajout de strontium dans les verres bioactifs, différents échantillons contenant des quantités croissantes d'oxyde de strontium, partiellement substitué à l'oxyde de calcium des verres binaires de même composition que ceux étudiés au cours de la Partie A, ont été synthétisés sous forme de poudre. Des poudres de verre au strontium ont été élaborées avec 2,5, 5, 10 et 20 % massique d'oxyde de strontium. Afin de réaliser ces verres 13,48 mL d'eau et 13,48 mL d'éthanol sont mélangés à 2,25 mL d'HCl à 2N puis 13,94 mL de TEOS sont ajoutés. Après 30 minutes d'agitation, les quantités de nitrate de calcium et de strontium indiquées dans le Tableau 7-1 sont ajoutées. Le sol est agité pendant 1 heure, mis à l'étuve à 60°C dans des conteneurs en téflon pendant 24 heures puis mis à l'air à 125°C durant 24 heures. Les poudres ainsi obtenues sont ensuite calcinées pendant 24 heures à 700°C (chauffage de 25 à 700°C effectué en 2 heures).

Les compositions réelles mesurées par ICP-AES sont données dans le Tableau 7-2. L'une des raisons avancées dans la littérature par O'Donnell et Hill⁴³ pour expliquer la différence de réactivité observée par Lao *et al.*⁴¹ entre les poudres 75 et 75Sr5 est la différence de connectivité de réseau (C.R.). Une connectivité plus importante implique une polymérisation

plus importante du réseau et induit une diminution de la vitesse de dissolution. Ce paramètre, purement théorique, a donc été calculé à partir des compositions des verres afin d'étudier son effet, il peut être exprimé par la formule suivante :

$$C.R. = 2 + \frac{\text{nombre de BO} - \text{nombre de NBO}}{\text{nombre d'oxydes formateurs}} = 2 + \frac{2[\text{SiO}_2] - 2[\text{CaO}] - 2[\text{SrO}]}{[\text{SiO}_2]} \quad (7-1)$$

Où : BO représente les oxygènes pontants (Bridging Oxygens)

NBO représente les oxygènes non pontants (Non Bridging Oxygens)

Les études expérimentales montrent que les verres possédant une connectivité de réseau supérieure à 2,6 sont très peu ou pas bioactifs en raison de leur résistance à la dissolution. Il faut noter cependant que pour les verres sol-gel, la connectivité réelle ne peut être correctement calculée au moyen de l'équation 7-1 qui se base sur la composition nominale en oxydes. En effet, la connectivité dans les verres sol-gel est plus basse qu'attendue en raison de la présence de nombreux groupements silanols (SiOH) résiduels provenant de la température de calcination plus basse que celle utilisée lors de l'élaboration d'un verre par fusion. Les ions H^+ des groupements silanols génèrent des oxygènes non pontants ce qui diminue d'autant la connectivité de réseau et la résistance à la dissolution dans les verres sol-gel, ce qui est favorable à la bioactivité. C'est pour cette raison que O'Donnell et Hill proposent de retrancher 1 à la valeur de connectivité des verres sol-gel. Toutefois, dans le cadre de ce travail, le calcul de ces valeurs étant réalisé pour la comparaison de verres sol-gel entre eux, les valeurs calculées par l'équation 7-1 ne seront pas corrigées. La connectivité de réseau augmente lorsque la quantité d'oxyde de strontium croît dans le verre (Tableau 7-2). Cela provient du fait que la substitution du calcium par du strontium étant réalisée en pourcentage massique, et les masses molaires de SrO et CaO étant différentes, cela revient à augmenter la proportion molaire de SiO_2 et ainsi à augmenter la connectivité du réseau. Afin de vérifier si cette augmentation a un effet significatif sur la réactivité, un échantillon de composition 71,5% SiO_2 - 18,5% CaO – 10% SrO a été élaboré. Sa connectivité (3,27) est proche de celle du verre ne contenant pas de strontium (3,22). Le même protocole de synthèse que pour les autres poudres a été employé en utilisant 12,85 mL d'eau et d'éthanol, 2,14 mL d'HCl, 13,29 mL de TEOS, 3,8951 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et 1,0212 g de $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$.

Tableau 7-1 : Quantités de nitrates impliquées dans la synthèse des poudres de verres binaire et au strontium

Echantillons	Ca(NO₃)₂.4H₂O (g)	Sr(NO₃)₂ (g)
75	5,2637	0
75Sr2,5	4,7373	0,2553
75Sr5	4,2109	0,5106
75Sr10	3,1582	1,0212
75Sr20	1,0527	2,0424

Tableau 7-2 : Compositions et connectivités de réseau des poudres de verres binaire et au strontium (% massique)

	75	75Sr2,5	75Sr5	75Sr10	75Sr20	71,5Sr10
% SiO₂	73,4 ± 0,7	73,6 ± 0,7	74,2 ± 0,7	74,9 ± 0,7	75,2 ± 0,7	71,4 ± 0,7
% CaO	26,6 ± 0,3	23,8 ± 0,3	21,0 ± 0,2	16,0 ± 0,2	5,3 ± 0,5	19,4 ± 0,2
% SrO	-	2,50 ± 0,03	4,80 ± 0,05	9,1 ± 0,9	19,5 ± 0,2	9,20 ± 0,09
C.R.	3,22	3,27	3,32	3,40	3,55	3,27

7.1.2. Caractérisation des verres au strontium

7.1.2.1. Propriétés texturales

L'évolution de la surface spécifique mesurée pour les différents verres au strontium (Figure 7-1) montre que l'ajout d'oxyde de strontium dans le verre induit une diminution de la surface spécifique qui n'est pas très significative jusqu'à 5 % de dopage mais qui devient très marquée à partir de 10 % de SrO.

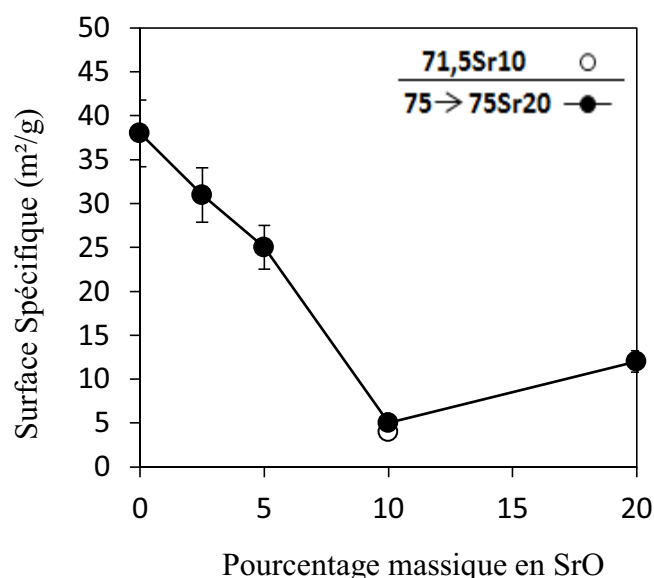


Figure 7-1 : Evolution de la surface spécifique des poudres de verre en fonction du pourcentage massique en SrO

7.1.2.2. Propriétés cristallographiques

Les propriétés cristallographiques des différents verres ont été étudiées par diffraction des rayons X. Les diffractogrammes de rayons X des poudres 75 et 75Sr5 (Figure 7-2) sont cohérents avec la nature vitreuse des matériaux étudiés qui présentent toutefois des pics de cristallisation de faible intensité pouvant correspondre à Ca_2SiO_4 (fiche JCPDS 33-0302¹⁶⁹). En revanche, le diffractogramme de la poudre 75Sr20 montre de nombreux pics dus à une cristallisation partielle du verre. Les phases formées semblent correspondre à des silicates de strontium : Sr_2SiO_4 (fiche JCPDS 39-1256¹⁷⁰) et SrSiO_3 (fiche JCPDS 34-0099¹⁷¹). Il semble donc que l'ajout de strontium dans les verres favorise leur cristallisation. L'observation d'une diminution de la surface spécifique n'est, dans ce cas, pas surprenante puisque les matériaux cristallisés possèdent généralement des surfaces spécifiques plus faibles que les matériaux amorphes.

Il est intéressant de relier ces observations aux résultats de l'étude par Résonance Magnétique Nucléaire du strontium 87 de Bonhomme *et al.*¹⁷² qui a été, en partie, réalisée sur la poudre de verre 75Sr10 de ce travail de thèse par le biais d'une collaboration avec le Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris. Les propriétés de l'environnement local du strontium et du calcium dans le verre 75Sr10 (Tableau 7-3) montrent des différences significatives notamment dans le nombre de coordination moyen. De plus, le strontium dans le verre 75Sr10 (74,9% SiO_2 - 16% CaO - 9,1% SrO) possède un environnement chimique

différent de celui du strontium dans un verre de composition 90,7% SiO_2 - 9,3% SrO (en pourcentage massique), tels que l'ont montré des calculs en dynamique moléculaire ; le degré de polymérisation du réseau de silicate, mais surtout le nombre de coordination moyen du strontium, sont très différents. Cela implique que le strontium peut avoir une grande variété d'environnements locaux différents. Le rôle du strontium dans le réseau de verre est donc différent de celui du calcium ce qui est cohérent avec l'observation de propriétés différentes pour les verres au strontium par rapport au verre 75.

De plus, cette étude montre que dans les verres bioactifs, le strontium a tendance à engendrer la formation de nanodomaines de silicate de strontium. Les quantités de SrO les plus importantes, 10 et 20%, permettent d'ailleurs d'identifier ces domaines en diffraction des rayons X. Le verre binaire 75 n'engendre quasiment pas de cristallisation à la température de calcination utilisée (700°C). Il semble donc que l'ajout de strontium dans le verre diminue la température de cristallisation du verre, témoignant une fois encore de propriétés différentes entre le strontium et le calcium.

Des pics ont déjà été observés par diffraction des rayons X pour des verres bioactifs au strontium obtenus par la voie sol-gel¹⁷³. Cette étude a montré la présence d'espèces cristallines dans le verre avant calcination. La Figure 7-3 montre un diffractogramme de rayons X de la poudre 75Sr20 avant calcination, les mêmes phases cristallines que celles observées par Taherkhani *et al.*¹⁷³ se retrouvent, à savoir du carbonate de strontium, un silicate de strontium ($\text{Sr}_2\text{Si}_2\text{O}_4$) et surtout des nitrates de strontium. Ces nitrates seront éliminés lors de la calcination. En revanche, même si les phases observées sont différentes de celles obtenues après calcination, il est intéressant de noter que même à basse température des silicates de strontium sont observés. Il semble donc que le strontium a bien tendance à favoriser l'organisation du réseau, même à basse température.

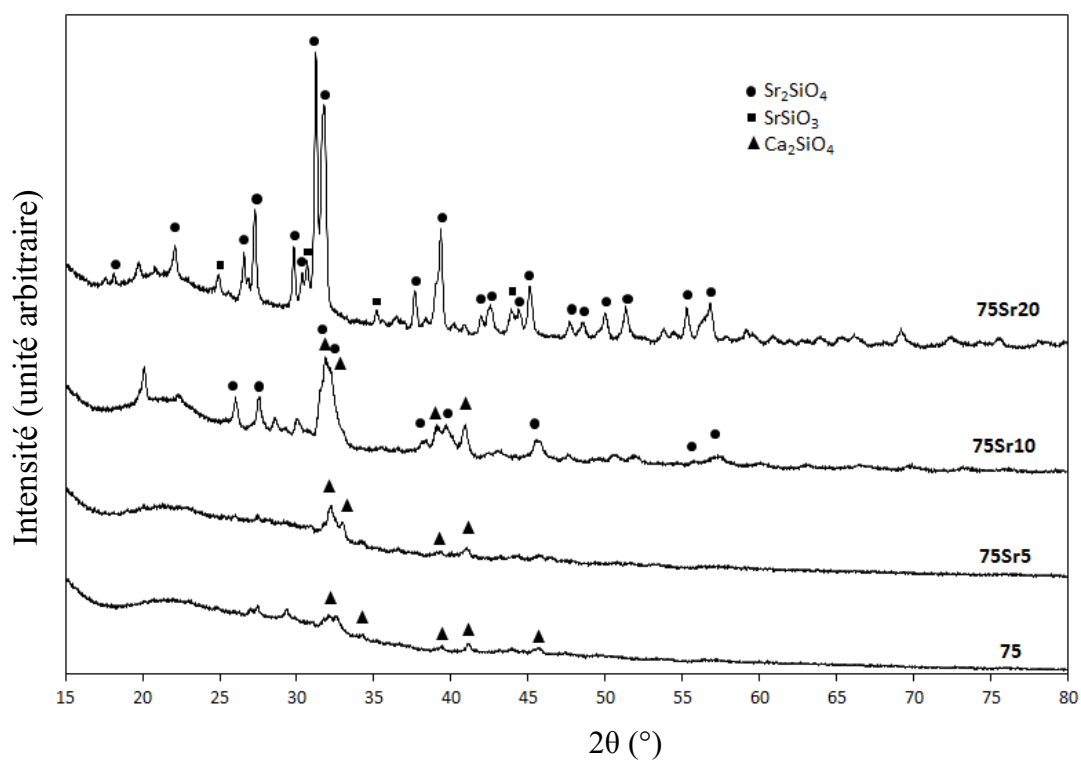


Figure 7-2 : Diffractogrammes de rayons X des poudres de verre 75, 75Sr5, 75Sr10 et 75Sr20 après calcination à 700°C

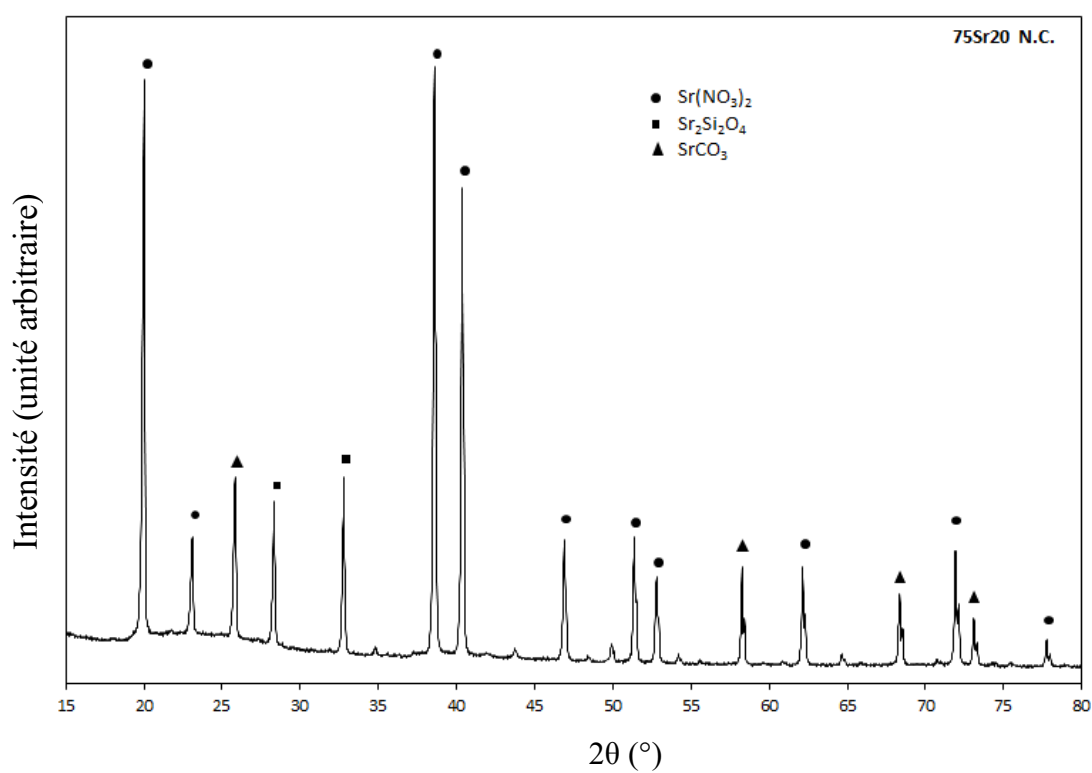


Figure 7-3 : Diffractogramme de rayons X de la poudre de verre 75Sr20 avant calcination

Tableau 7-3 : Environnements locaux du strontium et du calcium dans le verre 75Sr10, d'après¹⁷²

	Sr	Ca
Nombre de coordination (C.N.) moyen	6,4 ± 0,5	5,5 ± 0,1
Contribution au C.N. moyen :		
Des oxygènes pontants	33,6 %	31,5 %
Des oxygènes non-pontants	66,4 %	68,5 %

7.1.2.3. Etude des verres par spectroscopie infrarouge

Le spectre infrarouge (Figure 7-4) obtenu pour la poudre 75 montre les raies de vibration caractéristiques d'un réseau de verre à base de silice. Les bandes les plus intenses correspondent aux vibrations des liaisons Si-O-Si : balancement ($\sim 468 \text{ cm}^{-1}$), déformation ($\sim 800 \text{ cm}^{-1}$) et élongation ($\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$). Les verres contenant du strontium présentent les mêmes bandes de vibration puisqu'ils sont eux aussi majoritairement constitués par un réseau de SiO_2 . Cependant, des bandes à 840 et 935 cm^{-1} gagnent en intensité par rapport aux bandes de vibration de la liaison Si-O-Si et deviennent clairement visibles. Cela montre que l'ajout de strontium dans le verre semble favoriser l'apparition de certaines bandes de vibration, cela témoigne d'une évolution de la structure chimique lors de la substitution. L'existence d'un environnement différent pour le calcium et le strontium semble confirmée. Les bandes qui s'intensifient correspondent à la vibration des liaisons Si-NBO (Tableau 7-4) et Si-2NBO, c'est-à-dire les vibrations d'unités Si-O^- , la charge négative étant compensée par les espèces cationiques¹⁷⁴. En effet, le rapport d'intensités des bandes de vibration des liaisons Si-O-Si (symétrique) et Si-NBO montre une différence significative entre le verre binaire et les verres au strontium qui ne sont, par contre, pas très différents entre eux. Or les études RMN¹⁷² ont montré que le strontium avait une coordination plus importante et s'entourait de plus d'oxygènes que le calcium (nombre de coordination moyen de 6,4 pour le strontium et de 5,5 pour le calcium), il semble donc cohérent de voir apparaître plus de liaisons non pontantes Si-O⁻ en substituant une partie du calcium par du strontium.

Il est de plus intéressant de remarquer la présence de trois bandes de vibration des groupements hydroxyles clairement visibles à 3417 , 3479 et 3553 cm^{-1} . La présence d'une structure fine résolue dans la même zone du spectre a été observée par Yu *et al.*¹⁷⁵ sur le spectre infrarouge de la Jennite hydratée, un silicate de calcium de formule $(\text{Ca}_8(\text{Si}_6\text{O}_{18}\text{H}_2)(\text{OH})_8)\text{Ca} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Ces bandes résolues sont attribuées à la présence de

groupements OH sur des sites ordonnés bien définis qui induisent l'existence de distances bien définies pour les liaisons hydrogène des groupements Ca-OH et éventuellement Si-OH. L'observation de bandes résolues à 3417, 3479 et 3553 cm^{-1} est donc cohérente avec l'analyse par DRX et montre la présence de structures organisées de silicates de calcium et de strontium.

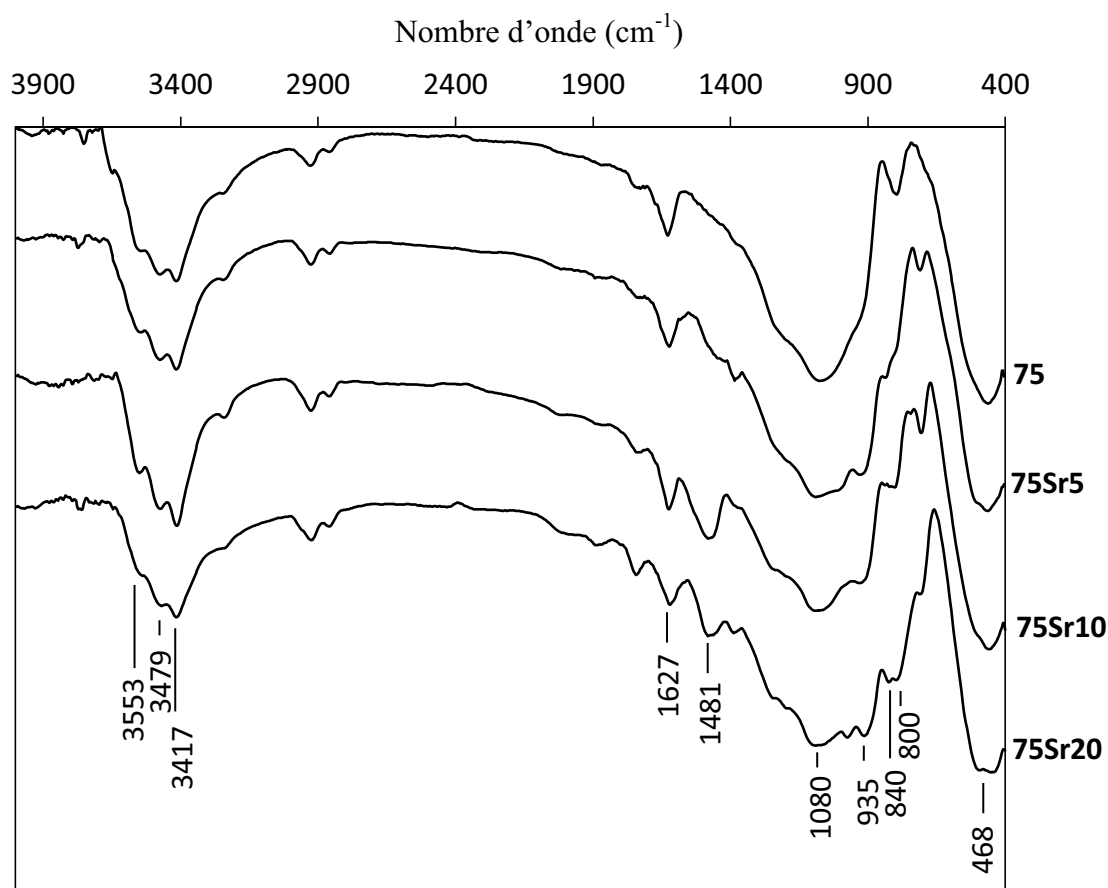


Figure 7-4 : Spectres infrarouge des poudres de verre 75, 75Sr5, 75Sr10 et 75Sr20 (les pics à 1481 et 1627 cm^{-1} correspondent à l'eau résiduelle et à la présence de groupements carbonates)

Tableau 7-4 : Rapport relatif des transmittances des groupements Si-O-Si (vibration asymétrique) et Si-NBO

	75	75Sr5	75Sr10	75Sr20
Si-O-Si (asymétrique) / Si-NBO	$2,0 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$

7.2. Comparaison des cinétiques de réactivité

7.2.1. Modèle d'évaluation des cinétiques

7.2.1.1. Choix des éléments étudiés

Il existe plusieurs façons de considérer la cinétique de réaction d'un verre bioactif dans le SBF puisque deux phénomènes ont lieu simultanément, la dissolution du réseau de verre et la formation d'une couche de phosphate de calcium. Il est donc possible de regarder soit la vitesse de dissolution des espèces (calcium et silicium) soit la vitesse de formation de la couche (précipitation du calcium et du phosphore). L'étude cinétique *via* la modélisation du relargage en calcium a déjà été réalisée¹⁷⁶ mais ne paraît pas forcément idéale puisque le calcium intervient à la fois dans les processus de dissolution et de précipitation. De plus, la comparaison des cinétiques de dissolution pour des verres dans lesquels une partie du calcium a été substituée par du strontium souhaitant être réalisée, une comparaison des vitesses de relargage du calcium risque d'être difficile du fait des différences importantes de concentration en calcium dans les verres. Les deux meilleurs choix pour comparer les verres sont donc l'étude du relargage de silicium qui n'est initialement pas présent dans le milieu et qui ne re-précipite pas, ainsi que l'étude de la précipitation de phosphates de calcium *via* le phosphore qui n'est initialement pas présent dans le verre. Les comparaisons des vitesses de dissolution du verre se feront donc *via* l'étude de la concentration en silicium dans le milieu, les comparaisons de vitesse de formation d'une couche phosphocalcique se feront donc *via* l'étude de la concentration en phosphore.

7.2.1.2. Modèle d'étude cinétique de dissolution

La modélisation de la vitesse de dissolution du réseau par l'étude du relargage de silicium a déjà été réalisée par Sepulveda *et al.*¹⁷⁷ en appliquant un modèle inspiré des travaux de Douglas et El-Shamy sur la dissolution des verres en solution¹⁷⁸. Ce modèle permet d'exprimer la variation de la concentration d'un élément libéré dans le milieu $[A]$ en fonction du temps d'immersion t :

$$\frac{d[A]}{dt} = kt^{-1/2} \quad (7-2)$$

L'intégration de cette équation et son application au cas du silicium donne :

$$[Si] = [Si]_0 + kt^{1/2} \quad (7-3)$$

En modélisant par une droite linéaire l'évolution de la concentration en silicium en fonction de $t^{1/2}$ il est alors possible de déterminer la constante cinétique k caractéristique de la vitesse de dissolution du réseau de silice.

Certaines limites existent cependant pour ce modèle qui n'est pas applicable sur l'ensemble des points de l'interaction. En effet, Sepulveda *et al.* ont montré que deux régimes existaient, associés chacun à une constante différente¹⁷⁷, l'une pour les premiers instants de réaction (avant 1 heure pour le 45S5 et 30 minutes pour le 58S) et l'autre pour la suite du processus de dissolution. Dans le cadre de cette étude, la modélisation a donc systématiquement été réalisée après au moins 30 minutes de réaction. De plus, aux délais les plus longs, un phénomène de saturation du silicium en solution est généralement observé (Figure 7-5), il provient probablement de la limitation du phénomène de dissolution par la couche phosphocalcique qui se forme en surface des verres par le processus de bioactivité. Le modèle de Sepulveda ne prend pas en compte ce phénomène et n'est donc pas applicable aux temps longs sous peine d'inconsistance (exemple du fit 1 sur la Figure 7-5). En revanche, ce modèle appliqué avant le palier (fit 2 sur la Figure 7-5) fonctionne très bien pour déterminer la cinétique de dissolution du réseau de silice avant que le phénomène de saturation ne se produise.

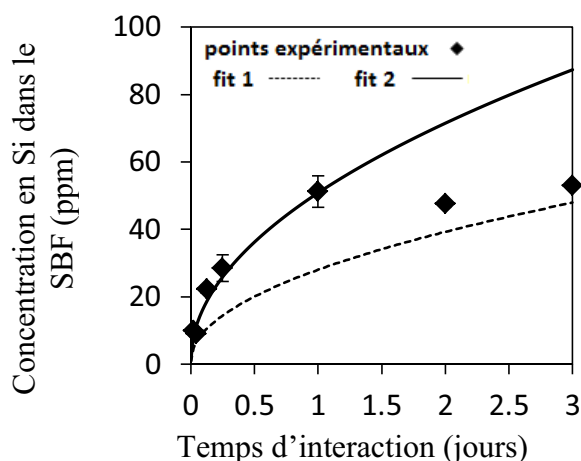


Figure 7-5 : Evolution expérimentale mesurée par ICP-AES et modélisation de la concentration en silicium relargué dans le SBF pour un verre de composition 75% SiO₂ - 25% CaO (pourcentages massiques) immergé dans du SBF. Le fit 1 est réalisé d'après le modèle de Sepulveda sur l'ensemble des points expérimentaux, ce qui n'est pas satisfaisant. Le fit 2 se limite aux points avant saturation de la concentration en silicium et est pleinement valide dans l'intervalle ainsi restreint

7.2.1.3. Evolution de la concentration en phosphore

L'étude a été réalisée sur des poudres de différents verres bioactifs immergés dans du SBF pour des délais de :

- 30 minutes, 1 et 5 heures, 1, 2, 3 et 5 jours pour 75Sr2,5, 75Sr20 et 71,5Sr10
- 30 minutes, 1 et 6 heures, 1, 2, 3 et 6 jours pour 75 et 75Sr5
- 30 minutes, 1 et 6 heures, 1, 2, 3 et 7 jours pour 75Sr10

Dans cette partie l'évolution de la concentration en phosphore est utilisée comme témoin de la formation de la couche phosphocalcique. La quantité de phosphore dans le SBF (Figure 7-6) semble diminuer plus rapidement pour le verre binaire que pour tous les verres qui contiennent du strontium. De manière très significative, le verre 71,5-Sr10, qui a une connectivité de réseau a priori équivalente au verre binaire 75 suivant le calcul d'O'Donnell et Hill, réagit beaucoup plus lentement que ce dernier. La connectivité de réseau pour les verres sol-gel au strontium ne peut pas être calculée suivant la formule proposée par O'Donnell et Hill, mais nécessite d'être déterminée expérimentalement, par exemple par RMN du silicium. L'ajout de strontium semble donc ralentir la vitesse de formation d'une couche d'apatite et ce phénomène est particulièrement marqué pour les plus forts taux de substitution du calcium par du strontium. Ce sont donc les verres partiellement cristallisés et ayant la plus faible surface spécifique qui induisent une précipitation de phosphate de calcium plus lente ce qui est cohérent puisqu'ils possèdent moins de sites de nucléation.

Il est intéressant de noter que la différence de vitesse de précipitation de la couche de phosphate de calcium est surtout marquée pour les verres contenant 10 et 20% de SrO puisque les verres contenant 2,5 et 5% de SrO conduisent à la consommation d'une grande partie du phosphore du SBF après 3 jours d'immersion, ce qui est comparable au verre binaire.

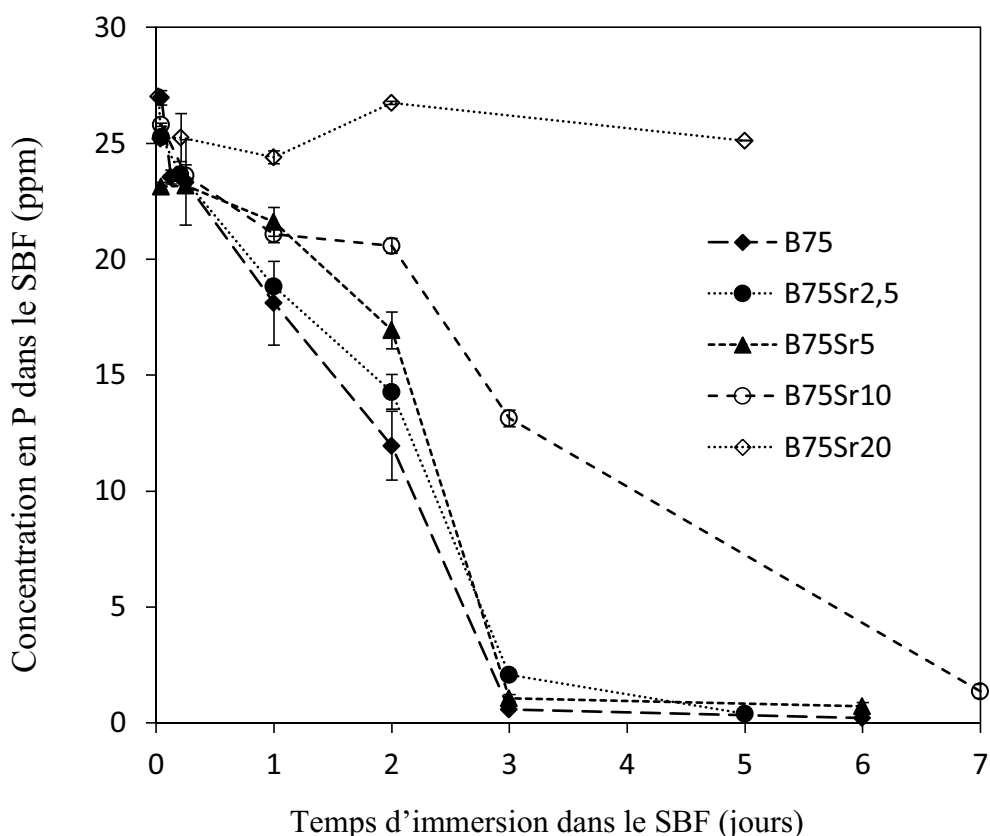


Figure 7-6 : Evolution de la concentration déterminée par ICP-AES en phosphore dans le SBF au cours de l'immersion des poudres de verre bioactif binaire et au strontium

7.2.1.4. Dissolution du réseau de silice

L'ajout de strontium dans les verres provoque une diminution de la cinétique de dissolution du réseau de SiO_2 (Figure 7-7). Le verre 71,5Sr10 ayant une vitesse de dissolution comparable à celle de 75Sr10 (25 ± 5 et $20 \pm 6 \text{ ppm.j}^{-1/2}$ respectivement) malgré des connectivités de réseau éloignées, ce paramètre ne permet pas à lui seul d'expliquer le ralentissement de la cinétique. En revanche, il a été montré précédemment que, contrairement à de nombreuses observations faites sur des verres fusion, le strontium ne s'insérerait pas forcément de manière identique au calcium dans le réseau d'un verre sol-gel, il génère un environnement chimique différent. Cependant, les observations faites par spectroscopie infrarouge d'un nombre de liaisons Si-NBO plus important pour les verres au strontium devrait induire une dissolution plus rapide du réseau¹⁷⁹ ce qui n'est pas le cas. La première explication qu'il est possible d'apporter est celle d'une limitation de la vitesse de dissolution par l'action de la couche phosphocalcique de surface. En effet, il a été montré¹⁸⁰ que la couche phosphocalcique qui se forme à la surface d'un verre bioactif contenant du strontium

était mieux cristallisée que la couche se formant à la surface d'un verre binaire limitant ainsi la vitesse de relargage du silicium. Cela provient de la présence de strontium dans cette couche qui entraîne une augmentation de sa résistance chimique.

