



**HAL**  
open science

# Synthèse, caractérisation et évaluation biologique d'apatites phosphocalciques carbo silicatées

Antoine Boyer

► **To cite this version:**

Antoine Boyer. Synthèse, caractérisation et évaluation biologique d'apatites phosphocalciques carbo silicatées. Biotechnologies. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2014. Français. NNT : 2014EMSE0739 . tel-01068540

**HAL Id: tel-01068540**

**<https://theses.hal.science/tel-01068540v1>**

Submitted on 25 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.

NNT : 2014 EMSE 0739

## THÈSE

présentée par

Antoine BOYER

pour obtenir le grade de  
Docteur de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne

Spécialité : Génie des procédés

### SYNTHESE, CARACTERISATION ET EVALUATION BIOLOGIQUE D'APATITES PHOSPHOCALCIQUES CARBO-SILICATEES.

soutenue à Saint-Etienne, le 17 avril 2014

#### Membres du jury

Président :	Nicolas DACHEUX	Professeur, Université Montpellier 2
Rapporteurs :	Jean-Michel BOULER Eric CHAMPION	Professeur, Université de Nantes Professeur, Université de Limoges
Examineurs :	Jérôme CHEVALIER Alain GUIGNANDON	Professeur, INSA Lyon Maître de Conférences, Université Jean Monnet, Saint-Etienne
Co-encadrant :	David MARCHAT	Chargé de Recherche, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne
Directeur de thèse :	Didier BERNACHE- ASSOLLANT	Professeur Emérite, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne

**Spécialités doctorales :**  
 SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX  
 MECANIQUE ET INGENIERIE  
 GENIE DES PROCÉDES  
 SCIENCES DE LA TERRE  
 SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT  
 MATHÉMATIQUES APPLIQUÉES  
 INFORMATIQUE  
 IMAGE, VISION, SIGNAL  
 GENIE INDUSTRIEL  
 MICROELECTRONIQUE

**Responsables :**  
 K. Wolski Directeur de recherche  
 S. Drapier, professeur  
 F. Gruy, Maître de recherche  
 B. Guy, Directeur de recherche  
 D. Graillet, Directeur de recherche  
 O. Roustant, Maître-assistant  
 O. Boissier, Professeur  
 J.C. Pinoli, Professeur  
 A. Dolgui, Professeur

**EMSE : Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)**

ABSI	Nabil	CR		CMP
AVRIL	Stéphane	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
BATTON-HUBERT	Mireille	PR2	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BERGER DOUCE	Sandrine	PR2		FAYOL
BERNACHE-ASSOLLANT	Didier	PR0	Génie des Procédés	CIS
BIGOT	Jean Pierre	MR(DR2)	Génie des Procédés	SPIN
BILAL	Essaid	DR	Sciences de la Terre	SPIN
BOISSIER	Olivier	PR1	Informatique	FAYOL
BORBELY	Andras	MR(DR2)	Sciences et génie des matériaux	SMS
BOUCHER	Xavier	PR2	Génie Industriel	FAYOL
BRODHAG	Christian	DR	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BURLAT	Patrick	PR2	Génie Industriel	FAYOL
COURNIL	Michel	PR0	Génie des Procédés	DIR
DARRIEULAT	Michel	IGM	Sciences et génie des matériaux	SMS
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR1	Génie Industriel	CMP
DEBAYLE	Johan	CR	Image Vision Signal	CIS
DELAFOSSÉ	David	PR1	Sciences et génie des matériaux	SMS
DESRAYAUD	Christophe	PR2	Mécanique et ingénierie	SMS
DOLGUI	Alexandre	PR0	Génie Industriel	FAYOL
DRAPIER	Sylvain	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
FEILLET	Dominique	PR2	Génie Industriel	CMP
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	MR(DR2)	Génie des Procédés	SPIN
GERINGER	Jean	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	CIS
GOEURIOT	Dominique	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences et génie de l'environnement	SPIN
GROSSEAU	Philippe	DR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	PR1	Génie des Procédés	SPIN
GUY	Bernard	DR	Sciences de la Terre	SPIN
HAN	Woo-Suck	CR	Mécanique et ingénierie	SMS
HERRI	Jean Michel	PR1	Génie des Procédés	SPIN
KERMOUCHE	Guillaume	PR2	Mécanique et Ingénierie	SMS
KLOCKER	Helmut	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
LAFOREST	Valérie	MR(DR2)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
LERICHE	Rodolphe	CR	Mécanique et ingénierie	FAYOL
LI	Jean-Michel			CMP
MALLIARAS	Georges	PR1	Microélectronique	CMP
MOLIMARD	Jérôme	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
MONTHEILLET	Frank	DR		SMS
MOUTTE	Jacques	CR		SPIN
NIKOLOVSKI	Jean-Pierre			CMP
PIJOLAT	Christophe	PR0	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Michèle	PR1	Génie des Procédés	SPIN
PINOLI	Jean Charles	PR0	Image Vision Signal	CIS
POURCHEZ	Jérémy	CR	Génie des Procédés	CIS
ROBISSON	Bruno			CMP
ROUSSY	Agnès	MA(MDC)		CMP
ROUSTANT	Olivier	MA(MDC)		FAYOL
ROUX	Christian	PR		CIS
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences et génie des matériaux	SMS
TRIA	Assia		Microélectronique	CMP
VALDIVIESO	François	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	SMS
VIRICELLE	Jean Paul	MR(DR2)	Génie des Procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR1	Génie industriel	CIS
YUGMA	Gallian	CR		CMP

**ENISE : Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)**

BERGHEAU	Jean-Michel	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
BERTRAND	Philippe	MCF	Génie des procédés	ENISE
DUBUJET	Philippe	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
FEULVARCH	Eric	MCF	Mécanique et Ingénierie	ENISE
FORTUNIER	Roland	PR	Sciences et Génie des matériaux	ENISE
GUSSAROV	Andrey	Enseignant contractuel	Génie des procédés	ENISE
HAMDI	Hédi	MCF	Mécanique et Ingénierie	ENISE
LYONNET	Patrick	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
RECH	Joël	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
SMUROV	Igor	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
TOSCANO	Rosario	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
ZAHOUANI	Hassan	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE

PR 0	Professeur classe exceptionnelle	Ing.	Ingénieur
PR 1	Professeur 1 <sup>ère</sup> classe	MCF	Maître de conférences
PR 2	Professeur 2 <sup>ème</sup> classe	MR (DR2)	Maître de recherche
PU	Professeur des Universités	CR	Chargé de recherche
MA (MDC)	Maître assistant	EC	Enseignant-chercheur
DR	Directeur de recherche	IGM	Ingénieur général des mines

SMS	Sciences des Matériaux et des Structures
SPIN	Sciences des Processus Industriels et Naturels
FAYOL	Institut Henri Fayol
CMP	Centre de Microélectronique de Provence
CIS	Centre Ingénierie et Santé

NNT : 2014 EMSE 0739

## THÈSE

présentée par

Antoine BOYER

pour obtenir le grade de  
Docteur de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne

Spécialité : Génie des procédés

### SYNTHESE, CARACTERISATION ET EVALUATION BIOLOGIQUE D'APATITES PHOSPHOCALCIQUES CARBO-SILICATEES.

soutenue à Saint-Etienne, le 17 avril 2014

#### Membres du jury

Président :	Nicolas DACHEUX	Professeur, Université Montpellier 2
Rapporteurs :	Jean-Michel BOULER Eric CHAMPION	Professeur, Université de Nantes Professeur, Université de Limoges
Examineurs :	Jérôme CHEVALIER Alain GUIGNANDON	Professeur, INSA Lyon Maître de Conférences, Université Jean Monnet, Saint-Etienne
Co-encadrant :	David MARCHAT	Chargé de Recherche, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne
Directeur de thèse :	Didier BERNACHE- ASSOLLANT	Professeur Emérite, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne



*« Même une pendule cassée donne l'heure juste deux fois par jour »*  
Dr Gregory House

*à mes parents  
à ma sœur  
à Fiona*



# Remerciements

C'est ici que vous, lecteurs, en commencez avec ce mémoire de thèse. C'est ici que moi, néo-chômeur, j'en finis!

Aussi, l'heure est venue aux remerciements... avant de chercher un emploi à la hauteur d'un doctorat.

En premier lieu, je tiens à remercier Messieurs Didier Bernache-Assollant et David Marchat de m'avoir proposé ce sujet de thèse et de m'avoir accueilli au sein du laboratoire BioPI, dans le CIS de l'ENSMSE (que d'acronymes qui font disparaître un élément important : le lieu de l'action, Saint-Etienne, nous y reviendrons!). Je vous remercie particulièrement pour votre patience et votre disponibilité, et de m'avoir fait confiance jusqu'au bout de ces trois ans (...et quelques mois). Vos réflexions scientifiques et votre rigueur rédactionnelle ont fortement influencées la qualité de ce manuscrit. Je remercie également Madame Nathalie Douard pour son aide et sa participation active à ce travail.

Je souhaite remercier Messieurs Jean Michel Bouler et Eric Champion pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant d'être rapporteurs de mon mémoire de thèse. Je remercie également Messieurs Jérôme Chevalier, Nicolas Dacheux et Alain Guignandon, pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je remercie également toutes les personnes qui ont participé à la réalisation des essais biologiques, (Silvia, Guénaëlle, Fiona) ainsi que le Laboratoire de Biologie Intégrative du Tissu Osseux (LBTO) où elles ont eu lieu.

Je tiens à remercier particulièrement mes deux stagiaires colombiens *longues durées* qui ont passé beaucoup de temps à faire un travail souvent ingrat mais somme toute très profitable à cette thèse : Silvia et José.

La thèse, c'est aussi un travail d'équipe ! Et comme au football, la technique est aussi importante que la tactique. J'adresse donc un grand MERCI à Coralie Laurent qui fut une merveilleuse ~~assistante~~ collègue! Je n'oublierai jamais ta bonne humeur ainsi que tes histoires de partie de chasse que tu me racontais lors de nos voyages féériques à la benne pour déposer les cartons et les chips en polystyrène (...même si une fois on a cru rester coincé dans l'ascenseur du K et devoir subvenir au cannibalisme pour s'en sortir...). De même, je remercie particulièrement Marie-Claude Bartholin, véritable GPS de labo, ainsi qu'Anne-Marie Danna qui m'a aidé à faire mes premiers pas derrière la paillasse du C3-09. Je remercie également l'ensemble des permanents et des techniciens qui m'ont aidé dans la réalisation de mes manip' : Gwendoline, Yamina, Annie, Laetitia, Maryline, Fatima, Alex, Jean-Pierre, Fred, Olivier, Marc, Nicolas, Sergio, Gilles, Jérémy.

Et que dire du secrétariat! Merci beaucoup Françoise, Carole, et Amélie pour toutes ces petites tracasseries administratives toujours réglées avec efficacité. Jamais bien loin d'elles,



je remercie également Jérôme, notre informaticien, de m'avoir fourni un PC performant presque dès le début de la thèse...

De ce temps passé à l'école des mines, je retiendrai surtout les formidables amitiés qu'on a pu créer entre doctorants. Les pauses-café du C3 avec ses lotofoot, les déjeuners sur l'herbe, les playground et surtout les HH au Soggy. Des plus anciens, partis depuis longtemps, aux petits nouveaux fraîchement venus, vous avez tous compté pour moi : Thomas (TP), Jules, Frank (mon frère de couleur), Olivier, Maxym, Benjamin, Pierre-Yves, Aaron, Ivan, Timothée, Pauline, Estelle, Agathe, Andréa, Maria, Lara, Mélanie, Wafa, Emmanuelle... Une pensée particulière à mes deux anciens co-bureau : Baptiste et Dimitrios avec qui j'ai pu réviser mon expression française (et grecque). Baptiste, merci pour tout le temps que tu as consacré à m'aider (synthèses, déconvolutions de courbe ...). Aussi, pour ceux qui y sont encore, je vous souhaite à tous de finir vos thèses dans les temps, avec plein de papier ! C'est possible !

Et comme le disait Franky Vincent, il n'y a pas que la thèse dans la vie, il y a le foot aussi. Ainsi, je remercie cap'tain Thomas et tous les licenciés de l'équipe de foot à 7 de l'EMSE qui ont dû supporter mes passes foireuses et mes tirs manquées pendant 3 saisons ! En tout cas, ça m'a permis de m'entretenir ☺ ! Et toi, as-tu déjà supporté l'équipe de foot de ta région ? En tout cas, quand on parle football à Saint-Etienne, il n'y en a que pour la grande équipe des Verts !!! Je remercie les joueurs de l'Association Sportive de Saint-Etienne d'avoir mouillé le maillot et soulevé une coupe après 32 ans de disette l'année où je m'abonnais en Kop Nord !

Saint-Etienne, c'est aussi la mine, le design, la râpée, le Forez, le Pilat, la Loire, le doux climat, le ciel toujours bleu, la douceur de vivre et les gens heureux. Et comme disait l'autre : « Saint-Etienne, aimez-la ou quittez-la ! »

Je rends grâce également à mes copains « historiques », les roannais : Alain (*Mephisto le buveur*), Anthony, Biwain, Coco, Guillaume, Henri, Kro, Tibo et leurs femmes, copines, amantes, ou souris respectives... avec qui j'ai pu me détendre régulièrement durant cette thèse autour d'une bière, d'un match, d'un south park, d'une LAN... ou des quatre à la fois.

*And now, last but not least*, je remercie également l'ASEC et ses membres (Association Stéphanoise des Jeunes Chercheurs... ne me demandez pas pourquoi l'acronyme ne correspond pas, ces gens ont des problèmes de boissons) pour ses soirées, ses voyages et ses rencontres. En effet, j'ai pu y rencontrer Fiona ☺. Tu es ce qui m'est arrivé de mieux en thèse. C'est grâce à toi si j'ai pu en voir le bout. « *T'es la meilleure* ». Miaou.

# Sommaire

<b>Remerciements</b> .....	<b>iii</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>vii</b>
<b>Table des figures et tableaux</b> .....	<b>xi</b>
<b>Glossaire</b> .....	<b>xix</b>
<b>Nomenclature des phases</b> .....	<b>xxi</b>
<b>Nomenclature des réactifs utilisés lors de l'évaluation biologique</b> .....	<b>xxii</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre I. Synthèse bibliographique</b> .....	<b>3</b>
<b>I.1. Le tissu osseux</b> .....	<b>5</b>
I.1.1. Les fonctions du tissu osseux .....	5
I.1.2. La matrice organique .....	5
I.1.3. La matrice minérale .....	5
I.1.4. Les cellules osseuses .....	6
<b>I.2. Les substituts osseux</b> .....	<b>9</b>
I.2.1. Cahier des charges .....	9
I.2.2. Les biocéramiques .....	10
I.2.3. Les phosphates de calcium .....	12
I.2.4. Amélioration de la bioactivité des CaP .....	13
<b>I.3. Les substitutions dans l'hydroxyapatite phosphocalcique (HA)</b> .....	<b>14</b>
I.3.1. Structure de l'HA stœchiométrique .....	14
I.3.2. L'hydroxyapatite phosphocalcique substituée d'intérêt biologique .....	15
I.3.3. L'hydroxyapatite phosphocalcique carbonatée (C-HA) .....	17
I.3.4. L'hydroxyapatite phosphocalcique silicatée (Si-HA) .....	20
I.3.5. L'hydroxyapatite phosphocalcique carbo-silicatée (C-Si-HA) .....	23
<b>I.4. Stratégie de l'étude : de la synthèse à l'évaluation biologique</b> .....	<b>26</b>
<b>Chapitre II. Synthèse et Caractérisations de l'apatite <math>C_{0,5}-Si_{0,5}-HA</math></b> .....	<b>27</b>
<b>II.1. Matériels et méthodes</b> .....	<b>30</b>
II.1.1. Synthèse et préparation des poudres .....	30
II.1.1.1. Mise en solution des réactifs .....	31
II.1.1.2. Mode opératoire .....	33
II.1.1.3. Paramètres de synthèses .....	34
II.1.1.4. Traitements thermiques .....	37
II.1.2. Méthodes de caractérisation .....	37

II.1.2.1. Analyses structurales.....	37
II.1.2.2. Spectroscopie InfraRouge .....	39
II.1.2.3. Analyses élémentaires.....	39
<b>II.2. Caractérisations des poudres de références : HA / C<sub>0,5</sub>-HA / Si<sub>0,5</sub>-HA.....</b>	<b>40</b>
II.2.1. Analyses physico-chimiques des poudres brutes.....	40
II.2.2. Evolution des phases après calcination .....	45
II.2.2.1. Analyses structurales.....	45
II.2.2.2. Spectroscopie InfraRouge .....	48
II.2.2.3. Evolution des paramètres de maille .....	58
II.2.3. Conclusion partielle.....	62
<b>II.3. Etude du composé : C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA.....</b>	<b>63</b>
II.3.1. Caractérisations physico-chimiques de la poudre brute C <sub>0,5</sub> -Si <sub>0,5</sub> -HA .....	63
II.3.2. Evolution du composé C <sub>0,5</sub> -Si <sub>0,5</sub> -HA après calcination .....	67
II.3.2.1. Calcination sous air .....	68
II.3.2.2. Calcination sous CO <sub>2</sub> .....	71
II.3.2.3. Effets de l'incorporation des groupements CO <sub>3</sub> et SiO <sub>4</sub> dans la structure apatitique.....	78
II.3.2.4. Discussion sur la structure des C-Si-HA .....	79
II.3.3. Analyse élémentaire du composé C <sub>0,5</sub> -Si <sub>0,5</sub> -HA .....	82
<b>II.4. Conclusion .....</b>	<b>85</b>
<b>Chapitre III. Stabilité Thermique et Frittage C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA.....</b>	<b>87</b>
<b>III.1. Matériels et méthodes .....</b>	<b>90</b>
III.1.1. Analyses thermiques .....	90
III.1.1.1. Protocoles de calcination et analyses physico-chimiques des poudres .....	90
III.1.1.2. Analyses thermogravimétriques et spectrométrie de masse .....	91
III.1.2. Elaboration des céramiques.....	92
III.1.2.1. Préparation des poudres : analyse BET .....	92
III.1.2.2. Mise en forme des comprimés.....	92
III.1.2.3. Analyses dilatométriques.....	92
III.1.2.4. Frittage des comprimés.....	92
III.1.2.5. Analyses morphologiques des comprimés.....	93
<b>III.2. Stabilité thermique .....</b>	<b>95</b>
III.2.1. Généralités sur la stabilité thermique des composés apatitiques .....	95
III.2.2. Comportement thermique des poudres : sous air (et hélium) .....	96
III.2.2.1. Analyses thermogravimétriques .....	96
III.2.2.2. Analyses structurales.....	100
III.2.2.3. Spectrométrie Infrarouge.....	100
III.2.2.4. Discussion .....	103
III.2.3. Comportement thermique des poudres : sous CO <sub>2</sub> .....	105
III.2.3.1. Analyses thermogravimétriques .....	105
III.2.3.2. Analyses structurales.....	108

III.2.3.3. Spectroscopie Infrarouge.....	109
III.2.3.4. Discussion .....	112
<b>III.3. Frittabilité .....</b>	<b>116</b>
III.3.1. Généralités sur le frittage.....	116
III.3.2. Fabrication des céramiques de composition $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$ .....	119
III.3.2.1. Compressibilité : Influence de la surface spécifique.....	119
III.3.2.2. Etude dilatométrique - Frittage .....	119
III.3.2.3. Caractérisations des céramiques denses $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$ .....	121
III.3.2.3.1. Analyses physico-chimiques .....	121
III.3.2.3.2. Analyses morphologiques .....	124
<b>III.4. Conclusion.....</b>	<b>129</b>
<b>Chapitre IV. Evaluation biologique 2D <i>in vitro</i> des céramiques <math>C_{0,8}-Si_{0,4}-HA</math> avec des cellules C3H10T1/2.....</b>	<b>131</b>
<b>IV.1. Culture cellulaire (<i>in vitro</i> 2D) .....</b>	<b>135</b>
IV.1.1. Le type cellulaire : C3H10T1/2 .....	135
IV.1.2. Comportement cellulaire à la surface des matériaux .....	136
<b>IV.2. Matériels et méthodes.....</b>	<b>138</b>
IV.2.1. Synthèse des poudres .....	138
IV.2.2. Elaboration des céramiques.....	139
IV.2.3. Evaluation biologique 2D <i>in vitro</i> .....	140
IV.2.3.1. Culture cellulaire - Milieu et procédé.....	140
IV.2.3.2. Attachement cellulaire .....	141
IV.2.3.3. Activité mitochondriale des cellules.....	141
IV.2.3.4. Prolifération cellulaire .....	141
IV.2.3.5. Apoptose .....	142
IV.2.3.6. Morphologie et cytosquelette cellulaire .....	142
IV.2.3.7. Représentations graphiques et analyses statistiques .....	143
<b>IV.3. Synthèses, caractérisations physico-chimiques et thermiques des poudres <math>C_{0,8}-HA</math> et <math>C_{0,8}-Si_{0,4}-HA</math> .....</b>	<b>144</b>
IV.3.1. Vérification de la pureté des poudres $C_{0,8}-HA$ et $C_{0,8}-Si_{0,4}-HA$ .....	144
IV.3.2. Comportement thermique : analyse thermogravimétrique .....	146
<b>IV.4. Elaboration et caractérisation des céramiques .....</b>	<b>148</b>
IV.4.1. Compression des poudres avant frittage .....	148
IV.4.2. Caractérisations des céramiques d'HA.....	149
IV.4.3. Détermination de la température optimale de frittage de $C_{0,8}-HA$ .....	150
IV.4.4. Détermination de la température optimale de frittage de $C_{0,8}-Si_{0,4}-HA$ .....	154
<b>IV.5. Comportement des cellules souches mésenchymateuses en culture 2D <i>in vitro</i> sur des céramiques denses HA, <math>C_{0,8}-HA</math> et <math>C_{0,8}-Si_{0,4}-HA</math> .....</b>	<b>159</b>
IV.5.1. Attachement cellulaire .....	159

---

IV.5.2. Comportement et activité cellulaire .....	160
IV.5.3. Morphologie cellulaire .....	163
<b>IV.6. Conclusion .....</b>	<b>168</b>
<b><i>Conclusions &amp; Perspectives.....</i></b>	<b>169</b>
<b><i>Références Bibliographiques .....</i></b>	<b>173</b>
<b><i>Annexes.....</i></b>	<b>185</b>
<b>A.1. Fiches de données de sécurité des réactifs .....</b>	<b>187</b>
<b>A.2. Courbes de spéciation .....</b>	<b>190</b>
<b>A.3. Détermination de la température optimale de calcination pour l'élimination des résidus de synthèse nitrés sans décarbonatation du composé C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA.....</b>	<b>191</b>
<b>A.4. Détermination du ratio CO<sub>3</sub>(A)/CO<sub>3</sub>(B) à partir des analyses thermogravimétriques .</b>	<b>193</b>

# Table des figures et tableaux

<b>Figure 1</b> : Les différentes échelles d'organisation de l'os naturel [Taton, 2001].	6
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique d'une unité de remodelage osseux [Servier Medical Art, 2005].	7
<b>Figure 3</b> : Spectre de bioactivité pour divers implants biocéramiques avec (a) le taux relatif de bioactivité, et (b) le temps de formation d'une liaison osseuse à l'interface de l'implant [(A) 45S5 bioglass, (B) Mina 13 Ceravital, (C) 55S4.3 Bioglass, (D) A/W glass ceramic, (E) HA, (F) Kgy 213 Ceravital][Cao, 1996]	11
<b>Figure 4</b> : Projection de la structure de HA sur les plans (001) et (010).	15
<b>Figure 5</b> : Projection de la structure de C <sub>A</sub> -HA sur les plans (001) et (010).	18
<b>Figure 6</b> : Projection de la structure de C <sub>B</sub> -HA sur les plans (001) et (010).	19
<b>Figure 7</b> : Projection de la structure de Si-HA sur les plans (001) et (010).	23
<b>Figure 8</b> : Mécanisme d'hydrolyse d'une molécule d'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS) en solution eau/éthanol acidifiée.	32
<b>Figure 9</b> : Mécanisme de condensation des groupements silanol en milieu basique après complète hydrolyse du précurseur TEOS.	32
<b>Figure 10</b> : Mécanisme de l'attaque nucléophile des liaisons siloxanes par des ions hydroxydes.	33
<b>Figure 11</b> : Mécanisme de la réaction de dépolymérisation du gel de silice par une solution d'ammoniaque.	33
<b>Figure 12</b> : Schéma du montage de synthèse par précipitation en voie aqueuse.	34
<b>Figure 13</b> : Diffractogrammes des poudres de référence HA, Si <sub>0,5</sub> -HA et C <sub>0,5</sub> -HA calcinées à 400°C pendant 2 h (poudre brute).	40
<b>Figure 14</b> : Spectres IR des poudres de référence HA, Si <sub>0,5</sub> -HA et C <sub>0,5</sub> -HA calcinées à 400°C pendant 2 h (poudre brute).	41
<b>Figure 15</b> : Spectre IR de la poudre de référence Si <sub>0,5</sub> -HA calcinée à 400°C pendant 2 h (poudre brute) - domaines SiO <sub>4</sub> .	42
<b>Figure 16</b> : Spectre IR de la poudre de référence C <sub>0,5</sub> -HA calcinée à 400°C pendant 2 h (poudre brute) - domaines CO <sub>3</sub> .	44
<b>Figure 17</b> : Spectres IR des poudres de référence HA, Si <sub>0,5</sub> -HA et C <sub>0,5</sub> -HA calcinées à 400°C pendant 2 h (poudre brute) - domaine ν <sub>3</sub> CO <sub>3</sub> .	45
<b>Figure 18</b> : Diffractogrammes des poudres de référence HA, Si <sub>0,5</sub> -HA et C <sub>0,5</sub> -HA calcinées sous air à 1000°C pendant 15 h.	46
<b>Figure 19</b> : Diffractogrammes des poudres de référence HA, Si <sub>0,5</sub> -HA et C <sub>0,5</sub> -HA calcinées sous CO <sub>2</sub> à 1000°C pendant 1 h.	47
<b>Figure 20</b> : Spectres IR des poudres de référence HA, Si <sub>0,5</sub> -HA et C <sub>0,5</sub> -HA calcinées sous air à 1000°C pendant 15 h.	48
<b>Figure 21</b> : Spectre IR de la poudre de référence Si <sub>0,5</sub> -HA calcinée sous air à 1000°C pendant 15 h - domaines SiO <sub>4</sub> .	50
<b>Figure 22</b> : Spectres IR des poudres de référence HA, Si <sub>0,5</sub> -HA et C <sub>0,5</sub> -HA calcinées sous CO <sub>2</sub> à 1000°C pendant 1 h.	51
<b>Figure 23</b> : Spectre IR de la poudre de référence C <sub>0,5</sub> -HA calcinée sous CO <sub>2</sub> à 1000°C pendant 1 h - domaines CO <sub>3</sub> .	52
<b>Figure 24</b> : Spectres IR des poudres de référence HA, Si <sub>0,5</sub> -HA et C <sub>0,5</sub> -HA calcinées sous CO <sub>2</sub> à 1000°C pendant 1 h - domaine ν <sub>3</sub> CO <sub>3</sub> .	52

<b>Figure 25</b> : Spectre IR de la poudre de référence $Si_{0,5}$ -HA calcinée sous $CO_2$ à 1000°C pendant 1 h - domaines $SiO_4$ .....	55
<b>Figure 26</b> : Déconvolution du spectre IR de la poudre de référence $Si_{0,5}$ -HA calcinée sous $CO_2$ à 1000°C pendant 1 h centré sur de la bande d'absorption $\nu_3 SiO_4$ à $891\text{ cm}^{-1}$ .....	55
<b>Figure 27</b> : Spectres IR de la poudre de référence $Si_{0,5}$ -HA réalisés avant calcination (tirets), après calcination sous air à 1000°C pendant 15 h (en pointillés), et sous $CO_2$ à 1000°C pendant 1 h (en ligne continue) - domaines $SiO_4$ .....	56
<b>Figure 28</b> : Spectres IR de la poudre de référence $Si_{0,5}$ -HA calcinée sous air à 1000°C pendant 15 h (en pointillés), et sous $CO_2$ à 1000°C pendant 1 h (en ligne continue) - domaine Si-R.....	57
<b>Figure 29</b> : Proposition de mécanisme d'adsorption des carbonates atmosphériques à la surface des apatites silicatées [Lavalley, 1996].....	57
<b>Figure 30</b> : Projection de la structure de $C_{A/B}$ -HA sur les plans (001) et (010).....	60
<b>Figure 31</b> : Projection de la structure de $C_A$ -Si-HA sur les plans (001) et (010).....	61
<b>Figure 32</b> : Diffractogramme de la poudre $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA calcinée à 400°C pendant 2 h sous air (poudre brute).....	63
<b>Figure 33</b> : Spectre IR de la poudre $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA calcinée à 400°C pendant 2 h (poudre brute).....	64
<b>Figure 34</b> : Spectres IR des poudres HA, $C_{0,5}$ -HA, $Si_{0,5}$ -HA et $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA calcinées à 400°C pendant 2 h (poudre brute) - domaine $\nu_L$ et $\nu_S$ OH.....	64
<b>Figure 35</b> : Spectres IR des poudres $C_{0,5}$ -HA et $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA calcinées à 400°C pendant 2 h (poudre brute) - domaines des $\nu_3 CO_3$ .....	65
<b>Figure 36</b> : Spectres IR des poudres $Si_{0,5}$ -HA et $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA calcinées à 400°C pendant 2 h (poudres brutes) - domaines des $SiO_4$ .....	66
<b>Figure 37</b> : Spectres IR de trois poudres $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA synthétisées dans les mêmes conditions et calcinées à 400°C pendant 2 h (brute).....	67
<b>Figure 38</b> : Diffractogramme de la poudre $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA calcinée à 1000°C pendant 15 h sous air.....	68
<b>Figure 39</b> : Spectre IR de la poudre $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA calcinée à 1000°C pendant 15 h sous air.....	69
<b>Figure 40</b> : Spectres IR de la poudre $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA réalisés avant calcination (tirets), et après calcination à 1000°C pendant 15 h sous air (trait continue) - domaines $SiO_4$ .....	70
<b>Figure 41</b> : Spectres IR des poudres $Si_{0,5}$ -HA et $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA calcinées à 1000°C pendant 15 h sous air - domaines $SiO_4$ .....	70
<b>Figure 42</b> : Diffractogramme de la poudre $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA calcinée à 1000°C pendant 1 h sous $CO_2$ .....	71
<b>Figure 43</b> : Spectre IR de la poudre $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA calcinée à 1000°C pendant 1 h sous $CO_2$ .....	72
<b>Figure 44</b> : Spectres IR de la poudre $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA réalisés avant calcination (tirets), après calcination à 1000°C pendant 15 h sous air (pointillés), après calcination à 1000°C pendant 1 h sous $CO_2$ (trait continue) - domaines $\nu_L$ et $\nu_S$ OH.....	73
<b>Figure 45</b> : Spectres IR de la poudre $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA réalisés avant calcination (tirets), après calcination à 1000°C pendant 15 h sous air (pointillés), après calcination à 1000°C pendant 1 h sous $CO_2$ (ligne continue) - domaines des $\nu_2$ et $\nu_3 CO_3$ .....	75
<b>Figure 46</b> : Spectres IR de la poudre $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA réalisées avant calcination (tirets), après calcination à 1000°C pendant 15 h sous air (pointillés), après calcination à 1000°C pendant 1 h sous $CO_2$ (ligne continue) - domaines des $SiO_4$ .....	75
<b>Figure 47</b> : Spectres IR de la poudre $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA réalisés avant calcination (tirets), après calcination à 1000°C pendant 15 h sous air (pointillés), après calcination à 1000°C pendant 1 h sous $CO_2$ (ligne continue) - domaines des dégénérescences $\nu_1 PO_4$ .....	77

<b>Figure 48</b> : Spectres IR des poudres $C_{0,5}Si_{0,5}HA$ (rouge) et $Si_{0,5}HA$ (bleu) calcinées à 1000°C pendant 1 h sous $CO_2$ - domaines des $SiO_4$ .	77
<b>Figure 49</b> : Paramètres de maille $a$ et $c$ des poudres calcinées comparés aux valeurs références de l'HA (PDF 9-432) représentées en pointillé.	79
<b>Figure 50</b> : Schéma récapitulatif des évolutions des paramètres de maille en fonction des substitutions ioniques en carbonate et en silicate dans la structure apatitique par rapport à l'HA.	80
<b>Figure 51</b> : Projection de la structure de $C_{A/B}Si-HA$ sur les plans (001) et (010).	81
<b>Figure 52</b> : Courbes thermogravimétriques des poudres HA, $Si_{0,5}HA$ , $C_{0,5}HA$ et $C_{0,5}Si_{0,5}HA$ réalisées sous gaz inerte (He).	97
<b>Figure 53</b> : Courbes thermogravimétriques et émission des masses 18, 30 et 44 des poudres HA et $C_{0,5}Si_{0,5}HA$ réalisées sous hélium.	98
<b>Figure 54</b> : Déconvolution du spectre d'émission de la masse 44 acquis lors de l'ATG de l'HA et de $C_{0,5}Si_{0,5}HA$ (avec $p = 10^{12}$ ).	99
<b>Figure 55</b> : Diffractogrammes de la poudre $C_{0,5}Si_{0,5}HA$ calcinée sous air à différentes températures (de 400°C à 1300°C).	100
<b>Figure 56</b> : Spectres IR de la poudre $C_{0,5}Si_{0,5}HA$ calcinée sous air à différentes températures (de 400°C à 1000°C).	101
<b>Figure 57</b> : Spectres IR de la poudre $C_{0,5}Si_{0,5}HA$ calcinées sous air à différentes températures : de 400°C à 1000°C - domaine des $\nu_3 CO_3$ .	102
<b>Figure 58</b> : Spectres IR de la poudre $C_{0,5}Si_{0,5}HA$ calcinées sous air à différentes températures (de 400°C à 1000°C) - domaine des $SiO_4$ .	102
<b>Figure 59</b> : Schéma récapitulatif des différentes réactions de décomposition thermique sous air d'un composé $C_B-Si-HA$ .	105
<b>Figure 60</b> : Courbes thermogravimétriques de la poudre $C_{0,5}Si_{0,5}HA$ réalisées sous $CO_2$ et sa première dérivée. En référence, les résultats de l'ATG sous hélium pour le même composé.	106
<b>Figure 61</b> : Diffractogrammes de la poudre $C_{0,5}Si_{0,5}HA$ calcinée sous $CO_2$ à différentes températures (de 400°C à 1300°C).	108
<b>Figure 62</b> : Spectres IR de la poudre $C_{0,5}Si_{0,5}HA$ calcinée sous $CO_2$ à différentes températures (de 400°C à 1250°C).	109
<b>Figure 63</b> : Spectres IR de la poudre $C_{0,5}Si_{0,5}HA$ calcinées sous $CO_2$ à différentes températures (de 400°C à 1250°C) - domaine des $\nu_3$ et $\nu_2 CO_3$ .	110
<b>Figure 64</b> : Spectres IR de la poudre $C_{0,5}Si_{0,5}HA$ calcinées sous $CO_2$ à différentes températures (de 600°C à 1250°C) - domaine des $\nu_3$ et $\nu_4$ phosphates.	111
<b>Figure 65</b> : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la décomposition d'un composé $C_B-Si-HA$ sous $CO_2$ en fonction de la température de calcination.	115
<b>Figure 66</b> : Courbe de retrait isotherme d'un comprimé céramique [Bernache-Assollant, 1993].	117
<b>Figure 67</b> : Chemins de diffusion possible lors du frittage de deux sphères ; (a) consolidation sans retrait, (b) densification [Bernache-Assollant, 1993].	117
<b>Figure 68</b> : Evolution de la surface spécifique de la poudre $C_{0,5}Si_{0,5}HA$ calcinée pendant 1 h sous $CO_2$ en fonction de la température.	119
<b>Figure 69</b> : Courbe de retrait linéaire (ligne continue) et dérivée première de la courbe de retrait (tirets) d'un comprimé de poudre $C_{0,5}Si_{0,5}HA$ calciné sous $CO_2$ en fonction de la température.	120



<b>Figure 70</b> : Diffractogrammes des comprimés, non polis et non broyés, de poudre $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ frittés sous $\text{CO}_2$ à différentes températures (de 1000°C à 1250°C).....	122
<b>Figure 71</b> : Spectres IR des comprimés broyés de poudre $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ frittés sous $\text{CO}_2$ à 1100°C, 1125°C et 1150°C. En référence, le spectre de la poudre calcinée et décomposé à 1250°C est ajouté. Domaine des $\nu_3$ et $\nu_4$ phosphates. ....	123
<b>Figure 72</b> : Spectres IR des comprimés broyés de poudre $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ frittés sous $\text{CO}_2$ à 1100°C, 1125°C et 1150°C. ....	124
<b>Figure 73</b> : Fréquence cumulée et nombre de grains en fonction de la taille des grains. ....	126
<b>Figure 74</b> : Fréquence cumulée en fonction de la taille normalisée des grains. ....	127
<b>Figure 75</b> : Images MEB des comprimés de poudre $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ frittés sous $\text{CO}_2$ à 1100°C, 1125°C et 1150°C pendant 1 h. ....	128
<b>Figure 76</b> : Place des C3H10T1/2 dans la lignée ostéogénique. ....	135
<b>Figure 77</b> : Fibre de tension d'actine (fibres de stress), et point focal d'adhérence entre la cellule et son substrat [Kramer, n.d.]. ....	136
<b>Figure 78</b> : Représentations schématiques des évaluations biologiques réalisées. ....	137
<b>Figure 79</b> : Diffractogrammes des poudres $C_{0,8}\text{-HA}$ et $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$ après calcination à 1000°C pendant 1 h sous $\text{CO}_2$ .....	144
<b>Figure 80</b> : Spectres IR des poudres $C_{0,8}\text{-HA}$ et $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$ après calcination à 1000°C pendant 1 h sous $\text{CO}_2$ . ....	145
<b>Figure 81</b> : Courbes thermogravimétriques des poudres $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$ et $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ réalisées sous $\text{CO}_2$ . ....	146
<b>Figure 82</b> : Evolution de la surface spécifique de la poudre $C_{0,8}\text{-HA}$ calcinée pendant 1 h sous $\text{CO}_2$ en fonction de la température.....	148
<b>Figure 83</b> : Evolution de la surface spécifique de la poudre $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$ calcinée pendant 1 h sous $\text{CO}_2$ en fonction de la température. ....	149
<b>Figure 84</b> : Images MEB des comprimés HA frittés à 1200°C pendant 2 h sous air. Flèches rouges : microporosités. Flèches jaunes : nanoporosité. ....	150
<b>Figure 85</b> : Courbe de retrait linéaire (ligne continue) et dérivée première de la courbe de retrait (tirets) d'un comprimé de poudre $C_{0,8}\text{-HA}$ calciné sous $\text{CO}_2$ en fonction de la température. ....	151
<b>Figure 86</b> : Diffractogrammes des comprimés $C_{0,8}\text{-HA}$ frittés sous $\text{CO}_2$ à différentes températures pendant 1 h. ....	153
<b>Figure 87</b> : Spectre IR des comprimés $C_{0,8}\text{-HA}$ frittés sous $\text{CO}_2$ à différentes températures pendant 1 h.....	153
<b>Figure 88</b> : Images MEB des comprimés de poudre $C_{0,8}\text{-HA}$ frittés à 1025°C pendant 1 h sous $\text{CO}_2$ . Flèches rouges : microporosités. Flèches jaunes : nanoporosité.....	154
<b>Figure 89</b> : Courbe de retrait linéaire (ligne continue) et dérivée première de la courbe de retrait (tirets) d'un comprimé de poudre $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$ calciné sous $\text{CO}_2$ en fonction de la température. ....	155
<b>Figure 90</b> : Images MEB des comprimés de poudre $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$ frittés sous $\text{CO}_2$ à 1100°C pendant 1 h. Flèches rouges : microporosités. Flèches jaunes : nanoporosité.....	156
<b>Figure 91</b> : Diffractogrammes des comprimés $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$ frittés sous $\text{CO}_2$ à différentes températures pendant 1 h.....	157
<b>Figure 92</b> : Spectre IR des comprimés $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$ frittés sous $\text{CO}_2$ à différentes températures pendant 1 h. ....	157
<b>Figure 93</b> : Evolution de l'attachement cellulaire sur les différents substrats après 30 min, 1 h et 2 h de culture. Etude statistique : différences significatives non dues au hasard (* = 95% ; ** = 99% ; *** = 99,9%). ....	159

**Figure 94** : Résultats des tests d'apoptose réalisés après 3 jours de culture sur les surfaces des céramiques HA,  $C_{0,8}$ -HA et  $C_{0,8}$ - $Si_{0,4}$ -HA, et du contrôle positif témoin.....160

**Figure 95** : Evolution de l'activité cellulaire sur les différents substrats après 1, 3, 6 et 8 jours de culture. Etude statistique : différences significatives non dues au hasard (\* = 95% ; \*\* = 99% ; \*\*\* = 99,9%).....161

**Figure 96** : Evolution de la prolifération cellulaire sur les différents substrats après 1 et 3 jours de culture. Etude statistique : différences significatives non dues au hasard (\* = 95% ; \*\* = 99% ; \*\*\* = 99,9%).....162

**Figure 97** : Marquage des fibres d'actine sur les différents substrats après 1 jour de culture. Flèches jaunes : stabilisation du noyau par les fibres de stress. Flèches rouges : fibres de stress particulièrement denses et marquées pour HA. Flèches bleues : cellules fines (caractéristique des cellules en migration). .....164

**Figure 98** : Images MEB de la surface de différents substrats après 24 h de culture. Flèches rouges : microporosités. Flèches bleues : cellules en division. Flèches vertes : cellules étalées et/ou matrice extracellulaire. ....166

**Figure 99** : Images MEB de la surface de différents substrats après 3 jours de culture. Flèches rouges : microporosités. Flèches bleues : cellules en division. Flèches roses : cellules étalées et confluentes. Flèches jaunes : nucléoles.....167

**Figure 100** : Courbes de spéciation des ions phosphates en fonction du pH [Guan, 2009]. .....190

**Figure 101** : Courbes de spéciation des ions silicates en fonction du pH [Guan, 2009]. .....190

**Figure 102** : Courbes de spéciation des ions carbonates en fonction du pH [Kaandorp, 2006]. .....190

**Figure 103** : Courbes thermogravimétriques des poudres  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA calcinées à 500°C (noir), 550°C (orange) et 600°C (bleu) pendant 10h, et réalisées sous gaz inerte (He), couplées avec l'étude au spectromètre de masse des gaz d'émission des éléments 30 et 44. ....192

**Figure 104** : Courbes thermogravimétriques réalisées sous gaz inerte (He) des poudres  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA brute et précalcinée à 1000°C pendant 1 heure sous  $CO_2$ . ....193

<b>Tableau 1</b> : Exemples de substitutions dans la structure apatitique [Palard, 2007].	16
<b>Tableau 2</b> : Paramètres de synthèses	36
<b>Tableau 3</b> : Coefficients stœchiométriques et pourcentages massiques théoriques des poudres synthétisées.	36
<b>Tableau 4</b> : Fiches de références pour l'indexation des diffractogrammes de phosphates de calcium (PDF) ....	38
<b>Tableau 5</b> : Bandes d'absorption infrarouges caractéristiques de l'HA [Heughebaert, 1977a; Raynaud, 1999].	41
<b>Tableau 6</b> : Bandes d'absorption infrarouge caractéristiques des groupements silicates dans une Si-HA [Marchat, 2013b].	43
<b>Tableau 7</b> : Bandes d'absorption infrarouge caractéristiques des groupements Si-O d'une silice cristalline ou amorphe [Marchat, 2013b].	43
<b>Tableau 8</b> : Bandes d'absorption infrarouge caractéristiques des groupements carbonates dans une C <sub>A/B</sub> -HA [Lafon, 2004; Heughebaert, 1977a; Rey, 1989; Rey, 1991; Fleet, 2009; Legeros, 1969; Antonakos, 2007].	44
<b>Tableau 9</b> : Aires intégrées des bandes d'absorption $\nu_1$ et $\nu_3$ du groupement SiO <sub>4</sub> du composé de référence Si <sub>0,5</sub> -HA après traitement thermique (i) à 400°C pendant 2 h sous air, (ii) à 1000°C pendant 15 h sous air, (iii) et à 1000°C pendant 1 h sous CO <sub>2</sub> .	49
<b>Tableau 10</b> : Aires intégrées des bandes d'absorption $\nu_5$ et $\nu_L$ du groupement OH des composés de référence après traitement thermique (i) à 400°C pendant 2 h sous air, (ii) à 1000°C pendant 15 h sous air, (iii) et à 1000°C pendant 1 h sous CO <sub>2</sub> .	51
<b>Tableau 11</b> : Aires intégrées des bandes d'absorption $\nu_3$ des groupements CO <sub>3</sub> des composés de référence après traitement thermique (i) à 400°C pendant 2 h sous air, (ii) et à 1000°C pendant 1 h sous CO <sub>2</sub> .	53
<b>Tableau 12</b> : Paramètres et volume de maille des poudres calcinées de référence - Evaluation par affinement de Le Bail (précision $\pm 1 \times 10^{-4}$ Å)	59
<b>Tableau 13</b> : Aires intégrées des bandes d'absorption $\nu_5$ et $\nu_L$ du groupement OH du composé C <sub>0,5</sub> -Si <sub>0,5</sub> -HA après traitement thermique (i) à 400°C pendant 2 h sous air, (ii) à 1000°C pendant 15 h sous air, (iii) et à 1000°C pendant 1 h sous CO <sub>2</sub> .	72
<b>Tableau 14</b> : Intensité des bandes d'absorption caractéristiques des groupements SiO <sub>4</sub> dans HA rencontrées pour les phases Si <sub>0,5</sub> -HA et C <sub>0,5</sub> -Si <sub>0,5</sub> -HA en fonction du traitement thermique (a = absente, f = faible, m = moyenne, Int = intense, $x^{1,2,3}$ = valeur intensité intégrée).	76
<b>Tableau 15</b> : Paramètres et volume de maille de la poudre C <sub>0,5</sub> -Si <sub>0,5</sub> -HA calcinée - Evaluation par affinement de Le Bail (précision $\pm 1 \times 10^{-4}$ Å)	78
<b>Tableau 16</b> : Résultats des dosages élémentaires des poudres C <sub>0,5</sub> -Si <sub>0,5</sub> -HA calcinées sous air à 550°C pendant 10 h et sous CO <sub>2</sub> à 1000°C pendant 1 h - en mmol.g <sup>-1</sup> .	82
<b>Tableau 17</b> : Valeurs des paramètres de calcination (de 500°C à 1300°C) pour la caractérisation physico-chimique des poudres C <sub>0,5</sub> -Si <sub>0,5</sub> -HA.	90
<b>Tableau 18</b> : Masses moléculaires et espèces chimiques associées suivies par SM [Lafon, 2004].	91
<b>Tableau 19</b> : Perte de masse des poudres HA, Si <sub>0,5</sub> -HA, C <sub>0,5</sub> -HA et C <sub>0,5</sub> -Si <sub>0,5</sub> -HA lors de l'analyse thermogravimétrique réalisée sous gaz inerte (He).	97
<b>Tableau 20</b> : Perte de masse de la poudre C <sub>0,5</sub> -Si <sub>0,5</sub> -HA lors de l'analyse thermogravimétrique réalisée sous gaz inerte (He) et sous CO <sub>2</sub> .	106
<b>Tableau 21</b> : Perte de masse et vitesse de perte de masse de la poudre C <sub>0,5</sub> -Si <sub>0,5</sub> -HA lors de l'analyse thermogravimétrique réalisée sous CO <sub>2</sub> en fonction de différents domaine de température (Figure 60 p. 106)	107

<b>Tableau 22</b> : Températures de début de consolidation avec retrait ( $T_d$ ), et températures de vitesse de densification maximale ( $T_m$ ) pour différentes compositions d'hydroxyapatite substituée. ....	118
<b>Tableau 23</b> : Résultats des dosages élémentaires des poudres $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$ calcinées sous air à 550°C pendant 10 h et des comprimés frittés sous $CO_2$ à 1100°C pendant 1 h - en $mmol.g^{-1}$ .....	124
<b>Tableau 24</b> : Densité et pourcentage de densification des comprimés de poudre $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$ frittés sous $CO_2$ à différentes températures. ....	125
<b>Tableau 25</b> : Paramètres de synthèses pour les poudres $C_{0,8}-HA$ et $C_{0,8}-Si_{0,4}-HA$ .....	138
<b>Tableau 26</b> : Coefficients stœchiométriques et pourcentages massiques théoriques pour les poudres $C_{0,8}-HA$ et $C_{0,8}-Si_{0,4}-HA$ .....	138
<b>Tableau 27</b> : Valeurs des paramètres de calcination avant la mise en forme par pressage des poudres $HA$ , $C_{0,8}-HA$ et $C_{0,8}-Si_{0,4}-HA$ . ....	148
<b>Tableau 28</b> : Densité et pourcentage de densification des comprimés de poudre $HA$ frittés sous air pendant 2 h. ....	150
<b>Tableau 29</b> : Densité et pourcentage de densification des comprimés de poudre $C_{0,8}-HA$ frittés sous $CO_2$ à différentes températures pendant 1 h.....	152
<b>Tableau 30</b> : Densité et pourcentage de densification des comprimés de poudre $C_{0,8}-Si_{0,4}-HA$ frittés sous $CO_2$ à différentes températures pendant 1 h.....	155
<b>Tableau 31</b> : Résultats des dosages élémentaires des comprimés frittés $C_{0,8}-Si_{0,4}-HA$ sous $CO_2$ à 1100°C pendant 1 h - en $mmol.g^{-1}$ . ....	158
<b>Tableau 32</b> : Paramètres de frittage des comprimés de poudres $HA$ , $C_{0,8}-HA$ et $C_{0,8}-Si_{0,4}-HA$ utilisés pour l'étude biologique 2D.....	158
<b>Tableau 33</b> : Résultats des caractérisations des poudres $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$ calcinées à 500°C, 550°C et 600°C pendant 10h sous air .....	192
<b>Tableau 34</b> : Perte de masse de la poudre $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$ brute et calcinée à 1000°C pendant 1 heure sous $CO_2$ , lors de l'analyse thermogravimétrique réalisée sous gaz inerte ( $He$ ). ....	194
<b>Tableau 35</b> : Evaluation de la carbonatation de la poudre $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$ après calcination à 1000°C pendant 1 heure sous $CO_2$ par ATG, et comparaison avec les valeurs de la formule hypothétique. ....	195



# Glossaire

Allogreffe : désigne la transplantation d'un greffon où le donneur et le receveur sont de la même espèce biologique.

Angiogenèse : processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins

Apoptose : mort cellulaire programmée ou suicide cellulaire. Processus par lequel des cellules déclenchent leur auto destruction en réponse à un signal. C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires.

Autogreffe : désigne la transplantation où donneur et receveur sont la même personne.

Cellules ostéoformatrices : cellules bordantes, ostéoblastes et ostéocytes.

Cellules primaires : cellules « fraîchement » prélevées à partir de tissus.

Cellules souches mésenchymateuses : cellules multipotentes présentes dans la moelle osseuse, qui ont la capacité de se différencier en différentes lignées des tissus mésenchymateux, incluant les os, le cartilage, le tissu adipeux, les muscles et le stroma de la moelle.

Collagène : famille de protéines, le plus souvent présente sous forme fibrillaire. Ces protéines ont pour fonction de conférer aux tissus osseux une résistance mécanique à l'étirement.

Enzyme : substance capable de favoriser une réaction chimique dans notre organisme (catalyseur biologique).

Exérèse : ablation chirurgicale d'une partie inutile ou nuisible à l'organisme ou d'un corps étranger.

Hématopoïèse : processus physiologique permettant la création et le renouvellement des cellules sanguines.

Lignée cellulaire : population homogène de cellules, stables après des mitoses successives, et ayant en théorie une capacité illimitée de division.

Mitose : division cellulaire qui permet une répartition égale de l'information génétique d'une cellule-mère initiale à deux cellules-filles.

Nécrose : mort cellulaire causée par des dommages physiques ou chimiques.

Ostéoblaste : cellule qui synthétise la partie non-minérale des os (ostéoïde) et participe ensuite à la minéralisation de cette même matrice.

Ostéoclaste : cellule qui est responsable de la résorption du tissu osseux, et qui participe à son renouvellement continu.

Ostéosclérose : affection osseuse qui se caractérise par un accroissement de la densité osseuse.

Ostéoconduction : propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux receveur au contact du matériau.

Ostéogénèse : processus par lequel s'élabore le tissu osseux.

Ostéoinduction : capacité d'induire la formation de la matière osseuse en site extra-osseux par des cellules ostéoformatrices.

Phosphatase alcaline : enzyme présente dans le sang, indispensable à la minéralisation de l'os.

Tissu conjonctif : tissu dont les cellules sont séparées par de la matrice extracellulaire.

Trypsination cellulaire : action en culture cellulaire d'utiliser la trypsine (enzyme digestive) pour détacher des cellules adhérant à leur support.

Xénogreffe : désigne la transplantation d'un greffon où le donneur est d'une espèce biologique différente de celle du receveur.

# Nomenclature des phases

BCP	Biphasic Calcium Phosphate (Mélange biphasé HA/TCP)
CaP	Phosphates de calcium (nom générique)
HA	Hydroxyapatite phosphocalcique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
C-HA	Hydroxyapatite phosphocalcique carbonatée
$\text{C}_A$ -HA	Hydroxyapatite phosphocalcique carbonatée de type A
$\text{C}_B$ -HA	Hydroxyapatite phosphocalcique carbonatée de type B
$\text{C}_{0,5}$ -HA	Hydroxyapatite phosphocalcique carbonatée de type B avec $x = 0,5$
$\text{C}_{0,8}$ -HA	Hydroxyapatite phosphocalcique carbonatée de type B avec $x = 0,8$
$\text{C}_{A/B}$ -HA	Hydroxyapatite phosphocalcique carbonatée de type mixte A/B
C-Si-HA	Hydroxyapatite phosphocalcique polysubstituée en carbonate et en silicate
$\text{C}_A$ -Si-HA	Hydroxyapatite phosphocalcique polysubstituée en carbonate en site A et en silicate
$\text{C}_B$ -Si-HA	Hydroxyapatite phosphocalcique polysubstituée en carbonate en site B et en silicate
$\text{C}_{0,5}$ - $\text{Si}_{0,5}$ -HA	Hydroxyapatite phosphocalcique polysubstituée en carbonate en site B $x=0,5$ et en silicate $y=0,5$
$\text{C}_{0,8}$ - $\text{Si}_{0,4}$ -HA	Hydroxyapatite phosphocalcique polysubstituée en carbonate en site B $x=0,8$ et en silicate $y=0,4$
$\text{C}_{A/B}$ -Si-HA	Hydroxyapatite phosphocalcique polysubstituée en carbonate en site A et B et en silicate
Mg-C-Si-HA	Hydroxyapatite phosphocalcique polysubstituée en magnésium, carbonate et silicate
Na-C-Si-HA	Hydroxyapatite phosphocalcique polysubstituée en sodium, carbonate et silicate
O-HA	Oxy-hydroxyapatite phosphocalcique
Si-O-HA	Oxy-hydroxyapatite phosphocalcique silicatée
Si-HA	Hydroxyapatite phosphocalcique silicatée
$\text{Si}_{0,5}$ -HA	Hydroxyapatite phosphocalcique silicatée avec $y = 0,5$
TCP	Phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Si-TCP	Phosphate tricalcique silicaté
TTCP	Phosphate tetracalcique $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$
Si-TTCP	Phosphate tetracalcique silicaté



# Nomenclature des réactifs utilisés lors de l'évaluation biologique

BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	Bovin Serum Albumin (Albumine de Sérum Bovin)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Milieu de Eagle Modifié de Dulbecco)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EtOH	Ethanol
HMDS	Hexamethyldisilazane
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampon Phosphate Salin)
SVF	Sérum de Veau Foetal

# Introduction

Difficile est d'imiter la nature, reproduire un organe biologique tel que le tissu osseux n'est pas chose aisée que ce soit du point de vue de sa composition chimique ou encore de son métabolisme. Dans certaines pathologies (congénitales, traumatiques, infectieuses...), le processus naturel de restauration de l'os peut-être mis en échec. Pour permettre à l'organisme un meilleur remodelage du tissu osseux altéré, la médecine actuelle emploie de plus en plus des substituts synthétiques.

Actuellement, les céramiques à base de phosphate de calcium sont communément employées en tant que substituts osseux de comblement. Les principaux avantages des composés phosphocalciques sont leur similarité en termes de composition chimique avec la partie minérale de l'os, leur bioactivité ainsi que leur ostéoconduction. Parmi eux, l'hydroxyapatite de formule chimique  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , notée HA, et le phosphate tricalcique  $\beta$ ,  $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2$ , noté  $\beta$ -TCP, sont les biomatériaux les plus utilisés. Ces céramiques acceptent la repousse osseuse mais présentent une capacité limitée à stimuler le développement de nouveaux tissus. De plus, aucun des deux ne possède un taux de biorésorption adapté et proche de celui de l'os naturel.

Une des méthodes envisageables pour améliorer la bioactivité de l'HA est l'incorporation d'ions au sein de sa structure tels que des ions carbonate ou silicium. Ces substitutions peuvent influencer les propriétés physico-chimiques de l'hydroxyapatite, mais également la réponse de la céramique en milieu biologique. L'intérêt des apatites carbonatées tient avant tout de leurs similitudes chimiques et cristallographiques avec le tissu osseux. La présence de carbonate dans la structure apatitique accroît le taux de résorption de la céramique en milieu physiologique à des taux de biodégradabilité proche de l'os naturel. D'autre part, la littérature fait état d'une influence bénéfique du « silicium soluble » sur la formation et la calcification des tissus osseux (modification du métabolisme des cellules osseuses). Ainsi,

hypothétiquement, l'incorporation simultanée d'ions carbonates et silicates dans la structure apatitique (C-Si-HA) permettrait de coupler les propriétés de résorption et de dissolution des apatites carbonatées avec le rôle métabolique important du silicium dans le tissu conjonctif.

L'objectif de ce travail de thèse est donc l'élaboration de céramiques denses et monophasiques en C-Si-HA de composition définie et contrôlée ainsi que la réalisation de premières évaluations biologiques de cette nouvelle phase.

La synthèse bibliographique, décrite au premier chapitre, s'attache à présenter l'influence des substitutions ioniques dans l'hydroxyapatite sur la réponse biologique, ainsi qu'un récapitulatif des résultats des travaux précédemment menés sur les apatites carbo-silicatées.

Le deuxième chapitre traite de la synthèse par voie liquide des hydroxyapatites phosphocalciques carbo-silicatées et de leur caractérisation. La synthèse des poudres doit aboutir à la mise en place d'un procédé reproductible ainsi qu'à l'obtention de poudres monophasiques aux taux de substitution en carbonate et en silicate maîtrisés.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude de la stabilité thermique sous différentes atmosphères et au frittage de comprimés de poudre de cette nouvelle phase pour l'obtention de céramiques denses et monophasiques.

Enfin, le dernier chapitre de ce mémoire est une étude préliminaire portant sur l'évaluation biologique des hydroxyapatites carbo-silicatées par culture *in vitro* de cellules souches mésenchymateuses murines.

**Chapitre I.  
Synthèse bibliographique**



## I.1. Le tissu osseux

### I.1.1. Les fonctions du tissu osseux

Le squelette est une structure rigide constituée de l'ensemble des os et des cartilages du corps. Il supporte la structure corporelle, il protège les organes internes, et, conjointement aux muscles, il facilite les mouvements du corps.

En plus de sa fonction support, le tissu osseux est impliqué dans le métabolisme phosphocalcique et le stockage des minéraux dans l'organisme. Les os contiennent 99% du calcium et 85% du phosphore du corps humain [De Vernejoul, 2008].

Le tissu osseux est également le lieu de l'activité hématopoïétique. L'hématopoïèse est le processus physiologique permettant la création et le renouvellement des cellules sanguines. Chez l'adulte, elle a lieu dans la moelle des os.

Le tissu osseux est constitué de cellules dispersées dans une matrice extracellulaire (tissu conjonctif). Celle-ci est constituée d'une matrice organique et d'une matrice minérale.

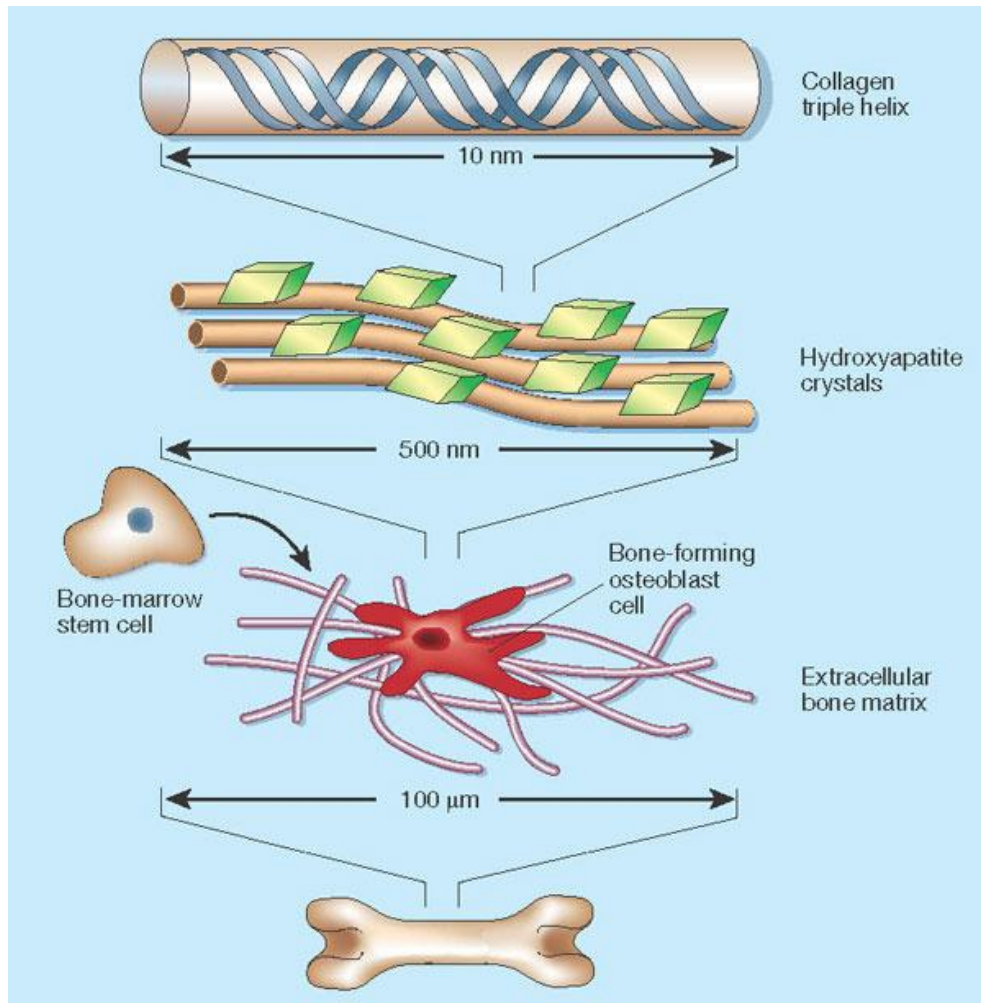
### I.1.2. La matrice organique

La matrice organique est composée à 90% de collagène principalement de type I (Figure 1 p. 6) [Ruhé, 2006; De Vernejoul, 2008]. Il s'agit de la protéine la plus abondante du corps humain. Le collagène est une protéine fibreuse, rigide, qui une fois superposée, agglomérée et agencée parallèlement les unes aux autres, assure l'élasticité et la résistance à la traction du tissu osseux.

### I.1.3. La matrice minérale

La partie minérale de l'os représente environ 65 % de son poids total. La phase cristalline de cette partie minérale s'apparente à de l'hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , notée HA. Ces cristaux, sous la forme de fines aiguilles hexagonales, s'entremêlent aux fibres de collagène de la matrice organique (Figure 1 p. 6) et assurent ainsi la rigidité de l'os. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  du tissu osseux sont des acteurs majeurs dans la régulation du métabolisme phosphocalcique de l'organisme.