De plus, le strontium semble favoriser l'organisation de domaines de silicate de strontium. Les cristaux de silicate de strontium, obtenus pour les teneurs importantes en strontium, sont observables par diffraction des rayons X.

Cette cristallisation pourrait être responsable de la diminution de la surface spécifique observée précédemment. La question qui demeure est de savoir si la diminution de la surface spécifique peut expliquer la diminution de la cinétique de dissolution. Cela ne semble pas forcément le cas puisque le verre 75Sr2,5 n'a pas une surface significativement différente de celle du verre 75 mais possède une cinétique de dissolution différente. En revanche, l'organisation en domaines de silicate de strontium pourrait expliquer la diminution de la cinétique de dissolution.

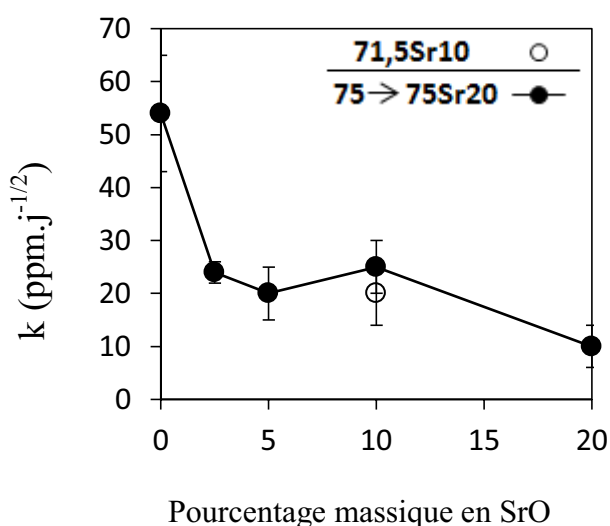


Figure 7-7 : Evolution de la constante cinétique de dissolution du réseau de silicium en fonction de la quantité de SrO dans les poudres de verre

7.3.Poudres de verre au strontium obtenues par voie sol-gel catalysée au HF

L'objectif de cette partie étant la réalisation d'une mousse de verre au strontium, l'acide fluorhydrique sera utilisé au cours de la synthèse. Le catalyseur jouant un rôle très important sur les propriétés du verre (1.4.2.3, Page 37), il est important de comprendre son influence sur la structure et la réactivité des verres au strontium. Afin de vérifier le rôle du HF sur la

synthèse de verres bioactifs au strontium, différentes poudres ont été réalisées selon le protocole de synthèse utilisé pour les poudres précédemment étudiées à la différence près que du HF (en quantité identique à celle utilisée pour la synthèse de mousses) a été ajouté avant gélification.

Les propriétés des poudres ainsi obtenues sont alors comparées (Tableau 7-5), l'utilisation du HF comme catalyseur diminue la taille des pores, comme le montrent les distributions de tailles de pores obtenues par la méthode BJH (Figure 7-8). Le HF a tendance à rendre la distribution plus étroite et à la décaler vers des plus faibles valeurs de tailles de pores. En effet, le catalyseur a une grande influence sur les propriétés finales du verre lors d'une synthèse sol-gel¹⁸¹ en particulier sur la mésoporosité¹⁸². He *et al.*¹⁸³ ont comparé l'effet de deux catalyseurs, HCl et HF, sur la synthèse de SiO₂ par voie sol-gel. Le HF utilisé comme catalyseur provoque une augmentation de la porosité et une diminution de la taille de pores ce qui va dans le sens des observations faites ici. Les auteurs avancent deux explications possibles à ce rôle qui sont : 1) la capacité du HF à équilibrer les vitesses d'hydrolyse et de condensation lors de la synthèse sol-gel, conduisant alors à un gel colloïdal au lieu d'un gel polymérique (1.4.2.3, Page 37), la surface spécifique sera alors plus importante et 2) le contrôle de la vitesse de formation des nuclei par réaction avec le SiO₂. L'utilisation du HF induit aussi une augmentation de la surface spécifique que la quantité de SrO soit de 5 ou de 10% massique. La conclusion la plus intéressante est que l'ajout de HF modifie effectivement, et de manière importante, la vitesse de dissolution des verres contenant du strontium (Tableau 7-5).

Il a été mis en évidence précédemment que le strontium ne jouait pas forcément le même rôle que le calcium dans la structure des verres, l'hypothèse avancée est celle d'une organisation en domaines de silicates de strontium créant un environnement chimique différent de celui du calcium, cette organisation est particulièrement marquée à partir d'un taux de SrO de 10%. La vitesse importante de formation du réseau de Si-O-Si inhérente à l'utilisation du HF comme catalyseur pourrait empêcher cette organisation. Les structures des verres 75Sr10 et 75Sr10HF ont donc été comparées pour vérifier cette hypothèse qui semble confirmée par les observations par diffraction des rayons X (Figure 7-9). En effet, la cristallisation induite par l'ajout de strontium dans les verres qui a été observée précédemment ne se produit pas pour le verre 75Sr10-HF. Cela suggère que l'utilisation de HF impose l'intégration du strontium au réseau en tant que modificateur analogue au calcium et empêche la cristallisation du réseau. Ainsi, la structure d'un verre catalysé avec du HF, dans lequel du strontium aurait été

substitué au calcium, ne devrait pas tellement différer de celle d'un verre binaire obtenu par la même voie de synthèse puisque le strontium devrait jouer un rôle analogue au calcium. Cette hypothèse semble validée par l'allure des spectres infrarouge comparés de 75Sr10 et 75Sr10HF (Figure 7-10). En effet, le spectre de la poudre 75Sr10-HF est très proche de celui de la poudre 75, c'est-à-dire que le type des liaisons rencontrées est similaire alors qu'il existait des différences notables avec la poudre de verre 75Sr10 qui avaient été élaborées sans HF. De plus, la structure fine observée à environ 3500 cm^{-1} pour 75Sr10, attribuée à l'existence de positions spécifiques provenant de l'organisation du réseau, n'est pas visible pour 75Sr10HF ce qui confirme que l'ajout de HF empêche l'organisation locale en silicates ce qui est en accord avec le diffractogramme de rayons X.

Tableau 7-5 : Récapitulatif des propriétés des poudres au strontium, catalysées avec du HCl ou du HF

	Surface spécifique (m^2/g)	Diamètre de pores moyen (nm)	k ($\text{ppm} \cdot \text{j}^{-1/2}$)
75Sr5	25	7,9	20 ± 5
75Sr10	5	8,6	25 ± 5
75Sr5-HF	130	5,3	70 ± 10
75Sr10-HF	155	4,3	49 ± 19

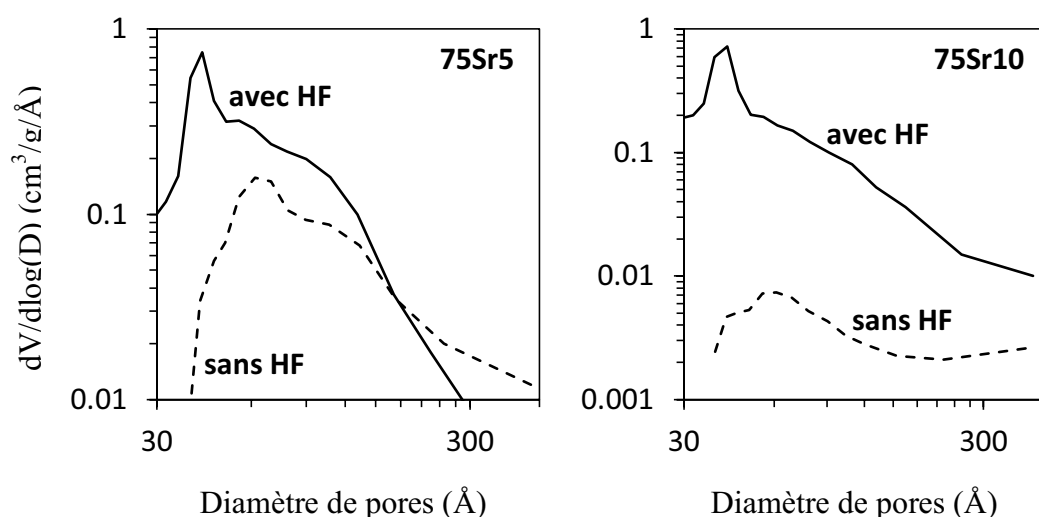


Figure 7-8 : Distribution de tailles de pores obtenues par la méthode BJH pour les poudres de verre binaire ou au strontium catalysées avec ou sans HF

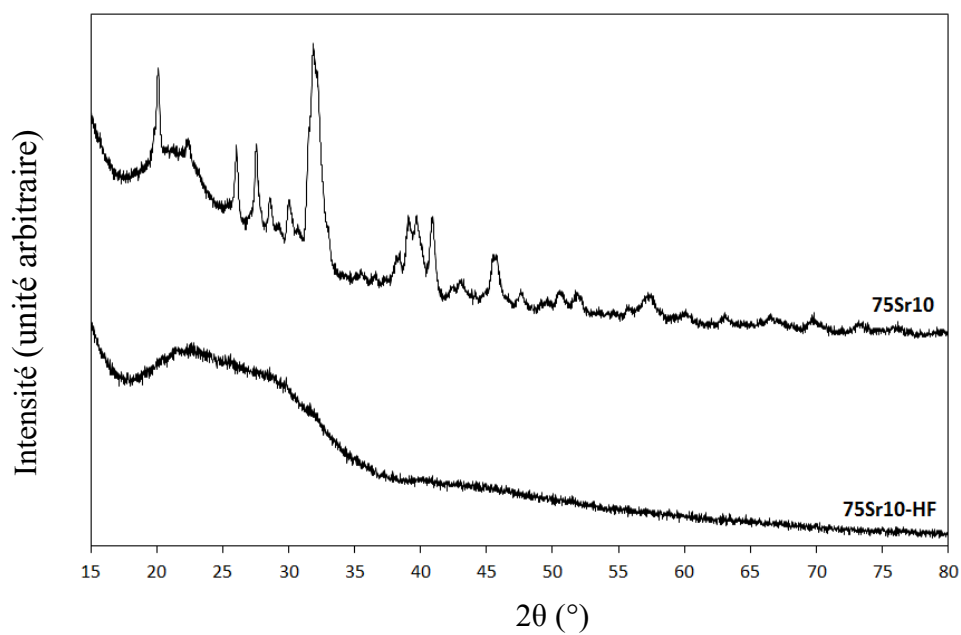


Figure 7-9: Diffractogrammes de rayons X des poudres 75Sr10 et 75Sr10-HF

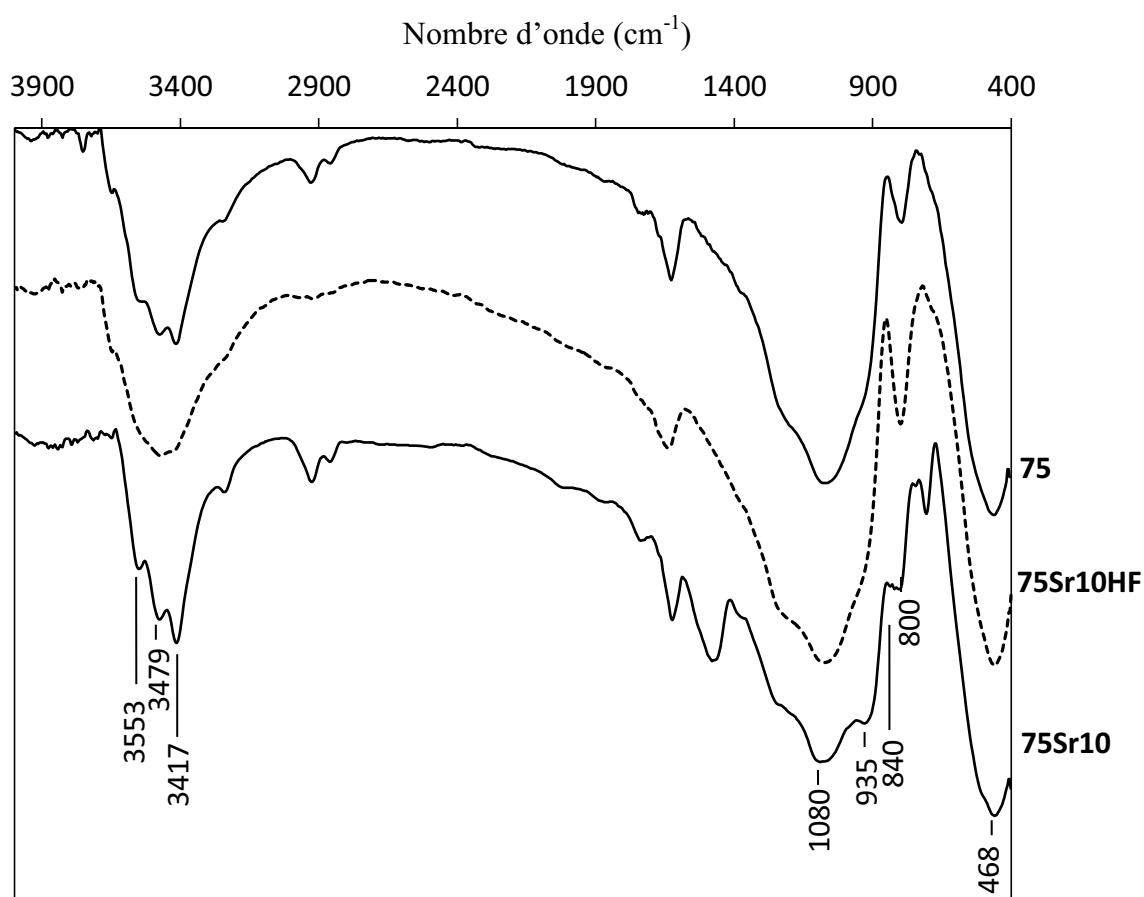


Figure 7-10 : Spectres infrarouge des poudres de verre 75, 75Sr10 et 75Sr10-HF

7.4. Conclusion

L'étude menée ici sur l'influence de la substitution partielle du calcium par du strontium a montré que cette substitution entraînait une cristallisation partielle, une diminution importante de la surface spécifique, une diminution de la vitesse de dissolution du verre et une diminution de la vitesse de précipitation d'une couche phosphocalcique (dont témoigne la diminution de la concentration en phosphore dans le milieu). Une substitution importante diminue donc a priori la bioactivité du verre. Ce résultat semble bien provenir d'une différence dans la structure du verre qui est engendrée par le remplacement d'ions Ca^{2+} par des ions Sr^{2+} , comme le confirme l'existence d'un environnement local différent observé en RMN.

Pour de faibles teneurs, à hauteur de 5% massique ou moins, la vitesse de dissolution est ralentie en raison de modifications de la structure du verre mais la surface spécifique et la vitesse de précipitation de la couche de surface ne semblent pas autant impactées. Un dopage raisonnable en strontium, n'excédant pas 5% massique, semble donc plus approprié si l'on souhaite conserver une bioactivité proche du verre binaire mais en ajoutant les effets bénéfique du relargage local de strontium.

De plus, les études réalisées en ajoutant du HF lors de la synthèse montrent sa grande influence sur la structure des verres au strontium dont la surface spécifique augmente et qui ne cristallisent pas en comparaison des mêmes verres obtenus sans HF. L'influence des paramètres expérimentaux est ici clairement mise en évidence, il est logique d'y voir l'explication aux observations contradictoires trouvées dans les différents travaux de la littérature pour lesquels les conditions expérimentales sont différentes. En particulier, il paraît envisageable de voir dans la polymérisation rapide induite par le HF, qui empêche l'organisation du réseau en silicate de strontium, un effet analogue à celui de la trempe utilisée pour l'élaboration de verres fusion. La trempe a pour effet d'empêcher la cristallisation ce qui explique des propriétés similaires pour les verres bioactifs obtenus par fusion qu'ils soient substitués ou non au strontium.

Ce résultat est intéressant puisque, contrairement aux poudres de verre, une mousse de verre au strontium réalisée avec du HF ne devrait pas voir sa cinétique de dissolution modifiée par la substitution partielle de CaO par du SrO.

Chapitre 8 Etude d'une mousse de verre au strontium

8.1. Elaboration et caractérisation d'une mousse de verre bioactif au strontium

8.1.1. Elaboration

Le protocole de synthèse est identique à celui utilisé pour l'élaboration de mousses binaires, la morphologie obtenue avec 0,5 mL de teepol s'étant montrée plus prometteuse, la mousse au strontium a été réalisée dans les mêmes conditions que M75-B (4.1.1, Page 85). L'ajout de strontium s'effectue sous forme de nitrate de strontium ($\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$) juste après l'ajout de nitrate de calcium (Tableau 8-1). Le moussage est réalisé dans les mêmes conditions que pour M75-B et les traitements thermiques qui suivent sont identiques à ceux présentés pour l'élaboration des mousses binaires.

Tableau 8-1 : Quantités de réactifs utilisées pour les synthèses des mousses M75-B et M75Sr5

	TEOS (mL)	H ₂ O (mL)	HCl 2N (mL)	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (g)	Sr(NO ₃) ₂ (g)	V _{Teepol} (mL)	V _{HF} (mL)
M75-B	13,94	13,48	2,25	5,2637	0	0,5	0,75
M75Sr5	13,94	13,48	2,25	4,5106	0,5106	0,5	0,75

8.1.2. Caractérisation de la texture

L'influence de l'ajout de strontium dans la mousse de verre ne semble pas induire de modification significative de la mésoporosité. En effet, la surface spécifique ainsi que le volume poreux total et le diamètre des mésopores sont identiques à ceux obtenus pour la mousse binaire (Tableau 8-2). Les isothermes présentent une boucle d'hystérésis caractéristique de matériaux mésoporeux dans les deux cas, les distributions de tailles de pores sont centrées à environ 10 nm de diamètre (Figure 8-1).

Tableau 8-2 : Résultats des analyses par adsorption d'azote de M75-B et M75Sr5

	Surface spécifique (m ² /g)	Volume poreux total (cm ³ /g)	Diamètre de pores moyen (nm)
M75-B	152 ± 16	0,50 ± 0,03	6,7 ± 0,3
M75Sr5	174 ± 11	0,51 ± 0,01	5,9 ± 0,4

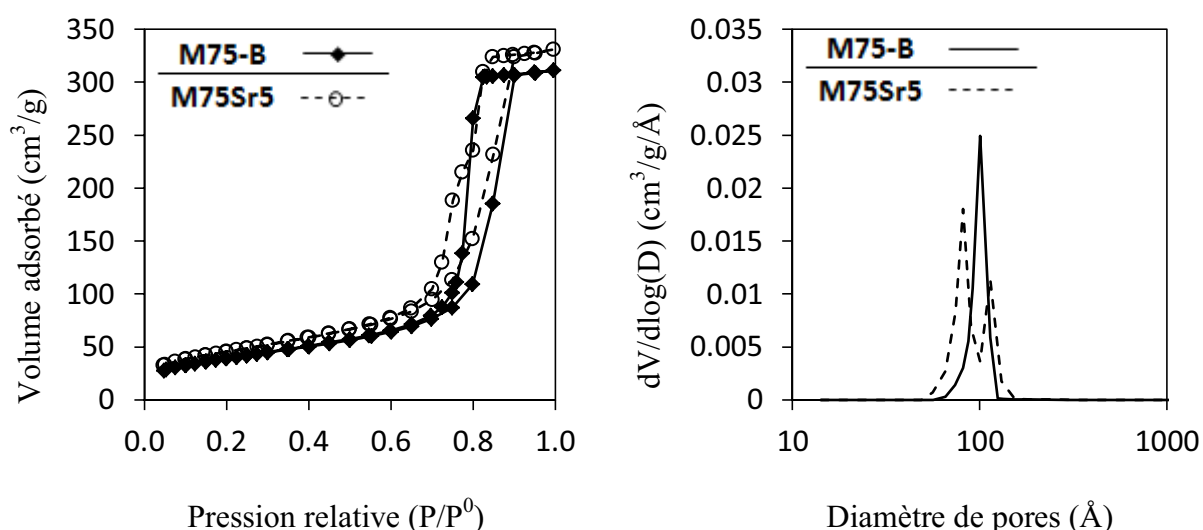


Figure 8-1 : Isothermes d'adsorption et de désorption, et distributions des tailles de mésopores obtenues par la méthode BJH pour les mousses M75-B et M75Sr5

8.1.3. Caractérisation de l'ultra-macroporosité

La mousse au strontium possède une structure macroporeuse fortement interconnectée (Figure 8-2). En comparaison de la mousse binaire (M75-B) réalisée dans les mêmes conditions, la mousse au strontium présente des tailles de pores et d'interconnexions similaires (Figure 8-3). L'introduction de nitrate de strontium dans la synthèse ne semble pas modifier la porosité finale du matériau.

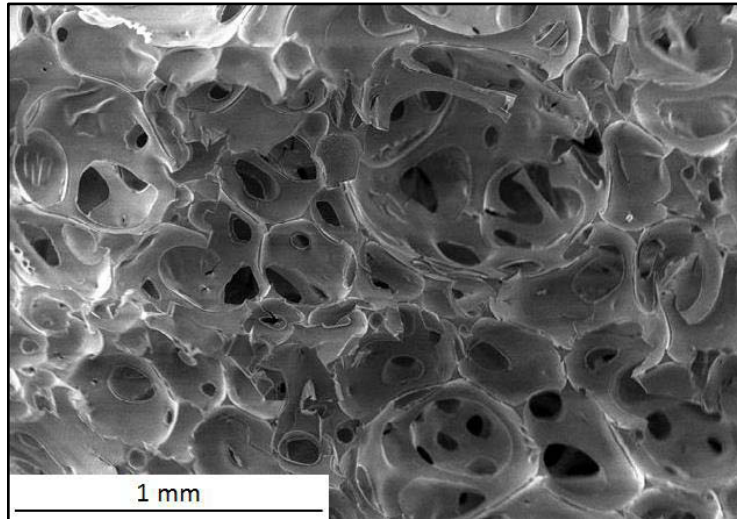


Figure 8-2 : Cliché MEB de la mousse M75Sr5

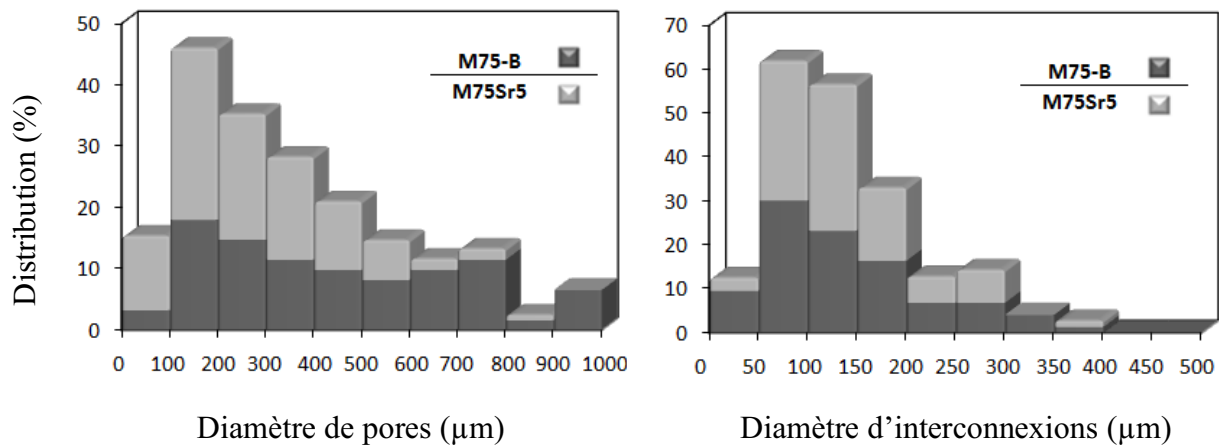


Figure 8-3 : Distributions de diamètres de pores et d'interconnexions des mousses M75-B et M75Sr5

8.2. Etude de l'interaction entre les mousses M75Sr5 et M75-B et le SBF

8.2.1. Evolution de composition du SBF

Le comportement *in vitro* de la mousse M75Sr5 a été caractérisé par immersion de morceaux de mousse dans du SBF pendant 15 et 30 minutes, 1 et 5 heures, 1, 2, 5 et 10 jours. Les analyses de composition du SBF (Figure 8-4) montrent, dans un premier temps, une augmentation de la concentration en silicium et en calcium ce qui témoigne d'un processus de dissolution du verre. Après 5 heures pour la mousse au strontium, et après 1 jour pour la

mousse binaire, la concentration en calcium atteint un maximum à 195 ± 24 ppm et à 264 ± 25 ppm pour les mousses M75Sr5 et M75-B respectivement. La valeur maximale de la concentration en calcium pour la mousse M75Sr5 est plus faible en raison de sa plus faible teneur en calcium qui provient de la substitution partielle du calcium par le strontium. En revanche, le relargage de silicium dans le milieu est sensiblement identique et conduit à un palier à 57 ± 2 ppm pour M75-B et 58 ± 1 ppm pour M75Sr5. Cette dissolution du réseau de verre conduit aussi au relargage du strontium dans le milieu, ce qui est l'objectif visé pour ce matériau. En effet, cela montre la capacité de la mousse à libérer localement un élément thérapeutique. L'évolution de la concentration en phosphore est similaire pour les deux mousses, sa diminution importante témoigne d'un phénomène de précipitation qui est à relier à la diminution de concentration en calcium dans le milieu qui s'explique par la précipitation d'une couche phosphocalcique à la surface de la mousse.

Le chapitre précédent a montré que l'utilisation de HF devrait empêcher la cristallisation du réseau malgré l'ajout de strontium et donc ne devrait pas ralentir la cinétique de dissolution par rapport à la mousse binaire M75-B. Il est intéressant de vérifier cette conclusion, le calcul des cinétiques de dissolution pour les deux mousses donne 47 ± 7 et 61 ± 15 ppm.j^{-1/2} pour M75Sr5 et M75-B respectivement. La cinétique de dissolution du réseau de silicium pour une mousse de verre bioactif obtenue en présence de HF n'est donc pas significativement impactée par l'ajout de strontium, validant ainsi les hypothèses précédentes.

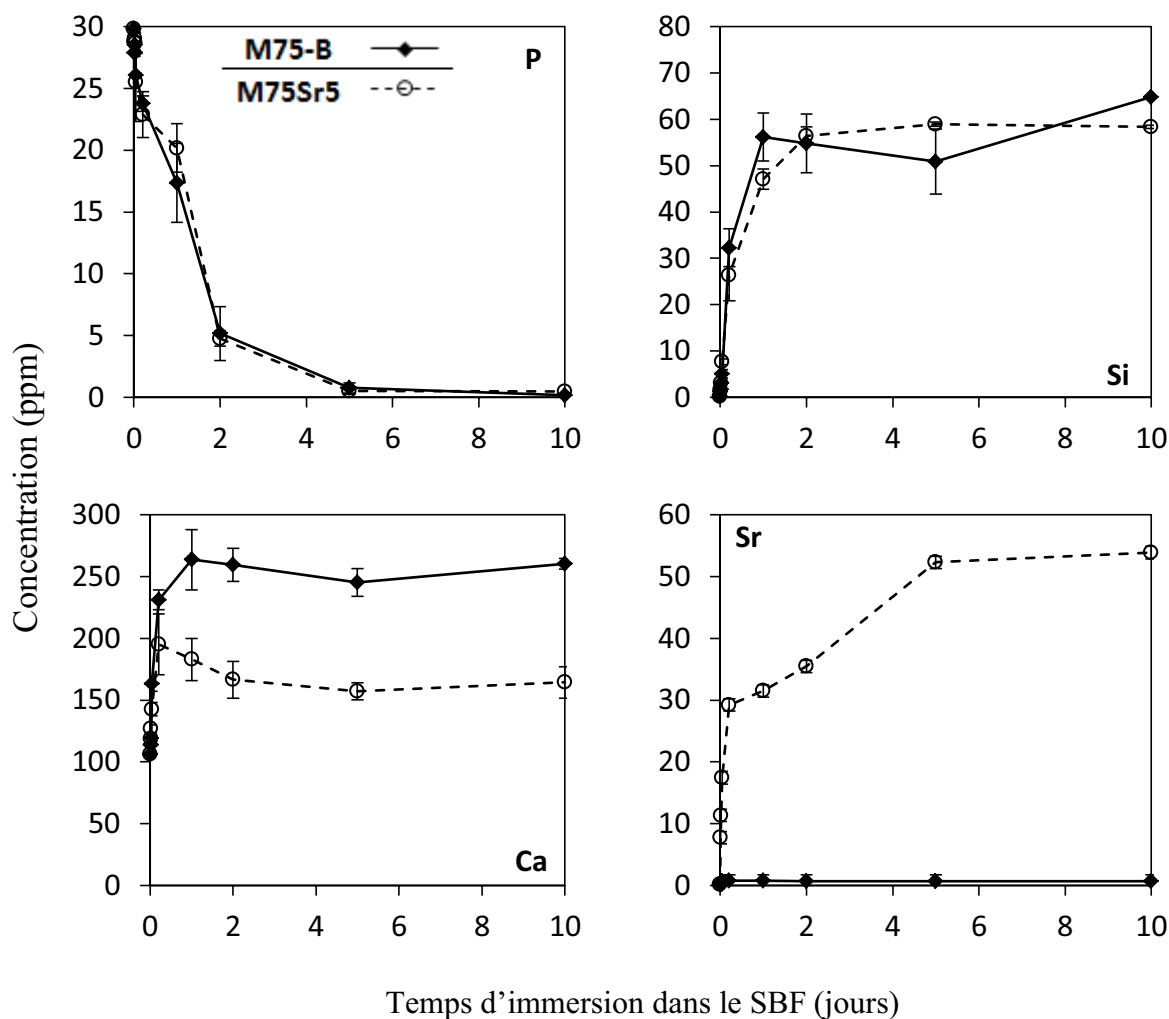


Figure 8-4 : Evolutions comparées des concentrations en phosphore, silicium, calcium et strontium dans le SBF au cours de l'immersion des mousses M75-B et M75Sr5

8.2.2. Cartographies élémentaires

Les cartographies élémentaires avant immersion dans le SBF (Figure 8-5) montrent une distribution homogène du calcium et du silicium dans les murs de la mousse M75Sr5. Par contre, le strontium semble réparti de manière moins homogène, sans toutefois former d'agréats, ce qui devrait conduire à un relargage identique à la surface du matériau.

Les cartographies à 5 jours (Figure 8-6) montrent la formation d'une couche de phosphate de calcium à la surface des pores comme pour M75-B ce qui est cohérent avec les mesures de taille de pores et d'interconnexions qui sont très similaires pour les deux mousses. Le strontium, présent en faible quantité à cause du relargage mis en évidence par les mesures de concentrations dans le milieu, est peu visible sur cette cartographie large. En réalisant une

cartographie rapprochée sur la couche de phosphate de calcium (Figure 8-7) il semble qu'il y ait une accumulation de strontium dans cette couche. Pour vérifier cette hypothèse des mesures locales de concentration sont réalisées sur la couche et à l'intérieur des murs.

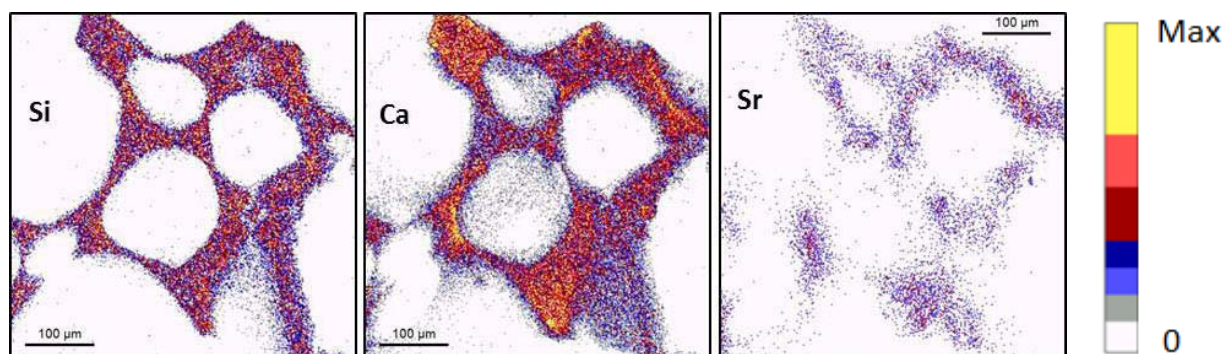


Figure 8-5 : Cartographies élémentaires de la mousse M75Sr5 avant immersion dans le SBF (0 jour)

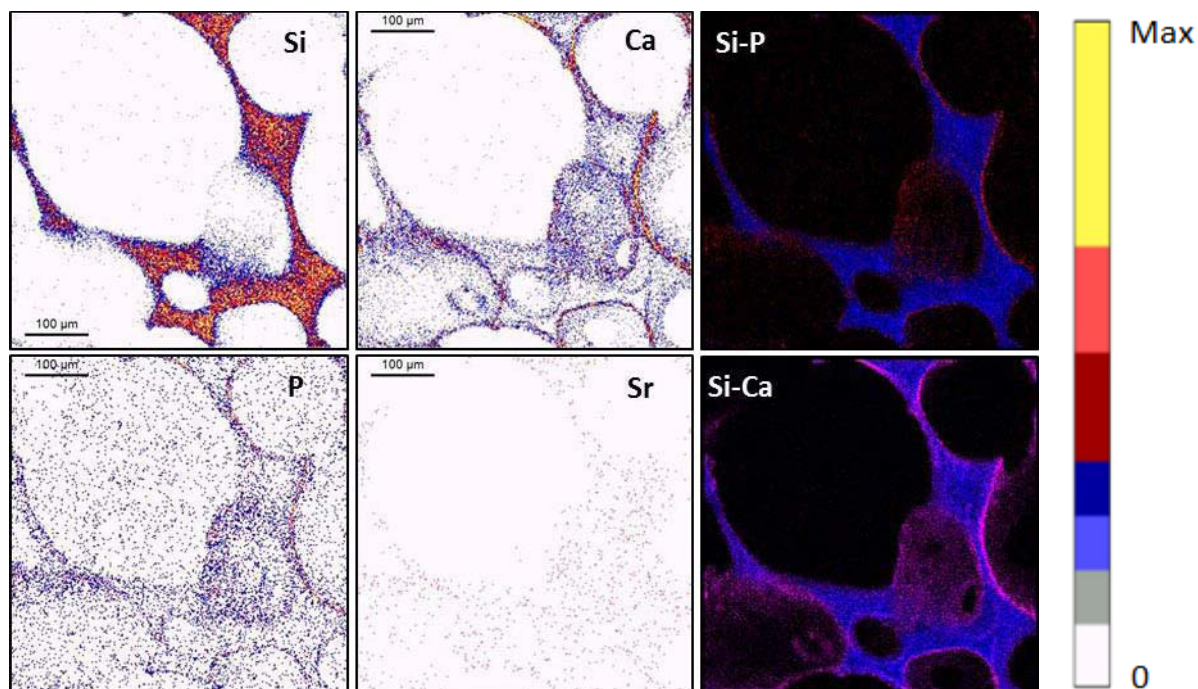


Figure 8-6 : Cartographies élémentaires de M75Sr5 après 5 jours d'immersion dans le SBF et superpositions des cartographies du silicium (bleu), du phosphore (rouge) et du calcium (rose)

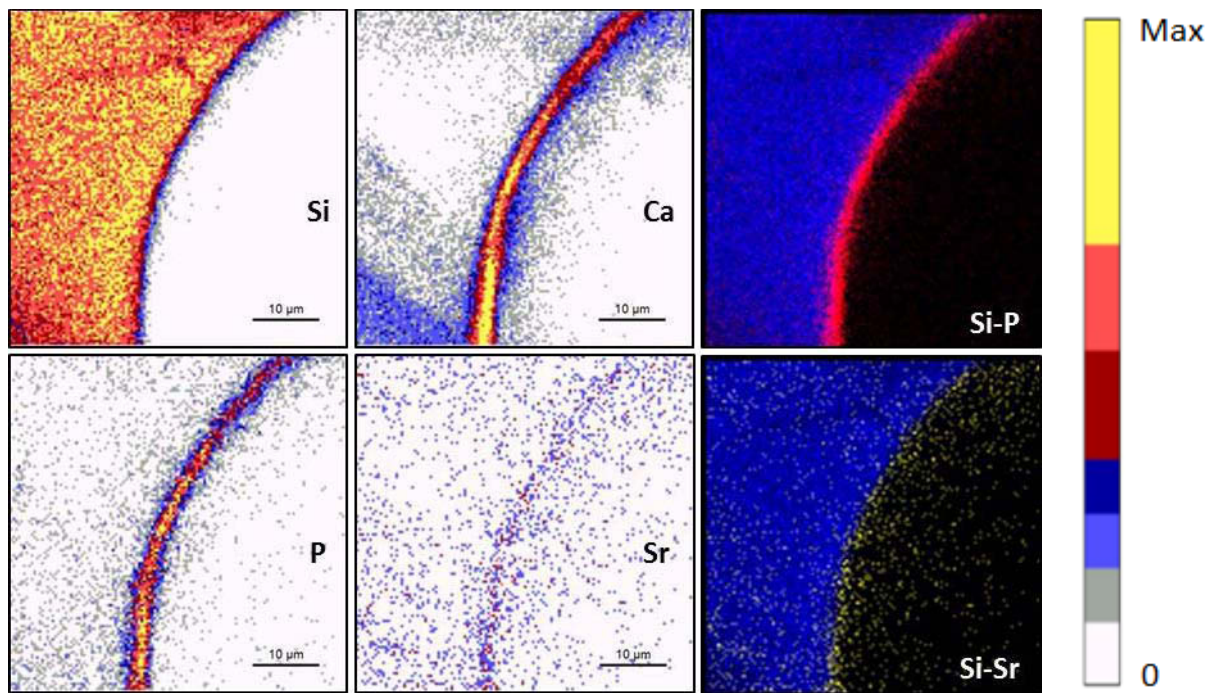


Figure 8-7 : Cartographies élémentaires de la couche de phosphate de calcium obtenue après 5 jours d'immersion de M75Sr5 dans le SBF et superpositions des cartographies de silicium (bleu), du phosphore (rouge) et du strontium (jaune)

8.2.3. Mesures locales de concentrations

Les mesures locales de concentrations à l'intérieur des murs (Figure 8-8) montrent une diminution de la concentration en calcium et donc une augmentation relative de la concentration en silicium. Elles montrent de plus l'augmentation de la quantité de phosphore à l'intérieur des murs, probablement en raison d'un phénomène de diffusion. Elles montrent aussi une décroissance très rapide de la quantité de strontium, atteignant une valeur très faible de l'ordre de 0,1 % massiques après seulement 1 jour d'immersion dans le SBF.

La partie périphérique du matériau (Figure 8-9) subit également une perte rapide de strontium, cependant, la valeur minimale atteinte dans la couche de phosphate de calcium est de 0,32 % massique, soit environ trois fois plus qu'à l'intérieur des murs. Des précipités contenant du calcium, du phosphore et du strontium apparaissent pour former, à 1 jour d'interaction, une couche de composition massique : 14,63 % Si – 27,26 % Ca - 12,53 % P - 0,49 % Sr - 0,31 % Mg. La formation de cette couche est possible grâce à la similitude entre le calcium et le strontium qui permet une substitution facile dans les phases apatitiques. Elle est particulièrement intéressante du point de vue de la régénération osseuse, en effet, elle sera directement en contact avec les cellules osseuses et le verre étant supposé être dégradé au

cours du processus de régénération, un relargage continu de strontium pendant la régénération est donc probable.

Cette mousse devrait donc combiner la très bonne bioactivité *in vivo* de M75-B en raison des grandes ressemblances qui existent entre ces mousses en termes de morphologie et de réactivité, ainsi que l'effet bénéfique du relargage en strontium ce qui en fait un scaffold très prometteur pour la régénération osseuse.

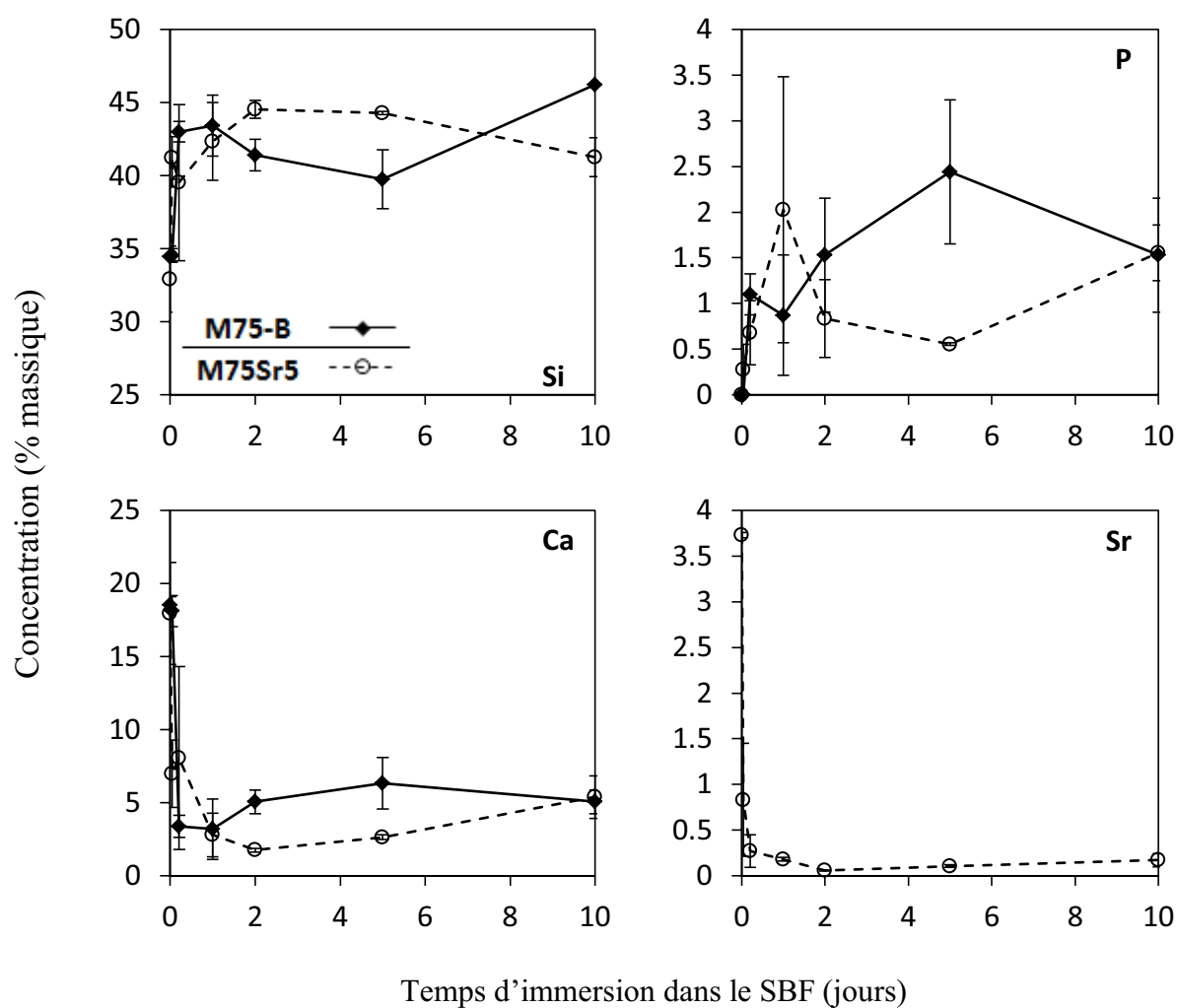


Figure 8-8 : Evolution de la composition de l'intérieur des murs de M75Sr5 lors de l'immersion dans le SBF

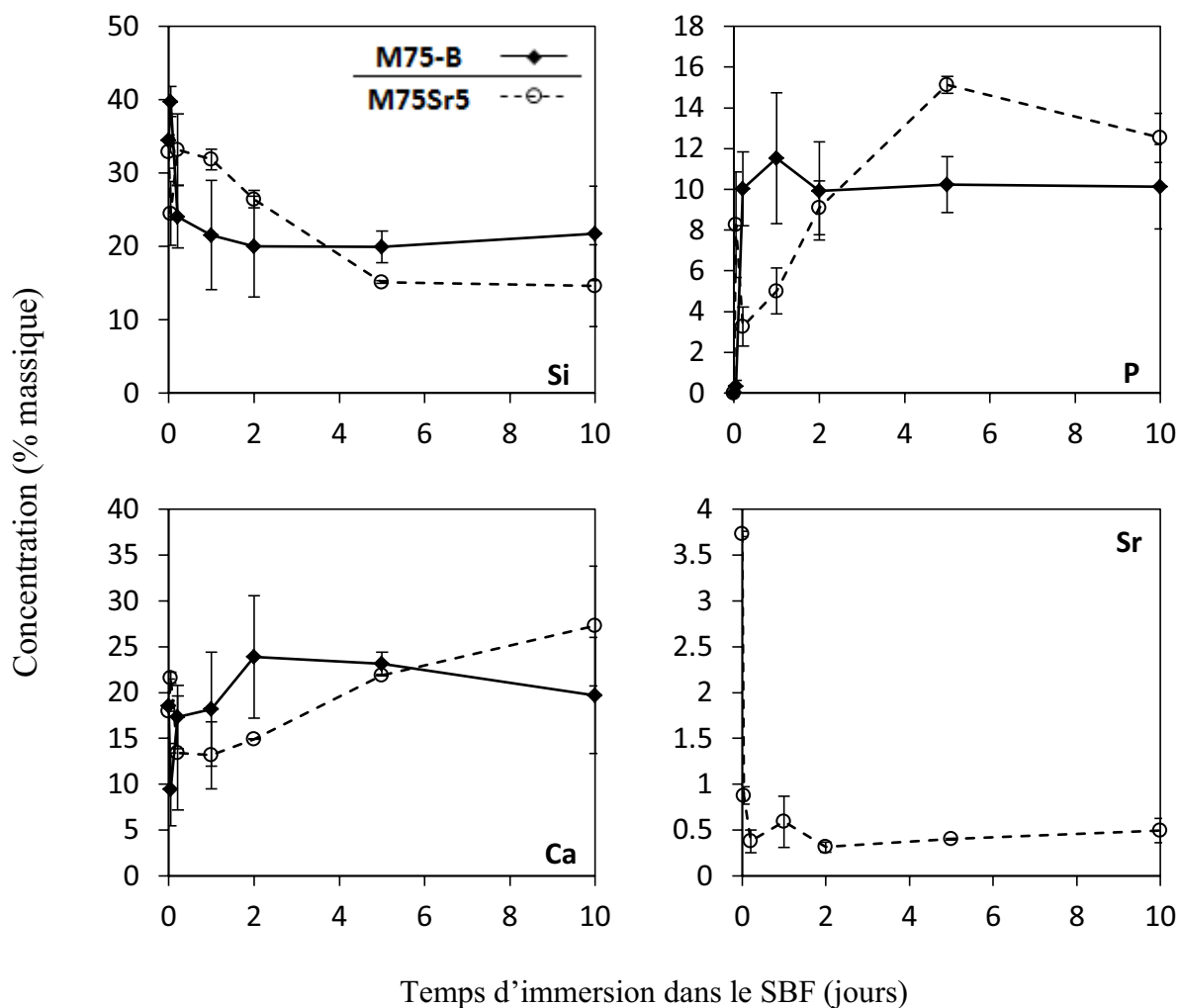


Figure 8-9 : Evolution de la composition de la périphérie des murs de M75Sr5 lors de l'immersion dans le SBF

8.3.Conclusion

Cette étude a montré qu'il est possible d'introduire du strontium dans les mousses de verre bioactif en conservant une porosité qui a montré son aptitude à permettre l'invasion par des cellules osseuses lors d'essais *in vivo*.

Les tests de bioactivité *in vitro* ont montré la capacité de la mousse M75Sr5 à relarguer localement du strontium dès les premiers instants de l'immersion du matériau. Ce relargage est certes rapide, mais de manière intéressante il semble que la couche de phosphate de calcium qui se forme à la surface du verre incorpore du strontium permettant ainsi la formation d'un « réservoir » de strontium au niveau local¹⁸⁴.

Chapitre 9 Premiers essais d'implantation *in vivo* de verre au strontium

9.1. Etude des coupes histologiques

Il a été montré précédemment que l'ajout de strontium dans les verres bioactifs jusqu'à 5% massique de SrO ne modifiait pas trop la bioactivité *in vitro* (7.4, Page 159). De plus, le verre 75Sr5 a déjà montré son effet bénéfique sur la différenciation *in vitro* des ostéoblastes¹⁸⁵, les poudres de verre 75 et 75Sr5 ont donc été sélectionnées. Afin d'étudier le comportement *in vivo* des matériaux, des implantations ont été réalisées en collaboration avec le Laboratoire de Physiopathologie Orale et Moléculaire de l'Université Paris Diderot et L'Université Saint Joseph de Beyrouth.

Les poudres de verre ont été implantées dans des condyles fémoraux de lapin pendant 7 semaines, le défaut osseux réalisé est un défaut de taille de critique de 6 mm de largeur. Après récupération, les échantillons sont fixés dans un tampon neutre de formaldéhyde à 10% puis sont enrobés dans une résine après déshydratation à l'éthanol. Des coupes sont réalisées et polies jusqu'à une épaisseur d'environ 60 µm et colorées au Giemsa-Paragon pour des observations histologiques en microscopie optique. Les coupes observées sont ensuite repolies pour éliminer la coloration afin de pouvoir les analyser par PIXE sans que les éléments de la coloration interfèrent avec les mesures.

Les coupes histologiques montrent que le défaut n'est pas encore totalement envahi par de l'os et qu'il y a de nombreux grains de verre qui ne sont pas au contact du tissu osseux (Figure 9-1). Toutefois, il y a aussi présence de granules enrobés dans de l'os. De plus, sur cette figure, la coloration fait apparaître le tissu osseux au contact du verre plus foncé que le tissu à proximité. Or, plus le tissu apparaît foncé à la coloration et plus il est jeune. Cela pourrait suggérer que le verre a induit la formation du tissu osseux plus foncé. Ce résultat reste à confirmer sur des études plus étendues mais semble prometteur. L'utilisation de grains de verre semble moins efficace à induire la régénération osseuse que les mousses de verre, l'un des problèmes principaux rencontrés avec les grains étant leur migration dans le défaut et même au-delà.

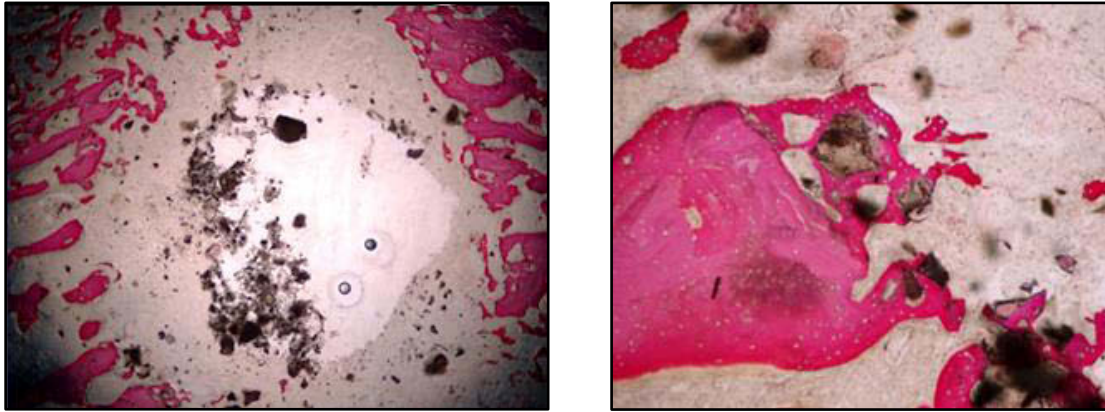


Figure 9-1 : Clichés obtenus par microscopie optique sur des coupes histologiques après 7 semaines d'implantation de la poudre de verre 75 dans un fémur de lapin

9.2. Cartographies élémentaires obtenues par faisceaux d'ions

La Figure 9-2 montre une zone de contact entre le verre et le tissu osseux. En effet, la partie rose (riche en calcium et en phosphore) c'est-à-dire le tissu osseux, entoure le grain (riche en silicium) en noir sur la coupe histologique comme en témoigne les superpositions des cartographies élémentaires du silicium avec le calcium et le phosphore.

Le cliché de la coupe histologique en Figure 9-3 montre une zone de contact entre l'os et le verre 75Sr5 qui a pu être cartographiée par PIXE. Les cartographies élémentaires laissent apparaître un espace entre l'os et le verre, des cartographies en électrons rétrodiffusés ont donc été réalisées pour comprendre l'existence de cet espace non remarqué sur la coupe histologique. La cartographie par électrons rétrodiffusés laisse apparaître des craquelures autour du grain de verre qui n'étaient pas présentes sur la coupe histologique. Ces craquelures proviennent vraisemblablement de contraintes mécaniques subies à l'interface fragile entre le verre et l'os pendant l'étape de polissage nécessaire au retrait de la coloration. Cette zone est donc bien une zone de contact os-verre malgré l'espace apparu pendant la préparation de l'échantillon. Les cartographies élémentaires obtenues par PIXE semblent montrer une dissolution partielle du grain de verre. De plus il semble y avoir des zones plus riches en strontium que d'autres. Il semble que les grains de verre contiennent encore une quantité importante de strontium.

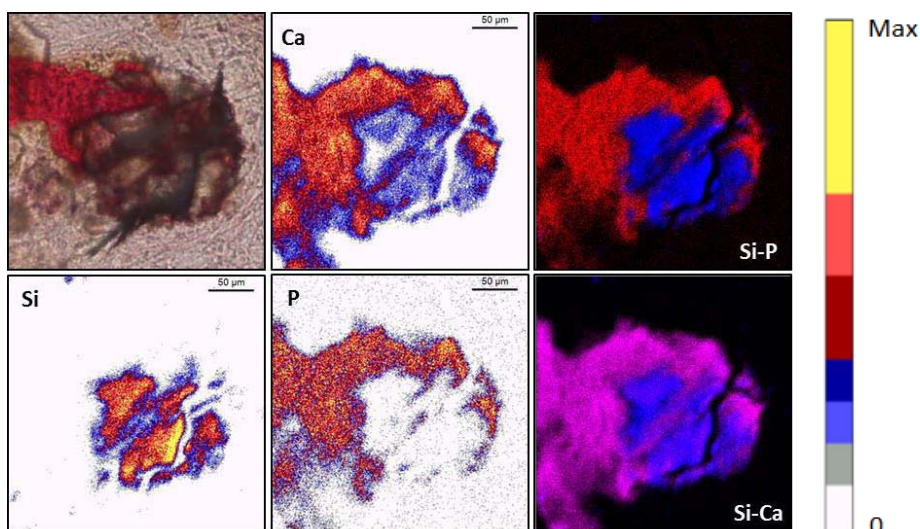


Figure 9-2 : Clichés obtenus par microscopie optique d'une coupe histologique après 7 semaines d'implantation de la poudre 75 dans un fémur de lapin, cartographies élémentaires correspondantes et surperpositions des cartographies du silicium (bleu), phosphore (rouge) et calcium (rose)

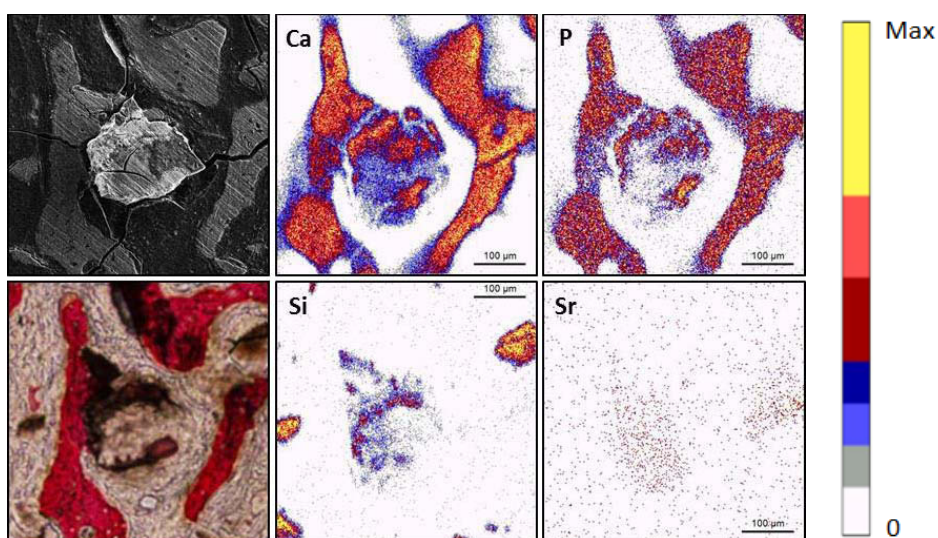


Figure 9-3 : Cartographie par électrons rétrodiffusés, clichés obtenues par microscopie optique d'une coupe histologique après 7 semaines d'implantation de la poudre 75 dans un fémur de lapin et cartographies élémentaire d'une zone de contact entre la poudre de verre 75Sr5 et l'os néoformé

9.3. Mesures locales de concentrations

Les mesures locales de concentrations en éléments majeurs (Figure 9-4) montrent que les grains de verre, binaires et au strontium, ont des compositions comparables après 7 semaines

d'implantation. Ils contiennent encore des concentrations importantes en silicium ($29 \pm 3 \%$ et $33 \pm 6 \%$ pour 75 et 75Sr5 respectivement) et contiennent en moyenne 3,5% de phosphore. Les rapports molaires Ca/P sont similaires pour l'os néoformé au contact des deux verres bioactifs ($1,8 \pm 0,1$ et $1,87 \pm 0,04$ pour 75 et 75Sr5 respectivement). Ces rapports ne sont pas significativement différents de celui de l'os ancien ($1,82 \pm 0,01$). En revanche, les rapports sont très élevés, et très éloignés de la valeur théorique de l'apatite, à l'intérieur des grains de verre ($5,8 \pm 0,9$ et 4 ± 1 pour 75 et 75Sr5 respectivement). Cela peut s'expliquer par la réaction incomplète de transformation des grains en phase minérale comme observée pour la mousse bioactive implantée *in vivo*. Cela est d'ailleurs cohérent avec le fait qu'il reste encore beaucoup de silicium à l'intérieur des grains de verre.

La différence remarquable entre ces deux matériaux provient du strontium (Figure 9-5). En effet, les grains de 75Sr5 contiennent encore du strontium contrairement aux grains de poudre 75 qui n'en contenaient pas avant l'implantation. De plus, et c'est là le plus intéressant, l'os néoformé à proximité de la poudre 75Sr5 contient plus de strontium (885 ± 490 ppm) que l'os néoformé à proximité du 75 (115 ± 33 ppm) qui est lui-même à une teneur comparable à celle de l'os ancien (136 ± 40 ppm).

Ces mesures montrent que le strontium libéré de manière locale par le verre a bien une influence sur l'os formé à proximité. Un autre effet intéressant de ces verres est la présence de silicium dans l'os néoformé en tant qu'élément trace (5600 ± 2000 ppm et 2000 ± 400 ppm pour 75 et 75Sr5 respectivement) alors que l'os ancien n'en contient pas¹⁶⁸ ce qui est très intéressant en raison de l'effet ostéoinducteur du silicium. Du zinc et du magnésium sont observés dans l'os ancien et l'os nouveau. De manière intéressante, il semble que l'os néoformé au contact de la poudre de verre 75Sr5 contienne une proportion de zinc plus importante que celui au contact de la poudre de verre 75. Ceci témoigne peut-être d'une maturité plus importante de l'os néoformé au contact de 75Sr5 où la concentration en zinc est équivalente à celle de l'os ancien. Le zinc et le magnésium se retrouvent aussi dans les grains de verre, probablement dans l'apatite qui se forme à leur surface ainsi qu'à l'intérieur par diffusion. L'insertion possible de ces éléments au sein des réseaux de phosphates de calcium¹⁸⁶, et plus particulièrement au sein du réseau d'hydroxyapatite^{187, 188}, a déjà été démontrée. En effet, des études structurales sur des phosphates de calcium de synthèse élaborés en présence de Mg ou de Zn montrent que ces éléments ont tendance à se substituer au calcium dans les réseaux cristallins.