De multiples substitutions chimiques apparaissent dans l'apatite osseuse [Ruhé, 2006] : par exemple, des ions carbonates à la place des ions phosphates ou hydroxydes ; ou encore la présence des ions magnésium ou sodium en substitution des ions calcium.



**Figure 1** : Les différentes échelles d'organisation de l'os naturel [Taton, 2001].

#### I.1.4. Les cellules osseuses

On distingue deux catégories de cellules osseuses : les cellules ostéoformatrices (cellules bordantes, ostéoblastes et ostéocytes), et les cellules ostéorésorbantes (ostéoclastes). Les ostéoblastes, les ostéoclastes et les cellules bordantes de l'os se retrouvent à la surface des tissus osseux, alors que les ostéocytes sont intégrés à l'intérieur de la matrice osseuse (Figure 2 p. 7).

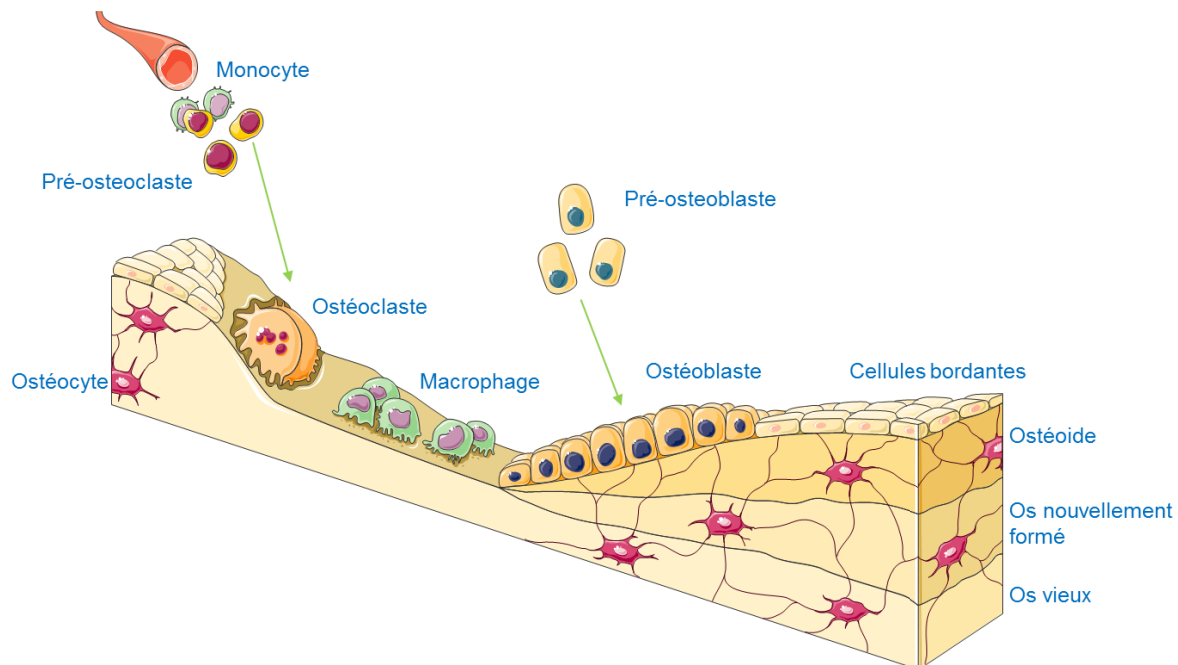
Les ostéoblastes, d'origine mésenchymateuse, sont responsables de la synthèse de la matrice osseuse dite non-minéralisée (ou ostéoïde) en sécrétant le collagène de type 1 pendant leur différenciation (Figure 1 p. 6). Ils jouent également un rôle essentiel dans la régulation de la minéralisation par le biais de la sécrétion de phosphatase alcaline (enzyme clé qui augmente les concentrations de phosphate au niveau du site de dépôt minéral) ou d'autres protéines (*e.g.* BSP, l'ostéocalcine, l'ostéopontine) [Owen, 1990]. Les ostéoblastes possèdent quatre voies différentes de différenciation :

- soit, ils finissent emmurés dans la matrice osseuse et deviennent des ostéocytes incorporés à la matrice minéralisée ;
- soit, ils deviennent métaboliquement moins actifs et forment les cellules bordantes ;
- soit, ils entrent en apoptose ;
- soit, ils se différencient en cellules déposant le cartilage (ou chondrocytes).

Les ostéocytes sont les cellules les plus abondantes dans l'os, ils représentent 95% de toutes les cellules osseuses. Ils communiquent entre eux et avec les autres cellules (cellules bordantes, ostéoblastes et ostéoclastes) par interdigitations formant un réseau dense de canaliculi dans la matrice osseuse. Ce réseau fonctionnel permet de « sentir » les tensions mécaniques appliquées sur les os et de sécréter les différents facteurs qui vont activer ou inhiber les ostéoblastes et les cellules bordantes. Ces senseurs du stress mécanique sont donc importants pour le maintien de la structure osseuse en détectant aussi les microlésions et en coordonnant un remodelage osseux ciblé [Clarke, 2008].

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes devenus plats et métaboliquement moins actifs. Leur rôle est de protéger le tissu osseux, mais également de le remodeler car elles peuvent redevenir des ostéoblastes en fonction des besoins tissulaires.

Les ostéoclastes de l'os sont, avec les odontoclastes de la dentine, les seules cellules capables de résorber la matrice extracellulaire. Ce sont des cellules volumineuses (50 à 100 µm), et polynucléaires (4 à 20 noyaux), d'origine hématopoïétique [Raisz, 2005].



**Figure 2 :** Représentation schématique d'une unité de remodelage osseux [Servier Medical Art, 2005].



Le tissu osseux est en constant remodelage, et près de 5 à 10 % de la masse osseuse est renouvelée annuellement chez l'adulte [De Vernejoul, 2008]. Le remodelage osseux est nécessaire à la régulation de la calcémie (taux plasmatique de calcium), à la conservation des propriétés mécaniques de l'os et à la réparation d'éventuelles fractures. Cette réorganisation s'effectue grâce à des unités fonctionnelles de remodelage qui associent ostéoclastes et ostéoblastes. L'os est formé de million de ces unités indépendantes d'environ 100 µm de diamètre qui se déplacent au fil du temps. La durée d'un cycle de remodelage est d'environ 4 mois chez l'adulte, la phase de formation de la matrice osseuse étant plus longue que celle de résorption [De Vernejoul, 2008].

Chez l'homme, le capital osseux atteint son maximum à l'âge de 20-25 ans [De Vernejoul, 2008]. Il reste stable durant quelques années puis, en fonction de la personne (sexe, activité sportive, hygiène de vie, nutrition ...), il diminue progressivement en vieillissant [De Vernejoul, 2008]. Les mécanismes de résorption osseuse deviennent alors plus importants que ceux de formation de tissu. Ceci se caractérise par une diminution d'épaisseur des os et par une augmentation de leur porosité (ostéoporose) engendrant la fragilisation du squelette et un accroissement de la probabilité de fracture.

Quand la régénération naturelle de l'os devient insuffisante et/ou dans le cas d'un défaut tissulaire important, l'utilisation de matériaux prothétiques peut s'avérer nécessaire. Une perte osseuse locale peut être la résultante d'une fracture, d'un traumatisme, ou encore suite à une exérèse tumorale. Les lacunes peuvent être comblées par des tissus osseux naturels ou par des substituts osseux synthétiques. Les greffons de tissus osseux naturels peuvent avoir différentes provenances : donneur et receveur sont la même personne (autogreffe), donneur et receveur sont de la même espèce biologique (allogreffe), donneur et receveur sont de deux espèces biologiques différentes (xéno greffe). Dans les cas d'implantation de tissus naturels, des risques d'indisponibilité ou de non compatibilité peuvent apparaître ; c'est pourquoi l'élaboration de biomatériaux synthétiques est nécessaire.

## 1.2. Les substituts osseux

Un substitut osseux peut être défini comme « un biomatériau ou produit de l'ingénierie tissulaire qui permet de combler et remplacer une perte osseuse afin d'obtenir la consolidation de l'os et la restauration de la fonction » [Mainard, 2007]. L'ingénierie tissulaire est un domaine interdisciplinaire qui applique les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie pour l'élaboration de substituts biologiques fonctionnels [Langer, 1993]. Ce concept fait appel à un matériauensemencé de cellules hôtes en présence ou non de facteurs de croissance biologiquement actifs [Bose, 2012]. Ces facteurs biologiques peuvent être une combinaison de cellules et de protéines qui stimulent les cellules hôtes.

Dans le cadre de notre étude, nous nous intéressons exclusivement aux propriétés du matériau « support » (scaffold) pour des applications à l'ingénierie tissulaire osseuse.

Les substituts osseux peuvent être obtenus de deux manières différentes. Ce sont soit des matériaux d'origine naturelle (coraux, bovins, porcins), soit des matériaux synthétiques (polymères ou céramiques). Denses ou poreux, leurs mises en forme varient selon leur utilisation.

### 1.2.1. Cahier des charges

Idéalement, le biomatériau destiné à la substitution osseuse doit être au moins aussi performant qu'un implant d'autogreffe. En outre, dans les cas où il ne peut pas se substituer complètement à l'utilisation d'os autologue (propre à l'individu), l'implant synthétique peut néanmoins permettre de diminuer la quantité d'os autologue nécessaire en s'ajoutant à lui afin d'étendre le volume du greffon [Blitterswijk, 2008].

Les principales exigences attendues d'un biomatériau sont ses capacités à combler le vide du défaut osseux et à faciliter la guérison. Idéalement, le substitut osseux est un matériau ostéo-conducteur, reprenant partiellement la composition et la fonction de l'os physiologique, avec une capacité de résorption et une fonction mécanique et / ou volumétrique [CNEDiMTS, 2013]. Pour cela, plusieurs qualités du matériau support ont été identifiées [Habibovic, 2006; Shepherd, 2011; Oh, 2006], et sont détaillés ci-après.

La biocompatibilité est vraisemblablement la caractéristique la plus importante pour un substitut osseux. Une fois implanté, le matériau ne doit pas occasionner d'inflammation ou de réponse toxique qui provoqueront la mort des cellules et une aggravation de la blessure. Tous les composants doivent être biocompatibles, y compris les produits de dégradation du matériau [Temenoff, 2000].

L'ostéoconduction est la propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux receveur au contact du matériau. C'est une qualité essentielle du biomatériau pour le succès d'une greffe osseuse. Elle permet aux cellules osseuses d'adhérer, de proliférer, de migrer et de déposer une nouvelle matrice extracellulaire.

L'architecture du matériau doit être adaptée au besoin. La présence de pores interconnectés permet le développement de la vascularisation, et facilite la colonisation des cellules dans le matériau. La repousse osseuse est alors favorisée, ce qui engendre une meilleure fixation biologique de l'implant [Blitterswijk, 2008].

Dans certaines applications, les matériaux doivent être biodégradables (*e.g.* ciment de comblement prothétique). Leur fonction est alors d'occuper temporairement le défaut osseux avant de laisser progressivement place à l'os nouveau. Les vitesses de résorption et de dégradation du substitut doivent ainsi être adaptées à la vitesse de formation de l'os nouveau (ostéogénèse) [Blitterswijk, 2008; Heljak, 2012].

La structure nanométrique de l'os est comparable à celle d'un matériau composite. L'interaction des cristaux « fragiles » (*i.e.* plasticité nulle) avec les fibres de collagène « élastiques » contribue à ses propriétés mécaniques uniques, difficiles à reproduire lors de la réalisation d'un matériau synthétique [Taton, 2001; Holzwarth, 2011]. Idéalement, un substitut osseux doit être conçu pour répondre aux sollicitations mécaniques macroscopiques de l'os qu'il remplace.

La capacité d'induire la formation de la matière osseuse en site extra-osseux (ostéoinduction) peut être une qualité intrinsèque du matériau (composition chimique, structure). Plus généralement, le substitut osseux peut être utilisé comme support vecteur de molécules ostéoinductives (facteurs de croissance biologique) [Bose, 2012; Bose, 2013].

Enfin, l'implant doit être médicalement utilisable. Le substitut osseux doit posséder des qualités mécaniques lui permettant de résister aux manipulations du chirurgien tout en ayant des caractéristiques s'approchant de celles des tissus du site d'implantation. Le matériau doit également respecter les conditions aseptiques lors de sa production, et ne doit pas avoir un coût prohibitif.

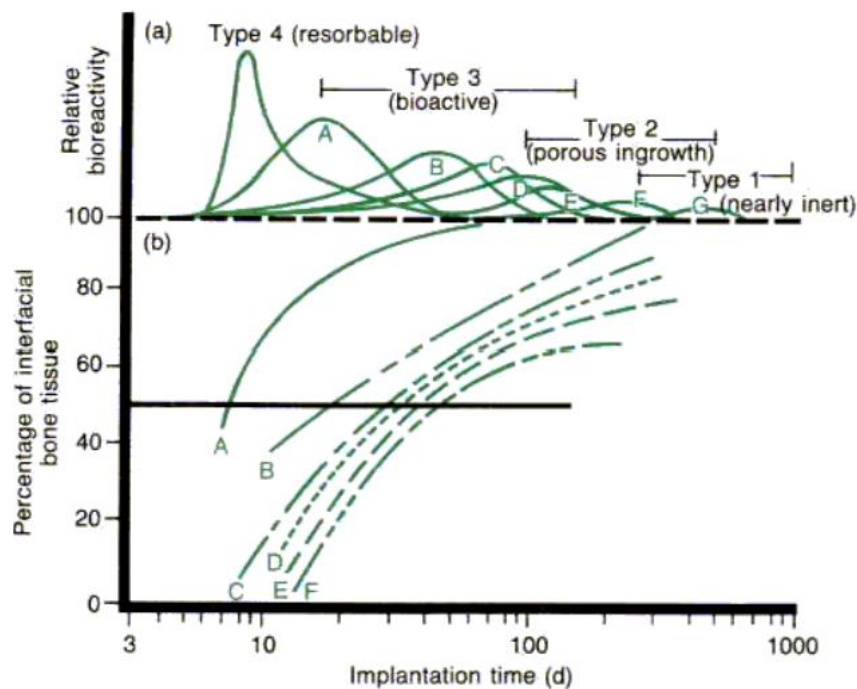
## 1.2.2. Les biocéramiques

Grâce à leurs caractéristiques spécifiques, les céramiques se sont rapidement imposées comme matériaux de comblement osseux.

Historiquement, les céramiques de première génération utilisées furent les plus inertes possibles (*e.g.* alumine) [Hench, 1993]. Mais au-delà de leur biocompatibilité avérée, une enveloppe fibreuse apparaissait à l'interface de l'implant et de l'os (encapsulation) empêchant une fixation adéquate (*e.g.* interruption des propriétés biologiques et mécaniques). Les recherches se sont alors orientées vers des matériaux

capables de former cette liaison biologique entre le tissu osseux et l'implant et de favoriser le métabolisme tissulaire : ce fut l'avènement des matériaux dits bioactifs.

Le mécanisme de fixation du tissu est directement lié au type de réponse tissulaire à l'interface de l'implant. Aucun matériau implanté dans les tissus vivants n'est inerte ; tous les matériaux provoquent une réponse des tissus vivants. Quatre types de réponses à l'attachement des prothèses au système musculo-squelettique sont identifiées [Cao, 1996] : (i) si le matériau est toxique, le tissu environnant meurt ; (ii) si le matériau est non toxique et est biologiquement inactif (presque inerte), il se forme un tissu fibreux de forme et d'épaisseur variable ; (iii) si le matériau est non toxique et est biologiquement actif (bioactif), il se forme une liaison à l'interface ; (iv) si le matériau est non toxique et se dissout, le tissu entourant le remplace (biorésorbable). La Figure 3 (p. 11) présente le spectre de bioactivité pour diverses biocéramiques. Le comportement des matériaux bioactifs est intermédiaire entre celui des matériaux pseudo-inertes et celui des matériaux biorésorbables [Cao, 1996].



**Figure 3 :** Spectre de bioactivité pour divers implants biocéramiques avec (a) le taux relatif de bioactivité, et (b) le temps de formation d'une liaison osseuse à l'interface de l'implant [(A) 45S5 bioglass, (B) Mina 13 Ceravital, (C) 55S4.3 Bioglass, (D) A/W glass ceramic, (E) HA, (F) Kgy 213 Ceravital][Cao, 1996]

La vitesse de formation de la liaison biologique à l'interface peut être corrélée avec le niveau de bioactivité. Le niveau de bioactivité d'un matériau spécifique peut être mis en relation avec le temps nécessaire pour que 50% de l'interface soit liée aux tissus. Dans ce but a été créé l'indice de bioactivité  $IB = 100/t_{0,5bb}$  où  $t_{0,5bb}$  est le temps nécessaire pour que 50% de la surface de l'implant soit liée aux tissus [Hench, 1988; Best, 2008a].

Voici quelques exemples de matériaux bioactifs : les verres bioactifs tels que Bioglass®, les vitro céramiques bioactives telles que l'apatite/wolastonite (A/W), les céramiques denses en phosphate de calcium tels que l'hydroxyapatite synthétique (HA), des composites bioactifs comme un mélange polyéthylène hydroxyapatite (PE-HA), et une série de matériaux bioactifs de revêtement. A noter que le phosphate tricalcique (TCP) est quant à lui considéré comme un matériau « biorésorbable ».

### 1.2.3. Les phosphates de calcium

Les céramiques à base de phosphate de calcium (CaP) sont, de par leurs compositions chimiques très proches de celle de la matrice minérale de l'os, une catégorie de matériaux bioactifs qui est grandement utilisée pour la réparation ou le remplacement des tissus osseux [Dorozhkin, 2010]. Elles présentent une parfaite biocompatibilité avec la formation rapide d'un lien biologique entre la céramique et le tissu osseux [Samavedi, 2013]. Parfaitement ostéoconductrices, certains auteurs prêtent également des propriétés ostéoinductives pour certains CaP [Zhang, 2005; Yuan, 2001; Ripamonti, 1991; Song, 2013; LeGeros, 2008].

Cependant, tous les types de CaP n'ont pas les mêmes réponses biologiques *in vivo* [Samavedi, 2013; Blitterswijk, 2008], leur biodégradation en est un exemple. Parmi les phosphates de calcium, l'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), notée HA, et le phosphate tricalcique béta ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \beta$ ), appelé  $\beta$ -TCP, sont les plus communément employés. Malheureusement, aucun des deux ne présente des caractéristiques idéales en termes de solubilité (*i.e.* dissolution chimique) et de résorption biologique (*i.e.* activité ostéoclastique). En effet, *in vivo*, la solubilité du TCP est si forte comparée à l'HA [Barralet, 2000a] qu'elle limite la résorption ostéoclastique [Detsch, 2008]. De plus, ce haut taux de solubilité engendre des inflammations qui nuisent à la formation d'un nouvel os sur le TCP [Hing, 2007]. D'autre part, l'HA qui peut alors être considérée comme pratiquement non résorbable, présente des taux de résorption (*in vivo* :  $60 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{jour}^{-1}$  [Barralet, 2000a]) et de solubilité (*in vitro* :  $K_{\text{sp}} \approx 1.10^{-117}$  [Doi, 1998; Moreno, 1968]) si faibles qu'ils ralentissent la vitesse d'apposition d'os sur sa surface [Spence, 2010; Porter, 2005].

D'une manière générale, pour les CaP, plus le rapport molaire Ca/P est faible (1,67 et 1,5 respectivement pour l'HA et le  $\beta$ -TCP), plus grande est la solubilité du composé (à l'exception du phosphate tetracalcique  $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$ ) [Ducheyne, 1993]. A l'heure actuelle, des mélanges biphasés HA /  $\beta$ -TCP en proportion variable, appelés BCP pour Biphasic Calcium Phosphate, sont grandement employés afin d'obtenir, en quelque sorte, une biodégradabilité contrôlée de l'implant [Mainard, 2007]. En réalité, les BCP ne présentent pas la « solubilité moyenne » dépendante du ratio du mélange HA /  $\beta$ -TCP, mais les « solubilités mixtes » correspondant aux solubilités des deux phases : en partie soluble ( $\beta$ -TCP), et en partie non soluble (HA).

## I.2.4. Amélioration de la bioactivité des CaP

Plusieurs solutions ont été proposées pour améliorer les propriétés biologiques des céramiques phosphocalciques. L'ajout de facteurs de croissance, la modulation de la composition et de la morphologie de l'implant en font partie.

Les facteurs de croissance sont des molécules qui peuvent influencer certaines fonctions cellulaires par l'intermédiaire de leur liaison à des récepteurs spécifiques de la membrane cellulaire. Ces molécules peuvent être classées en trois groupes : (i) les molécules d'adhésion cellulaire (*e.g.* la protéine fibronectine et le tripeptide RGD) ; (ii) les molécules angiogéniques (*e.g.* les protéines VEGF-A, VEGF-C, bFGF) ; (iii) les molécules bioactives (*e.g.* les protéines TGF $\beta$  et BMP). Ces facteurs jouent respectivement un rôle dans : (i) l'interaction entre les cellules et le substrat ; (ii) dans la stimulation de la formation de vaisseaux sanguins (angiogenèse) ; (iii) et dans la prolifération, la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes et la formation des tissus [Blitterswijk, 2008]. L'ajout de ces facteurs apporte aux CaP des propriétés ostéoinductives. Toutefois, leur contrôle mérite une attention particulière pour d'éventuels déséquilibres qui peuvent survenir chez des patients où la surstimulation du remodelage osseux a lieu.

La structure de la céramique est également un acteur essentiel dans la régénération osseuse. C'est elle qui détermine la vitesse et le degré de reconstruction [Teixeira, 2010]. Les propriétés biologiques des CaP peuvent être améliorées en modulant les paramètres tels que (i) la macroporosité qui facilite la migration des cellules et le transport des ions et des nutriments [Teixeira, 2010; Woodard, 2007; Mastrogiacomo, 2006], (ii) la microporosité qui augmente localement la surface spécifique du matériaux ce qui améliore la croissance osseuse en fournissant des points d'ancrage aux ostéoblastes [Teixeira, 2010; Yuan, 1999; Woodard, 2007], (iii) l'interconnexion des macropores qui facilite la croissance osseuse en fournissant de l'espace suffisant à la vascularisation et à l'évacuation des déchets cellulaire [Teixeira, 2010; Woodard, 2007; Mastrogiacomo, 2006], ou (iv) les rayons de courbures [Rumpler, 2008].

La bioactivité des céramiques en phosphate de calcium peut être également modulée par la substitution des ions ou groupements  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  par d'autres ions (*e.g.*  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ...) [Bose, 2013]. Dans le cadre de notre étude, nous allons principalement nous intéresser à l'hydroxyapatite phosphocalcique et ses dérivés (*i.e.* HA substituées). Ainsi seules les influences biologiques des éléments ioniques incorporés dans la structure apatitique sont détaillées ci-après.

## I.3. Les substitutions dans l'hydroxyapatite phosphocalcique (HA)

### I.3.1. Structure de l'HA stœchiométrique

L'hydroxyapatite phosphocalcique (notée HA) appartient à la famille cristallographique des apatites, décrite par la formulation générique  $\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Y}_2$ , où Me représente un cation divalent,  $\text{XO}_4$  un groupement anionique trivalent et Y un anion monovalent.

Avec sa formule chimique  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , l'hydroxyapatite phosphocalcique stœchiométrique a une composition théorique massique de 39,68 % de Ca, 18,45 % de P, et un ratio molaire Ca/P égale à 1,667.

L'HA cristallise selon un système hexagonal avec un groupement spatial de symétrie  $P6_3/m$ . Dans le cas de l'HA stœchiométrique (sans substitution ou lacune), les paramètres cristallographiques de maille  $a$ ,  $c$  et  $\beta$  sont respectivement égaux à 9,418 Å, 6,884 Å et 120°. Le volume de la maille est égal à 528,80 Å<sup>3</sup> (données extraites de la fiche ICDD-PDF 9-432).

La structure apatitique accepte un grand nombre de substituants. Ainsi, les cations bivalents ( $\text{Me}^{2+}$ ) peuvent non seulement être remplacés par des cations bivalents (*e.g.*  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ), mais également par des cations monovalents (*e.g.*  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) ou trivalents (*e.g.*  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ). De même, les anions  $\text{XO}_4^{3-}$  trivalents peuvent être remplacés par des groupements bivalents (*e.g.*  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) [Lafon, 2004], trivalents (*e.g.*  $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{VO}_4^{3-}$ ) ou tétravalents (*e.g.*  $\text{SiO}_4^{4-}$ ) [Palard, 2007]. Enfin, les groupements Y peuvent également être substitués par des ions monovalent (*e.g.*  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ) ou bivalents (*e.g.*  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{O}^{2-}$ ,  $\text{S}^{2-}$ ). Toutefois des mécanismes de compensations de charges apparaissent lors de substitutions ioniques afin de conserver l'électroneutralité impliquant des modifications structurales et la création de lacunes dans la maille. A noter que contrairement aux sites Me et Y, aucune apatite renfermant des lacunes sur les sites  $\text{XO}_4$  n'a été décrite. Les tétraèdres  $\text{XO}_4$  définissent le squelette de la structure apatitique [Elliott, 1994]. La structure cristallographique de la maille d'hydroxyapatite est exposée dans la Figure 4 (p. 15).

La maille cristalline présente deux types de tunnels notés « I » et « II », perpendiculaires au plan (001) (Figure 4 p. 15).

Le tunnel de type I de diamètre égal à environ 2,5 Å est occupé par des cations Me ( $\text{Me}_I$ ). Dans le cas de l'HA, il s'agit de Ca<sub>I</sub>. Les sites de ces cations sont au nombre de quatre par maille. Ils sont placés sur les axes ternaires et sont entourés de neuf atomes d'oxygène.

Les tunnels de type II ont pour leur part un diamètre plus grand, compris entre 3 et 3,5 Å. Ils contiennent le reste des cations Me, soit six cations  $\text{Me}_{\text{II}}$  par maille ( $\text{Ca}_{\text{II}}$  dans le cas de l'HA). Ces tunnels présentent une symétrie  $C_s$  et les cations de type II sont localisés en périphérie de celui-ci. Groupés trois par trois aux niveaux  $z = \frac{1}{4}$  et  $z = \frac{3}{4}$  de la maille, ils forment des triangles équilatéraux décalés de  $60^\circ$  autour de l'axe sénaire hélicoïdal (axe  $c$  de la maille hexagonal). Avec une coordinance égale à 7, ils sont entourés de six atomes d'oxygène des groupements tétraédriques  $\text{XO}_4$  et du groupement anionique Y.

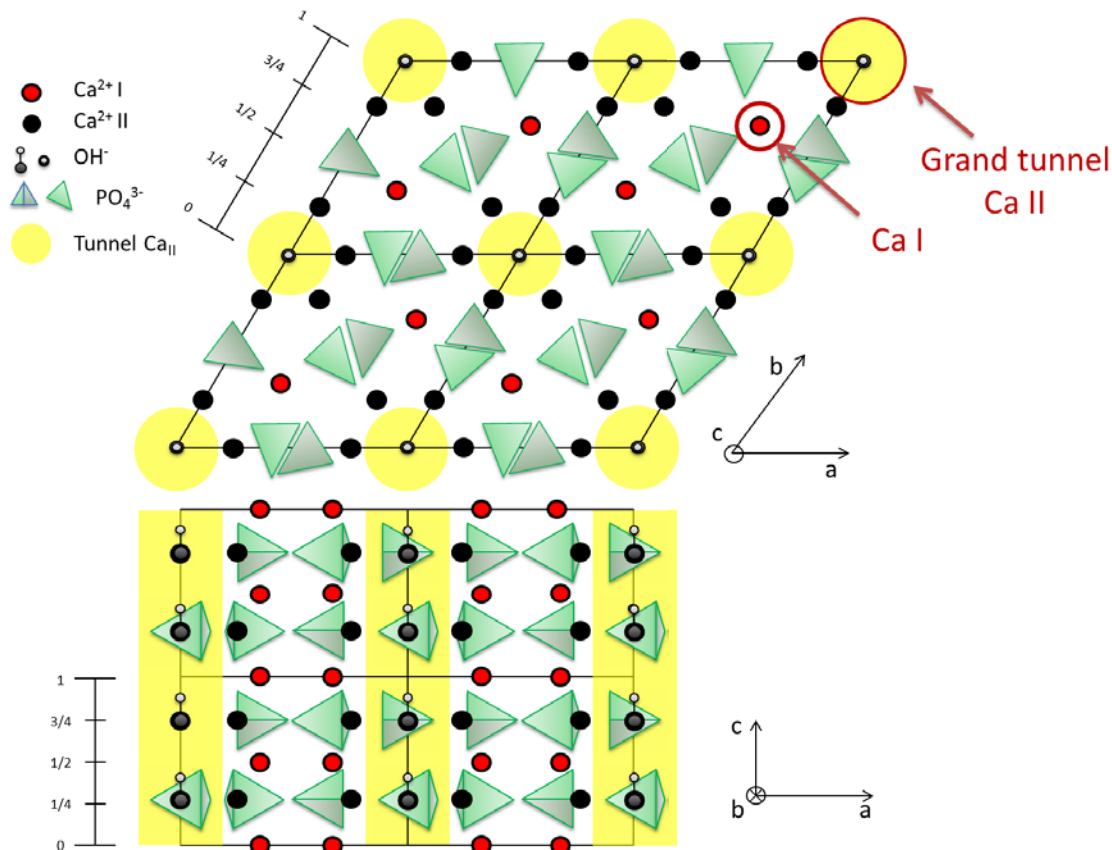


Figure 4 : Projection de la structure de HA sur les plans (001) et (010).

### I.3.2. L'hydroxyapatite phosphocalcique substituée d'intérêt biologique

Comme déjà signifié, la phase minérale des tissus osseux s'apparente à une apatite phosphocalcique poly-substituée. En fonction de leur nature, les ions de substitution se répartissent sur les trois sites qu'offre la structure apatitique. Les sites accueillant les ions hydroxydes ( $\text{OH}^-$ ) et ceux accueillant les ions phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) sont appelés respectivement sites A et sites B. Par la suite, pour définir la structure, on parlera d'ions « hydroxydes » et de sites « hydroxydes » ; et pour caractériser les spectres infrarouges, on parlera de vibrations des groupements « hydroxyles » en accord avec la



communauté scientifique. Quelques exemples de substitutions ioniques dans l'HA sont présentés dans le Tableau 1 (p.16). Les éléments présentés sont en rapport avec les espèces naturellement présentes dans l'os. Les cas des hydroxyapatites carbonatées et des hydroxyapatites silicatées sont détaillés dans des paragraphes spécifiques (I.3.3 p. 17 et I.3.4 p. 20).

D'une manière générale, les substitutions ioniques modifient les paramètres de maille de la structure apatitique. D'après les revues de J.H Shepherd et S.M. Best [Shepherd, 2011; Shepherd, 2012], des études ont montré que la substitution des ions  $\text{Ca}^{2+}$  par  $\text{Sr}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  augmente la solubilité de l'apatite. A contrario, l'addition de  $\text{Cr}^{3+}$  conduit à une augmentation de la taille des grains d'HA et une réduction de la solubilité du matériau [Shepherd, 2011]. De plus, les substitutions cationiques affectent souvent la stabilité thermique du matériau ce qui peut engendrer des complications lors de l'élaboration de céramiques (*e.g.* C-HA ou Mg-HA peuvent décomposer dès  $800^\circ\text{C}$  contre  $1200^\circ\text{C}$  pour HA) [Shepherd, 2011; Lafon, 2004].

**Tableau 1** : Exemples de substitutions dans la structure apatitique [Palard, 2007].

	Substitutions	Formules chimiques théoriques	Notations
Site $\text{Ca}^{2+}$	$\text{Ag}^+$	$\text{Ca}_{10-x}\text{Ag}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-x}$	Ag-HA
	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}_{10-x}\text{Mg}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Mg-HA
	$\text{Sr}^{2+}$	$\text{Ca}_{10-x}\text{Sr}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Sr-HA
	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Ca}_{10-x}\text{Zn}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Zn-HA
Site B ( $\text{PO}_4^{3-}$ )	$\text{CO}_3^{2-}$	$\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{4-6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$	$\text{C}_B$ -HA
	$\text{HPO}_4^{2-}$	$\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{4-6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$	
	$\text{SiO}_4^{4-}$	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{4-6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$	Si-HA
Site A (OH)	Cl	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{Cl}_{2x}$	Cl-HA
	$\text{CO}_3^{2-}$	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}(\text{CO}_3)_x$	$\text{C}_A$ -HA
	F	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{F}_{2x}$	F-HA
Mixte Sites A/B	$\text{CO}_3^{2-}$	$\text{Ca}_{10-x+u}(\text{PO}_4)_{4-6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x+2u-2y}(\text{CO}_3)_y$	$\text{C}_{A/B}$ -HA

D'un point de vue biologique, il a été montré que le magnésium joue un rôle dans le remodelage osseux au moment de la calcification [Shepherd, 2012]. L'argent a lui montré des caractéristiques prometteuses en tant qu'agent antibactérien [Shepherd, 2012]. Le strontium a été retrouvé dans les tissus calcifiés de l'os et semble être un acteur important dans leur minéralisation [Shepherd, 2012]. Tout comme le strontium, le zinc a montré un effet inhibiteur sur l'activité ostéoclastique *in vitro* [Shepherd, 2012]. Pour ce qui est des substitutions anioniques, la présence d'ions fluorures  $\text{F}^-$  est déterminante dans la croissance de l'os. L'absence de  $\text{F}^-$  limite la densification de l'os, et inversement, sa trop forte concentration génère des ostéoscléroses [Shepherd, 2012].

Enfin, l'intérêt des ions  $\text{Cl}^-$  réside en leur capacité à développer un environnement acide à la surface de l'os qui active les ostéoclastes dans le processus de résorption afin de solubiliser les sels alcalins du minéral osseux [Kannan, 2007].

Ainsi, l'incorporation de tel ou tel ion dans la structure apatitique est susceptible de changer et potentiellement d'améliorer la bioactivité de la céramique.

### I.3.3. L'hydroxyapatite phosphocalcique carbonatée (C-HA)

Même si la composition de la partie minérale de l'os dépend de plusieurs paramètres (location, âge, genre, etc.), elle contient toujours une quantité importante de carbonate (entre 3 % et 8 % en masse), préférentiellement située en site B dans la structure apatitique, en substitution des phosphates [Montel, 1981; Rey, 1989; Legeros, 1969; Zapanta-Legeros, 1965; Driessens, 1983]. La substitution des ions carbonates augmente la solubilité de l'HA comme confirmé dans les expériences *in vitro* et *in vivo* [Barralet, 2000a; Nelson, 1981]. Les céramiques denses et poreuses faites en hydroxyapatite substituée par des carbonates (C-HA) présentent une meilleure biocompatibilité comparées aux échantillons d'hydroxyapatite stœchiométrique lors d'études *in vitro* et *in vivo* [Landi, 2003; Spence, 2009; Spence, 2010]. En effet, les propriétés d'ostéoconductivité et de biorésorption sont plus élevées dans C-HA que dans HA. La présence de carbonates dans la structure apatitique semble augmenter la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes actifs [Spence, 2010]. Ainsi, G. Spence propose de contrôler le vitesse de résorption d'une céramique synthétique d'hydroxyapatite en contrôlant sa teneur en carbonate [Spence, 2009]. La résorbabilité en milieu biologique d'une apatite synthétique pourrait être modulée jusqu'à celle de l'os naturel. De plus, il a été prouvé que les ions carbonates incorporés dans l'HA améliorent la bioactivité du matériau comme la croissance osseuse ou la synthèse de fibre de collagène par les cellules ostéoblastiques [Landi, 2003; Doi, 1998; Detsch, 2010; Melville, 2006; Patel, 2002b; Porter, 2005].

Comme présenté dans le Tableau 1 (p. 16), les ions carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) peuvent s'insérer dans la maille d'hydroxyapatite selon deux types de substitutions distinctes. Ils peuvent soit remplacer les ions hydroxydes  $\text{OH}^-$  (substitution de type A :  $\text{C}_A\text{-HA}$ ), soit les ions phosphates  $\text{PO}_4^{3-}$  (substitution de type B :  $\text{C}_B\text{-HA}$ ). Les carbonates peuvent également occuper simultanément les deux sites, on parle alors d'apatites carbonatées mixtes de type A/B, notées  $\text{C}_{A/B}\text{-HA}$ . Selon la méthode de synthèse choisie, il est possible d'obtenir des apatites carbonatées de type A (e.g. par traitement thermique sous  $\text{CO}_2$  d'HA), de type B (e.g. par précipitation en voie aqueuse en présence de sels de carbonates) ou de type mixte [Gibson, 2002b; Lafon, 2008; Lafon, 2004]. Une revue concernant les différentes formulations proposées dans la littérature des apatites carbonatées est proposée ci-après.

• Les apatites carbonatées phosphocalciques de type A ( $C_A$ -HA)

Les apatites carbonatées phosphocalciques de type A sont associées à la formule suivante (Eq. I-1 p. 18) [Elliott, 1994] :



dans laquelle  $z$  ( $0 \leq z \leq 1$ ) représente la quantité d'ions carbonates incorporés en lieu et place des ions hydroxydes.  $\text{V}_{\text{OH}}^+$  correspond aux lacunes d'ions  $\text{OH}^-$  présentes dans la maille afin de respecter l'électronéutralité de la structure. Suite à cette substitution, différents auteurs font part de changement dans la taille de la maille apatitique [Zapanta-Legeros, 1965; Legeros, 1969; Bonel, 1970]. Une contraction selon l'axe  $c$  et une élongation selon l'axe  $a$  (en référence à l'HA stœchiométrique) sont observées avec l'augmentation du taux d'ions carbonates introduits en site A (Figure 5 p. 18). A noter que la  $C_A$ -HA change de structure cristalline lorsque  $z$  est supérieur à 0,9, la structure apatitique ayant alors une symétrie pseudo-hexagonale avec un groupe d'espace monoclinique [Elliott, 1980].

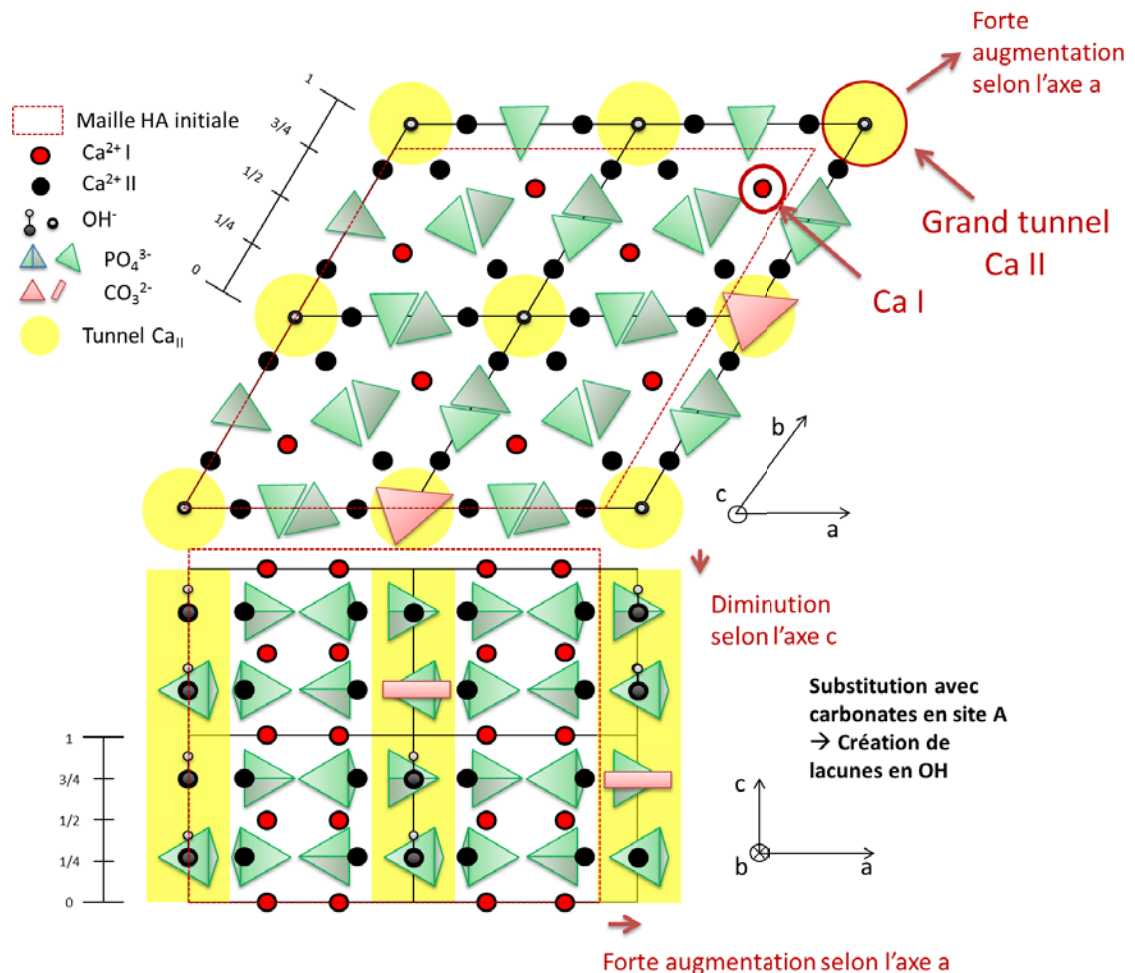
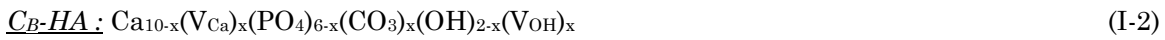


Figure 5 : Projection de la structure de  $C_A$ -HA sur les plans (001) et (010).

• Les apatites carbonatées phosphocalciques de type B ( $C_B$ -HA)

La formule la plus simple pour décrire les apatites carbonatées de type B est la suivante (Eq. I-2 p. 19) [Lafon, 2004] :



dans laquelle  $x$  ( $0 \leq x \leq 2$ ) représente la quantité d'ions carbonates substitués aux ions phosphates. A noter qu'ici encore, l'électroneutralité est conservée par la création de lacune  $\text{V}_{\text{OH}}^+$  en site hydroxyde et  $\text{V}_{\text{Ca}}^{2-}$  en site calcium. L'incorporation de carbonates en substitution des groupements phosphates dans la structure hexagonale de l'apatite engendre une diminution du paramètre de maille  $a$  et un accroissement du paramètre  $c$  [Zapanta-Legeros, 1965; Legeros, 1969; Labarthe, 1973; Vignoles, 1987] (Figure 6 p. 19).

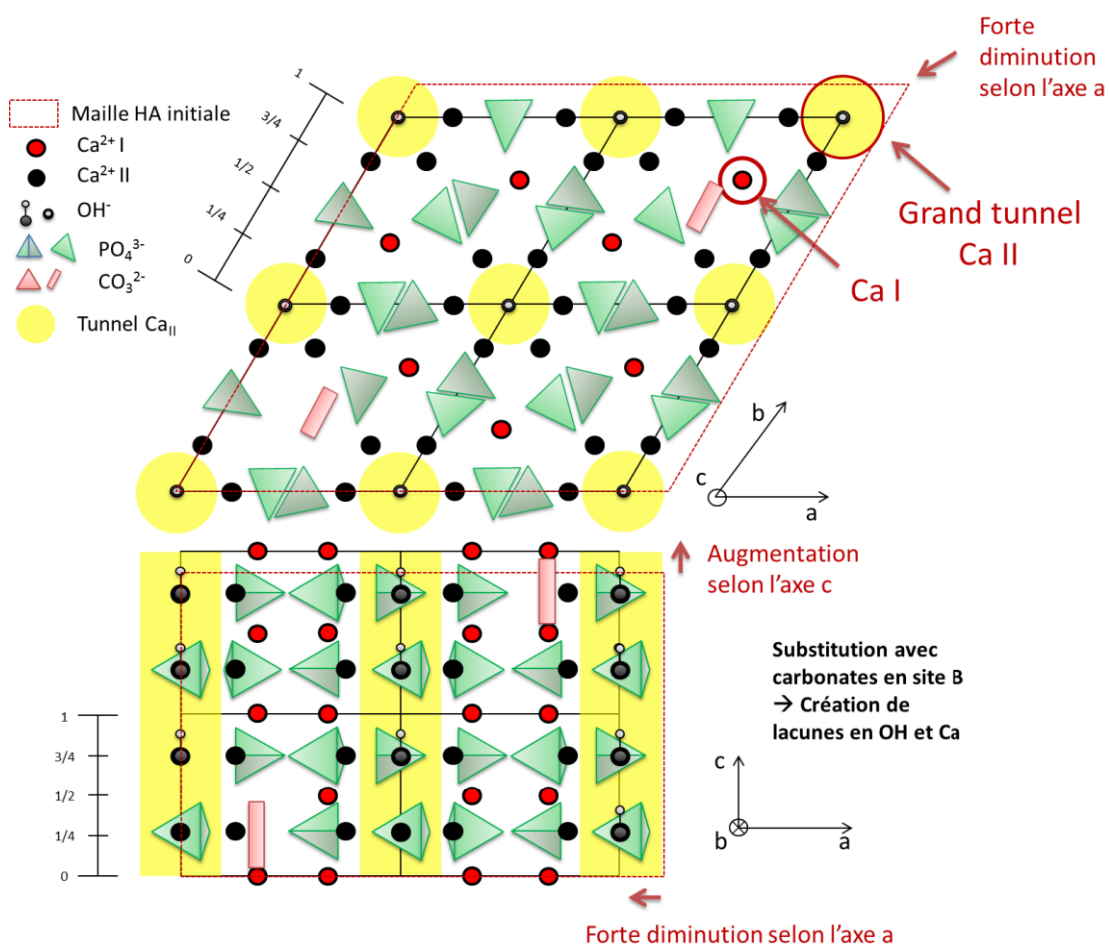
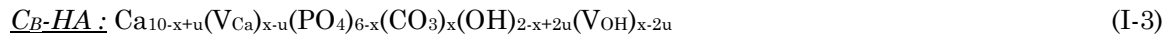


Figure 6 : Projection de la structure de  $C_B$ -HA sur les plans (001) et (010).

Aussi, un autre modèle fut proposé par Labarthe pour les  $C_B$ -HA (Eq. I-3 p. 20) [Labarthe, 1973]. L'auteur observa expérimentalement que les concentrations initialement prévues en calcium et en groupements hydroxydes étaient inférieures aux

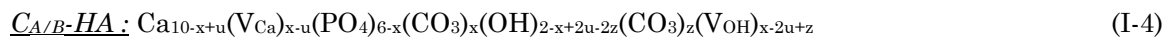
teneurs mesurées. La formule donnée par l'auteur présente une nouvelle variable «  $u$  » qui permet le comblement des lacunes d'ions calcium et d'ions hydroxydes par le couple  $[\text{Ca} / (\text{OH})_2]$ .



avec  $(0 \leq x \leq 2)$  et  $(0 \leq 2u \leq x)$ . Le modèle prévoit, tout comme le précédent (Eq. I-2 p. 19), la création de lacunes sur les sites OH et Ca afin de préserver l'électroneutralité. Ce modèle fait aujourd'hui référence pour la description des apatites phosphocalciques carbonatées de type B (sans autre substitution) [Lafon, 2004].

- *Les apatites carbonatées phosphocalciques de type mixte ( $C_{A/B}\text{-HA}$ )*

Les apatites carbonatées phosphocalciques de type mixte incorporent simultanément des carbonates en site A et en site B. Le nombre maximum de sites A pouvant être occupés dépend du nombre d'ions hydroxyde à disposition, et donc du nombre d'ions carbonates présents en site B. Au-delà de cette condition limitative, il n'existe aucun lien entre les teneurs en carbonate de type A et celle de type B [Elliott, 1994]. Ainsi, la formule des hydroxyapatites carbonatées de type mixte, inspirée des Eq. I-1 (p. 18) et Eq. I-3 (p. 20), pourrait être la suivante (Eq. I-4 p. 20) [Lafon, 2004] :



avec  $(0 \leq x \leq 2)$ ,  $(0 \leq 2u \leq x)$  et  $(0 \leq z \leq 2-x+2u)$ . La création de lacunes sur les sites OH et Ca permet, ici encore, le maintien de l'électroneutralité. L'évolution des paramètres de maille de l'apatite sera fonction du ratio de substitution en carbonate en site A et en site B : une contraction selon l'axe  $c$  et une élongation selon l'axe  $a$  pour une substitution en site A majoritaire, ou inversement dans le cas d'une substitution principalement en site B.

D'un point de vue général, la limite d'incorporation des groupements carbonates dans les  $C_A\text{-HA}$  est de 5,7% en masse (soit  $z = 1$ ) et 14,6% en masse (soit  $x = 2$ ) dans les  $C_B\text{-HA}$ . A noter qu'en raison de la présence de lacunes en sites cationiques lors des substitutions de carbonate en site B, le ratio  $\text{Ca}/(\text{P}+\text{C}_B)$  devient inférieur à celui d'une HA stœchiométrique de 1,667.

### 1.3.4. L'hydroxyapatite phosphocalcique silicatée (Si-HA)

Une autre possibilité pour améliorer la bioactivité de l'HA serait l'incorporation de silicium dans sa structure [Gibson, 1999; Patel, 2002a]. Plusieurs études ont montré l'influence bénéfique du silicium dans le régime alimentaire, son importance dans le

métabolisme cellulaire ainsi que dans la formation osseuse [Carlisle, 1970; Schwarz, 1972; Nielsen, 2004]. Même si les mécanismes sont mal définis, les preuves de la participation du silicium dans la synthèse du collagène et dans la minéralisation de la matrice sont effectives [Nielsen, 2004; Reffitt, 2003; Jugdaohsingh, 2007]. Des études sur les cultures cellulaires et tissulaires exposent l'implication du silicium dans la différenciation des cellules ostéoblastiques [Reffitt, 2003]. De plus, le silicium soluble augmente la densité de la partie minérale de l'os [Jugdaohsingh, 2007]. Le silicium soluble semble également stimuler la précipitation spontanée des phosphates de calcium (*i.e.* de la phase minérale de l'os) [Damen, 1992]. D'une manière générale, le silicium soluble est un acteur essentiel dans la croissance et le développement de l'os.

En conséquence, l'introduction dans la structure apatitique du silicium afin d'améliorer les propriétés biologiques de l'HA a été l'idée principale de plusieurs études. Ainsi, plusieurs auteurs se sont intéressés à l'élaboration de céramiques en hydroxyapatite substituée par des silicates (Si-HA) [Gibson, 1999; Patel, 2002a; Arcos, 2004b; Thian, 2006b; Kim, 2003; Ruys, 1993; Best, 2008b; Botelho, 2006; Marchat, 2013b; Palard, 2008]. Malheureusement, les résultats des études biologiques restent disparates, confus et parfois trompeurs. Par exemple, K.A. Hing présente une apposition plus rapide de l'os ainsi qu'une amélioration de l'adhésion et de la prolifération des cellules ostéoblastiques sur Si-HA en comparaison avec HA [Hing, 2006; Hing, 2007], alors que M. Palard ne trouve aucune différence significative [Palard, 2009]. De même, récemment, D. Marchat affirme qu'une phase Si-HA pure n'a pas d'intérêt biologique et apparaît même toxique pour des cellules ostéoblastiques (C3H10) [Marchat, 2013a]. En effet, la chimie de surface d'une céramique  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  (*i.e.* HA substituée par une quantité stœchiométrique de silicate égale à 0,5) semble perturber le dépôt de matrice extracellulaire et affecter la capacité des cellules ostéoblastiques à s'attacher, se mouvoir et même survivre [Marchat, 2013a].

Ainsi, de récentes critiques sur les résultats publiés concernant Si-HA ont mis en avant le manque de preuves expérimentales qui pourraient expliquer les effets réels d'une substitution de Si dans l'HA sur l'activité biologique [Boanini, 2010; Bohner, 2009]. Le manque de caractérisation physico-chimique des biocéramiques Si-HA dans les études précédemment réalisées (*e.g.* pureté des phases, solubilité, taux de substitution de Si dans la maille cristalline) a été en particulier pointé du doigt. Il semble ainsi que la présence de phases secondaires telles que des silicates polymérisés (*e.g.* silice) à la surface des Si-HA dites « pures » peut changer la réponse biologique [Balas, 2003].

De plus, il semblerait que d'un point de vue physico-chimique, la présence de silicium dans la biocéramique n'est pas un gage d'amélioration de la solubilité de l'HA. Ainsi, par exemple, pour un pH fixé à 3,4 et avec une température régulée à 37°C, les produits de solubilité de l'HA et de la  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  sont estimés à  $K_S^{\text{HA}} = 2,2 \cdot 10^{-127}$  et

$K_{S^{SiO_4},5HA} = 1,5 \cdot 10^{-132}$  [Marchat, article soumis]. Globalement, le composé silicaté semble présenter une solubilité légèrement plus faible que l'HA quelle que soit l'acidité du milieu. Le silicium contenu dans la structure apatitique d'une Si-HA pure ne peut donc pas être relargué dans le milieu biologique par des mécanismes de dissolution chimique.

Une autre possibilité d'amélioration de la bioactivité (*e.g.* osteoinduction) de la phase Si-HA est le greffage de principes actifs ou de molécules organiques favorisant la fixation des cellules responsables de la formation osseuse. En effet, grâce aux liaisons Si-O développées par la substitution des phosphates par des silicates, la fonctionnalisation de surface des céramiques en Si-HA est envisageable [Douard, 2010].

Jusqu'à la fin des années 90, peu de modèles décrivant la substitution des ions phosphates par des ions silicates dans la maille d'hydroxyapatite avaient été établis. La formule la plus couramment utilisée pour décrire une phase Si-HA reste celle proposée ci-dessous [Gibson, 1999; Palard, 2007; Marchat, 2013b] (Eq. I-5 p. 22) :



avec ( $0 \leq y \leq 2$ ). Cette composition théorique prévoit la conservation de l'électroneutralité par la création de lacune  $\text{V}_{\text{OH}}^+$ . Selon ce modèle, la quantité maximum d'ions silicates qui peut être introduite dans la maille correspond à  $y = 2$  ; soit un pourcentage massique de silicate égale à 19,1%. Le composé alors formé, de formule chimique  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_4(\text{SiO}_4)_2$ , est appelé silicocarnotite. Son système cristallin change et devient orthorhombique. A noter qu'au vu des récentes recherches [Marchat, 2013b], l'existence d'une Si-HA pure en structure hexagonale sans apparition de phase secondaire semble limitée à une teneur en silicates de  $y \leq 1,25$  après synthèse par précipitation en milieu aqueux, et à  $y \leq 0,75$  après calcination à 1000°C.

En raison de leur taille plus grande, les groupements silicates substitués aux groupements phosphates modifient les paramètres de maille de la structure cristalline [Arcos, 2004b; Tang, 2005; Palard, 2008; Marchat, 2013b] (Figure 7 p. 23). Une expansion de la maille proportionnelle au taux de substitution en Si est observée selon l'axe *c*. A noter que la valeur selon l'axe *a* reste sensiblement inchangée voire légèrement augmentée.

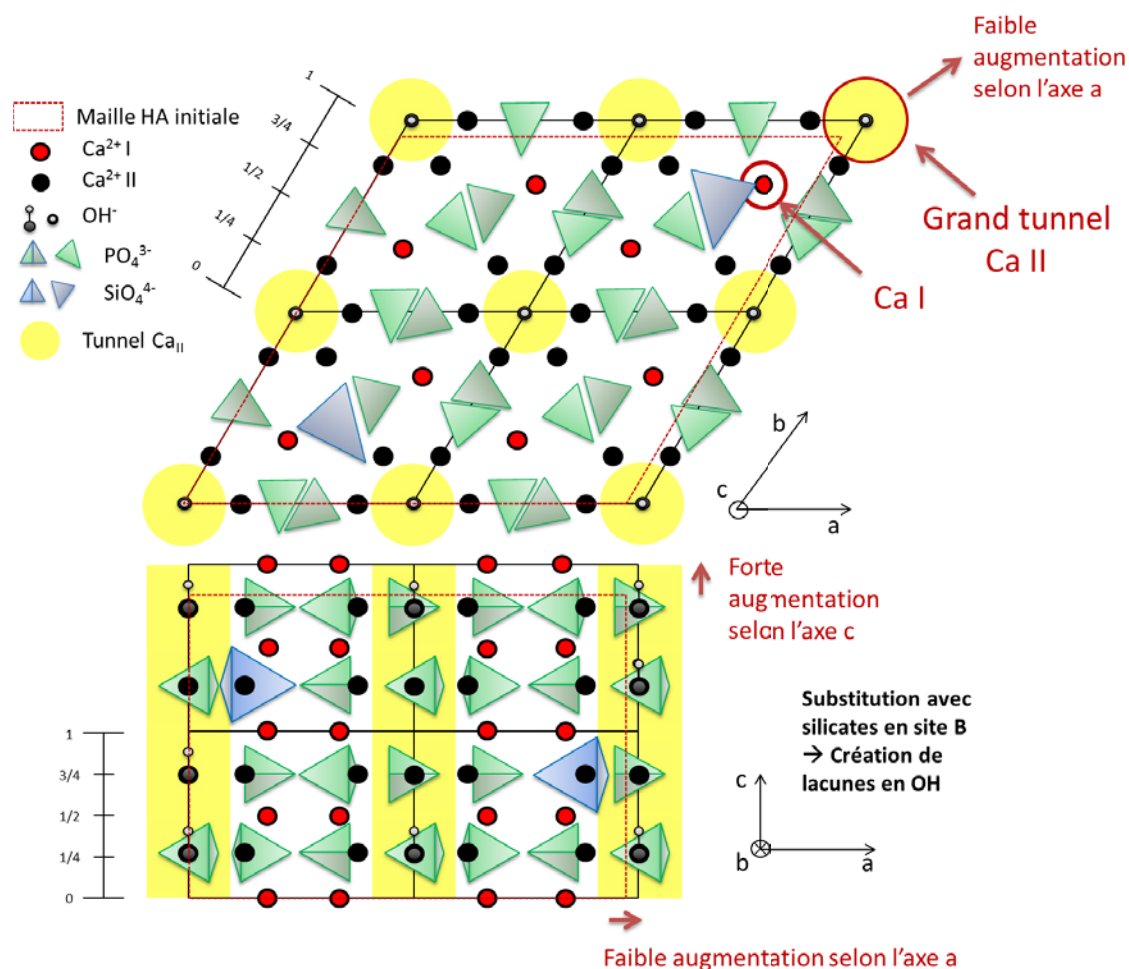


Figure 7 : Projection de la structure de Si-HA sur les plans (001) et (010).

### I.3.5. L'hydroxyapatite phosphocalcique carbo-silicatée (C-Si-HA)

Hypothétiquement, l'incorporation simultanée d'ions carbonates et silicates dans la structure apatitique permettrait de coupler les bonnes propriétés de résorption et de dissolution des apatites carbonatées avec les propriétés biologiques du silicium soluble.

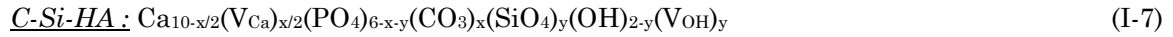
Dans le cas de l'hydroxyapatite phosphocalcique carbo-silicatée (C-Si-HA), les ions carbonates peuvent, comme pour C-HA, s'insérer dans la maille selon deux types de substitutions distinctes. Ils peuvent remplacer soit les ions hydroxydes  $\text{OH}^-$ , soit les ions phosphates  $\text{PO}_4^{3-}$ , soit les deux simultanément. Les ions silicates peuvent s'insérer dans la structure apatitique seulement en substitution d'un ion phosphate. Carbonate, silicate et phosphate partagent ainsi le même site dans la maille d'une C-Si-HA. Dans la littérature, différentes formules décrivant les C-Si-HA sont proposées. La plus simple, avec des quantités égales de carbonate ( $x$ ) et de silicate ( $y$ ) en substitution des



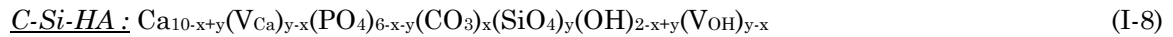
groupements phosphates permettant un équilibre des charges sans création de lacunes dans la structure apatitique, est présentée par Eq. I-6 (p. 24) [Pavankumar, 2011] :



Avec des quantités indépendantes l'une de l'autre en carbonate (x) et en silicate (y), E. Landi propose la formule Eq. I-7 (p. 24) [Landi, 2010]. Les espèces incorporées prennent place seulement en site B, et des lacunes en site calcium et en site hydroxyde sont générées afin d'assurer l'électroneutralité de la structure.

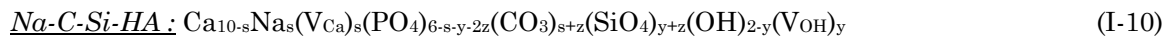


Une autre formulation basée sur celles proposées pour C<sub>B</sub>-HA (Eq. I-2 p. 19) et pour Si-HA (Eq. I-5 p. 22) présentées précédemment est également possible (Eq. I-8 p. 24) [Boyer, 2012] :



avec  $0 \leq y \leq x \leq 2$  et  $(x+y) \leq 2$ . A noter que parmi toutes les formulations proposées pour C-Si-HA, aucune ne fait état d'une carbonatation de type mixte (*i.e.* carbonatation des sites A et B).

D'autres auteurs utilisent des formules incorporant un nouvel élément dans la structure de l'apatite autre que les carbonates et les silicates tel que le magnésium (w) (Eq. I-9 p. 24) [Sprio, 2008; Huang, 2011] ou le sodium (s) (Eq. I-10 p. 24) [Mostafa, 2009; Mostafa, 2011] et équilibrent en conséquence, grâce à l'ajout de lacunes, leurs phases Mg-C-Si-HA et Na-C-Si-HA.



Globalement, les hydroxyapatites co-substituées par des carbonates et des silicates ont fait, jusqu'alors, l'objet de peu d'étude dans la littérature [Landi, 2010; Huang, 2011; Ibrahim, 2011; Mostafa, 2009; Mostafa, 2011; Sprio, 2008; Pavankumar, 2011; Boyer, 2012]. De plus, dans la majorité des cas, la pureté des phases ne fut pas clairement prouvée : manque d'information et/ou présence de phase secondaire (TCP, silice, éléments indésirables). Certains auteurs incluent intentionnellement (ou non) d'autres éléments lors de l'élaboration de C-Si-HA (*e.g.* Mg, Na). T. Huang synthétise une phase Mg-C-Si-HA avec 0,79% de Mg ce qui ne peut pas être considéré comme une phase pure de C-Si-HA [Huang, 2011]. De même, N. Mostafa utilise du Na<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub> et du NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> comme précurseurs en silicate et en phosphate [Mostafa, 2009; Mostafa, 2011], et D. Ibrahim et S. Sprio emploient du NaHCO<sub>3</sub> comme réactifs en carbonate [Ibrahim, 2011; Sprio, 2008]. Dans ces cas-là, les composés synthétisés incorporent du Na dans leur structure apatitique. Une alternative à la synthèse de C-Si-HA par

précipitation en voie aqueuse est proposée par K. Pavankumar : l'emploi des microondes [Pavankumar, 2011]. Dans ce cas, l'auteur déclare obtenir des poudres nanocristallines de C-Si-HA, mais aucun spectre infrarouge n'illustre ses propos. De même, E. Landi obtient une poudre faiblement cristallisée mais ne démontre pas l'incorporation du silicate dans la structure apatitique [Landi, 2010].

Du fait du manque de données, la pureté des poudres ne peut être considérée comme prouvée. Les résultats des études biologiques réalisées sur ces matériaux sont donc incertains. Dans l'étude de E. Landi [Landi, 2010], deux phases C-Si-HA (1,73%/0,88% et 2,24%/0,55% en pourcentage massique de  $\text{CO}_3/\text{Si}$ ) sont testées biologiquement avec des cellules ostéoblastiques humaines. L'auteur constate que la phase la plus riche en Si apparaît toxique pour les cellules. Dans le second cas, le composé C-Si-HA n'est pas toxique, mais la prolifération des ostéoblastes semble ralentie. Aussi, après 7 jours de culture cette seconde phase stimule la prolifération cellulaire ainsi que la teneur en protéine, et inhibe l'activité de la phosphatase alcaline. Enfin, C-Si-HA encourage légèrement la différenciation des ostéoblastes, comme le montre le dépôt de calcium plus élevée, par rapport à HA.

D'un point de vue physico-chimique, les résultats de l'étude de dissolution *in vitro* (pH = 4,5) montrent une augmentation graduelle de la solubilité de HA avec la co-substitution en carbonate et en silicate [Pavankumar, 2011].

Ainsi, ces premiers résultats, bien que discutables quant à la rigueur des protocoles utilisés, semblent favorables à l'hypothèse d'une amélioration des propriétés de résorption et de bioactivité de l'HA par l'incorporation dans sa structure de groupements carbonates et silicates.

## I.4. Stratégie de l'étude : de la synthèse à l'évaluation biologique

Actuellement, l'hydroxyapatite, le phosphate tricalcique  $\beta$  ainsi que les mélanges biphasiques HA /  $\beta$ -TCP, couramment employés en tant que substituts osseux en chirurgie réparatrice, n'ont pas les qualités adéquates de solubilité et de biorésorption. *In vivo*, la solubilité du  $\beta$ -TCP est si forte comparée à l'HA qu'elle limite l'activité ostéoclastique et engendre même des inflammations qui nuisent à l'ostéogénèse. De son côté, les faibles taux de résorption et de solubilité de l'HA ralentissent la vitesse d'apposition de l'os à sa surface.

La substitution ionique apparaît comme une des possibilités pour moduler la bioactivité de l'hydroxyapatite [Boanini, 2010; Shepherd, 2012]. Naturellement présents dans la partie minérale de l'os, les carbonates augmentent la solubilité de l'HA. Ainsi, la vitesse de résorption en milieu biologique d'une apatite synthétique contenant des carbonates peut être modulée jusqu'à celle de l'os naturel. L'incorporation de groupements silicates dans une structure apatitique résorbable permettrait de mettre en avant les propriétés ostéogéniques du silicium soluble. Ainsi, l'incorporation simultanée d'ions carbonates et silicates dans la structure apatitique pourrait permettre de coupler les propriétés de résorption et de dissolution des apatites carbonatées avec le rôle métabolique important du silicium dans le tissu conjonctif.

Jusqu'à présent, un faible nombre d'études a été réalisé sur cette nouvelle phase C-Si-HA et très peu d'entre elles se sont intéressées à ses propriétés biologiques. La nature physico-chimique des poudres synthétisées et des matériaux frittés reste elle-même souvent mal définie (pureté des phases, composition chimique, taux de substitution...).

Sachant que les cellules sont extrêmement sensibles à la chimie de leur substrat, la bioactivité de ces matériaux peut être altérée par une quantité infime de phase non-désirée. Dans le but d'évaluer la réponse biologique de C-Si-HA, la composition de cette nouvelle phase doit être parfaitement définie et contrôlée.

Sur ces bases, l'objectif principal de ce travail de thèse est donc triple :

- La synthèse de poudre pure d'hydroxyapatite co-substituée en carbonate et en silicate de teneur définie et contrôlée (Chapitre II - p. 27).
- Le frittage de céramiques monophasiques denses en C-Si-HA (Chapitre III - p. 87).
- L'évaluation biologique de ces nouveaux substituts osseux via la culture 2D *in vitro* de cellules de lignée ostéoblastique (Chapitre IV - p. 131).

**Chapitre II.**  
**Synthèse et Caractérisations de**  
**l'apatite C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA**



Hypothétiquement, l'incorporation simultanée de carbonate et de silicate dans l'hydroxyapatite permettrait d'améliorer son comportement biologique (*i.e.* résorption, ostéoinduction). C'est pourquoi différents auteurs se sont intéressés à la synthèse d'hydroxyapatite carbo-silicatée (C-Si-HA). Les études publiées à ce jour montrent cependant que les poudres obtenues sont riches en impuretés et que leurs caractérisations physico-chimiques sont généralement incomplètes [Sprio, 2008; Landi, 2010; Mostafa, 2011; Ibrahim, 2011].

L'objectif de ce chapitre est donc la synthèse et la caractérisation de poudres monophasiques d'hydroxyapatites substituées par des groupements carbonates et silicates, de composition contrôlée et reproductible.

Pour une meilleure compréhension des modifications structurales générées par les différentes substitutions, des poudres de référence d'hydroxyapatite (HA), d'hydroxyapatite silicatée (Si-HA) et d'hydroxyapatite carbonatée (C-HA) ont également été synthétisées.

Ce chapitre décrit, dans un premier temps, le procédé de synthèse utilisé pour la préparation des poudres d'hydroxyapatites substituées exemptes d'ions indésirables ( $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ...). Les moyens de caractérisation mis en œuvre sont ensuite évoqués.

Dans une seconde partie, les résultats des caractérisations des composés de références (HA, C-HA et Si-HA) sont détaillés. Enfin, les analyses de la poudre synthétisée en C-Si-HA sont présentées, comparées, puis discutées à la lumière des références.

## II.1. Matériels et méthodes

### II.1.1. Synthèse et préparation des poudres

De nombreuses méthodes de synthèse d'apatite sont proposées dans la littérature. Parmi elles, deux grandes catégories se détachent : les synthèses en voie sèche [Arcos, 2004b] et celles en voie humide [Raynaud, 2002; Boanini, 2010].

La première consiste en une réaction entre deux phases solides à température élevée (réaction dite « solide-solide »). Elle fait intervenir une succession d'étapes de broyage et de calcination. Le broyage peut être une source de pollution de la poudre voire d'inhomogénéité. La calcination à des températures élevées diminue la surface spécifique des poudres synthétisées, ce qui les rend par la suite thermiquement peu réactives (*i.e.* frittage). De plus, cette méthode de fabrication peut dénaturer les phases en raison des traitements thermiques successifs (*e.g.* décarbonatation des C-HA). Cette méthode peut toutefois rester adaptée dans la perspective d'une production importante de quantité de poudre (*i.e.* industrielle).

La synthèse en voie humide passe par la précipitation d'une poudre en milieu, généralement, aqueux. Réalisée à faible température (<100°C), elle permet l'obtention de poudres peu cristallisées présentant des surfaces spécifiques élevées et donc une meilleure réactivité thermique. De plus, contrairement aux réactions « solide-solide », les synthèses par précipitation (sous agitation) assurent une parfaite homogénéité de la poudre dès la germination des grains. Pour toutes ces raisons, la synthèse en voie liquide paraît mieux adaptée au cadre de notre étude.

La synthèse par précipitation en voie aqueuse des phosphates de calcium consiste à ajouter une ou plusieurs solutions ioniques (*e.g.* solutions de phosphate, de carbonate et/ou de silicate) à une autre solution ionique (*e.g.* solution de calcium) initialement présente dans le réacteur de synthèse [Raynaud, 2002]. Afin de garantir la bonne homogénéité de la précipitation, le choix des réactifs est crucial. Ils doivent être parfaitement solubles (capables d'être dissous en solution) et les solutions obtenues doivent être miscibles entre elles. Or, la mise en solution d'un précurseur silicaté s'avère compliquée.

Deux réactifs sont principalement rencontrés dans la littérature pour la préparation d'une hydroxyapatite silicatée : le tétraacétate de silicium ( $Si(CH_3COOH)_4$ ) [Palard, 2008; Gibson, 1999; Balas, 2003; Leventouri, 2003; Bianco, 2009; Sprio, 2008], et l'orthosilicate de tétraéthyle dit « TEOS » ( $Si(OCH_2CH_3)_4$ ) [Arcos, 2004a; Kim, 2003; Bianco, 2009; Landi, 2010]. La solubilité de ces réactifs organiques en milieu aqueux est difficile voire impossible (cf. fiche produit - Annexe A.1 p. 187). Leur dissolution n'est au mieux que partielle (présence de solide dans la solution saturée). Les poudres issues de ces protocoles comportent généralement, en plus de l'apatite silicatée, des

phases secondaires (e.g.  $\alpha$ - et  $\beta$ - tricalcium phosphate, phase amorphe silicatée, silicocarnotite). Le silicium n'est donc pas intégré en totalité dans la structure apatitique lors de la précipitation. Plusieurs auteurs font état d'une incorporation du silicium dans la maille apatitique dans un second temps, par le biais d'un traitement thermique ( $T > 800^\circ\text{C}$ ) des poudres (réaction solide-solide) [Palard, 2008; Palard, 2007]. La mise en solution totale du précurseur silicaté, pour la précipitation d'une phase homogène, s'avère ainsi essentielle.

La mise en solution totale des réactifs et plus particulièrement celle des silicates, point clé de la synthèse, est détaillée ci-dessous. Le mode opératoire et les différents paramètres de synthèse des hydroxyapatites sont ensuite décrits.

### II.1.1.1. Mise en solution des réactifs

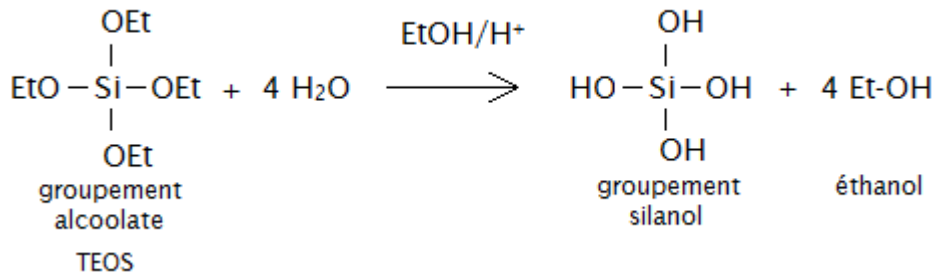
Afin de synthétiser par précipitation en voie aqueuse les poudres de C-Si-HA, quatre précurseurs sans ions indésirables et tous parfaitement solubles sont utilisés.

Parmi eux, le nitrate de calcium tétrahydraté ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , pureté 99%, Merck 1.02121, Allemagne), l'hydrogénophosphate di-ammonium ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , pureté 99%, Merck 1.01207, Allemagne), et l'hydrogénocarbonate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pureté 99%, Merck 1.01131, Allemagne). Ces trois sels sont parfaitement solubles en milieu aqueux (cf. fiche produit - Annexe A.1 p. 187). Etant parfaitement miscibles et ne réagissant pas entre eux, les sels de phosphate et de carbonate sont dissous dans la même solution. Cela permet de conserver le rapport stœchiométrique au cours de la précipitation tout en facilitant leur introduction dans le réacteur de synthèse.

La préparation de la solution silicatée repose sur le protocole développé par le laboratoire pour la synthèse de poudres de Si-HA [Marchat, 2013b]. La solution de silicates solubles est préparée à partir de TEOS ( $\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_4$ , pureté 99%, Sigma-Aldrich 86578, Allemagne) via une méthode sol-gel. La première étape consiste à préparer un gel de silice via l'hydrolyse puis la condensation de ce précurseur. La seconde étape est la dépolymérisation du gel pour obtenir une solution ionique de silicate.

- En premier lieu, le groupement alcoolate (Si-OEt) du TEOS est hydrolysé en groupement silanol (Si-OH) (Figure 8 p. 32). La réaction est catalysée en milieu acide via de l'acide nitrique ( $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) (96%, Merck 1.01799, Allemagne). Cette réaction génère de nombreux monomères Si-OH qui s'agrègent et forment une suspension colloïdale appelée « sol ».

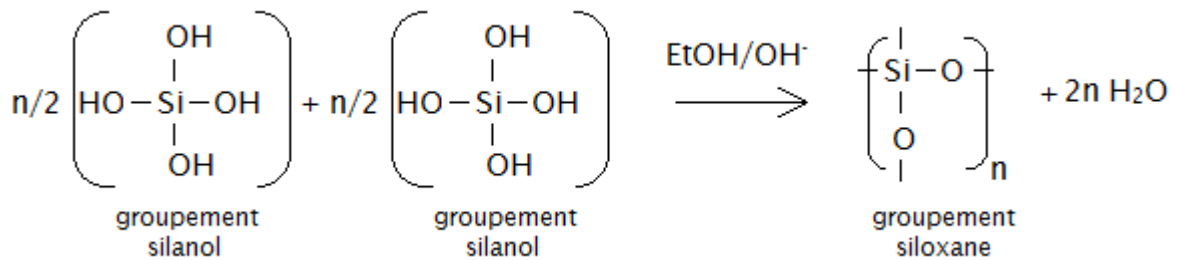




**Figure 8 :** Mécanisme d'hydrolyse d'une molécule d'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS) en solution eau/éthanol acidifiée.

Le rapport molaire de TEOS / éthanol / eau acidifiée est fixé à 1 / 8,5 / 4. La température et le temps d'agitation sont fixés respectivement à 35°C et 1 heure.

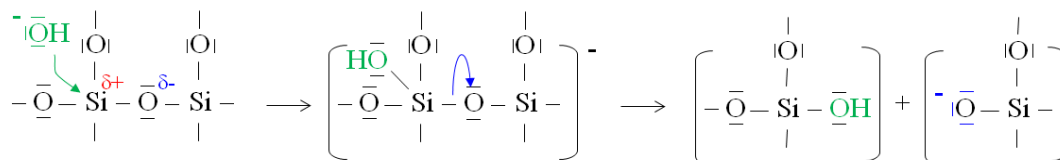
- La condensation des groupements silanol est la deuxième étape dans la fabrication du gel. La réaction débute avec l'augmentation du pH de la solution à un niveau basique, environ 8, par l'ajout de quelques gouttes de solution d'ammoniaque ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 28%, Merck 1.05423, Allemagne). Cette réaction génère des liaisons siloxanes ( $\text{Si-O-Si}$ ), déclenchant la formation d'un gel de silice (Figure 9 p. 32). La polymérisation est immédiate.



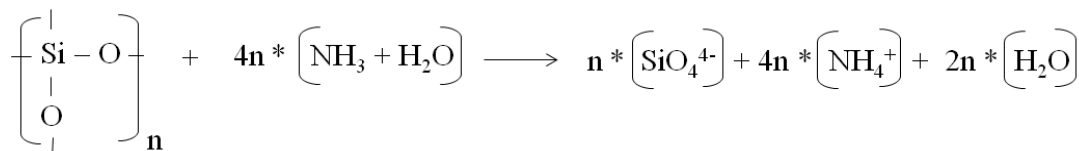
**Figure 9 :** Mécanisme de condensation des groupements silanol en milieu basique après complète hydrolyse du précurseur TEOS.

La réaction de condensation est considérée à l'équilibre après 12 heures.

- La dépolymérisation du gel de silice est la dernière étape pour obtenir une solution d'ions silicates solubles. La réaction correspond à une attaque nucléophile des liaisons siloxanes ( $\text{Si-O}$ ) par des ions hydroxydes d'une solution d'ammoniaque ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 28%, Merck 1.05423, Allemagne). Le pH de la solution est maintenue supérieur à 11 au cours de cette opération (Figure 10 p. 33 et Figure 11 p. 33).



**Figure 10 :** Mécanisme de l'attaque nucléophile des liaisons siloxanes par des ions hydroxydes.



**Figure 11 :** Mécanisme de la réaction de dépolymérisation du gel de silice par une solution d'ammoniaque.

Une fois le gel dissous, la solution est filtrée sur un système Millipore (Magma nylon, 0,8 µm) afin de s'assurer de l'absence de résidus de gel ou de particules solides qui auraient pu précipiter. La concentration en ions silicates de la solution est alors mesurée par chromatographie ionique (Dionex DX-500) à l'aide d'une colonne d'échange ionique SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup> (AS4A) couplé à un détecteur UV/visible (410 nm). En moyenne, la concentration des solutions en silicate est de 1073 ± 35 p.p.m. (n = 15 solutions). Cette valeur dépend du procédé de préparation (e.g. les réactions d'hydrolyse, de condensation et de dépolymérisation). En conséquence, le volume de la solution de silicates solubles doit être recalculé pour chaque nouvelle synthèse.

### II.1.1.2. Mode opératoire

Comme décrite dans la partie précédente, la méthode par précipitation en voie aqueuse consiste à ajouter des solutions de phosphate, de carbonate et de silicate à une solution de calcium. La vitesse d'introduction, la valeur du pH et la température sont contrôlées et régulées durant tout le procédé. Le schéma du montage de synthèse est présenté Figure 12 (p. 34).

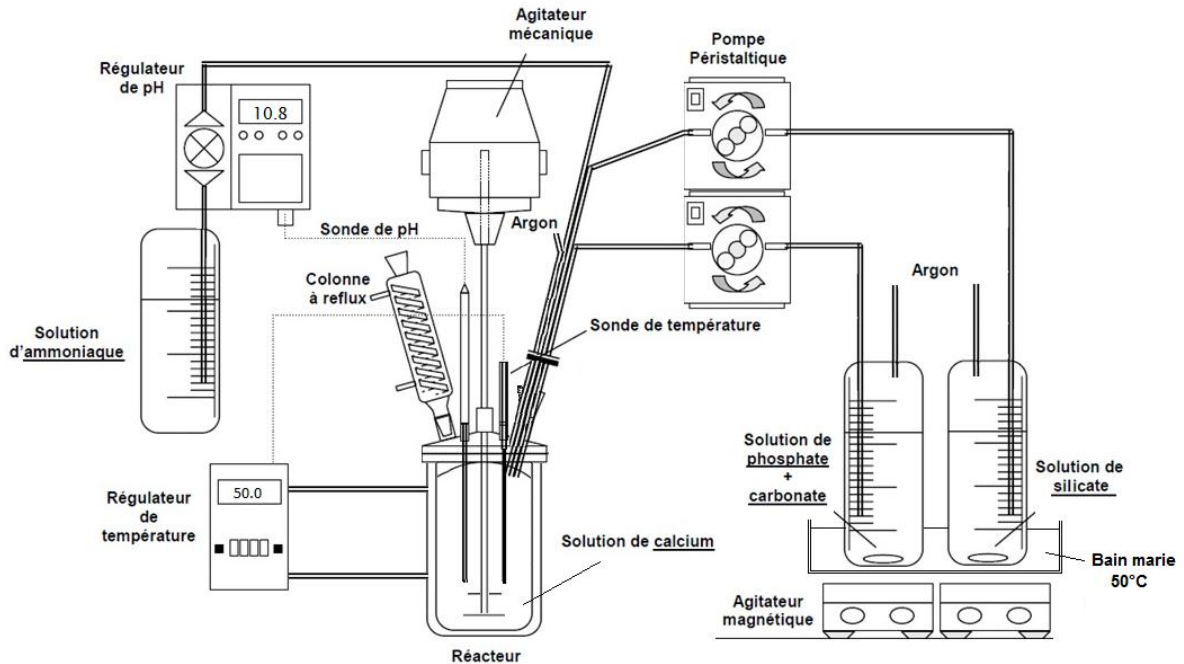
La solution de nitrate de calcium est introduite dans un réacteur double paroi de 5 L. Cette solution est chauffée à la température choisie via une huile siliconée circulant dans la double enveloppe du réacteur. Ce cryothermostat (Huber) est relié à une sonde de température Pt100 placée au cœur du réacteur, ce qui permet une régulation dynamique. Le milieu réactionnel est continuellement agité durant toute la durée de la synthèse (Eurostar IKA Werke). Afin d'éviter la carbonatation du précipité par le gaz carbonique atmosphérique, le réacteur est balayé par un flux d'argon (pureté 99,999%, Air Liquide, France). Le pH est ajusté puis maintenu à sa valeur de consigne par l'ajout d'une solution concentrée d'ammoniaque (NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 28%, Merck 1.05423, Allemagne) au moyen d'une pompe (ProMinent) reliée à un régulateur de pH (Hanna Instruments), lui-même connecté à une électrode de pH (Electrode pH Steamline

Schott Instruments). Une colonne à reflux surplombe la tête de réacteur afin de condenser les vapeurs d'ammoniaque.

Les solutions des précurseurs ioniques sont préchauffées au bain marie et maintenues sous agitation magnétique jusqu'à leur introduction complète dans le réacteur. Les solutions de phosphate-carbonate et de silicate sont ajoutées à débit contrôlé à l'aide de deux pompes péristaltiques (Masterflex L/S Cole Parmer Instrument Company).

L'ajout des réactifs terminé, le précipité en suspension est laissé à maturer sous flux d'argon durant un temps donné en maintenant la température, le pH et l'agitation aux valeurs de consignes. A l'issue de la maturation, le précipité est filtré (filtres Whatman 542, 2,7  $\mu\text{m}$ ), puis séché à l'étuve sous air pendant 24 heures à 100°C.

Après séchage en étuve, la poudre est finement broyée à l'aide d'un broyeur planétaire (RETSCH PM400) composé de billes et de bols de broyage en zircone. La poudre obtenue est ensuite tamisée à 400  $\mu\text{m}$ .

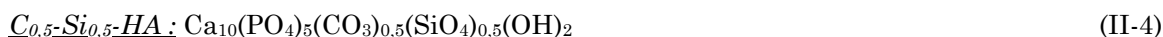
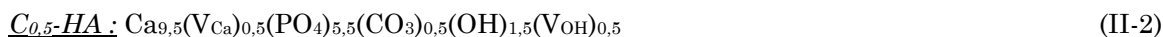


**Figure 12** : Schéma du montage de synthèse par précipitation en voie aqueuse.

### II.1.1.3. Paramètres de synthèses

Dans cette étude, quatre compositions différentes sont synthétisées : une hydroxyapatite phosphocalcique stœchiométrique (HA), une hydroxyapatite carbonatée (C-HA), une hydroxyapatite silicatée (Si-HA), et une hydroxyapatite co-substituée en carbonate et en silicate (C-Si-HA). Les formules chimiques théoriques de ces quatre poudres sont les suivantes (Eq. II-1 à II-4 p. 34 à 35):





où  $V_{Ca}$  et  $VOH$  représentent respectivement les lacunes en site calcium et en site hydroxyde.

Ces compositions sont respectivement nommées HA,  $C_{0,5}$ -HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA. Hypothétiquement, et quelle que soit la composition, l'incorporation des silicates et/ou des carbonates au cours de la synthèse par précipitation est exclusivement réalisée en site B.

Les formules théoriques de  $C_{0,5}$ -HA et  $Si_{0,5}$ -HA proviennent des formules générales présentes dans la littérature (cf. I.3.3 p. 17 et I.3.4 p. 20) où les coefficients en carbonate (x) et en silicate (y) dans la phase apatitique ont été fixés à 0,5. Les mêmes coefficients stœchiométriques (x) et (y) ont été utilisés dans la formule théorique de la poudre de  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA (cf. I.3.5 p. 23). Ces coefficients stœchiométriques permettent, en première approximation, d'établir un équilibre électrique dans la structure, sans formation de lacunes, par compensation des charges des ions bivalents ( $CO_3 PO_4^+$ ) et des ions tétravalents ( $SiO_4 PO_4$ ).

Quelle que soit la stœchiométrie recherchée, la maîtrise de la composition de la poudre dépend de la maîtrise des paramètres de synthèse. Parmi eux :

- Le pH de la réaction : dans le cas de la synthèse de l'HA, le pH de la réaction est fixé à 8. Dans le cas de la précipitation des apatites silicatées, il est important de maintenir en solution les ions silicates sous forme  $H_3SiO_4^-$  pour la précipitation de la phase Si-HA [Marchat, 2013b]. Ainsi, pour la synthèse des apatites substituées ( $C_{0,5}$ -HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA), le pH est maintenu à 10,8. Cette valeur a été choisie selon les courbes de spéciations (cf. Annexe A.2 p. 190) des espèces phosphates [Elliott, 1994; Guan, 2009], silicates [Šefčík, 1997; Guan, 2009] et carbonates [Van Gerven, 2004; Kaandorp, 2006] afin d'obtenir les ions  $HPO_4^{2-}$ ,  $H_3SiO_4^-$  et  $CO_3^{2-}$  comme espèces majoritaires dans le milieu réactionnel.

- Le rapport molaire en réactifs  $Ca/(P+Si+C)$  : les quantités initiales de nitrate de calcium, d'hydrogénophosphate di-ammonium, d'hydrogénocarbonate d'ammonium et de silicate soluble sont fixées en fonction de la formule de l'apatite à synthétiser.

- La concentration en réactif : pour chaque synthèse, les quantités de réactifs introduites sont calculées afin d'obtenir une masse théorique de 60 g de poudre précipitée. Le volume d'eau déionisée pour dissoudre le précurseur en calcium est fixé à 1500 mL. Les précurseurs en phosphate et carbonate sont dissous conjointement dans

500 mL d'eau déionisée. Pour rappel, le volume de la solution de silicates solubles est fixé selon sa concentration.

- La vitesse d'introduction des réactifs : la durée d'introduction des solutions « phosphate + carbonate » et « silicate » est fixée à 25 minutes. Les débits des pompes péristaltiques sont calculés en conséquence.

- La température : dans le cas de la synthèse de l'HA, la température est fixée à 60°C. Du fait d'un pH plus élevé, et afin de limiter la consommation en ammoniacque, la température de synthèse des apatites substituées ( $C_{0,5}$ -HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA) est abaissée à 50°C.

- Le temps de maturation : un temps suffisamment long pour obtenir une phase précipitée thermodynamiquement stable avec un rapport molaire  $Ca/(P+Si+C)$  constant.

Les paramètres de synthèse des quatre compositions sont présentés dans le Tableau 2 (p. 36). Afin de faciliter la compréhension, les coefficients stœchiométriques et les pourcentages massiques théoriques des compositions des poudres sont indiqués Tableau 3 (p. 36). Ces valeurs ont été définies à partir des formules chimiques théoriques Eq. II-1 à Eq. II-4 (p. 34).

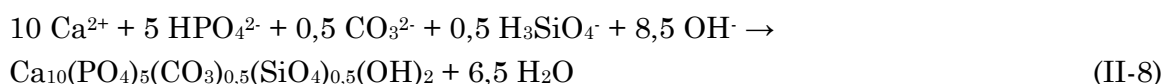
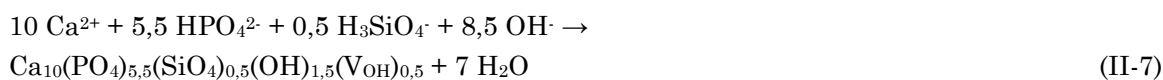
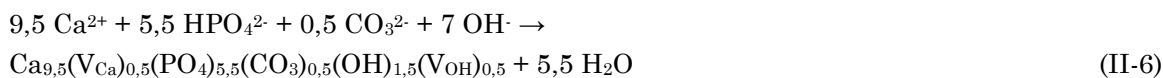
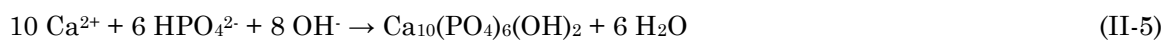
**Tableau 2** : Paramètres de synthèses

Echantillons	Paramètres de synthèses							
	nCa /mol	nP /mol	nSi /mol	nC /mol	Ca/ P+Si+C	pH	T /°C	tm /h
HA	0,597	0,358	0	0	10/6	8	60	24
$Si_{0,5}$ -HA	0,603	0,332	0,030	0	10/6	10,8	50	48
$C_{0,5}$ -HA	0,595	0,344	0	0,031	9,5/6	10,8	50	48
$C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA	0,609	0,304	0,030	0,030	10/6	10,8	50	48

**Tableau 3** : Coefficients stœchiométriques et pourcentages massiques théoriques des poudres synthétisées

Echantillons	Coefficients stœchiométriques théoriques				% massiques théoriques			
	xCa	xP	xSi	xC	%wt Ca	%wt P	%wt Si	%wt C
HA	10	6	0	0	39,89	18,50	0	0
$Si_{0,5}$ -HA	10	5,5	0,5	0	40,25	17,11	1,41	0
$C_{0,5}$ -HA	9,5	5,5	0	0,5	39,72	17,77	0	0,63
$C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA	10	5	0,5	0,5	40,66	15,71	1,42	0,61

Les réactions générales de précipitation des phases HA, C<sub>0,5</sub>-HA, Si<sub>0,5</sub>-HA et C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA, dans ces conditions expérimentales et en première approximation, peuvent respectivement être écrites de la façon suivante (Eq. II-5 à II-8 p. 37) :



#### II.1.1.4. Traitements thermiques

Afin de bloquer la maturation des phases apatitiques, et d'éliminer un maximum de résidus nitrés de synthèse, toutes les poudres synthétisées sont traitées à 400°C pendant 2 heures sous air. Les poudres ainsi préparées sont appelées « poudres brutes ».

Pour détecter la présence éventuelle de phase secondaire, les poudres brutes sont calcinées à haute température afin d'améliorer leur cristallinité et ainsi d'affiner leurs pics de diffraction. Deux atmosphères différentes sont utilisées pour ces traitements thermiques : air et CO<sub>2</sub>. Les paramètres de calcination sont les suivants :

- 1000°C pendant 15 heures sous air à pression ambiante : en accord avec la norme en vigueur de caractérisation des phosphates de calcium ISO 13779-3 : 2008.
- 1000°C pendant 1 heure sous CO<sub>2</sub> à pression ambiante (P<sub>CO2</sub> assimilé à 1 bar soit 10<sup>5</sup> Pa ; CO<sub>2</sub>, 99,9995% Air Liquide, France) protocole établi à partir des résultats de J.-P. Lafon [Lafon, 2004] afin de prévenir toute décarbonatation des hydroxyapatites carbonatées.

### II.1.2. Méthodes de caractérisation

#### II.1.2.1. Analyses structurales

L'analyse qualitative des phases cristallines présentes au sein des échantillons est réalisée par diffraction des rayons X (DRX). Les diffractogrammes sont enregistrés avec la radiation CuK $\alpha$  (40 kV, 30mA) sur un diffractomètre  $\theta/2\theta$  Siemens D5000 à température ambiante. Les acquisitions sont réalisées sur un domaine angulaire de 27° à 38° (en 2 $\theta$ ) selon un pas de 0,02° et un temps de comptage égal à 9 s. Le pic est considéré comme détectable si le rapport d'intensité signal/bruit est supérieur ou égale à 2. Les phases sont identifiées par comparaison avec les références ICDD-PDF

(International Center for Diffraction Data - Powder Diffraction Files). Un récapitulatif des principales fiches utilisées est présenté dans le Tableau 4 (p. 38).

**Tableau 4** : Fiches de références pour l'indexation des diffractogrammes de phosphates de calcium (PDF)

Nature du composé	N° Fiches PDF	Nature du composé	N° Fiches PDF
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9-432	CaO	37-1497
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - TCP $\alpha$	9-348	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	4-733
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - TCP $\beta$	9-169	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_4(\text{SiO}_4)_2$	40-393
$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ - TTCP	25-1137	$\text{Ca}_2\text{SiO}_4$	86-401
$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	9-345	$\text{CaSiO}_3$	43-1460

Les poudres synthétisées sont susceptibles de contenir de la chaux sous sa forme hydratée  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Or, en raison de la superposition de la raie principale de diffraction de l'hydroxyde de calcium (plan (200) à  $2\theta = 34,08^\circ$ ) avec une raie de l'HA (plan (202) à  $2\theta = 34,05^\circ$ ), un test qualitatif supplémentaire doit être réalisé pour s'assurer de l'absence de chaux dans le composé. Ce test est effectué après calcination des poudres à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 15 heures sous air en accord avec la norme ISO 13779-3 : 2008. L'absence de chaux est alors vérifiée en projetant de la poudre encore chaude (à  $400^\circ\text{C}$ ) dans de l'eau désionisée. Quelques gouttes de l'indicateur coloré phénolphtaléine sont ensuite ajoutées. La solution devient instantanément rose en présence de chaux, qui alcalinise la solution.

Les échantillons étudiés sont également susceptibles de contenir une phase de carbonate de calcium  $\text{CaCO}_3$ , obtenue par précipitation au cours de la synthèse ou par carbonatation de la chaux. En effet, au-delà de  $900^\circ\text{C}$  et sous atmosphère  $\text{CO}_2$ , le composé CaO, s'il est présent, devient  $\text{CaCO}_3$  (Eq. II-9 p. 38) :



La présence de  $\text{CaCO}_3$  à l'état de traces dans une poudre d'HA est difficile à déceler par DRX en raison des seuils de détection trop élevés et de la faible intensité de ses pics principaux de diffraction. Le protocole de détection établi consiste à calciner l'échantillon sous air à  $550^\circ\text{C}$  pendant 10 heures. Ce traitement thermique préalable permet de retransformer la phase  $\text{CaCO}_3$  en CaO (Eq. II-9 p. 38) sans décarbonater une éventuelle C-HA. Ces paramètres de calcination ont été déterminés via l'étude de la stabilité thermique des composés C-HA et C-Si-HA (cf. III.2.2 p. 96). Le test de détection de la chaux à la phénolphtaléine peut alors être réalisé sur ces poudres chaudes selon le protocole précédemment décrit.

Les paramètres de maille des poudres monocristallines sont déterminés par la méthode d'affinement proposée par A. Le Bail via le logiciel TopasP4-2. Pour cela,

l'acquisition d'un diffractogramme haute résolution (domaine angulaire :  $10^\circ$  à  $120^\circ$ , pas :  $0,02^\circ$ , temps de comptage : 10,5 s) est effectuée sur des poudres calcinées à  $1000^\circ\text{C}$  (cf. protocole II.1.1.4 p. 37).

### II.1.2.2. Spectroscopie InfraRouge

La spectroscopie infrarouge (IR) permet d'obtenir des informations sur la nature des liaisons chimiques qui constitue un échantillon.

L'acquisition des spectres IR est réalisée sur un spectromètre MIR TF VERTEX 70 (Bruker Optics) à température ambiante sur des échantillons pulvérulents. Le domaine spectral étudié s'étend de  $4000\text{ cm}^{-1}$  à  $400\text{ cm}^{-1}$  avec une résolution de  $2\text{ cm}^{-1}$ . Une itération de 64 scans est effectuée pour chaque spectre.

Afin de pouvoir comparer les différents spectres, il est nécessaire de procéder à leur normalisation. Pour cela, la bande  $\nu_4\text{ PO}_4$  (à environ  $600\text{ cm}^{-1}$ ) est utilisée comme bande de référence. Cette procédure est communément utilisée dans la littérature [Rey, 1989; Lafon, 2008].

Les aires intégrées des bandes d'absorption normalisées permettent une analyse semi-quantitative de la composition élémentaire de l'échantillon. La déconvolution des bandes d'absorption est réalisée à l'aide du logiciel Origin 8.6 via un modèle de courbe gaussienne [Figueiredo, 2012; Bradley, n.d.].

### II.1.2.3. Analyses élémentaires

L'analyse quantitative des éléments chimiques présents dans les échantillons est réalisée à l'aide de deux techniques selon l'élément analysé :

- Les concentrations en carbone dans les échantillons sont déterminées par un analyseur CS-444 (Leco) par détection infrarouge après combustion. Les cellules infrarouges de l'appareillage détectent le  $\text{CO}_2$  dégagé. Grâce à des droites d'étalonnage, le taux de carbone initialement présent dans l'échantillon est dosé. A noter toutefois que le dosage des carbones ne différencie pas les carbonates dans l'apatite des carbonates absorbés.

- Les concentrations en calcium, phosphore et silicium dans les échantillons sont mesurées par Spectroscopie d'Emission Atomique / Plasma Couplé par Induction (ICP/AES), à l'aide de l'appareil Horiba Activa Spectrometer (Jobin-Yvon). Une masse précise de poudre est dissoute dans une solution d'acide nitrique à  $0,4\text{ mol.L}^{-1}$  (96%, Merck 1.01799, Allemagne). Afin de minimiser les erreurs de mesure dues à l'appareillage et à ses limites de détection, les solutions sont préparées de telle sorte que les concentrations des éléments à doser soient proches de  $30\text{ mg.L}^{-1}$ .



## II.2. Caractérisations des poudres de références : HA / $C_{0,5}$ -HA / $Si_{0,5}$ -HA

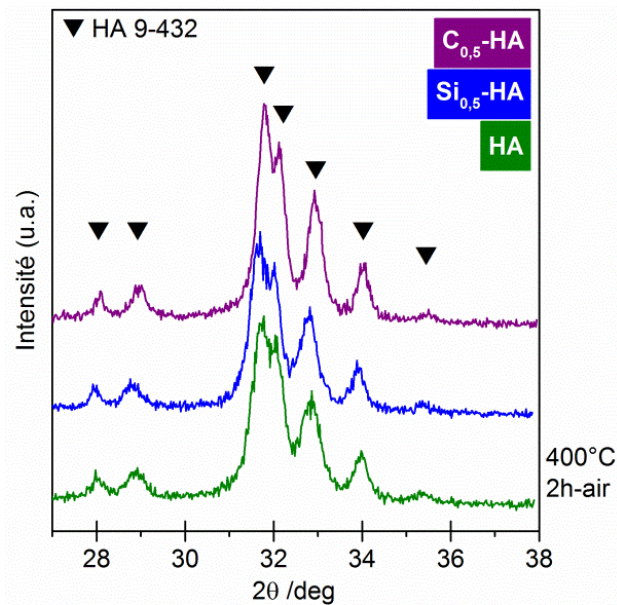
Afin de mettre en évidence les modifications structurales liées à la substitution des groupements phosphates par des groupements carbonates et/ou silicates dans une maille hydroxyapatite, des échantillons de référence (HA,  $C_{0,5}$ -HA et  $Si_{0,5}$ -HA) ont été synthétisés et minutieusement caractérisés.

Dans un premier temps sont présentés les résultats des analyses physico-chimiques des poudres brutes. Dans une seconde partie, les poudres de références sont analysées après traitement thermique (sous air et sous  $CO_2$ ) afin de cristalliser et ainsi de mieux distinguer les phases en présence.

L'ensemble de ces résultats permettra de mettre en lumière les phénomènes observés dans le composé  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA (cf : II.3 p. 63).

### II.2.1. Analyses physico-chimiques des poudres brutes

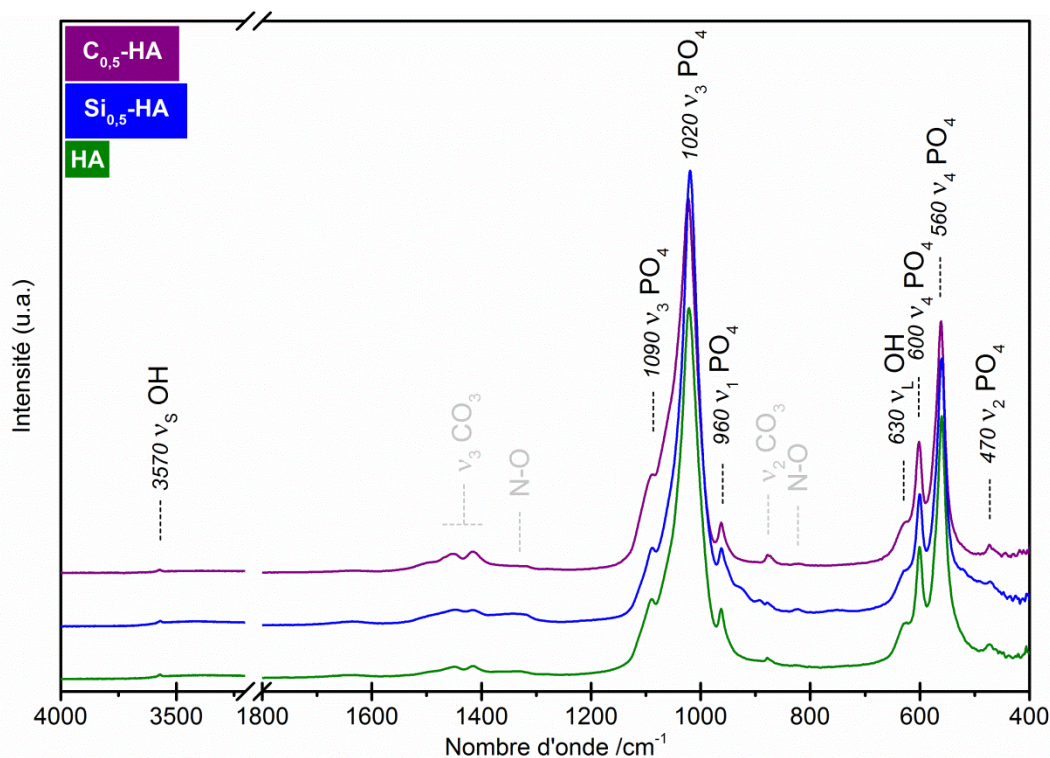
Les diagrammes de diffraction des rayons X des poudres de référence HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ -HA calcinées à 400°C pendant 2 heures sous air sont présentés sur la Figure 13 (p. 40). Les profils pour les trois compositions sont semblables et caractéristiques d'une phase apatitique (PDF n°9-432). Aucune phase secondaire cristalline n'est détectée. Les pics de diffraction sont larges ce qui révèle une faible cristallinité des poudres. La petite taille des cristallites qui composent les poudres brutes peut également expliquer ce phénomène.



**Figure 13** : Diffractogrammes des poudres de référence HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ -HA calcinées à 400°C pendant 2 h (poudre brute).

Sur la Figure 14 (p. 41) sont présentés les spectres d'absorption infrarouge des poudres de référence HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ -HA calcinées à 400°C pendant 2 heures sous air. Ces poudres brutes présentent toutes les bandes d'absorption caractéristiques d'une hydroxyapatite phosphocalcique. Le Tableau 5 (p. 41) recense les nombres d'onde des bandes d'absorption infrarouge attribuées aux groupements phosphates et hydroxyles dans l'HA.

De faibles bandes à 822 et 1330  $cm^{-1}$  sont également présentes. Elles sont caractéristiques des groupements  $NO_3$  des résidus de synthèse nitrés. De même, un épaulement de faible intensité est observable à 866  $cm^{-1}$ . Il est spécifique aux carbonates labiles :  $CO_2$  atmosphérique adsorbé à la surface des poudres.



**Figure 14 :** Spectres IR des poudres de référence HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ -HA calcinées à 400°C pendant 2 h (poudre brute).

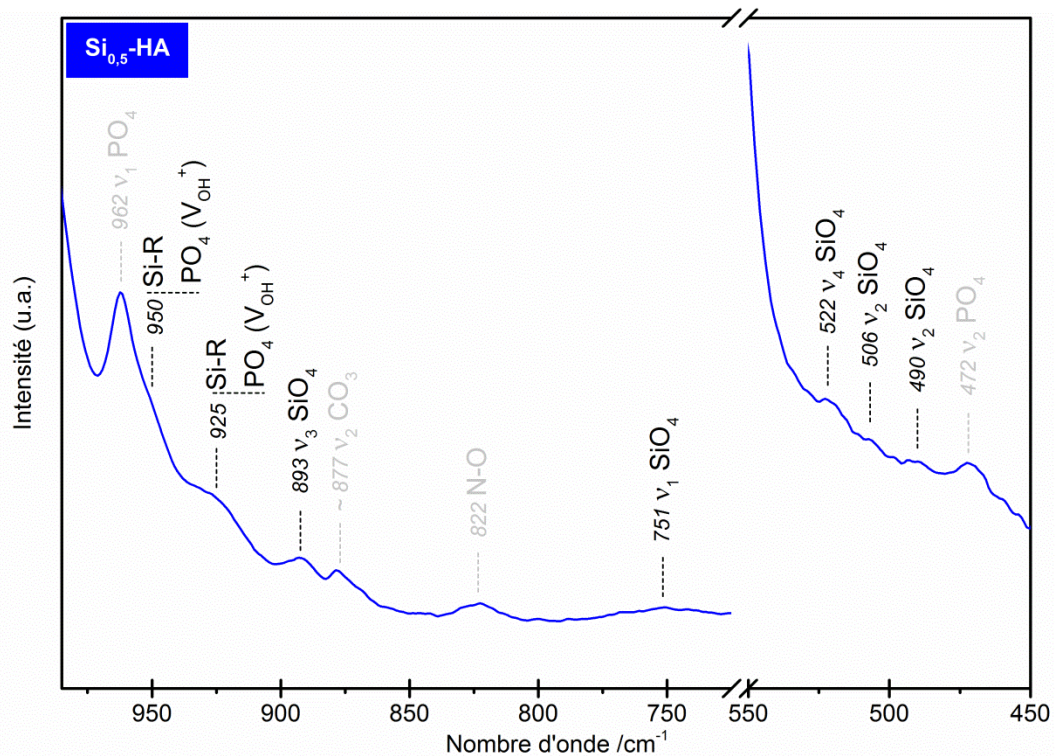
**Tableau 5 :** Bandes d'absorption infrarouges caractéristiques de l'HA [Heughebaert, 1977a; Raynaud, 1999].

Nombres d'onde $cm^{-1}$	Attribution	Mode
3570	O-H, élongation symétrique des ions $OH^-$	$v_5$
1090 - 1020	P-O, élongation antisymétrique des ions $PO_4^{3-}$	$v_3$
960	P-O, élongation antisymétrique des ions $PO_4^{3-}$	$v_1$
630	O-H libration des ions $OH^-$	$v_L$
600 - 560	P-O élongation antisymétrique des ions $PO_4^{3-}$	$v_4$
470	P-O élongation antisymétrique des ions $PO_4^{3-}$	$v_2$

En fonction de la composition de l'apatite, d'autres bandes sont observables :

- Le spectre du composé  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  (Figure 15 p. 42) présente des bandes à 490, 506, 522, 751 et 893  $\text{cm}^{-1}$  spécifiques au groupement  $\text{SiO}_4$  dans les sites B de la structure apatitique (Tableau 6 p. 43). Les épaulements centrés vers 925 et 950  $\text{cm}^{-1}$  peuvent être attribués aux élongations des liaisons Si-OH ou Si-O $\cdot$  à la surface des grains [Marchat, 2013b]. La bande à 950  $\text{cm}^{-1}$  peut également correspondre à la vibration du groupement phosphate situé à proximité des lacunes en site A : bande communément observée pour l'oxy-hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{O}_x(\text{VOH})_x$  [Liao, 1999]. Dans le cas présent, les lacunes en site hydroxyde ( $\text{VOH}^+$ ) sont dues à l'équilibre des charges au sein de la structure [Marchat, 2013b] à la suite de la substitution des groupements  $\text{PO}_4$  par des groupements  $\text{SiO}_4\text{PO}_4^-$ , et non à la déshydratation de cette phase puisque les poudres n'ont été calcinées qu'à 400°C.

Le spectre de la poudre brute en  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  ne présente pas les bandes d'absorption infrarouge relatives à la silice  $\text{SiO}_2$  (Tableau 7 p. 43). La spectrométrie infrarouge permet d'affirmer que le silicium est totalement intégré dans la structure apatitique et ce, dès la précipitation.



**Figure 15 :** Spectre IR de la poudre de référence  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinée à 400°C pendant 2 h (poudre brute) - domaines  $\text{SiO}_4$ .

**Tableau 6 :** Bandes d'absorption infrarouge caractéristiques des groupements silicates dans une Si-HA [Marchat, 2013b].

Nombres d'onde $cm^{-1}$	Attribution	Mode
985	$SiO_4$ dans HA	$v_3$
947	$PO_4$ dans HA avec $V_{OH}$ et/ou Si-R de surface	
930	$PO_4$ dans HA avec $V_{OH}$ et/ou Si-R de surface	
893	$SiO_4$ dans HA	$v_3$
840	Si-R	$v_3$
750	$SiO_4$ dans HA	$v_1$
528	$SiO_4$ dans HA	$v_4$
504	$SiO_4$ dans HA	$v_2$
490	$SiO_4$ dans HA	$v_2$

**Tableau 7 :** Bandes d'absorption infrarouge caractéristiques des groupements Si-O d'une silice cristalline ou amorphe [Marchat, 2013b].

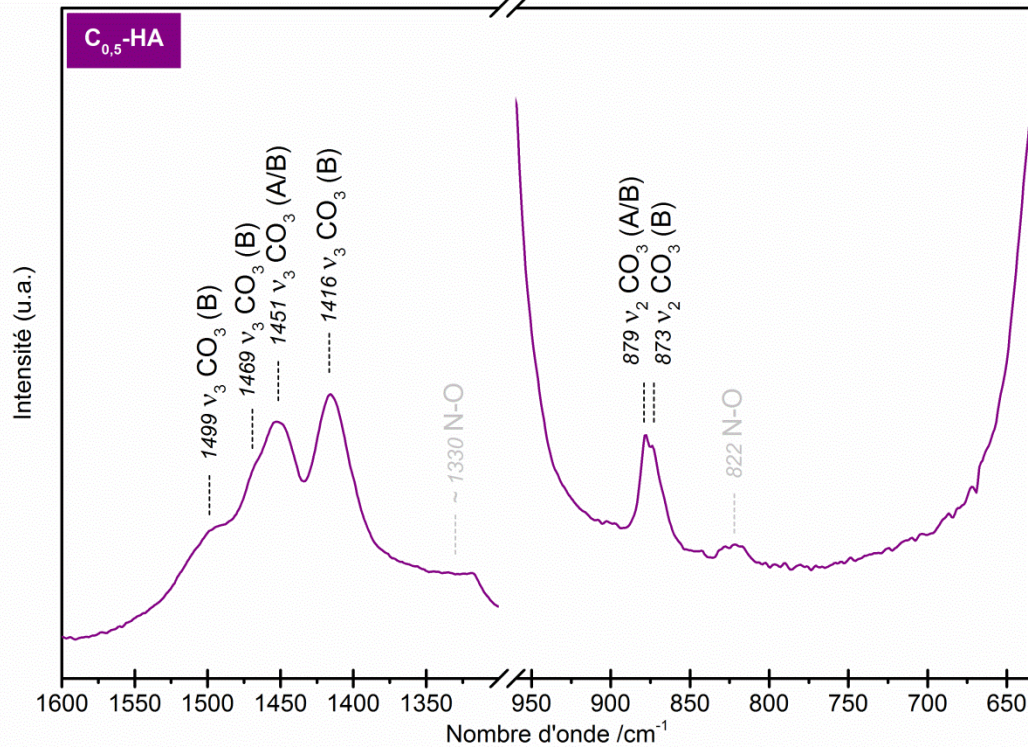
Nombres d'onde $cm^{-1}$	Attribution
873	Si-O dans silice
798	Si-O dans silice
683	Si-O dans silice
535	Si-O dans silice
515	Si-O dans silice
500	Si-O dans silice

• Le spectre du composé  $C_{0,5}$ -HA (Figure 16 p. 44) présente des bandes à 873 (B), 879 (A/B), 1416 (B) et 1451  $cm^{-1}$  (A/B) et des épaulements à 1469 (B) et 1499  $cm^{-1}$  (B) spécifiques des groupements  $CO_3$  dans la structure apatitique (Tableau 8 p. 44). La spectrométrie infrarouge permet d'affirmer que, lors de la précipitation, les carbonates sont intégrés uniquement dans la structure en site B, puisqu'aucune des bandes attribuées spécifiquement au  $CO_3$  de type A n'est observée (e.g. 670, 757 et 1540  $cm^{-1}$ ). De plus, aucune autre phase n'a pu être détectée tel que le carbonate de calcium (712  $cm^{-1}$  [Lafon, 2004]).

Des bandes liées aux carbonates sont aussi visibles dans les poudres brutes des autres composés de référence comme en témoigne la Figure 17 (p. 45).

La valeur de l'aire intégrée de la bande d'absorption centrée vers 1416  $cm^{-1}$  indique que la teneur en carbonate présente dans HA ( $A_{1416\_HA} = 0,94$  u.a.) et  $Si_{0,5}$ -HA ( $A_{1416\_Si_{0,5}\text{-}HA} = 2,04$  u.a.) est moindre que celle observée dans  $C_{0,5}$ -HA ( $A_{1416\_C_{0,5}\text{-}HA} = 4,97$  u.a.). HA et  $Si_{0,5}$ -HA présentent ainsi une légère carbonatation en site B après précipitation. La carbonatation des poudres HA et  $Si_{0,5}$ -HA durant le procédé de synthèse s'explique par

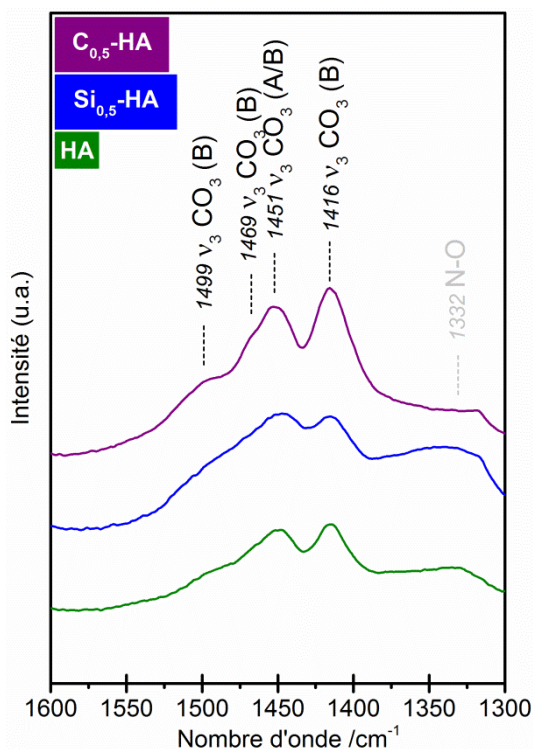
la forte concentration de  $CO_2$  atmosphérique dissous dans la solution d'ammoniaque. Malgré les précautions mises en œuvre tel que le balayage à l'argon, la carbonatation du milieu réactionnel via la solution ammoniacale reste inévitable. Toutefois ses conséquences sur la composition finale des poudres restent très limitées (e.g. 0,13 % massique en C pour  $Si_{0,5}$ -HA).



**Figure 16** : Spectre IR de la poudre de référence  $C_{0,5}$ -HA calcinée à  $400^\circ C$  pendant 2 h (poudre brute) - domaines  $CO_3$ .

**Tableau 8** : Bandes d'absorption infrarouge caractéristiques des groupements carbonates dans une  $C_{A/B}$ -HA [Lafon, 2004; Heughebaert, 1977a; Rey, 1989; Rey, 1991; Fleet, 2009; Legeros, 1969; Antonakos, 2007].

Nombres d'onde $cm^{-1}$	Attribution	Mode
1540	$CO_3$ en site A	$v_3$
1499	$CO_3$ en site B	$v_3$
1465	$CO_3$ en site B	$v_3$
1455	$CO_3$ en site A et B	$v_3$
1410	$CO_3$ en site B	$v_3$
879	$CO_3$ en site A et B	$v_2$
873	$CO_3$ en site B	$v_2$
757	$CO_3$ en site A	$v_2$
670	$CO_3$ en site A	$v_4$



**Figure 17** : Spectres IR des poudres de référence HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ -HA calcinées à 400°C pendant 2 h (poudre brute) - domaine  $\nu_3$   $CO_3$ .

En résumé, au cours de la synthèse par précipitation, les ions silicates et carbonates, respectivement pour  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ -HA, sont bien incorporés dans la structure apatitique en substitution de groupements phosphates.

## II.2.2. Evolution des phases après calcination

Structurellement, l'influence de l'incorporation au cours de la précipitation des ions silicates et carbonates en substitution de groupements phosphates ne peut être clairement évaluée sur des échantillons faiblement cristallin. Afin d'augmenter leur cristallinité, les poudres sont calcinées à haute température (*i.e.* 1000°C). Pour réaliser ces traitements thermiques, deux atmosphères sont étudiées et comparées : air et dioxyde de carbone (cf. II.1.1.4 p. 37). L'évolution des phases des composés de références HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ -HA, est ici analysée. Enfin, l'impact de l'incorporation des groupements silicates et carbonates sur la structure apatitique est étudiée.

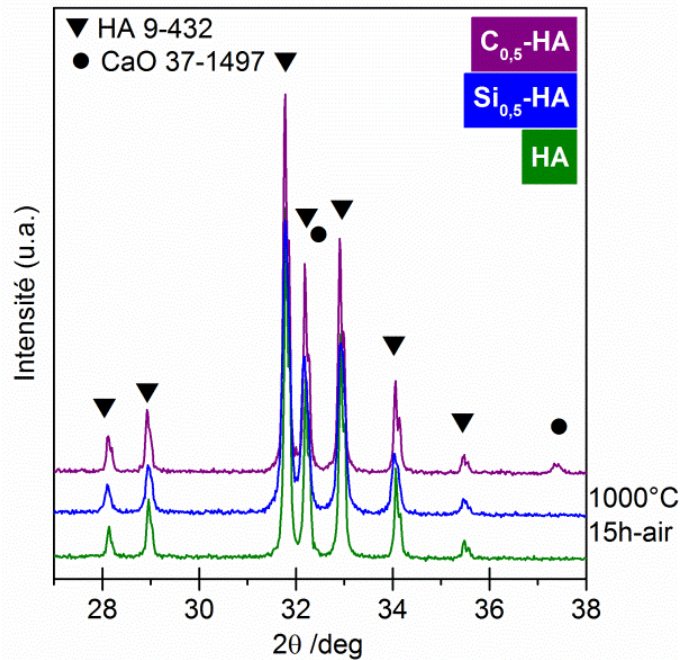
### II.2.2.1. Analyses structurales

- *Echantillons calcinés sous air (1000°C - 15 h)*

Les diagrammes de diffraction des rayons X des poudres de référence HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ -HA après calcination à 1000°C pendant 15h sous air sont présentés sur la Figure 18 (p. 46).

Au premier abord, les pics de diffraction sont plus intenses et plus fins que ceux observés sur les diffractogrammes des poudres brutes (Figure 13 p. 40), confirmant la cristallisation des poudres. Les diffractogrammes des composés HA et  $Si_{0,5}$ -HA sont caractéristiques d'une phase apatitique monocristalline (HA - PDF n°9-432). Dans le cas de la poudre  $C_{0,5}$ -HA, les raies propres à la chaux (CaO - PDF n°37-1497) sont observables en plus de celles de l'HA (*e.g.*  $2\theta = 37,35^\circ$ ). L'apparition de CaO après traitement sous air est caractéristique de la décomposition de l'apatite carbonatée [Lafon, 2003]. Ce phénomène sera détaillé ultérieurement (II.2.2.2 p. 48).

Le seuil de détection de l'analyse DRX étant relativement élevé (0,5 % en masse pour la phase CaO dans HA [Raynaud, 2001]), un test phénolphtaléine est réalisé sur les poudres calcinées afin de s'assurer de l'absence de chaux. Alors que le composé  $C_{0,5}$ -HA traité sous air provoque logiquement une coloration rose de la solution de phénolphtaléine, le test est négatif pour les autres composés de référence (*i.e.* HA et  $Si_{0,5}$ -HA). Ces derniers ne contiennent donc pas de chaux. Il est à noter qu'aucune autre phase cristalline n'est détectée sur les diffractogrammes.



**Figure 18** : Diffractogrammes des poudres de référence HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ -HA calcinées sous air à 1000°C pendant 15 h.

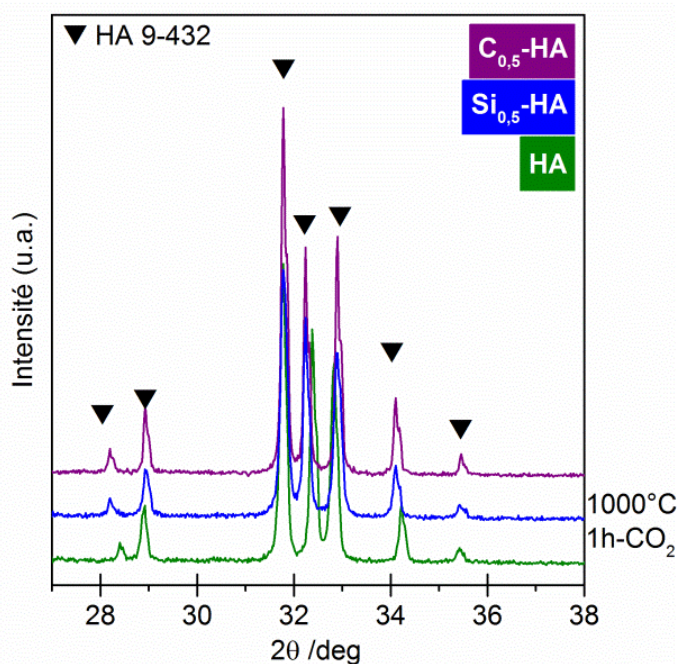
• *Echantillons calcinés sous  $CO_2$  (1000°C - 1 h)*

Les diagrammes de diffraction des rayons X des poudres de références HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ -HA après calcination à 1000°C pendant 1h sous  $CO_2$  sont présentés sur la Figure 19 (p. 47). Les raies de diffraction apparaissent intenses et étroites, ce qui est caractéristique des poudres cristallisées. Pour les trois compositions, le profil correspond à celui d'une structure apatitique (HA : PDF n°9-432). Aucune autre phase

crystalline n'est détectée par DRX. Les tests à la phénolphtaléine réalisés sur chacune des poudres calcinées sous  $CO_2$ , et traités à  $550^\circ C$  sous air selon le protocole établi (cf. II.1.2.1 p. 37), sont négatifs.

Ni le TCP, ni la silicocarnotite, qui sont connus pour être des produits de décomposition thermique de  $Si_{0,5}$ -HA [Palard, 2008; Kim, 2003], ne sont détectés. Contrairement à la calcination sous air, la poudre  $C_{0,5}$ -HA calcinée sous  $CO_2$  ne contient pas de CaO. Comme suggéré par la littérature [Lafon, 2003], le dioxyde de carbone utilisé comme atmosphère de calcination stabilise les carbonates au sein de la structure apatitique des  $C_{0,5}$ -HA à plus haute température que sous air.

Il est à noter également l'existence d'un décalage en  $2\theta$  pour certains pics de diffraction des composés  $C_{0,5}$ -HA et  $Si_{0,5}$ -HA par rapport à ceux de l'HA. Ainsi, l'écart angulaire entre les deux pics situés dans la zone  $28^\circ$ - $29^\circ$  apparaît plus étroit dans le cas de la poudre d'HA que pour les deux autres composés également traités sous  $CO_2$ . Ces variations angulaires sont synonymes d'une modification de la distance entre deux plans de diffraction vraisemblablement due à la présence des carbonates et/ou des silicates dans la maille d'HA.



**Figure 19 :** Diffractogrammes des poudres de référence HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ -HA calcinées sous  $CO_2$  à  $1000^\circ C$  pendant 1 h.

Afin d'étudier plus en détails ces modifications structurales, une analyse de l'évolution des paramètres de maille est réalisée. Cette dernière doit être conduite sur des composés purs. Aussi, afin de garantir la pureté des composés (absence de phase secondaire amorphe), une analyse préalable par spectrométrie infrarouge est menée.

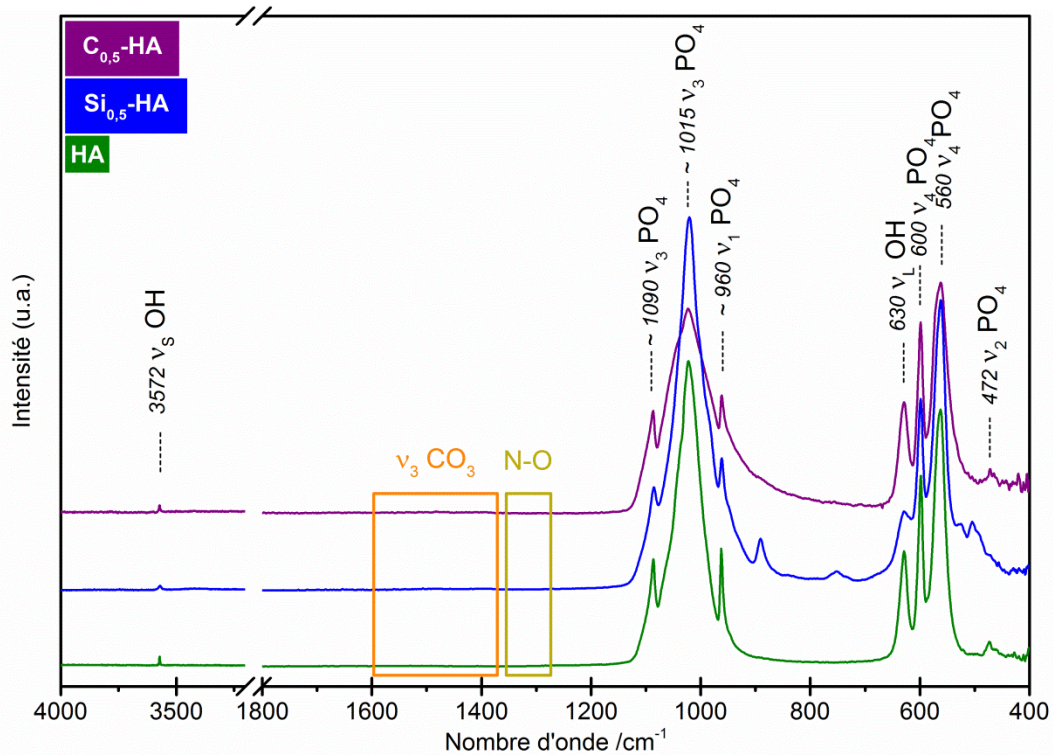


### II.2.2.2. Spectroscopie InfraRouge

La Figure 20 (p. 48) présente les spectres d'absorption infrarouges des poudres de référence HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ -HA réalisés après calcination à 1000°C pendant 15 heures sous air.