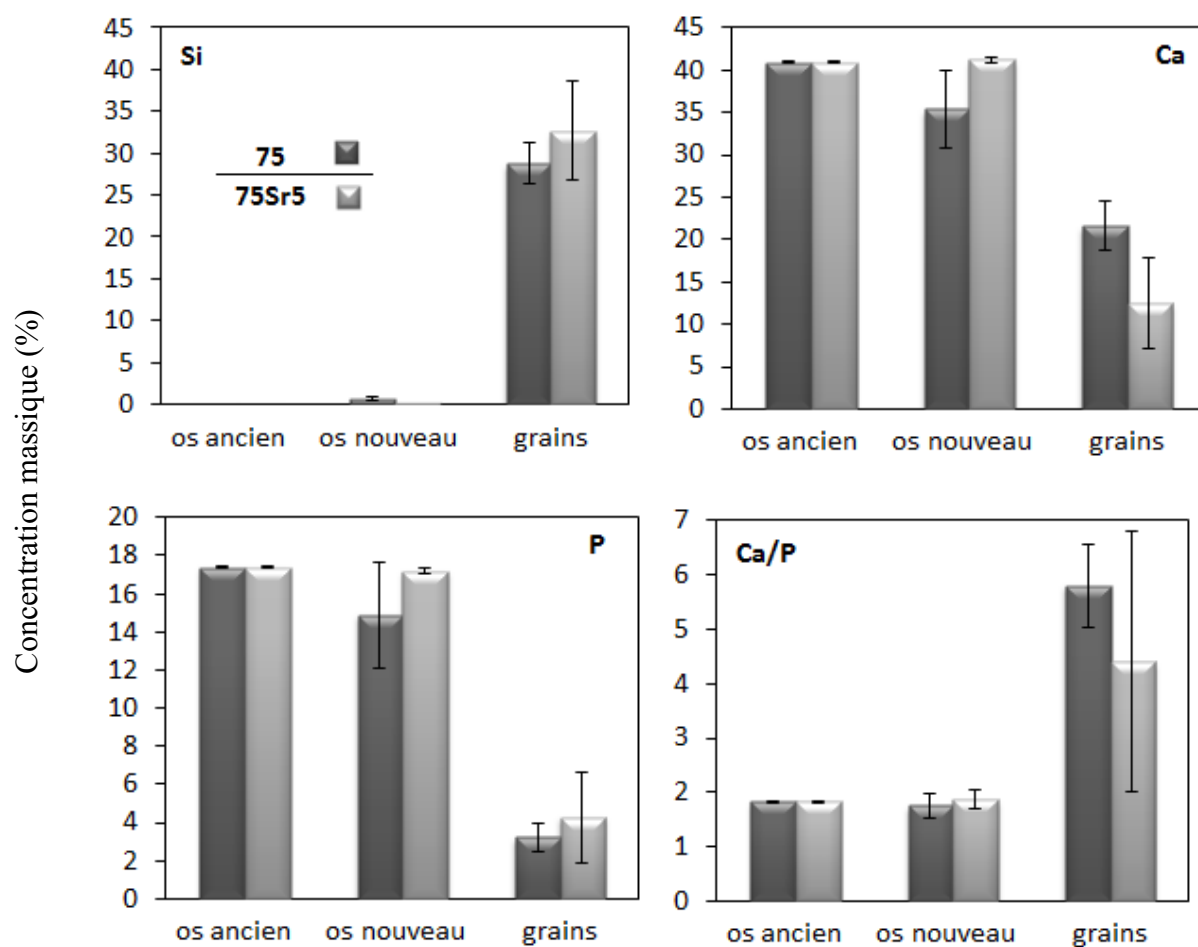


Figure 9-4 : Mesures locales de concentrations en éléments majeurs dans les zones d'intérêt des coupes histologiques des poudres 75 et 75Sr5 implantées *in vivo*

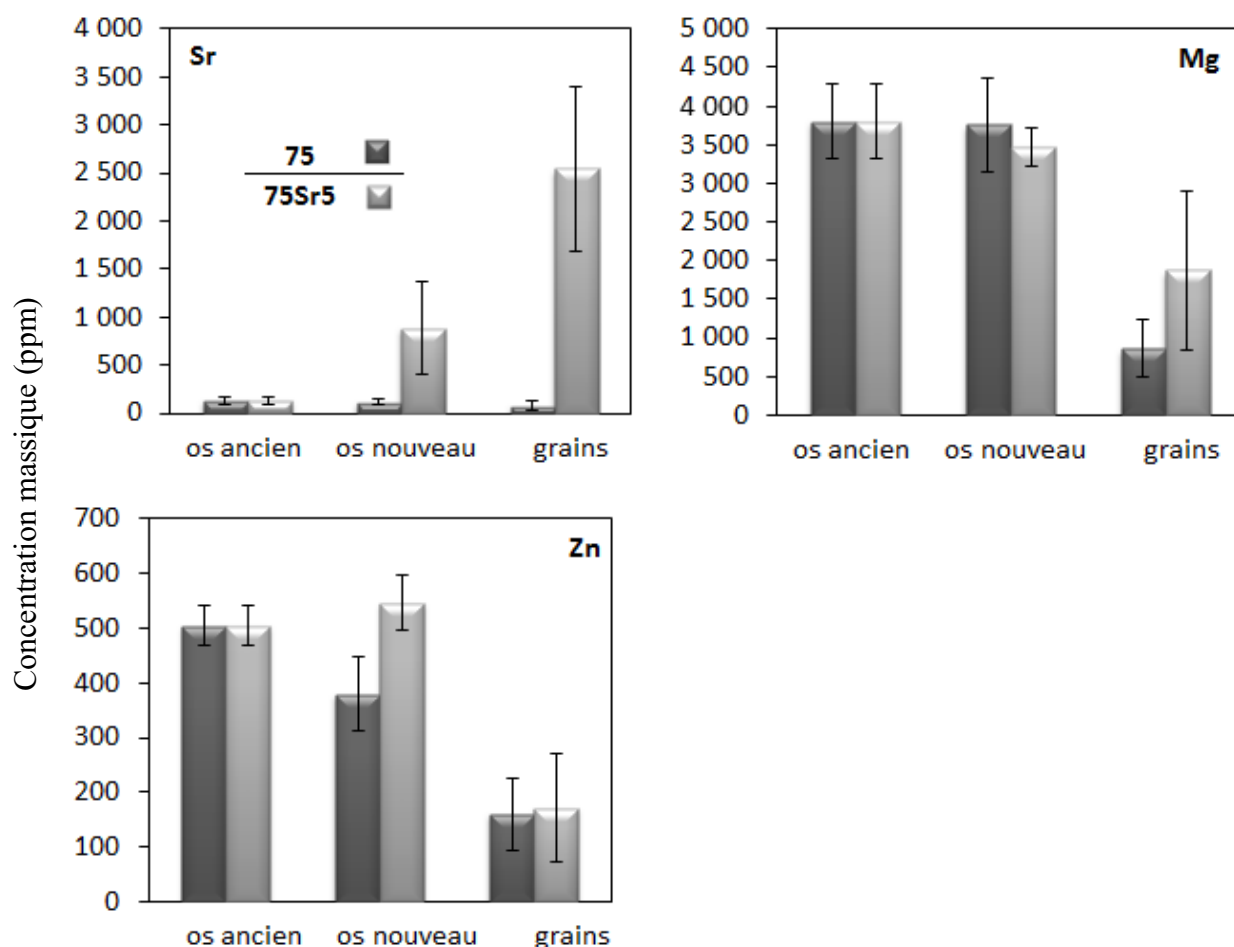


Figure 9-5 : Mesures locales de concentrations en éléments traces dans les zones d'intérêt des coupes histologiques des poudres 75 et 75Sr5 implantées *in vivo*

9.4.Profils de concentration

Le profil de concentration réalisé à l'interface os-verre binaire (Figure 9-6) montre une différence très marquée entre les deux zones. L'os contient environ 40% massique de calcium, 17% de phosphore et ne contient pas de silicium. En s'approchant du verre, la quantité de silicium augmente de manière importante alors que celles de calcium et de phosphore diminuent. Dans cette zone, le verre contient encore beaucoup de silicium et de calcium et contient très peu de phosphore. Le grain au strontium au contact de l'os et sur lequel un profil similaire a été réalisé (Figure 9-7) montre une réaction plus avancée puisqu'il contient moins de silicium (7 à 20% comparés aux 30 à 35% du grain binaire) et une quantité importante de phosphore (aux alentours de 10%).

Le plus intéressant pour ce verre est l'étude du profil de concentration du strontium (Figure 9-8) qui montre la présence de strontium dans l'os et son augmentation importante à

l'approche du verre qui contient encore une concentration importante, jusqu'à 1,4%, dans sa partie interne.

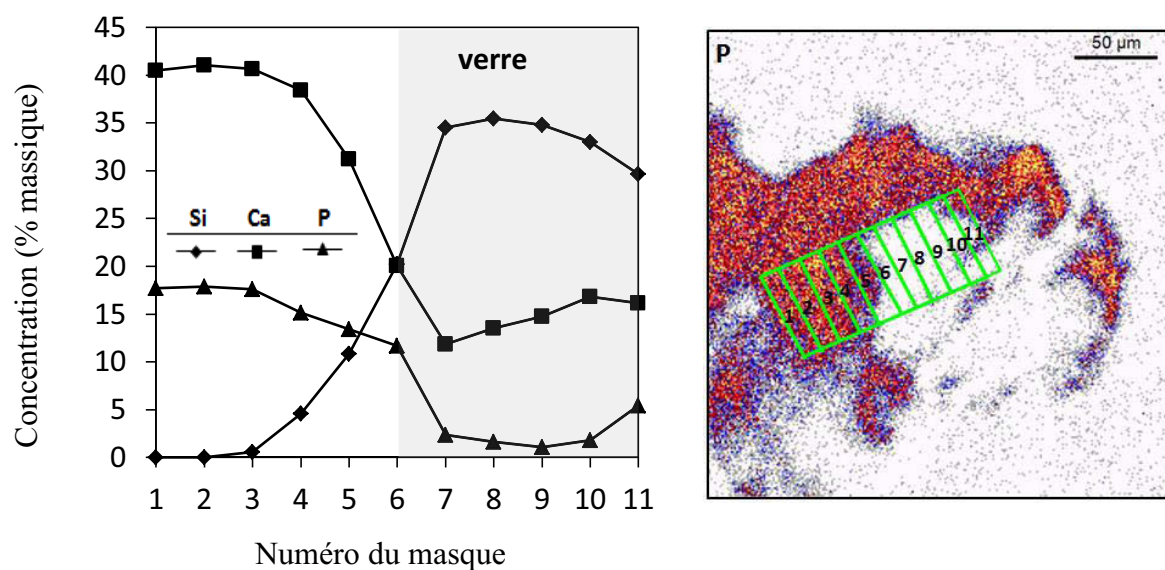


Figure 9-6 : Profil de concentration des éléments majeurs à l'interface os néoformé-poudre 75 (chaque masque a une dimension de $55 \times 12 \mu\text{m}^2$)

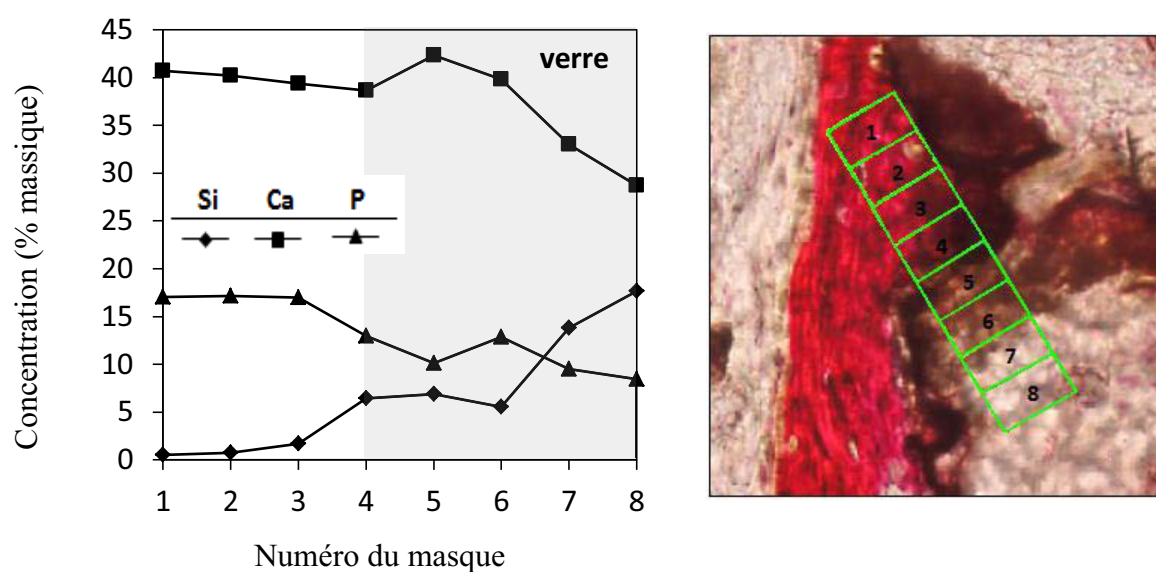


Figure 9-7 : Profil de concentrations des éléments majeurs à l'interface os néoformé-poudre 75Sr5 (chaque masque a une dimension de $18 \times 35 \mu\text{m}^2$)

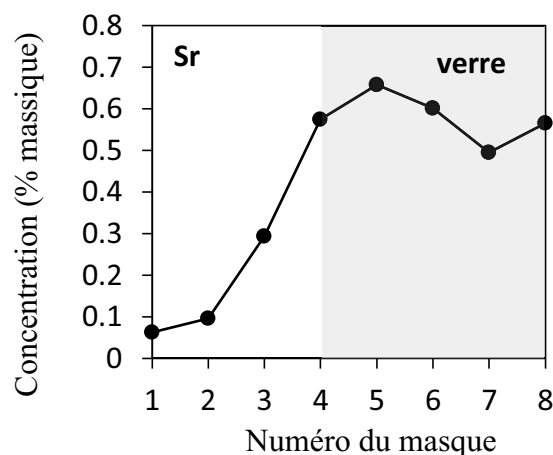


Figure 9-8 : Profil de concentration en strontium à l'interface os néoformé-poudre 75Sr5

9.5. Conclusion

Avant de conclure sur les résultats, il est intéressant de remarquer que le protocole d'étude mis en place avec polissage des coupes pour retirer la coloration nécessaire aux observations histologiques, associée à la possibilité de se repérer en PIXE grâce à la présence d'un microscope optique, a permis l'observation d'une même zone par différentes techniques. En effet, trois techniques différentes (histologie, électrons rétrodiffusés et PIXE) peuvent être combinées pour augmenter la compréhension des phénomènes se produisant à l'interface os - verre bioactif. Les résultats de l'implantation de la poudre de verre 75 dans des fémurs de lapin ont montré une intégration moins réussie que l'implantation d'une mousse de verre de composition similaire (M75-B). La poudre 75Sr5 a montré le même problème, présentant certains grains inclus dans de l'os, mais aussi de nombreux grains n'ayant pas donné lieu à la formation d'une interface avec le tissu osseux. Le défaut de taille critique n'a pas été comblé par de l'os néoformé, cela peut venir du modèle ou encore du site d'implantation qui n'est pas adapté. Cependant, le fait que certains grains, pourtant très proches de zones osseuses, n'aient pas donné lieu à une interface verre-os laisse supposer que l'utilisation du matériau sous forme de poudre n'est peut-être pas optimale.

Cependant, l'étude des coupes histologiques par PIXE a permis la réalisation de mesures locales de concentration qui ont montré que l'os néoformé au contact des grains de 75Sr5 contenait une quantité beaucoup plus importante de strontium que le même os au contact de grains de 75. Le strontium ainsi retenu localement devrait avoir un effet bénéfique durant tout le processus de régénération¹⁸⁵.

Partie D Composites

Chapitre 10 Scaffolds composites poudre de verre dans une matrice de gélatine

10.1. Vers une démarche biomimétique dans l'élaboration des biomatériaux

10.1.1. Composites et hybrides

Les scaffolds en verre et en céramique pour l'ingénierie osseuse représentent un terrain de recherche très attractif, comme en témoigne le grand nombre de publications qui y sont consacrées chaque année. Cependant, ces matériaux, et principalement ceux à base de verre, présentent un problème récurrent qu'il est difficile de résoudre sans compromettre l'architecture poreuse, il s'agit des propriétés mécaniques insuffisantes¹⁸⁹. Une stratégie pour améliorer les propriétés mécaniques des scaffolds s'inspire de la nature. En effet, l'os est composé de deux phases, une phase minérale et une phase organique, il s'agit donc d'un composite, ce qui lui confère des propriétés mécaniques particulières. L'association d'un polymère biodégradable et d'un verre bioactif devrait permettre d'atteindre des propriétés mécaniques plus compatibles avec les contraintes subies par l'os¹⁹⁰.

Il existe deux manières différentes d'associer un verre bioactif et une phase organique, la première s'inspire très fortement de l'os avec la réalisation d'un matériau composite, c'est-à-dire une poudre de verre dispersée dans une phase organique de la même manière que l'apatite est dispersée dans le collagène de l'os. La deuxième manière consiste à créer une liaison plus intime entre le verre et le polymère, il s'agit de la formation de matériaux hybrides. Cette deuxième solution est plus difficile à mettre en œuvre car à l'heure actuelle, les synthèses de verre bioactif par voie sol-gel comportent un traitement thermique nécessaire à l'élimination des nitrates provenant du précurseur de calcium. Les températures nécessaires à ce traitement engendreraient la perte de la phase organique. Même si la synthèse d'hybrides à base de verre et de gélatine a déjà été tentée¹⁹¹, le problème des nitrates résiduels n'a pas été abordé. En effet, au cours de ces travaux le précurseur de calcium utilisé est le $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, cependant, l'incorporation du calcium au réseau de verre ne se faisant qu'à la condition de

chauffer le verre, il semble qu'ici seul un hybride SiO_2 - gélatine soit formé avec des nitrates de calcium déposés en surface. Certains chercheurs ont tenté de résoudre ce problème en utilisant un autre précurseur de calcium, le chlorure de calcium¹⁹², cependant l'intégration du calcium au réseau de verre n'a pas été démontrée et il se dépose probablement encore sous forme de sel à la surface du matériau. La voie composite, qui fait appel à une poudre de verre qui a pu être calcinée dans une étape précédente, paraît donc plus simple à mettre en œuvre, et par conséquent cette voie a été choisie pour la réalisation de scaffolds aux propriétés mécaniques améliorées.

10.1.2. Les polymères biocompatibles

De nombreux matériaux polymères sont biocompatibles et couramment utilisés pour des applications médicales. Certains de ces polymères sont inertes, mais il existe aussi des polymères résorbables couramment utilisés, la plupart d'entre eux sont présentés dans le Tableau 10-1. Différents polymères synthétiques biocompatibles ont déjà été utilisés en association avec des verres bioactifs pour la réalisation de composites tels que le PVA (Poly(alcool vinylique))¹⁹³, le polycaprolactone ou encore le PMMA (Polyméthacrylate de méthyle)¹⁹⁴. Des polymères naturels peuvent aussi être employés tels que le chitosan utilisé par exemple pour réaliser des dépôts composites sur des implants métalliques¹⁹⁵. L'alginate¹⁹⁶, la gélatine, ou encore le collagène sont aussi des candidats intéressants parmi les polymères naturels.

Par rapport aux polymères synthétiques, les matériaux dérivés de protéines (collagène, gélatine, élastine, acide hyaluronique, *etc...*) présentent une meilleure biocompatibilité¹⁹⁷. La gélatine associée à des phosphates de calcium^{198, 199} a déjà prouvé son intérêt dans le domaine des substituts osseux. Ce biopolymère a donc été choisi en partie pour cette raison mais aussi pour son faible coût, pour sa disponibilité et parce que la gélatine est un dérivé du collagène, un matériau organique naturellement présent dans les os.

Tableau 10-1 : Polymères biodégradables trouvant des applications médicales²⁰⁰

Material class	Manufacturer	Product name
Cellulose acetate	Mazzucchelli	BIOCETA®
Copolyester	Planet Polymer	EnviroPlastic®-Z
	BASF	Ecoflex
	Eastman	Easter Bio™
Polycaprolactone (PCL)	Birmingham Polymers	Poly(ε-caprolactone)
	Planet Polymer	Enviroplastic®-C
	Solvay	CADA®
	Union Carbide	TONE®
Poly(ester amide)	Bayer	BAK 1095
		BAK 2195
Poly(ethylene terephthalate) (PET)-modified	DuPont	Biomax®
Polyglycolide (PGA)	Alkermes	Medisorb®
	Birmingham Polymers	Poly(glycolide)
	Boehringer Ingelheim	Resomer®
	PURAC	PURASORB® PG
Polyhydroxyalkanoates (PHA)	Metabolix	PHA
	Biomer	Biomer™
	Monsanto	Biopol®
Poly(lactic acid) (PLA)	Alkermes	Medisorb®
	Birmingham Polymers	Poly(L-lactide) & Poly(DL-lactide)
	Boehringer Ingelheim	Resomer®
	Cargill Dow Polymers	EcoPLA®
	Chronopol	Haplon™
	Hygail	PLA
	Neste	Poly(L-lactide)
	PURAC	PURASORB® PL/PD/PDL
Poly(vinyl alcohol) (PVOH)	Idroplast	Hydrolene®
	Novon	Aqua-NOVON®
	Planet Polymer	Aquadro™
	Texas Polymer	Vinex™

10.1.3. Quelle voie de synthèse ?

La technique la plus employée pour la synthèse de gélatine poreuse seule²⁰¹ ou de composites gélatine-céramique est la lyophilisation²⁰² dont un exemple de la morphologie obtenue est présenté en Figure 10-1. Cependant ce procédé ne permet pas de contrôler les tailles de pores et d'interconnexions, son inconvénient majeur étant de conduire à des tailles de pores faibles pour des applications en ingénierie osseuse. Par exemple, Gentile *et al.* ont réalisé des scaffolds, ayant pour phase organique un mélange de gélatine et de chitosan et pour phase minérale un verre bioactif, par le procédé de lyophilisation²⁰³. Ces scaffolds possèdent des tailles de pores majoritairement inférieures à 200 - 300 µm. Avec le même type de composites, Peter *et al.* ont obtenu des tailles de pores comprises entre 150 et 300 µm²⁰⁴. De plus, comme le montre la Figure 10-1, la forme des pores n'est pas régulière et même plutôt anarchique.

L'utilisation de billes de polymères comme agent porogène serait préférable. En effet, cette technique, utilisée avec des billes de plusieurs centaines de micromètres, a montré une bonne efficacité pour la synthèse de céramiques probablement grâce au frittage qui consolide le matériau final (2.2.2.1.2, Page 45). L'élaboration de composites devrait être possible puisque la phase organique (gélatine) devrait permettre une meilleure résistance aux contraintes engendrées par l'étape de séchage. Toutefois, contrairement à la majorité des cas exposés

dans la littérature pour l'élaboration de céramiques, l'élimination des billes par traitement thermique est impossible car cela éliminerait aussi la phase organique du matériau composite. Pour appliquer cette méthode, il convient donc de trouver une association bille-phase organique-solvant qui permette de dissoudre les billes sans endommager la phase organique (choisie qui est de la gélatine pour sa grande bioactivité). Une association efficace a été trouvée en associant des billes de PMMA, de l'acétone et de la gélatine. En effet, l'acétone est un solvant du PMMA mais pas de la gélatine qui ne devrait donc pas être altérée pendant l'étape de dissolution des billes.

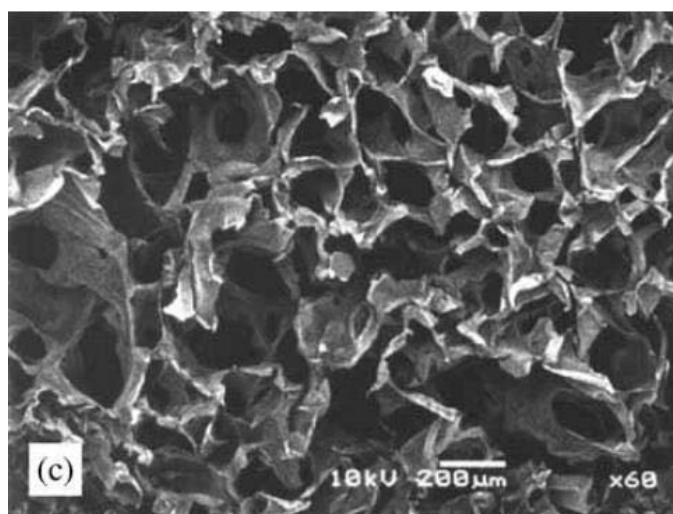


Figure 10-1 : Cliché MEB d'un composite de gélatine et de β -TCP obtenu par le procédé de lyophilisation²⁰⁵

10.2. Etude préliminaire des composites verre-gélatine

10.2.1. Elaboration et caractérisation

10.2.1.1. Voie de synthèse

Les composites gélatine-poudre de verre sont élaborés selon le protocole présenté en Figure 10-2 et Figure 10-3. De la poudre de verre 75 (7.1.1, Page 143) est broyée avec un broyeur planétaire et tamisée avec un tamis de 50 μm . La poudre obtenue est ensuite mélangée avec des billes de PMMA de diamètre compris entre 200 et 400 μm . De la gélatine de porc (type A) est ajoutée à de l'eau distillée à 35°C, après 10 minutes d'agitation permettant la dissolution de la gélatine, la solution obtenue est prélevée et ajoutée au mélange poudre-billes.

La concentration de la poudre de gélatine dans l'eau ainsi que la proportion de verre par rapport à la gélatine sont ajustées pour réaliser trois scaffolds différents. Les scaffolds composites, notés SC75, sont tous élaborés à partir d'une poudre de verre de composition 75SiO_2 - 25CaO (en pourcentage massique), les lettres A, B et C correspondent à trois compositions différentes du composite final. (Tableau 10-2). Le mélange est versé dans des tubes en polyéthylène dans lesquels il est tassé de manière à compacter les billes et à chasser le surplus de gélatine et de verre. Les tubes sont ensuite laissés ouverts à l'air ambiant pendant 24 heures pour permettre l'évaporation de l'eau et la gélification de la gélatine. Les composites gélatine-billes-poudre sont ensuite immergés dans de l'acétone pendant 6 heures sous agitation, puis 24 heures dans de l'acétone renouvelé, toujours sous agitation, afin d'éliminer les billes de PMMA par dissolution. Des scaffolds macroporeux aux murs composés d'un mélange de gélatine et de verre bioactif sont alors obtenus (Figure 10-4).

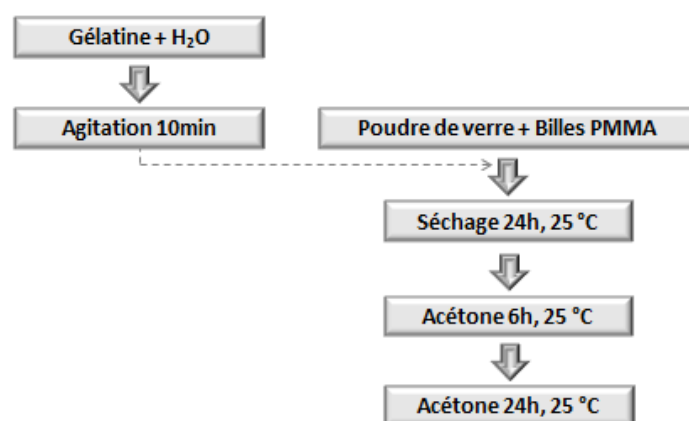


Figure 10-2 : Représentation schématique du procédé d'élaboration des scaffolds composite verre bioactif-gélatine

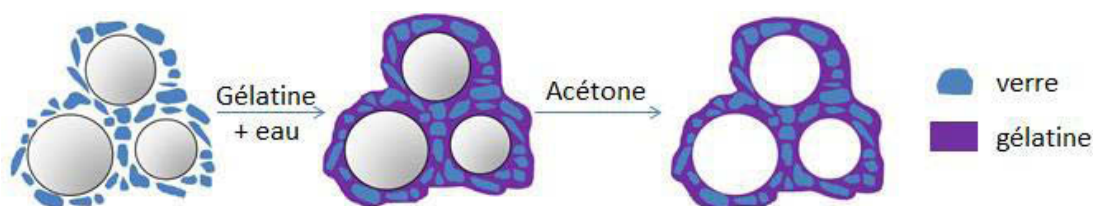


Figure 10-3 : Schéma des différentes étapes conduisant à l'obtention du scaffold composite : dans un premier temps les billes et la poudre de verre sont mélangées puis un mélange d'eau et de gélatine est ajouté et après immersion dans l'acétone les billes sont éliminées

Tableau 10-2 : Quantités de produits utilisés pour la synthèse de scaffolds composites

	Concentration gélatine dans eau (g/mL)	Rapport massique verre / gélatine
SC75-A	0,2	70/30
SC75-B	0,1	60/40
SC75-C	0,1	80/20

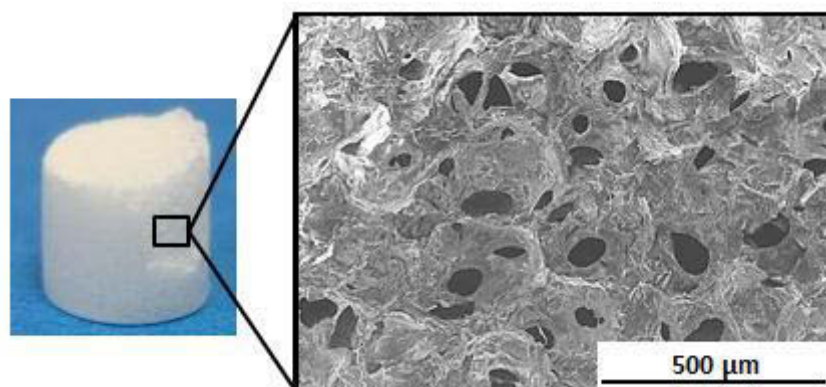


Figure 10-4 : Photographie et clichés MEB du scaffold composite SC75-B

10.2.1.2. Caractérisation de la macroporosité

La Figure 10-5 indique une distribution de tailles de pores assez resserrée, entre 100 et 300 μm , provenant de la distribution étroite des billes ainsi que des tailles de pores comparables pour les deux composites SC75-A et SC75-B (les distributions pour SC75-C ne sont pas représentées car elles sont similaires à celles des autres scaffolds et gêneraient la lecture des graphiques). Ces distributions étroites montrent l'intérêt de cette méthode d'élaboration de scaffolds pour le contrôle fin de la porosité, et permet d'éviter la formation de pores au diamètre trop important qui ne présentent pas vraiment d'intérêt biologique mais détériorent les propriétés mécaniques.

Cependant, lors des observations par MEB, il semble ressortir que la proportion des interconnexions n'est pas la même pour tous les scaffolds. Afin d'estimer la réalité de cette observation et l'éventualité de son influence sur la réactivité du matériau il est intéressant de connaître la proportion d'interconnexions des scaffolds. Pour cela les interconnexions et les pores visibles sur les clichés MEB sont comptés pour chaque cliché et pour chaque composite. Il en résulte un nombre d'interconnexions par pore de $0,5 \pm 0,1$ pour SC75-A, de $1,3 \pm 0,03$

pour SC75-B et de $0,56 \pm 0,09$ pour SC75-C. Cette différence provient vraisemblablement de la plus grande viscosité du mélange obtenu pour SC75-A qui contient de la gélatine moins diluée que celle de SC75-B lors de la synthèse, de même que la viscosité du mélange pour SC75-C est plus élevée du fait de la proportion plus importante de poudre. Le compactage des billes est donc moins aisé et conduit à la formation de moins d'interconnexions. La mise en forme de SC75-B qui contient un mélange plus fluide (gélatine moins concentrée et fraction inorganique moins importante) conduit à une structure plus interconnectée.

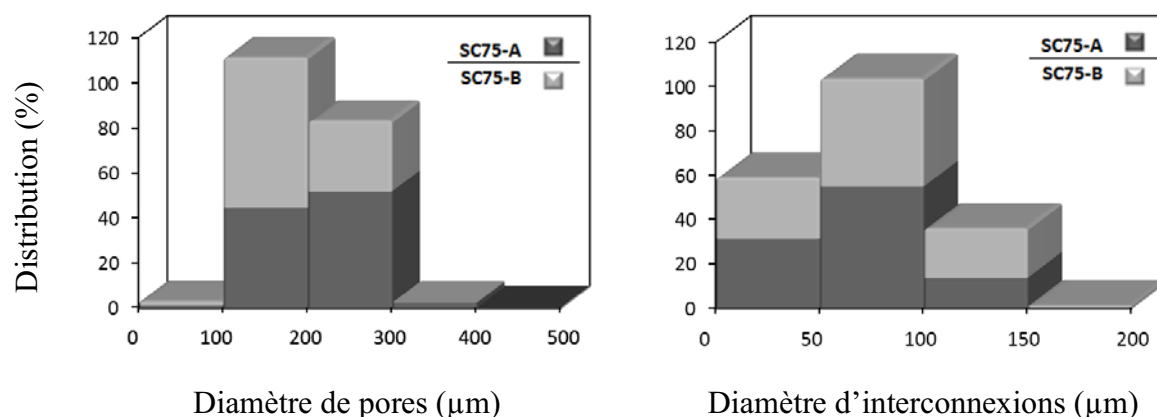


Figure 10-5 : Distribution des diamètres de pores (gauche) et d'interconnexions (droite)

10.2.2. Etude morphologique

Afin de mieux comprendre la structure des composites à l'échelle des grains de verre qui le composent, les composites ont été inclus en résine, coupés en sections et analysés par micro-PIXE. Les cartographies élémentaires montrent la répartition des grains de verre dans les murs des trois composites (Figure 10-6, Figure 10-7 et Figure 10-8). Les cartographies du calcium et du silicium permettent d'imager facilement les grains, par contre il n'est pas possible de réaliser de cartographie de la matrice de gélatine, celle-ci étant constituée d'éléments organiques non détectables avec le détecteur PIXE utilisé.

Les cartographies ainsi obtenues semblent montrer que les composites qui contiennent le plus de verre (SC75-A et SC75-C) présentent des murs épais qui contiennent de nombreux grains alors que SC75-B possède des murs plus fins, souvent de la largeur d'un grain (Figure 10-7). Le scaffold SC75-A qui a été réalisé avec le mélange gélatine - eau le plus concentré semble montrer des murs plus compacts que ceux de SC75-C qui contient pourtant plus de verre.

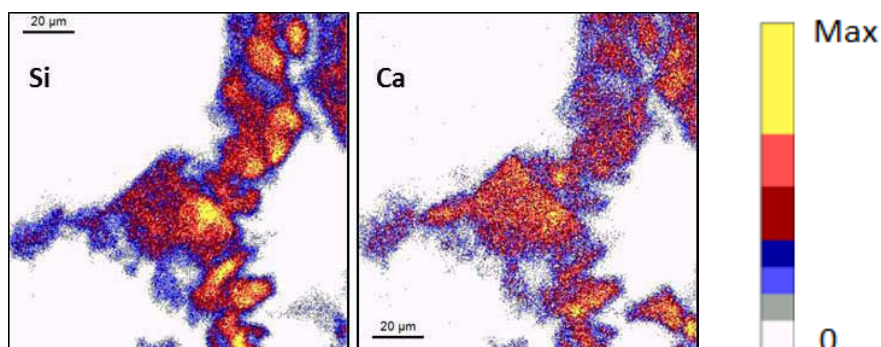


Figure 10-6 : Cartographies élémentaires d'une section de SC75-A

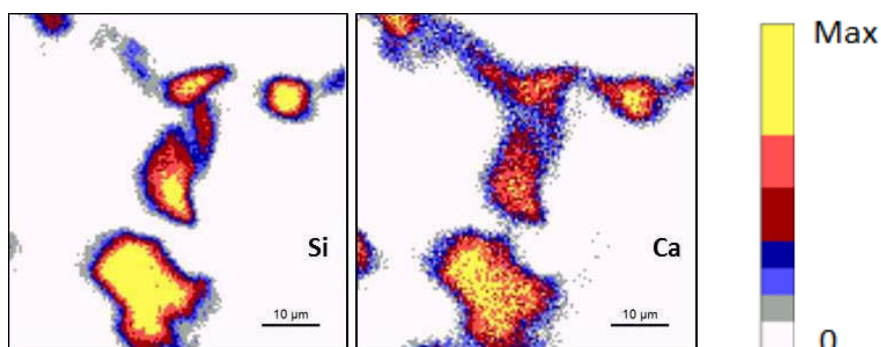


Figure 10-7 : Cartographies élémentaires d'une section de SC75-B (il est à noter que ces cartographies présentent une barre d'échelle différente de celles des Figure 10-6 et 10-8)

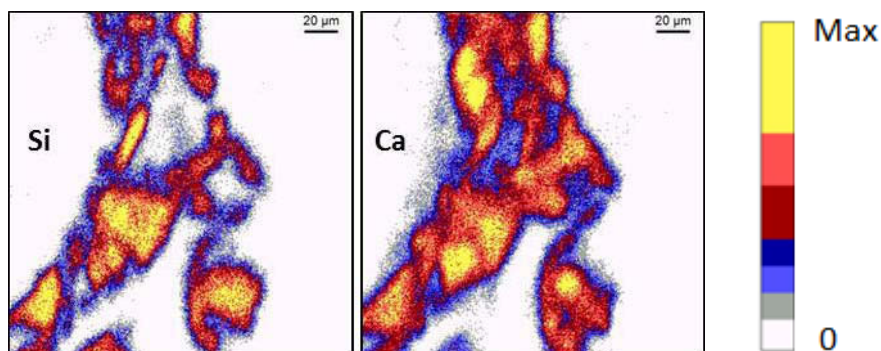


Figure 10-8 : Cartographies élémentaires d'une section de SC75-C

10.2.3. Premiers essais mécaniques

La Figure 10-9 montre les essais comparés de SC75-B et d'une mousse de verre bioactif (4.1.1, Page 85). Cet essai a été réalisé avec un analyseur mécanique DMA 2980 (Dynamic Mechanical Analyser) avec l'application d'une contrainte en compression suivant une rampe de 1 N/min jusqu'à 18 N à 37°C.

Une meilleure résistance à la compression pour le scaffold composite verre bioactif - gélatine que pour la mousse de verre pur est obtenue confirmant l'intérêt de l'utilisation de la phase organique pour l'obtention de meilleures propriétés mécaniques. En effet, la mousse de verre fissure par paliers, SC75-B présente un module d'Young comparable mais la contrainte limite élastique est beaucoup plus élevée de même que la capacité à se déformer.

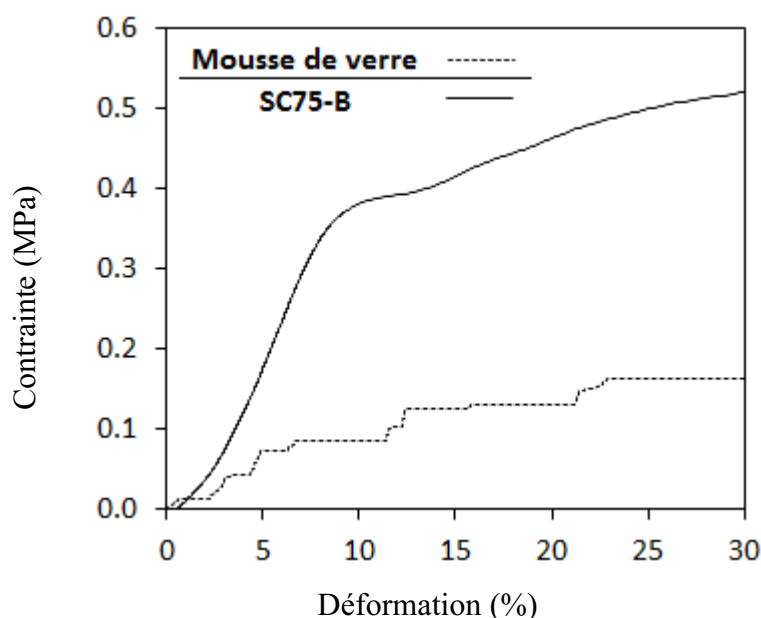


Figure 10-9 : Essais mécaniques en compression comparés d'une mousse de verre bioactif et de SC75-B

10.2.4. Réactivité et résistance à la dissolution

Les trois scaffolds sont immergés dans du SBF pour étudier leur résistance à la dissolution. Après seulement 5 heures d'immersion SC75-B présente une diminution de volume importante et un effondrement de la structure macroporeuse (Figure 10-11). A l'inverse, même après 1 jour d'immersion dans le SBF, SC75-A a conservé sa structure macroporeuse (Figure 10-10). Cette différence peut s'expliquer soit par la quantité de poudre de verre plus importante soit par la plus grande concentration de la gélatine dans l'eau utilisée lors de la synthèse. L'aspect plutôt effondré de SC75-C, qui contient plus de verre que SC75-A, après 1 jour d'immersion (Figure 10-12) semble montrer une influence plus importante de la concentration de la gélatine lors de la synthèse qui augmente la tenue à la dissolution du scaffold. Cet effet pourrait être relié à la morphologie des murs observée précédemment puisque le composite résistant le mieux à la dissolution est celui ayant les murs les plus épais (SC75-A) et les plus compacts alors que le scaffold qui résiste le moins bien est celui

possédant les murs les plus fins (SC75-B). SC75-C possède une résistance intermédiaire probablement grâce à la quantité importante de verre qu'il contient. Cependant, la réactivité ainsi observée est très inhomogène puisqu'elle conduit à des murs totalement transformés et à d'autres murs inaccessibles au fluide, probablement à cause de la plus faible proportion d'interconnexions.

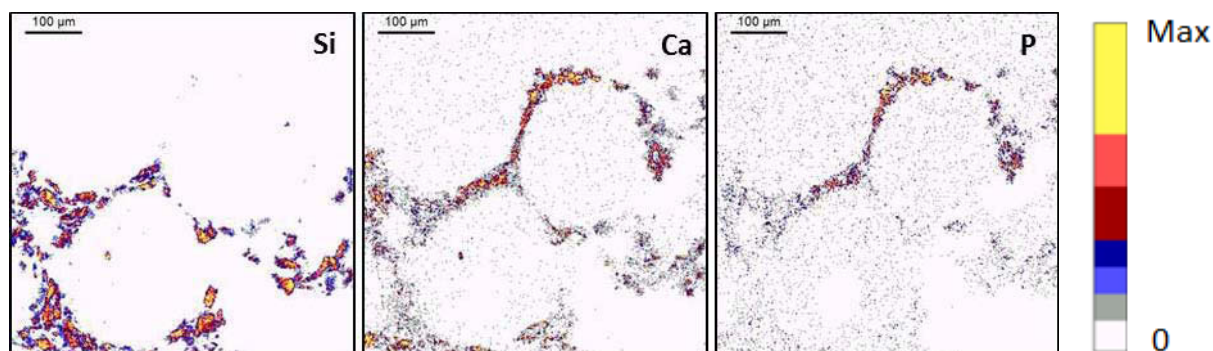


Figure 10-10 : Cartographies élémentaires du silicium, du calcium et du phosphore de SC75-A après 1 jour d'immersion dans le SBF

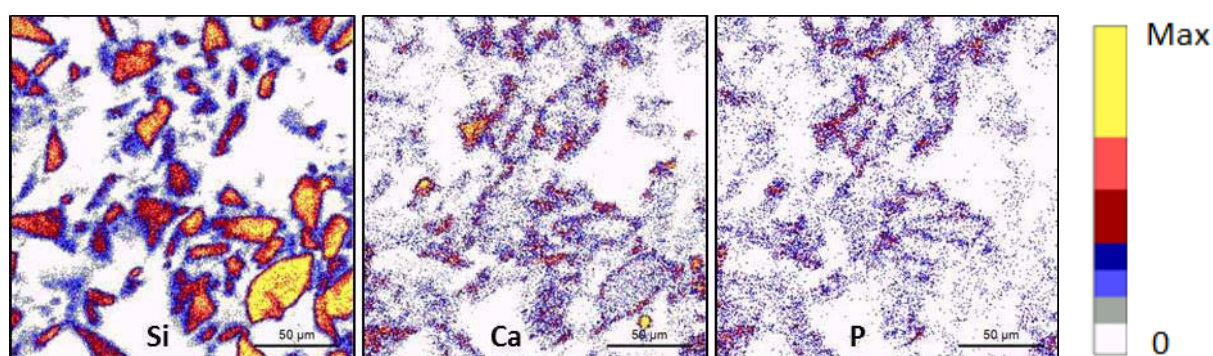


Figure 10-11 : Cartographies élémentaires du silicium, du calcium et du phosphore de SC75-B après 5 heures d'immersion dans le SBF

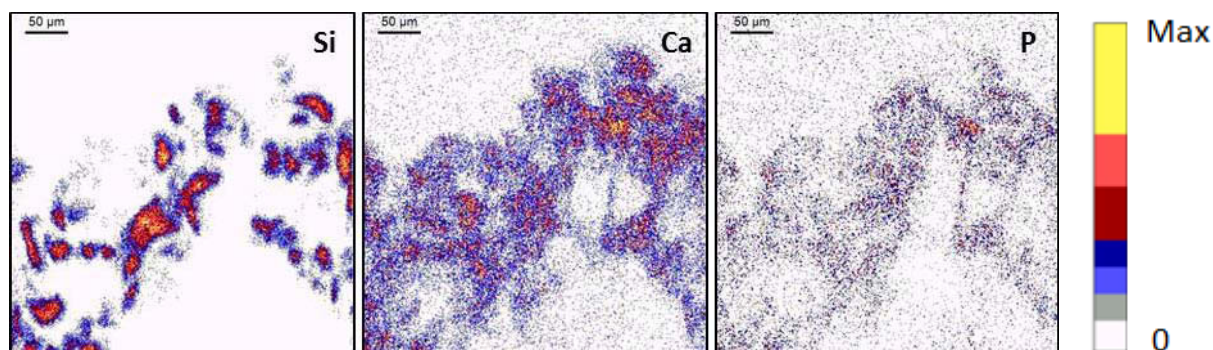


Figure 10-12 : Cartographies élémentaires du silicium, du calcium et du phosphore de SC75-C après 1 jour d'immersion dans le SBF

10.3. Conclusion

Lors de la synthèse de SC75-B une solution de gélatine plus diluée et une quantité moindre de poudre de verre sont utilisées par rapport à SC75-A et SC75-C ce qui conduit à une structure plus interconnectée et qui semble plus prometteuse pour des applications en ingénierie tissulaire. En effet, SC75-A réagit de manière inhomogène. Cependant, si SC75-A maintient sa structure macroporeuse après 1 jour d'immersion dans le SBF, vraisemblablement grâce à l'épaisseur plus importante de ses murs, ce n'est pas le cas de SC75-B qui présente un effondrement de sa structure. Une voie de stabilisation de la gélatine permettant d'augmenter sa résistance à la dissolution, ce qui est hautement souhaitable, sera donc recherchée et étudiée dans la suite de ce travail.

Chapitre 11 Etude *in vitro* du scaffold composite à matrice gélatine réticulée

11.1. Réticulation de la gélatine

Le scaffold SC75-B semble montrer une structure prometteuse mais sa faible tenue lorsqu'il est immergé dans un milieu aqueux rend impossible son utilisation en l'état. Le problème majeur de la résistance du scaffold tient au gonflement et au ramollissement de la gélatine dans un milieu aqueux. Afin d'améliorer la résistance à la dissolution des composites, la gélatine a été réticulée en immergeant SC75-B pendant 24 heures dans une solution aqueuse de glutaraldéhyde (GA) à 1 %²⁰².

La gélatine est une macromolécule biologique obtenue par hydrolyse du collagène et composée de différents acides aminés qui forment des chaînes imbriquées les unes dans les autres. Les différents acides aminés sont à l'origine des différentes fonctions chimiques portées par la gélatine (Figure 11-1) et par réaction de ces fonctions avec une espèce chimique, appelée agent de réticulation, il est possible de créer des liaisons covalentes entre les chaînes. L'agent de réticulation utilisé au cours de ce travail est le glutaraldéhyde, porteur de groupements carbonyles ($-C=O$) qui vont réagir par addition nucléophile avec les groupements amines ($-NH_2$) portés par la lysine (un des acides aminés de la gélatine) selon le schéma présenté en Figure 11-2.

La réticulation correspond donc à la formation de liaisons entre des chaînes polymères. La réticulation des polymères dérivés de protéines (collagène, gélatine, élastine) permet donc d'en augmenter la résistance mécanique ainsi que la stabilité structurale, et par conséquent, la dégradation rapide dans un environnement aqueux peut être évitée²⁰⁶. En effet, la vitesse de dégradation des biopolymères diminue avec le taux de réticulation. Par exemple, Bulgarelli *et al.* ont réalisé une étude des vitesses de dégradation de billes de gélatine et de caséine dans de l'eau après réticulation dans du glycéraldéhyde²⁰⁷. La Figure 11-3 montre que la dégradation diminue avec l'augmentation du temps d'immersion des billes dans l'agent réticulant et donc avec le taux de réticulation.

Une fois la réticulation réalisée, le scaffold est rincé à l'eau et à l'acétone puis séché (Figure 11-4), il sera alors noté SC75-B+GA. D'autres agents réticulant auraient pu être envisagés tels que la génipine²⁰⁸, des proanthocyanidiens oligomériques²⁰⁹, des carbodiimides ou encore des dérivés de l'acide citrique.

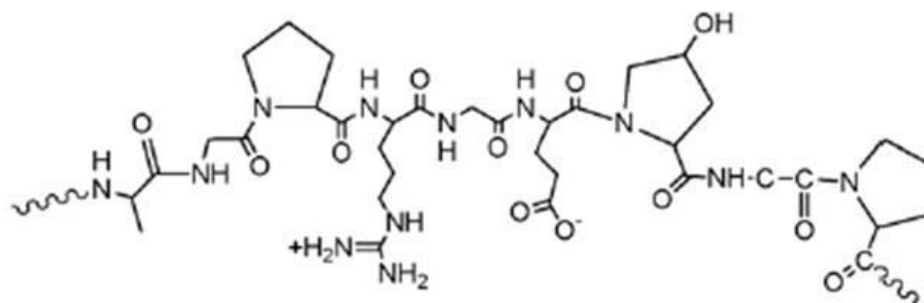


Figure 11-1 : Unité de base de la gélatine²¹⁰

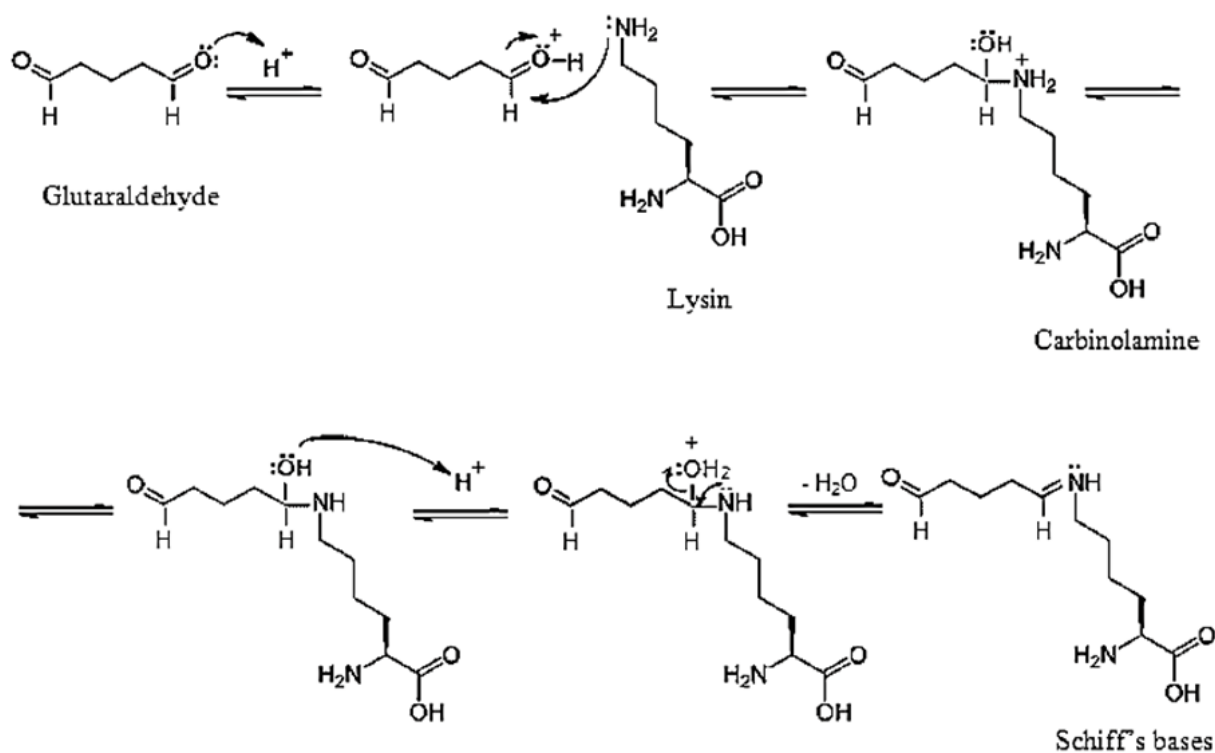


Figure 11-2 : Mécanisme de réticulation de la gélatine par du glutaraldéhyde²¹¹

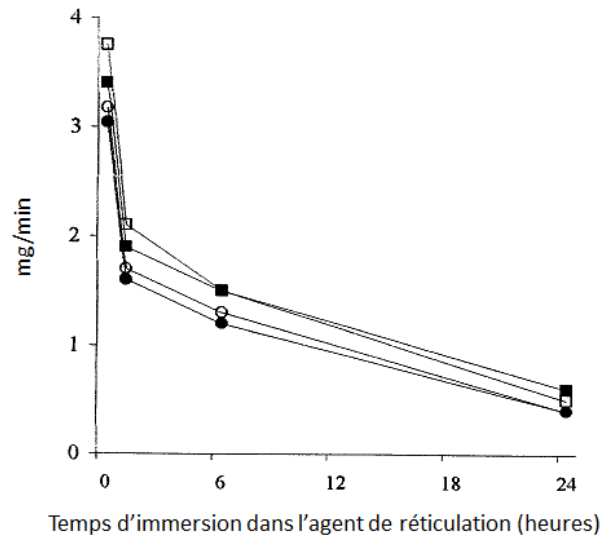


Figure 11-3 : Vitesse de dégradation (mg/min) de billes de caséine et de gélatine en fonction du temps de réticulation pour différents rapports gélatine / caséine²⁰⁷



Figure 11-4 : Cliché optique d'un scaffold gélatine-verre bioactif avant (gauche) et après (droite) immersion 24 heures dans une solution de glutaraldéhyde

11.2. Evolution du SBF lors de l'immersion du scaffold composite

La Figure 11-5 montre qu'il n'y a pas de différence majeure d'évolution de la composition du SBF que le composite soit traité ou non au glutaraldéhyde. Il est à noter que SC75-B ne présente des points sur ce graphique que jusqu'à un jour puisqu'au-delà de ce délai, le scaffold se disloque dans le SBF. Au contraire, une fois traité au glutaraldéhyde, l'intégrité du composite est conservée même après 5 jours d'immersion. Ces résultats montrent que le traitement au glutaraldéhyde ne semble pas modifier la réactivité du composite mais permet bien d'améliorer la résistance à la dissolution puisque le scaffold récupéré après 5 jours d'immersion a conservé son intégrité.

Les courbes montrent que même inclus dans une matrice de gélatine, le verre se dissout, libérant ainsi du calcium et du silicium dans le milieu. De plus, la diminution de la

concentration en calcium à partir d'1 jour d'immersion associée à la diminution importante de la concentration en phosphore semble attester de la précipitation de phosphates de calcium à la surface du composite. Cette couche semble incorporer du magnésium comme en témoigne la diminution de sa concentration dans le milieu.

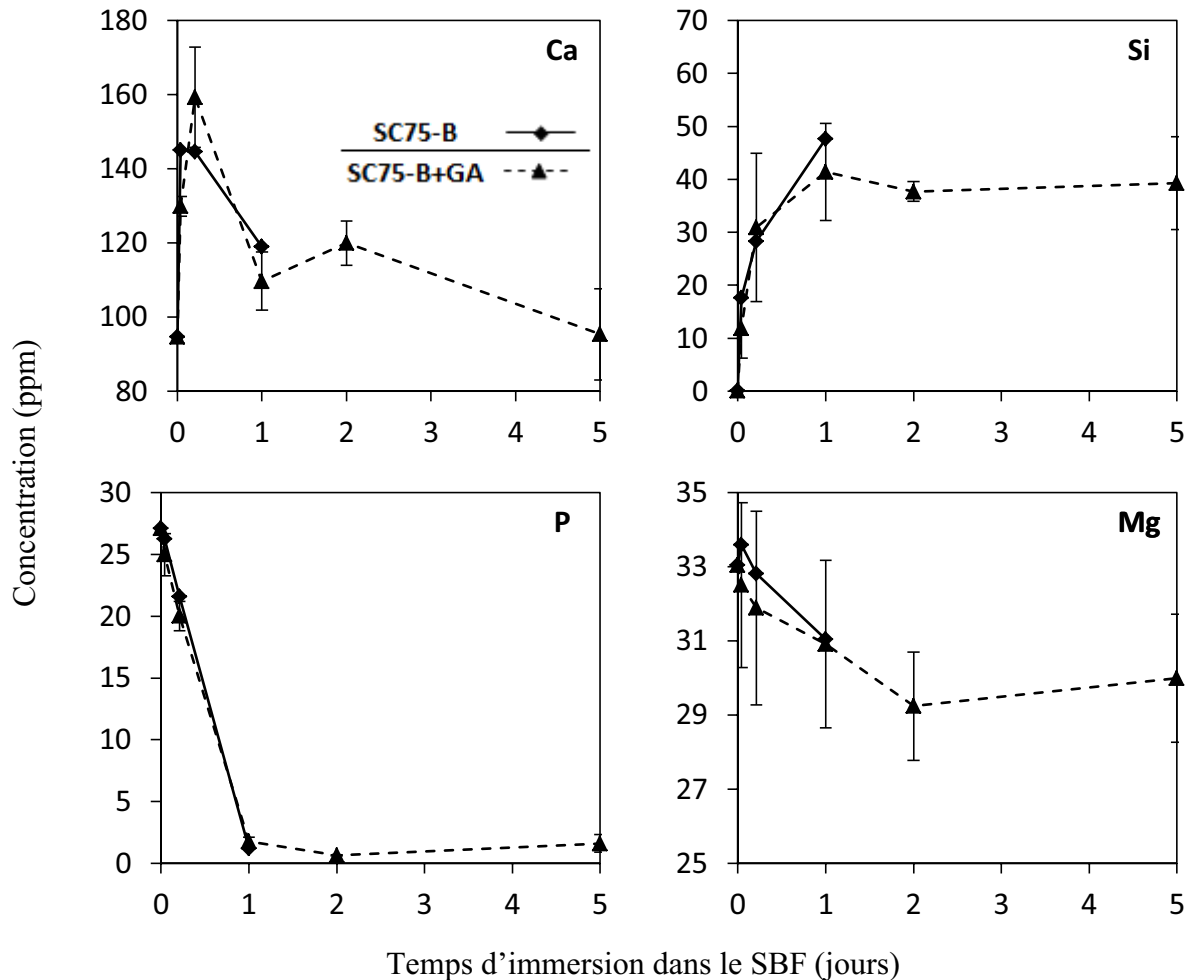


Figure 11-5 : Evolutions des concentrations mesurées par ICP-AES en phosphore, silicium, calcium et magnésium dans le SBF au cours de l'immersion de SC75-B traité ou non au glutaraldéhyde

11.3. Cartographies élémentaires

Les cartographies élémentaires du composite avant immersion dans le SBF (Figure 11-6) montrent la répartition des grains dans les murs et l'importante porosité présente dans le matériau. Les cartographies obtenues après 5 jours d'immersion dans le SBF (Figure 11-7) montrent les murs de gélatine qui se recouvrent de phosphates de calcium ainsi que des grains contenant encore beaucoup de silicium et de calcium, et des grains contenant surtout du

phosphore et du calcium, cela semble attester de la bioactivité de SC75-B+GA. La réactivité de SC75-B, attendue plus homogène que SC75-A au vu du plus grand nombre d'interconnexions par pore, a conduit à le réticuler afin d'augmenter sa résistance à la dissolution. Cet objectif a été atteint puisque la structure poreuse a été maintenue même après 5 jours d'immersion dans le SBF. De plus, la réactivité de SC75-B+GA est bien homogène avec le dépôt d'une couche phosphocalcique à la surface des pores démontrant l'influence du nombre des pores sur la circulation du fluide en plus de leur taille.

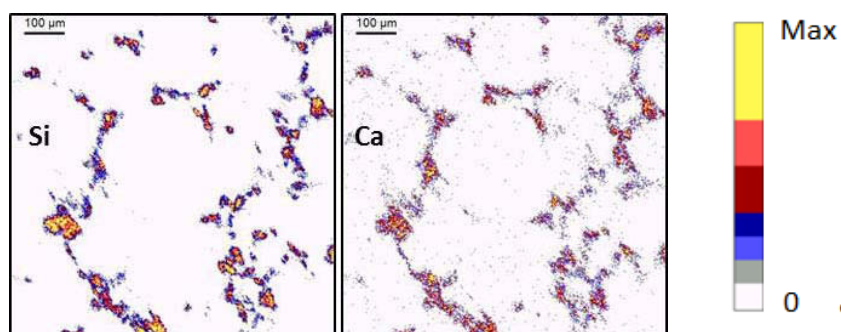


Figure 11-6 : Cartographies élémentaires de SC75-B+GA avant immersion dans le SBF

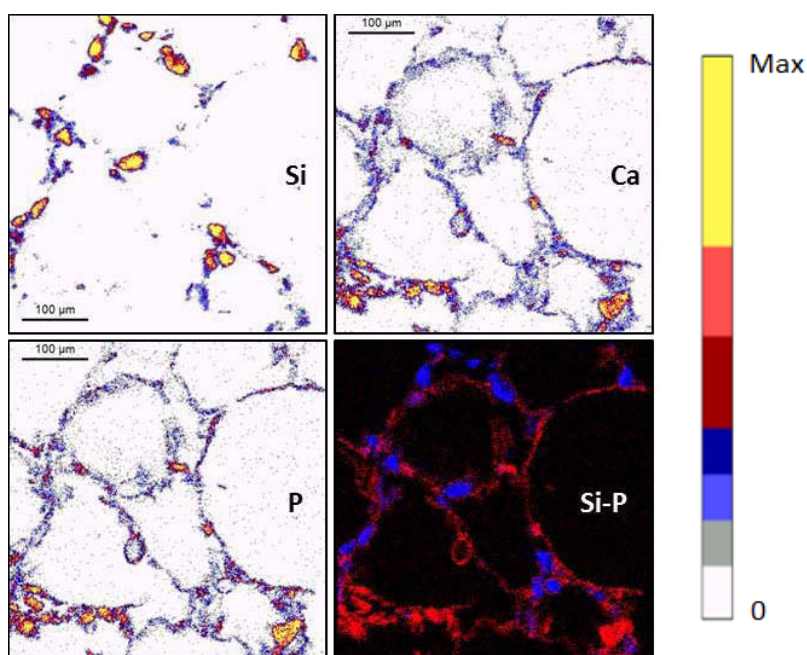


Figure 11-7 : Cartographies élémentaires obtenues après 5 jours d'immersion de SC75-B+GA dans le SBF et superposition des cartographies du silicium et du phosphore

11.4. Mesures locales de concentration

Les mesures locales de concentration à l'intérieur des grains (Figure 11-8) montrent une diminution rapide de la concentration en calcium jusqu'à 1 jour d'immersion du composite dans le SBF. Cette diminution est cohérente avec l'augmentation rapide de calcium observée dans le SBF, elle est aussi responsable de l'augmentation de la concentration en silicium à l'intérieur des grains de verre. Ces observations montrent que les grains de verre, malgré leur inclusion dans une matrice de gélatine, peuvent réagir jusqu'à leur cœur en libérant des éléments d'intérêt biologique, ici le calcium et le silicium, mais aussi éventuellement d'autres éléments tels que le strontium qui peuvent être introduits dans la poudre de verre.

De plus, la quantité importante de phosphore présente à l'intérieur des grains de verre et la présence de magnésium confirment cette capacité du verre à réagir de la même manière que s'il était immergé directement dans le SBF. L'incertitude de mesure (qui correspond à l'erreur type sur la moyenne) sur cette concentration est importante après 1 et 5 jours d'immersion dans le SBF à cause de la différence de réactivité entre les grains qui ne sont pas identiques en taille et sont inclus dans des murs de tailles différentes. Ainsi les grains les plus petits et les grains contenus dans les murs les plus fins réagissent plus vite et plus en profondeur que les plus gros grains.

Les évolutions de concentrations locales à la surface du composite (Figure 11-9) montrent l'augmentation rapide des concentrations en calcium et en phosphore qui correspondent à la couche de phosphate de calcium qui se forme à la surface du scaffold composite. Cette couche incorpore aussi du magnésium. La concentration importante en phosphore à la surface du scaffold après seulement 1 jour d'immersion témoigne du potentiel bioactif important de ce composite.