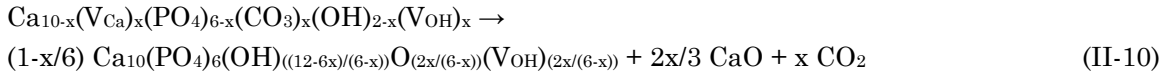
L'ensemble des spectres infrarouges des poudres calcinées révèle les bandes d'absorption caractéristiques des groupements phosphates (472, 560, 600, ~960, ~1015 et ~1090  $cm^{-1}$ ) et hydroxyles (630 et 3572  $cm^{-1}$ ) d'une hydroxyapatite phosphocalcique.

Comme attendu les vibrations associées aux groupements  $NO_3$  (résidus nitrés) ont disparus après le traitement thermique. De même, les bandes d'absorption spécifiques aux carbonates initialement présentes sur les spectres des poudres brutes (Figure 17 p. 45) sont absentes après calcination sous air à 1000°C (Figure 20 p. 48).



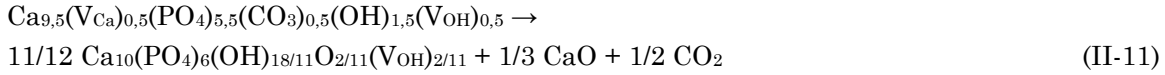
**Figure 20** : Spectres IR des poudres de référence HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ -HA calcinées sous air à 1000°C pendant 15 h.

Dans le cas de la poudre  $C_{0,5}$ -HA, en plus de la disparition des bandes d'absorption spécifiques aux carbonates en spectroscopie infrarouge, une seconde phase cristalline (CaO) est détectée par DRX (Figure 18 p. 46). Le composé carbonaté se décompose lors du traitement thermique sous air à 1000°C. Ce phénomène, déjà mis en évidence lors d'études antérieures [Labarthe, 1973; Lafon, 2003; Lafon, 2004], correspond à la décarbonatation des sites B de l'hydroxyapatite, conduisant à la formation de chaux. La réaction générale de décomposition est décrite selon l'Eq. II-10 (p. 49) suivante :



avec ( $0 \leq x \leq 2$ )

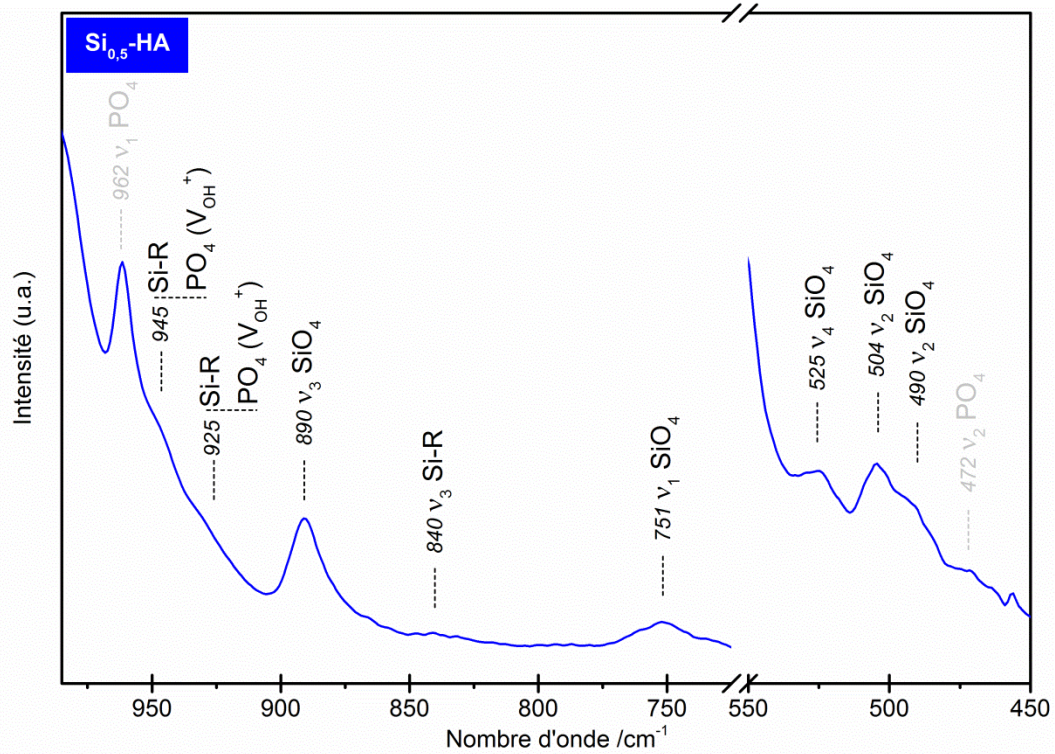
Plus spécifiquement, la réaction de décomposition sous air devient pour C<sub>0,5</sub>-HA (Eq. II-11 p. 49):



Par rapport à HA et C<sub>0,5</sub>-HA, seule la poudre Si<sub>0,5</sub>-HA présente des bandes d'absorption supplémentaires après calcination sous air à 1000°C pendant 15 heures. La Figure 21 (p. 50) détaille ces vibrations caractéristiques de la présence de silicates dans la maille d'HA. Les bandes d'absorption observées dans la poudre brute (Figure 15 p. 42) sont ici retrouvées : à 490, 504, 525, 751 et 890 cm<sup>-1</sup> pour les bandes spécifiques du groupement SiO<sub>4</sub> dans la structure apatitique, ainsi qu'à 925 et 945 cm<sup>-1</sup> pour les épaulements attribués aux liaisons Si-R de surface, où R correspond au groupement OH. Pour rappel, la vibration à 945 cm<sup>-1</sup> est également liée aux groupements phosphates situés à proximité de lacunes en site hydroxyde. Une vibration supplémentaire, de faible intensité, attribuée à une liaison Si-R (avec R = OH) apparaît à 840 cm<sup>-1</sup> [Marchat, 2013b]. D'une manière générale, l'intensité des bandes relatives au silicium (Tableau 9 p. 49) est plus importante après calcination sous air du fait de l'augmentation de l'ordre local dans la structure. Le spectre de la poudre Si<sub>0,5</sub>-HA calcinée sous air ne présente pas d'autre vibration susceptible d'être associée à une phase secondaire (*e.g.* SiO<sub>2</sub>). La poudre Si<sub>0,5</sub>-HA calcinée sous air à 1000°C pendant 15 h est donc monophasique. La spectrométrie infrarouge permet d'affirmer que le silicium est intégré exclusivement dans la structure apatitique après traitement thermique à 1000°C sous air.

**Tableau 9** : Aires intégrées des bandes d'absorption  $\nu_1$  et  $\nu_3$  du groupement SiO<sub>4</sub> du composé de référence Si<sub>0,5</sub>-HA après traitement thermique (i) à 400°C pendant 2 h sous air, (ii) à 1000°C pendant 15 h sous air, (iii) et à 1000°C pendant 1 h sous CO<sub>2</sub>.

	Traitement Thermique	Aire Intégrée (u.a.) $\nu_1 \text{ SiO}_4 \sim 751 \text{ cm}^{-1}$	Aire Intégrée (u.a.) $\nu_3 \text{ SiO}_4 \sim 890 \text{ cm}^{-1}$
<b>Si<sub>0,5</sub>-HA</b>	400°C - 2h - air	0,43	1,25
	1000°C - 15h - air	1,10	4,35
	1000°C - 1h - CO <sub>2</sub>	0,10	2,50

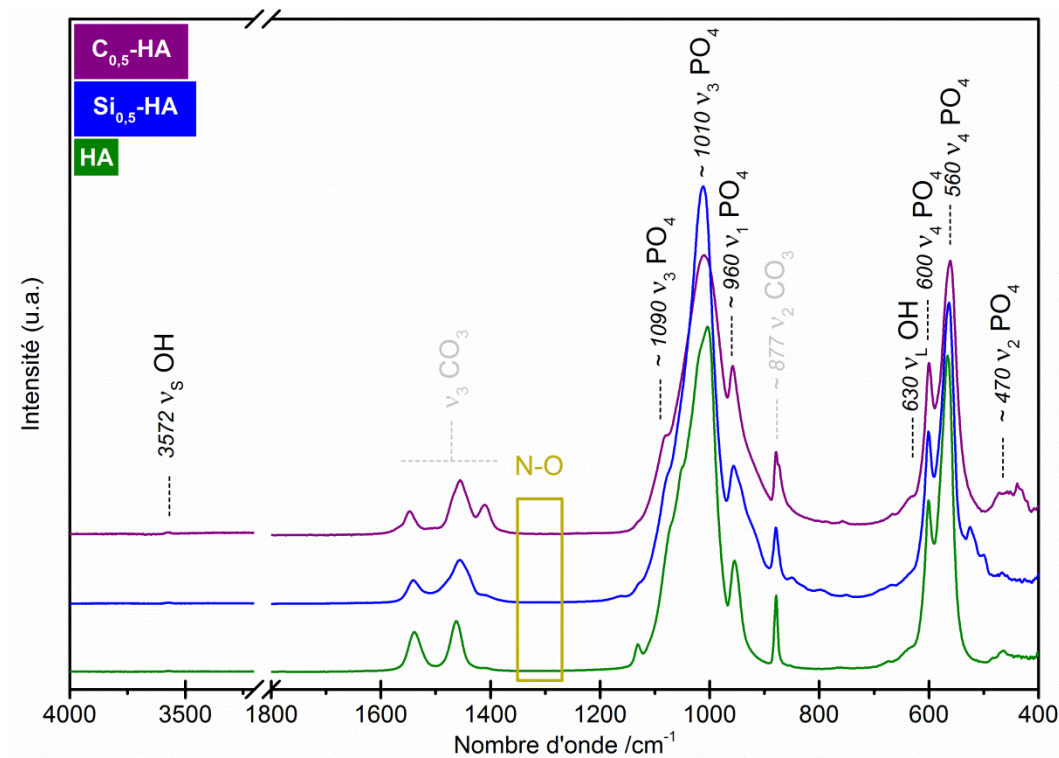


**Figure 21** : Spectre IR de la poudre de référence  $Si_{0,5}$ -HA calcinée sous air à  $1000^{\circ}C$  pendant 15 h - domaines  $SiO_4$ .

La Figure 22 (p. 51) présente les spectres infrarouges des poudres de référence HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ -HA réalisés après calcination à  $1000^{\circ}C$  pendant 1 heure sous  $CO_2$ . Ici encore, tous les composés présentent les bandes spécifiques aux groupements phosphates et hydroxyles d'une hydroxyapatite phosphocalcique. Toutefois, les intensités des bandes spécifiques aux groupements OH, à  $630$  et  $3572$   $cm^{-1}$ , sont faibles comparées à celles des spectres obtenus après calcination à  $1000^{\circ}C$  sous air (Figure 20 p. 48 et Tableau 10 p. 51).

Les profils des spectres infrarouges des poudres calcinées sous  $CO_2$  à haute température ne présentent plus les vibrations associées au groupement  $NO_3$ . Comme déjà observés après la calcination sous air à  $1000^{\circ}C$  (Figure 20 p. 48), les résidus de synthèse nitrés sont éliminés par le traitement thermique.

Dans le cas du composé  $C_{0,5}$ -HA après calcination sous  $CO_2$ , les vibrations des groupements carbonates sont identifiées et détaillées sur la Figure 23 (p. 52) : à  $666$   $cm^{-1}$  (A),  $757$   $cm^{-1}$  (A),  $873$   $cm^{-1}$  (B),  $879$   $cm^{-1}$  (A/B),  $1411$   $cm^{-1}$  (B),  $1455$   $cm^{-1}$  (A/B),  $1465$   $cm^{-1}$  (B),  $1502$   $cm^{-1}$  (B) et  $1547$   $cm^{-1}$  (A). Aucune bande liée à une autre espèce n'est détectée. La poudre cristalline  $C_{0,5}$ -HA calcinée sous  $CO_2$  est monophasique.



**Figure 22 :** Spectres IR des poudres de référence HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ -HA calcinées sous  $CO_2$  à  $1000^\circ C$  pendant 1 h.

**Tableau 10 :** Aires intégrées des bandes d'absorption  $\nu_s$  et  $\nu_L$  du groupement OH des composés de référence après traitement thermique (i) à  $400^\circ C$  pendant 2 h sous air, (ii) à  $1000^\circ C$  pendant 15 h sous air, (iii) et à  $1000^\circ C$  pendant 1 h sous  $CO_2$ .

	Traitement Thermique	Aire Intégrée (u.a.) $\nu_s$ OH $\sim 3570\text{ cm}^{-1}$	Aire Intégrée (u.a.) $\nu_L$ OH $\sim 630\text{ cm}^{-1}$
HA	$400^\circ C$ - 2h - air	0,31	5,31
	$1000^\circ C$ - 15h - air	0,36	8,10
	$1000^\circ C$ - 1h - $CO_2$	0,13	1,40
$C_{0,5}$ -HA	$400^\circ C$ - 2h - air	0,41	5,43
	$1000^\circ C$ - 15h - air	0,48	9,72
	$1000^\circ C$ - 1h - $CO_2$	0,25	3,29
$Si_{0,5}$ -HA	$400^\circ C$ - 2h - air	0,32	6,09
	$1000^\circ C$ - 15h - air	0,47	7,34
	$1000^\circ C$ - 1h - $CO_2$	0,18	2,46

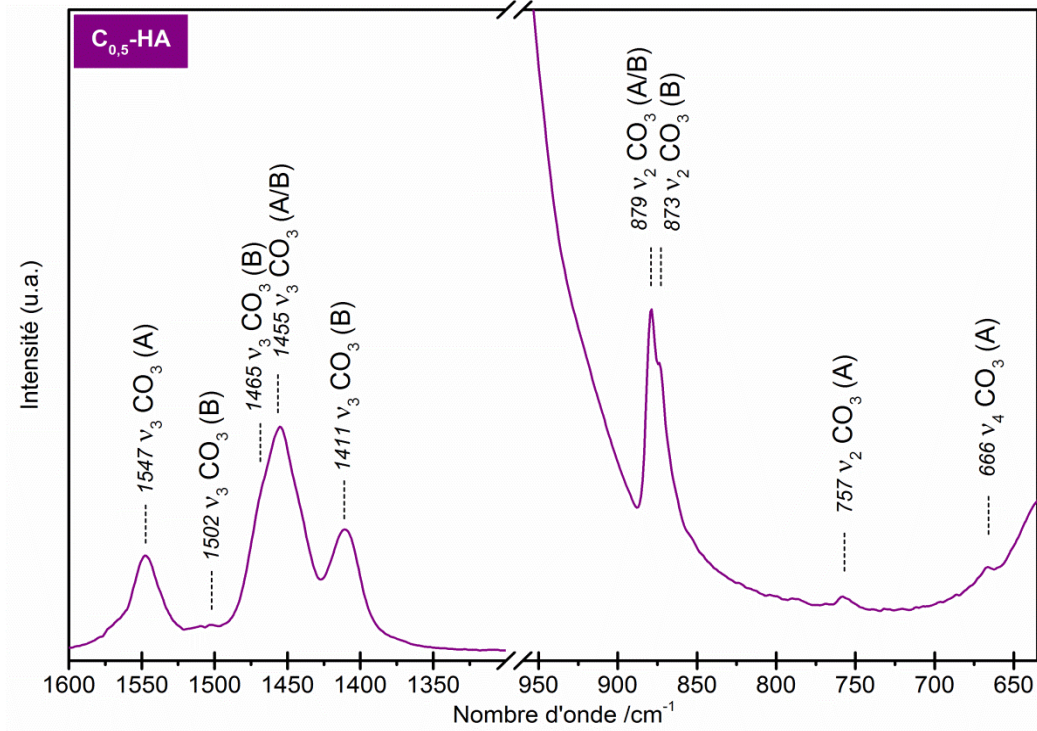


Figure 23 : Spectre IR de la poudre de référence  $C_{0,5}$ -HA calcinée sous  $CO_2$  à 1000°C pendant 1 h - domaines  $CO_3$ .

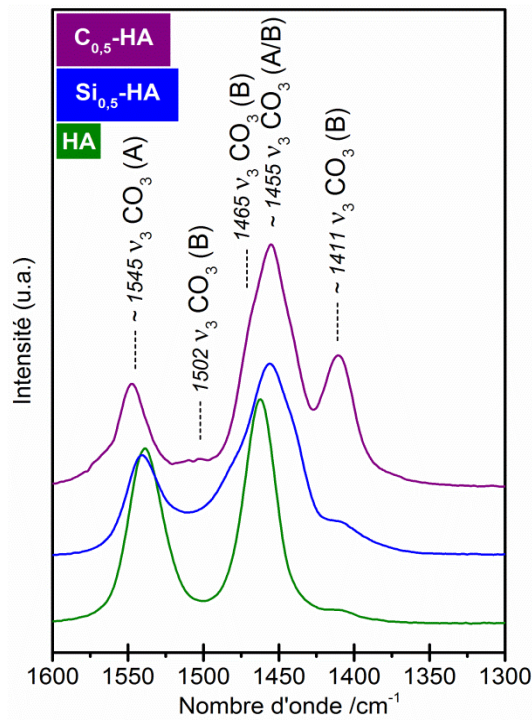


Figure 24 : Spectres IR des poudres de référence HA,  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ -HA calcinées sous  $CO_2$  à 1000°C pendant 1 h - domaine  $\nu_3$   $CO_3$ .

Les bandes d'absorption spécifiques aux groupements carbonates sont également observables sur les spectres infrarouges des deux autres composés de référence après calcination sous CO<sub>2</sub>. La Figure 24 (p. 52) détaille le domaine  $\nu_3$  de vibrations des CO<sub>3</sub> pour les poudres HA, Si<sub>0,5</sub>-HA et C<sub>0,5</sub>-HA calcinées sous CO<sub>2</sub>. Les bandes d'absorption spécifiques aux carbonates de type B (e.g.  $\sim 1411 \text{ cm}^{-1}$ ) sont présentes pour chacune des compositions. Toutefois, comme observé avant calcination (Figure 17 p. 45), elles apparaissent plus intensément dans le cas de la poudre C<sub>0,5</sub>-HA ( $A_{1411_{\text{C}_{0,5}\text{-HA}}} = 5,19 \text{ u.a.}$ ) que pour les poudres HA ( $A_{1411_{\text{HA}}} = 0,66 \text{ u.a.}$ ) et Si<sub>0,5</sub>-HA ( $A_{1411_{\text{Si}_{0,5}\text{-HA}}} = 1,92 \text{ u.a.}$ ), et leurs proportions semblent conservées (Tableau 11 p. 53). Le taux de carbonatation en site B n'est ainsi dû qu'aux substitutions intervenant au cours de la précipitation.

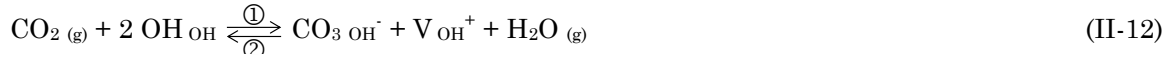
Les bandes d'absorption caractéristiques des carbonates de type A, c'est-à-dire positionnés en site hydroxyde, sont observables sur les profils des spectres infrarouges des trois composés calcinés sous CO<sub>2</sub>. Leurs intensités intégrées sont plus fortes pour HA que pour Si<sub>0,5</sub>-HA et C<sub>0,5</sub>-HA comme en témoignent les valeurs calculées pour la bande d'absorption centrée vers  $1545 \text{ cm}^{-1}$  :  $A_{1545_{\text{HA}}} = 5,56 \text{ u.a.} > A_{1545_{\text{Si}_{0,5}\text{-HA}}} = 3,43 \text{ u.a.} > A_{1545_{\text{C}_{0,5}\text{-HA}}} = 2,60 \text{ u.a.}$  (Tableau 11 p. 53).

**Tableau 11** : Aires intégrées des bandes d'absorption  $\nu_3$  des groupements CO<sub>3</sub> des composés de référence après traitement thermique (i) à 400°C pendant 2 h sous air, (ii) et à 1000°C pendant 1 h sous CO<sub>2</sub>.

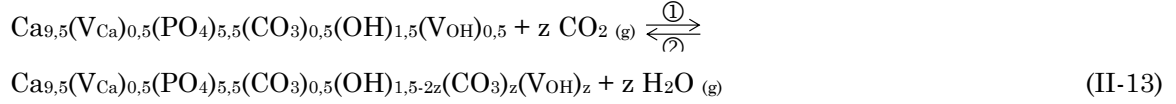
	Traitement Thermique	Aire Intégrée (u.a.) $\nu_3 \text{ CO}_3 \text{ (B)}_{\sim 1411 \text{ cm}^{-1}}$	Aire Intégrée (u.a.) $\nu_3 \text{ CO}_3 \text{ (A)}_{\sim 1545 \text{ cm}^{-1}}$
HA	400°C - 2h - air	0,94	0,18
	1000°C - 1h - CO <sub>2</sub>	0,66	5,56
C <sub>0,5</sub> -HA	400°C - 2h - air	4,97	0,35
	1000°C - 1h - CO <sub>2</sub>	5,19	2,60
Si <sub>0,5</sub> -HA	400°C - 2h - air	2,04	0,13
	1000°C - 1h - CO <sub>2</sub>	1,92	3,43

Ainsi, contrairement à la calcination sous air, le traitement thermique sous CO<sub>2</sub> maintient dans la structure les carbonates de type B incorporés au cours de la synthèse, et ce sans modification notable de leur concentration, et enrichit en parallèle les hydroxyapatites en carbonate de type A.

La carbonatation en site A correspond à la substitution d'ions hydroxydes par des ions carbonates avec la création de lacunes dans la maille apatitique. L'enrichissement de la structure apatitique en carbonate de type A est à corrélérer avec la diminution des intensités des bandes d'absorption spécifiques aux groupements hydroxydes (Tableau 10 p. 51). L'équilibre de carbonatation en site A peut s'écrire selon l'Eq. II-12 (p. 54), où les charges effectives de structure sont représentées [Lafon, 2004]:



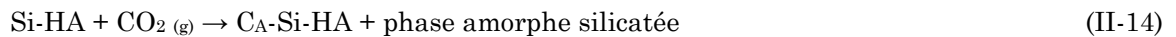
Dans le cas du composé  $C_{0,5}\text{-HA}$ , la formule de carbonatation des sites hydroxydes devient la suivante (Eq. II-13 p. 54):



avec ( $0 \leq z \leq 0,75$ )

Plus le nombre de groupements OH initialement présents dans la maille est important, plus la quantité (z) de  $\text{CO}_3$  incorporable est grande. Or, dans les composés  $C_{0,5}\text{-HA}$  et  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$ , la substitution des ions phosphates par des ions carbonates ou silicates engendre des lacunes dans les sites OH en raison de l'équilibre électronique (cf. Eq. II-2 et II-3 p. 35). Ceci expliquerait que la contribution en spectroscopie IR des bandes d'absorption caractéristiques des  $\text{CO}_3$  en site A est plus importante pour HA que pour  $C_{0,5}\text{-HA}$  et  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  (cf. Tableau 11 p. 53).

La Figure 25 (p. 55) détaille le profil du spectre infrarouge de la poudre  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  après calcination sous  $\text{CO}_2$  pour les domaines de vibration des groupements  $\text{SiO}_4$ . Certaines bandes spécifiques aux groupements  $\text{SiO}_4$  dans HA, et déjà observées sur le spectre de la poudre brute (Figure 15 p. 42), sont à nouveau détectées après calcination sous  $\text{CO}_2$  ( $1000^\circ\text{C}$ ) : parmi elles les bandes à  $524$  et  $890 \text{ cm}^{-1}$ . A noter toutefois que seule la déconvolution du spectre, présenté Figure 26 (p. 55), permet de faire apparaître clairement l'existence de la vibration à  $890 \text{ cm}^{-1}$ . L'aire intégrée de cette bande d'absorption augmente après la calcination sous  $\text{CO}_2$ , mais est moins intense qu'après la calcination sous air à la même température de  $1000^\circ\text{C}$  ( $A_{890_{\text{Si}_{0,5}\text{-HA}_{\text{brute}}}} = 1,25 \text{ u.a.} < A_{890_{\text{Si}_{0,5}\text{-HA}_{\text{CO}_2}}}} = 2,50 \text{ u.a.} < A_{890_{\text{Si}_{0,5}\text{-HA}_{\text{air}}}} = 4,35 \text{ u.a.}$  - Tableau 9 p. 49). En outre, les autres bandes d'absorption liées aux silicates dans l'HA à  $490$ ,  $504$  et  $751 \text{ cm}^{-1}$ , visibles après traitement thermique sous air (Figure 21 p. 50), sont peu détectables après calcination sous  $\text{CO}_2$ . En parallèle, d'autres bandes et épaulements, spécifiques d'espèces silicatées amorphe (e.g.  $\text{SiO}_2$ ), apparaissent :  $500$ ,  $516$ ,  $537$  et  $800 \text{ cm}^{-1}$ . Il semble ainsi que le  $\text{CO}_2$ , utilisé comme atmosphère de calcination, engendre une décomposition de l'hydroxyapatite silicatée. La réaction peut être décrite comme suit (Eq. II-14) :



où  $\text{C}_A\text{-Si-HA}$  représente une phase cristalline d'hydroxyapatite silicatée en site B et carbonatée en site A. Ainsi, après calcination de la poudre  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  à  $1000^\circ\text{C}$  sous  $\text{CO}_2$ , une phase amorphe silicatée et une phase cristalline d'hydroxyapatite silicatée en site B et carbonatée en site A apparaissent ( $\text{C}_A\text{-Si-HA}$ ).

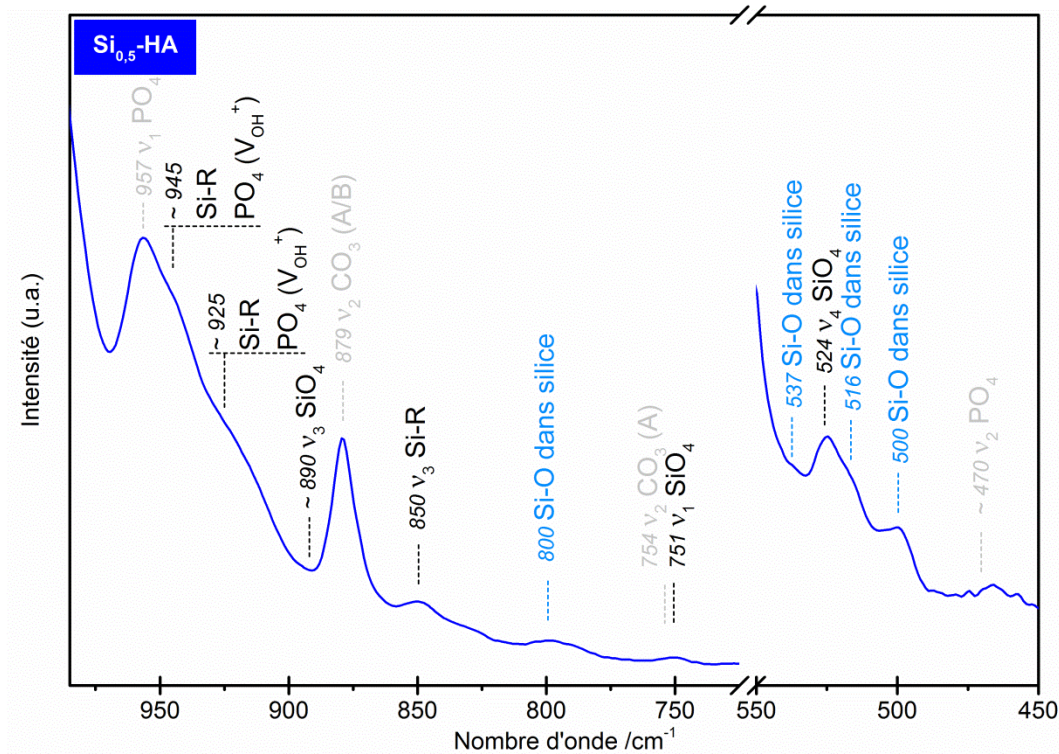


Figure 25 : Spectre IR de la poudre de référence  $Si_{0.5}$ -HA calcinée sous  $CO_2$  à  $1000^\circ C$  pendant 1 h - domaines  $SiO_4$ .

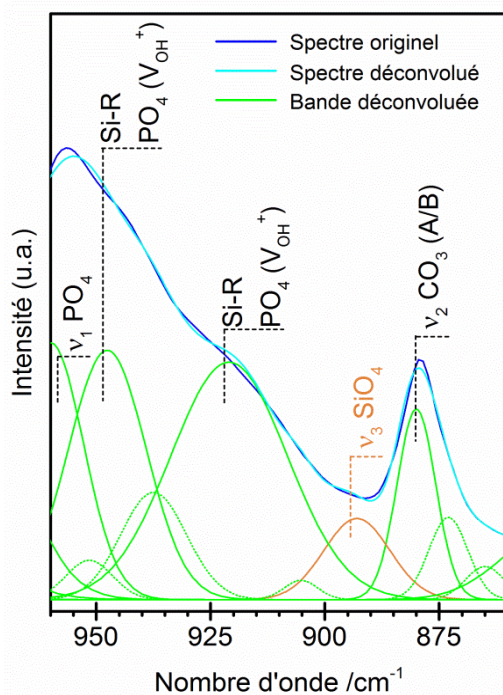
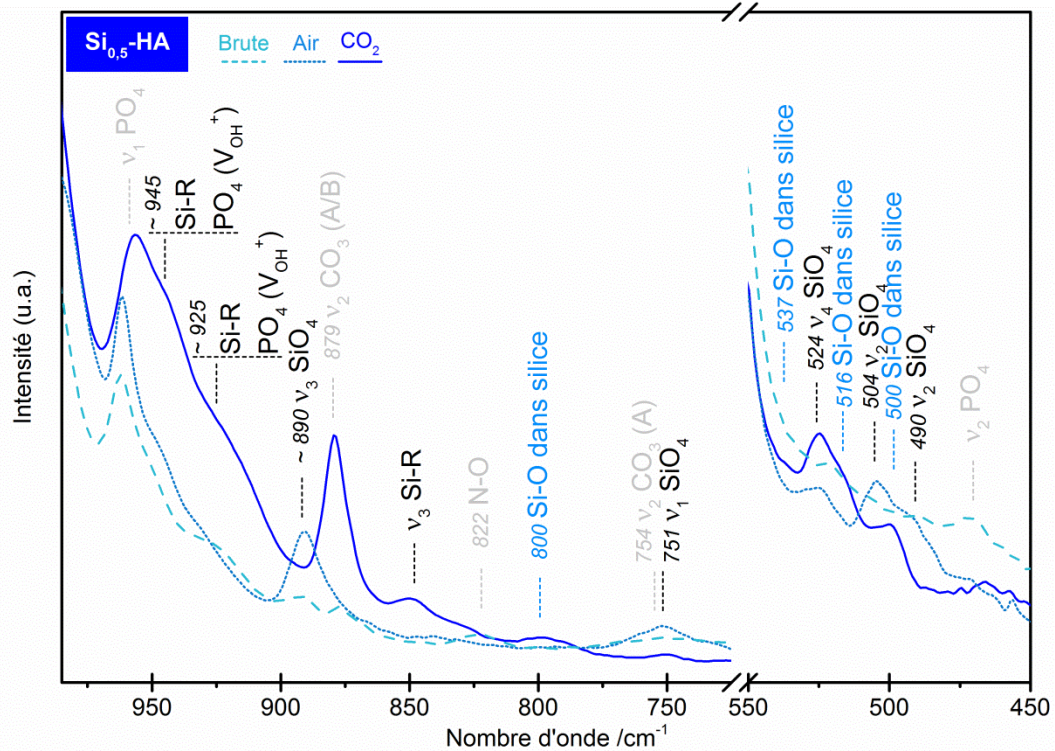


Figure 26 : Déconvolution du spectre IR de la poudre de référence  $Si_{0.5}$ -HA calcinée sous  $CO_2$  à  $1000^\circ C$  pendant 1 h centré sur de la bande d'absorption  $\nu_3 SiO_4$  à  $891 cm^{-1}$ .



La superposition des spectres infrarouges des poudres  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  brute et calcinées sous air et sous  $\text{CO}_2$  à  $1000^\circ\text{C}$  (Figure 27 p. 56), permet également de mettre en évidence une différence sensible des intensités des épaulement centrés vers  $925$  et  $945\text{ cm}^{-1}$ . Pour rappel, ils sont caractéristiques des liaisons Si-R de surface et des groupements  $\text{PO}_4$  à proximité de lacune en site hydroxyde ( $\text{V}_{\text{OH}^+}$ ) [Marchat, 2013b]. L'augmentation de leur intensité après calcination sous  $\text{CO}_2$  témoigne d'un changement de l'environnement des groupements  $\text{PO}_4$  au sein de la maille  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  mais également au niveau des groupements de surface. Ce premier phénomène est à corrélérer avec l'augmentation du nombre de lacunes  $\text{V}_{\text{OH}^+}$  selon la réaction de carbonatation des sites A proposée précédemment (Eq. II-12 p. 54).



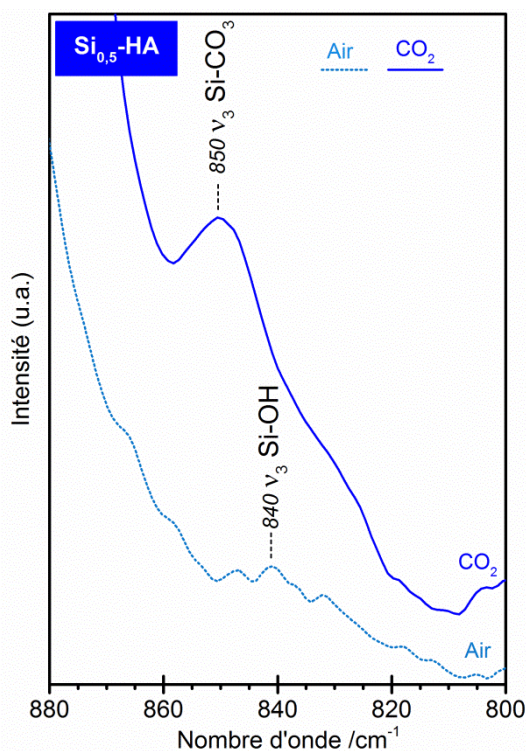
**Figure 27 :** Spectres IR de la poudre de référence  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  réalisés avant calcination (tirets), après calcination sous air à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 15 h (en pointillés), et sous  $\text{CO}_2$  à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 1 h (en ligne continue) - domaines  $\text{SiO}_4$ .

En ce qui concerne les groupements de surface, une analyse plus fine des spectres infrarouges de la poudre  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  après calcination sous air et sous  $\text{CO}_2$  (Figure 28 p. 57) indique, en plus des composantes à  $945$  et  $925\text{ cm}^{-1}$  liées aux groupements de surface Si-R, l'apparition d'une nouvelle vibration centrée vers  $850\text{ cm}^{-1}$ , soit  $+10\text{ cm}^{-1}$  à côté de la bande liée à Si-R avec  $\text{R} = \text{OH}$  ( $840\text{ cm}^{-1}$  [Marchat, 2013b]). Deux hypothèses peuvent être émises quant à l'origine de la bande à  $850\text{ cm}^{-1}$  sous  $\text{CO}_2$  (absente sous air) :

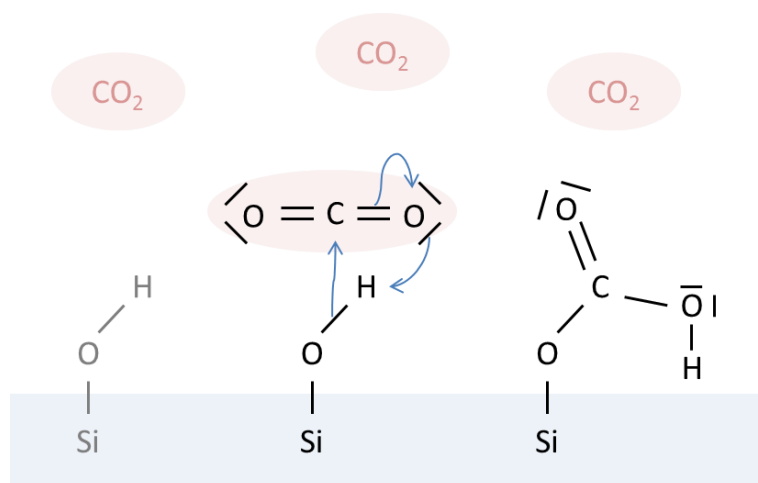
- Cette bande est liée à la présence de la phase secondaire silicatée amorphe apparue avec le traitement thermique sous  $\text{CO}_2$ . Cette hypothèse est possible à ce

moment-là de la lecture, elle sera réfutée avec la caractérisation des poudres C-Si-HA après calcination où le même phénomène se produit sans la présence d'une phase secondaire (cf. II.3.2.4 p. 79).

- Le groupement -R n'est plus le même. La liaison Si-(OH) après calcination sous air devient une liaison Si-(CO<sub>3</sub>) après calcination sous CO<sub>2</sub>, via une réaction d'échange solide/gaz à la surface des poudres. Un schéma réactionnel hypothétique est proposé sur la Figure 29 (p. 57).



**Figure 28** : Spectres IR de la poudre de référence  $Si_{0,5}$ -HA calcinée sous air à 1000°C pendant 15 h (en pointillés), et sous  $CO_2$  à 1000°C pendant 1 h (en ligne continue) - domaine Si-R.



**Figure 29** : Proposition de mécanisme d'adsorption des carbonates atmosphériques à la surface des apatites silicatées [Lavalley, 1996].

Enfin, la forte diminution (proche de « l'extinction ») des bandes d'absorption relatives aux groupements  $SiO_4$  à 490, 504, 751  $cm^{-1}$  sur le spectre infrarouge de la poudre  $Si_{0,5}$ -HA calcinée sous  $CO_2$  peut également s'expliquer de deux façons :

- Une partie des atomes de silicium présents dans l'hydroxyapatite silicatée pourraient être sortis de la maille apatitique afin de constituer la phase amorphe silicatée. Cependant, cette hypothèse est en contradiction avec la présence des autres vibrations spécifiques aux  $SiO_4$  dans la structure apatitique (e.g. 524 et 890  $cm^{-1}$ ). Cette hypothèse sera également désavouée avec la caractérisation des poudres C-Si-HA après calcination sous  $CO_2$  où le même phénomène de faible intensité de bande (e.g. 490 et 751  $cm^{-1}$ ) se produit sans l'apparition d'une phase secondaire silicatée (Figure 46 p. 75).
- La deuxième hypothèse est une modification des composantes vibrationnelles des groupements  $SiO_4$   $PO_4$  lorsque des groupements  $CO_3$   $OH$  sont dans leur environnement (modification des interactions locales). Ces modifications pourraient être liées à des interactions fortes entre ces groupements entraînant « l'extinction » de certaines vibrations.

Afin de comprendre les évolutions de structure, les paramètres de maille des différents composés de références traités sous air et/ou sous  $CO_2$  ont été calculés et sont présentés dans le paragraphe suivant (cf. II.2.2.3). Ces résultats permettront également d'expliquer la décomposition de la poudre  $Si_{0,5}$ -HA lors de la calcination sous  $CO_2$ .

### II.2.2.3. Evolution des paramètres de maille

L'étude de l'évolution des paramètres de maille a été réalisée sur les composés purs traités sous air et/ou sous  $CO_2$ . Le Tableau 12 (p. 59) regroupe les valeurs calculées de  $a$  et  $c$  ainsi que le volume de la maille. A titre de référence, ces valeurs sont comparées au standard de l'hydroxyapatite stœchiométrique (PDF-ICDD 9-432).

En raison de la présence de plusieurs phases cristallines dans la poudre  $C_{0,5}$ -HA après calcination sous air (présence de CaO en plus de l'HA), ses paramètres de maille n'ont pas été calculés. Après traitement thermique à 1000°C pendant 15 heures sous air, la poudre HA présente des valeurs de paramètres de maille comparables à celles de sa fiche PDF standard ( $\Delta_a = +0,002 \text{ \AA}$  ;  $\Delta_c = -0,001 \text{ \AA}$ ). Pour la poudre  $Si_{0,5}$ -HA, une expansion selon l'axe  $c$  est observée ( $\Delta_c = +0,014 \text{ \AA}$  soit +2,0%), tout comme une légère dilatation selon l'axe  $a$  ( $\Delta_a = +0,009 \text{ \AA}$  soit +1,0%). Ces valeurs sont similaires à celles rencontrées dans la littérature pour un même taux de substitution en silicate et calcinée selon les mêmes paramètres ( $\Delta_a = +0,010 \text{ \AA}$  et  $\Delta_c = +0,015 \text{ \AA}$  [Marchat, 2013b]).

Après traitement thermique à 1000°C pendant 1 heure sous  $CO_2$ , les poudres de HA et de  $C_{0,5}$ -HA sont monophasiques. Leurs paramètres de mailles sont présentés dans le Tableau 12 (p. 59). De même, les paramètres de maille de la poudre  $Si_{0,5}$ -HA calcinée

sous CO<sub>2</sub> ont été calculés (Tableau 12 p. 59) malgré la présence de phase amorphe (Figure 25 p. 55). En effet, contrairement à la poudre C<sub>0,5</sub>-HA calcinée sous air, cette phase secondaire est sous forme de traces. Les changements structuraux de la phase Si-HA, relatifs à la formation de cette phase secondaire, sont donc considérés comme négligeables en première approximation. Les résultats révèlent que, quelle que soit la composition, l'atmosphère de dioxyde de carbone cause une expansion selon l'axe *a* de la structure apatitique. Cet élargissement dépend de la composition de l'échantillon : HA ( $\Delta_a = +0,109 \text{ \AA}$  soit +11,6%) > Si<sub>0,5</sub>-HA ( $\Delta_a = +0,058 \text{ \AA}$  soit +6,2%) > C<sub>0,5</sub>-HA ( $\Delta_a = +0,036 \text{ \AA}$  soit +3,8%). Le paramètre *c* évolue différemment selon la nature de la substitution. Il diminue pour HA ( $\Delta_c = -0,014 \text{ \AA}$  soit -2,0%), augmente pour Si<sub>0,5</sub>-HA ( $\Delta_c = +0,017 \text{ \AA}$  soit +2,5%) et reste stable pour C<sub>0,5</sub>-HA ( $\Delta_c = +0,002 \text{ \AA}$  soit +0,2%). D'une manière générale, ces résultats sont en accord avec la littérature. En effet, une expansion selon l'axe *a* et une contraction selon l'axe *c* de la maille ont été reportées lors d'une carbonatation en site A d'une HA ou d'une C<sub>B</sub>-HA [Legeros, 1969; Zapanta-Legeros, 1965; Montel, 1981]. Dans ce cas l'accroissement du paramètre *a* est synonyme de l'élargissement des tunnels de type II de la structure apatitique (Figure 30 p. 60).

**Tableau 12** : Paramètres et volume de maille des poudres calcinées de référence - Evaluation par affinement de Le Bail (précision  $\pm 1 \times 10^{-4} \text{ \AA}$ )

Echantillons	Traitement thermique	Paramètres de maille / $\text{\AA}$				Volume de la maille / $\text{\AA}^3$
		axe <i>a</i>		axe <i>c</i>		
HA (PDF 9-432)	/	9,418		6,884		1057,6
Si <sub>0,5</sub> -HA*	1000°C-15h air	9,428	+0,010	6,899	+0,015	1062
HA	1000°C-15h air	9,420	+0,002	6,883	-0,001	1057,8
	1000°C-1h CO <sub>2</sub>	9,527	+0,109	6,870	-0,014	1080,0
Si <sub>0,5</sub> -HA	1000°C-15h air	9,427	+0,009	6,898	+0,014	1061,8
	1000°C-1h CO <sub>2</sub> **	9,476	+0,058	6,901	+0,017	1073,2
C <sub>0,5</sub> -HA	1000°C-15h air	N/A***		N/A***		N/A***
	1000°C-1h CO <sub>2</sub>	9,454	+0,036	6,886	+0,002	1066,0

\* [Marchat, 2013b]

\*\* présence d'une phase secondaire amorphe

\*\*\* multiphasique

Les groupements CO<sub>3</sub>, en substitution des groupements OH (site A), sont situés sur le même plan dans la structure ( $z = \frac{1}{4} - \frac{3}{4}$ ) que les tétraèdres des groupements PO<sub>4</sub> (site B). Dans le cas de la poudre C<sub>0,5</sub>-HA, la place générée par la substitution des PO<sub>4</sub> (tétraédrique) par des CO<sub>3</sub> (plan) moins volumineux, permet une intégration plus aisée dans la structure des CO<sub>3</sub> en site A. Ainsi, les effets sur la structure de la carbonatation en site A sont amoindris par la présence de groupements carbonates en substitution des groupements phosphates (site B) qui, selon la littérature [Zapanta-

Legeros, 1965; Legeros, 1969; Labarthe, 1973; Vignoles, 1988], accroît le paramètre  $c$  et réduit le paramètre  $a$ .

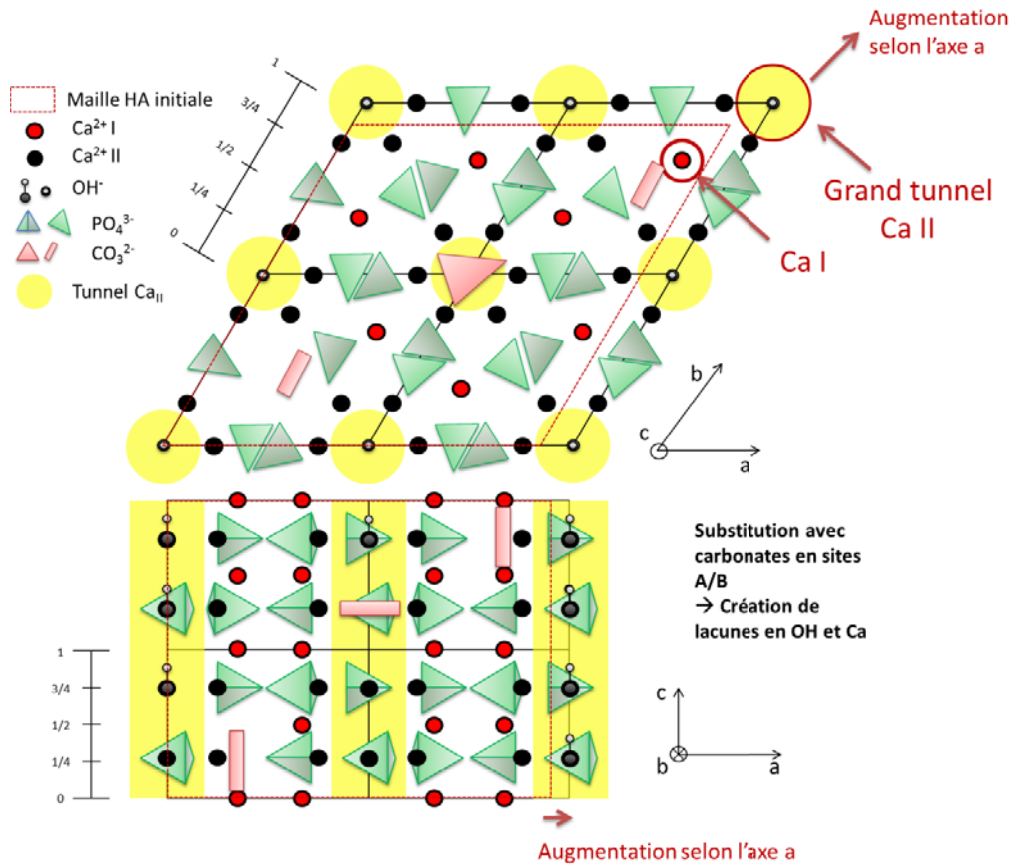


Figure 30 : Projection de la structure de  $C_{A/B}$ -HA sur les plans (001) et (010).

La présence de silicate en site B dans l'apatite agrandit principalement la maille selon l'axe  $c$  [Marchat, 2013b; Palard, 2008]. Dans le cas remarquable de la poudre  $Si_{0.5}$ -HA calcinée sous  $CO_2$ , l'élargissement des tunnels de type II, lié à l'incorporation de carbonate en site OH (confirmée par IR), engendre un fort accroissement du paramètre  $a$  ( $\Delta a_{(air/CO_2)} = +0,049 \text{ \AA}$  soit  $+5,0\%$ ) sans modification significative de la hauteur de la maille ( $\Delta c_{(air/CO_2)} = +0,003 \text{ \AA}$  soit  $+0,4\%$ ).

Deux hypothèses sont émises pour expliquer la déstabilisation de la structure de la poudre  $Si_{0.5}$ -HA lors de la calcination sous atmosphère  $CO_2$  :

- Les travaux de Heughebaert et Montel sur la cristallisation du phosphate de calcium ont déterminé que la structure apatitique apparait seulement si au moins 25% des sites OH dans les tunnels sont occupés [Heughebaert, 1977a; Heughebaert, 1977b]. Si en site A le taux d'occupation est inférieur à 0,5, soit  $V_{OH^+} > 1,5$ , alors la structure se décompose. Pour  $Si_{0.5}$ -HA, la quantité théorique de groupements hydroxydes initialement présents est égale à 1,5 (cf. Eq. II-3 p. 35). Selon le mécanisme de carbonatation en site A décrit par l'Eq. II-12 (p.54), une réaction totale de substitution de 1,5 OH engendrerait l'incorporation de 0,75  $CO_3$  en site A. Le taux d'occupation

dans les tunnels serait alors toujours supérieur à la limite de décomposition proposée. Cette première hypothèse sur l'origine de la décomposition de la structure de Si-HA n'est donc pas validée.

- La déformation de la structure apatitique est trop importante. Les liaisons Si-O (0,161 nm) étant plus longues que les liaisons P-O (0,155 nm), le volume des tétraèdres  $SiO_4$  est lui aussi plus important que celui des tétraèdres de phosphates  $PO_4$  [Palard, 2007]. D'après les résultats de ces travaux, l'incorporation lors de la synthèse des  $SiO_4$  en substitution des  $PO_4$  élargit la maille selon l'axe  $a$  (+1,0‰) et l'axe  $c$  (+2,0‰). Les  $CO_3$  en site A, introduits lors de la calcination, augmentent également le paramètre  $a$ . Les groupements  $CO_3$  en site A sont situés sur le même plan dans la structure ( $z = \frac{1}{4} - \frac{3}{4}$ ) que les tétraèdres des groupements  $PO_4$  et  $SiO_4$  en site B. La déformation totale de la structure semble trop importante et déstabilise la phase Si-HA. Une projection de la structure du composé  $C_A-Si-HA$  est présentée Figure 31 (p. 61). Une partie des atomes de silicium, jusqu'alors incorporée dans la structure, est chassée de la maille apatitique. La limite d'incorporation et donc de solubilité des carbonates de type A et de silicate dans la maille  $C_A-Si-HA$  semble dépassée. On observe un phénomène de démixtion. Une phase secondaire, amorphe et silicatée, est ainsi formée (cf. spectrométrie infrarouge Figure 25 p. 55).

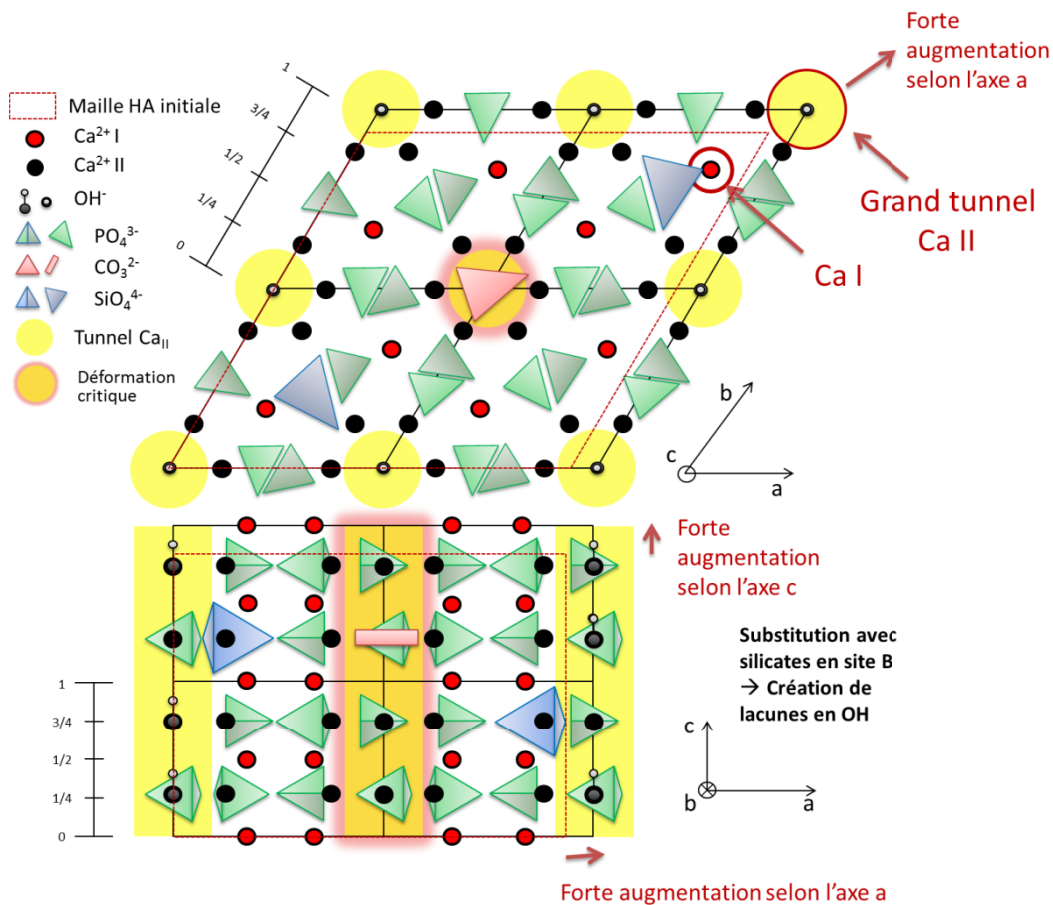


Figure 31 : Projection de la structure de  $C_A-Si-HA$  sur les plans (001) et (010).

### II.2.3. Conclusion partielle

L'incorporation dès la précipitation en voie aqueuse de carbonate et de silicate dans les composés respectivement de C-HA et de Si-HA est prouvée.

Nos études ont confirmé la stabilisation de  $C_B$ -HA par le dioxyde de carbone lors du traitement thermique à 1000°C [Lafon, 2004]. En revanche, cette atmosphère s'est avérée défavorable à la structure Si-HA avec la formation d'une phase secondaire silicatée amorphe détectée en analyse IR.

Des phénomènes structuraux sont observés en analyse IR où des interactions fortes (« extinctions » de bandes d'absorption) sont constatées entre  $SiO_4 PO_4^-$  et  $CO_3 OH^-$ .

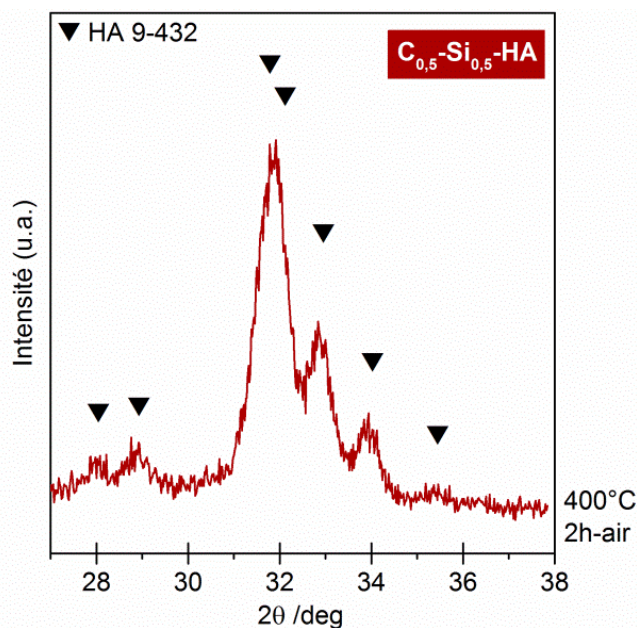
Comme attendu, l'incorporation dans la structure apatitique de groupement carbonate et silicate modifie les paramètres de la maille hexagonale  $P6_3/m$  de l'HA. Dans le cas particulier d'une  $C_A$ -Si-HA, la déformation de la structure devient critique et entraîne sa démixtion.

## II.3. Etude du composé : $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$

L'étude s'intéresse à présent au nouveau composé  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$ . Dans un premier temps, les caractérisations physico-chimiques permettront de vérifier l'incorporation des groupements carbonates et silicates dans l'apatite lors de la précipitation de la poudre. Dans un deuxième temps, l'influence de ces substitutions sur la structure cristalline de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  sera étudiée. Enfin, une formule chimique de la poudre calcinée sous  $CO_2$  sera proposée.

### II.3.1. Caractérisations physico-chimiques de la poudre brute $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$

Le diagramme de diffraction des rayons X de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinée à  $400^\circ C$  pendant 2 heures sous air (poudre brute) est présenté sur la Figure 32 (p. 63). Le profil est caractéristique d'une phase apatitique (PDF n°9-432). Aucune phase secondaire cristalline n'est détectée. Les pics de diffraction sont larges ce qui révèle une faible cristallinité des poudres et/ou la petite taille des cristallites.



**Figure 32** : Diffractogramme de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinée à  $400^\circ C$  pendant 2 h sous air (poudre brute).

Le spectre infrarouge de la poudre brute  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  (Figure 33 p. 64) présente tout d'abord les bandes d'absorption caractéristiques d'une poudre d'hydroxyapatite phosphocalcique, à savoir les domaines de vibration des groupements phosphates et hydroxyles. Les bandes d'absorption relatives aux groupements hydroxyles apparaissent moins intenses que celles des poudres de référence : *e.g.*  $A_{630_{C_{0,5}-Si_{0,5}-HA_{brute}}} = 3,90 \text{ u.a.} < A_{630_{HA_{brute}}} = 5,31 \text{ u.a.}$  (Figure 34 p. 64, compléments voir Tableau 10 p. 51 et Tableau 13 p. 72). Cela traduit la forte présence de lacunes en site



hydroxyde dans le composé  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  et ce dès la précipitation. La présence de lacunes en site A est confirmée par les épaulements centrés vers  $925$  et  $945\text{ cm}^{-1}$  qui correspondent à la vibration des groupements  $PO_4$  à proximité des  $VOH^+$ .

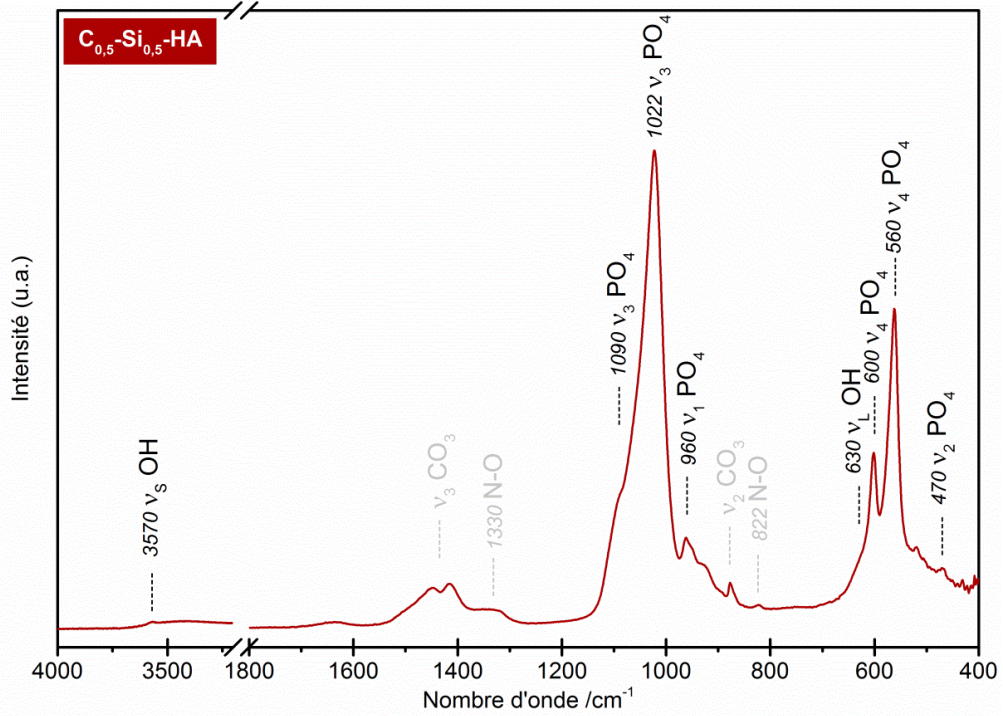


Figure 33 : Spectre IR de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinée à  $400^\circ\text{C}$  pendant 2 h (poudre brute).

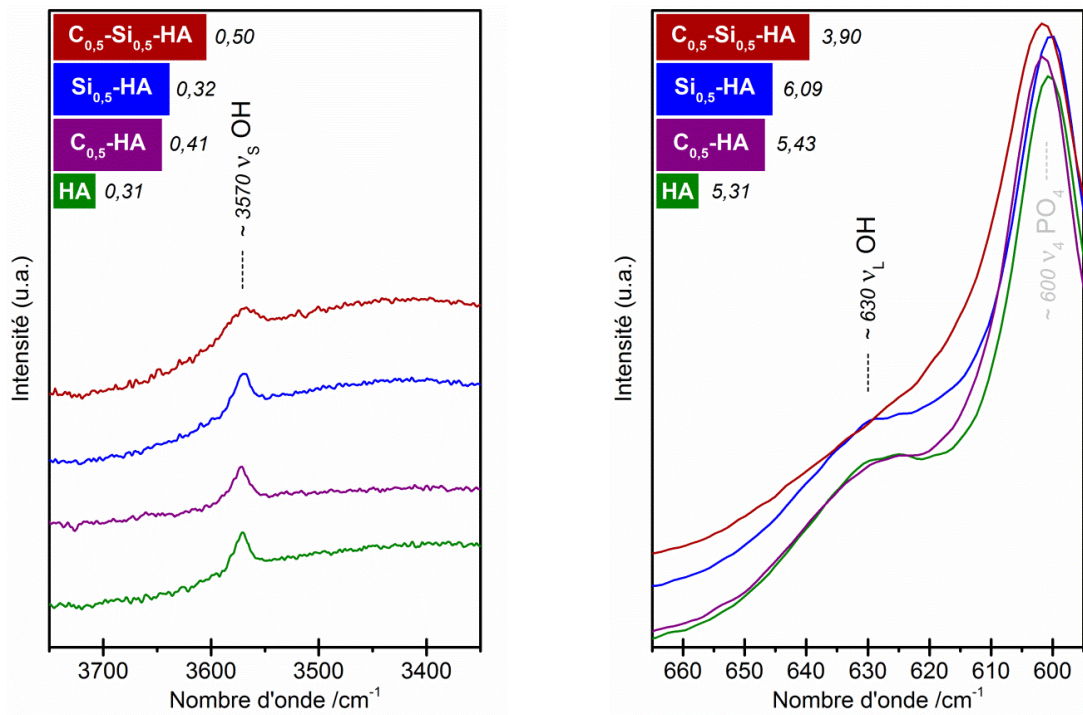
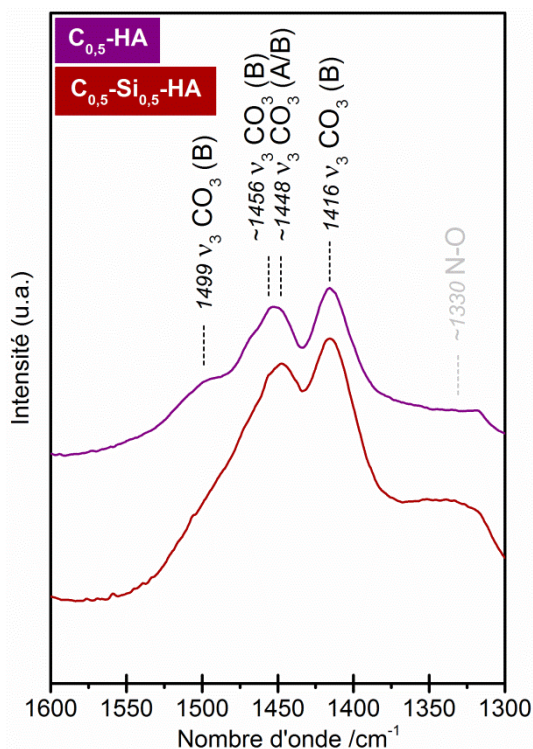


Figure 34 : Spectres IR des poudres HA,  $C_{0,5}-HA$ ,  $Si_{0,5}-HA$  et  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinées à  $400^\circ\text{C}$  pendant 2 h (poudre brute) - domaine  $v_L$  et  $v_s$  OH.