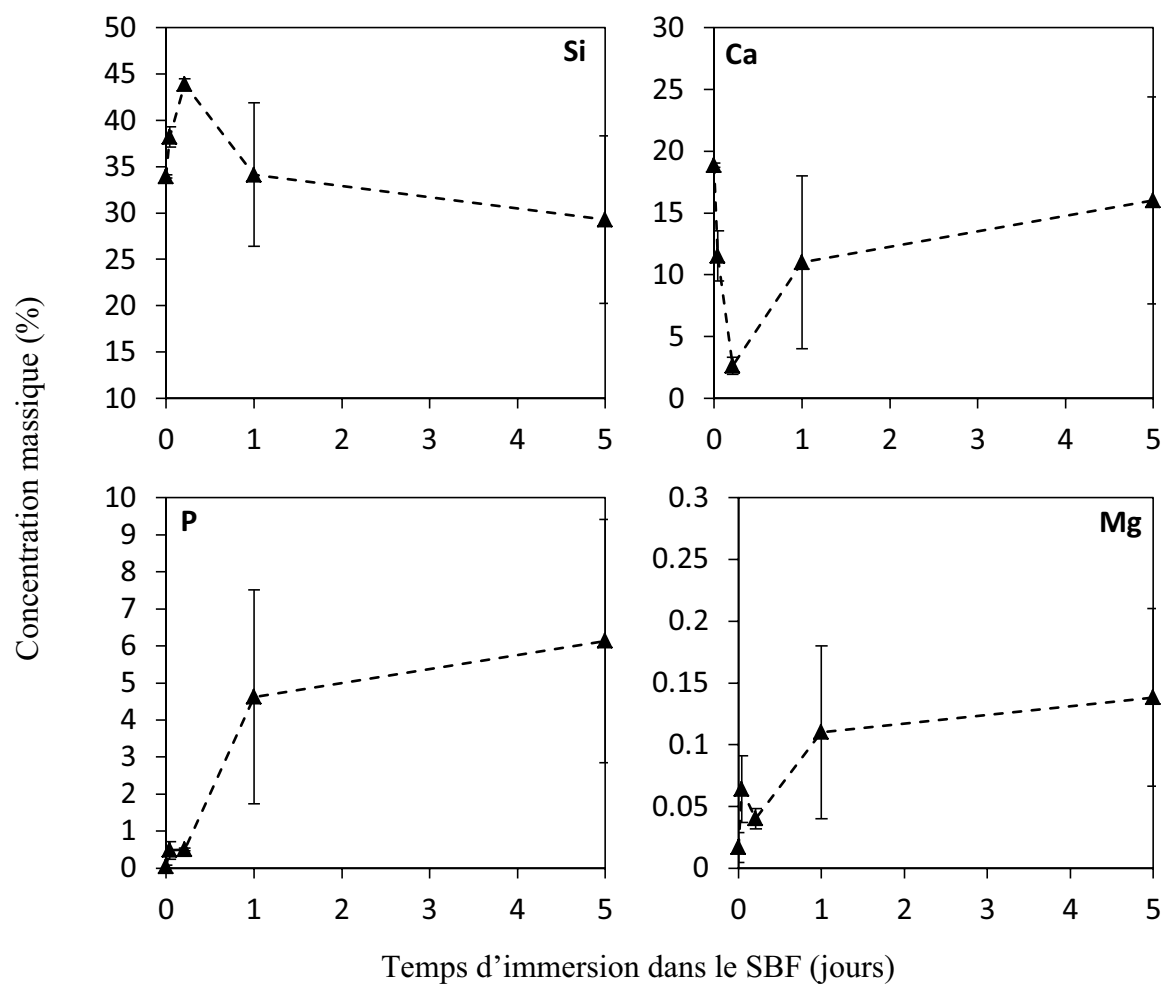


Figure 11-8 : Mesures locales de concentrations au cœur des grains de SC75-B-GA

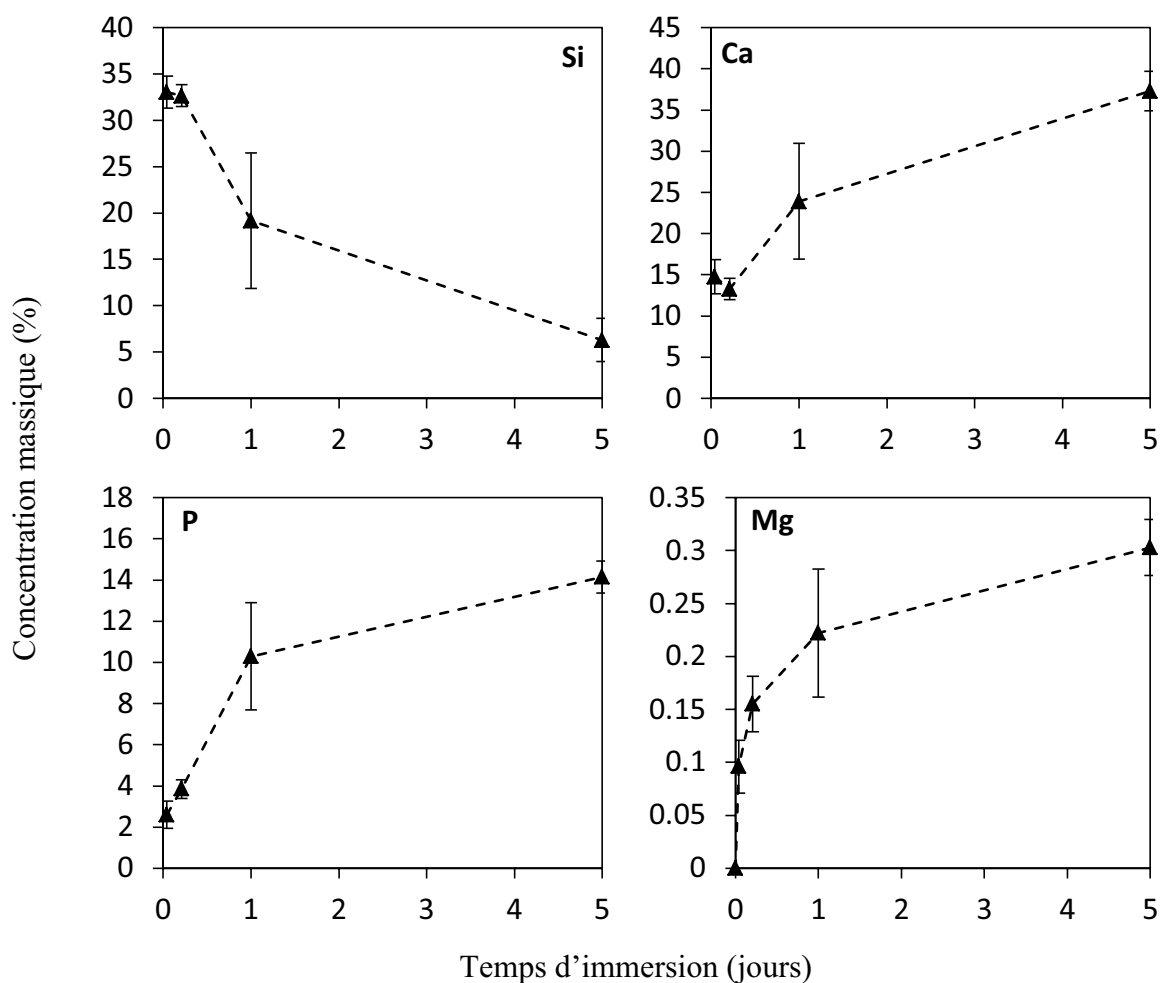


Figure 11-9: Mesures locales de concentrations dans la couche de phosphates de calcium de SC75-B-GA

11.5. Conclusion

L'élaboration de scaffolds composites à la porosité contrôlée a donc pu être réalisée par l'utilisation ingénieuse de l'association gélatine-acétone-billes PMMA et une demande de brevet d'invention a été déposée sur la base de ces travaux²¹². La bioactivité *in vitro* du composite a été mise en évidence par l'étude de son comportement lors de l'immersion dans le SBF. L'utilisation du glutaraldéhyde pour réticuler la gélatine permet effectivement d'améliorer la tenue à la dissolution des scaffolds, puisque la structure poreuse et l'intégrité du scaffold sont conservées même après 5 jours d'immersion dans le SBF. Il est intéressant de remarquer qu'une couche de phosphate de calcium se dépose à la surface de la gélatine qui sert de matrice au composite mais que le verre à l'intérieur des murs réagi lui aussi permettant le relargage d'éléments chimiques ayant un intérêt biologique.

Conclusions générales et perspectives

Les besoins croissants en greffes osseuses sont à l'origine de nombreux travaux de recherche dans ce domaine. L'ingénierie tissulaire est une méthode permettant d'obtenir des greffes à partir de cellules, de facteurs de croissance et d'un support appelé scaffold. Les caractéristiques optimales du scaffold ne sont pas encore bien connues et peuvent varier en fonction des cas (site d'implantation, taille et forme du défaut, patient, ...), ses propriétés doivent donc pouvoir être ajustées. Dans cet objectif, différents scaffolds ont été élaborés et caractérisés au cours de ce travail.

Dans un premier temps des mousses de verre bioactif binaire aux macroporosités différentes ont été comparées. L'ajustement de la macroporosité possible grâce au procédé de moussage a permis d'obtenir une mousse apparemment prometteuse grâce à des essais *in vitro* et à l'utilisation de la méthode PIXE. Un agent de gélification (la gélatine) a été proposé et utilisé avec succès pour la réalisation de mousses de verre sans acide fluorhydrique (HF), un réactif hautement toxique. Ce procédé présentant une gélification plus lente du réseau de verre a, de plus, permis de mésostructurer la porosité de la mousse de verre contrairement aux mousses réalisées avec du HF comme catalyseur pour lesquelles la gélification rapide empêche l'organisation des pores. Des premiers essais d'implantation *in vivo* d'une mousse de verre binaire ont montré sa biocompatibilité et sa capacité à permettre l'invasion cellulaire. L'étude par la méthode PIXE de l'interface os – verre a montré des différences significatives de composition en éléments traces entre les vestiges de verre, l'os néoformé et l'os ancien, cette étude n'étant possible que grâce à la grande sensibilité de la méthode PIXE.

Dans un deuxième temps, du strontium a été introduit dans les verres bioactifs en tant qu'agent thérapeutique pour sa capacité à stimuler la formation osseuse et à inhiber sa résorption. La substitution d'une partie du calcium du réseau par du strontium conduit à une diminution de la vitesse de dissolution du réseau en induisant une cristallisation partielle, ce qui n'est pas le cas lorsque du HF est employé comme catalyseur. Ce résultat souligne la grande influence du catalyseur sur les propriétés finales du verre, et plus particulièrement du HF qui, de plus, provoque une augmentation de la surface spécifique du verre. Pour les verres réalisés sans HF, des ajouts trop importants de strontium (supérieure à 5% massique de SrO) conduisent à une diminution notable de la vitesse de formation d'une couche phosphocalcique.

Une mousse au strontium a ensuite été réalisée, elle a montré sa capacité à relarguer localement du strontium lors de sa dissolution. De manière intéressante, le strontium s'accumule dans la couche phosphocalcique qui précipite à la surface du verre créant ainsi un

réservoir local pouvant servir tout au long du processus de résorption du verre et de régénération de l'os. Ce résultat a priori prometteur pour des applications biologiques est à relier à l'observation de la capacité d'une poudre de verre (contenant 5% de SrO) implantée *in vivo* à agir localement en s'insérant dans l'os néoformé au contact du verre. L'utilisation du strontium dans les verres bioactifs semble donc très prometteuse.

Dans la dernière partie de ce travail, une mise en forme différente des verres bioactifs a été proposée par la réalisation de composites poudre de verre - matrice gélatine à la porosité plus finement contrôlée que par le procédé de moussage. L'utilisation d'une phase organique permet l'amélioration des propriétés mécaniques de l'implant qui est le point faible des scaffolds de verre. Ces scaffolds ont montré leur capacité à permettre la précipitation d'une couche phosphocalcique à leur surface ainsi que leur capacité de relargage des éléments constitutifs du verre qui ont un effet bénéfique sur la régénération osseuse (calcium et silicium).

De ce travail peuvent se dégager un certain nombre de perspectives tant du point de vue des matériaux que de celui des techniques de caractérisation. En effet, les améliorations constantes apportées à la ligne nano-faisceau du CENBG, permettront bientôt d'utiliser la méthode PIXE en trois dimensions (tomo-PIXE), ce qui sera particulièrement adapté à l'étude de scaffolds. De plus, même si une étude par analyse multimodale a été mise en place pour les échantillons biologiques, l'intérêt de cette approche encourage à poursuivre son développement. Enfin, l'installation prochaine de deux détecteurs de rayons X supplémentaires portera à quatre le nombre de ces détecteurs (deux vers l'avant de l'échantillon et deux vers l'arrière pour les échantillons fins). L'angle solide sera alors multiplié jusqu'à quatre pour les échantillons minces ce qui permettra (en sommant les résultats des détecteurs) de réduire le temps d'analyse, d'augmenter la qualité des images et d'avoir une meilleure quantification des éléments traces.

Du point de vue des matériaux, les premiers essais *in vivo* montrent un comportement très prometteur des mousses de verre et l'implantation d'une mousse de verre au strontium permettrait de confirmer l'intérêt de l'ajout de cet élément dans les verres bioactifs, de plus, l'implantation sur des délais plus importants que ceux réalisés (jusqu'à 1 an) permettrait d'évaluer le devenir à long terme du matériau. Au contraire du strontium qui est incorporé au réseau, il est possible d'adsorber des agents thérapeutiques (comme des médicaments) dans les mésopores d'un verre. Grâce à la mésostructuration possible des mousses réalisées sans

HF il serait possible de contrôler le relargage de ces espèces. Néanmoins, la surface spécifique de la mousse obtenue est étonnamment faible pour un tel matériau. Une partie de la porosité semble donc bouchée et des études sur l'élimination des phases organiques utilisées au cours de cette synthèse semblent nécessaires.

Enfin, de nombreuses études restent à faire sur les matériaux composites, la taille des particules de verre utilisées pourrait être réduite à quelques micromètres, voir pourrait être inférieure au micromètre dans le but de réaliser des nanocomposites dans lesquels les grains de verre ne seraient pas discernables de la phase organique. L'étude des propriétés mécaniques en milieu humide des scaffolds réticulés permettrait de confirmer l'intérêt de la réticulation, qui de plus devra prouver son innocuité vis-à-vis de l'organisme hôte de l'implant. Enfin, la gélatine elle-même pourrait permettre l'incorporation d'agents thérapeutiques à relargage local.

Annexe : Théorie de l'imagerie chimique quantitative par micro- faisceaux d'ions

1.1.L'interaction ions - matière

Lorsque des ions sont envoyés sur un matériau ils pénètrent à l'intérieur et interagissent avec la matière. De ces interactions peuvent découler des modifications des propriétés du matériau et les faisceaux d'ions peuvent être utilisés dans cet objectif. Le but sera alors l'obtention d'un matériau différent du matériau de départ. Il peut s'agir d'implanter des ions pour réaliser un dopage, ou bien de générer un endommagement volontaire pour obtenir une amorphisation ou une transformation de phase, de la lithographie peut aussi être réalisée²¹³. Les analyses par faisceaux d'ions, quant à elles, regroupent toutes les techniques d'étude des particules ou des émissions secondaires issues de l'interaction entre les ions du faisceau et les noyaux ou les électrons des atomes de l'échantillon.

Il est intéressant de noter qu'au cours de leur trajet dans l'échantillon les ions incidents vont être ralentis par deux phénomènes : les collisions nucléaires élastiques et les collisions électroniques inélastiques²¹⁴. La prédominance de l'un de ces phénomènes dépend de la vitesse de l'ion incident. Aux énergies utilisées couramment en analyses par faisceaux d'ions (de 0.5 à 5 MeV) les ions ont une vitesse importante et interagissent principalement avec les électrons conduisant à une forte ionisation. Leur grande différence de masse conduit à une faible déviation du faisceau incident permettant d'avoir une trajectoire quasiment rectiligne. Les ions sont donc progressivement ralentis et, en arrivant au terme de leur parcours, ils interagissent avec les noyaux, ces interactions risquant cette fois de grandement modifier la trajectoire du faisceau.

Le parcours des ions dans l'échantillon dépend donc de ces deux interactions, cet effet est exprimé par le pouvoir d'arrêt S qui représente la perte d'énergie par unité de longueur traversée (x en cm) soit²¹⁵:

$$S = \left| \frac{dE}{dx} \right| \text{ en MeV.cm}^{-1} \quad (1-1)$$

Ou, en prenant en compte la densité du matériau :

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

Puisque le ralentissement provient de deux interactions différentes le pouvoir d'arrêt correspond à la somme des pouvoirs d'arrêt nucléaire et électronique :

$$\frac{dE}{dx} = \left(\frac{dE}{dx} \right)_{\text{électronique}} + \left(\frac{dE}{dx} \right)_{\text{nucléaire}} \quad (1-3)$$

Le pouvoir d'arrêt dû aux interactions nucléaires est négligeable aux énergies utilisées en analyse par faisceaux d'ions.

Le parcours des ions dans la matière R peut être exprimé grâce au pouvoir d'arrêt :

$$R = \int_{E_0}^0 \frac{dE}{|dE/dx|} \quad (1-4)$$

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

Les pouvoirs d'arrêt de nombreux éléments sont connus, toutefois, pour des matrices comportant plusieurs éléments il convient d'appliquer une loi de Bragg qui considère que la perte d'énergie dans la matrice est la somme des pertes d'énergies dues à chaque élément constitutif de la matrice proportionnellement à son abondance exprimée par la fraction massique de l'élément (w_i) :

$$S = \sum_{i=1}^n w_i \left[\frac{dE}{dx} \right]_i \quad (1-5)$$

1.2. Les différentes techniques d'analyse par faisceaux d'ions

Le parcours des ions dans la matrice va déterminer l'épaisseur de pénétration du faisceau dans la matrice. Sur toute cette épaisseur, des réactions se produisent et donnent lieu à différentes émissions secondaires (voir Figure 1-1).

Différentes techniques d'analyses vont correspondre à l'étude de ces émissions. Le grand avantage de ces techniques d'analyse par faisceau d'ions est que, ces émissions se produisant simultanément, elles peuvent être étudiées au cours d'une seule analyse. Correspondant à différents phénomènes, il est alors possible d'obtenir des informations complémentaires^{216, 217}.

- **PIXE** : Particles Induced X-ray Emission ou émission X induite par particules chargées.

Cette technique ayant été utilisée au cours de ce travail de thèse, elle sera décrite de manière détaillée par la suite.

- **RBS** : Rutherford Backscattering Spectrometry ou Spectrométrie de rétrodiffusion de Rutherford.

Cette technique est basée sur l'étude de la perte d'énergie de la particule incidente lorsqu'elle subit un choc élastique au contact de l'atome cible. En effet, à cause des interactions avec le champ coulombien électrostatique de l'atome cible, la particule perd de l'énergie et cette

diminution est liée à la masse de l'ion incident ainsi qu'à la masse et à la profondeur de l'atome cible dans la matrice. En mesurant le nombre et l'énergie des ions rétrodiffusés il est donc possible d'obtenir des informations sur la nature des atomes constitutifs de l'échantillon, leur concentration et leur position en profondeur.

La spectrométrie de rétrodiffusion est généralement utilisée en couplage avec la méthode PIXE afin de déterminer l'épaisseur de la cible ainsi que la charge déposée qui sont des informations nécessaires à la quantification pour des échantillons semi-épais. Au cours de ce travail tous les échantillons ont été préparés sous forme de cibles épaisses. L'analyse par RBS n'a donc pas été nécessaire.

- **PIGE/NRA** : Particles Induced Gamma-ray Emission ou émission gamma induite par particules chargées / Nuclear Reaction Analysis ou analyse par réactions nucléaires

Des ions avec des énergies de l'ordre de quelques MeV sont susceptibles de passer la barrière coulombienne des noyaux des éléments légers constitutifs de l'échantillon. En effet, les énergies des ions incidents ne sont pas suffisantes pour vaincre la répulsion coulombienne des éléments lourds. Dans ce cas des réactions nucléaires ont lieu et les énergies des particules (NRA) ou des rayonnements γ (PIGE) émis sont caractéristiques des éléments de l'échantillon cible.

- **STIM** : Scanning Transmission Ion Microscopy ou Microscopie ionique à balayage en transmission.

La méthode STIM repose sur l'étude de la perte d'énergie que subit le faisceau en traversant l'échantillon, cela impose évidemment de travailler avec des échantillons suffisamment fins pour qu'ils puissent être traversés par le faisceau. L'analyse de l'énergie des ions traversant permet de réaliser des cartographies en contraste de densité.

- **ERDA** : Elastic Recoil Detection Analysis ou Analyse par détection des atomes de recul

Au contraire de la méthode RBS qui analyse le projectile rétrodiffusé après un choc élastique, il est possible d'étudier les atomes de recul éjectés de l'échantillon par ce même choc. En effet, initialement immobiles, les atomes de masses inférieures à celle du projectile vont se voir transférer une énergie et vont être éjectés de l'échantillon. C'est le principe de la méthode ERDA qui s'applique donc principalement à des éléments légers, elle est particulièrement utilisée pour l'étude de l'hydrogène.

- **IL** : Ionoluminescence

Lors du bombardement d'une matrice par des ions, des rayonnements visibles peuvent être émis, de manière analogue au phénomène de cathodoluminescence qui a lieu lors de l'analyse par faisceaux d'électrons. L'intensité et la longueur d'onde de ces rayonnements dépendent de la présence de centres émetteurs tels que des substituants à l'état de traces ou encore de défauts structuraux²¹⁸.

Il est intéressant de noter que plusieurs de ces techniques sont complémentaires de la méthode PIXE et ont déjà été utilisées pour l'étude d'os. Par exemple, la substitution du calcium par du manganèse dans du minéral osseux a été étudiée par l'association des méthodes PIXE et d'Ionoluminescence²¹⁹. De même, les méthodes PIXE et PIGE ont été utilisées conjointement pour l'étude d'ossements archéologiques²²⁰.

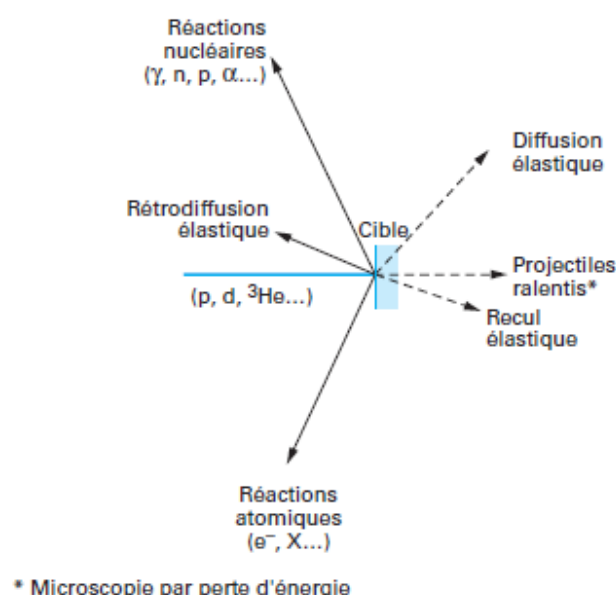


Figure 1-1: Représentation des différents rayonnements / particules résultants de l'interaction d'un ion incident avec une cible¹²⁸

1.3.Principe de la méthode PIXE

1.3.1. Théorie

La méthode PIXE repose sur le principe de fluorescence X, mais contrairement à une analyse par spectrométrie de fluorescence X, l'arrachement d'un électron dans les couches profondes du cortège électronique des atomes composant l'échantillon se fait par bombardement d'ions.

Suite au bombardement ionique, des lacunes électroniques peuvent être créées, la position interne de ces lacunes rend l'atome instable et des transitions électroniques en provenance de

couches plus externes vont s'opérer pour revenir à un état plus stable. Deux phénomènes concurrents peuvent avoir lieu pour libérer le surplus d'énergie généré par la transition d'un électron vers une couche de plus basse énergie : l'émission d'un photon X ou l'émission d'un électron Auger.

Si la transition qui s'opère est radiative, le surplus d'énergie est directement émis sous forme d'une radiation X (**a** sur la Figure 1-2). Si la transition n'est pas radiative, le surplus d'énergie est utilisé pour éjecter un électron appelé électron Auger (**b** sur la Figure 1-2). Les transitions radiatives permises sont celles autorisées par les règles de sélection suivantes :

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

Où n est le nombre quantique principal

l est le nombre quantique associé au moment angulaire orbital

J est le nombre quantique associé au moment angulaire total

Dans le cas de l'analyse PIXE, seules les radiations qui donnent lieu à une émission de rayons X, c'est-à-dire les transitions radiatives, sont intéressantes. Ces transitions sont représentées sur la Figure 1-3. Elles sont classées en différentes séries en fonction de la couche dans laquelle se situe la lacune, ainsi les raies K correspondent à des transitions d'une couche supérieure vers la couche K. A l'intérieur d'une série, les raies sont classées en fonction de la couche de départ de l'électron qui effectue la transition. Il est intéressant de noter que les transitions n'ont pas toutes la même probabilité d'existence, ainsi, les raies $K\alpha$ et $K\beta$ sont généralement les plus probables, de plus, les raies $K\alpha$ sont généralement plus probables que les $K\beta$.

L'énergie de la radiation émise est égale à la différence entre les énergies des deux niveaux impliqués dans la transition. Les niveaux d'énergies étant quantifiés, les énergies des radiations observées sont dépendantes de la nature de l'élément émetteur (de numéro atomique Z) selon la loi de Moseley :

$$E = C(Z - s)^2 \quad (1-6)$$

Où C et s sont des constantes dépendant du type de raie ($K\alpha$, $K\beta$, ...).

Ainsi chaque élément de l'échantillon va émettre une série de raies, correspondants aux différentes transitions possibles, l'étude de ces raies permettra l'analyse de la composition de l'échantillon. Cette étude se fera principalement grâce aux raies K et L comme le montre la Figure 1-4. Le choix de l'une ou l'autre des raies est fait en fonction du numéro atomique des éléments constitutifs de l'échantillon ainsi que des caractéristiques du détecteur utilisé.

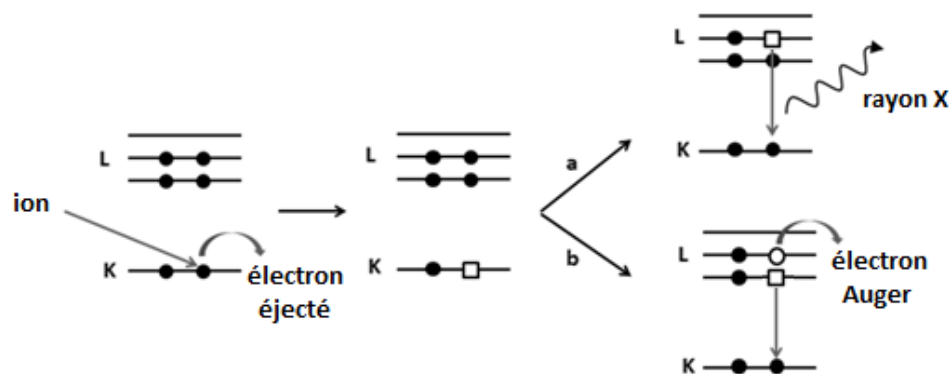


Figure 1-2 : Représentation schématique des déplacements électroniques à l'origine du phénomène d'émission de fluorescence X **(a)** ou de l'émission d'électron Auger **(b)**

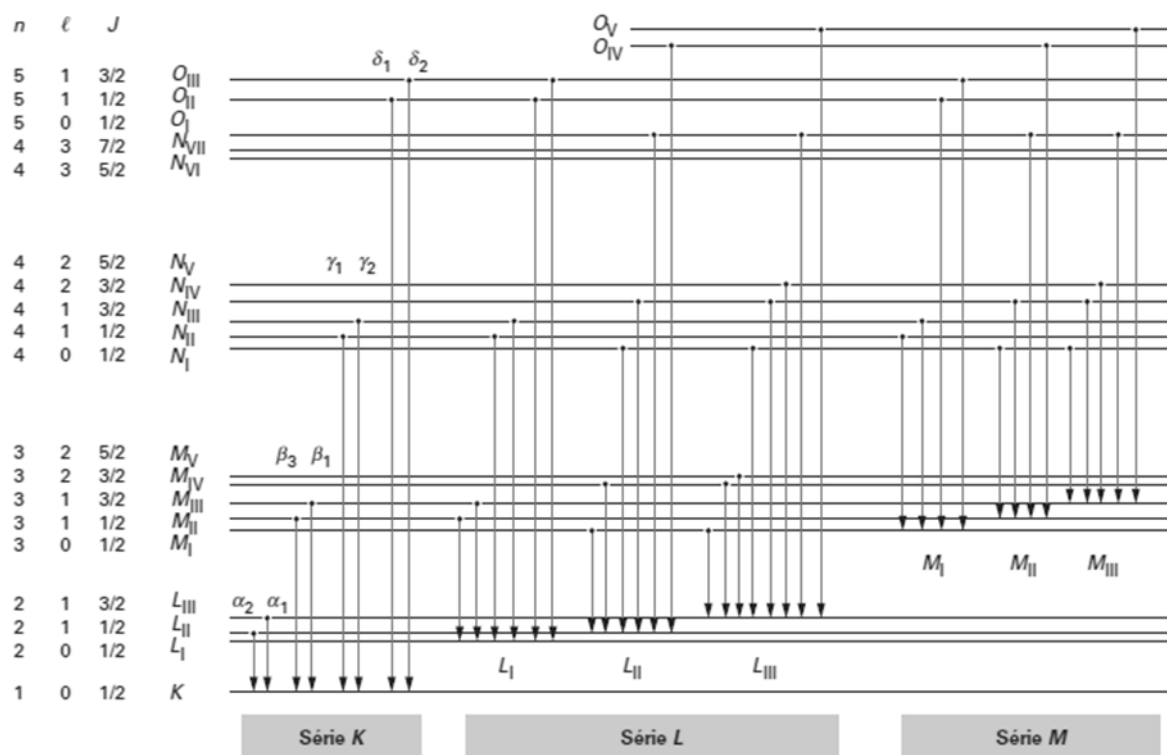


Figure 1-3 : Principales transitions radiatives pouvant donner lieu à un phénomène de fluorescence X

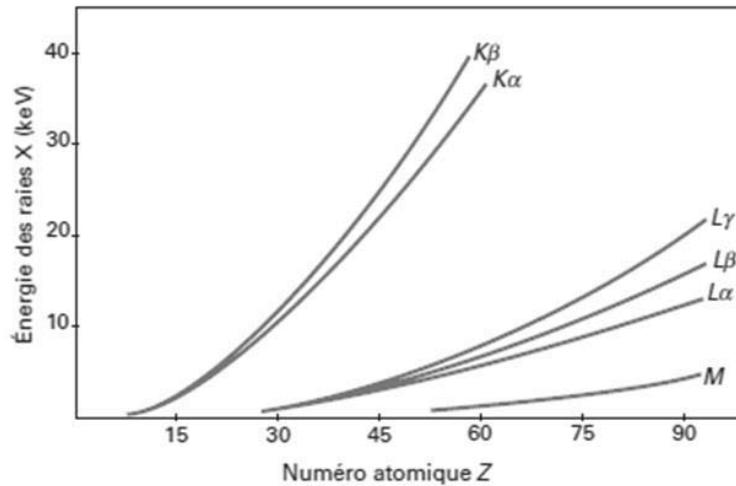


Figure 1-4: Energies d'émission des raies de fluorescence en fonction du numéro atomique de l'élément émetteur²²¹

1.3.2. Rendement de fluorescence

Comme expliqué précédemment, le phénomène d'émission d'une radiation X est en concurrence avec l'émission d'un électron Auger. La prédominance de l'un des deux phénomènes sur l'autre est caractérisée par le rendement de fluorescence ω_k . Ce paramètre correspond à la probabilité pour qu'une lacune créée dans une couche donne lieu à l'émission d'un photon X. Il peut encore être défini comme le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de lacunes créées dans la couche. Il dépend de la nature de l'élément ainsi que de la couche impliquée.

De nombreuses mesures expérimentales du rendement de fluorescence de la couche K ont été réalisées et ont permis l'établissement d'une loi semi-empirique permettant son expression en fonction du numéro atomique Z de l'élément émetteur. Cette loi varie selon les auteurs, une version courante a été exprimée par Burhop²²²:

$$\left(\frac{\omega_k}{1-\omega_k}\right)^{1/4} = A + BZ + CZ^3 \quad (1-7)$$

Plusieurs valeurs des paramètres A, B et C ont été obtenues²²³. Les valeurs calculées par cette formule sont proches des valeurs expérimentales et théoriques compilées par Krause^{224, 225}.

La Figure 1-5 montre l'évolution du rendement de fluorescence en fonction du numéro atomique. Cette courbe montre que le rendement de fluorescence est faible pour les éléments de faible numéro atomique et élevé pour les éléments de numéro atomique élevé, ainsi les

éléments lourds engendreront préférentiellement une émission de photons X alors que les éléments légers seront à l'origine d'une émission majoritaire d'électrons Auger.

A partir de la couche L le rendement de fluorescence est plus difficile à déterminer car un autre phénomène peut se produire. En effet, des transitions non-radiatives peuvent avoir lieu entre les différentes sous-couches, par exemple entre la sous-couche L_I et la sous-couche L_{III} . Ces transitions sont appelées transitions de Coster-Krönig. Il est alors possible de définir trois types de rendements différents : ω , le rendement de fluorescence ; a , le rendement d'émission d'électron Auger et f , le rendement de Coster-Krönig pour lesquels la relation suivante est vérifiée :

$$\omega + a + f = 1 \quad (1-8)$$

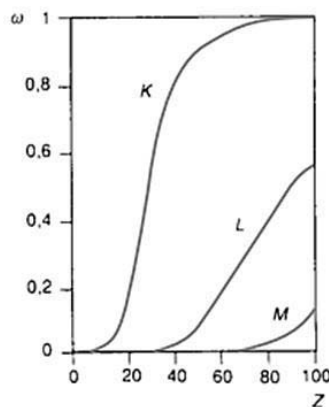


Figure 1-5: Evolution du rendement de fluorescence pour les différentes raies d'émission en fonction du numéro atomique de l'élément émetteur ²²⁶

1.3.3. Sections efficaces

1.3.3.1. Section efficace d'ionisation

La section efficace d'ionisation (σ_S^i) est liée à la probabilité d'ionisation d'une couche atomique S. La Figure 1-6 montre la variation de la section efficace d'ionisation en fonction du numéro atomique de l'élément analysé pour différentes raies et différentes énergies de l'ion incident. Elle peut être calculée par différentes théories dont la plus utilisée est la théorie ECPSSR (Energy Loss, Coulomb fields, Perturbation of the atomic Stationary States, Relativistic effects). Elle est basée sur une théorie plus ancienne, l'approximation de Born en ondes planes (PWBA : Plane Wave Born Approximation).

La théorie PWBA montre déjà une bonne corrélation avec les valeurs de sections efficaces d'ionisation obtenues expérimentalement et prend en compte les observations suivantes (dont les deux premières sont visibles sur la Figure 1-6) :

- Pour une énergie de la particule incidente fixée, σ_S^i décroît rapidement avec l'augmentation de la masse de l'atome.
- Pour un atome donné, σ_S^i augmente avec l'augmentation de l'énergie de la particule incidente jusqu'à atteindre une valeur seuil correspondant à une vitesse de la particule incidente proche de celle de l'électron sur sa couche.
- σ_S^i dépend de l'énergie par nucléon de l'ion incident (E/A) et varie en $(E/A)^4$. Cette dépendance justifie l'utilisation de protons (particules plus légères) dans le but d'optimiser la section efficace d'ionisation.

Actuellement la théorie la plus utilisée, la théorie ECPSSR, apporte différentes corrections par rapport à l'approximation de Born en ondes planes en prenant en compte²²⁷ :

- La perte d'énergie pendant la collision (E)
- La déflection et le changement de vitesse de l'ion incident à cause du champ coulombien (C)
- La perturbation des états atomiques stationnaires par l'ion incident (PSS)
- Les effets relativistes (R)

Ce dernier modèle montre une meilleure corrélation avec les valeurs expérimentales de section efficace d'ionisation²²⁸.