Les bandes spécifiques aux carbonates de type B sont observables à 877, 1416, 1448, 1456 et 1499  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 35 p. 65). Les contributions sont les mêmes que pour le composé  $C_{0,5}\text{-HA}$  mais certaines (e.g. 1448 et 1456  $\text{cm}^{-1}$ ) sont légèrement décalées vers les plus petits nombres d'onde. L'intensité des bandes d'absorption relatives aux  $\text{CO}_3$  de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  semble supérieure à celles de la poudre  $C_{0,5}\text{-HA}$ . Cela peut s'expliquer, en partie, par la normalisation inadéquate des spectres avec la bande  $\nu_4 \text{PO}_4$  à 600  $\text{cm}^{-1}$ . En effet, les groupements phosphates sont stœchiométriquement moins présents dans la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  que dans la poudre  $C_{0,5}\text{-HA}$ . Une autre hypothèse serait une meilleure incorporation des carbonates en site B de l'HA en présence de silicate. Cette hypothèse a été vérifiée par le dosage de la teneur en carbone (% massique) dans les poudres brutes :  $\%C_{C_{0,5}\text{-HA}} = 0,51 < \%C_{C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}} = 0,63$ . De plus, comme dans le cas du composé de référence  $C_{0,5}\text{-HA}$ , la carbonatation des sites A de la structure apatitique n'est pas observée (e.g. absence de la bande d'absorption caractéristique à 1545  $\text{cm}^{-1}$ ). Les carbonates dosés sont donc principalement situés en site B dans l'apatite; les traces observables de  $\text{CO}_2$  adsorbés (866  $\text{cm}^{-1}$ ) pouvant être considérées comme négligeables.



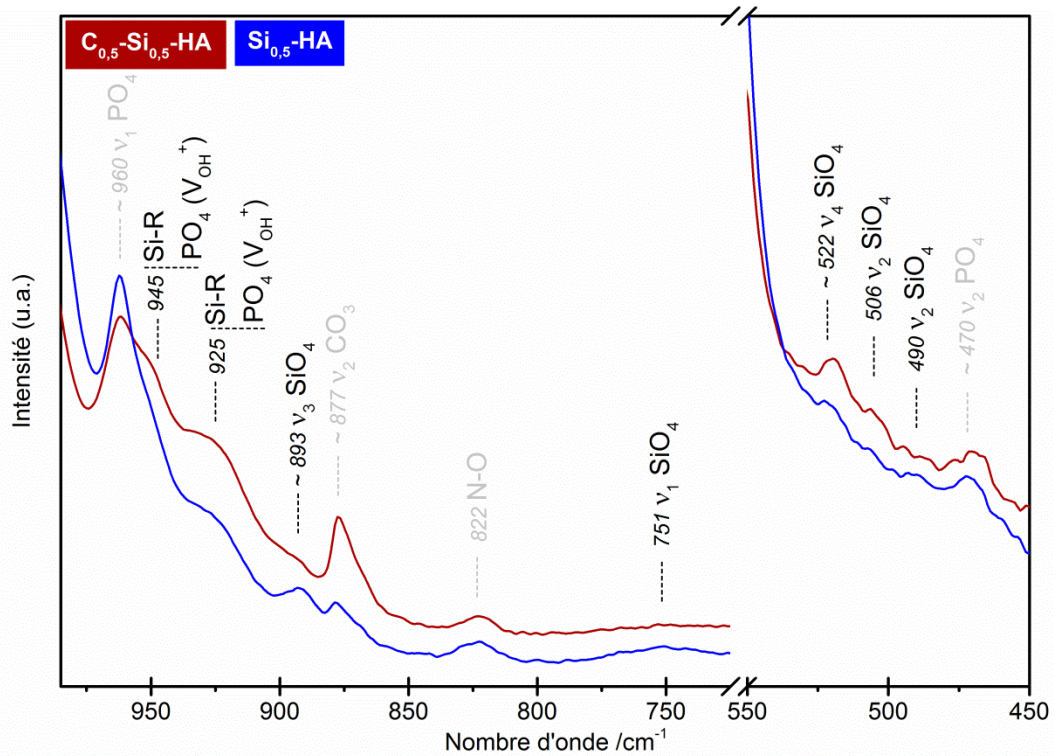
**Figure 35** : Spectres IR des poudres  $C_{0,5}\text{-HA}$  et  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinées à 400°C pendant 2 h (poudre brute) - domaines des  $\nu_3 \text{CO}_3$ .

La Figure 36 (p. 66) détaille le spectre sur les domaines d'absorption caractéristiques du silicium. Le composé  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  présente des bandes à 490, 506, 522, 751 et 893  $\text{cm}^{-1}$  spécifiques aux groupements  $\text{SiO}_4$  dans HA. Les bandes relatives à la silice de type amorphe ne sont pas détectées (e.g. 800  $\text{cm}^{-1}$ ). Comme pour le composé

de référence  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$ , l'incorporation des silicates dans la maille apatitique pour le composé  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  a lieu dès la synthèse. A noter toutefois que l'intensité des bandes d'absorption des groupements  $\text{SiO}_4$  dans la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  reste globalement faible voire imperceptible (e.g. 490, 751 et 893  $\text{cm}^{-1}$ ). Ce phénomène peut s'expliquer par une modification des composantes vibrationnelles des groupements  $\text{SiO}_4$  lorsque des groupements  $\text{CO}_3\text{PO}_4^+$  sont dans son environnement proche. Ces modifications pourraient être liées à des interactions locales entre ces groupements entraînant l'affaiblissement de certaines vibrations liées aux silicates dans HA.

Les vibrations des liaisons de surface, du type Si-OH, à 925 et 945  $\text{cm}^{-1}$  sont également observées.

Aucune autre phase secondaire, si ce n'est la présence de résidus de synthèse nitrés, n'est détectée dans le composé  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  après calcination à 400°C pendant 2 heures en spectrométrie infrarouge.



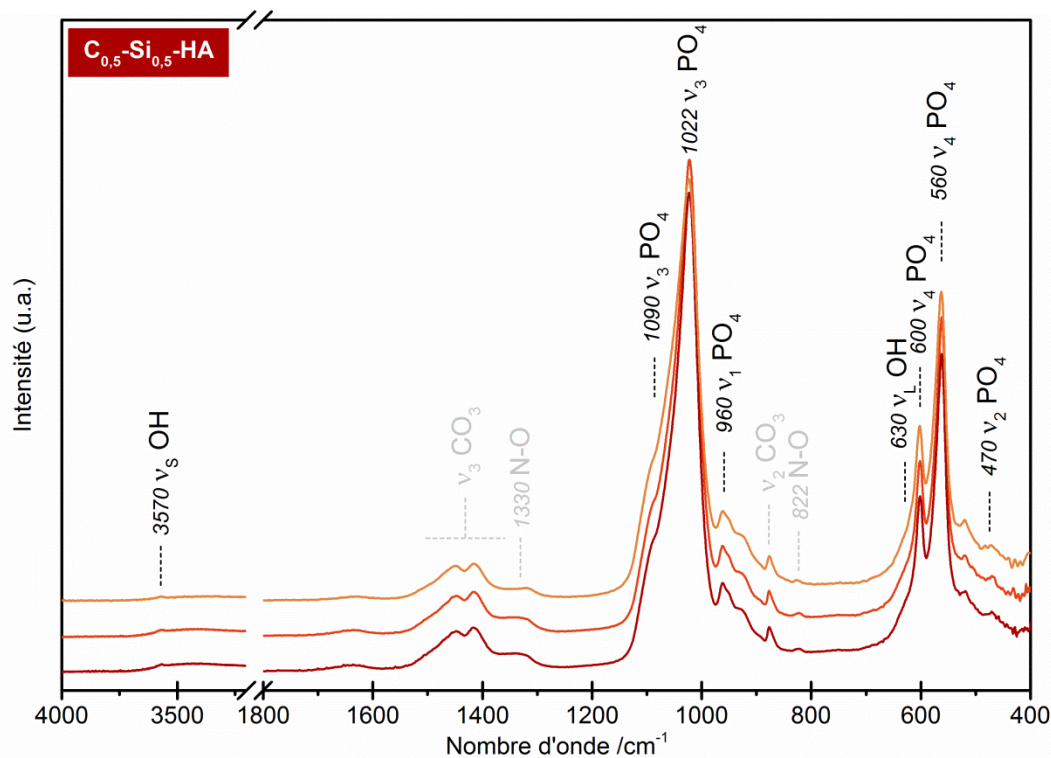
**Figure 36** : Spectres IR des poudres  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  et  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinées à 400°C pendant 2 h (poudres brutes) - domaines des  $\text{SiO}_4$ .

D'une manière générale, la poudre synthétisée est bien de structure apatitique et les groupements carbonates et silicates sont incorporés dans la maille en substitution des groupements phosphates et ce, dès la précipitation. Il apparait également une interaction entre les  $\text{CO}_3\text{PO}_4^+$  et les  $\text{SiO}_4\text{PO}_4^-$  au sein de la maille apatitique dès la précipitation puisque (i) la quantité de  $\text{CO}_3$  fixé dans la structure est plus importante

en présence d'ions silicates (Figure 35 p. 65), et (ii) des phénomènes équivalents à des extinctions de certaines bandes  $SiO_4$  en site apatitique sont observés.

En outre, la présence de lacunes en site hydroxyde ( $V_{OH}^+$ ) indique que la formule Eq. II-4 (p. 35) et que la réaction de précipitation (Eq. II-8 p. 37) théoriques proposées en début de chapitre ne correspondent pas à la réalité du composé  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  synthétisé. La formation de la phase  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  semble nécessiter la création de lacune  $V_{OH}^+$  remettant en question l'hypothèse d'une compensation parfaite (d'un équilibre) des charges de structure  $CO_3 PO_4^+$  et  $SiO_4 PO_4^-$ .

Afin de s'assurer de la reproductibilité du procédé de synthèse, plusieurs poudres  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  ont été élaborées selon les mêmes paramètres de synthèse. L'allure des profils des spectres infrarouges de trois de ces poudres est identique (Figure 37 p. 67). La reproductibilité du procédé de synthèse est vérifiée.



**Figure 37 :** Spectres IR de trois poudres  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  synthétisées dans les mêmes conditions et calcinées à 400°C pendant 2 h (brute).

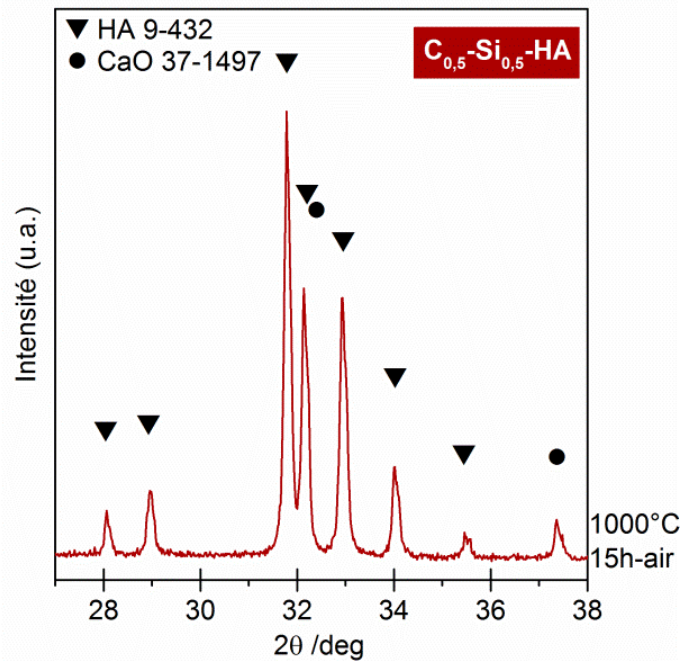
### II.3.2. Evolution du composé $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$ après calcination

Afin d'évaluer les conséquences des substitutions ioniques sur la structure apatitique, la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  a été calcinée à haute température pour augmenter sa cristallinité. Les mêmes conditions de calcination que pour les poudres de référence

ont été utilisées, à savoir : sous air et sous dioxyde de carbone. Une fois la pureté des poudres calcinées démontrée, les effets de l'incorporation des groupements silicates et carbonates sur la structure apatitique seront étudiés.

### II.3.2.1. Calcination sous air

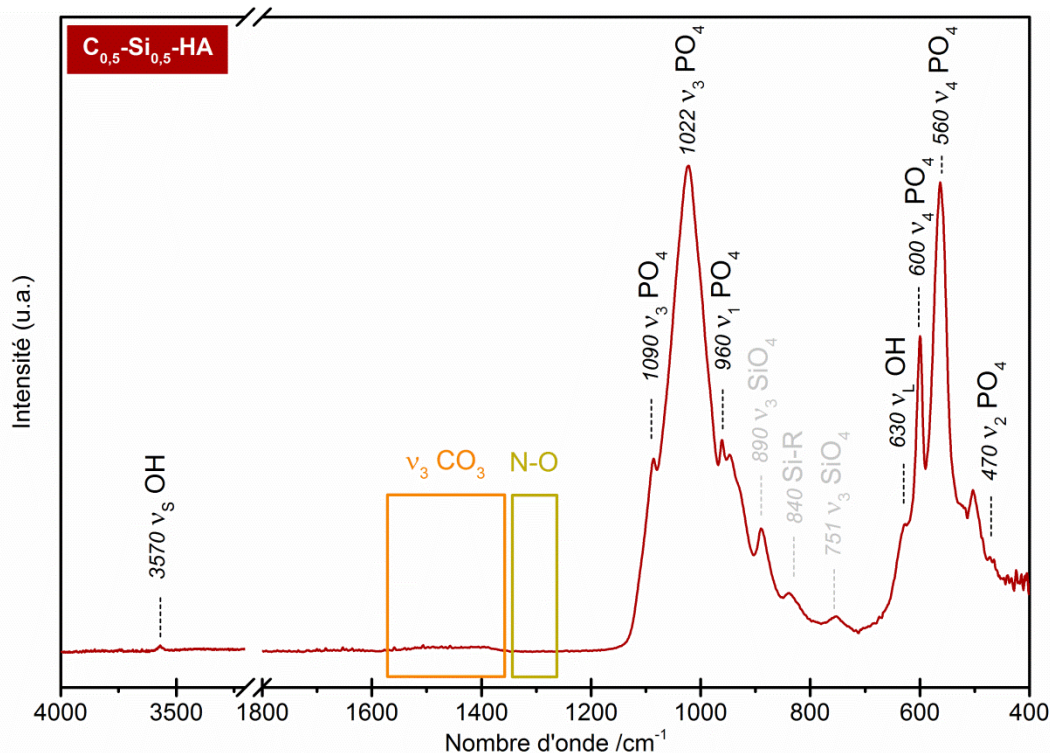
Le diagramme de diffraction des rayons X et le spectre infrarouge de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinée à  $1000^{\circ}C$  pendant 15 heures sous air sont présentés respectivement sur la Figure 38 (p. 68) et la Figure 39 (p. 69).



**Figure 38** : Diffractogramme de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinée à  $1000^{\circ}C$  pendant 15 h sous air.

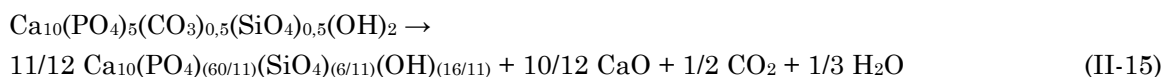
Comme pour les poudres apatitiques de référence, les pics de diffraction de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinée à  $1000^{\circ}C$  sont plus intenses et plus fins que ceux de la poudre brute. Ceci est dû à une augmentation de l'ordre local (cristallinité) et à une augmentation de la taille des grains de la poudre.

Comme pour le composé carbonaté  $C_{0,5}-HA$  (Figure 18 p.46), le diffractogramme de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinée sous air présente les raies de diffraction propres à la chaux ( $CaO$  - PDF n°37-1497) en plus de celles de l'hydroxyapatite ( $HA$  - PDF n°9-432). La coloration de la solution lors du test à la phénolphtaléine confirme la présence de  $CaO$  dans la poudre. La décomposition de la phase  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  sous air à  $1000^{\circ}C$  est donc avérée.



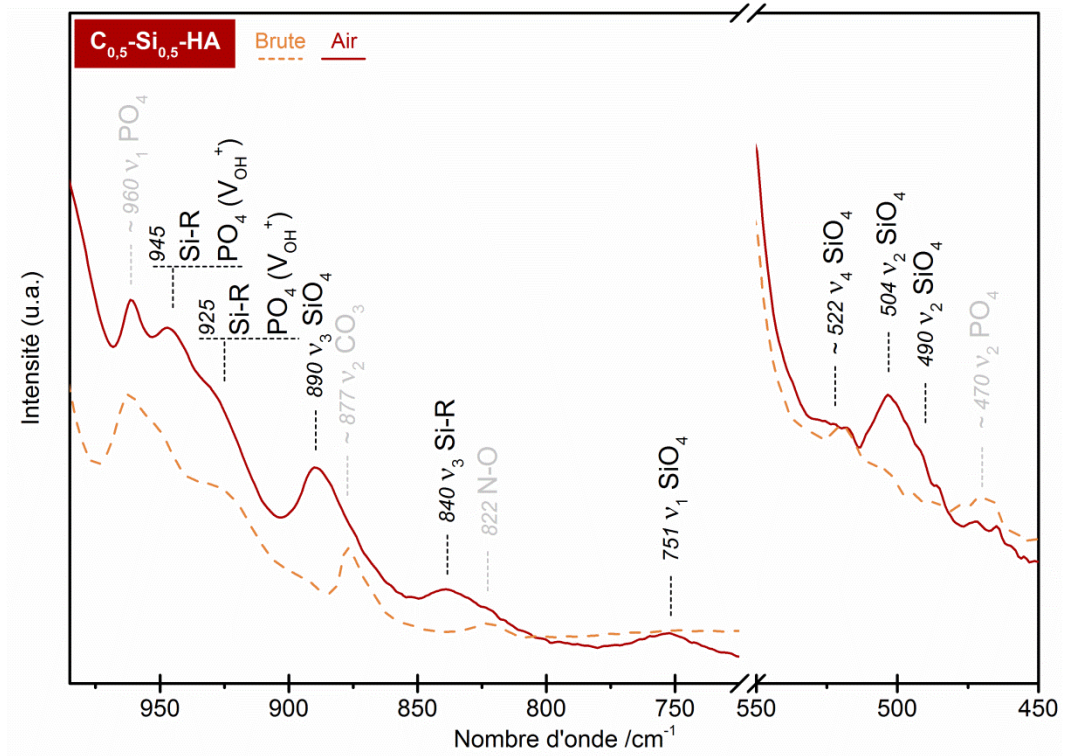
**Figure 39 :** Spectre IR de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinée à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 15 h sous air.

Les bandes spécifiques aux carbonates initialement présentes sur le spectre de la poudre brute sont absentes après calcination sous air (cf. Figure 39 p. 69, des détails sont fournis sur la Figure 45 p. 75). Le même phénomène de décarbonatation des sites B sous air que celui décrit pour la poudre de référence  $C_{0,5}\text{-HA}$  (Figure 20 p. 48) est observé. Une réaction de décomposition de la phase  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ , basée sur celle de  $C_{0,5}\text{-HA}$  (Eq. II-11 p. 49), est proposée ci-dessous (Eq. II-15 p. 69) :

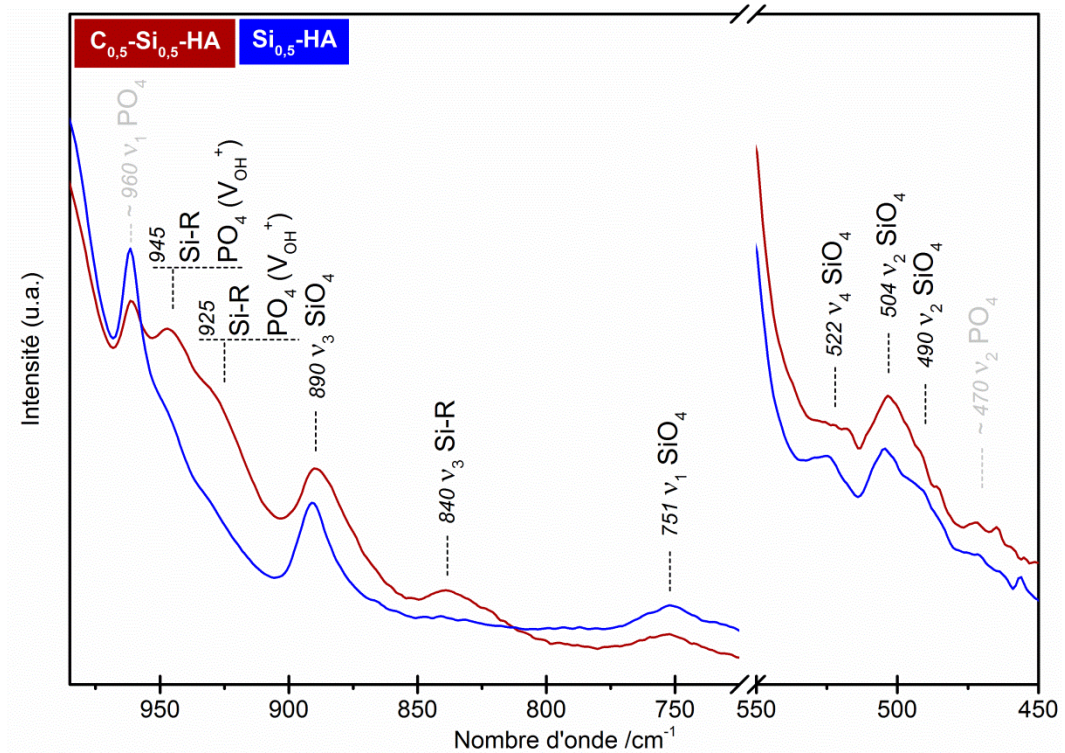


Cette réaction reste toutefois générale et théorique puisque la spectrométrie infrarouge réalisée avant la calcination de la poudre a démontré l'existence de lacunes  $\text{V}_{\text{OH}}^+$  dans la structure de l'hydroxyapatite silico-carbonatée. L'étude de la stabilité thermique du composé  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  permettra d'approfondir ce point (cf. Chapitre III).

En plus des bandes d'absorption caractéristiques d'une hydroxyapatite phosphocalcique (domaine  $\text{PO}_4$  et  $\text{OH}$ ), le spectre infrarouge de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinée à  $1000^\circ\text{C}$  sous air présente également des vibrations spécifiques des liaisons  $\text{Si-O}$  (Figure 40 p. 70). Les bandes d'absorption à peine distinguées dans la poudre brute (Figure 36 p. 66) sont ici bien visibles. Comme pour le composé de référence  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinée dans les mêmes conditions (Figure 41 p. 70), il apparaît les vibrations spécifiques à  $\text{SiO}_4$  dans l'HA (e.g. 490, 504, 522, 751 et  $890 \text{ cm}^{-1}$ ), ainsi que celles des



**Figure 40 :** Spectres IR de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  réalisés avant calcination (tirets), et après calcination à  $1000^{\circ}C$  pendant 15 h sous air (trait continue) - domaines  $SiO_4$ .



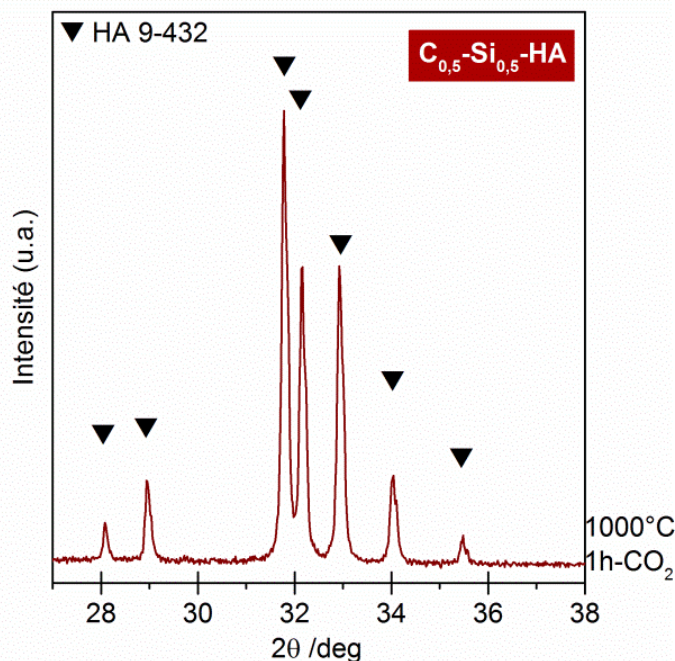
**Figure 41 :** Spectres IR des poudres  $Si_{0,5}-HA$  et  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinées à  $1000^{\circ}C$  pendant 15 h sous air - domaines  $SiO_4$ .

liaisons Si-OH de surface (e.g.  $\sim 925\text{ cm}^{-1}$ ). Ce phénomène d'intensification des bandes  $\text{SiO}_4$  dans HA peut principalement être attribué, comme dans le cas de Si-HA (II.2.2.2 p. 48), à une augmentation de l'ordre local dans les cristallites. Une deuxième hypothèse, mise au jour pour les poudres brutes (II.3.1 p. 63), serait que les extinctions de bandes liées à l'interaction des groupements  $\text{CO}_3$  (en site B) et  $\text{SiO}_4$  disparaissent du fait de la décarbonatation de la phase C-Si-HA.

Enfin, la déshydratation de la C-Si-HA due à la calcination à haute température ( $1000^\circ\text{C}$ ) peut également expliquer le gain d'intensité des bandes d'absorption centrées vers  $925$  et  $945\text{ cm}^{-1}$ , toutes deux liées à la présence de lacunes  $\text{V}_{\text{OH}}^+$  dans la structure apatite.

### II.3.2.2. Calcination sous $\text{CO}_2$

Le diagramme de diffraction des rayons X de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinée à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 1 heure sous une atmosphère de dioxyde de carbone est présenté sur la Figure 42 (p. 71). Le spectre infrarouge est donné sur la Figure 43 (p. 72).

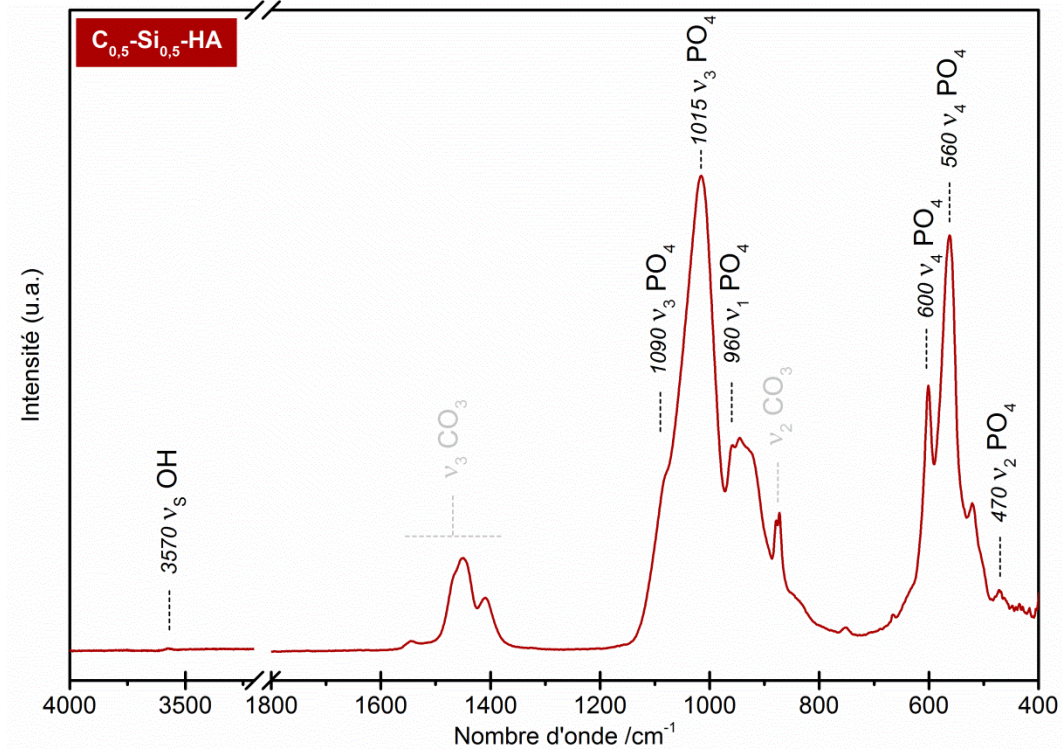


**Figure 42** : Diffractogramme de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinée à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 1 h sous  $\text{CO}_2$ .

Le profil de diffraction correspond à celui d'une structure apatitique bien cristallisée (HA - PDF n°9-432). Aucune autre phase cristalline n'est observée. Les phases habituellement rencontrées lors de la décomposition des Si-HA (TCP, silicocarnotite [Palard, 2007]) ou des C-HA ( $\text{CaO}$ ,  $\text{CaCO}_3$  [Lafon, 2004]) ne sont pas détectées. Le test à la phénolphtaléine sur la poudre recalcinée sous air à  $550^\circ\text{C}$  pendant 10 heures reste lui aussi négatif. Contrairement à la calcination faite sous air, la structure apatitique



du composé  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  est préservée lors de la calcination à  $1000^{\circ}C$  sous une atmosphère de dioxyde de carbone.

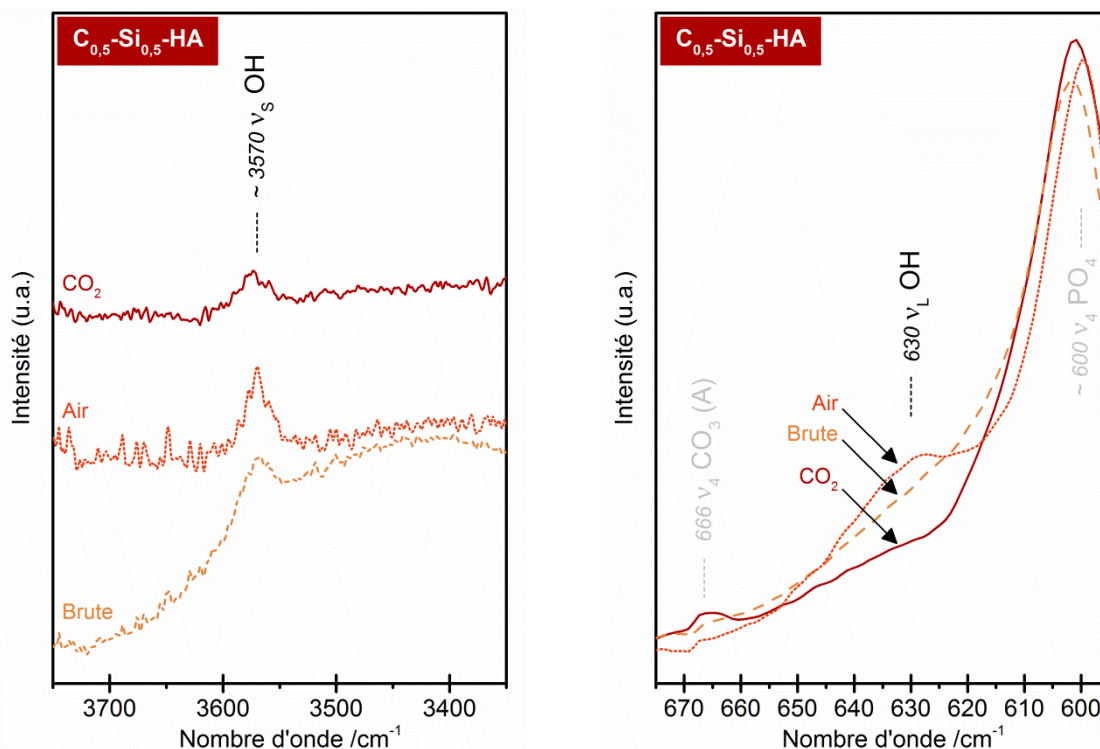


**Figure 43** : Spectre IR de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinée à  $1000^{\circ}C$  pendant 1 h sous  $CO_2$ .

Outre les bandes caractéristiques des groupements  $PO_4$  d'une hydroxyapatite phosphocalcique, le spectre infrarouge de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  après calcination à  $1000^{\circ}C$  sous  $CO_2$  présente également les bandes d'absorption spécifiques aux groupements OH (Figure 44 p. 73). Toutefois, leur intensité intégrée est moindre en comparaison avec celle de la poudre brute et de celle de la poudre calcinée sous air (e.g. bande  $\nu_L$  OH :  $A_{630_{C_{0,5}-Si_{0,5}-HA_{CO_2}}} = 1,84 \text{ u.a.} < A_{630_{C_{0,5}-Si_{0,5}-HA_{brute}}} = 3,90 \text{ u.a.} < A_{630_{C_{0,5}-Si_{0,5}-HA_{Air}}} = 4,15 \text{ u.a.}$ ). Les intensités intégrées de ces bandes sont regroupées dans le Tableau 13 (p. 72).

**Tableau 13** : Aires intégrées des bandes d'absorption  $\nu_s$  et  $\nu_L$  du groupement OH du composé  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  après traitement thermique (i) à  $400^{\circ}C$  pendant 2 h sous air, (ii) à  $1000^{\circ}C$  pendant 15 h sous air, (iii) et à  $1000^{\circ}C$  pendant 1 h sous  $CO_2$ .

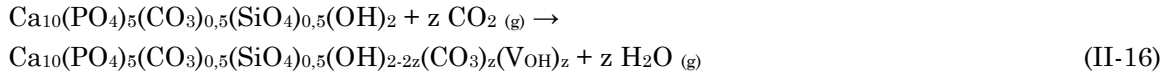
	Traitement Thermique	Aire Intégrée (u.a.) $\nu_s$ OH <sub>3570</sub> $cm^{-1}$	Aire Intégrée (u.a.) $\nu_L$ OH <sub>630</sub> $cm^{-1}$
$C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$	400°C - 2h - air	0,50	3,90
	1000°C - 15h - air	0,60	4,15
	1000°C - 1h - $CO_2$	0,27	1,84



**Figure 44 :** Spectres IR de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  réalisés avant calcination (tirets), après calcination à  $1000^{\circ}C$  pendant 15 h sous air (pointillés), après calcination à  $1000^{\circ}C$  pendant 1 h sous  $CO_2$  (trait continue) - domaines  $v_L$  et  $v_S$  OH.

La Figure 45 (p. 75) compare les spectres infrarouges, centrés sur les domaines  $v_2$  et  $v_3$   $CO_3$ , de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  obtenus avant (poudre brute) et après calcination (sous air et sous  $CO_2$ ). Les bandes d'absorption spécifiques aux carbonates de type A ( $666$ ,  $754$  et  $1545$   $cm^{-1}$ ), de type B ( $873$ ,  $1410$ ,  $1465$  et  $1500$   $cm^{-1}$ ) et de type A/B ( $879$  et  $1450$   $cm^{-1}$ ) sont visibles sur le spectre infrarouge après calcination sous  $CO_2$ . Les intensités intégrées des bandes d'absorption des carbonates de type B de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  sont stables avant et après la calcination sous  $CO_2$  à  $1000^{\circ}C$  (e.g. la bande d'absorption centrée vers  $1410$   $cm^{-1}$ :  $A_{1410_{C_{0,5}-Si_{0,5}-HA_{brute}}} = 4,94$  u.a. et  $A_{1410_{C_{0,5}-Si_{0,5}-HA_{CO_2}}} = 4,86$  u.a.). Ceci confirme une nouvelle fois que la carbonatation en site B n'intervient qu'au cours de la précipitation.

Le  $CO_2$  utilisé comme atmosphère lors du traitement thermique préserve les carbonates de type B et enrichit la structure apatitique en carbonates de type A. Ce phénomène est à corréliser avec la diminution de l'intensité des bandes relatives aux groupements OH lors de la calcination sous  $CO_2$  (Figure 44 p. 73). En se basant sur la formule théorique du composé  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  (Eq. II-4 p. 35) ainsi que sur le phénomène de carbonatation des sites hydroxydes observé pour les poudres apatitiques de référence (Eq. II-12 p. 54), la réaction de carbonatation suivante des sites A de la phase  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  est proposée (Eq. II-16 p. 74):



La présence de lacunes en site OH ( $\text{V}_{\text{OH}}^+$ ) dans la poudre avant calcination, établie par spectrométrie infrarouge (II.3.1 p. 63), ne devrait pas modifier la nature de la réaction d'échange entre le  $\text{CO}_2$  et les tunnels de la maille apatitique, mais simplement la quantité échangée. Les résultats de l'analyse élémentaire, présentés dans la partie II.3.3 (p. 82), permettront d'établir une formule chimique du composé après calcination sous  $\text{CO}_2$ .

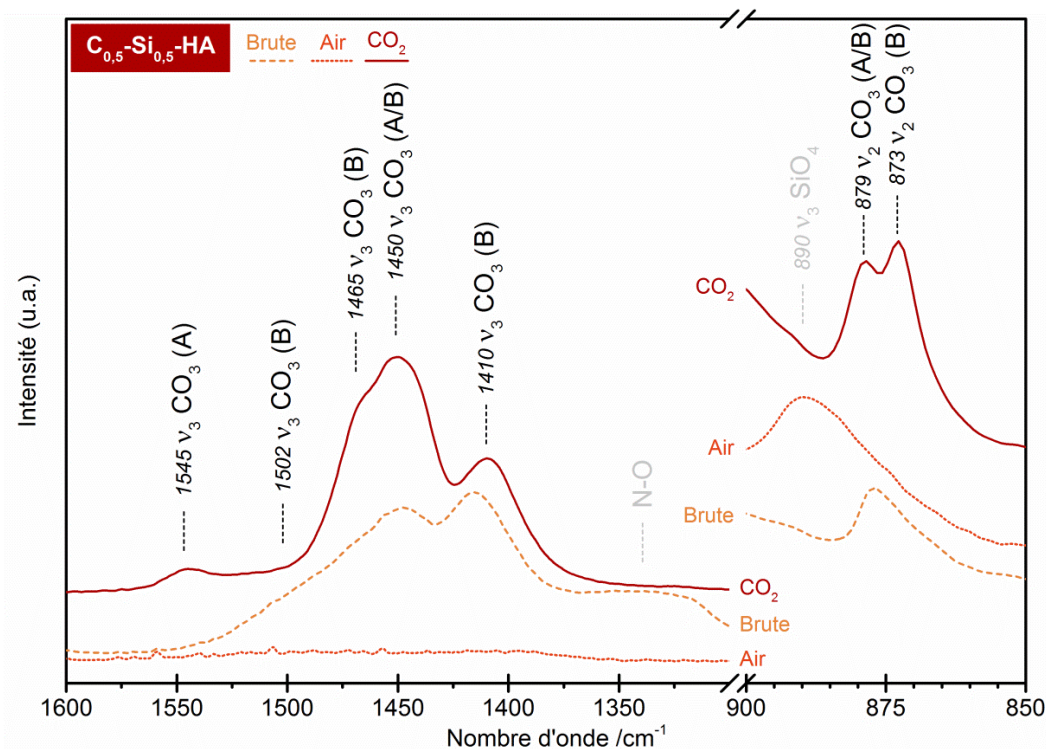
Le spectre détaillé de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinée sous  $\text{CO}_2$  (Figure 46 p. 75) présente également quelques-unes des bandes spécifiques aux  $\text{SiO}_4$  dans HA et plus exactement celles à 522 et 751  $\text{cm}^{-1}$ . Le Tableau 14 (p. 76) récapitule et compare les intensités des bandes d'absorption caractéristiques des groupements  $\text{SiO}_4$  dans HA rencontrées pour les phases  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  et  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  selon l'atmosphère du traitement thermique. Par rapport à la calcination sous air, certaines bandes, également associées aux  $\text{SiO}_4$  dans HA, s'affaiblissent fortement (*e.g.* à 504  $\text{cm}^{-1}$ ) voire s'éteignent (*e.g.* à 490  $\text{cm}^{-1}$ ). La vibration caractéristique du groupement  $\text{SiO}_4$  dans l'HA à 985  $\text{cm}^{-1}$  est, quant à elle, non perceptible car englobée dans le domaine de vibration des  $\nu_3 \text{PO}_4$  situé à proximité. Comme pour le composé de référence  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$ , la bande d'absorption à 890  $\text{cm}^{-1}$  relative aux  $\text{SiO}_4$  dans l'HA est confondue dans les domaines de vibration avoisinant. L'aire intégrée de sa bande, obtenue par déconvolution, est légèrement moins intense que lors de la calcination à 1000°C sous air.

Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer la diminution d'intensité de ces bandes :

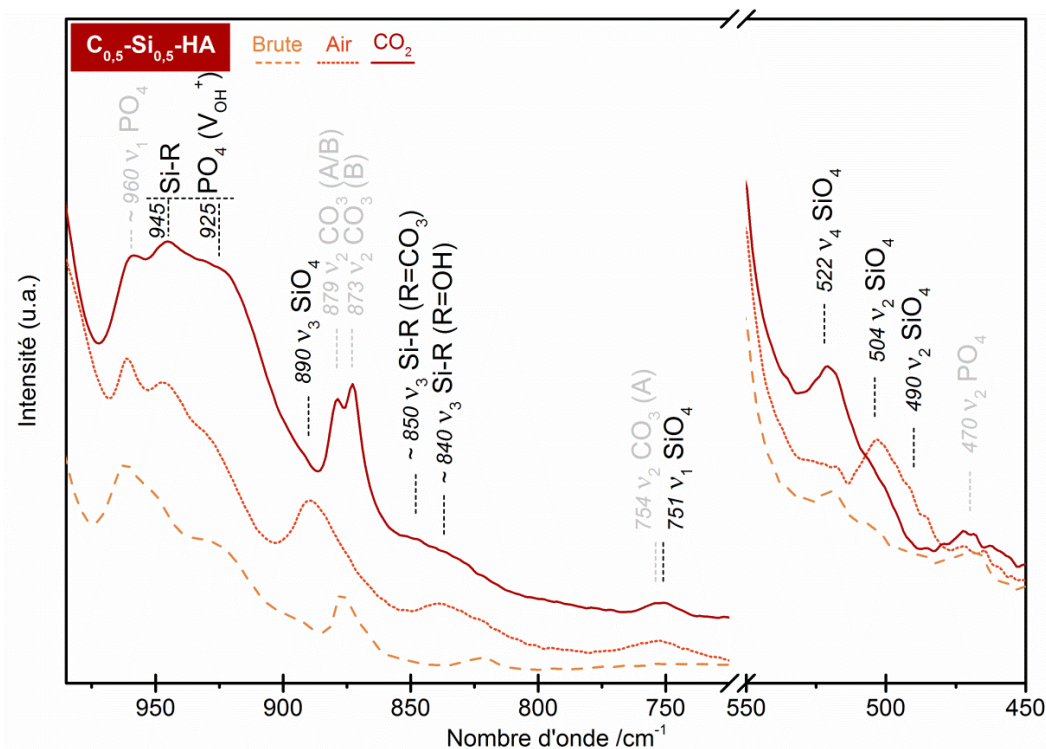
(i) Une modification des composantes vibrationnelles des groupements  $\text{SiO}_4 \text{PO}_4^-$  lorsque des groupements  $\text{CO}_3 \text{OH}^-$  sont dans leur environnement : phénomène observé pour la poudre  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinée sous  $\text{CO}_2$  (Figure 27 p. 56).

(ii) Une interaction forte entre  $\text{SiO}_4 \text{PO}_4^-$  et  $\text{CO}_3 \text{PO}_4^+$  : phénomène mis en évidence lors de la comparaison des poudres brutes  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  et  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  (Figure 36 p. 66).

En effet, seul le spectre de la poudre calcinée sous air à 1000°C pendant 15 heures, où les carbonates (de type A et B) sont éliminés, présente l'ensemble des vibrations spécifiques aux  $\text{SiO}_4$  (*e.g.* 504  $\text{cm}^{-1}$ ).



**Figure 45 :** Spectres IR de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  réalisés avant calcination (tirets), après calcination à  $1000^{\circ}C$  pendant 15 h sous air (pointillés), après calcination à  $1000^{\circ}C$  pendant 1 h sous  $CO_2$  (ligne continue) - domaines des  $v_2$  et  $v_3$   $CO_3$ .



**Figure 46 :** Spectres IR de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  réalisées avant calcination (tirets), après calcination à  $1000^{\circ}C$  pendant 15 h sous air (pointillés), après calcination à  $1000^{\circ}C$  pendant 1 h sous  $CO_2$  (ligne continue) - domaines des  $SiO_4$ .

**Tableau 14** : Intensité des bandes d'absorption caractéristiques des groupements  $SiO_4$  dans HA rencontrées pour les phases  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA en fonction du traitement thermique ( $a$  = absente,  $f$  = faible,  $m$  = moyenne,  $Int$  = intense,  $x^{1,23}$  = valeur intensité intégrée).

	$Si_{0,5}$ -HA		$C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA	
	1000°C - 15h - Air	1000°C - 1h - $CO_2$	1000°C - 15h - Air	1000°C - 1h - $CO_2$
$\nu_2$ 490 $cm^{-1}$	$f$ ↓	$a$	$f$ ↓	$a$
$\nu_2$ 504 $cm^{-1}$	$Int$ ↓	$f$	$Int$ ↓	$f$
$\nu_4$ 522 $cm^{-1}$	$m$ ↑	$Int$	$m$ ↑	$Int$
$\nu_1$ 751 $cm^{-1}$	$m^{1,10}$ ↓	$f^{0,10}$	$*^{1,01}$ ↓	$*^{0,18}$
$\nu_3$ 890 $cm^{-1}$	$Int^{4,35}$ ↓	$m^{2,50}$	$Int^{7,99}$ ↓	$m^{6,75}$
$\nu_3$ 985 $cm^{-1}$	**	**	**	**

\* superposition des bandes  $\nu_2$   $CO_3$  (A) et  $\nu_1$   $SiO_4$

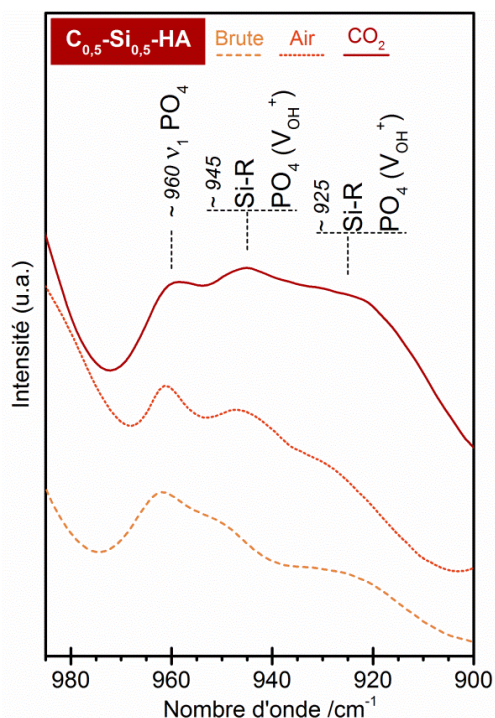
\*\* superposition des bandes  $\nu_3$   $PO_4$  et  $\nu_3$   $SiO_4$

D'autre part, le traitement sous  $CO_2$  modifie la structure de la C-Si-HA, avec la formation de  $VOH^+$  liée à l'incorporation de  $CO_3OH^-$ , mais également la nature des groupements de surface comme en témoigne l'épaulement centré vers 850  $cm^{-1}$  (Figure 46 p. 75). Pour rappel, deux hypothèses avaient été émises sur l'origine de la bande à 850  $cm^{-1}$  dans le cas du composé  $Si_{0,5}$ -HA calciné sous une atmosphère  $CO_2$  (Figure 25 p. 55) : (i) nouvelle vibration liée à la phase secondaire amorphe silicatée ; (ii) changement de la nature du groupement de surface Si-R (OH étant remplacé par des  $CO_3$ ). Dans le cas de la poudre  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA, aucune phase secondaire silicatée n'est détectée (e.g. 800  $cm^{-1}$  :  $SiO_2$ ). La seconde hypothèse est donc retenue. Le large épaulement distribué entre 820 et 860  $cm^{-1}$  serait donc la superposition des vibrations des liaisons de surface Si-OH (~840  $cm^{-1}$ ) et Si- $CO_3$  (~850  $cm^{-1}$ ).

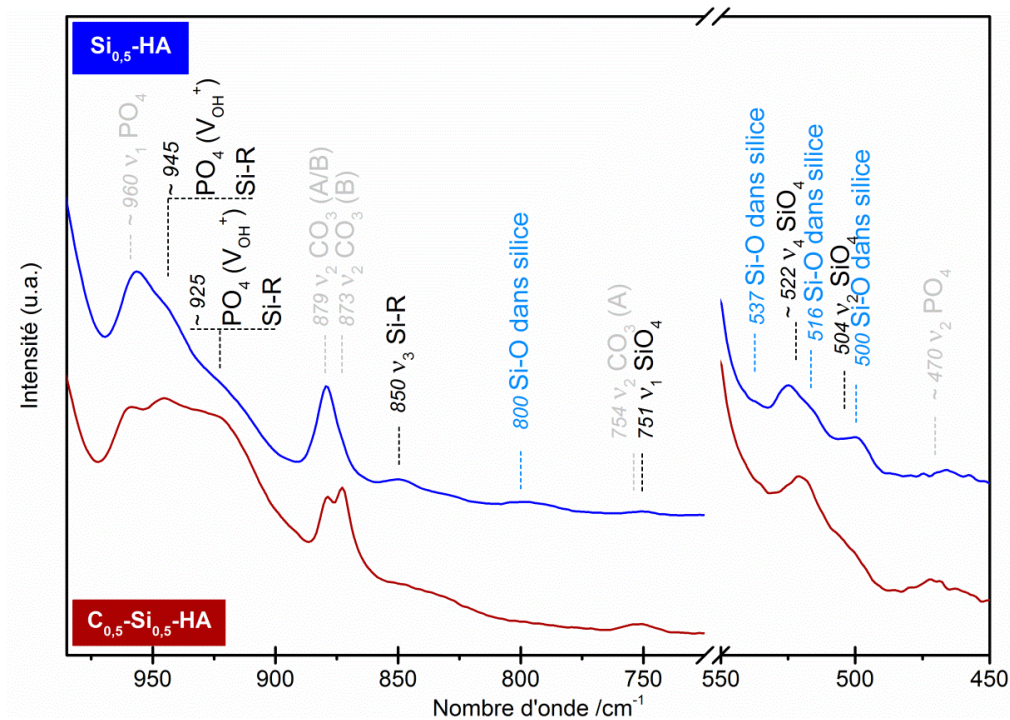
L'intensité du domaine 910-950  $cm^{-1}$  qui comprend les bandes d'absorption à 925 et 945  $cm^{-1}$ , augmente fortement après la calcination de la poudre  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA sous  $CO_2$  (Figure 47 p. 77). Ces deux bandes d'absorption sont liées en partie au nombre de lacunes en site hydroxyde  $VOH^+$  (à proximité des groupements  $PO_4$ ) et en partie aux sites de surface Si-R. Dans la phase  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA calcinées sous  $CO_2$ , les  $VOH^+$  ont trois origines possibles : (i) l'équilibre des charges électriques après l'incorporation des carbonates et des silicates en site B ; (ii) la carbonatation des sites A lors de la calcination sous  $CO_2$  ; (iii) la déshydratation partielle lors de la calcination au-dessus de 800°C [Tónsuaadu, 2012].

Plus que les sites de surface Si-R, dont la contribution peut être considérée comme faible en comparant l'évolution du domaine 820-860  $cm^{-1}$  sur les spectres des phases  $Si_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA (Figure 48 p. 77), il semble que la forte augmentation de

l'intensité du domaine 910-950  $\text{cm}^{-1}$  soit surtout liée au changement d'environnement local des  $\text{PO}_4$  au voisinage des colonnes de type II (*i.e.*  $\text{V}_{\text{OH}}^+$  et  $\text{CO}_3\text{OH}$ ).



**Figure 47 :** Spectres IR de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  réalisés avant calcination (tirets), après calcination à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 15 h sous air (pointillés), après calcination à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 1 h sous  $\text{CO}_2$  (ligne continue) - domaines des dégénérescences  $\nu_1 \text{PO}_4$ .



**Figure 48 :** Spectres IR des poudres  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  (rouge) et  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  (bleu) calcinées à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 1 h sous  $\text{CO}_2$  - domaines des  $\text{SiO}_4$ .

### II.3.2.3. Effets de l'incorporation des groupements $\text{CO}_3$ et $\text{SiO}_4$ dans la structure apatitique

Le Tableau 15 (p. 78) présente les valeurs calculées des paramètres de maille de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  après calcination à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 1 heure sous  $\text{CO}_2$  (poudre monophasique). Les valeurs de  $a$  et de  $c$  sont confrontées aux valeurs standards de l'HA (PDF-ICDD 9-432). Dans ces conditions de calcination, la maille apatitique connaît une dilatation selon les axes  $c$  ( $\Delta c = +0,025 \text{ \AA}$  soit  $+3,6\%$ ) et  $a$  ( $\Delta a = +0,013 \text{ \AA}$  soit  $+1,4\%$ ).

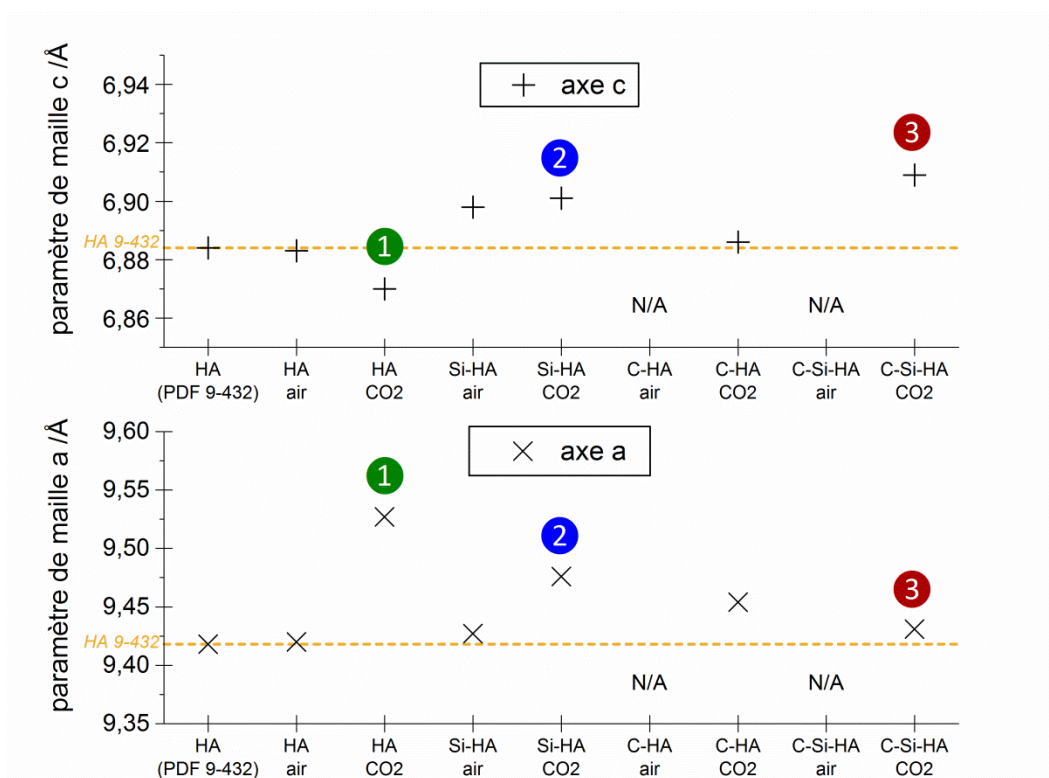
**Tableau 15 :** Paramètres et volume de maille de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinée - Evaluation par affinement de Le Bail (précision  $\pm 1 \times 10^{-4} \text{ \AA}$ )

Echantillons	Traitement thermique	Paramètres de maille / $\text{\AA}$		Volume de la maille / $\text{\AA}^3$
		axe $a$	axe $c$	
HA Réf. [PDF]	/	9,418	6,884	1057,6
$C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$	$1000^\circ\text{C}\text{-15h air}$	N/A*	N/A*	N/A*
	$1000^\circ\text{C}\text{-1h CO}_2$	9,431 +0,013	6,909 +0,025	1064,4

\* multiphasique

La Figure 49 (p. 79) regroupe toutes les valeurs des paramètres de maille des poudres préparées et décrites dans ce chapitre. En raison d'un taux différent de carbonatation en site A selon les poudres (cf. intensité des bandes en infrarouge), l'influence sur la structure de l'incorporation des ions carbonates et silicates est difficile à apprécier. Toutefois, en comparant les valeurs des paramètres de maille des poudres  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  et  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinées sous  $\text{CO}_2$ , l'effet du carbonate de type B sur la structure apatitique peut être estimé. Un phénomène de rétrécissement de la maille selon l'axe  $a$  est observé ( $\Delta a_{(\text{Si-HA} / \text{C-Si-HA})} = -0,045 \text{ \AA}$  soit  $-4,7\%$ ) lorsque les  $\text{SiO}_4$  cohabitent avec des groupements  $\text{CO}_3$  en site  $\text{PO}_4$ , et ce sans modification significative de la hauteur de la maille ( $\Delta c_{(\text{Si-HA} / \text{C-Si-HA})} = +0,008 \text{ \AA}$  soit  $+1,2\%$ ). Les carbonates incorporés en site B permettent ainsi une diminution du paramètre de maille  $a$ . Cette co-substitution en site  $\text{PO}_4$  permet également de limiter la dilatation selon l'axe  $a$ , causée par l'incorporation des ions carbonates en site A, et ainsi de stabiliser la structure apatitique (*i.e.* absence de phase amorphe secondaire contrairement à ce qui est observé pour la phase  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  traitée sous  $\text{CO}_2$ ).

Il semble plus simple pour la structure d'HA de s'accommoder d'une augmentation de  $c$ , que de  $a$ . Ainsi, si  $a$  augmente,  $c$  doit pouvoir diminuer ❶, sinon le risque de déstabilisation de la maille est fort ❷, excepté si l'augmentation de  $a$  reste faible ❸ (Figure 49 p. 79).



**Figure 49 :** Paramètres de maille  $a$  et  $c$  des poudres calcinées comparés aux valeurs références de l'HA (PDF 9-432) représentées en pointillé.

#### II.3.2.4. Discussion sur la structure des C-Si-HA

Trois apatites différentes substituées par des groupements carbonates en sites A et/ou B et silicates en site B peuvent exister :  $C_A\text{-Si-HA}$ ,  $C_B\text{-Si-HA}$ ,  $C_{A/B}\text{-Si-HA}$ . La structure cristalline évolue selon la nature et l'emplacement de ces substituants dans la maille. La Figure 50 (p. 80) schématise les effets sur la structure apatitique des différentes substitutions ioniques rencontrées dans cette étude ( $\text{CO}_3$  et  $\text{SiO}_4$ ).

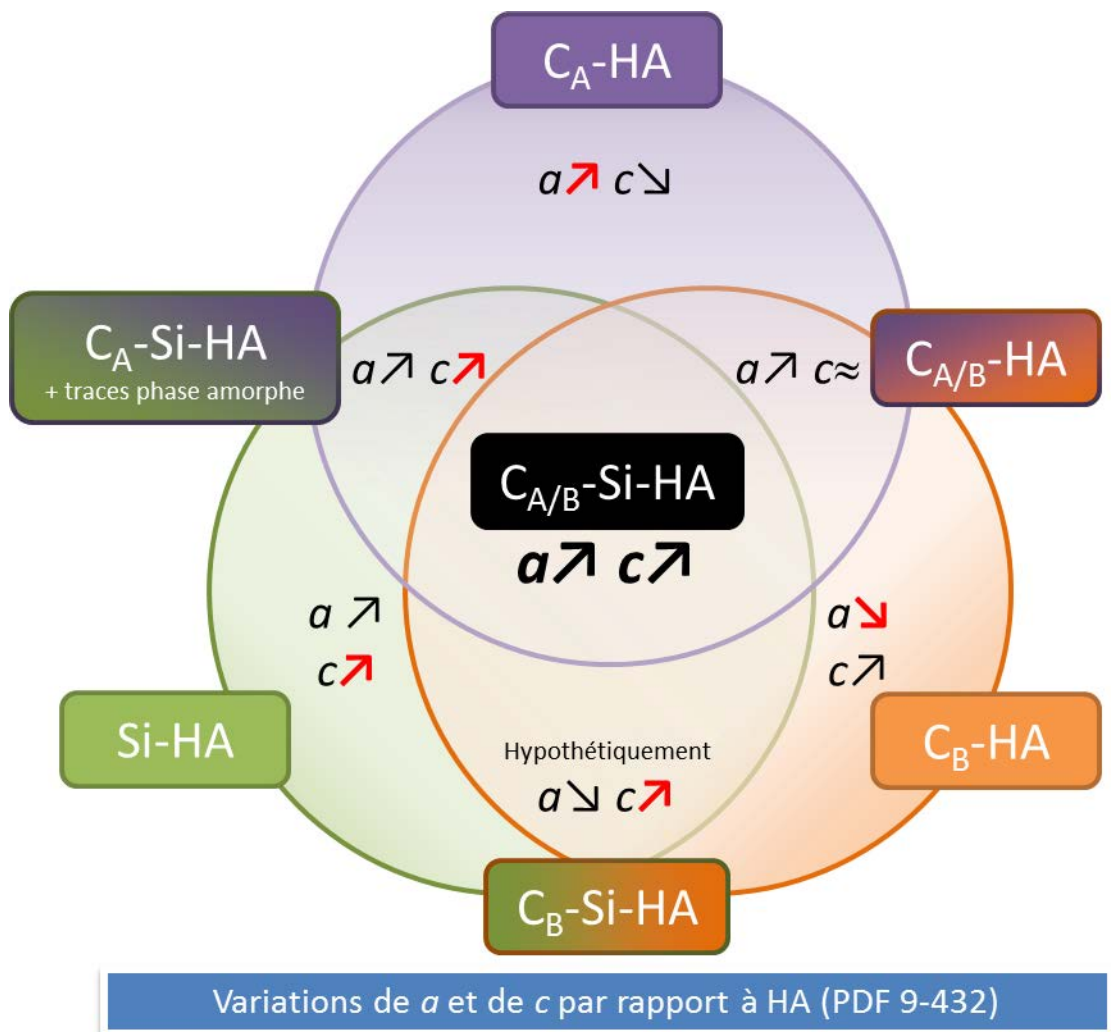
- $C_A\text{-Si-HA}$  : carbonates en site A et silicates en site B (Figure 31 p. 61). C'est le cas de la poudre  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  traitée sous atmosphère  $\text{CO}_2$ . L'étude infrarouge a montré l'existence d'une interaction entre les  $\text{SiO}_4\text{PO}_4^-$  et  $\text{CO}_3\text{OH}^-$ . Les groupements  $\text{CO}_3$  en site A sont situés sur le même plan dans la structure ( $z = \frac{1}{4} - \frac{3}{4}$ ) que les tétraèdres des groupements  $\text{PO}_4$  et  $\text{SiO}_4$  en site B. La déformation totale de la structure semble trop importante ( $a$  et  $c$  ↗) et déstabilise la phase apatitique. Il y a alors démixtion du composé  $C_A\text{-Si-HA}$  lors du traitement thermique sous  $\text{CO}_2$ . Une phase secondaire silicatée apparaît.

- $C_B\text{-Si-HA}$  : carbonates en site B et silicates en site B. C'est le cas de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  après précipitation et non calcinée à haute température. En raison de la faible cristallinité de la poudre, ses paramètres de maille n'ont pas pu être calculés. La structure est apatitique et ne présente pas de phase secondaire cristalline ou amorphe.



Toutefois, des interactions entre silicates et carbonates en site B existent ( $\text{SiO}_4 \text{PO}_4^- / \text{CO}_3 \text{PO}_4^+$ ). Pour témoin, l'intensité des bandes infrarouges relatives aux  $\text{SiO}_4$  dans HA (e.g. 751 et 890  $\text{cm}^{-1}$  Figure 36 p. 66 et Figure 46 p. 75) change en fonction de la présence ou non des carbonates de type B. De plus, la présence de silicates semble faciliter l'intégration des carbonates dans la structure lors de la précipitation comme en témoigne l'analyse IR (Figure 35 p. 65) et le dosage de la teneur en carbone des poudres  $\text{C}_B\text{-HA}$  et  $\text{C}_B\text{-Si-HA}$ .

A noter cependant qu'en raison de la présence de lacune en site hydroxyde dans la structure de la poudre brute, la formule hypothétique de la phase  $\text{C}_B\text{-Si-HA}$  (Eq. II-4 p. 35), et par conséquent la réaction de la précipitation de cette phase  $\text{C}_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  (Eq. II-8 p. 37), ne sont pas vérifiées.



**Figure 50** : Schéma récapitulatif des évolutions des paramètres de maille en fonction des substitutions ioniques en carbonate et en silicate dans la structure apatitique par rapport à l'HA.

•  $C_{A/B}\text{-Si-HA}$  : carbonates en site A et B et silicates en site B (Figure 51 p. 81). C'est le cas de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  après calcination sous  $\text{CO}_2$  à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 1h. Ici encore la structure est apatitique et le composé ne présente pas de phase secondaire cristalline ou amorphe. Les mêmes phénomènes d'extinction de bande en infrarouge, constatés pour  $C_A\text{-Si-HA}$  et  $C_B\text{-Si-HA}$ , sont observables pour  $C_{A/B}\text{-Si-HA}$  (e.g.  $504$  et  $751\text{ cm}^{-1}$ ) (Figure 46 p. 75 et Tableau 14 p. 76).

Il apparait que la phase  $C_{A/B}\text{-Si-HA}$  est plus stable thermiquement que la phase  $C_A\text{-Si-HA}$ . Comme déjà observée pour la phase  $C_{0,5}\text{-HA}$  (Figure 30 p. 60), la place générée par la substitution des  $\text{PO}_4$  (tétraédrique) par des  $\text{CO}_3\text{PO}_4^+$  (plan) permet une meilleure intégration des  $\text{CO}_3\text{OH}^-$  dans les tunnels de type II lors de la calcination sous  $\text{CO}_2$ . La présence de  $\text{CO}_3$  en site B stabilise donc l'hydroxyapatite silicatée lors du traitement thermique sous  $\text{CO}_2$ .

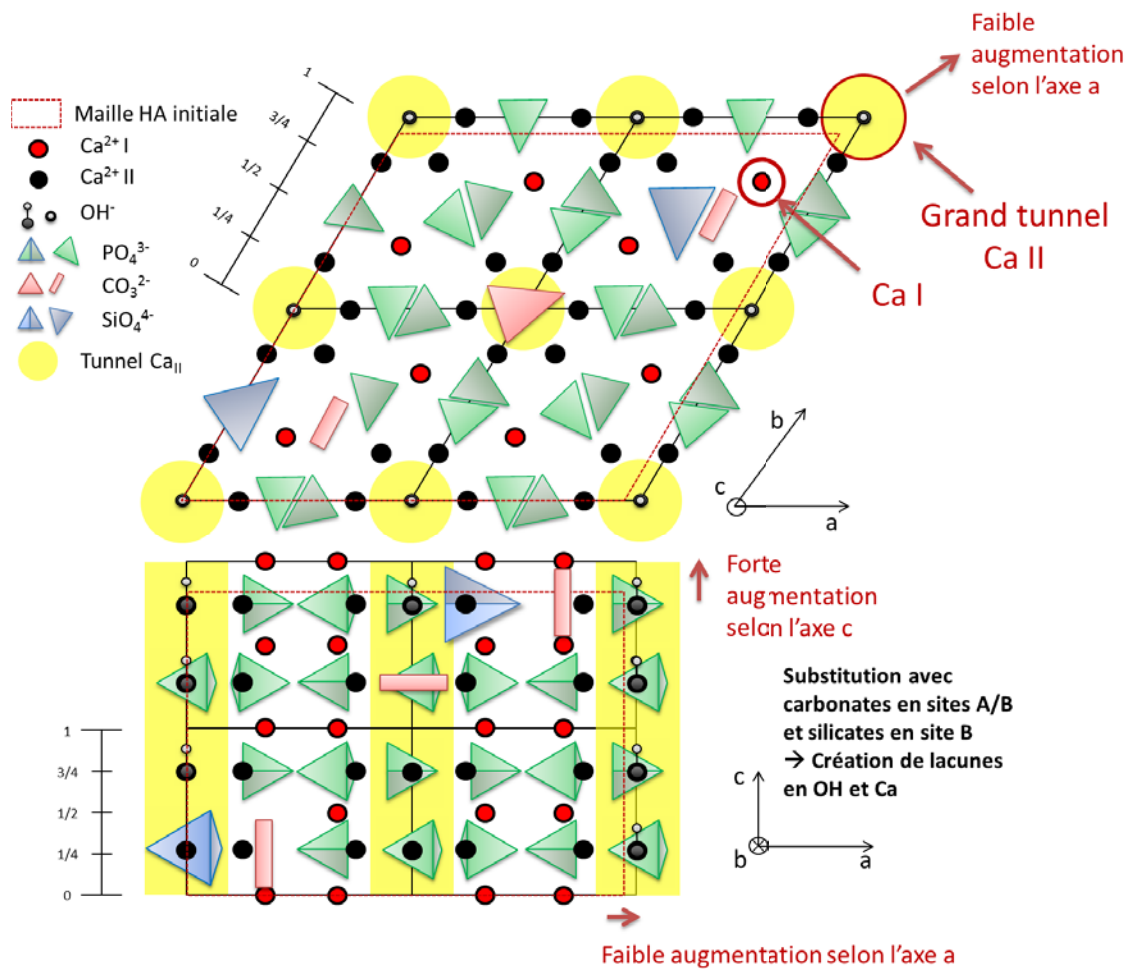


Figure 51 : Projection de la structure de  $C_{A/B}\text{-Si-HA}$  sur les plans (001) et (010).

### II.3.3. Analyse élémentaire du composé $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$

Les caractérisations précédentes ont permis de démontrer l'incorporation des groupements carbonates et silicates dans la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  pendant la synthèse.

Le Tableau 16 (p. 82) présente les résultats des dosages élémentaires obtenus pour la poudre monophasique de  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinée à  $1000^\circ\text{C}$  sous  $\text{CO}_2$  précédemment étudiée, ainsi qu'un dosage supplémentaire de la poudre brute calcinée à  $550^\circ\text{C}$  pendant 10 heures sous air. Ce dernier est utile dans la détermination de la formule élémentaire du composé. En effet, à cette température de calcination ( $550^\circ\text{C}$ ) la majorité des résidus de synthèse (*e.g.* résidus nitrés, eau...) est éliminée ; et la perte de carbonate initialement présent dans l'échantillon est limitée [Lafon, 2004]. Une calcination sous air à une température supérieure engendrerait une décarbonation de l'apatite. L'usage d'une atmosphère  $\text{CO}_2$  enrichirait quant à lui la structure en carbonate. Ce traitement thermique,  $550^\circ\text{C}$  pendant 10 heures sous air, fut ainsi défini grâce à une étude complémentaire à celle de la stabilité thermique du composé, présentée en annexe (A.3 p. 191).

**Tableau 16** : Résultats des dosages élémentaires des poudres  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinées sous air à  $550^\circ\text{C}$  pendant 10 h et sous  $\text{CO}_2$  à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 1 h - en  $\text{mmol.g}^{-1}$ .

Echantillons	Ca	P	Si	C	Ca/(P+Si+C)	Si/P
$C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ 550°C-10h air	10,64 $\pm 0,11$	4,83 $\pm 0,11$	0,54 $\pm 0,01$	0,63 $\pm 0,01$	1,775	0,112
$C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ 1000°C-1h $\text{CO}_2$	10,80 $\pm 0,20$	5,26 $\pm 0,11$	0,60 $\pm 0,01$	0,82 $\pm 0,01$	1,616	0,114

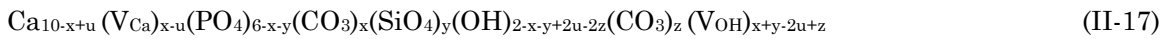
Les quantités d'éléments calcium, phosphore, silicium et carbone (mol) sont exprimées par gramme de poudre. Parmi les deux échantillons dosés, la principale différence dans les résultats se situe au niveau de la teneur en carbone. Après calcination sous air à  $550^\circ\text{C}$  pendant 10 heures, les carbones présents dans l'échantillon sont exclusivement considérés comme des carbonates de type B dans l'apatite (cf II.3.1 p. 63). La poudre traitée à  $550^\circ\text{C}$  présente alors un taux de  $0,625 \text{ mmol.g}^{-1}$  en carbone. Après calcination à  $1000^\circ\text{C}$  sous  $\text{CO}_2$ , il augmente à  $0,823 \text{ mmol.g}^{-1}$ . Ces résultats corroborent les observations faites lors des analyses infrarouges préalablement présentées (Figure 45 p. 75) où le traitement thermique sous  $\text{CO}_2$  enrichit l'apatite en carbonate de type A.

Les rapports molaires (*e.g.* Si/P) permettent de s'affranchir de l'évolution de la composition de la poudre pendant le traitement thermique (*e.g.* élimination des résidus de synthèse, déshydratation, carbonatation). Le ratio  $\text{Ca}/(\text{P}+\text{Si}+\text{C})$  est calculé à 1,616 pour la poudre calcinée à  $1000^\circ\text{C}$  sous  $\text{CO}_2$ . Ce résultat ne correspond pas à la valeur théorique attendue de 1,667, mais il est en accord avec l'enrichissement de l'apatite en

carbonate lors d'un traitement thermique sous CO<sub>2</sub>. A noter également que le ratio Si/P reste stable quel que soit le traitement thermique de la poudre.

Nous avons précédemment prouvé que le composé C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA calciné à 1000°C pendant 1 h sous CO<sub>2</sub> est cristallin, monophasique et sans trace d'impureté. Le dosage élémentaire de la poudre correspond donc au dosage élémentaire d'une seule phase. La formule chimique du composé peut donc être déterminée.

Pour cela, comme il s'agit d'une hydroxyapatite phosphocalcique co-substituée en carbonate et en silicate de type C<sub>A/B</sub>-Si-HA, et qu'aucun modèle de ce composé n'est présent dans la littérature, la formule hypothétique suivante est proposée (Eq. II-17 p. 83):



avec  $(0 \leq 2u \leq x+y+z \leq 2)$  et  $(0 \leq 2z \leq 2-x-y+2u \leq 2)$

Cette formule est issue des formules précédemment établies pour les phases C<sub>A/B</sub>-HA (Eq. I-4 p. 20) [Lafon, 2004] et Si-HA (Eq. I-5 p. 22) [Palard, 2007] où  $x$  et  $z$  sont les quantités de carbonate respectivement introduites en site B et A dans l'apatite, et où  $y$  est la quantité de silicate présente exclusivement en site B. De plus, des lacunes en sites Ca ( $\text{V}_{\text{Ca}^{2+}}$ ) et OH ( $\text{V}_{\text{OH}^+}$ ) sont créées afin de garantir l'électroneutralité de la structure.

Les coefficients stœchiométriques (*i.e.*  $x$ ,  $y$  et  $z$ ) de la poudre C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA calcinée sous CO<sub>2</sub> à 1000°C sont à présent calculées selon Eq. II-17 (p. 83). Initialement, les valeurs  $x$ ,  $y$  et  $z$  (notées  $x_i$ ,  $y_i$  et  $z_i$ ) sont fixées à l'aide des valeurs mesurées par dosage élémentaire. Ainsi, le dosage des carbones de la poudre traitée thermiquement à 550°C sous air permet d'obtenir le taux de substitution en carbonate de type B ( $x_i$ ) (Eq. II-18 p. 83).

$$x_i = \%C_{550^\circ\text{C}} \quad (\text{II-18})$$

où  $\%C_{550^\circ\text{C}}$  représente le pourcentage molaire de carbone dans la poudre traitée thermiquement à 550°C sous air.

De la même façon, la valeur de  $z_i$ , qui correspond à la teneur en carbonate en site A fixée lors de la calcination sous CO<sub>2</sub>, est renseignée en soustrayant au taux en carbone de l'échantillon calciné à 1000°C celui à 550°C (Eq. II-19 p. 83).

$$z_i = \%C_{1000^\circ\text{C}} - \%C_{550^\circ\text{C}} \quad (\text{II-19})$$

où  $\%C_{1000^\circ\text{C}}$  représente le pourcentage molaire de carbone dans la poudre traitée thermiquement à 1000°C sous CO<sub>2</sub>.

Enfin, la valeur de  $y_i$  est déterminée par le dosage élémentaire en silicium de la poudre calcinée à 1000°C (Eq. II-20 p. 83).

$$y_i = \%Si_{1000^\circ\text{C}} \quad (\text{II-20})$$

où %Si<sub>1000°C</sub> représente le pourcentage molaire de silicium dans la poudre traitée thermiquement à 1000°C sous CO<sub>2</sub>.

Aussi, la structure apatitique impose d'avoir un taux d'occupation des sites PO<sub>4</sub> (site B) égal à 6. Soit la contrainte (Eq. II-21 p. 84):

$$n_{\text{PO}_4} + x + y = 6 \quad (\text{II-21})$$

où n<sub>PO<sub>4</sub></sub>, x et y sont respectivement les coefficients stœchiométriques dans l'apatite des groupements phosphate, carbonate et silicate en site B.

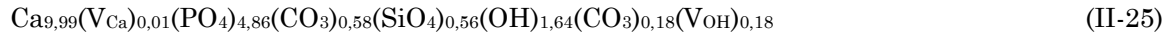
En conséquence, un facteur correctif de proportionnalité « 6/(n<sub>PO<sub>4</sub></sub> + x<sub>i</sub> + y<sub>i</sub>) » a été appliqué à l'ensemble des valeurs mesurées pour obtenir les coefficients x, y et z de la formule élémentaire de la poudre C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA calcinée à 1000°C pendant 1 h sous CO<sub>2</sub> (Eq. II-22 à II-24 p. 84).

$$x = x_i * (6/(n_{\text{PO}_4} + x_i + y_i)) \quad (\text{II-22})$$

$$y = y_i * (6/(n_{\text{PO}_4} + x_i + y_i)) \quad (\text{II-23})$$

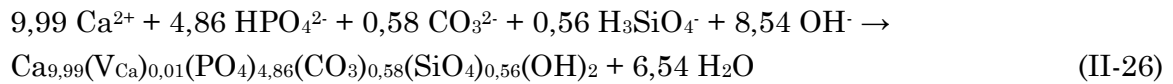
$$z = z_i * (6/(n_{\text{PO}_4} + x_i + y_i)) \quad (\text{II-24})$$

Connaissant ceci, il est maintenant possible de calculer numériquement les coefficients stœchiométriques à partir des résultats des dosages élémentaires (Tableau 16 p. 82). Une formule hypothétique de la poudre C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA calcinée à 1000°C pendant 1 h sous CO<sub>2</sub> est donnée ci-dessous (Eq. II-25 p. 84):

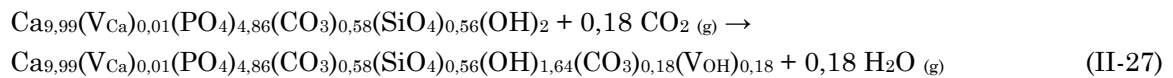


Les valeurs en silicates et carbonates en site B (*i.e.* y = 0,56 et x = 0,58) sont proches de celle attendue de 0,5 donnée par la formule de précipitation (Eq. II-4 p. 35). Le taux de carbonates en site A (z = 0,18) montre l'influence de l'atmosphère lors du traitement thermique qui conduit à la carbonatation de l'apatite.

La réaction générale de précipitation de la phase C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA, dans ces conditions expérimentales et en deuxième approximation, peut ainsi être écrite de la façon suivante (Eq. II-26 p. 84) :



Suite à la calcination sous CO<sub>2</sub>, la carbonatation constatée en site hydroxyde s'écrit selon la formule suivante (Eq. II-27 p. 84):



Les carbonates en site B sont préservés et des lacunes en site A sont créées afin de préserver l'électroneutralité lors de l'incorporation des carbonates en site A.

## II.4. Conclusion

Dans cette première partie de l'étude, nous avons synthétisé des poudres d'hydroxyapatite phosphocalciques co-substituées par des carbonates et des silicates par précipitation en voie aqueuse.

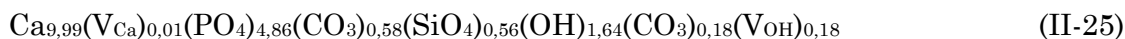
Afin d'éviter des phénomènes d'immiscibilité des réactifs, une solution précurseur d'ions silicates solubles, préparée via une réaction sol-gel, est employée. Les poudres synthétisées sont monophasiques, cristallines et de structure apatitique. L'intégration dans la structure des carbonates et des silicates en substitution des groupements phosphates se produit dès la précipitation. La reproductibilité du procédé de synthèse est vérifiée.

Les poudres C-Si-HA se décomposent à haute température sous air du fait de la perte des carbonates de type B. L'emploi de CO<sub>2</sub> comme atmosphère de calcination permet d'éviter cette décomposition et engendre une carbonatation des sites hydroxydes.

De façon plus remarquable, des interactions entre les carbonates (en site A et B) et les silicates ont été mises en évidence. Des phénomènes structuraux sont observés en analyse IR où des interactions fortes sont constatées entre SiO<sub>4</sub> et CO<sub>3</sub> (*i.e.* extinctions de bandes d'absorption spécifiques aux silicates pour les composés C-Si-HA - Tableau 14 p. 76).

Une poudre Si-HA calcinée sous CO<sub>2</sub> voit sa structure déstabilisée après l'incorporation des carbonates en site A. La présence simultanée de SiO<sub>4</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> et CO<sub>3</sub>OH<sup>-</sup> situés dans un même plan dans la structure apatitique (Figure 31 p. 61) engendre la démixtion du composé C<sub>A</sub>-Si-HA avec l'apparition d'une phase amorphe silicatée supplémentaire. L'absence de ce phénomène dans le cas d'une C<sub>A/B</sub>-Si-HA démontre l'importance des carbonates en site B dans la stabilité de l'apatite silicatée lors de sa calcination sous CO<sub>2</sub>.

Afin de déterminer précisément la composition des C<sub>A/B</sub>-Si-HA monophasiques, une méthode basée sur différents dosages élémentaires et différents traitements thermiques a été mise en place. Ainsi, dans le cas du composé étudié C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA calciné à 1000°C pendant 1h sous CO<sub>2</sub>, la formule chimique obtenue est la suivante :



Les teneurs en carbonate et en silicate en site B dans la structure sont conformes aux valeurs attendues (*i.e.* 0,5). Une légère carbonatation des sites hydroxydes suite à l'emploi du CO<sub>2</sub> comme atmosphère de calcination est confirmée.

Dans ce chapitre, une poudre monophasique d'hydroxyapatite co-substituée par des carbonates et des silicates, de composition contrôlée et définie, a été obtenue. La suite

de ce manuscrit s'attache à décrire la stabilité thermique de ce composé en vue de préparer des céramiques.

Chapitre III.  
Stabilité Thermique et  
Frittage C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA





L'évaluation des propriétés biologiques d'une hydroxyapatite co-substituée en carbonate et en silicate nécessite l'élaboration d'une céramique dense et monophasique.

Le chapitre II a démontré qu'il était possible de synthétiser une poudre monophasique de C-Si-HA. Il a également été entrevu que les apatites carbonatées de type B (C<sub>B</sub>-HA et C<sub>B</sub>-Si-HA) chauffées sous air se décomposent à des températures peu élevées (<1000°C). Le chapitre III s'intéresse au comportement thermique sous différentes atmosphères de la nouvelle phase (C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA) en vue de son frittage.

Dans un premier temps, ce chapitre déterminera les produits de décomposition en fonction de l'atmosphère de calcination, puis précisera les équations de décomposition et les températures associées.

La seconde partie de l'étude s'intéressera à la détermination des valeurs optimales des paramètres de frittage pour l'obtention de céramiques denses et monophasiques, de formule C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA.

## III.1. Matériels et méthodes

L'étude de la stabilité thermique et du frittage des poudres C-Si-HA est menée à partir de la même composition que celle synthétisée dans le chapitre II :  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ . Après synthèse et avant toutes caractérisations, les poudres brutes d'hydroxyapatite co-substituées avec des carbonates et des silicates sont précalcinées sous air pendant 2 h à 400°C afin d'éliminer un maximum de résidus de synthèse.

### III.1.1. Analyses thermiques

#### III.1.1.1. Protocoles de calcination et analyses physico-chimiques des poudres

Dans le cadre de l'étude de la stabilité thermique, la poudre est chauffée à différentes températures, de 500°C à 1300°C, sous deux atmosphères différentes : air ambiant (pression atmosphérique assimilée à 1 bar) et  $\text{CO}_2$  (99,9995% AirLiquide, France,  $P_{\text{CO}_2}$  = pression atmosphérique). Les fours de calcination utilisés sont respectivement un four Nabertherm LH30/14 (air), et un four tubulaire Nabertherm couplé à un appareil régulateur de débit pour l'introduction du  $\text{CO}_2$  (Wetsys - Setaram Instrumentation). Les différentes valeurs des paramètres de calcination sont présentées dans le Tableau 17 (p. 90).

**Tableau 17 :** Valeurs des paramètres de calcination (de 500°C à 1300°C) pour la caractérisation physico-chimique des poudres  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ .

Atmosphère	Vitesse de montée	Durée du palier	Caractérisations
Air ambiant	$\pm 4^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	0 h	DRX / FTIR
$\text{CO}_2$ (P = 1 bar)	$\pm 5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	1 h	DRX / FTIR

L'analyse qualitative des phases cristallines au sein des poudres calcinées et des comprimés frittés est faite par diffraction des rayons X. Un test phénolphtaléine est également réalisé afin de confirmer la présence ou non de chaux, après le recuit de l'échantillon sous air à 550°C pendant 10 h selon le protocole décrit au chapitre précédant (II.1.2.1 p. 37).

De même, le protocole de la spectrométrie infrarouge (IR) des échantillons étudiés dans ce chapitre (poudres calcinées et comprimés frittés et broyés) est analogue à celle introduite précédemment (II.1.2.2 p. 39).

Enfin, les concentrations élémentaires des échantillons sont déterminées selon les mêmes protocoles que ceux décrits au chapitre II (II.1.2.3 p. 39), à savoir par un analyseur CS pour le dosage du carbone et par ICP/AES pour ceux des éléments calcium, phosphore et silicium.

A noter qu'à l'exception du test phénolphtaléine réalisé sur poudre chaude, ces précédentes caractérisations sont effectuées à température ambiante.

### III.1.1.2. Analyses thermogravimétriques et spectrométrie de masse

L'analyse thermogravimétrique (ATG) est une technique d'analyse thermique qui consiste à mesurer la variation de masse d'un échantillon en fonction de la température. Pour cette étude, l'ATG est couplée à un spectromètre de masse (SM) afin de déterminer les températures de dégradation et la nature des gaz émis lors du traitement thermique des poudres apatitiques.

Pour une meilleure compréhension de la stabilité thermique du composé d'étude  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA, les poudres de référence HA,  $C_{0,5}$ -HA et  $Si_{0,5}$ -HA ont également été analysées. L'appareillage utilisé pour l'étude ATG est un four haute température SETARAM 92-16-18. Les expériences sont effectuées dans des creusets en alumine contenant environ 20 mg de poudre. La rampe de montée en température est fixée à  $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , de  $30^{\circ}\text{C}$  jusqu'à  $1300^{\circ}\text{C}$ . Deux atmosphères d'étude sont utilisées : hélium et  $\text{CO}_2$  (Air Liquide, France) ( $P = 1$  bar). Sous hélium, un spectromètre de masse (OmniStar Pfeiffer Vacuum) est utilisé pour l'identification des gaz émis lors de la décomposition thermique. Dans le Tableau 18 (p. 91) figurent les masses moléculaires et les espèces chimiques associées faisant l'objet d'un suivi durant l'étude spectrométrique. A noter qu'en fonction de l'isotope, une même espèce chimique peut avoir différentes masses associées.

**Tableau 18 :** Masses moléculaires et espèces chimiques associées suivies par SM [Lafon, 2004].

Masse	Espèces chimiques	Masse	Espèces chimiques
12	C	30	NO
14	N	32	$\text{O}_2$
16	O	44	$\text{CO}_2$ , $\text{N}_2\text{O}$
17	HO, $\text{NH}_3$	45	$^{13}\text{CO}_2$ , $^{17}\text{NNO}$
18	$\text{H}_2\text{O}$ , $^{18}\text{O}$	46	$\text{NO}_2$ , $\text{CO}^{18}\text{O}$
28	CO, $\text{N}_2$		

Lors de l'exploitation des résultats de l'ATG, le pourcentage de perte de masse est normalisé à 0% à la température de  $400^{\circ}\text{C}$  en raison de la précalcination des poudres à cette même température.

## III.1.2. Elaboration des céramiques

### III.1.2.1. Préparation des poudres : analyse BET

Pour obtenir un comprimé de poudre cohésif et dans le but d'éviter le délaminage des pastilles lors de la phase de pressage, la surface spécifique de la poudre est abaissée à environ  $30 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  ([Lafon, 2004; Palard, 2007]) à l'aide d'un traitement thermique. La température de précalcination de la poudre, avant le pressage uniaxial, a ainsi été déterminée sur la base de l'évolution de sa surface spécifique avec la température. Cette étude a été réalisée par la méthode BET 5 points à l'aide d'un appareillage Micrometrics ASAP2010. Au préalable, les poudres sont dégazées à  $250^\circ\text{C}$  sous vide afin d'éliminer les espèces adsorbées, soit principalement l'eau et le dioxyde de carbone. La valeur de surface spécifique est obtenue à partir de la mesure de l'isotherme d'absorption de  $\text{N}_2$  à la température de 77 K. La masse de poudre utilisée pour chaque analyse est d'environ 700 mg.

### III.1.2.2. Mise en forme des comprimés

Les préformes sont obtenues par pressage uniaxial d'environ 450 mg de poudre précalcinée dans une matrice cylindrique en acier inoxydable de 12,7 mm de diamètre. Pour cela, une pression de 50 MPa est appliquée pendant une minute à l'aide d'un appareillage Lloyd Instruments LR50K. Les vitesses de montée ( $5 \text{ mm}.\text{min}^{-1}$ ) et de descente ( $0,1 \text{ mm}.\text{min}^{-1}$ ) en charge sont contrôlées de manière précise. Afin d'augmenter le taux de compaction en cru, les préformes sont ensuite pressées isostatiquement dans un bain d'huile à 300 MPa (Nova Swiss NV2-40-4E).

### III.1.2.3. Analyses dilatométriques

L'analyse dilatométrique est une technique d'analyse thermique qui consiste à mesurer la dilatation linéaire d'un objet en fonction de la température. Les analyses dilatométriques sont réalisées via un dilatomètre SETARAM TMA92. Elles sont pratiquées sur des comprimés issus du procédé d'élaboration décrit dans la partie précédente (III.1.2.2 p. 92). Afin de considérer les dilatations thermiques propres à l'appareillage, des mesures dilatométriques sans échantillon (blanc) sont effectuées et les valeurs obtenues sont soustraites lors du traitement des données. La rampe de montée en température ainsi que l'atmosphère de calcination sont similaires à celles utilisées en ATG ainsi que lors du frittage des céramiques : *i.e.*  $5^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$  sous  $\text{CO}_2$  ( $P_{\text{CO}_2} = 1 \text{ bar}$ ).

### III.1.2.4. Frittage des comprimés

A partir des données dilatométriques, différentes températures de frittage sont testées. Les comprimés sont ainsi frittés à haute température pendant 1 heure dans un

four tubulaire à atmosphère contrôlée ( $P_{CO_2} = 1$  bar). La rampe de montée et de descente en température est fixée à  $\pm 5^\circ C.min^{-1}$ .

### III.1.2.5. Analyses morphologiques des comprimés

Afin d'observer la microstructure des comprimés, un polissage "miroir" est réalisé. Pour ce faire, une polisseuse Mecapol P320 (Presi) est utilisée avec un lot graduel (de  $45 \mu m$  à  $1 \mu m$ ) de pates diamantées et de disques abrasifs.

La microstructure des échantillons frittés est observée par microscopie électronique à balayage (MEB) à l'aide d'un appareillage JEOL 6500 F après déposition d'une fine couche conductrice d'or ( $\sim 10$  nm) à leur surface (Q150R ES, Quorum Technologies). Une révélation des joints de grains par gravage thermique est préalablement effectuée sur les comprimés polis ( $1 \mu m$ ). Les échantillons sont ainsi calcinés pendant 30 minutes à une température inférieure de  $50^\circ C$  à celle du palier de frittage et sous la même atmosphère. Ici encore, les rampes de montée et de descente en température sont fixées à  $\pm 5^\circ C.min^{-1}$ .

La taille des grains est déterminée via l'analyse des images acquises au MEB à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health, USA). Dans un premier temps, les contours des grains sont accentués (noircis). Ceci renforce le contraste et facilite la binarisation de l'image par le logiciel. Plusieurs micrographies sont analysées pour un même échantillon afin d'avoir une évaluation représentative de la microstructure et de prendre en compte son éventuelle hétérogénéité. Une fois les images analysées, les valeurs des tailles des grains sont données par le logiciel en Diamètre Cercle Equivalent (DCE). Le DCE représente le diamètre du disque ayant la même surface que le grain. Ainsi, les grains sont approximés à des sphères.

La densité des échantillons frittés est déterminée en utilisant le principe de la poussée d'Archimède dans de l'éthanol à 99%. Cette méthode consiste à effectuer trois pesées de l'échantillon : (i) à sec ( $m_{sec}$ ), (ii) humide ( $m_{humide}$ ), et (iii) immergé ( $m_{immergé}$ ). La densité mesurée ( $d_m$ ) est calculée à partir de la relation (Eq. III.1 p. 93):

$$d_m = m_{sec} / [(m_{humide} - m_{immergé}) / d_{éthanol}] \quad (III-1)$$

Le taux de densification (D) est calculé en divisant la densité mesurée par la densité théorique ( $d_t$ ) (Eq. III-2 p. 93). L'incertitude de mesure sur la valeur du taux de densification est d'environ 1% [Lafon, 2004].

$$D = d_m / d_t \quad (III-2)$$

La densité théorique de l'HA stœchiométrique est égale à 3,156 (référence PDF 9-432). Toutefois, dans le cas des compositions substituées par des groupements carbonates et/ou silicates et du fait de la présence de lacunes en site calcium et/ou hydroxyde, la densité théorique évolue. La densité théorique peut être déterminée par

l'intermédiaire du rapport de la masse volumique théorique ( $\rho_t$ ) et de la masse volumique de l'eau ( $\rho_{\text{eau}}$ ) (Eq. III-3 p. 94).

$$d_t = \rho_t / \rho_{\text{eau}} \quad (\text{III-3})$$

avec  $\rho_{\text{eau}} = 1 \text{ g.cm}^{-3}$  ; et  $\rho_t$  est définie selon la formule suivante (Eq. III-4 p. 94):

$$\rho_t = M_{\text{C-Si-HA}} / (V_{\text{C-Si-HA}} \times N_A) \quad (\text{III-4})$$

avec :

- $M_{\text{C-Si-HA}}$  : la masse molaire du composé C-Si-HA (en  $\text{g.mol}^{-1}$ )
- $V_{\text{C-Si-HA}}$  : le volume d'une maille cristalline de C-Si-HA (en  $\text{cm}^3$ )
- $N_A$  : le nombre d'Avogadro :  $6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

La masse molaire  $M_{\text{C-Si-HA}}$  est déterminée par dosage élémentaire. Le volume de la maille  $V_{\text{C-Si-HA}}$  est calculé à l'aide des paramètres de maille déterminés par l'analyse structurale du composé cristallin. Il s'agit ici de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinée à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 1 heure sous  $\text{CO}_2$  (Tableau 15 p. 78), soit une température et donc une composition différente de celle des pastilles frittées. Ceci induit une approximation au niveau de  $d_t$  qui vient s'ajouter aux erreurs de mesure.

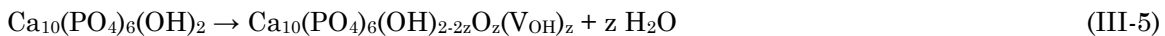
## III.2. Stabilité thermique

Par définition une céramique subit un traitement thermique de frittage au cours duquel sa stabilité doit être assurée. Outre la température de frittage, nous avons vu que l'atmosphère du traitement thermique semble essentielle pour ces hydroxyapatites carbo-silicatées. Ainsi, ce chapitre se propose de décrire la stabilité thermique de la poudre  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA sous différentes atmosphères (air, hélium et  $CO_2$ ) à l'aide d'analyses thermogravimétriques, structurales et spectrométriques.

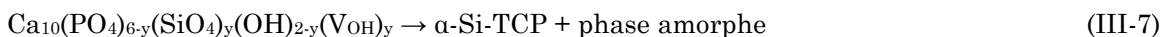
### III.2.1. Généralités sur la stabilité thermique des composés apatitiques

Peu d'études sur la stabilité thermique des composés C-Si-HA ont été menées [Mostafa, 2009; Sprio, 2008], et aucune d'entre elles n'a présenté de mécanisme de décomposition. Afin de mieux comprendre les évolutions de la phase  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA lors de la calcination, les comportements thermiques des phases apatitiques de référence (HA, Si-HA et C-HA) sont à présent rappelés :

- Une poudre d'HA stœchiométrique perd ses groupements hydroxyles par déshydratation sous air à partir de  $900^\circ C$  ( $850^\circ C$  sous vide) formant une oxy-hydroxyapatite (Eq. III-5 p. 95). Une fois transformée en oxyapatite, elle se décompose à haute température ( $>1350^\circ C$  sous air) en TCP et TTCP (Eq. III-6 p. 95) [Liao, 1999; Tónsuaadu, 2012] :



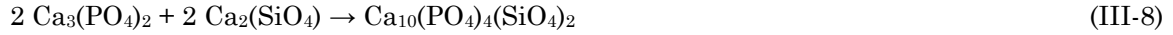
- Des précédents travaux internes au laboratoire sur les Si-HA indiquent que la température de décomposition d'une poudre de Si-HA est fonction de la quantité de silicate incorporée dans la structure apatitique [Marchat, 2013b]. Plus elle est élevée, plus la température de décomposition est basse. A titre indicatif, dans le cas d'une  $Si_{0,5}$ -HA, la dégradation de la phase silicatée se produit vers  $1200^\circ C$ , alors qu'elle s'opère vers  $1100^\circ C$  dans le cas d'une  $Si_{1,0}$ -HA. La stabilité thermique de la phase Si-HA est également fonction de la pression partielle en eau : *i.e.* une atmosphère anhydre abaisse la température de décomposition [Marchat, 2013b]. Un bilan général de la décomposition est présenté par l'Eq. III-7 p. 95 :



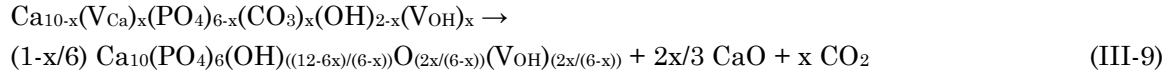
La silicocarnotite ( $Ca_{10}(PO_4)_4(SiO_4)_2$ ) peut également être un produit de la décomposition thermique des composés Si-HA [Palard, 2007; Kim, 2003; Bianco, 2009]. Dans ce cas, la silicocarnotite peut être issue d'une réaction impliquant le phosphate



tricalcique TCP ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) et le silicate de calcium ( $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$ ) comme suit (Eq. III-8 p. 96):

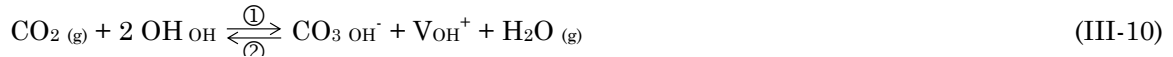


• Comme évoquée dans le chapitre II (Eq. II-10 p. 49), la poudre de  $C_B\text{-HA}$  se décarbonate lors d'un traitement thermique sous air, ce qui entraîne la décomposition de l'apatite selon l'équation générale Eq. III.9 (p. 96) [Lafon, 2003; Barralet, 2002; Tónsuaadu, 2012].



avec ( $0 \leq x \leq 2$ )

En fonction de la teneur initiale de l'apatite en carbonate, la réaction débute à plus ou moins haute température ( $600^\circ\text{C}$  à  $700^\circ\text{C}$ ) sous air [Lafon, 2004]. Elle peut être décalée à de plus hautes températures dans le cas d'une calcination sous une atmosphère riche en  $\text{CO}_2$  comme vue dans le chapitre II [Lafon, 2003]. A noter toutefois que la calcination sous  $\text{CO}_2$  enrichit l'apatite en carbonate en site A selon le sens 1 de la réaction Eq. III-10 (p. 96) (présentée également au chapitre précédent avec l'Eq. II-12 p. 54).

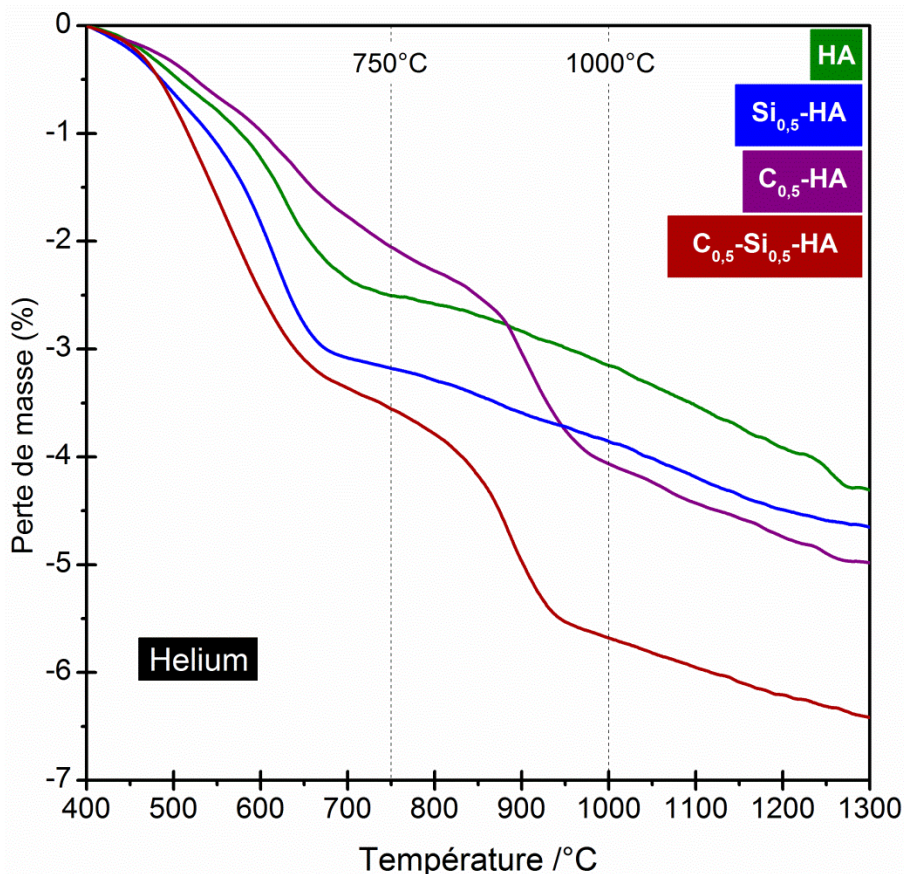


## III.2.2. Comportement thermique des poudres : sous air (et hélium)

### III.2.2.1. Analyses thermogravimétriques

Les résultats de l'analyse thermogravimétrique de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  ainsi que des poudres de référence (*i.e.* HA,  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$  et  $C_{0,5}\text{-HA}$ ) sont présentés sur la Figure 52 (p. 97). Quelle que soit la composition initiale, les poudres d'apatites se caractérisent par une perte de masse continue lors de la montée en température.

Suivant la composition de l'apatite, les masses totales perdues sont comprises entre 4,3 % et 6,5 % de  $400^\circ\text{C}$  à  $1300^\circ\text{C}$  (Tableau 19 p. 97). D'une manière générale, les courbes ATG permettent de distinguer trois domaines de température ( $400^\circ\text{C}\text{-}750^\circ\text{C}$ ,  $750^\circ\text{C}\text{-}1000^\circ\text{C}$ , et  $1000^\circ\text{C}\text{-}1300^\circ\text{C}$ ) qui se différencient les uns des autres par leur vitesse de perte de masse.

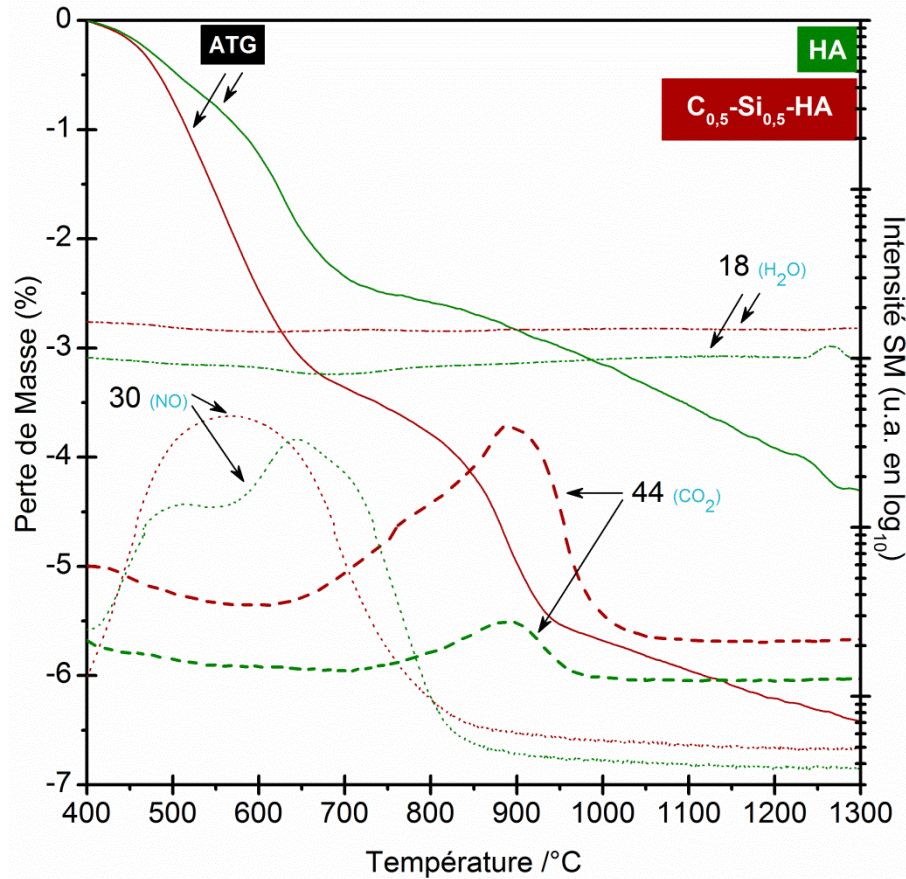


**Figure 52 :** Courbes thermogravimétriques des poudres HA,  $Si_{0,5}$ -HA,  $C_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA réalisées sous gaz inerte (He).

**Tableau 19 :** Perte de masse des poudres HA,  $Si_{0,5}$ -HA,  $C_{0,5}$ -HA et  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA lors de l'analyse thermogravimétrique réalisée sous gaz inerte (He).

Composition	400-750°C (%)	750-1000°C (%)	>1000°C (%)	Total (%)
HA (He)	2,50	0,65	1,19	4,34
$Si_{0,5}$ -HA (He)	3,18	0,69	0,78	4,65
$C_{0,5}$ -HA (He)	2,05	2,01	0,92	4,98
$C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA (He)	3,56	2,12	0,75	6,43

Ces pertes de masse sont caractérisées par des départs gazeux spécifiques, mis en évidence par leur masse moléculaire (Tableau 18 p. 91). L'addition des signaux relatifs aux masses 18, 30 et 44 permet d'identifier les principales pertes de masses observées sur la courbe ATG entre 400°C et 1300°C sous atmosphère inerte [Lafon, 2004] (e.g. HA et  $C_{0,5}$ - $Si_{0,5}$ -HA détaillés Figure 53 p. 98).



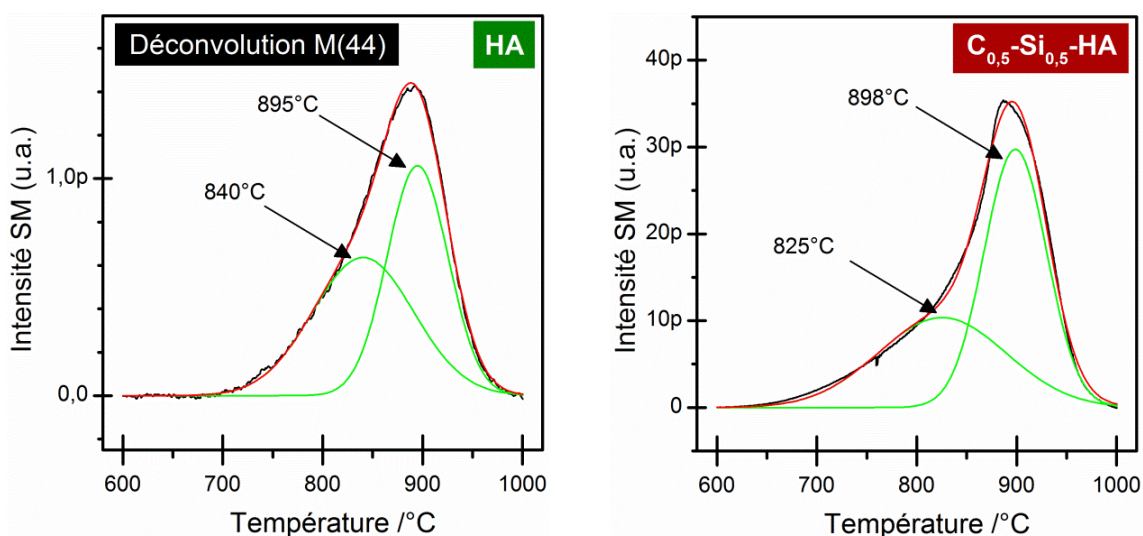
**Figure 53 :** Courbes thermogravimétriques et émission des masses 18, 30 et 44 des poudres HA et  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  réalisées sous hélium.

En fonction de la composition des poudres apatitiques, les variations de masses des échantillons dans le premier domaine, entre 400°C et 750°C, sont inégales (de 2 % à 3,5 % en masse - cf. Tableau 19 p. 97). En raison de la précalcination des poudres à 400°C pendant 2 heures avant l'analyse thermogravimétrique, le dégagement d'eau, habituellement rencontré entre 20°C et 600°C [Lafon, 2004; Palard, 2007], est peu marqué. Les départs gazeux entre 400°C et 800°C sont associés à l'émission de la masse 30, correspondant à l'élimination des résidus de synthèse nitrés. Leurs proportions semblent ainsi peu variables entre les poudres d'HA et de  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$ . La légère différence constatée peut toutefois s'expliquer par la variation des surfaces spécifiques des poudres étudiées. Dans ce domaine de température, les pertes de masses sont associées au dégagement des espèces adsorbées de surface. Ainsi, la fixation d'espèce à la surface et, par conséquent, la perte de masse durant la calcination, sont proportionnelles à la surface spécifique de la poudre.

Dans le deuxième domaine de température, entre 750°C et 1000°C, les spectres de masse indiquent une émission majoritaire de la masse 44. L'absence d'émission de produit nitré de masse inférieure (*e.g.* NO ( $M=30$ )) exclut l'hypothèse du protoxyde d'azote, et permet d'affirmer qu'il s'agit d'un dégagement de dioxyde de carbone. Aussi,

les composés carbonatés (*i.e.*  $C_{0,5}\text{-HA}$  et  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ ) se caractérisent par une perte de masse plus importante avec environ 2 % de perte massique contre 0,65 % pour les composés non carbonatés (*i.e.* HA et  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$ ) (cf. Tableau 19 p. 97).

Les déconvolutions des courbes associées à l'émission de la masse 44 sont présentées sur la Figure 54 (p. 99) pour les poudres d'HA et de  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ . Elles font apparaître l'existence de deux départs de  $\text{CO}_2$  d'origines distinctes. Le premier d'entre eux débute aux alentours de 625°C et 700°C respectivement pour les poudres de  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  et d'HA, et est centré vers 825°C et 840°C respectivement. Le second départ commence pour les deux compositions vers 800°C avec un maximum vers 895°C/898°C. A noter également que les intensités des aires déconvoluées sont proportionnelles à la quantité de gaz  $\text{CO}_2$  émise, et que celles-ci sont 23 fois plus intenses pour  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  que pour HA. Au-delà de 1000°C, aucun autre départ de masse lié au  $\text{CO}_2$  n'est détecté.



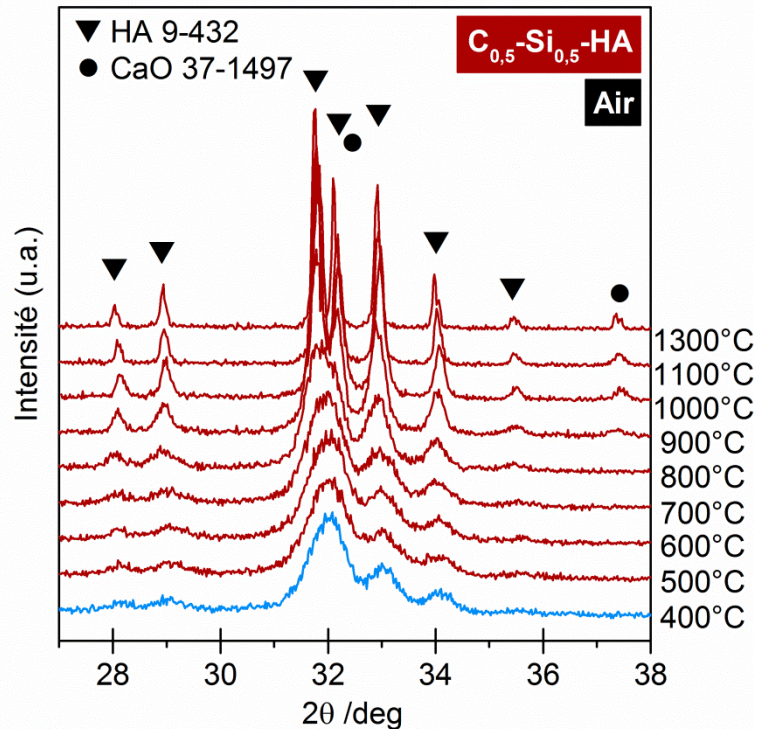
**Figure 54** : Déconvolution du spectre d'émission de la masse 44 acquis lors de l'ATG de l'HA et de  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  (avec  $p = 10^{12}$ ).

Dans le troisième domaine de température, ( $T > 1000^\circ\text{C}$ ), les pertes de masse des quatre composés apatitiques, HA,  $\text{Si}_{0,5}\text{-HA}$ ,  $C_{0,5}\text{-HA}$  et  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ , sont continues (Figure 52 p. 97) et approximativement égales (Tableau 19 p. 97). Il s'agit essentiellement de pertes en eau avec une fluctuation plus prononcée vers  $1260^\circ\text{C}$  dans le cas de l'HA. Ce phénomène, très visible sur la spectrométrie de masse de l'HA pour  $M=18$  (Figure 53 p. 98), correspond à la perte des groupements hydroxyles par déshydratation de l'oxy-hydroxyapatite qui se poursuit jusqu'à ce que la structure apatitique se décompose selon les réactions Eq. III-5 et III-6 (p. 95) [Lafon, 2004].

A noter qu'ici cette réaction est décalée à de plus basses températures que sous air ( $>1350^\circ\text{C}$  [Liao, 1999; Tõnsuaadu, 2012]) en raison de la faible pression de vapeur d'eau sous hélium, déplaçant l'équilibre thermodynamique de déshydratation de l'HA vers les basses températures.

### III.2.2.2. Analyses structurales

Les diagrammes de diffraction des rayons X des poudres  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinées à différentes températures sous air sont regroupés sur la Figure 55 (p. 100).



**Figure 55** : Diffractogrammes de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinée sous air à différentes températures (de 400°C à 1300°C).

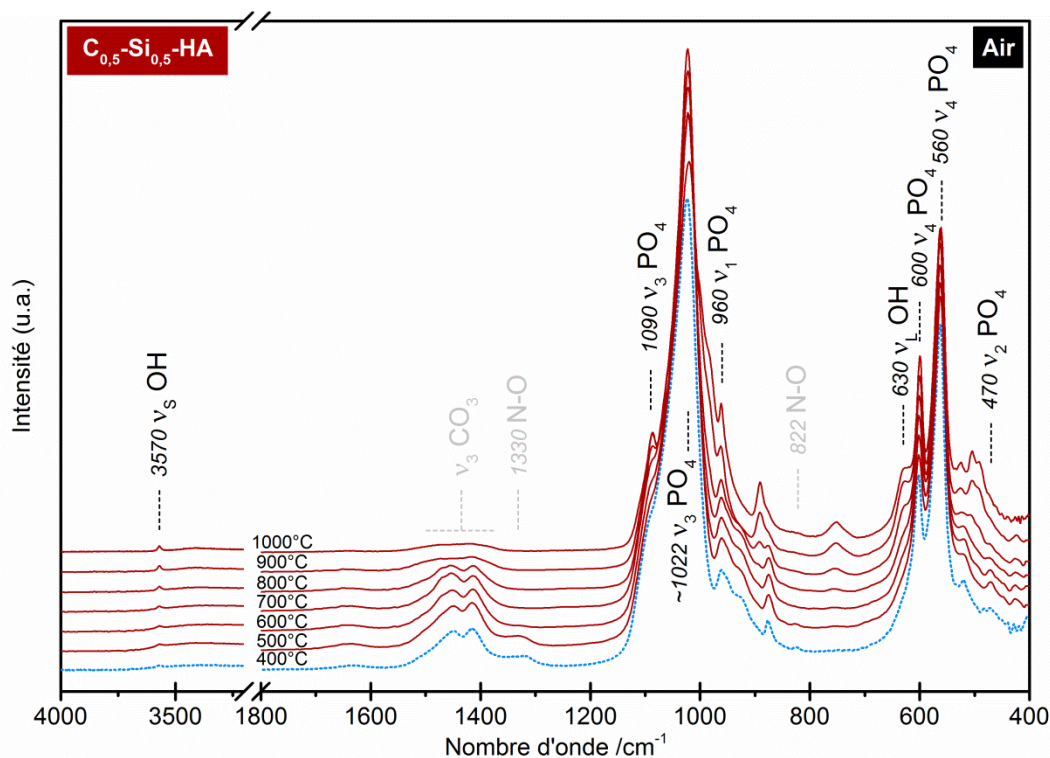
D'une manière générale, les raies de diffraction s'affinent avec la montée en température. Ceci traduit une augmentation de l'ordre local (*i.e.* ici de la cristallinité), mais aussi très certainement de la taille des grains de la poudre. Les profils sont caractéristiques d'une phase apatitique (PDF n°9-432). Les raies de diffraction propres à la chaux (CaO - PDF n°37-1497) sont observables en plus de celles de l'apatite à partir de 900°C. Un test à la phénolphtaléine (plus sensible que la DRX) confirme la présence de CaO, et donc la décomposition de la phase apatitique carbonatée, dès 800°C sous air.

### III.2.2.3. Spectrométrie Infrarouge

L'allure générale des spectres infrarouges des poudres  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinées à différentes températures sous air est présentée Figure 56 (p. 101). Les spectres infrarouges des poudres  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinées sous air présentent les bandes d'absorption caractéristiques de l'hydroxyapatite phosphocalcique quelle que soit la température de calcination. Les bandes d'absorption spécifiques des résidus de synthèse nitrés (*e.g.* 820 et 1320  $cm^{-1}$ ) disparaissent complètement au-delà de 600°C. Les bandes relatives aux groupements carbonates tendent également à disparaître lors

de la montée en température sous air (Figure 57 p. 102). Leurs intensités décroissent dès que la température de calcination devient supérieure à 700°C. La disparition des bandes d'absorption spécifiques aux  $\text{CO}_3$  de type B (e.g. centré vers 875  $\text{cm}^{-1}$ ) semble simultanée et inversement proportionnelle à l'intensification de celles liées aux groupements  $\text{SiO}_4$  (e.g. 490, 504, 751 et 890  $\text{cm}^{-1}$ ) et OH (e.g. 630 et 3570  $\text{cm}^{-1}$ ) (Figure 58 p. 102). Après calcination sous air à 1000°C de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ , les bandes d'absorption caractéristiques des groupements carbonates ont presque complètement disparu. Quelle que soit la température de traitement thermique, aucune phase secondaire (e.g. TCP, silicium en phase amorphe...) n'est détectée par spectrométrie infrarouge dans la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ .

L'étude infrarouge des poudres  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinées à différentes températures sous air permet de corroborer les résultats obtenus dans le chapitre précédent où des interactions fortes entre les  $\text{CO}_3\text{PO}_4^+$  et les  $\text{SiO}_4\text{PO}_4^-$  ont été soupçonnées. Effectivement, la disparition progressive des  $\text{CO}_3$  de type B dans une hydroxyapatite carbo-silicatée monophasique entraîne simultanément l'apparition des bandes caractéristiques des groupements  $\text{SiO}_4$  dans la maille apatitique. Des interactions structurales fortes semblent donc bel et bien exister entre les  $\text{CO}_3$  et les  $\text{SiO}_4$  en site  $\text{PO}_4$ .



**Figure 56 :** Spectres IR de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinée sous air à différentes températures (de 400°C à 1000°C).

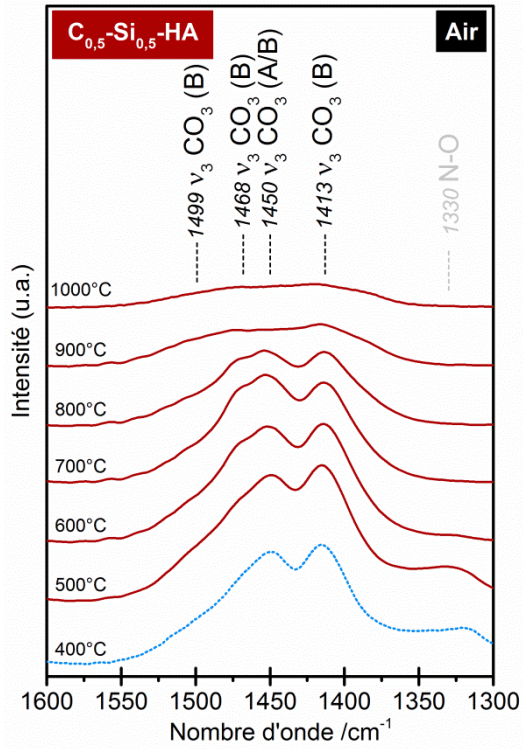


Figure 57 : Spectres IR de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinées sous air à différentes températures : de 400°C à 1000°C - domaine des  $v_3 CO_3$ .

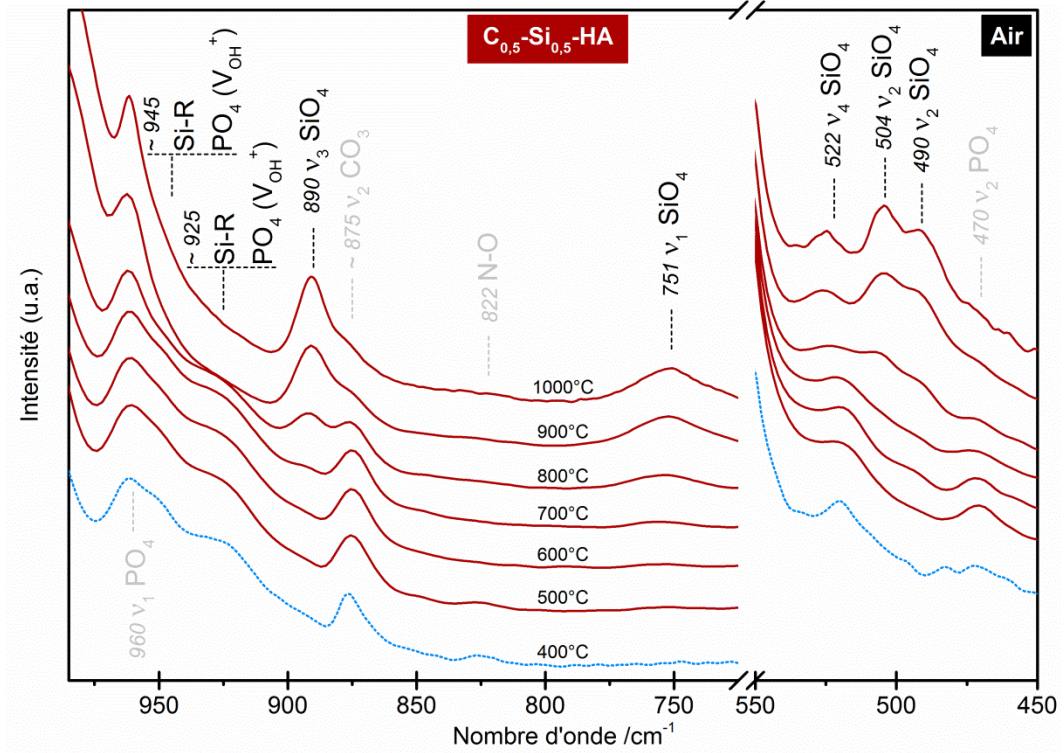


Figure 58 : Spectres IR de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinées sous air à différentes températures (de 400°C à 1000°C) - domaine des  $SiO_4$ .

### III.2.2.4. Discussion

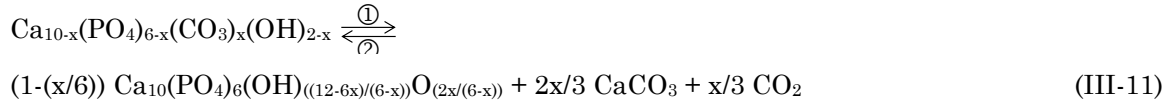
La poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  d'hydroxyapatite co-substituée par des carbonates et des silicates présente plusieurs phénomènes de décomposition thermique lors de sa calcination sous air.

En premier lieu figurent les réactions liées à l'élimination des résidus de synthèse et des espèces adsorbées. Il est connu que les apatites préparées par voie liquide perdent de l'eau entre 20°C et 400°C, et ce, qu'elles soient synthétisées à partir de sels de sodium, de fluor ou d'ammonium [Labarthe, 1973; Lafon, 2004; El Feki, 1994; Zyman, 2009; Tõnsuaadu, 2012; Tõnsuaadu, 2003]. Aussi, il est nécessaire de distinguer l'eau adsorbée en surface, dont la désorption est maximale autour de 100°C, de l'eau de constitution qui est insérée au sein de la structure. Cette dernière devant diffuser dans le matériau afin d'être évacuée, nécessite un apport en énergie plus important et donc un traitement thermique à de plus haute température (jusqu'à 450°C environ [Tõnsuaadu, 2012]). Dans notre étude, les analyses thermogravimétriques sont effectuées sur des poudres précalciniées sous air à 400°C pendant 2 heures. L'essentiel de la perte en masse d'eau n'a donc pas été observée sur les courbes d'ATG.