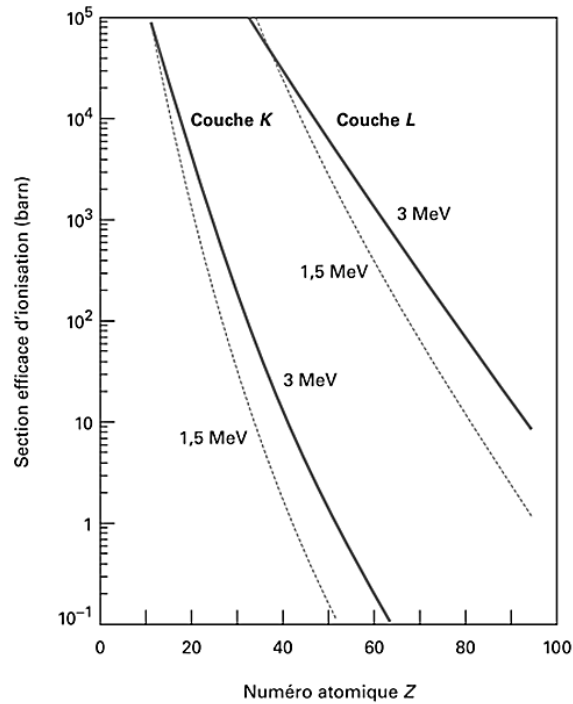


Figure 1-6 : Evolution de la section efficace d'ionisation en fonction du numéro atomique de l'élément analysé pour des protons²²¹

1.3.3.2. Section efficace totale de production des rayons X

La section efficace de production d'une raie X concernant une transition radiative ayant lieu sur la couche S, notée σ_S^X , est un paramètre influant le nombre de rayons X détectés lors de l'analyse par PIXE, elle permet de mesurer l'efficacité de production des rayons X et peut être exprimée de la manière suivante :

$$\sigma_S^X = \sigma_S^i \omega_S k \quad (1-9)$$

Où : σ_S^i est la section efficace d'ionisation et ω_S le rendement de fluorescence, ces deux termes ont été exposés précédemment

k est l'intensité relative d'émission de la raie X

La Figure 1-7, qui représente l'évolution de la section efficace de production des raies K en fonction de l'énergie des ions incidents, montre que des énergies de l'ordre du MeV permettent d'atteindre une production optimale de rayons X pour les éléments légers et moyens. L'analyse par la méthode PIXE des verres contenant uniquement du silicium et du calcium, ainsi que du phosphore et du magnésium provenant de leur réaction avec un milieu biologique, sera donc réalisée avec un faisceau de protons d'énergie 1,5 MeV.

En revanche, pour les éléments plus lourds, tels que le strontium, l'énergie des ions du faisceau devra être plus importante afin d'optimiser la section efficace de production des raies X. Dans ce but, les échantillons contenant du strontium seront analysés avec un faisceau de protons de 3 MeV.

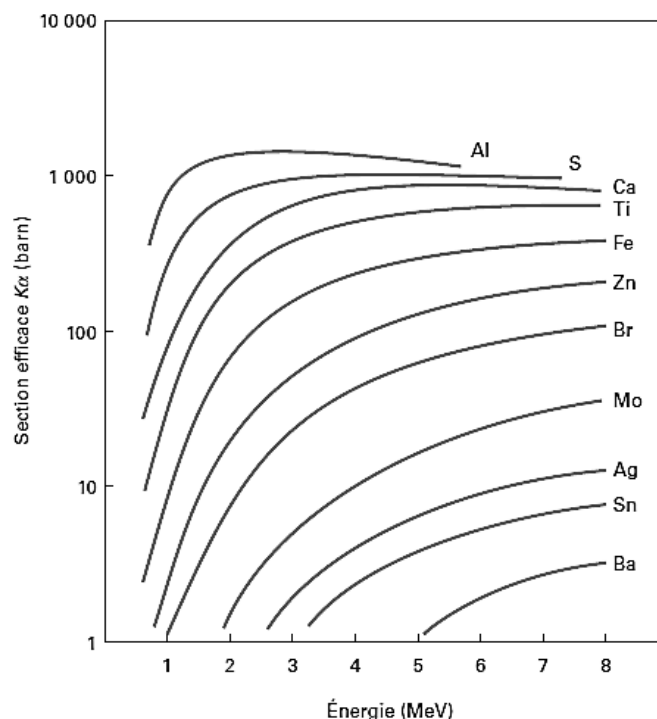


Figure 1-7 : Sections efficaces de production des raies X en fonction de l'énergie des protons incidents pour différents éléments²²¹

1.3.4. Bruit de fond et interférences spectrales lors d'une analyse

Hormis les pics correspondants aux différentes émissions radiatives résultant de l'ionisation des éléments constitutifs de l'échantillon, d'autres événements peuvent provoquer l'observation d'un fond continu ou encore de pics à des énergies ne correspondant pas aux éléments présents dans l'échantillon.

1.3.4.1. Bruit de fond continu

Le bruit de fond continu possède trois causes différentes:

- Le rayonnement de freinage (bremsstrahlung) des électrons secondaires

Cette contribution au rayonnement de freinage est la plus importante, elle provient de la décélération des électrons éjectés par l'ionisation des atomes de la cible. Ces électrons

secondaires sont accélérés, dans un premier temps, au voisinage des noyaux de la cible ce qui provoque l'émission d'un rayonnement électromagnétique, l'énergie de ce rayonnement est prélevée sur l'énergie cinétique de l'électron résultant en sa décélération. L'énergie maximale qu'un proton peut transférer à un électron lors de la collision est donnée par la relation :

$$E_{max} = \frac{4m_e E}{M} \quad (1-10)$$

Où : M est la masse de l'ion incident

m_e est la masse de l'électron

E est l'énergie de l'ion incident.

L'intensité du spectre de freinage dû aux électrons secondaires est très élevée aux faibles énergies mais décroît rapidement pour des énergies supérieures à E_{max} . Le rayonnement de freinage des électrons secondaires a un comportement anisotrope et se trouve à son maximum à 90° par rapport au faisceau de particules incidentes. Les mesures par PIXE ont donc intérêt à être réalisées à un angle le plus élevé possible car une réduction significative du continuum sera alors observée. De plus, la quantité d'ions rétrodiffusés risquant d'atteindre le détecteur sera aussi à son minimum²²⁹.

- Le rayonnement de freinage des ions incidents

Aux plus hautes énergies, le phénomène prédominant est le rayonnement de freinage des particules incidentes (voir Figure 1-8). Ce rayonnement provient de l'accélération de l'ion incident lorsqu'il entre en collision avec les noyaux des atomes de la matrice. La section efficace de ce processus σ est donnée par la relation²³⁰ :

$$\frac{d\sigma}{dE_X} = C \frac{AZ^2 Z_1^2}{EE_X} \left(\frac{Z}{A} - \frac{Z_1}{A_1} \right) \quad (1-11)$$

Où : E_X est l'énergie du rayonnement X émis

A, Z et E sont respectivement la masse, la charge et l'énergie de l'ion incident

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

Il est intéressant de noter dans cette relation que la section efficace est inversement proportionnelle à l'énergie de la particule incidente. De plus, le terme $(Z/A - Z_1/A_1)$ s'annule pour un projectile ayant le même rapport charge / masse que l'atome cible. Pour de nombreuses cibles ce rapport vaut $1/2$, l'utilisation de particule alpha ou bien encore d'ions plus lourds tels que l'oxygène, conduit à la disparition de cette contribution au bruit de fond ce qui n'est pas le cas des protons. Une expérience réalisée par Folkmann *et al.*²³¹, consistant à bombarder du carbone avec des particules alphas et des protons de même énergie par

nucléon, montre que la contribution basse énergie due aux électrons est la même pour les deux particules, par contre, pour les alphas, le bruit de fond à haute énergie est trois fois moins important que celui pour les protons. Cet effet est clairement visible sur la Figure 1-9 où le bruit de fond à haute énergie est plus élevé pour le proton que pour l'ion hélium.

- Des rayons gamma provenant de réactions nucléaires peuvent ensuite céder une partie de leur énergie par diffusion Compton

Une particule incidente d'une énergie suffisamment importante pour exciter le noyau de l'atome cible donnera lieu à l'émission d'une radiation γ . Cette émission dépend aussi de la nature de l'échantillon analysé, certains éléments ayant une section efficace de production des rayonnements γ plus élevée. L'énergie de la particule incidente doit être aussi basse que possible afin de minimiser la contribution des radiations γ au bruit de fond et l'utilisation de protons est préférable puisque, pour une même vitesse, des ions plus lourds auront une plus haute énergie²³⁰. Toutefois, pour des protons ayant des énergies inférieures à 3 MeV, ce phénomène est assez rare²²¹.

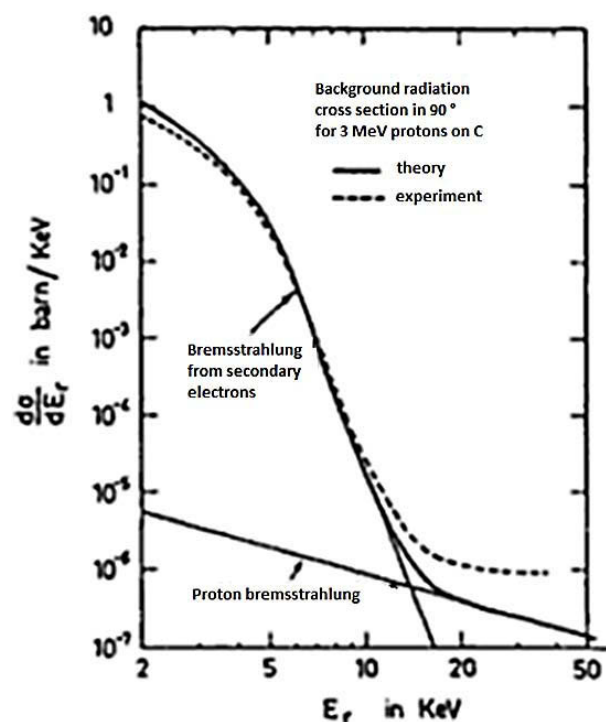


Figure 1-8: Représentation des différentes contributions au bruit de fond continu²³²

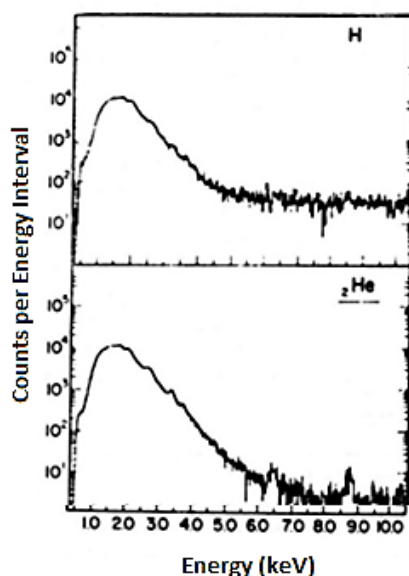


Figure 1-9 : Spectres de rayons X obtenus par le passage de particules de 1,7 MeV/u à travers un film de mylar de 530 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (d'après²³⁰)

1.3.4.2. Fluorescence secondaire

Le phénomène de fluorescence secondaire apparaît lorsqu'une raie est émise de manière très intense par l'échantillon, les nombreux photons obtenus risquent d'interagir avec les atomes de l'échantillon. Si l'énergie de ces photons est supérieure à l'énergie d'ionisation d'autres atomes de l'échantillon, alors ces atomes peuvent être ionisés à leur tour (photoionisation) et émettre une raie X appelée fluorescence secondaire. Négliger ce phénomène dans le traitement des données conduirait à une erreur de calcul des concentrations des éléments de l'échantillon, la fluorescence secondaire est donc un phénomène pris en compte dans les logiciels de traitement de données et plus particulièrement par le code GUPIX qui a été utilisé dans le cadre de ce travail de thèse et qui sera présenté par la suite (3.6.1.2.2, Page 72)²³³.

1.3.4.3. Empilement et échappement

Deux autres phénomènes se produisant au niveau du détecteur de photons X peuvent être à l'origine de parasites sur les spectres enregistrés : l'empilement et l'échappement.

Il y a empilement lorsque deux photons X arrivent en même temps sur le détecteur. Leurs deux énergies sont détectées en même temps ce qui donne lieu à un pic correspondant à la somme de ces deux énergies.

Il y a échappement lorsque les photons qui pénètrent dans le détecteur provoquent une ionisation proche de la surface du détecteur au silicium. Dans ce cas, le photon X de l'atome

de silicium ionisé peut s'échapper avant d'avoir pu déposer son énergie dans le détecteur, générant une collecte de charges incomplète. L'énergie mesurée correspond alors à l'énergie du photon incident moins l'énergie manquante du photon X caractéristique du silicium (1,74 keV).

Bibliographie

-
- ¹ 1st Biomaterials Consensus Conference, 1986, Chester, UK
- ² 2nd Biomaterials Consensus Conference, 1992, Chester, UK
- ³ Schmidt R., *Traité des matériaux, Comportement des matériaux dans les milieux biologiques, Applications en médecine et biotechnologies*, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 1999
- ⁴ Cao W., Hench L.L., *Bioactive Materials*, *Ceramics International* 22 (1996) 493-507
- ⁵ Hench L.L., Wheeler D.L., Greenspan D.C., *Molecular control of bioactivity in sol-gel glasses*, *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 13 (1998) 245-250
- ⁶ <http://testsite.iofbonehealth.org/docs/patients-public/about-osteoporosis/facts-about-bones.html>, Photo Paul Crompton
- ⁷ http://reflexions.ulg.ac.be/cms/c_344578/processus-de-fossilisation-des-iguanodons-la-diagenese
- ⁸ Young, Lowe, Stevens, Heath, *Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater*, Edition de Boeck
- ⁹ Takata M.K., Saiki M., Sumita N.M., Saldiva P.H.N., Pasqualucci C.A., *Trace element determinations in human cortical and trabecular bones*, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 264 (2005) 5-8
- ¹⁰ McAuliffe J.A., *Bone graft substitutes*, *Journal of Hand Therapy* 16 (2003) 180-187
- ¹¹ Dorozhkin V., Epple M., *Biological and medical significance of calcium phosphates*, *Angewandte Chemistry International Edition* 41 (2004) 3130-3146
- ¹² Elsinger E.C., Leal L., *Coralline hydroxyapatite bone graft substitutes*, *The Journal of Foot and Ankle Surgery* 35 (1996) 396-399
- ¹³ Emadi R., Tavangarian F., Roohani Esfahani S.I., *Biodegradable and bioactive properties of a novel bone scaffold coated with nanocrystalline bioactive glass for bone tissue engineering*, *Materials Letters* 64 (2010) 1528-1531
- ¹⁴ Kivrak N., Tas A.C., *Synthesis of calcium hydroxyapatite – tricalcium phosphate (HA-TCP) composite bioceramic powders and their sintering behavior*, *Journal of the American Ceramic Society* 81 (1998) 2245-2252
- ¹⁵ Grossin D., Rollin-Martinet S., Estournès C., Rossignol F., Champion E., Combes C., Rey C., Geoffroy C., Drouet C., *Biomimetic apatite sintered at very low temperature by spark*

plasma sintering : physico-chemistry and microstructure aspects, Acta Biomaterialia 6 (2010) 577-585

¹⁶ Rey C., Combes C., Drouet C., Sfihi H., Barroug A., *Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites : implications for biominerals and biomaterials*, Materials Science and Engineering C 27 (2007) 198-205

¹⁷ Best S.M., Porter A.E., Thian E.S., Huang J., *Bioceramics: Past, present and for the future*, Journal of the European Ceramic Society 28 (2008) 1319-1327

¹⁸ Hench L.L., *The story of Bioglass®*, Journal of Materials Science : Materials in Medicine 17 (2006) 967-978

¹⁹ Haussonne J.M., Carry C., Bowen P., Barton J., *Traité des matériaux, Céramiques et Verres, Principes et techniques d'élaboration*, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 2005

²⁰ Hench L.L., Wheeler D.L., Greenspan D.C., *Molecular control of bioactivity in sol-gel glasses*, Journal of Sol-Gel Science and Technology 13 (1998) 245-250

²¹ Kokubo T., Takadama H., *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity ?*, Biomaterials 27 (2006) 2907-2915

²² Böhner M., Lemaître J., *Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?*, Biomaterials 30 (2009) 2175-2179

²³ Pan H., Zhao X., Darvell B.W., Lu W.W., *Apatite-formation ability - Predictor of "bioactivity" ?*, Acta Biomaterialia 6 (2010) 4181-4188

²⁴ Hoppe A., Guldal N.S., Boccaccini A.R., *A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics*, Biomaterials 32 (2011) 2757-2774

²⁵ Balas F., Perez-Pariente J., Vallet-Regi M., *In vitro bioactivity of silicon-substituted hydroxyapatites*, Journal of Biomedical Material Research 66A (2003) 364-375

²⁶ Marie P.J., *The calcium-sensing receptor in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis*, Bone 46 (2010) 571-576

²⁷ Maeno S., Niki Y., Matsumoto H., Morioka H., Yatabe T., Fumiyama A., Toyama Y., Taguchi T., Tanaka J., *The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture*, Biomaterials 26 (2005) 4847-4855

-
- ²⁸ Salinas A.J., Martin A.I., Vallet-Regi M., *Bioactivity of three CaO-P₂O₅-SiO₂ sol-gel glasses*, Journal of Biomedical Materials Research 61 (2002) 524-532
- ²⁹ Lin S., Ionescu C., Baker S., Smith M.E., Jones J.R., *Characterisation of the inhomogeneity of sol-gel derived SiO₂-CaO bioactive glass and a strategy for its improvement*, Journal of Sol-Gel Science and Technology 53 (2010) 255-262
- ³⁰ Carta D., Pickup., Knowles J.C., Smith M.E., Newport R.J., *Sol-gel synthesis of the P₂O₅-CaO-Na₂O-SiO₂ system as a novel bioresorbable glass*, Journal of Materials Chemistry 15 (2005) 2134-2140
- ³¹ Mami M., Lucas-Girot A., Oudadesse H., Dorbez-Sridi R., Mezahi F., Dietrich E., *Investigation of the surface reactivity of a sol-gel derived glass in the ternary system SiO₂-CaO-P₂O₅*, Applied Surface Science 254 (2008) 7386-7393
- ³² Padilla S., Roman J., Carenas A., Vallet-Regi M., *The influence of the phosphate content on the bioactivity of sol-gel glass ceramics*, Biomaterials 26 (2005) 475-483
- ³³ Nedelec JM., Courtheoux L., Jallot E., Kinowski C., Lao J., Laquerriere P., Mansuy C., Renaudin G., Turell S., *Materials doping through sol-gel chemistry: a little something can make a big difference*, Journal of Sol-Gel Science and Technologies 46 (2008) 259-271
- ³⁴ El-Kady A.M., Ali A.F., Rizk R.A., Ahmed M.M., *Synthesis, characterization and microbiological response of silver doped bioactive glass nanoparticles*, Ceramics International 38 (2012) 177-188
- ³⁵ Pors Nielsen S., *The biological role of strontium*, Bone 35 (2004) 583-588
- ³⁶ Jallot E., Lao J., Nedelec J-M., Sautier J-M., Isaac J., *Verres bioactifs dopés en strontium*, W.O. Patent 2009/027594, 2009
- ³⁷ Gentleman E., Fredholm Y.C., Jell G., Lotfibakhshaiesh N., O'Donnell M.D., Hill R.G., Stevens M.M., *The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in-vitro*, Biomaterials 31 (2010) 3949-3956
- ³⁸ Doweidar H., *Density-structure correlations in silicate glasses*, Journal of Non-Crystalline Solids 249 (1999) 194-200
- ³⁹ Xiang Y., Du J., *Effect of strontium substitution on the structure of 45S5 Bioglasses*, Chemistry of Materials 23 (2011) 2703-2717

-
- ⁴⁰ Goel A., Rajagopal R.R., Ferreira J.M.F., *Influence of strontium on structure, sintering and biodegradation behaviour of CaO-MgO-SrO-SiO₂-P₂O₅-CaF₂ glasses*, Acta Biomaterialia 7 (2011) 4071-4080
- ⁴¹ Lao J., Nedelec J-M., Jallot E., *New strontium - based bioactive glasses: physicochemical reactivity and delivering capability of biologically active dissolution products*, Journal of Materials Chemistry, 19 (2009) 2940-2949
- ⁴² Fredholm Y.C., Karpukhina N., Law R.V., Hill R.C., *Strontium containing bioactive glasses: Glass structure and physical properties*, Journal of Non-Crystalline Solids 356 (2010) 2546-2551
- ⁴³ O'Donnell M.D., Hill R.G., *Influence of strontium and the importance of glass chemistry and structure when designing bioactive glasses for bone regeneration*, Acta Biomaterialia 6 (2010) 2382-2385
- ⁴⁴ Brinker C.J., Scherer G.W., *Sol-gel science*, Academic Press, San Diego (1990)
- ⁴⁵ Gash A.E., Tillotson T.M., Satcher J.H., Hrubesh L.W., Simpson R.L., *New sol-gel synthetic route to transition and main-main group metal oxide aerogels using inorganic salt precursors*, Journal of Non-Crystalline Solids 285 (2001) 22-28
- ⁴⁶ Audebert P., Miomandre F., *Procédé sol-gel de polymérisation*, Techniques de l'Ingénieur J5820 (2005)
- ⁴⁷ Phalippou J., Kocon L., *Elaboration des gels et des aérogels*, Techniques de l'Ingénieur J2230 (2004)
- ⁴⁸ Perrin F-X., *Films inorganiques et hybrides obtenus par voie sol-gel*, Techniques de l'Ingénieur M1722 (2007)
- ⁴⁹ Stöber W., Fink A., Bohn E., *Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range*, Journal of Colloid and Interface Science 26 (1968) 62-69
- ⁵⁰ Hench L.L., West J.K., *The sol-gel process*, Chemical Review 90 (1990) 33-72
- ⁵¹ Pierre A. C., *Introduction aux procédés sol-gel*, Ed Septima, Paris (1992)
- ⁵² Ramila A., Balas F., Vallet-Regi M., *Synthesis routes for bioactive sol-gel glasses: alkoxides versus nitrates*, Chemistry of Materials 14 (2002) 542-548
- ⁵³ Lin S., Ionescu C., Pike K.J., Smith M.E., Jones J.R., *Nanostructure evolution and calcium distribution in sol-gel derived bioactive glass*, Journal of Materials Chemistry 19 (2009) 1276-1282

-
- ⁵⁴ Drosse I., Volkner E., Capanna R., De Biase P., Mutschler W., Schieker M., *Tissue engineering for bone defect healing : an update on a multi-component approach*, Injury, International Journal of the Care of the Injured 39 S2 (2008) S9-S20
- ⁵⁵ Kanczler J.M., Oreffo R.O.C., *Osteogenesis and angiogenesis : the potential for engineering bone*, European Cells and Materials 15 (2008) 100-114
- ⁵⁶ Jones J.R., Ehrenfried L.M., Hench L.L., *Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering*, Biomaterials 27 (2006) 964-973
- ⁵⁷ Jones J.R., *New trends in bioactive scaffolds : the importance of nanostructure*, Journal of the European Ceramic Society 29 (2009) 1275-1281
- ⁵⁸ Freyman T.M., Yannas I.V., Gibson L.J., *Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering*, Progress in Materials Science 46 (2001) 273-282
- ⁵⁹ Karageorgiou V., Kaplan D., *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*, Biomaterials 26 (2005) 5474-5491
- ⁶⁰ Lin H., Ma J., Li X., Wu X., QU F., *A co-templated approach to hierarchically mesoporous-macroporous bioactive glasses (MMBG) scaffolds for bone tissue regeneration*, Journal of Sol-Gel Science and Technologie 62 (2012) 170-176
- ⁶¹ Wang X., Li X., Ito A., Sogo Y., *Synthesis and characterization of hierarchically macroporous and mesoporous CaO-MO-SiO₂-P₂O₅ (M=Mg, Zn, Sr) bioactive glass scaffolds*, Acta Biomaterialia 7 (2011) 3638-3644
- ⁶² Atwood R.C., Jones J.R., Lee P.D., Hench L.L., *Analysis of pore interconnectivity in bioactive glass foams using X-ray microtomography*, Scripta Materialia 51 (2004) 1029-1033
- ⁶³ Jones J.R., Lee P.D., Hench L.L., *Hierarchical porous materials for tissue engineering*, Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences 364 (2006) 263-281
- ⁶⁴ von Doernberg MC., von Rechenberg B., Bohner M., Grunenfelder S., van Lenthe G.H., Muller R., Gasser B., Mathys R., Baroud G., Auer J., *In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes*, Biomaterials 27 (2006) 5186-5198
- ⁶⁵ Lu J.X., Flautre B., Anselme K., Hardouin P., Gallur A., Descamps M., Thierry B., *Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo*, Journal of Materials Science : Materials in Medicine 10 (1999) 111-120

-
- ⁶⁶ Vueva Y., Gama A., Teixeira A.V., Almeida R.M., Wang S., Falk M.M., Jain H., *Monolithic glass scaffolds with dual porosity prepared by polymer-induced phase separation and sol-gel*, Journal of the American Ceramic Society 93 (2010) 1945-1949
- ⁶⁷ Colombo P., Vakifahmetoglu C., Costacurta S., *Fabrication of ceramic components with hierarchical porosity*, Journal of Materials Science 45 (2010) 5425-5455
- ⁶⁸ Vueva Y., Gama A., Teixeira A.V., Almeida R.M., Wang S., Falk M.M., Jain H., *Monolithic glass scaffolds with dual porosity prepared by polymer-induced phase separation and sol-gel*, Journal of the American Ceramic Society 93 (2010) 1945-1949
- ⁶⁹ Haugen H., Will J., Köhler A., Hopfner U., Aigner J., Wintermantel E., *Ceramic TiO₂-foams: characterization of a potential scaffold*, Journal of the European Ceramic Society 24 (2004) 661-668
- ⁷⁰ Vitale-Brovarone C., Bairo F., Bretcanu O., Verne E., *Foam-like scaffolds for bone tissue engineering based on a novel couple of silicate-phosphate specular glasses: synthesis and properties*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine 20 (2009) 2197-2205
- ⁷¹ Bretcanu O., Samaille C., Boccaccini A.R., *Simple methods to fabricate Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds exhibiting porosity gradient*, Journal of Materials Science 43 (2008) 4127-4134
- ⁷² Wang S., Jain H., *High surface area nanomacroporous bioactive glass scaffold for hard tissue engineering*, Journal of the American Ceramic Society 93 (2010) 3002-3005
- ⁷³ Zhu Y., Wu C., Ramaswamy Y., Kockrick E., Simon P., Kaskel S., Zreiqat H., *Preparation, characterization and in vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses (MBGs) scaffolds for bone tissue engineering*, Microporous and Mesoporous Materials 112 (2008) 494-503
- ⁷⁴ Shih C.J., Chen H.T., Huang H.F., Lu P.S., Chang H.F., Chang I.L., *Synthesis and in vitro bioactivity of mesoporous bioactive glass scaffolds*, Materials Science and Engineering C 30 (2010) 657-663
- ⁷⁵ Descamps M., Duhoo T., Monchau F., Lu J., Hardouin P., Hornez J.C., Leriche A., *Manufacture of macroporous β -tricalcium phosphate bioacceramics*, Journal of the European Ceramic Society 28 (2008) 149-157
- ⁷⁶ Descamp M., Richart O., Hardouin P., Hornez J.C., Leriche A., *Synthesis of macroporous β -tricalcium phosphate with controlled porous architectural*, Ceramics International 34 (2008) 1131-1137

-
- ⁷⁷ Descamps M., Hornez J.C., Leriche A., *Manufacture of hydroxyapatite beads for medical applications*, Journal of the European Ceramic Society 29 (2009) 369-375
- ⁷⁸ Liu J., Miao X., *Porous alumina ceramics prepared by slurry infiltration of expanded polystyrene beads*, Journal of Materials Science 40 (2005) 6145-6150
- ⁷⁹ Liu Y., Kim J-H., Young D., Kim S., Nishimoto S.K., Yang Y., *Novel template-casting technique for fabricating β -tricalcium phosphate scaffolds with high interconnectivity and mechanical strength and in vitro responses*, Journal of Biomedical Materials Research A 92 (2009) 997-1006
- ⁸⁰ Pardini A., Mercier C., Hornez J.C., Descamps M., Follet-Houttemane C., Moreau G., Leriche A., *Elaboration d'un verre bioactif macroporeux*, Matériaux, Dijon, 2006
- ⁸¹ Yan H., Zhang K., Blanford C.F., Francis L.F., Stein A., *In vitro hydroxycarbonate apatite mineralization of CaO-SiO₂ sol-gel glasses with a three-dimensionally ordered macroporous structure*, Chemistry of Materials 13 (2001) 1374-1382
- ⁸² Zhang K., Yan H., Bell D.C., Stein A., Francis L.F., *Effects of materials parameters on mineralization and degradation of sol-gel bioactive glasses with 3D-ordered macroporous structures*, Journal of Biomedical Materials Research Part A 66 (2003) 860-869
- ⁸³ Thèse Jérémy Soulié, *Synthèse par voie sol-gel et réactivité in vitro de verres bioactifs dopés, mésostructurés et macrostructurés. Caractérisation par micro-faisceaux d'ions*, Université Blaise Pascal, 2010
- ⁸⁴ Simitzis J., Baciú D.E., *In vitro bioactivity investigation using FTIR, XRD and SEM/EDAX techniques of porous bioactive glasses prepared by sol-gel using PMMA beads as template*, Optoelectronics and Advanced Materials 3 (2009) 1056-1059
- ⁸⁵ Hu G., Xiao L., Fu H., Bi D., Ma., Tong P., *Degradable and bioactive scaffold of calcium phosphate and calcium sulphate from self-setting cement for bone regeneration*, Journal of Porous Materials 17 (2010) 605-613
- ⁸⁶ Lukyanova L., Franceschi-Messant S., Vicendo P., Perez E., Rico-Lattes I., Weinkamer R., *Preparation and evaluation of microporous organogel scaffolds for cell viability and proliferation*, Colloids and Surface B: Biointerfaces 79 (2010) 105-112
- ⁸⁷ Gross K.A., Rodriguez-Lorenzo L.M., *Biodegradable composite scaffolds with an interconnected spherical network for bone tissue engineering*, Biomaterials 25 (2004) 4955-4962

-
- ⁸⁸ Zhang J., Wu L., Jing D., Ding J., *A comparative study of porous scaffolds with cubic and spherical macropores*, Polymer 46 (2005) 4979-4985
- ⁸⁹ Yan P., Wang J., Ou J., Li Z., Lei Z., Yang S., *Synthesis and characterization of three-dimensional ordered mesoporous-macroporous bioactive glass*, Materials Letters 64 (2010) 2544-2547
- ⁹⁰ Li X., Jiang J., Wang Y., Nie X., Qu F., *Preparation of multilevel macroporous materials using natural plants as templates*, Journal of Sol-Gel Science and Technology 56 (2010) 75-81
- ⁹¹ Nakanishi K., *Pore structure control of silica gels based on phase separation*, Journal of Porous Materials 4 (1997) 67-112
- ⁹² Lofton C.M., Milz C.B., Huang H., Sigmund W.M., *Biocontinuous porosity in ceramics utilizing polymer spinodal phase separation*, Journal of the European Ceramic Society 25 (2005) 883-889
- ⁹³ Marques A.C., Jain H., Kiely C., Song K., Kiely C.J., Almeida R.M., *Nano/macroporous monolithic scaffolds prepared by sol-gel method*, Journal of Sol-Gel Science and Technology 51 (2009) 42-47
- ⁹⁴ Yeong W-Y., Chua C-K., Leong K-F., Chandrasekaran M., *Rapid prototyping in tissue engineering : challenges and potential*, Trends in Biotechnology 22 (2004) 643-652
- ⁹⁵ Shruti S., Salina A.J., Lusvardi G., Malavasi G., Menabue L., Vallet-Regi M., *Mesoporous bioactive scaffolds prepared with cerium-, gallium-, and zinc-containing glasses*, Acta Biomaterialia 9 (2013) 4836-4844
- ⁹⁶ Serra T., Planell J.A., Navarro M., *High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology*, Acta Biomaterialia 9 (2013) 5521-5530
- ⁹⁷ Arafat M.T., Lam C.X.F., Ekaputra A.K., Wong S.Y., Li X., Gibson I., *Biomimetic composite coating on rapid prototyped scaffolds for bone tissue engineering*, Acta Biomaterialia 7 (2011) 809-820
- ⁹⁸ Lee J-S., Cha H-D., Shim J-H., Jung J.W., Kim J.Y., Cho D.W., *Effect of pore architecture and stacking direction on mechanical properties of solid freeform fabrication-based scaffold for bone tissue engineering*, Journal of Biomedical Materials Research A 100 (2012) 1846-1853

-
- ⁹⁹ Sepulveda P., Binner J.G.P., *Processing of cellular ceramics by foaming and in situ polymerisation of organic monomers*, Journal of The European Ceramic Society 19 (1999) 2059-2066
- ¹⁰⁰ Wu Z.Y., Hill R.G., Yue S., Nightingale D., Lee P.D., Jones J.R., *Gel-derived bioactive glass scaffolds produced by a gel-cast foaming technique*, Acta Biomaterialia 7 (2011) 1807-1816
- ¹⁰¹ Sepulveda P., Jones J.R., Hench L.L., *Bioactive sol-gel foams for tissue repair*, Journal of Biomedical Materials Research 59 (2002) 340-348
- ¹⁰² Coelho M.B., Pereira M.M., *Sol-gel synthesis of bioactive glass scaffolds for tissue engineering: effect of surfactant type and concentration*, Journal of Biomedical Materials Research B 75 (2005) 451-456
- ¹⁰³ Valerio P., Guimaraes M.H.R., Pereira M.M., Leite M.F., Goes A.M., *Primary osteoblast cell response to sol-gel derived bioactive glass foams*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine 16 (2005) 851-856
- ¹⁰⁴ Jones J.R., Hench L.L., *Effect of surfactant concentration and composition on the structure and properties of sol-gel-derived bioactive glass foam scaffolds for tissue engineering*, Journal of Materials Science 38 (2003) 3783-3790
- ¹⁰⁵ Jones J.R., Sepulveda P., Hench L.L., *The effect of temperature on the processing and properties of macroporous bioactive glass foams*, Key Engineering Materials 218-220 (2002) 299-302
- ¹⁰⁶ Jones J.R., Hench L.L., *Factors affecting the structure and properties of bioactive foam scaffolds for tissue engineering*, Journal of Biomedical Materials Research B 68 (2004) 36-44
- ¹⁰⁷ Jones J.R., Ehrenfried L.M., Hench L.L., *Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering*, Biomaterials 27 (2006) 964-973
- ¹⁰⁸ Frayret J., Mermet J-M., Paucot H., *ICP-OES : couplage plasma induit par haute fréquence – spectrométrie optique*, Techniques de l'ingénieur P2719 (2012)
- ¹⁰⁹ Aguiar H., Serra J., Gonzalez P., Leon B., *Structural study of sol-gel silicate glasses by IR and Raman spectroscopies*, Journal of Non-Crystalline Solids 355 (2009) 475-480
- ¹¹⁰ Esnouf C., *Caractérisation microstructurale des matériaux. Analyse par les rayonnements X et électroniques*, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes (2011)

-
- ¹¹¹ Sun L-M., Meunier F., *Absorption, aspects théoriques*, Techniques de l'Ingénieur J2730 (2003)
- ¹¹² Sing K.S.W., *Reporting physisorption data for gas / solid systems*, Pure and Applied Chemistry 54 (1982) 2201-2218
- ¹¹³ Rouquerol F., Luciani L., Llewellyn P., Denoyel R., Rouquerol J., *Texture des matériaux pulvérulents ou poreux*, Techniques de l'Ingénieur P1050 (2003)
- ¹¹⁴ Brunauer S., Emmett Ph., Teller E., *Adsorption of gases in multimolecular layers*, Journal of the American Chemical Society 60 (1938) 309-319
- ¹¹⁵ Barrett E.P., Joyner L.G., Halenda P.P., *The determination of pore volume and area distributions in porous substances - Computations from nitrogen isotherms*, Journal of the American Chemical Society 73 (1951) 373-380
- ¹¹⁶ Rasneur B., Charpin J., *Caractérisation de la texture poreuse des matériaux*, Techniques de l'ingénieur, P1050 (1999)
- ¹¹⁷ Giesche H., *Mercury porosimetry: a general (practical) overview*, Particle and Particle Systems Characterization 23 (2006) 1-11
- ¹¹⁸ Tsiptsias C., Paraskevopoulos M.K., Christofilos D., Andrieux P., Panayiotou C., *Polymeric hydrogels and supercritical fluids: the mechanism of hydrogel foaming*, Polymer 52 (2011) 2819-2826
- ¹¹⁹ Ren L., Tsuru K., Hayakawa S., Osaka A., *Novel approach to fabricate porous gelatin-siloxane hybrids for bone tissue engineering*, Biomaterials 23 (2002) 4765-4773
- ¹²⁰ Panzavolta S., Fini M., Nicoletti A., Bracci B., Rubini K., Giardino R., Bigi A., *Porous composite scaffolds based on gelatin and partially hydrolyzed α -tricalcium phosphate*, Acta Biomaterialia 5 (2009) 636-643
- ¹²¹ rsbweb.nih.gov/ij/
- ¹²² Jones J.R., Lin S., Yue S., Lee P.D., Hanna J.V., Smith M.E., Newport R.J., *Bioactive glass scaffolds for bone regeneration and their hierarchical characterisation*, Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers H 224 (2010) 1373-1387
- ¹²³ Norme ISO 23317 :2007, *Implants for surgery – In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials*
- ¹²⁴ Maxwell J.A., Teesdale W.J., Campbell J.L., *The Guelph PIXE software package II*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 95 (1995) 407-421

-
- ¹²⁵ Maxwell J.A., Campbell J.L., Teesdale W.J., *The Guelph PIXE software package*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 43 (1989) 218-230
- ¹²⁶ Govil I.M., *Proton induced x-ray emission- A tool for non-destructive trace elements analysis*, Current Science 80 (2001) 1542-1549
- ¹²⁷ Weber G., Robaye G., Bartsch P., Collignon A., Beguin Y., Roelandts I., Delbrouck J.M., *Trace element analysis by PIXE in several biomedical fields*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 3 (1984) 326-331
- ¹²⁸ Berger P., Revel G., *Microsonde nucléaire - Principe et appareillage*, Techniques de l'Ingénieur P2563 (2005)
- ¹²⁹ Incerti S., Habchi C., Moretto P., Olivier J., Seznec H., *Geant4 simulation of the new CENBG micro and nanoprobe facility*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 249 (2006) 738-742
- ¹³⁰ www.cenbg.in2p3.fr/-La-plateforme-AIFIRA-
- ¹³¹ Incerti S., Zhang Q., Andersson F., Moretto P., Grime G.W., Merchant M.J., Nguyen D.T., Habchi C., Pouthoer T., Seznec H., *Monte Carlo simulation of the CENBG microbeam and nanobeam lines with the Geant4 toolkit*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 260 (2007) 20-27
- ¹³² Barberet P., Incerti S., Andersson F., Delalee F., Serani L., Moretto P., *Technical description of the CENBG nanobeam line*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 267 (2009) 2003-2007
- ¹³³ Barberet P., Daudin L., Gordillo N., Sorieul S., Simon M., Seznec H., Idarraga I., Incerti S., Balana A., Moretto P., *First results obtained using the CENBG nanobeam line: Performances and applications*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 269 (2011) 2163-2167
- ¹³⁴ Sepulveda P., Jones J.R., Hench L.L., *Bioactive sol-gel foams for tissue repair*, Journal of Biomedical Materials Research 59 (2002) 340-348
- ¹³⁵ Dias M.R., Fernandes P.R., Guedes J.M., Hollister S.J., *Permeability analysis of scaffolds for bone tissue engineering*, Journal of Biomechanics 45 (2012) 938-944
- ¹³⁶ Wang S., Jain H., *High surface area nanomacroporous bioactive glass scaffold for hard tissue engineering*, Journal of the American Ceramic Society 93 (2010) 3002-3005

-
- ¹³⁷ Yu B., Turdean-Ionescu C.A., Martin R.A., Newport R.J., Hanna J.V., Smith M.E., Jones J.R., *Effect of calcium source and properties of sol-gel derived bioactive glasses*, Langmuir 28 (2012) 17465-17476
- ¹³⁸ Chen Y., Xie Z., Yang J., Huang Y., *Alumina casting based on gelation of gelatin*, Journal of the European Ceramic Society 19 (1999) 271-275
- ¹³⁹ Ortega F.S., Valenzuela F.A.O., Scuracchio C.H., Pandolfelli V.C., *Alternative gelling agents for the gelcasting of ceramic foams*, Journal of the European Ceramic Society 23 (2003) 75-80
- ¹⁴⁰ Ginebra Molins M.P., Planell Estany J.A., Giovanni Santin M.A., Ambrosio L., *Biopolymer-containing calcium phosphate foam, process for obtaining thereof and use for bone regeneration*, W.O. Patent 2010/116321, 2010
- ¹⁴¹ Mahony O., Tsigkou O., Ionescu C., Minelli C., Ling L., Hanly R., Smith M.E., Stevens M.M., Jones J.R., *Silica-gelatin hybrids with tailorable degradation and mechanical properties for tissue regeneration*, Advanced Functional Materials 20 (2010) 3835-3845
- ¹⁴² Montufar E.B., Traykova T., Planell J.A., Ginebra M.P., *Comparaison of a low molecular weight and a macromolecular surfactant as foaming agents for injectable self setting hydroxyapatite foams: Polysorbate 80 versus gelatine*, Materials Science and Engineering C 31 (2011) 1498-1504
- ¹⁴³ Almeida R.M., Gama A., Vueva Y., *Bioactive sol-gel scaffolds with dual porosity for tissue engineering*, Journal of Sol-Gel Science and Technology 57 (2011) 336-342
- ¹⁴⁴ Lacroix J., Lao J., Jallot E., *Green and safe in situ templating of bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering*, Journal of Materials Chemistry B 1 (2013) 1782-1785
- ¹⁴⁵ Lacroix J., Jallot E., Nedelec J-M., Lao J., *Influence of Glass Scaffolds Macroporosity on the Bioactive Process*, The Journal of Physical Chemistry B 117 (2013) 510-517
- ¹⁴⁶ Zhu Y., Kaskel S., *Comparison of the in vitro bioactivity and drug release property of mesoporous bioactive glasses (MBGs) and bioactive glasses (BGs) scaffolds*, Microporous and Mesoporous Materials 118 (2009) 176-182
- ¹⁴⁷ Xia W., Chang J., *Well-ordered mesoporous bioactive glasses (MBG): A promising bioactive drug delivery system*, Journal of Controlled Release 110 (2006) 522-530
- ¹⁴⁸ Brinker C.J., Lu Y., Sellinger A., Fan H., *Evaporation-induced self-assembly : nanostructures made easy*, Advanced Materials 11 (1999) 579-585

-
- ¹⁴⁹ Sayari A., Kruk M., Jaroniec M., Moudrakovski I.L., *New approaches to pore size engineering of mesoporous silicates*, *Advanced Materials* 10 (1998) 1376-1379
- ¹⁵⁰ Soler-Illia G.J.A.A., Crepaldi E.L., Grosso D., Sanchez C., *Block copolymer-templated mesoporous oxides*, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 8 (2003) 109-126
- ¹⁵¹ Zhao D., Yang P., Melosh N., Feng J., Chmelka B.F., Stucky G.D., *Continuous mesoporous silica films with highly ordered large pore structures*, *Advanced Materials* 10 (1998) 1380-1385
- ¹⁵² Naik S.P., Yamakita S., Ogura M., Okubo T., *Studies on mesoporous silica films synthesized using F127, a triblock co-polymer*, *Microporous and Mesoporous Materials* 75 (2004) 51-59
- ¹⁵³ Yan P., Wang J., Ou J., Li Z., Lei Z., Yang S., *Synthesis and characterization of three-dimensional ordered mesoporous-macroporous bioactive glass*, *Materials Letters* 64 (2010) 2544-2547
- ¹⁵⁴ Li D., Guan X., Song J., Di Y., Zhang D., Ge X., Zhao L., Xiao F-S., *Highly efficient synthesis of ordered mesoporous silica materials with controllable microporosity using surfactant mixtures as templates*, *Colloids and Surfaces A* 272 (2006) 194-202
- ¹⁵⁵ Ivanova R., Alexandridis P., Lindman B., *Interaction of poloxamer block copolymers with cosolvents and surfactants*, *Colloids and Surface A* 183-185 (2001) 41-53
- ¹⁵⁶ Yang P., Zhao D., Margolese D.I., Chmelka B.F., Stucky G.D., *Block copolymer templating syntheses of mesoporous metal oxides with large ordering lengths and semicrystalline framework*, *Chemistry of Materials* 11 (1999) 2813-2826
- ¹⁵⁷ Yu T., Deng Y., Wang L., Liu R., Zhang L., Tu B., Zhao D., *Ordered mesoporous nanocrystalline titanium-carbide / carbon composites from in situ carbothermal reduction*, *Advanced Materials* 19 (2007) 2301-2306
- ¹⁵⁸ Yan X., Yu C., Zhou X., Tang J., Zhao D., *Highly Ordered Mesoporous Bioactive Glasses with Superior In Vitro Bone-Forming Bioactivities*, *Angewandte Chemie* 43 (2004) 5980-5984
- ¹⁵⁹ Soulié J., Lao J., Jallot E., Nedelec J-M., *Influence of mesostructuration on the reactivity of bioactive glasses in biological medium: a PIXE-RBS study*, *Journal of Materials Chemistry* 22 (2012) 20680-20688

-
- ¹⁶⁰ Yan X.X., Deng H.X., Huang X.H., Lu G.Q., Qiao S.Z., Zhao D.Y., Yu C.Z., *Mesoporous bioactive glasses. I. Synthesis and structural characterization*, Journal of Non-Crystalline Solids 351 (2005) 3209-3217
- ¹⁶¹ Yun HS., Kim SE., Hyun YT., *Preparation of 3D cubic ordered mesoporous bioactive glasses*, Solid State Sciences 10 (2008) 1083-1092
- ¹⁶² Grosso D., Balkenende A.R., Alboury P.A., Ayrat A., Amenitsch H., Babonneau F., *Two-Dimensional Hexagonal Mesoporous Silica Thin Films Prepared from Block Copolymers: Detailed Characterization and Formation Mechanism*, Chemistry of Materials 13 (2001) 1848-1856
- ¹⁶³ Shih C-C., Chien C-S., Kung J-C., Chen J-C., Chang S-S., Lu P-S., Shih C-J., *Effect of surfactant concentration on characteristics of mesoporous bioactive glass prepared by evaporation induced self-assembly process*, Applied Surface Science 264 (2013) 105-110
- ¹⁶⁴ Yan P., Wang J., Ou J., Li Z., Lei Z., Yang S., *Synthesis and characterization of three-dimensional ordered mesoporous-macroporous bioactive glass*, Materials Letters 64 (2010) 2544-2547
- ¹⁶⁵ Izquierdo-Barba I., Vallet-Regi M., *Fascinating properties of bioactive template glasses: A new generation of nanostructured bioceramics*, Solid State Science 13 (2011) 773-783
- ¹⁶⁶ Zaichick V., Tzaphlidou M., *Determination of calcium, phosphorus, and the calcium/phosphorus ratio in cortical bone from the human femoral neck by neutron activation analysis*, Applied Radiation and Isotopes 56 (2002) 781-786
- ¹⁶⁷ Bi L., Jung S., Day D., Neidig K., Dusevich V., Eick D., Bonewald L., *Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds*, Journal of Biomedical Materials Research A 100 (2012) 3267-3275
- ¹⁶⁸ Xynos I.D., Edgar A.J., Buttery L.D.K., Hench L.L., Polak J.M., *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 Communications 276 (2000) 461-465
- ¹⁶⁹ Park W.J., Song Y.H., Yoon D.H., *Synthesis and luminescent characteristics of $\text{Ca}_{2-x}\text{Sr}_x\text{SiO}_4:\text{Eu}^{2+}$ as a potential green-emitting phosphor for near UV-white LED applications*, Materials Science and Engineering B 173 (2010) 76-79

-
- ¹⁷⁰ Gupta S.K., Mohapatra M., Kaity S., Natarajan V., Godbole S.V., *Structure and site selective luminescence of sol - gel derived Eu:Sr₂SiO₄*, Journal of Luminescence 132 (2012) 1329-1338
- ¹⁷¹ Lu Z., Weng L., Song S., Zhang P., Luo X., *Hydrothermal synthesis, morphology and photoluminescence of hexagonal SrSiO₃:Eu²⁺ micro-octahedrons and prism-like hollow microstructures*, Materials Chemistry and Physics 132 (2012) 800-807
- ¹⁷² C. Bonhomme, C. Gervais, N. Folliet, F. Pourpoint, C. Coelho Diogo, J. Lao, E. Jallot, J. Lacroix, JM. Nedelec, D. Iuga, J. Hanna, M.E. Smith, Y. Xiang, J. Du, D. Laurencin, *⁸⁷Sr solid state NMR as a structurally sensitive tool for the investigation of materials: antiosteoporotic pharmaceuticals and bioactive glasses*, Journal of the American Chemical Society 134 (2012) 12611-12628
- ¹⁷³ Taherkhani S., Moztarzadeh F., Mozafi M., Lotfibakhshaiesh N., *Sol-gel synthesis and characterization of unexpected rod-like crystal fibers based on SiO₂-(1-x)CaO-xSrO-P₂O₅ dried gel*, Journal of Non-Crystalline Solids 358 (2012) 342-348
- ¹⁷⁴ Lusvardi G., Malavasi G., Menabue L., Aina V., Morterra C., *Fluoride-containing bioactive glasses: Surface reactivity in simulated body fluids solutions*, Acta Biomaterialia 5 (2009) 3548-3562
- ¹⁷⁵ Yu P., Kirkpatrick R.J., Poe B., McMillan P.F., Cong X., *Structure of calcium silicate hydrate (C-S-H): near-, mid-, and far-infrared spectroscopy*, Journal of the American Ceramic Society 82 (1999) 742-748
- ¹⁷⁶ Cerruti M.G., Greenspan D., Powers K., *An analytical model for the dissolution of different particle size samples of Bioglass in TRIS-buffered solution*, Biomaterials 26 (2005) 4903-4911
- ¹⁷⁷ Sepulveda P., Jones J.R., Hench L.L., *In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses*, Journal of Biomedical Materials Research 61 (2002) 301-311
- ¹⁷⁸ Douglas R.W., El-Shamy T.M.M., *Reactions of glasses with aqueous solutions*, Journal of American Ceramic Society 50 (1967) 1-8
- ¹⁷⁹ Serra J., Gonzales P., Liste S., Chiussi S., Leon B., Perez-Amor M., Ylanen H.O., Hupa M., *Influence of the non-bridging oxygen groups on the bioactivity of silicate glasses*, Journal of Materials Science : Materials in Medicine 13 (2002) 1221-1225

-
- ¹⁸⁰ Shahrabi S., Hesarakhi S., Moemeni S., Khorami M., *Structural discrepancies and in vitro nanoapatite formation ability of sol-gel derived glasses doped with different bone stimulator ions*, Ceramics International 37 (2011) 2737-2746
- ¹⁸¹ Lei B., Chen X., Wang Y., Zhao N., Du C., Zhang L., *Acetic acid derived mesoporous bioactive glasses with enhanced in vitro bioactivity*, Journal of Non-Crystalline Solids 355 (2009) 2583-2587
- ¹⁸² Silva R.F., Vasconcelos W.L., *Influence of processing variables on the pore structure of silica gels obtained with tetraethylorthosilicate*, Materials Research 2 (1999) 197-200
- ¹⁸³ He Z.W., Liu X.Q., Gou J., Wang Y.Y., *Structural characteristic and thermal stability of nanoporous SiO₂ low-k films prepared by sol-gel method with catalyst HF*, Materials Science and Engineering B 128 (2006) 168-173
- ¹⁸⁴ Lacroix J., Lao J., Nedelec J-M., Jallot E., *Micro PIXE-RBS for the study of Sr release at bioactive glass scaffolds / biological medium interface*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nimb.2012.10.019>
- ¹⁸⁵ Isaac J., Nohra J., Lao J., Jallot E., Nedelec J-M., Berdal A., Sautier J-M., *Effects of strontium-doped bioactive glass on the differentiation of cultured osteogenic cells*, European Cells Materials 21 (2011) 130-143
- ¹⁸⁶ Gomes S., Nedelec J-M., Jallot E., Renaudin G., *Unexpected mechanism of Zn²⁺ insertion in calcium phosphate bioceramics*, European Cells and Materials 23 (2012) 38
- ¹⁸⁷ Tang Y., Chappell H.F., Dove M.T., Reeder R.J., Lee Y.J., *Zinc incorporation into hydroxyapatite*, Biomaterials 30 (2009) 2864-2872
- ¹⁸⁸ Laurencin D., Almora-Barrios N., de Leeuw N.H., Gervais C., Bonhomme C., Mauri F., Chrzanowski W., Knowles J.C., Newport R.J., Wong A., Gan Z., Smith M.E., *Magnesium incorporation into hydroxyapatite*, Biomaterials 32 (2011) 1826-1837
- ¹⁸⁹ Liu Y., Teoh S-H., *Biotechnology Advances, Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.003>
- ¹⁹⁰ Fu Q., Saiz E., Rahaman M.N., Tomsia A.P., *Bioactive glass scaffolds for tissue engineering: state of art and future perspectives*, Materials Science and Engineering C 31 (2011) 1245-1256

-
- ¹⁹¹ Ren L., Tsuru K., Hayakawa S., Osaka A., *Sol-gel preparation and in vitro deposition of apatite on porous gelatin-siloxane hybrids*, Journal of Non-Crystalline Solids 285 (2001) 116-122
- ¹⁹² Gomide V.S., Zonari A., Ocarino N.M., Goes A.M., Serakides R., Pereira M.M., *In vitro and in vivo osteogenic potential of bioactive glass-PVA hybrid scaffolds colonized by mesenchymal stem cells*, Biomedical Materials 7 (2012) 015004-015010
- ¹⁹³ Costa H.S., Mansur A.A.P., Pereira M.M., Mansur H.S., *Engineering hybrid scaffolds of poly(vinyl alcohol)/bioactive glass for potential bone engineering applications: synthesis, characterization, cytocompatibility, and degradation*, Journal of Nanomaterials (2011) 1-16
- ¹⁹⁴ Floroian L., Sima F., Florescu M., Badea M., Popescu A.C., Serban N., Mihailescu I.N., *Double layered nanostructured composite coatings with bioactive silicate glass and polymethylmetacrylate for biomimetic implant applications*, Journal of Electroanalytical Chemistry 648 (2010) 111-118
- ¹⁹⁵ Mehdipour M., Afshar A., *A study of the electrophoretic deposition of bioactive glass – chitosan composite coating*, Ceramics International 38 (2012) 471-476
- ¹⁹⁶ Srinivasan S., Jayasree R., Chennazhi K.P., Nair S.V., Jayakumar R., *Biocompatible alginate / nano bioactive glass ceramic composite scaffolds for periodontal tissue regeneration*, Carbohydrates Polymers 87 (2012) 274-283
- ¹⁹⁷ Rohanizadeh R., Swain M.V., Mason R.S., *Gelatin sponges (Gelfoam®) as a scaffold for osteoblasts*, Journal of Materials Science : Materials in Medicine 19 (2008) 1173-1182
- ¹⁹⁸ Landi E., Valentini F., Tampieri A., *Porous hydroxyapatite / gelatine scaffolds with ice-designed channel-like porosity for biomedical applications*, Acta Biomaterialia 4 (2008) 1620-1626
- ¹⁹⁹ Takahashi Y., Yamamoto M., Tabata Y., *Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β -tricalcium phosphate*, Biomaterials 26 (2005) 3587-3596
- ²⁰⁰ Mohanty A.K., Misra M., Hinrichsen G., *Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: an overview*, Macromolecular Materials and Engineering 276-277 (2000) 1-24
- ²⁰¹ Thakur G., Mitra A., Basak A., Sheet D., *Characterization and scanning electron microscopic investigation of crosslinked freeze dried gelatin matrices for study of drug diffusivity and release kinetics*, Micron, 43 (2012) 311-320

-
- ²⁰² Mozafari M., Rabiee M., Azami M., Maleknia S., *Biomimetic formation of apatite on the surface of porous gelatin/bioactive glass nanocomposite scaffolds*, Applied Surface Science 257 (2010) 1740-1749
- ²⁰³ Gentile P., Mattioli-Belmonte M., Chiono V., Ferretti C., Baino F., Tonda-Turo C., Vitale-Brovarone C., Pashkuleva I., Reis R.L., Ciardelli G., *Bioactive glass/polymer composite scaffolds mimicking bone tissue*, Journal of Biomedical Materials Research A 100 (2012) 2654-2667
- ²⁰⁴ Peter M., Binulal N.S., Nair S.V., Selvamurugan N., Tamura H., Jayakumar R., *Novel biodegradable chitosan-gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering*, Chemical Engineering Journal 158 (2010) 353-361
- ²⁰⁵ Takahashi Y., Yamamoto M., Tabata Y., *Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β -tricalcium phosphate*, Biomaterials 26 (2005) 3587-3696
- ²⁰⁶ Grover C.N., Cameron R.E., Best S.M., *Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering*, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 10 (2012) 62-74
- ²⁰⁷ Bulgarelli E., Forni F., Bernabei M.T., *Casein/gelatin beads – I. Cross-linker solution composition effect on cross-linking degree*, International Journal of Pharmaceutics 190 (1999) 175-182
- ²⁰⁸ Lien S-M., Li W-T., Huang T-J., *Genipin-crosslinked gelatin scaffolds for articular cartilage tissue engineering with a novel crosslinking method*, Materials Science and Engineering C 28 (2008) 36-43
- ²⁰⁹ Chen K.Y., Shyu P.C., Dong G.C., Chen Y.S., Kuo W.W., *Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite*, Biomaterials 30 (2009) 1682-1688
- ²¹⁰ Smitha S., Shajesh P., Mukundan P., Nair T.D.R., Warriar K.G.K., *Synthesis of biocompatible hydrophobic silica-gelatin nano-hybrid by sol-gel process*, Colloids and Surfaces B 55 (2007) 38-43
- ²¹¹ Farris S., Song J., Huang Q., *Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 58 (2010) 998-1003

-
- ²¹² Lao J., Lacroix J., Jallot E., Dieudonné X., *Implant à porosité contrôlée*, Demande de dépôt de brevet d'invention N° 1355057
- ²¹³ Baglin J.E.E., *Ion beam nanoscale fabrication and lithography - a review*, Applied Surface Science 258 (2012) 4103-4111
- ²¹⁴ Oliviero E., Ruault MO., Fortuna F., *Faisceaux d'ions – Théorie et mise en œuvre*, Techniques de l'Ingénieur M4395 (2009)
- ²¹⁵ Trouslard P., Trocellier P., *Spectrométrie de collisions élastiques et de réactions nucléaires. Théorie*, Techniques de l'Ingénieur P2560 (2002)
- ²¹⁶ Malmqvist K.G., *Accelerator-based ion beam analysis - an overview and future prospects*, Radiation Physics and Chemistry 71 (2004) 817-827
- ²¹⁷ www.ipnl.in2p3.fr/ace/techniques/techniques_menu.html
- ²¹⁸ Malmqvist K.G., Elfman M., Remond G., Yang C., *PIXE and ionoluminescence - A synergetic analytical combination*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 109-110 (1996) 227-233
- ²¹⁹ Spemann D., Jankuhn St., Vogt J., Butz T., *Ionoluminescence investigations of ancient human bone with an external ion beam*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 161-163 (2000) 867-871
- ²²⁰ Müller K., Reiche I., *Differentiation of archeological ivory and bone materials by micro-PIXE/PIGE with emphasis on two Upper Palaeolithic key sites : Abri Pataud and Isturitz, France*, Journal of Archeological Science 38 (2011) 3234-3243
- ²²¹ Moretto P., Beck L., *Émission X induite par particules chargées (PIXE) : théorie*, Techniques de l'Ingénieur P2557 (2003)
- ²²² Burhop E.H.S., *Le rendement de fluorescence*, Journal de Physique et le Radium 16 (1955) 625-629
- ²²³ Bambynek W., Craseman B., Fink HU., Mark H., Swift C.D., Price R.E., Venugopala Rao P., *X-ray fluorescence yields, Auger, and Coster-Kronig transition probabilities*, Review of Modern Physics 44 (1972) 716-813
- ²²⁴ Krause M.O., *Atomic radiative and radiationless yields for K and L shells*, Journal of Physical Chemistry 8 (1979) 307-327
- ²²⁵ Cauchois Y., Despujols J., *Constantes des spectres d'émission X*, Techniques de l'Ingénieur K750 (1990)

-
- ²²⁶ Despujols J., *Spectrométrie d'émission des rayons X. Fluorescence X*, Techniques de l'Ingénieur P2695 (2000)
- ²²⁷ Denker A., Bohne W., Rauschenberg J., Röhrich J., Strub E., *Materials analysis using fast ions*, Application of Accelerator in Research Industry Conference Proceeding 680 (2002) 424-427
- ²²⁸ Lapicki G., *Cross sections for K-shell X-ray production by hydrogen and helium ions in elements from beryllium to uranium*, Journal of Physical and Chemical Reference Data 18 (1989) 111-122
- ²²⁹ Folkman F., Cramon K.M., Hertel N., *Angular distribution of particle-induced X-ray emission*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 3 (1984) 11-15
- ²³⁰ Johansson S.A.E., Johansson T.B., *Analytical application of particle induced X-ray emission*, Nuclear Instruments and Methods 137 (1976) 473-516
- ²³¹ Folkmann F., Gaarde C., Huus T., Kemp K., *Proton Induced X-ray Emission as a tool for trace element analysis*, Nuclear Instruments and Methods 116 (1974) 487-499
- ²³² Brundles C.R., Evans C.A., Wilson S., *Encyclopedia of materials characterization: surfaces, interfaces, thin films* (1992) Butterworth-Heinemann
- ²³³ Campbell J.L., Wang JX., Maxwell J.A., Teesdale W.J., *An exact treatment of secondary and tertiary fluorescence enhancement in PIXE*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 43 (1989) 539-555

Résumé :

Les verres bioactifs sont des matériaux particulièrement intéressants en régénération osseuse du fait de leur capacité à stimuler les cellules responsables de la croissance osseuse par les espèces qu'ils relarguent lors de leur dissolution et pour leur capacité à se lier à l'os. Au-delà de leur rôle comme matériau de comblement de défauts osseux, ils pourraient servir de support à la croissance en laboratoire de véritables greffons osseux cultivés à l'aide de seulement quelques cellules d'un patient. Afin d'être efficace, ce support doit posséder une architecture macroporeuse interconnectée pour permettre l'invasion cellulaire ainsi que la vascularisation, nécessaire à la survie des cellules.

Ce travail de thèse a pour objectif la réalisation d'un tel support par l'ajout d'une étape de moussage au procédé sol-gel. Ce procédé a été utilisé pour la synthèse de matériaux aux porosités différentes permettant de déterminer une porosité plus prometteuse pour des essais in vivo qui ont montré l'invasion possible de cette mousse par des cellules osseuses. Ce procédé a de plus été rendu plus sûr par la mise au point d'une voie de synthèse alternative dans laquelle l'acide nécessaire au procédé de moussage, mais toxique, a été remplacé avec succès. Cette voie alternative a de plus permis l'organisation de la mésoporosité de la mousse. L'incorporation d'un élément d'intérêt biologique, le strontium, a été réalisé et son influence sur les propriétés et la réactivité du verre a été étudiée. Enfin, une voie de synthèse de nouveaux matériaux composites a été proposée : la grande bioactivité des verres bioactifs est conservée tout en ayant des propriétés mécaniques supérieures grâce à l'utilisation de la gélatine comme phase organique.

Mots clés : Biomatériaux, procédé sol-gel, verres bioactifs, macroporosité, mésoporosité, strontium, micro-PIXE

Abstract:

Bioactive glasses are very interesting materials for bone regeneration because of their ability to stimulate cells responsible for bone growth with ionic products released during dissolution and for their bone bonding ability. Beyond their role as bone filling materials, they can be used as support for growth of laboratory-made bone grafts cultivated from just a few cells of a patient. This support, named scaffold, has to be an interconnected macroporous architecture in order to allow cell invasion and vascularization which is essential to cell survival.

The aim of this thesis work is the realization of such a scaffold using the sol-gel foaming process. This process has been used for the synthesis of materials with different properties that were compared for determination of the most promising for in vivo implantation and was indeed able to allow cell invasion. Moreover, this process was improved to be safer by replacement of hazardous catalyst. This new process also allowed the structuration of the mesoporosity inside the foams. Incorporation of a biologically active element (strontium) was realized and its influence on the glass properties and reactivity was evaluated. Finally, the synthesis of new composite materials has been proposed: the high bioactivity of bioactive glasses is preserved while better mechanical properties are obtained thanks to the use of gelatin as organic phase.

Keywords: Biomaterials, sol-gel process, bioactive glasses, macroporosity, mesoporosity, strontium, micro-PIXE