Dans le cadre de cette étude, la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  est synthétisée à l'aide de réactifs nitrés et ammoniacés. D'après l'analyse par spectrométrie de masse des gaz émis lors de l'ATG, les résidus nitrés de synthèse sont évacués entre la température ambiante et 800°C (Figure 53 p. 98), alors qu'ils disparaissent pour des températures supérieures à 700°C sur les spectres IR. Cette déviation s'explique par la différence entre les cycles thermiques relatifs aux ATG-SM et à la spectrométrie IR. L'étude des gaz émis par spectrométrie de masse est réalisée *in situ* au moment de la montée en température (+ 5°C.min<sup>-1</sup>), alors que pour la spectrométrie IR, les poudres sont calcinées plus longuement (+4°C.min<sup>-1</sup>), avant d'être analysées à température ambiante.

A partir de 625°C environ, l'analyse thermogravimétrique sous hélium de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  présente une perte de masse associée à un dégagement de CO<sub>2</sub> (Figure 53 p. 98). Cette décarbonatation est le résultat de deux contributions d'origines distinctes, maximales à 825°C et 898°C, et semble prendre fin aux alentours de 1000°C (Figure 54 p. 99). Dans le cas voisin de l'hydroxyapatite carbonatée (C-HA), J-P. Lafon [Lafon, 2004] observe également deux départs successifs de carbonate lors de la calcination. Par exemple, la décarbonatation d'une poudre  $C_{0,7}\text{-HA}$  débute à 650°C pour se terminer à 1050°C, et connaît deux maxima à environ 750°C et 950°C [Lafon, 2004]. J-P. Lafon explique que le premier départ de carbonate est directement issu de la décomposition de l'apatite lors de la calcination sous atmosphère inerte et sans apport d'eau atmosphérique (sens 1 de l'Eq. III-11 p. 104).

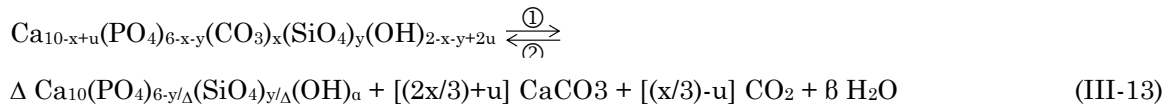




Un produit de décomposition intermédiaire est alors formé : CaCO<sub>3</sub>. Le second départ de carbonate nait de la décomposition thermique de CaCO<sub>3</sub> selon le sens 1 de la réaction suivante (Eq. III-12 p. 104).

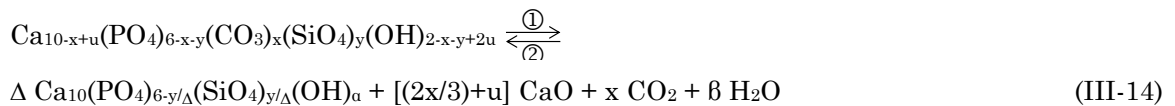


Appliquées à la composition générale d'une C<sub>B</sub>-Si-HA, la réaction de décarbonatation sous atmosphère inerte, avec la formation de CaCO<sub>3</sub> en phase intermédiaire, devient la suivante (Eq. III.13 p. 104) :



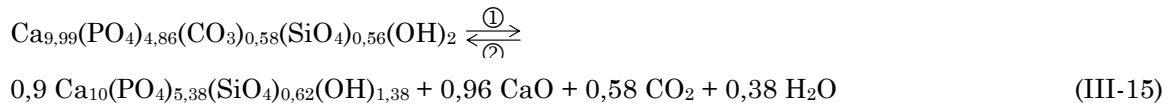
avec :  $\Delta=1-(x/6)$  ;  $\alpha=[2-y-(x/3)]/\Delta$  ;  $\beta=(-x/3)+u$

Il est à noter que quelle que soit la composition étudiée en ATG-SM sous hélium, la température de départ du deuxième dégagement reste constante (*i.e.* 800°C - Figure 54 p. 99). Ceci confirme vraisemblablement que ce dégagement gazeux est issu de la décomposition d'un même composé (*i.e.* CaCO<sub>3</sub>). Or, la décarbonatation du CaCO<sub>3</sub> en CaO sous atmosphère inerte se situe aux alentours de 700°C [Lafon, 2004]. Le CaCO<sub>3</sub> se décompose donc quasiment instantanément à partir du moment où il est formé, expliquant qu'aucune trace de ce dernier ne soit détectée par DRX et par spectrométrie IR. Le produit de décomposition CaCO<sub>3</sub> est donc une espèce intermédiaire de réaction. Ainsi, l'équilibre de décomposition thermique globale de l'hydroxyapatite carbo-silicatée de type B peut s'écrire de la façon suivante (Eq. III.14 p. 104) :



avec :  $\Delta=1-(x/6)$  ;  $\alpha=[2-y-(x/3)]/\Delta$  ;  $\beta=(-x/3)+u$

Appliquée à la composition hypothétique de notre échantillon C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA (déterminée dans le chapitre II - Eq. II.26 p. 84), la réaction de décarbonatation globale sous atmosphère inerte devient la suivante (Eq. III.15 p. 104):

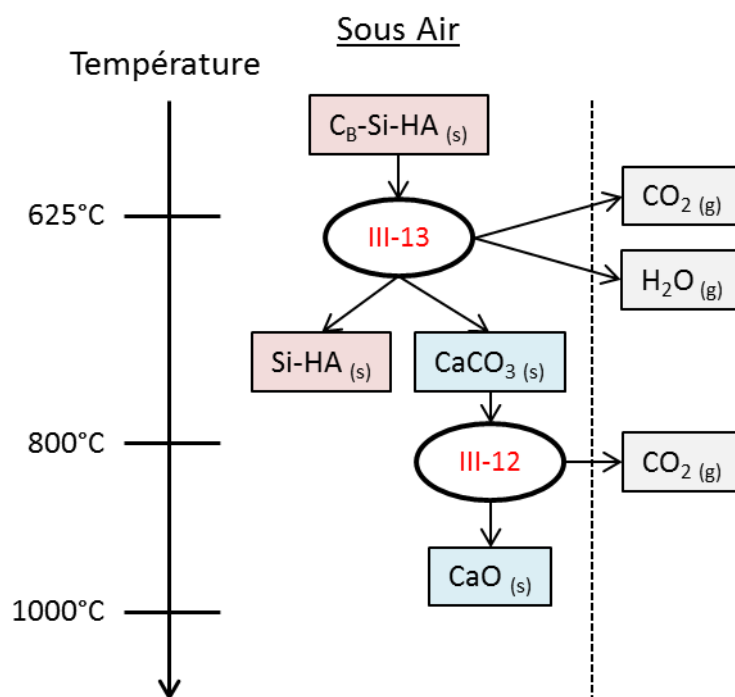


Comme indiqué précédemment la décarbonatation anticipée observée sur les diffractogrammes ou les spectres IR par rapport aux résultats ATG peut s'expliquer

par la différence des cycles thermiques utilisés pour ces analyses (analyses respectivement faites au moment de la calcination avec une montée en température à  $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  pour l'ATG et après une calcination à  $4^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  pour les analyses DRX et IR).

Entre  $1000^\circ\text{C}$  et  $1300^\circ\text{C}$  (température limite de notre étude), aucune nouvelle phase n'est détectée dans la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ .

La Figure 59 (p. 105) schématise les différentes étapes de décomposition thermique rencontrées lors du traitement thermique de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  sous air (et inerte).

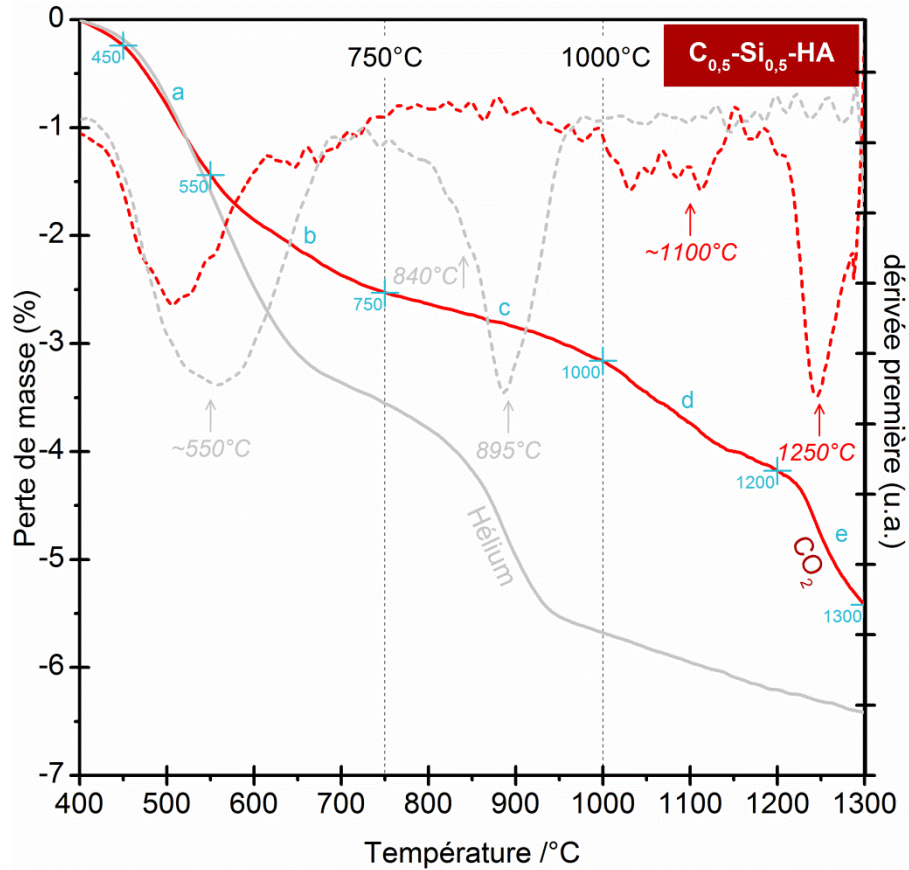


**Figure 59** : Schéma récapitulatif des différentes réactions de décomposition thermique sous air d'un composé  $C_B\text{-Si-HA}$ .

### III.2.3. Comportement thermique des poudres : sous $\text{CO}_2$

#### III.2.3.1. Analyses thermogravimétriques

Le résultat de l'analyse thermogravimétrique de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  réalisée sous  $\text{CO}_2$  est présenté sur la Figure 60 (p. 106). En référence, la courbe thermogravimétrique réalisée sous hélium, présentée dans la partie précédente (III.2.2.1 p. 96), est ajoutée à la figure. Après normalisation par rapport à la valeur obtenue à  $400^\circ\text{C}$ , les pertes de masse peuvent être comparées et discutées selon les trois mêmes domaines de température que ceux établis précédemment :  $400^\circ\text{C}\text{-}750^\circ\text{C}$ ,  $750^\circ\text{C}\text{-}1000^\circ\text{C}$ , et  $1000^\circ\text{C}\text{-}1300^\circ\text{C}$  (cf. Tableau 20 p. 106).



**Figure 60 :** Courbes thermogravimétriques de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  réalisées sous  $CO_2$  et sa première dérivée. En référence, les résultats de l’ATG sous hélium pour le même composé.

**Tableau 20 :** Perte de masse de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  lors de l’analyse thermogravimétrique réalisée sous gaz inerte (He) et sous  $CO_2$ .

Composition	400-750°C (%)	750-1000°C (%)	>1000°C (%)	Total (%)
$C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$ (He)	3,56	2,12	0,75	6,43
$C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$ ( $CO_2$ )	2,53	0,63	2,24	5,40

D’une manière générale, la perte de masse totale à 1300°C pour l’ATG réalisée sous  $CO_2$  est inférieure à celle faite sous He.

En regardant plus en détail, les pertes de masse sous He et  $CO_2$  se superposent jusqu’à 550°C environ, correspondant à la perte des résidus de synthèse nitrés comme vu précédemment (III.2.2.1 p. 96).

A partir de 550°C, alors que la vitesse de perte de masse reste constante sous hélium (*i.e.* égale à celle observée entre 400°C et 550°C), et ce au moins jusqu’à 650°C, elle diminue sensiblement sous  $CO_2$  (*i.e.* de  $-12 \times 10^{-3}$  à  $-5,45 \times 10^{-3} \text{ \%} \cdot \text{°C}^{-1}$ ). Pour rappel, les deux ATG sont réalisées avec des poudres  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  issues d’un même lot. La

quantité de résidus de synthèse nitrés présente initialement dans la poudre est donc la même quelle que soit l'atmosphère d'étude. Ainsi, la perte de masse liée à l'élimination des résidus nitrés est contrebalancée en partie lors du traitement thermique sous  $\text{CO}_2$ . L'augmentation de la masse molaire du composé  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  via la substitution de groupements hydroxyles ( $M_{2(\text{OH})} = 34 \text{ g.mol}^{-1}$ ) par des groupements carbonates ( $M_{\text{CO}_3} = 60 \text{ g.mol}^{-1}$ ) en est vraisemblablement la cause (Eq. III-10 p. 96, sens 1). Cette substitution s'opèrerait donc dès  $550^\circ\text{C}$  dans cette hydroxyapatite carbo-silicatée de type B.

Entre  $750^\circ\text{C}$  et  $1000^\circ\text{C}$ , la forte perte de masse de 2,1 % enregistrée sous hélium, et attribuée à la décarbonatation de la C-Si-HA, est réduite de 70% sous  $\text{CO}_2$  (Tableau 20 p. 106). Autrement dit, la vitesse de perte de masse qui en résulte reste relativement constante et faible sous  $\text{CO}_2$  ( $-2,5 \times 10^{-3} \text{ \%.}^\circ\text{C}^{-1}$ ) comparativement à celle sous He ( $-8,5 \times 10^{-3} \text{ \%.}^\circ\text{C}^{-1}$ ).

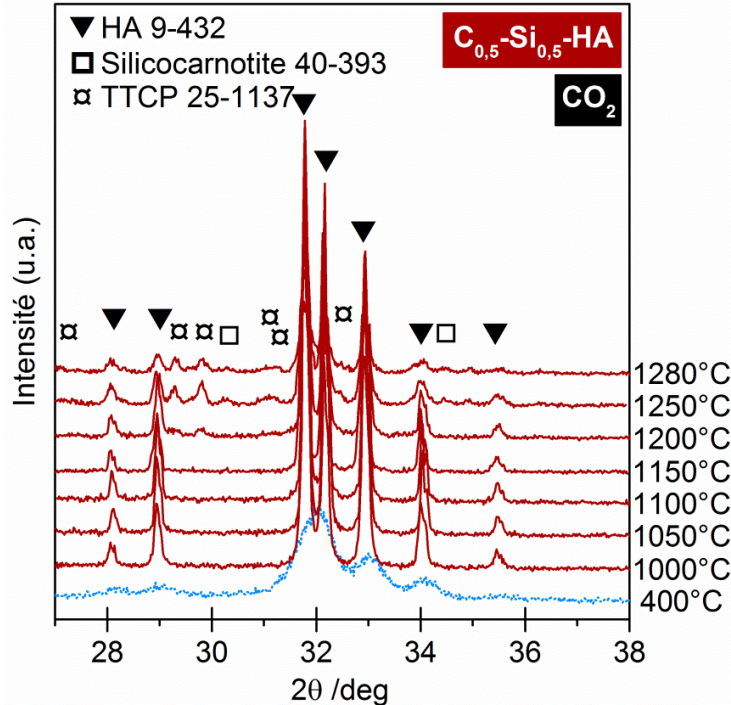
Au-delà de  $1000^\circ\text{C}$ , la courbe thermogravimétrique enregistrée sous  $\text{CO}_2$  présente deux vitesses de pertes de masse : la première entre  $1000^\circ\text{C}$  et  $1200^\circ\text{C}$  ( $-5,1 \times 10^{-3} \text{ \%.}^\circ\text{C}^{-1}$ ) et la seconde au-delà de  $1200^\circ\text{C}$  ( $-12,2 \times 10^{-3} \text{ \%.}^\circ\text{C}^{-1}$ ). Ces deux vitesses sont supérieures à celle, constante, obtenue sous hélium ( $-2,5 \times 10^{-3} \text{ \%.}^\circ\text{C}^{-1}$ ) dans cette même gamme de température ( $1000^\circ\text{C}$ - $1300^\circ\text{C}$ ) et qui pour rappel correspond à la déshydratation de l'hydroxyapatite (III.2.1 p. 95). Même si l'origine de ces deux pertes de masse successives ( $1000^\circ\text{C}$ - $1200^\circ\text{C}$  et  $>1200^\circ\text{C}$ ) enregistrées sous  $\text{CO}_2$  sera discutée plus en aval de ce chapitre (III.2.3.4 p. 112), il est important de noter que leur somme (2,24%) est équivalente à la perte de masse enregistrée lors de la décarbonatation de la  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  sous He (2,12%), soit entre  $750^\circ\text{C}$  et  $1000^\circ\text{C}$ . Il semblerait donc que comme pour les hydroxyapatites carbonatées [Lafon, 2004], un balayage de  $\text{CO}_2$  lors du traitement thermique d'une  $C_B\text{-Si-HA}$  tend à déplacer l'équilibre de la réaction III-14 (p. 104) dans le sens 2. Il en résulte alors une stabilisation de cette phase à plus haute température que sous air ou sous gaz inerte (e.g. He).

**Tableau 21** : Perte de masse et vitesse de perte de masse de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  lors de l'analyse thermogravimétrique réalisée sous  $\text{CO}_2$  en fonction de différents domaine de température (Figure 60 p. 106)

Domaine	Perte de masse (%)	Vitesse de perte de masse (%/°C)
[a] $450^\circ\text{C}$ - $550^\circ\text{C}$	-1,20	$-12 \times 10^{-3}$
[b] $550^\circ\text{C}$ - $750^\circ\text{C}$	-1,09	$-5,45 \times 10^{-3}$
[c] $750^\circ\text{C}$ - $1000^\circ\text{C}$	-0,63	$-2,52 \times 10^{-3}$
[d] $1000^\circ\text{C}$ - $1200^\circ\text{C}$	-1,02	$-5,1 \times 10^{-3}$
[e] $1200^\circ\text{C}$ - $1300^\circ\text{C}$	-1,22	$-12,2 \times 10^{-3}$

### III.2.3.2. Analyses structurales

Les diagrammes de DRX des poudres  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinées à différentes températures sous  $CO_2$  sont regroupés sur la Figure 61 (p. 108). En référence, le profil de la poudre brute (calcinée à  $400^\circ C$  pendant 2 heures sous air) est ajouté.



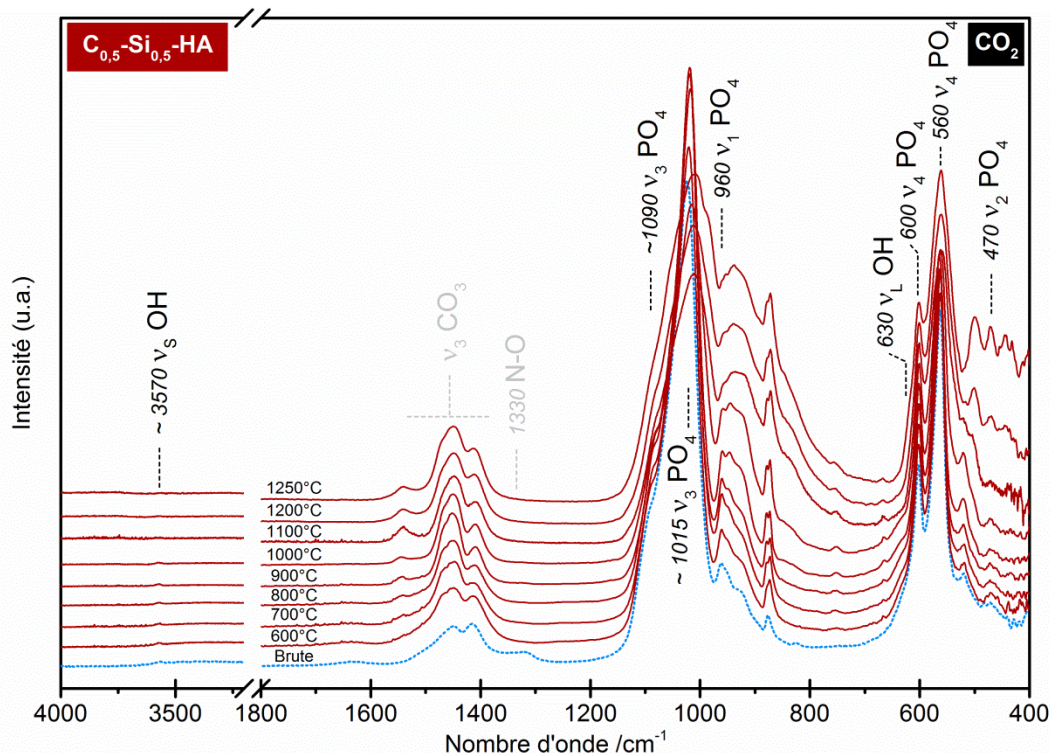
**Figure 61 :** Diffractogrammes de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinée sous  $CO_2$  à différentes températures (de  $400^\circ C$  à  $1300^\circ C$ ).

D'une manière générale, comme lors de la calcination sous air, les raies de diffraction s'affinent avec la montée en température. Ceci est synonyme d'un accroissement de l'ordre local (augmentation de la cristallinité) mais aussi de la taille des grains de la poudre. Les profils sont exclusivement caractéristiques d'une phase apatitique (PDF n°9-432) jusqu'à la température de  $1150^\circ C$ . Au-delà, les raies de diffraction spécifiques au TTCP (PDF n°25-1137) dans un premier temps ( $1200^\circ C$ ), puis à la silicocarnotite (PDF n°40-393) dans un second temps ( $1250^\circ C$ ), sont détectées en plus de celles de l'apatite. Les pics caractéristiques du TCP ( $Ca_3(PO_4)_2$ ), de la chaux (CaO) ou du carbonate de calcium ( $CaCO_3$ ) ne sont quant à eux pas détectés et ce, quelle que soit la température de calcination. Toutefois, un test à la phénolphtaléine, plus sensible, confirme la présence de CaO dans les poudres  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinées à  $1200^\circ C$  sous  $CO_2$  puis recuites à  $550^\circ C$  pendant 10 heures sous air. La chaux présente dans cette poudre est liée à la décarbonatation du  $CaCO_3$  lors du recuit sous air selon l'Eq. III.12 (p. 104).

Ainsi, comme entrevu dans le chapitre II, l'atmosphère  $CO_2$  décale à de plus hautes températures les réactions de décomposition de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  en comparaison aux atmosphères air ou inerte.

### III.2.3.3. Spectroscopie Infrarouge

L'allure générale des spectres infrarouges des poudres  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinées entre 600°C et 1250°C sous  $\text{CO}_2$  est présentée Figure 62 (p. 109). Comme précédemment, le spectre de la poudre brute (en bleu), calcinée à 400°C sous air, est ajouté à la figure et est utilisé comme référence. Globalement, les spectres infrarouges des poudres  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinées sous  $\text{CO}_2$  présentent les bandes d'absorption caractéristiques d'une hydroxyapatite phosphocalcique co-substituée en carbonate et en silicate, et ce, quelle que soit la température de calcination.



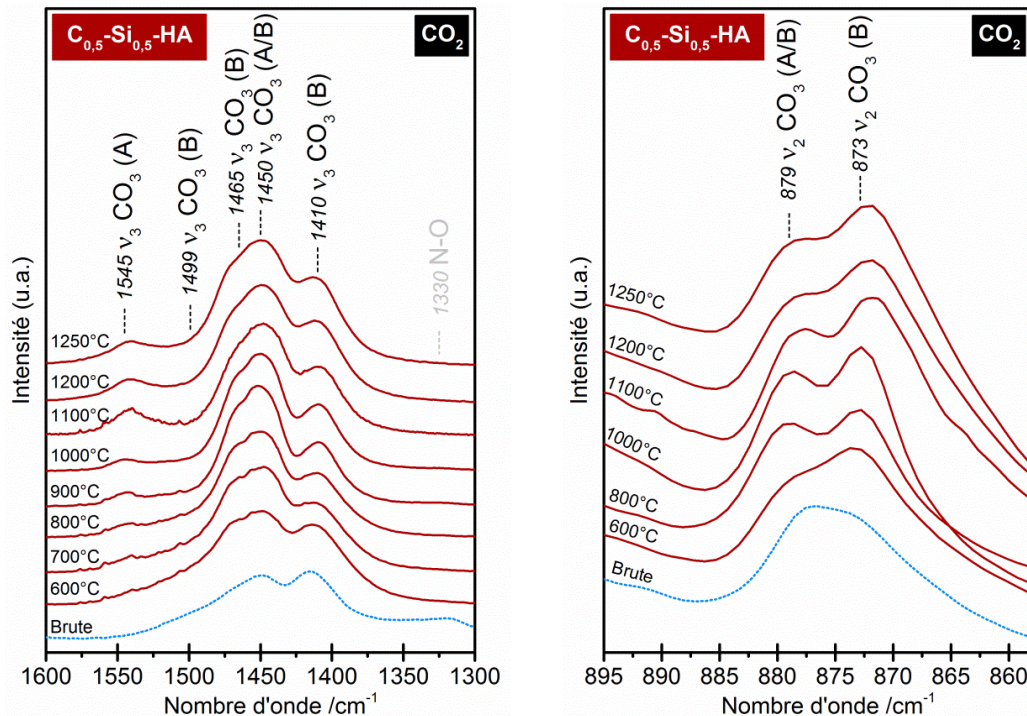
**Figure 62 :** Spectres IR de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinée sous  $\text{CO}_2$  à différentes températures (de 400°C à 1250°C).

Plus précisément, comme lors de l'étude de la stabilité thermique sous air, les bandes d'absorption des résidus de synthèse nitrés (e.g. 820 et 1330  $\text{cm}^{-1}$ ) disparaissent complètement au-delà de 600°C. A contrario, les bandes d'absorption relatives aux groupements carbonates de type B (e.g. 873, 1410 ou 1465  $\text{cm}^{-1}$ ) sont observables sur l'ensemble des spectres (Figure 63 p. 110) et restent d'intensité constante quelle que soit la température de calcination. Les bandes d'absorption des carbonates de type A (e.g. 667 ou 1545  $\text{cm}^{-1}$ ), absentes sur le spectre de la poudre brute, s'intensifient avec la montée en température, et présentent un maximum d'intensité vers 1100°C. Pour rappel, l'acquisition des spectres infrarouges est réalisée sur des poudres refroidies sous  $\text{CO}_2$  (1 bar) jusqu'à température ambiante. Pendant ce refroidissement, l'apatite, après s'être décarbonatée à très haute température (>1000°C - ATG Figure 60 p. 106), se recarbonate en site A (1000-550°C). Ceci explique la présence de bandes d'absorption

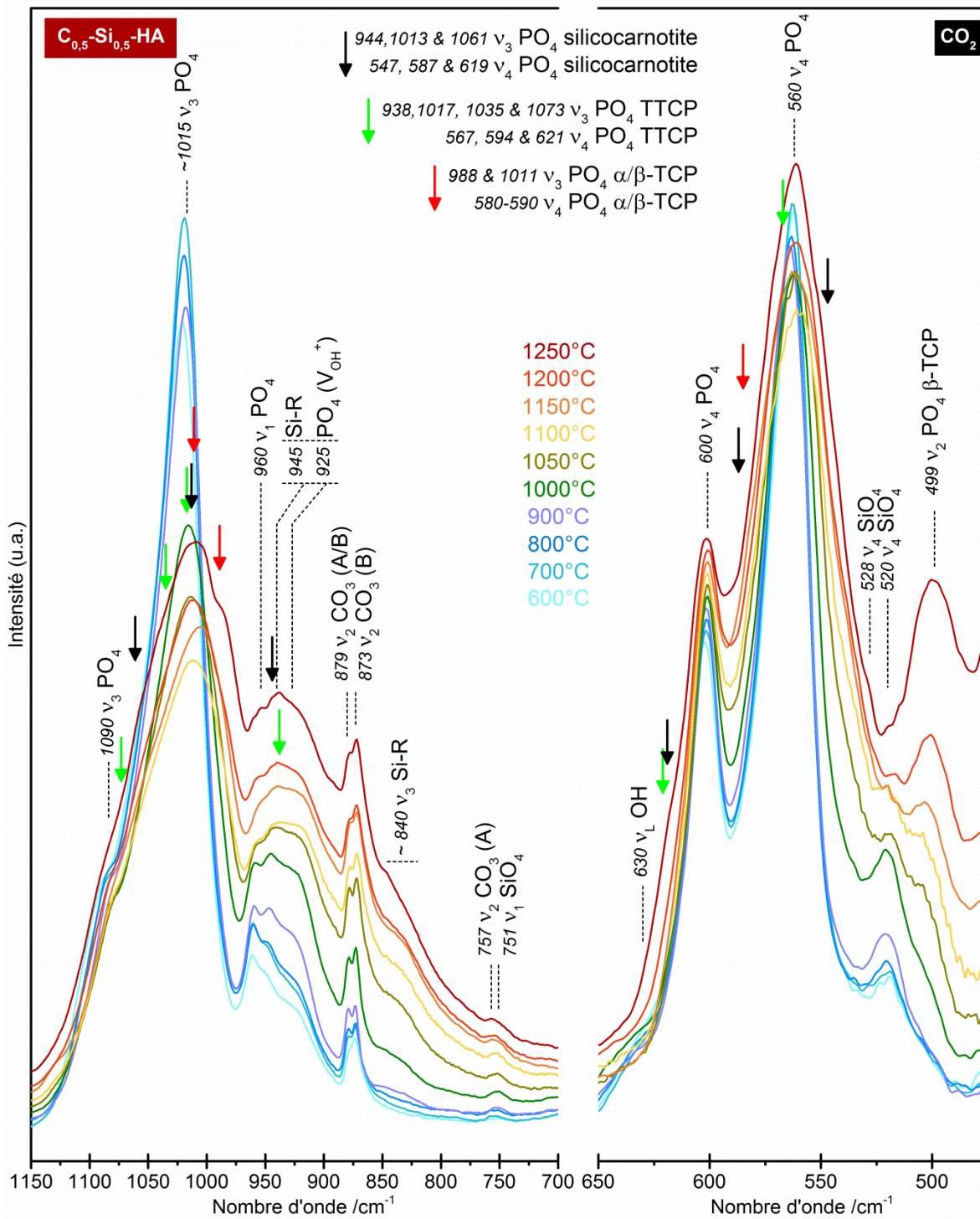
en spectrométrie infrarouge spécifiques aux carbonates de type A sur des poudres calcinées à des températures supérieures à celle de stabilité des  $\text{CO}_3$  de type A.

Avec l'augmentation de la température de calcination, l'intensité du domaine de vibration entre 900 et 950  $\text{cm}^{-1}$  s'accroît (Figure 64 p. 111). Dans le chapitre II, ce domaine d'absorption a été identifié comme étant principalement lié au nombre de lacunes en site hydroxyde  $\text{V}_{\text{OH}^+}$  à proximité des groupements  $\text{PO}_4$ . Contrairement à la calcination sous air, la calcination sous  $\text{CO}_2$  génère plus de lacunes à proximité des groupements  $\text{PO}_4$  du fait de la substitution des groupements hydroxyles par des groupements carbonates (Eq. III-10 p. 96). Ces phénomènes sont également en lien avec la forte diminution de l'intensité des bandes d'absorption des groupements hydroxyles (e.g. 630 et 3570  $\text{cm}^{-1}$ ) au-delà de 1000°C.

Au-delà de 1000°C, les élargissements des bandes d'absorption  $\nu_2$  et  $\nu_3$   $\text{PO}_4$  (i.e. 560 et 1015  $\text{cm}^{-1}$ ) témoignent de la présence de nouveaux épaulements (Figure 64 p. 111). Le début de la décomposition de la phase  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  semble ainsi débuter. Entre 1000°C et 1150°C, les changements vibrationnels restent toutefois de très faible intensité ce qui explique qu'aucune phase secondaire ne soit détectée par DRX (Figure 61 p. 108). C'est à partir de 1150°C que ces bandes attribuables à des liaisons P-O (e.g. 547, 619, 944, 989 et 1061  $\text{cm}^{-1}$ ), spécifiques à de nouvelles phases phosphatées (e.g. TCP [Marchat, 2013b; Jillavenkatesa, 1998; Martínez, 2010], TTCP [Jillavenkatesa, 1997; Posset, 1998], silicocarnotite [Hristov, 2009; Yu, 2013]), s'intensifient ; le TTCP et la silicocarnotite n'étant détectées par DRX qu'à partir de 1200°C (Figure 61 p. 108).



**Figure 63 :** Spectres IR de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinées sous  $\text{CO}_2$  à différentes températures (de 400°C à 1250°C) - domaine des  $\nu_3$  et  $\nu_2$   $\text{CO}_3$ .



**Figure 64** : Spectres IR de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinées sous  $CO_2$  à différentes températures (de  $600^\circ C$  à  $1250^\circ C$ ) - domaine des  $v_3$  et  $v_4$  phosphates.



### III.2.3.4. Discussion

La poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  est sujette à plusieurs réactions lors de sa calcination sous  $\text{CO}_2$ .

Tout comme lors de la calcination sous air, les espèces adsorbées et les résidus de synthèse sont éliminés entre la température ambiante et  $600^\circ\text{C}$  environ lors d'un traitement thermique sous  $\text{CO}_2$ .

Lors de sa calcination sous  $\text{CO}_2$  ( $P_{\text{CO}_2} = 1 \text{ bar}$ ), la carbonatation des sites hydroxyyles de l'apatite débute aux alentours de  $550^\circ\text{C}$  (cf. ATG - Figure 60 p. 106) selon le sens 1 de l'équilibre de réaction Eq. III-10 (p. 96). Une hydroxyapatite silico-carbonatée en site A et B est alors formée ( $C_{A/B}\text{-Si-HA}$ ). La fixation des carbonates de type A se poursuit jusqu'à que l'équilibre thermodynamique d'échange entre la structure apatitique et l'atmosphère soit atteint.

Entre  $1000^\circ\text{C}$  et  $1200^\circ\text{C}$ , la vitesse de perte de masse sous  $\text{CO}_2$  est supérieure à celle observée sous He (Figure 60 p. 106). Pour rappel, celle sous He correspond uniquement à la perte des groupements hydroxyyles par déshydratation selon l'équilibre réactionnel suivant (Eq. III-16 p. 112) :



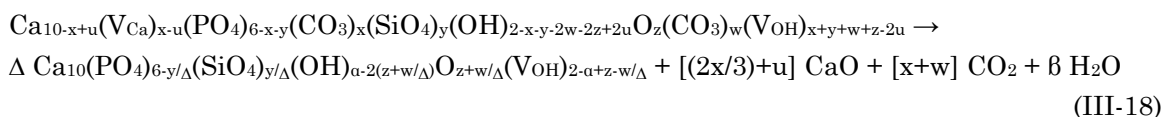
La vitesse de perte de masse légèrement supérieure sous  $\text{CO}_2$  serait donc liée à la décarbonatation partielle des sites A selon l'Eq. III-10 (p. 96) dans le sens 2. Concrètement, en atmosphère anhydre, cet équilibre peut être écrit selon l'Eq. III-17 (p. 112) suivante :



Les réactions de décarbonatation et de déshydratation des sites A du composé  $C_{A/B}\text{-Si-HA}$  ont lieu dans le même domaine de température. Elles sont donc simultanées et tendent à la formation d'une oxy-hydroxyapatite silico-carbonatée notée  $C_{(A)/B}\text{-Si-O-HA}$ , carbonatée en site B et légèrement en site A. En effet, la réaction de décarbonatation des sites A ne peut pas être totale du fait de l'atmosphère de 1 bar en  $\text{CO}_2$  utilisée (Eq. III-17 déplacé dans le sens 2).

Dans le même domaine de température (*i.e.*  $1000^\circ\text{C}$ - $1200^\circ\text{C}$ ), la perte d'ordre local (désorganisation de la structure apatitique) est observée par spectroscopie infrarouge avec l'élargissement progressif des bandes d'absorption  $\nu_2$  et  $\nu_3 \text{ PO}_4$  (Figure 64 p. 111). Elle aboutit aux prémices de la décomposition de la phase apatitique à partir de  $1150^\circ\text{C}$ , avec la présence dans la poudre d'une phase de type TCP. Sa quantité reste toutefois limitée car non détectée par DRX (Figure 61 p. 108). L'apparition d'une phase secondaire locale peut être expliquée par la formation d'un taux de lacune  $\text{V}_{\text{OH}}$  en site A supérieure à une valeur limite. Pour rappel, les travaux de Heughebaert et Montel

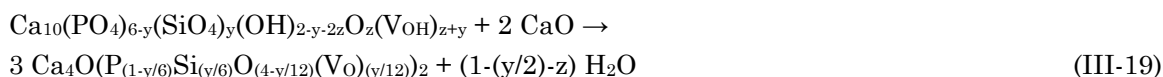
sur la cristallisation du phosphate de calcium ont déterminé que la structure apatitique est stable seulement si au moins 25% des sites OH dans les tunnels de type II sont occupés [Heughebaert, 1977a; Heughebaert, 1977b]. La formation locale de TCP peut ainsi être décrite par la réaction de décomposition d'une oxyapatite (Eq. III-6 p. 95). Elle engendre également la formation d'une phase TTCP. C'est seulement à partir de 1200°C que cette seconde phase (*i.e.* TTCP) est clairement détectée par DRX (Figure 61 p. 108). C'est à cette même température de 1200°C que débute la principale perte de masse liée à la décarbonatation des sites B constatée en analyse thermogravimétrique (Figure 60 p. 106). Ainsi, l'élimination des carbonates de type B entraîne la décomposition macroscopique du composé apatitique. Une réaction bilan est proposée à l'aide de l'Eq. III-18 (p. 113) :



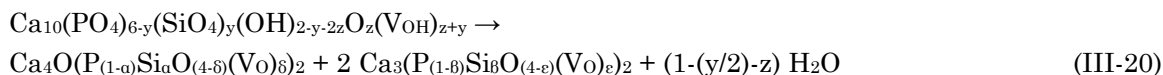
avec :  $\Delta=1-(x/6)$  ;  $\alpha=[2-(x/3)-y]/\Delta$  ;  $\beta=(-x/3)-z+u+\Delta z$

Une oxy-hydroxyapatite phosphocalcique silicatée (Si-O-HA) et de la chaux, observée via un test à la phénolphthaléine, sont alors formées. La réaction de décomposition constitue un équilibre hétérogène solide / gaz entre une solution solide apatitique (Si-O-HA), de la chaux, et du dioxyde de carbone. La pression partielle de  $CO_2$ , variable intensive, influence les équilibres thermodynamiques et ainsi la température de décarbonatation des sites B et donc la température de décomposition de l'apatite. Ainsi, plus la pression partielle de  $CO_2$  est grande, plus la décomposition de l'apatite est décalée vers les hautes températures [Lafon, 2004].

Le TTCP, observé à l'échelle macroscopique, peut quant à lui être issu d'une réaction entre la phase apatitique silicatée Si-O-HA et la chaux CaO (Eq. III-19 p. 113) comme suit (réaction issue de l'extrapolation de celle entre l'HA et la CaO [Lafon, 2004]) :



Ceci est en accord avec la faible quantité de chaux présente qui est un intermédiaire réactionnel. Le TTCP peut également être issu de la décomposition de la phase Si-O-HA selon l'Eq. III-20 (p. 113) suivante :

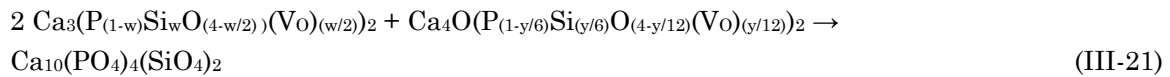


avec  $y = 2\alpha + 4\beta = 4\delta + 8\epsilon$  ; et où  $V_O$  représente les lacunes en site O.

Cette réaction (Eq. III-20 p. 113) est inspirée de la réaction de décomposition de l'O-HA (Eq. III-6 p. 95) formant une phase TCP.

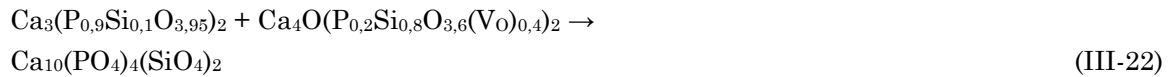
Pour rappel, la phase Si-O-HA peut également se décomposer selon l'Eq. III-7 (p. 95) en formant un composé  $\alpha$ -Si-TCP et une phase amorphe silicatée [Marchat, 2013b].

A 1250°C, une phase supplémentaire, la silicocarnotite, est présente dans la poudre. La silicocarnotite est un produit de décomposition thermique courant pour les composés Si-HA [Palard, 2007; Kim, 2003; Bianco, 2009]. Dans notre cas, elle pourrait être issue d'une réaction impliquant les espèces silicatées présentes : Si-TCP et Si-TTCP. La réaction Eq. III-21 (p. 114) illustrant sa formation est inspirée du sens 2 de la réaction d'équilibre Eq. III-6 (p. 95) où O-HA se décompose à haute température en TCP et TTCP.



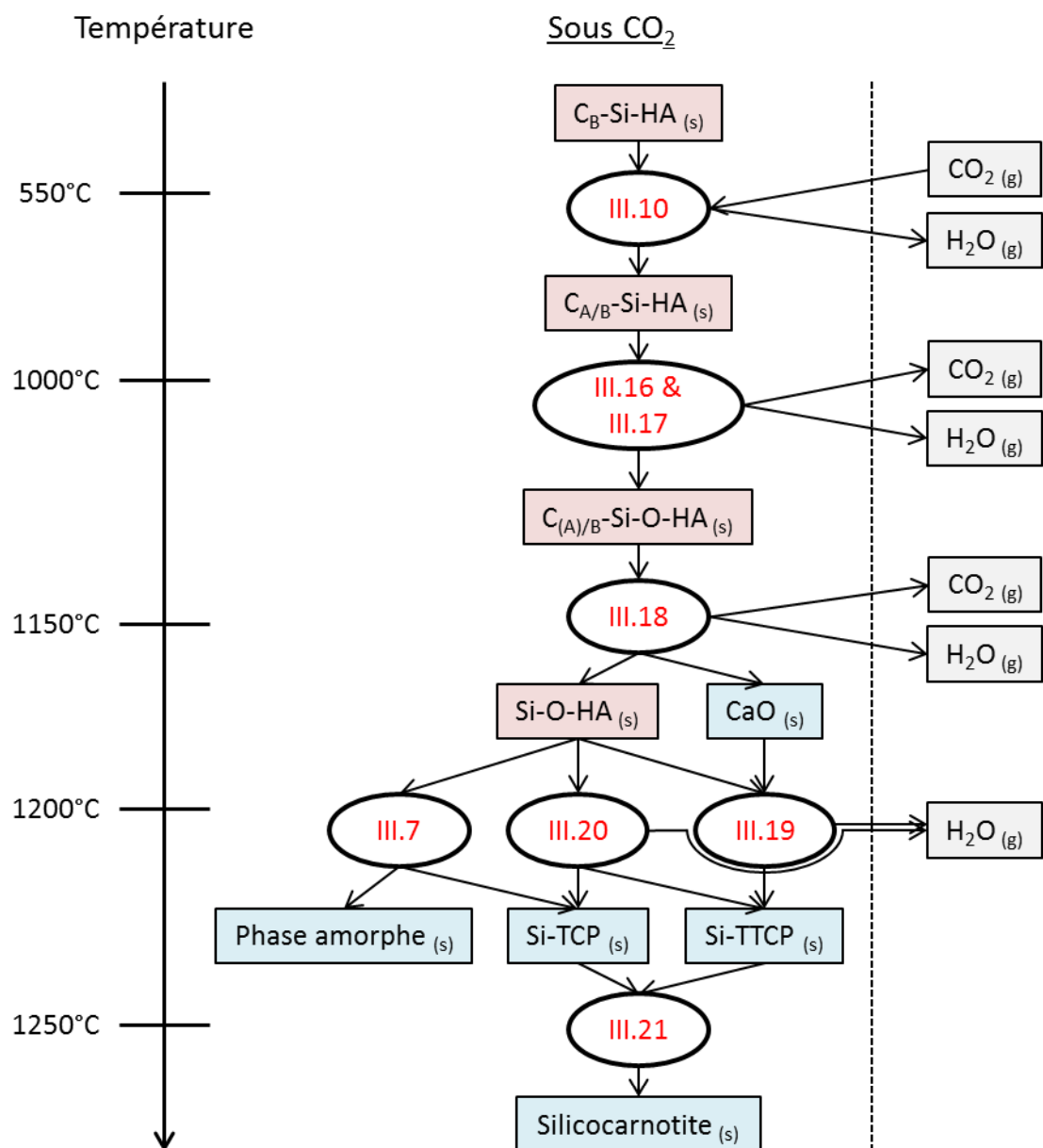
avec  $y = 6 - 12w$  et  $\text{V}_O$  représente les lacunes en site O.

Sachant que le Si-TCP peut contenir dans sa forme saturée jusqu'à  $w = 0,1$  silicium par maille [Dunfield, 2005; Reid, 2005], la réaction de décomposition serait alors la suivante (Eq. III-22 p. 114):



A noter que le TCP, sous sa forme allotropique alpha, et la silicocarnotite ont le même système réticulaire (orthorhombique), pouvant hypothétiquement faciliter la formation de cette dernière.

Enfin, la Figure 65 (p. 115) schématise les différentes étapes de la décomposition thermique rencontrées par la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  lors d'une calcination sous  $\text{CO}_2$ . Les températures indiquées et le caractère linéaire du schéma de décomposition sont à modérer du fait de la simultanéité de certaines réactions.



**Figure 65 :** Schéma récapitulatif des différentes étapes de la décomposition d'un composé  $C_B\text{-Si-HA}$  sous  $\text{CO}_2$  en fonction de la température de calcination.

### III.3. Frittabilité

Le frittage est l'étape essentielle de fabrication d'une céramique puisqu'elle doit aboutir à la consolidation du matériau avant son utilisation.

L'objectif de cette partie est de définir les paramètres optimaux de frittage pour l'obtention d'une céramique dense et monophasique en hydroxyapatite co-substituée en carbonate et en silicate, élaborée à partir de poudre de composition  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  étudiée précédemment.

Dans un premier temps, l'étude s'attache au frittage des comprimés de poudre avec la définition d'un domaine de température de densification maximale pour le composé  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ . Dans un second temps, les comprimés frittés sont caractérisés afin de définir la température optimale de densification sans décomposition.

#### III.3.1. Généralités sur le frittage

Le frittage peut être défini comme le développement des liaisons entre les grains d'un milieu pulvérulent ou d'un aggloméré, par la diffusion d'atomes ou de molécules, sous l'action de contraintes superficielles et de la température [Bernache-Assollant, 1993]. Il se manifeste par une réorganisation de la matière permettant une minimisation de l'énergie de surface du milieu divisé. Le frittage se caractérise par une augmentation de la cohésion du matériau sous l'effet de la température.

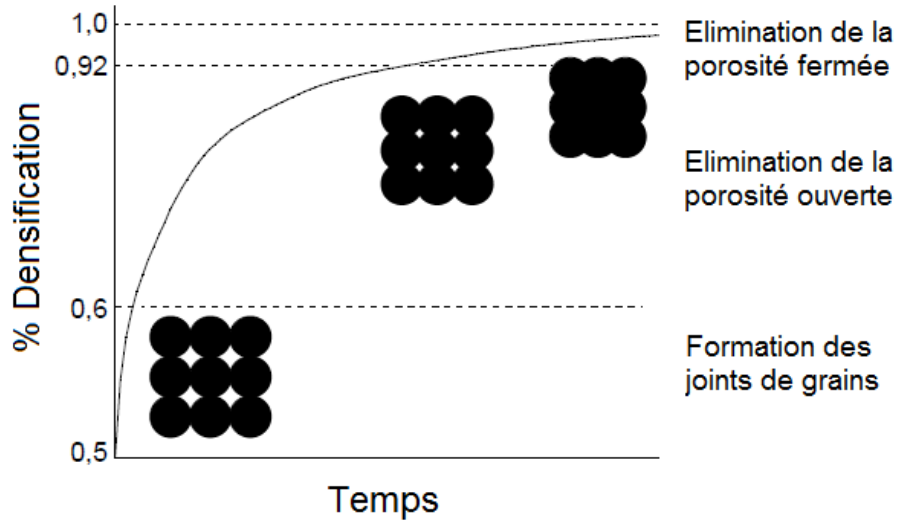
Le processus de frittage peut-être décrit comme une succession de trois étapes qui permet de transformer un matériau pulvérulent compacté en un ensemble dense sans porosité (Figure 66 p.117). Celles-ci peuvent être associées à différents taux de densification. Le taux de densification ( $D$ ) est défini comme le rapport de la densité mesurée du matériau ( $d_m$ ) sur sa densité maximale théorique ( $d_t$ ) (Eq. III-2 p. 93). A noter que quelle que soit la méthode de compaction, la préforme « crue », point de départ du processus de densification, présente en moyenne une porosité comprise entre 40 et 60% en volume [Bernache-Assollant, 1993].

(i)  $0,5 < D < 0,6$  : Formation des joints de grains qui établissent un squelette solide, traversé de pores ouverts.

(ii)  $0,6 < D < 0,92$  : Les pores ouverts diminuent peu à peu de volume pour finalement se séparer en pores fermés.

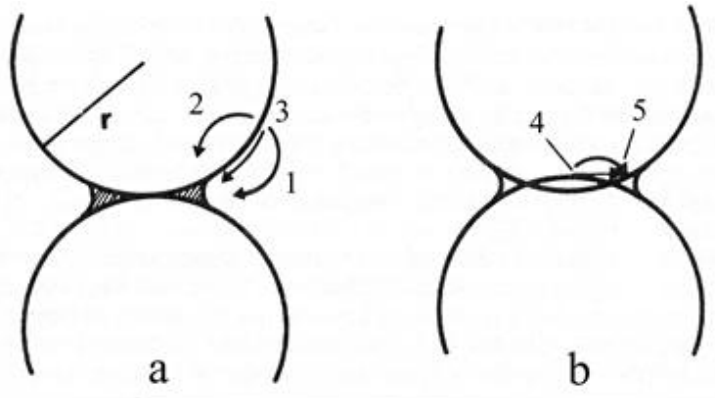
(iii)  $0,92 < D < 1$  : Les pores fermés sont isolés, puis éliminés dans une matrice devenue cohérente.

Il est à noter que dans les faits, la succession des étapes n'est pas aussi stricte et que celles-ci peuvent être partiellement simultanées.



**Figure 66 :** Courbe de retrait isotherme d'un comprimé céramique [Bernache-Assollant, 1993].

Le frittage met en jeu des phénomènes de déplacement de matière qui sont générés par des gradients de contraintes dus aux effets des courbures. Ainsi, sous l'action de ces gradients, la matière converge vers la surface des ponts, soit depuis la surface des grains, soit depuis le joint de grain. Aussi, pour une même origine de matière, plusieurs chemins de diffusions sont possibles (Figure 67 p. 117). Ils peuvent être eux-mêmes classés en deux types de mécanisme de consolidation : avec retrait, ou sans retrait.



**Figure 67 :** Chemins de diffusion possible lors du frittage de deux sphères ; (a) consolidation sans retrait, (b) densification [Bernache-Assollant, 1993].

Dans le cas de la consolidation sans retrait (Figure 67 (a) p. 117), la matière a pour origine la surface des grains. Il s'agit d'un phénomène de coalescence à densité constante. Le transfert de matière peut s'opérer par un processus gazeux (évaporation/condensation ou diffusion gazeuse (1)), ou alors par des processus dans la phase solide (diffusions en volume (2) ou superficielles (3)).

Dans le cas de la consolidation avec retrait (Figure 67 (b) p. 117), la matière provient du joint de grain, ce qui implique un rapprochement des centres des grains et donc une densification du matériau. Le transfert de matière peut avoir pour origine la diffusion aux joint de grains (4) (diffusion de type Coble), et/ou la diffusion en volume (5) via l'intérieur du grain (diffusion de type Nabarro - Herring) [Bernache-Assollant, 1993].

L'analyse simultanée de la surface spécifique et du retrait de l'échantillon permet de distinguer quel type de mécanisme est actif en fonction de la température.

Le Tableau 22 (p. 118) présente les températures caractéristiques rencontrées dans la littérature lors du frittage de différentes compositions apatitiques (HA, C-HA et Si-HA). D'une manière générale, la présence de silicate dans la maille apatitique diminue la capacité de frittage de l'HA. Ainsi, plus sa concentration est élevée, plus la température de vitesse maximale de retrait est haute [Gibson, 2002a; Palard, 2009]. A noter que la présence de silicate ralentit également la croissance des grains [Kim, 2003; Gibson, 2002a; Bianco, 2009; Ruys, 1993; Palard, 2009]. A contrario, la présence de groupements carbonates baisse la température de frittage de l'apatite [Lafon, 2008; Barralet, 2000b]. Cette dernière est liée à la concentration des lacunes ( $V_{Ca}$  et  $V_{OH}$ ) dans la structure qui favorisent les phénomènes de diffusion au cours de la consolidation [Champion, 2013]. La difficulté lors du frittage des céramiques en C-HA est d'empêcher la décarbonatation des sites B (et donc la décomposition de la phase apatitique) qui se produit à température relativement basse ( $\sim 700^\circ\text{C}$ ) lors d'un traitement thermique sous air. Ainsi, l'usage d'une atmosphère  $\text{CO}_2$  lors du traitement thermique permet le maintien des carbonates de type B dans la structure de l'apatite à de plus hautes températures et donc l'obtention d'un taux de densification plus élevé sans décomposition. Toutefois, il a été constaté que la carbonatation des sites A nuit à la frittabilité [Lafon, 2004].

**Tableau 22 :** Températures de début de consolidation avec retrait ( $T_d$ ), et températures de vitesse de densification maximale ( $T_m$ ) pour différentes compositions d'hydroxyapatite substituée.

Composition	Atmosphère	$T_d$	$T_m$
HA [Palard, 2009; Lafon, 2008]	Inerte	$\sim 780^\circ\text{C}$	$\sim 1080^\circ\text{C}$
HA [Lafon, 2008]	50% $\text{CO}_2$ 50% inerte	$\sim 875^\circ\text{C}$	$\sim 1150^\circ\text{C}$
$C_{0.7}$ -HA [Lafon, 2008]	50% $\text{CO}_2$ 50% inerte	$\sim 780^\circ\text{C}$	$\sim 1000^\circ\text{C}$ & $1100^\circ\text{C}$
$Si_{0.5}$ -HA [Palard, 2009]	Inerte	$\sim 900^\circ\text{C}$	$\sim 1180^\circ\text{C}$

A noter également que la présence d'eau dans l'atmosphère lors du frittage, même en faible quantité (e.g.  $P_{\text{H}_2\text{O}} = 3\%$ ), influence le frittage [Lafon, 2004] : (i)  $P_{\text{H}_2\text{O}}$  catalyse la réaction de décomposition par décarbonatation des sites B, (ii)  $P_{\text{H}_2\text{O}}$  favorise

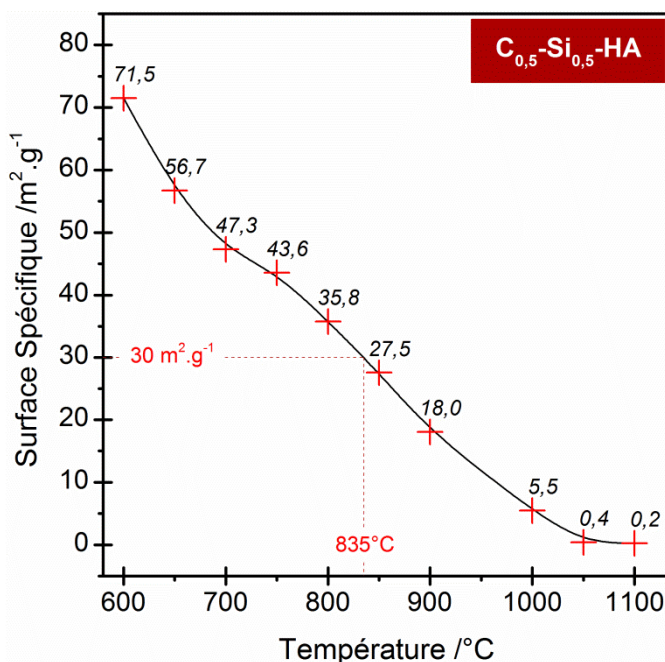
indirectement la frittabilité en inhibant la carbonatation des sites A, et (iii)  $P_{H_2O}$  favorise le grossissement granulaire. Ainsi, dans le cadre de notre étude, le choix d'une atmosphère de frittage anhydre a ainsi été fait.

### III.3.2. Fabrication des céramiques de composition

#### $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$

##### III.3.2.1. Compressibilité : Influence de la surface spécifique

Afin d'élaborer des préformes, les poudres sont préalablement calcinées pour obtenir une surface spécifique de  $30 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . Cette valeur, couramment utilisée [Lafon, 2004; Palard, 2007], permet d'éviter les effets de délaminage lors de la compression de la poudre tout en gardant une réactivité de surface suffisante lors du frittage. La Figure 68 (p. 119) présente l'évolution de la surface spécifique de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  en fonction de la température de calcination sous  $CO_2$  pendant une heure. Une surface spécifique de  $30 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  est obtenue en calcinant la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  à  $835^\circ\text{C}$  pendant 1 heure sous  $CO_2$ . A noter également qu'après cette calcination, la poudre obtenue reste monphasique et ne présente plus de résidus de synthèse nitrés.



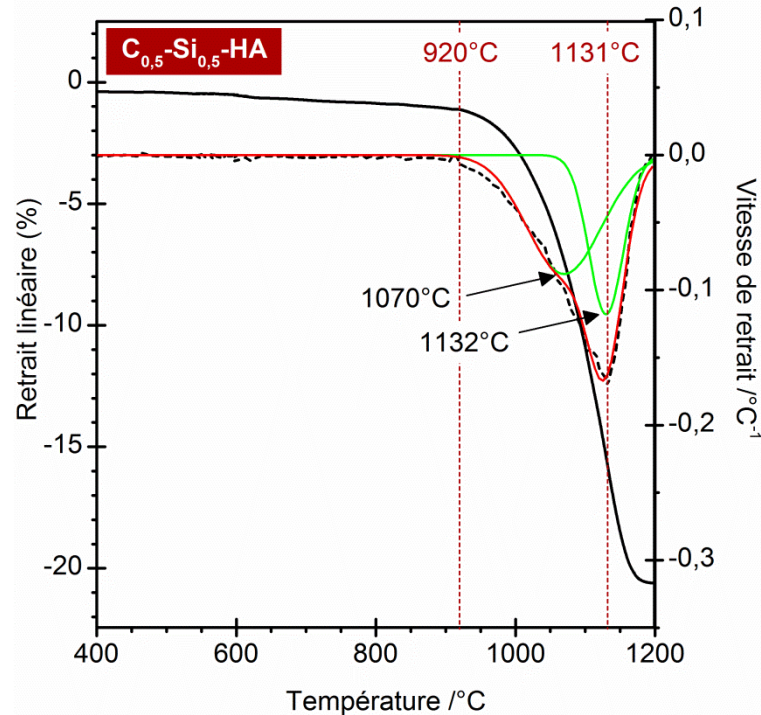
**Figure 68** : Evolution de la surface spécifique de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinée pendant 1 h sous  $CO_2$  en fonction de la température.

##### III.3.2.2. Etude dilatométrique - Frittage

Afin d'élaborer des comprimés denses, une étude préliminaire de la densification est réalisée. L'analyse dilatométrique permet d'enregistrer, en continu, la variation relative de dimension d'un échantillon de poudre compactée soumis à une montée



progressive en température. La Figure 69 (p. 120) présente la courbe de retrait linéaire (et sa première dérivée) d'un comprimé de poudre de composition  $C_{0,5}Si_{0,5}HA$  calciné sous  $CO_2$  en fonction de la température. A noter que la vitesse de montée correspond à celle du four de frittage (*i.e.*  $5^\circ C \cdot min^{-1}$ ).



**Figure 69 :** Courbe de retrait linéaire (ligne continue) et dérivée première de la courbe de retrait (tirets) d'un comprimé de poudre  $C_{0,5}Si_{0,5}HA$  calciné sous  $CO_2$  en fonction de la température.

Le début du mécanisme de consolidation avec retrait est observable à partir de  $920^\circ C$  ( $T_d$ ). Avant cela, la diminution de la surface spécifique de la poudre (Figure 68 p. 119) associée à l'absence de retrait linéaire du comprimé de poudre ( $< 1\%$ ) sont caractéristiques des mécanismes consolidant de diffusion superficielle [Champion, 2013]. L'examen de la courbe dérivée indique que la température où la vitesse de retrait est maximale est de  $1131^\circ C$  ( $T_m$ ). La vitesse de retrait est alors de  $0,17\% \cdot ^\circ C^{-1}$ . Une analyse plus précise de la courbe dérivée relative à la composition  $C_{0,5}Si_{0,5}HA$  fait apparaître deux cinétiques de retrait associées à deux pics distincts par déconvolution. Les deux maxima sont respectivement centrés sur  $1070^\circ C$  et  $1132^\circ C$ .

L'analyse thermogravimétrique de la composition  $C_{0,5}Si_{0,5}HA$ , conduite dans des conditions expérimentales similaires, a conclu à l'élimination des carbonates de type A et à la déshydratation de l'apatite entre  $1000^\circ C$  et  $1200^\circ C$  (Figure 60 p. 106). Aussi, il est connu que la diffusion de matière, moteur du frittage, est influencée par la nature et la concentration des défauts ponctuels dans le solide. La création et la présence de lacune  $V_{OH}^+$  participent ainsi à l'accélération de la densification.

Le premier retrait constaté en dilatométrie, qui commence à 920°C, correspondrait alors au frittage de l'espèce apatitique  $C_{AB}\text{-Si-HA}$  (Figure 65 p. 115) par les différents mécanismes de densification (diffusion en volume, diffusion aux joints de grains). Le deuxième retrait qui s'ajoute au premier en accélérant les mécanismes densifiant, serait lié à l'augmentation du nombre de lacune  $V_{OH^+}$ . A partir de 1150°C, la stabilité thermique de l'échantillon est plus précaire : pour preuve la présence constatée de phase secondaire dans la poudre traitée aux mêmes températures (e.g. TCP à 1150°C, TTCP à 1200°C) (cf. III.2.3 p. 105). Les phénomènes de densification prennent fin aux alentours de 1200°C avec le frittage d'une apatite probablement décomposée et donc multiphasiques. Le retrait total pour un comprimé de composition  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  fritté sous  $CO_2$  est alors de 20,6 %.

Dans l'objectif d'obtenir des céramiques monophasiques les plus denses possibles en  $C\text{-Si-HA}$  plusieurs températures de frittage des comprimés de  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  sont testées. A la vue des résultats de l'étude dilatométrique, et afin de confirmer la décomposition de cette phase apatitique dans les céramiques frittées au-dessus de 1150°C, nous avons étudié le frittage de ces comprimés dans la gamme de température 1000°C - 1250°C.

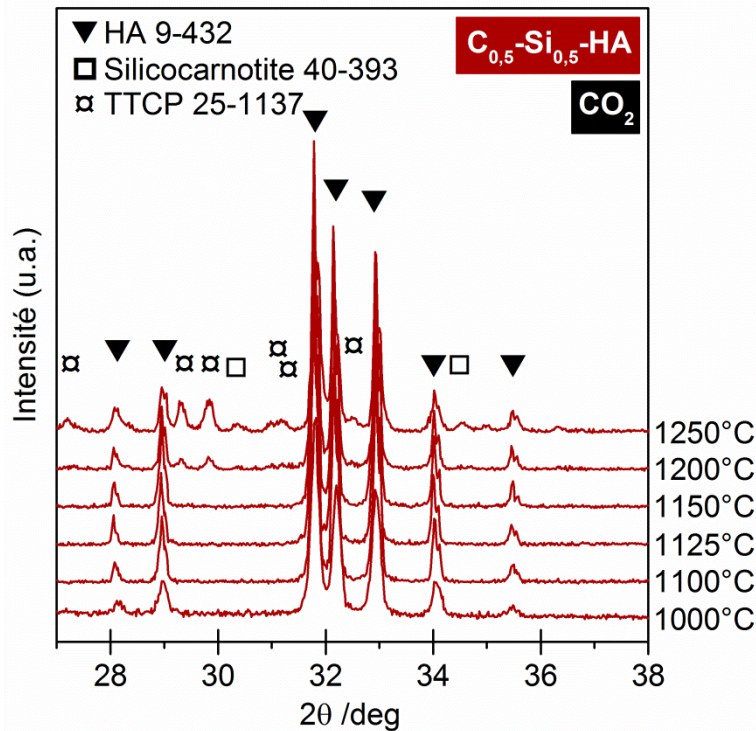
### III.3.2.3. Caractérisations des céramiques denses

#### $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$

Dans un premier temps, l'étude portera sur la vérification de la non-décomposition des pièces frittées. Dans un second temps, elle s'attardera sur l'étude morphologique des échantillons. Enfin, une température optimale de frittage des comprimés de poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  sera proposée.

#### III.3.2.3.1. Analyses physico-chimiques

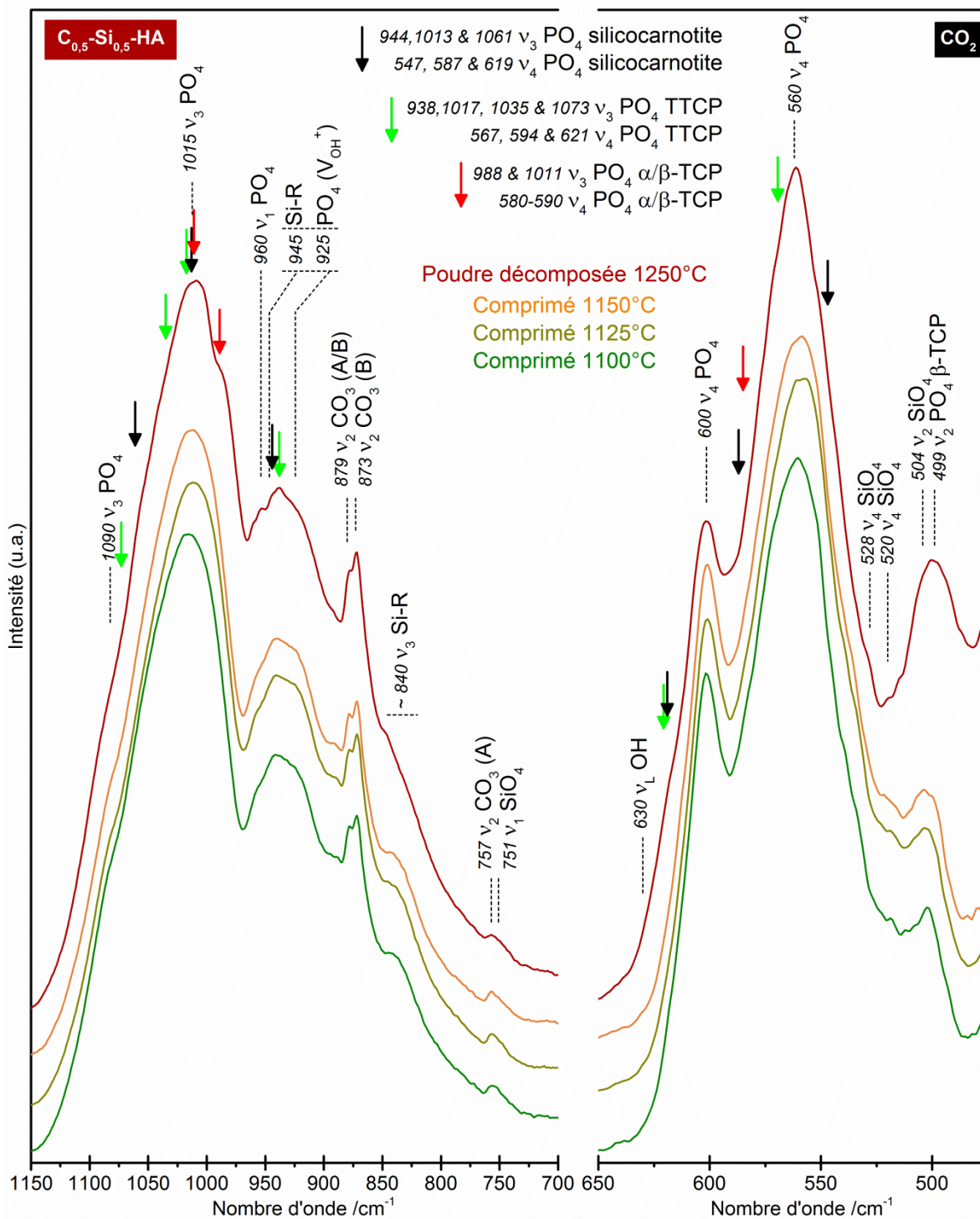
Les diagrammes de diffraction des rayons X des comprimés de poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  frittés (non polis et non broyés) à différentes températures sous  $CO_2$  sont présentés sur la Figure 70 (p. 122). Tous sont caractéristiques d'une phase apatitique, mais comme déjà observé lors de l'étude de la stabilité thermique de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$ , les diffractogrammes des comprimés frittés aux températures de 1200°C et 1250°C présentent des phases secondaires (i.e. TTCP et silicocarnotite). L'absence de coloration des solutions lors du test à la phénolphtaléine des comprimés broyés et recuits à 550°C pendant 10 heures sous air, confirme l'absence de  $CaO$  et donc l'absence de  $CaCO_3$  pour les comprimés frittés jusqu'à 1150°C. Ainsi, pour la suite de l'étude, seule trois températures de frittage seront étudiées : 1100°C, 1125°C et 1150°C.



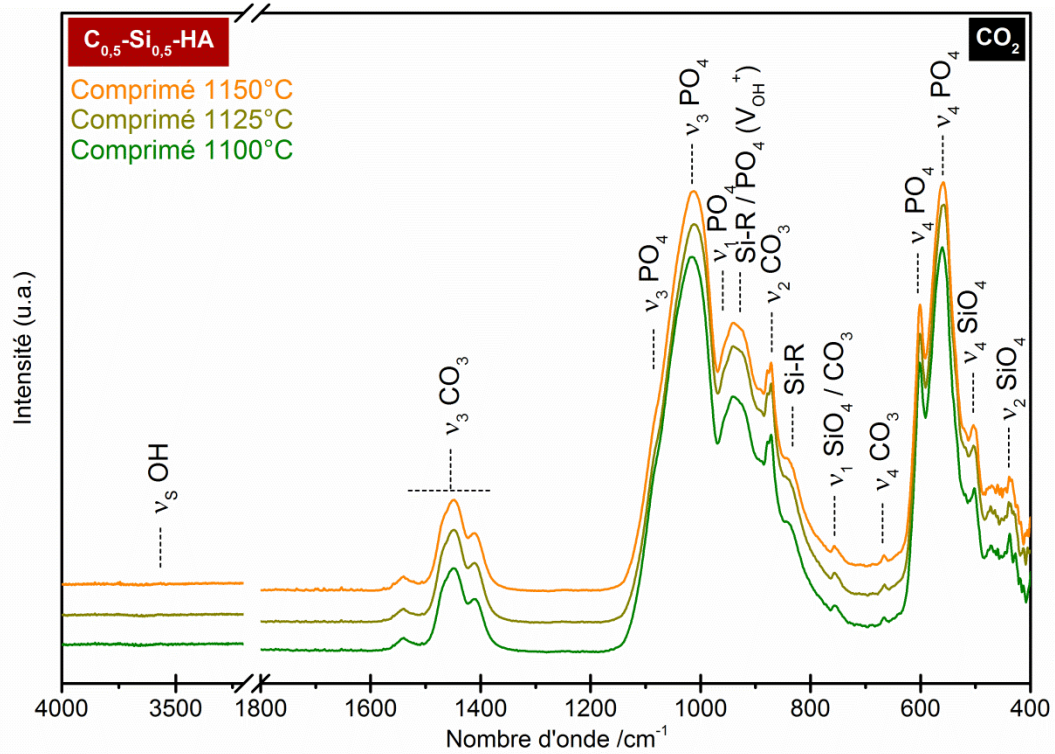
**Figure 70 :** Diffractogrammes des comprimés, non polis et non broyés, de poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  frittés sous  $CO_2$  à différentes températures (de  $1000^\circ C$  à  $1250^\circ C$ ).

Les spectres infrarouges des comprimés broyés  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  frittés aux trois températures de  $1100^\circ C$ ,  $1125^\circ C$  et  $1150^\circ C$ , sont présentés sur la Figure 71 (p. 123) et sur la Figure 72 (p. 124). L'allure des spectres est parfaitement similaire. Ils sont tous caractéristiques d'une  $C_{A/B}-Si-HA$  (II.3.2 p. 67) avec la présence de bandes d'absorption liées aux silicates et aux carbonates de type A et B. La Figure 71 (p. 123) détaille les domaines des vibrations  $\nu_3$  et  $\nu_4$  des groupements phosphates pour ces mêmes comprimés. Le spectre de la poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  après traitement thermique à  $1250^\circ C$  est ajouté à cette figure afin de mieux appréhender les éventuelles bandes de vibrations associées aux composés issus de la réaction de décomposition de  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  précédemment mis en évidence (III.2.3.3 p. 109). Avec l'augmentation de la température de frittage, un élargissement des bandes  $\nu_3$  et  $\nu_4$  des groupements phosphates est observé, synonyme d'une perte d'ordre local. Toutefois, les bandes d'absorption spécifiques au TCP, TTCP ou à la silicocarnotite ne sont pas observées sur les spectres IR des pastilles même pour la température de frittage la plus haute (*i.e.*  $1150^\circ C$ ).

Ainsi, les résultats de la spectroscopie IR et de la DRX montrent que les pastilles frittées entre  $1100^\circ C$  et  $1150^\circ C$  ne sont pas décomposées.



**Figure 71** : Spectres IR des comprimés broyés de poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  frittés sous  $CO_2$  à 1100°C, 1125°C et 1150°C. En référence, le spectre de la poudre calcinée et décomposé à 1250°C est ajouté. Domaine des  $v_3$  et  $v_4$  phosphates.



**Figure 72 :** Spectres IR des comprimés broyés de poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  frittés sous  $CO_2$  à  $1100^\circ C$ ,  $1125^\circ C$  et  $1150^\circ C$ .

III.3.2.3.2. Analyses morphologiques

Afin de calculer la densité théorique des comprimés, la masse molaire des échantillons frittés à  $1100^\circ C$  est calculée. Pour cela, les valeurs issues des dosages élémentaires, présentées dans le Tableau 23 (p. 124), sont utilisées selon la même méthode qu'employée dans le chapitre précédent (II.3.3 p. 82) pour déterminer la formule stœchiométrique de l'échantillon fritté à  $1100^\circ C$  pendant 1 heure sous  $CO_2$ . La formule obtenue est la suivante (Eq. III.23 p. 124):

$$Ca_{9,89}(V_{Ca})_{0,11}(PO_4)_{4,84}(CO_3)_{0,57}(SiO_4)_{0,59}(OH)_{1,60}(CO_3)_{0,08}(VOH)_{0,32} \tag{III-23}$$

La masse molaire associée à ce composé est alors de  $976 \text{ g.mol}^{-1}$ .

**Tableau 23 :** Résultats des dosages élémentaires des poudres  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinées sous air à  $550^\circ C$  pendant 10 h et des comprimés frittés sous  $CO_2$  à  $1100^\circ C$  pendant 1 h - en  $mmol.g^{-1}$ .

Echantillons	Ca	P	Si	C	Ca/(P+Si+C)	Si/P
$C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$ $550^\circ C-10h$ air	10,642 $\pm 0,115$	4,831 $\pm 0,108$	0,540 $\pm 0,005$	0,625 $\pm 0,004$	1,775	0,112
$C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$ $1100^\circ C-1h$ $CO_2$	10,751 $\pm 0,124$	5,262 $\pm 0,055$	0,638 $\pm 0,014$	0,710 $\pm 0,005$	1,626	0,121

Du fait de la différence des traitements thermiques appliqués aux comprimés frittés (*i.e.* 1100°C, 1125°C et 1150°C), les teneurs en carbonate de type A sont inégales entre les échantillons. Ainsi, une approximation est faite pour les valeurs des masses molaires des comprimés frittés à 1125°C et 1150°C qui sont considérées égales à celle des comprimés frittés à 1100°C. A noter également que la quantité de carbonate de type A fixée dans les comprimés frittés à 1100°C est inférieure à celle des poudres calcinées à 1000°C (Eq. II.25 p. 84). Cela traduit bien les phénomènes de décarbonatation observés en ATG entre 1000°C et 1100°C (Figure 60 p. 106).

Le calcul de la densité mesurée par la poussée d'Archimède et le pourcentage de densification des comprimés sont présentés dans le Tableau 24 (p. 125). D'une manière générale, les densités mesurées sont proches de la densité théorique, synonyme d'un taux de densification élevé. Quelle que soit la température de frittage, le pourcentage de densification calculé est légèrement supérieur à 100%. Cette aberration est due principalement aux approximations (erreurs et hypothèses) faites lors de la détermination de la densité théorique : (i) techniques de dosages élémentaires, (ii) méthode de détermination de la formule stœchiométrique de l'échantillon, (iii) estimation du volume de la maille élémentaire par diffractométrie.

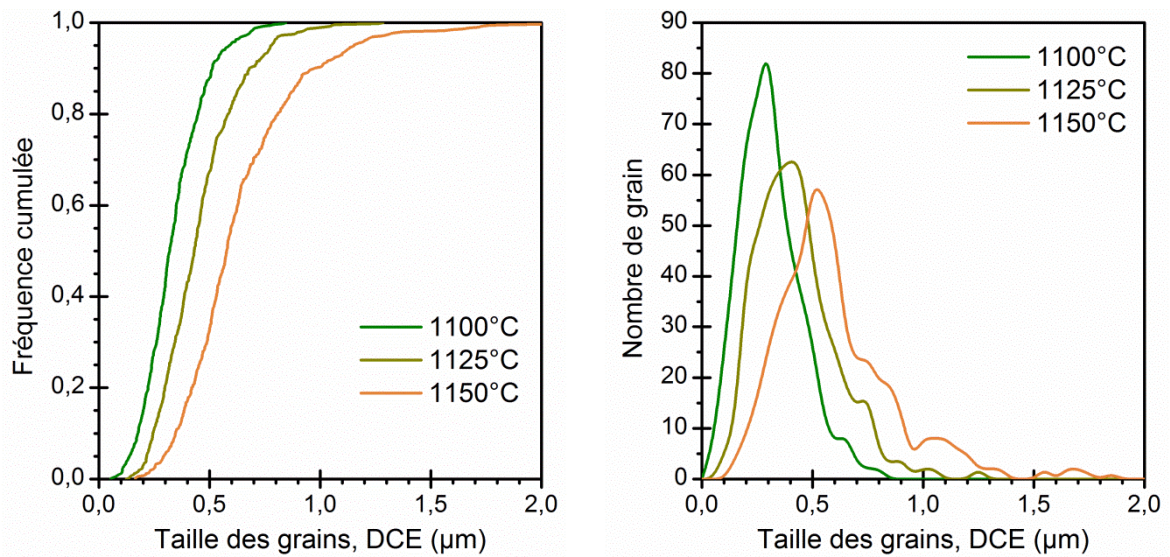
Aussi, la densité mesurée est maximale pour la température de frittage de 1125°C ( $d_m = 3,09$ ). Au-delà de cette température, la densité de la céramique diminue. Ce phénomène peut être expliqué par la déshydratation et la décarbonatation des sites A de l'apatite comme observée en ATG (Figure 60 p. 106) et illustré par les réactions Eq. III.16 et III.17 p. 112. En effet, lors du frittage de la céramique, au-delà de 92% de densification, les pores fermés sont isolés à l'intérieur de la matrice [Bernache-Assollant, 1993]. Les espèces dégazées,  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{CO}_2$ , sont alors piégées au sein des pores fermés. Dès que la pression  $y$  est trop élevée, le processus de densification devient impossible. Parallèlement, la perte de ces espèces (*i.e.*  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ ) entraîne une diminution de la masse molaire de l'apatite ( $M_{\text{CO}_2} = 44 \text{ g.mol}^{-1}$  et  $M_{\text{H}_2\text{O}} = 18 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Ceci induit alors une diminution de la masse volumique de la céramique et donc une baisse de la densité mesurée.

**Tableau 24 :** Densité et pourcentage de densification des comprimés de poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  frittés sous  $\text{CO}_2$  à différentes températures.

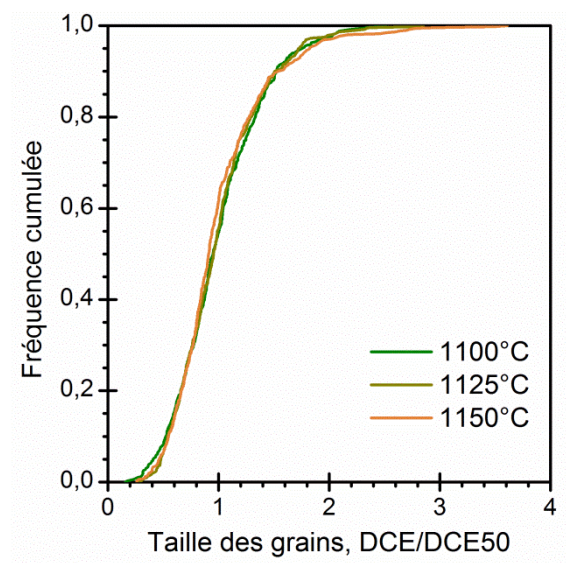
Température de frittage	Densité théorique*	Densité Archimède	% Densification
1100°C	3,05	3,07 ± 0,01	> 100 %
1125°C	3,05	3,09 ± 0,01	> 100 %
1150°C	3,05	3,07 ± 0,01	> 100 %

\* obtenue grâce aux paramètres de mailles (DRX) et à la masse molaire (dosages élémentaires)

Les observations réalisées au microscope électronique à balayage de la surface des comprimés frittés et polis, sont présentées Figure 75 (p. 128). D'une manière générale, l'absence de porosité est constatée quelle que soit la température de frittage (1100°C, 1125°C et 1150°C) de l'échantillon. Les céramiques présentent une microstructure dense comme prédit par les mesures de poussée Archimède. Les joints de grain apparaissent bien définis. Les distributions granulaires des matériaux frittés sont exposées à la Figure 73 (p. 126) et sont obtenues après l'analyse d'environ 500 grains pour chaque température de frittage. Quelle que soit la température de frittage, les distributions des grains peuvent être considérées comme monomodales. La taille moyenne des grains ( $DCE_{50}$ ) augmente avec la température de frittage : 0,34  $\mu\text{m}$ , 0,45  $\mu\text{m}$  et 0,63  $\mu\text{m}$  pour respectivement 1100°C, 1125°C et 1150°C. Les fréquences cumulées en fonction de la taille des grains normalisées par rapport à la taille moyenne des grains ( $DCE/DCE_{50}$ ) sont identiques quelle que soit la température de frittage (Figure 74 p. 127). Ceci indique que les distributions granulaires sont similaires. La taille moyenne des grains permet d'évaluer la croissance granulaire [Tétard, 1999]. Ainsi, aucun grossissement anormal des grains ne se produit au cours du frittage du composé  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  et ce, quelle que soit la température de frittage.



**Figure 73** : Fréquence cumulée et nombre de grains en fonction de la taille des grains.



**Figure 74** : Fréquence cumulée en fonction de la taille normalisée des grains.

En résumé, la densification maximale des comprimés de poudre  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  est obtenue pour une température de frittage de 1125°C pendant une heure sous  $CO_2$ . Au-delà de cette température, les grains d'apatite continuent leur croissance et plusieurs preuves significatives d'une diminution de l'ordre local de la structure apatitique apparaissent (élargissement des bandes d'absorption des groupements phosphates en spectrométrie infrarouge, décarbonatation et déshydratation des sites A). Au-delà de 1150°C, le caractère monophasique de la céramique  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  n'est plus assuré (présence de TTCP et de silicocarnotite à partir de 1200°C sur les diffractogrammes).



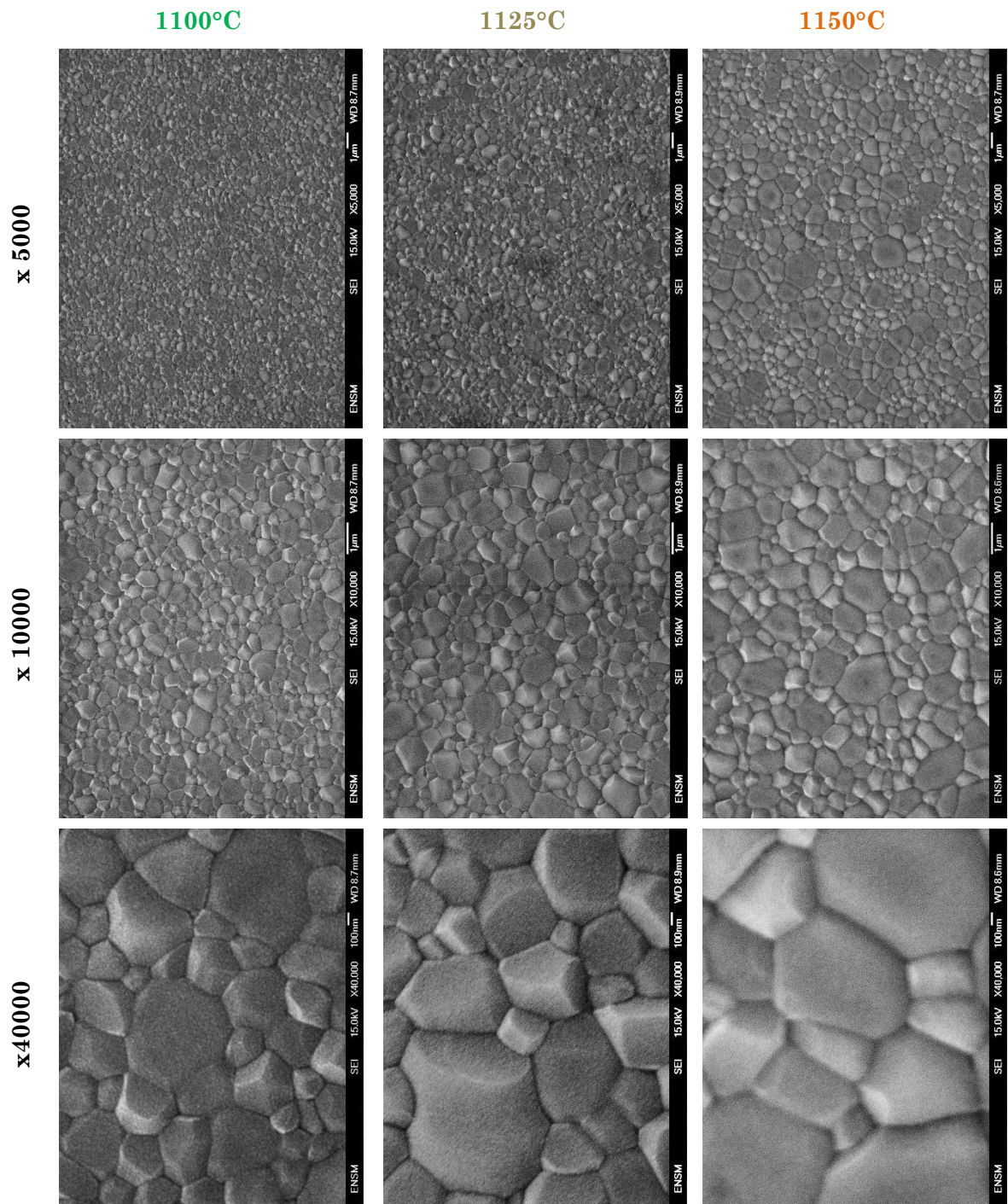
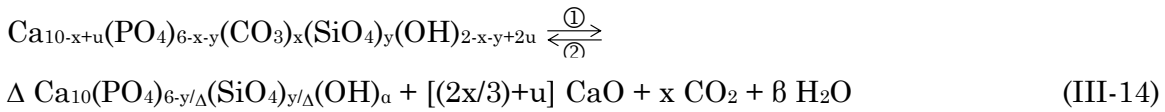


Figure 75 : Images MEB des comprimés de poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  frittés sous  $\text{CO}_2$  à 1100°C, 1125°C et 1150°C pendant 1 h.

## III.4. Conclusion

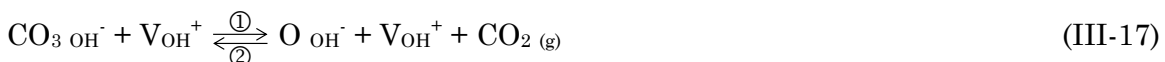
Dans cette deuxième partie de l'étude, nous avons voulu élaborer une céramique dense et monophasique en hydroxyapatite co-substituée en carbonate et en silicate.

Pour cela, la stabilité thermique du composé C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA sous différentes atmosphères a été étudiée. L'étude expérimentale a permis d'établir la part prépondérante du carbonate de type B dans le maintien de la stabilité thermique du composé C-Si-HA. La réaction de décomposition (Eq. III-14 p. 104) constitue un équilibre hétérogène solide / gaz entre une solution solide apatitique, de la chaux et du dioxyde de carbone.



L'usage de CO<sub>2</sub> comme atmosphère de calcination permet de maintenir les carbonates de type B au sein de la structure apatitique jusqu'à des températures relativement élevées pour ce type de composé (T < ~1200°C). Ce gaz est en parallèle responsable d'un enrichissement de l'apatite en carbonate de type A.

Ainsi, entre 550°C et 1200°C, la phase apatitique est le siège d'équilibre d'échange entre les ions situés dans la colonne (site A) de l'hydroxyapatite et l'atmosphère du four : équilibres de déshydratation (Eq. III-16 p. 112) ou encore de carbonatation des sites A (Eq. III-17 p. 112).

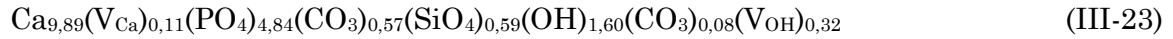


A 1150°C, la poudre C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA présente localement des traces de phase secondaire, type TCP et TTCP, qui pourraient provenir d'une déstabilisation de la structure du fait de la présence d'une trop grande proportion de lacune V<sub>OH<sup>+</sup></sub>. Ces phénomènes apparaissent indépendants de l'équilibre de décarbonatation des sites B.

Lors d'une calcination sous CO<sub>2</sub>, le composé apatitique C-Si-HA, qu'il soit sous forme de poudre ou de céramique dense, est décomposé à 1200°C avec la création de phases secondaires (*i.e.* CaO, TTCP et silicocarnotite).

En conclusion, des céramiques denses et monophasiques peuvent être élaborées à partir de poudre C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA. La température optimale de frittage définie pour cette

composition, pour une densification maximale sans décomposition, est de 1125°C. La formule chimique de la céramique obtenue est alors proche de celle-ci (Eq. III-23 p. 124 - évaluée pour un composé fritté à 1100°C pendant 1 heure sous CO<sub>2</sub>):



Les teneurs en carbonate et en silicate en site B dans la structure sont conformes aux valeurs attendues (*i.e.* 0,5). Une légère carbonatation en site A, due au CO<sub>2</sub> atmosphérique du traitement thermique, est également confirmée.

L'étude complète, de la synthèse chimique à la fabrication de la céramique, du composé C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA s'achève. L'extension de ce protocole à d'autres apatites silico-carbonatées devra être effectuée pour tester des compositions chimiques plus particulièrement adaptées à l'ingénierie tissulaire osseuse.

Chapitre IV.  
Evaluation biologique 2D *in vitro*  
des céramiques C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA avec des  
cellules C3H10T1/2



Une des possibilités pour moduler le comportement biologique des phosphates de calcium est la substitution ionique. Ainsi, l'incorporation de silicium dans la structure apatitique permettrait d'améliorer la bioactivité de l'HA [Gibson, 1999; Patel, 2002a; Hing, 2006]. Différentes études ont prouvé son importance dans le métabolisme cellulaire et le processus de croissance des os [Carlisle, 1970; Schwarz, 1972; Nielsen, 2004]. Le silicium « soluble » (cf. chapitre bibliographie I.3.4 p. 20) est également impliqué dans les mécanismes de minéralisation de la matrice extracellulaire et de synthèse du collagène [Reffitt, 2003; Jugdaohsingh, 2007]. Malheureusement, l'hydroxyapatite silicatée (Si-HA) ne semble pas libérer facilement ses ions silicates du fait de sa faible solubilité [Marchat, article soumis; Marchat, 2013a]. A contrario, la substitution d'ions phosphates par des ions carbonates augmente la solubilité des biocéramiques apatitiques comme confirmé lors d'expériences *in vitro* et *in vivo* [Landi, 2003; Spence, 2009; Barralet, 2000a]. De plus, le taux de biorésorption semble augmenter avec le taux en carbonate dans le composé C-HA [Spence, 2010]. Ainsi, hypothétiquement, la dégradation en milieu biologique d'une céramique C-Si-HA pourrait être modulée en contrôlant sa teneur en carbonate. Le silicium de la maille apatitique serait alors relargué *in situ* et pourrait améliorer l'activité biologique de la biocéramique.

Les études détaillées aux chapitres précédents ont permis de prouver qu'il est possible de préparer des céramiques denses, monophasiques et de composition contrôlée en C-Si-HA. L'objectif de ce dernier chapitre est d'évaluer biologiquement ces nouvelles biocéramiques à l'aide d'essai *in vitro* en deux dimensions (2D). Compte tenu des buts complémentaires de cette co-substitution, à savoir augmenter la dégradabilité (CO<sub>3</sub>) et la bioactivité (SiO<sub>4</sub>) de l'HA, un taux élevé de CO<sub>3</sub> en substitution des PO<sub>4</sub> (x = 0,8) ainsi qu'une teneur de SiO<sub>4</sub> proche de l'optimale définie par la littérature pour des Si-HA (y = 0,4) [Botelho, 2006; Hing, 2006; Best, 2008b; Thian, 2006a], ont été choisis.

Dans un premier temps, ce chapitre s'intéressera à l'élaboration de poudre et à l'obtention de céramiques denses et monophasiques de formule C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA. Des céramiques d'HA et de C<sub>0,8</sub>-HA, objets de comparaison pour la discussion des résultats biologiques, seront également préparées.

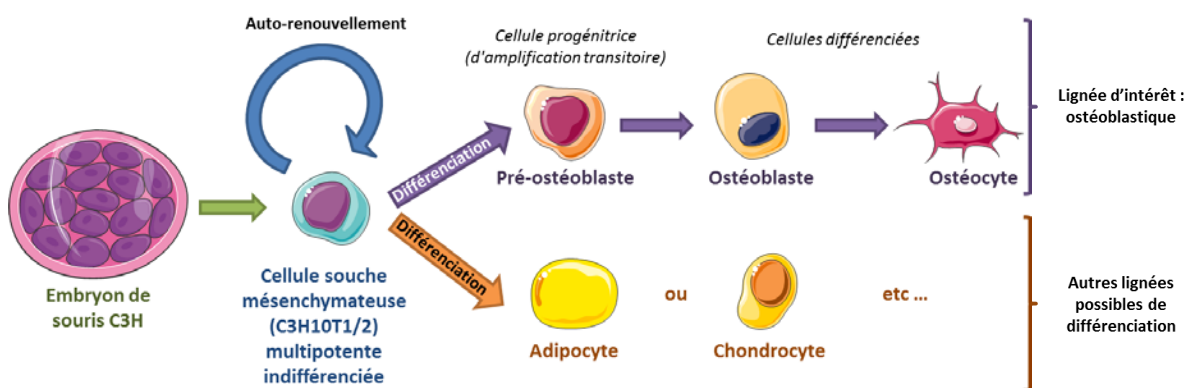
La seconde partie de ce chapitre s'intéressera aux propriétés biologiques de la nouvelle phase C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA via une étude *in vitro* réalisée à l'aide de cellules souches mésenchymateuses C3H10T1/2.

L'évaluation biologique de ces matériaux a été effectuée au Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux (LBTO) en collaboration avec le Centre Ingénierie et Santé (CIS) de l'Ecole des Mines de St-Etienne dans le cadre du projet de stage de Master de Silvia Ramirez.

## IV.1. Culture cellulaire (*in vitro* 2D)

### IV.1.1. Le type cellulaire : C3H10T1/2

Pour réaliser les différentes expériences d'évaluations biologiques, une lignée de cellules souches mésenchymateuses est utilisée : C3H10T1/2. Une lignée cellulaire est une population homogène de cellules, stables après des mitoses successives, et ayant en théorie une capacité illimitée de division. Cette lignée a été créée en 1973 à partir d'embryons de souris C3H [Reznikoff, 1973]. Ces cellules présentent une morphologie fibroblastique en culture cellulaire et sont fonctionnellement similaires aux cellules souches mésenchymateuses, en présentant les mêmes caractéristiques morphologiques et biochimiques [Pinney, 1989; Tang, 2004]. Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules multipotentes. Elles sont, d'une part, indifférenciées et capables de le rester par prolifération (auto-renouvellement), et d'autre part, capables de se différencier en différents types cellulaires appartenant aux tissus squelettiques (*e.g.* os, cartilage, tissu adipeux...) sous l'effet d'un stimulus (facteur de différenciation) (Figure 76 p. 135). Dans le cadre de notre étude, des facteurs ostéogéniques sont utilisés (acide ascorbique et  $\beta$ -glycérophosphate) afin d'orienter la différenciation des cellules en ostéoblastes, et ainsi utiliser ces cellules comme modèle de lignée ostéogénique.



**Figure 76** : Place des C3H10T1/2 dans la lignée ostéogénique.

Pour des raisons pratiques, la lignée C3H10T1/2 a été utilisée, plutôt que des cellules prélevées directement à partir de tissus (cellules « primaires »). En effet, les cellules primaires sont certes plus fidèles de l'environnement *in vivo* mais leur culture est bien plus difficile comparée aux lignées, que ce soit pour obtenir ces cellules en grand nombre ou pour les maintenir longtemps en culture.

Parmi les différentes lignées cellulaires immortalisées, les cellules C3H10T1/2 sont des cellules embryonnaires qui ne sont pas d'origine cancéreuse (*e.g.* MG-63) et donc n'apportent pas de biais (insensibilité, prolifération démesurée, perte des capacités apoptotiques) dans l'interprétation des résultats obtenus. Ainsi, ce modèle semble parfaitement adapté à l'évaluation de la biocompatibilité de comprimés céramiques ; il

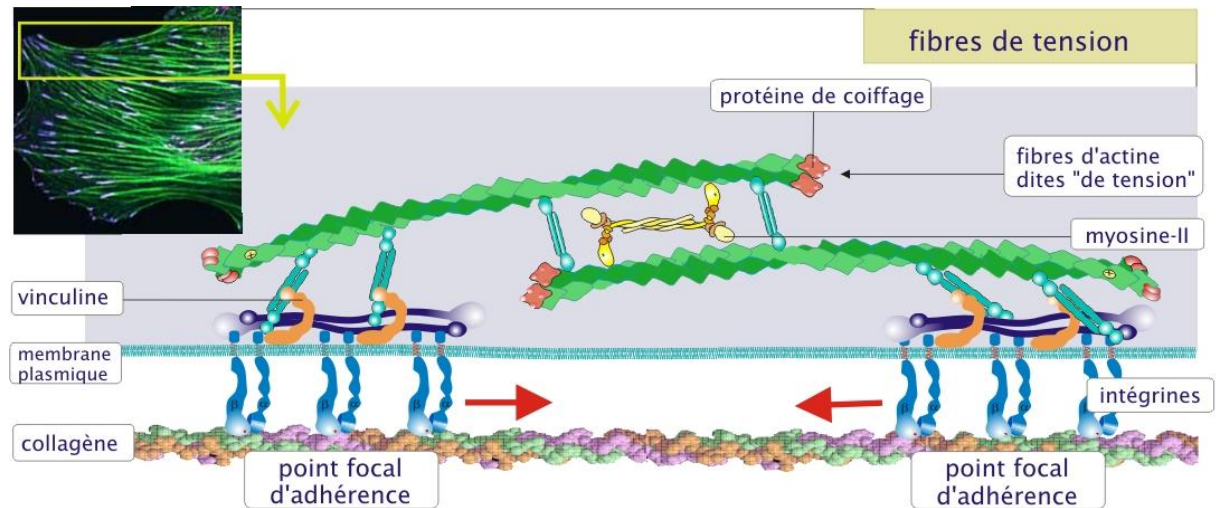


a déjà été utilisé plusieurs fois expérimentalement dans ce but [Barnes, 2003; Miyawaki, 2008; Srivastava, 2013].

### IV.1.2. Comportement cellulaire à la surface des matériaux

La biocompatibilité des céramiques apatitiques est évaluée en mesurant l'attachement, l'activité mitochondriale, la prolifération et l'apoptose des cellules ensemencées à leur surface (Figure 78 p. 137). Le plastique des puits de culture (spécialement traitée pour favoriser la culture cellulaire), sans échantillon, est utilisé comme référence.

Ainsi, plusieurs caractéristiques biologiques de la cellule et de son interaction avec le substrat ont été étudiées à commencer par l'attachement. L'attachement représente la mise en place des différents liens (ou contacts focaux du complexe d'adhésion) entre la cellule et son substrat permettant l'étalement cellulaire (Figure 77 p. 136).



**Figure 77 :** Fibre de tension d'actine (fibres de stress), et point focal d'adhérence entre la cellule et son substrat [Kramer, n.d.].

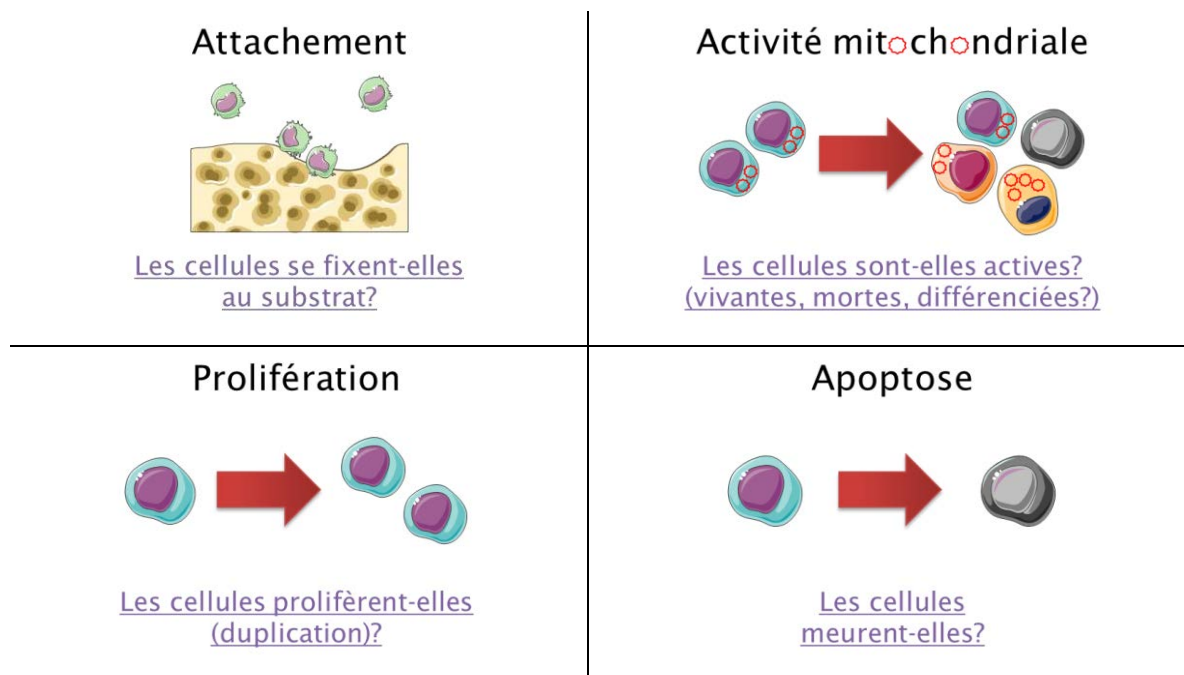
L'activité cellulaire est mesurée en dosant l'activité d'une enzyme de la chaîne respiratoire des mitochondries de l'ensemble des cellules vivantes. La chaîne respiratoire permet la production d'énergie pour la cellule : plus celle-ci fonctionne, plus la production d'énergie est forte et plus l'activité des cellules est considérée importante. L'énergie produite peut être utilisée autant pour la prolifération des cellules que pour la réalisation des différents processus intracellulaires (*e.g.* synthèse protéique, communication intercellulaire). Ce dosage est souvent utilisé pour évaluer la viabilité des cellules en supposant que chaque cellule contient le même nombre de mitochondries. Pour opérer un test quantitatif des cellules vivantes, une courbe d'étalonnage d'un nombre connu de cellules vivantes pour une activité donnée de la chaîne respiratoire, doit être réalisée pour chaque essai. Dans le cadre de notre étude,

une analyse quantitative n'apparaît pas nécessaire. Une simple comparaison relative des résultats entre chaque composition est effectuée.

La prolifération représente le nombre relatif de cellules qui est en phase de duplication cellulaire pendant une durée donnée (*i.e.* phase S, comme Synthèse, de l'interphase au cours de laquelle le matériel chromosomique est doublé par réplication de l'ADN). Dans le cadre de cette évaluation biologique, les résultats de l'étude de prolifération sont normalisés par rapport à l'activité cellulaire pour chaque composition à un temps donné.

L'apoptose est le processus par lequel les cellules entrent en mort cellulaire programmée, et ceci en réponse à un signal (*e.g.* hormones, cellules environnantes). C'est un processus physiologique, génétiquement programmé et nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. Il est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. L'apoptose se différencie de la nécrose (mort cellulaire causée par des dommages physiques ou chimiques).

L'interaction de la cellule avec le substrat modifie également la morphologie de la cellule et donc son cytosquelette. Le cytosquelette est l'ensemble organisé des polymères biologiques qui confèrent la forme et l'essentiel des propriétés mécaniques cellulaires. Parmi ces composés se trouve l'actine (Figure 77 p. 136). C'est une protéine globulaire multifonctionnelle qui participe à de nombreux processus cellulaires (*e.g.* la contraction musculaire, la motilité cellulaire, la division cellulaire le mouvement des organites, la signalisation cellulaire, la mise en place et l'entretien de jonctions cellulaires, et la forme des cellules). Plusieurs de ces processus sont réalisés par des interactions intimes de l'actine avec les membranes cellulaires.



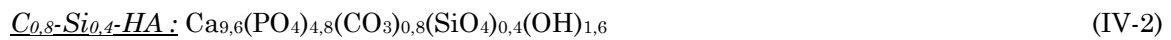
**Figure 78** : Représentations schématiques des évaluations biologiques réalisées.

## IV.2. Matériels et méthodes

### IV.2.1. Synthèse des poudres

Les protocoles de synthèse par précipitation en voie aqueuse des poudres d'HA, de C<sub>0,8</sub>-HA et de C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA sont les mêmes que ceux présentés dans le chapitre II (II.1.1 p. 30).

Les formules chimiques théoriques des deux nouvelles compositions de poudre (*i.e.* C<sub>0,8</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA), issues des formules générales Eq. I-2 (p. 19) et Eq. I-8 (p. 24), sont les suivantes (Eq. IV-1 à IV-2 p. 138):



Les valeurs des paramètres de synthèse spécifiques aux nouvelles compositions (*i.e.* C<sub>0,8</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA) sont présentées dans le Tableau 25 (p. 138). Afin de faciliter la compréhension, les coefficients stœchiométriques et les pourcentages massiques théoriques associés sont indiqués Tableau 26 (p. 138). Ceux de la poudre HA sont regroupés dans les Tableau 2 et Tableau 3 (chapitre II, p. 36). Quelle que soit la composition synthétisée, les volumes d'eau déionisée pour dissoudre les précurseurs sont les même que ceux utilisés dans les précédentes synthèses (*i.e.* 1500 mL pour Ca, 500 mL pour C et P). Le volume de la solution silicatée est fixé par la concentration de la solution et le nombre de mole désiré.

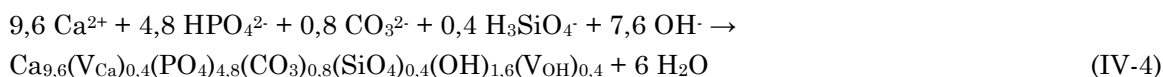
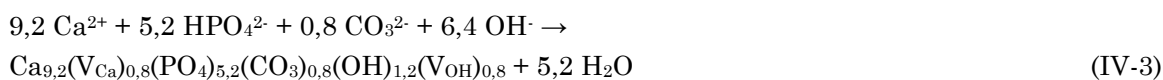
**Tableau 25 :** Paramètres de synthèses pour les poudres C<sub>0,8</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA

Echantillons	Paramètres de synthèses							
	nCa /mol	nP /mol	nSi /mol	nC /mol	Ca/ P+Si+C	pH	T /°C	tm /h
C <sub>0,8</sub> -HA	0,593	0,335	0	0,052	1,53	10,8	50	48
C <sub>0,8</sub> -Si <sub>0,4</sub> -HA	0,605	0,302	0,025	0,050	1,60	10,8	50	48

**Tableau 26 :** Coefficients stœchiométriques et pourcentages massiques théoriques pour les poudres C<sub>0,8</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA

Echantillons	Coefficients stœchiométriques théoriques				% massiques théoriques			
	xCa	xP	xSi	xC	%wt Ca	%wt P	%wt Si	%wt C
C <sub>0,8</sub> -HA	9,2	5,2	0	0,8	39,61	17,30	0	1,03
C <sub>0,8</sub> -Si <sub>0,4</sub> -HA	9,6	4,8	0,4	0,8	40,39	15,61	1,18	1,01

Les réactions générales de précipitation des phases C<sub>0,8</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA, dans ces conditions expérimentales et en première approximation, peuvent être écrites de la façon suivante (Eq. IV-3 et IV-4 p. 139) :



Afin d'arrêter la maturation de la phase apatitique des précipités (i.e. élimination de l'eau adsorbée) et afin d'éliminer un maximum de résidus de synthèse, les poudres sont traitées thermiquement à 400°C pendant 2 heures.

## IV.2.2. Elaboration des céramiques

Pour limiter les contraintes de cisaillement au sein du comprimé au moment de sa mise en forme par pressage uniaxial, et ainsi les phénomènes de délaminage bien connus pour les CaP, les poudres brutes doivent être précalcinées afin d'abaisser leur surface spécifique. Le protocole d'élaboration des comprimés frittés d'HA, de C<sub>0,8</sub>-HA et de C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA est identique à celui mis en place dans le chapitre précédent pour la composition C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA (III.1.2 p. 92). Seule la température de calcination des poudres avant le pressage uniaxial change en fonction de la surface spécifique voulue. Une surface spécifique de 25 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> est utilisée pour les composés HA et C<sub>0,8</sub>-HA, alors qu'une surface spécifique de 30 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> est préférée pour le composé C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA. Ces valeurs ont été définies lors d'études préliminaires internes au laboratoire, non présentées dans ce mémoire.

Les températures de frittage sont déterminées en fonction des études dilatométriques, morphologiques (i.e. densité Archimède et MEB) et physico-chimiques (i.e. DRX, analyse IR) pour les composés C<sub>0,8</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA. Pour les pastilles d'HA, et en accord avec la littérature [Champion, 2013; Raynaud, 1999], la température de frittage est fixée à 1200°C pendant 2 heures sous air.

Afin de s'affranchir des effets de surface autres que ceux liés à la chimie des céramiques (e.g. rugosité), mais également d'analyser leur structure, un polissage « miroir » est pratiqué sur les comprimés frittés. Comme décrit précédemment (III.1.2.5 p. 93), ce polissage est réalisé à l'aide d'une polisseuse Mecapol P320 (Presi) et de solutions diamantées de granulométrie décroissante (de 45 µm à 1 µm).

L'ensemble des protocoles d'analyse utilisés dans les chapitres II et III sont repris pour les caractérisations des poudres et des céramiques HA, C<sub>0,8</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA : DRX (II.1.2.1 p. 37), spectrométrie IR (II.1.2.2 p. 39), analyses thermogravimétriques

(III.1.1.2 p. 91), détermination de la surface spécifique (III.1.2.1 p. 92), analyses dilatométriques (III.1.2.3 p. 92) et morphologiques (III.1.2.5 p. 93).

Les résultats de ces caractérisations permettent la détermination d'une température de frittage optimale pour les échantillons C<sub>0,8</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA (densification sans décomposition).

Aussi, à l'aide de dosage élémentaire (II.1.2.3 p. 39), une formule stœchiométrique de la biocéramique C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA évaluée biologiquement est proposée.

Finalement, 84 comprimés frittés et polis de poudre de chaque composition (HA, C<sub>0,8</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA) sont produits pour les évaluations biologiques. Avant l'ensemencement cellulaire, les céramiques sont stérilisées à 210°C pendant 30 minutes (air sec, APT line, Binder).

### IV.2.3. Evaluation biologique 2D *in vitro*

#### IV.2.3.1. Culture cellulaire - Milieu et procédé

La culture des cellules C3H10T1/2 est réalisée dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma D5796, USA), complété avec 2 mM de glutamine (Sigma G7513, USA), 50 mg.mL<sup>-1</sup> de pénicilline, 50 mg.mL<sup>-1</sup> de streptomycine (Sigma P4458, USA), et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Biological Industries, 04-007-1A, Israël). Ce milieu est constitué de sels minéraux permettant de maintenir la pression osmotique des cellules, des acides aminés nécessaire à la synthèse protéique (source d'azote), du glucose (source d'énergie et de carbone), et enfin du sérum qui contient les facteurs de croissance et les vitamines nécessaires à la survie et à la prolifération des cellules. Les cellules sont entretenues dans des flasques dans lesquelles elles se multiplient. Avant d'être confluente, les cellules sont décollées (cellules adhérentes) afin d'être réensemencées à plus basse densité. Pour cela, après un rinçage dans du PBS (tampon phosphate salin, Sigma D8537, USA), les cellules sont séparées du support par action de la trypsine (Sigma T4174, USA) qui est une enzyme rompant les liens entre la cellule et son substrat. Cette étape appelée « passage » permet d'éviter la confluence (cellules entrant en contact les unes avec les autres) qui peut entraîner la dérive des cellules souches ou même leur mort par apoptose. Lorsque les cellules se trouvent entre les passages 13 et 17, elles sontensemencées à une densité de 5000 cellules.cm<sup>-2</sup> dans les puits centraux (afin d'éviter les effets de bordure) d'une plaque 24 puits (Falcon, VWR 734-0020), contenant ou non les comprimés céramiques, dans 1 mL de milieu de culture. En complément, après 24 heures de culture, 50 µg.mL<sup>-1</sup> d'acide ascorbique (Sigma A8960-5G, USA) et 10 mM de β-glycérophosphate (Sigma G9422-50G, USA) sont ajoutés comme facteurs ostéogéniques. Les cultures sont réalisées dans un incubateur maintenu à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub> et sans régulation d'O<sub>2</sub> (*i.e.* environ 21%). Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 à 3 jours.

### IV.2.3.2. Attachement cellulaire

L'attachement cellulaire à la surface des céramiques est évalué après 30 min, 1 h et 2 h d'ensemencement. A chacun de ces temps, les cellules sont rincées au PBS, puis fixées 20 minutes dans le para-formaldéhyde à 4 % (Sigma HT5014, USA), avant d'être à nouveau rincées au PBS pour finalement être incubées 10 minutes avec du Hoescht Dye 33342 (Invitrogen H3570, USA) dilué au 1/100<sup>ème</sup>. Ce dernier est un intercalant fluorescent de l'ADN double brin qui permet de visualiser les noyaux des cellules. Une mosaïque de clichés photographiques des surfaces des comprimés est réalisée en utilisant le microscope à fluorescence Zeiss Axio Observer. Les cellules comptées sont normalisées par rapport à la surface analysée pour chaque échantillon.

### IV.2.3.3. Activité mitochondriale des cellules

L'activité cellulaire est évaluée par le test de viabilité MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide, Sigma M5655, USA), après 1, 3, 6 et 8 jours de culture. Ce dosage est basé sur la réduction du réactif MTT, par une enzyme de la mitochondrie des cellules vivantes, formant des cristaux de formazan. L'addition de DMSO (diméthylsulfoxyde, Sigma D5879, USA) permet de lyser la cellule, et de solubiliser ces cristaux. Le milieu se colore alors d'une teinte bleue/violette. L'intensité peut être dosée par absorbance à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La densité optique mesurée est « relativement » proportionnelle à la quantité de cellules vivantes du fait qu'elle reflète l'activité mitochondriale des cellules.

D'un point de vue expérimental, pour chaque temps, les cellules sont rincées deux fois à l'aide d'un milieu DMEM, contenant 0,1 % de BSA (albumine de sérum bovin, Invitrogen 11520376, USA). Dans chaque puits de culture, le MTT (5 mg.mL<sup>-1</sup>) est ajouté en proportion 1:10 par rapport au milieu, et le tout est placé à l'incubateur pendant 4 heures. Le milieu est ensuite retiré et les cellules sont incubées pendant 40 minutes dans du DMSO. L'absorbance du surnageant est enfin mesurée à l'aide du spectrophotomètre Thermo Multiskan Spectrum.

### IV.2.3.4. Prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est évaluée en utilisant un analogue de la thymidine (composé de l'ADN) : le 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), détecté par un dosage immunologique (kit BrdU, Roche Applied Science, 11647229001, Allemagne). Ce test colorimétrique est basé sur la mesure de la quantité de BrdU incorporé dans l'ADN nouvellement synthétisé dans les cellules en cours de division. Après 1 et 3 jours de culture, 10  $\mu$ M de BrdU sont ajoutés dans chaque puits, puis les cellules sont incubées à nouveau pendant 2 heures. L'ADN des cellules est ensuite dénaturé avant d'être incubé 95 minutes en présence d'un anticorps Anti-BrdU qui se lie au BrdU. Après rinçage, un colorant à base de tetraméthyl-benzidine permettant de révéler le couplage

formé est ajouté. La coloration bleutée est mesurée par absorbance à 370 nm avec une référence à 492 nm (spectrophotomètre Thermo Multiskan Spectrum). La densité optique mesurée est ainsi directement proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisé et donc au nombre de cellules en phase de duplication (*i.e.* phase S de l'interphase au cours de laquelle le matériel chromosomique est doublé) le temps de l'incubation (*i.e.* 2 heures). Chaque résultat de prolifération est normalisé par rapport à l'activité cellulaire mesurée précédemment.

#### IV.2.3.5. Apoptose

L'évaluation de l'apoptose (mort cellulaire programmée) est réalisée après 3 jours de culture par la coloration des cellules mortes à la surface des comprimés via le kit APOPercentage (Biocolor, A1000, UK). Ce colorant, dilué au 1:20 du milieu de culture, est employé pour marquer les cellules en cours d'apoptose incubées à 37°C pendant une durée de 30 minutes. Afin d'enlever toute trace de milieu, les cellules sont ensuite rincées dans du PBS avant d'être fixées avec du para-formaldéhyde 4 % pendant 15 minutes à température ambiante, avant d'être à nouveau rincées au PBS. Les comprimés céramiques sont observés à l'œil nu. Un contrôle positif est réalisé en incubant des cellules sur une pastille à 37 °C pendant 7 heures en présence de dexaméthasone (10<sup>-4</sup> M) (Sigma D4902, USA) dilué dans le milieu de culture standard en proportion 1:2 qui permet de tuer les cellules. Des images représentatives sont prises pour chaque condition expérimentale.

#### IV.2.3.6. Morphologie et cytosquelette cellulaire

Afin de marquer les fibres d'actine du cytosquelette après 24 heures de culture, les cellules sont rincées au PBS, puis fixées avec du para-formaldéhyde à 4% pendant 15 minutes, et à nouveau rincées au PBS, avant d'être perméabilisées avec du Triton-X100 à 0,1% (Sigma T8787, USA) pendant 3 minutes. Après un rinçage au PBS, les échantillons sont incubés avec de la rhodamine-phalloïdine (Invitrogen R415, USA) diluée au 1:50 dans une solution de PBS (10% SVF) pendant 45 minutes à 37°C. La phalloïdine se fixe à l'actine des cellules. Elle est couplée à la rhodamine qui est un marqueur fluorescent rouge. Enfin, les échantillons sont rincés avec une solution PBS avant d'être observés au microscope à fluorescence Zeiss Axio Observer.

La morphologie des cellules est observée au MEB après 1 et 3 jours de culture. Les cellules à la surface des céramiques sont tout d'abord fixées à l'aide d'une solution de glutaraldéhyde (Sigma G5882, USA) à 2,5 % pendant 60 minutes à 4°C préparée dans du cacodylate (Sigma C0250, USA) à 0,1 M. Ensuite, les comprimés sont rincés deux fois avec la solution de cacodylate (0,1 M ; pH = 7,4). Afin de déshydrater les cellules, les céramiques sont immergées dans des bains successifs d'éthanol (Cooper, France) allant de 30 % à 100 % comme suit : (i) 30 % EtOH pendant 10 min, (ii) 50 % EtOH

pendant 10 min, (iii) 70 % EtOH pendant 10 min, (iv) 80 % EtOH pendant 10 min, (v) 90 % EtOH pendant 10 min, (vi) 95 % EtOH pendant 15 min, (vii) 100 % EtOH pendant 15 min. Enfin, les comprimés sont recouverts de HMDS (hexamethyldisilazane, Sigma 440191, USA) pendant 30 secondes, puis séchés et conservés dans un dessiccateur.

Juste avant l'acquisition au MEB, les comprimés sont recouverts d'une fine couche d'or (quelques nanomètres) par déposition sous vide afin de créer une surface électriquement conductrice.

#### IV.2.3.7. Représentations graphiques et analyses statistiques

Les résultats des tests d'attachement (N=6), d'activité mitochondriale (N=4) et de prolifération cellulaire (N=6) sont analysés statistiquement par la méthode One-Way ANOVA et post-test Bonferroni, qui permet de comparer entre eux des échantillons indépendants, en donnant comme résultat une valeur  $p$ . Les différences significatives sont marquées sur les figures par des *étoiles* \* comme suit :

\* :  $p < 0,05$  : 95% de chance que la différence significative ne soit pas due au hasard

\*\* :  $p < 0,01$  : 99% de chance que la différence significative ne soit pas due au hasard

\*\*\* :  $p < 0,001$  : 99,9% de chance que la différence significative ne soit pas due au hasard.

Les barres d'erreurs présentées dans ce chapitre correspondent à des erreurs types de la moyenne (« standard error of the mean » en anglais).



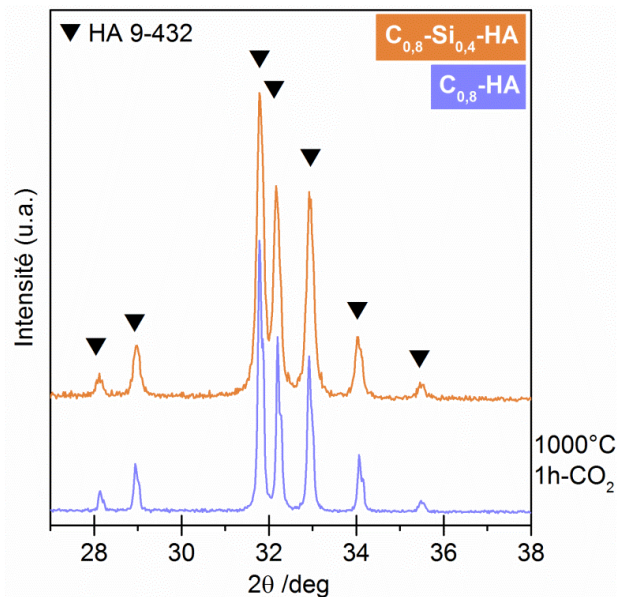
## IV.3. Synthèses, caractérisations physico-chimiques et thermiques des poudres

### $C_{0,8}\text{-HA}$ et $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$

L'objectif des caractérisations des poudres  $C_{0,8}\text{-HA}$  et  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  est premièrement de s'assurer de la pureté des poudres et de la bonne incorporation des groupements carbonates et silicates dans la structure apatitique, et secondement de comparer le comportement thermogravimétrique de la nouvelle composition  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  à celui de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  en vue de l'élaboration des pastilles céramiques par frittage.

#### IV.3.1. Vérification de la pureté des poudres $C_{0,8}\text{-HA}$ et $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$

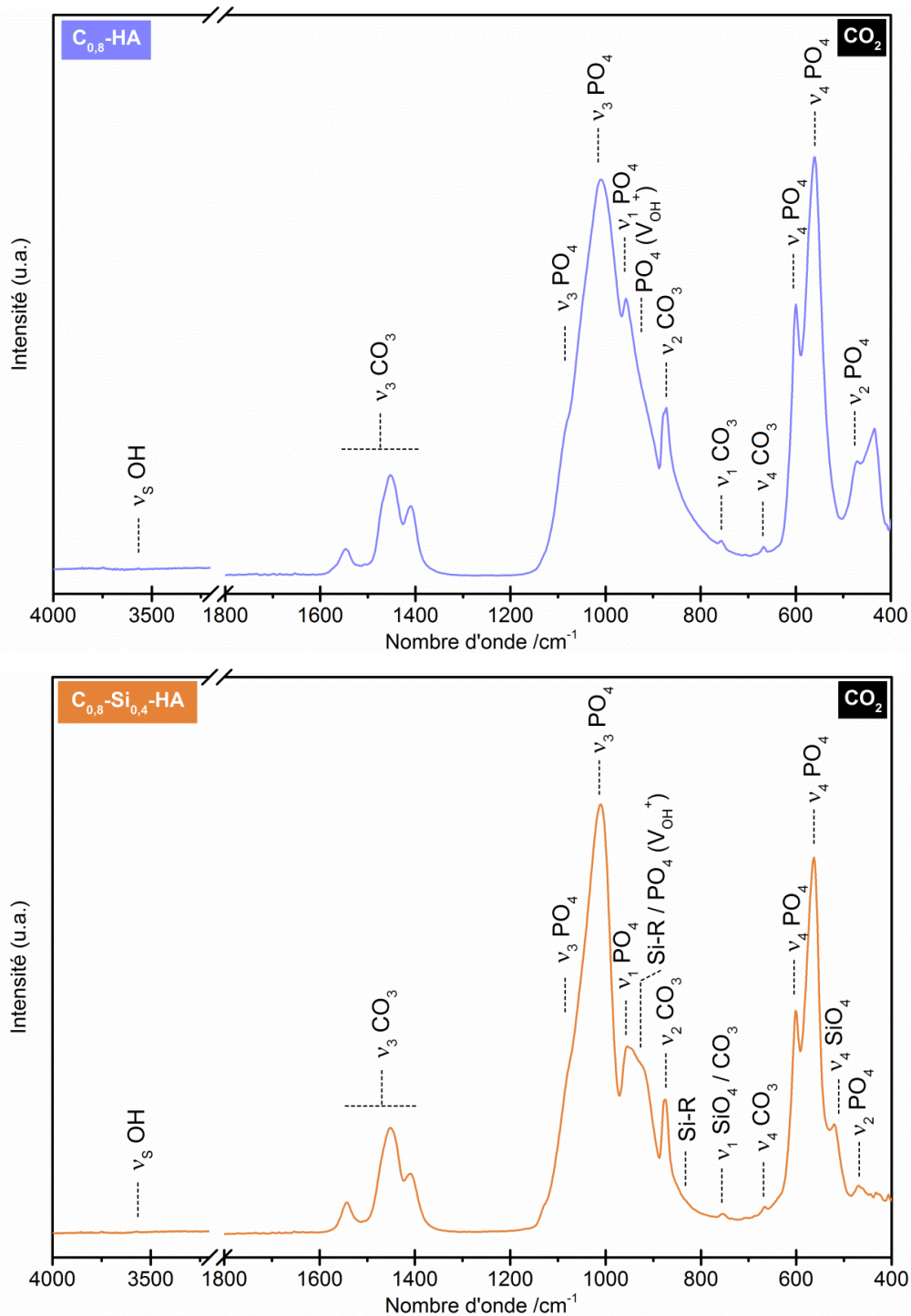
Les diagrammes de diffraction des rayons X des poudres  $C_{0,8}\text{-HA}$  et  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  calcinées à 1000°C sous  $\text{CO}_2$  pendant 1 heure sont présentés sur la Figure 79 (p. 144). Ils sont caractéristiques de la phase apatitique (PDF 9-432). Aucune phase cristalline secondaire n'est détectée. L'absence de coloration des solutions lors du test à la phénolphaléine, après le recuit des poudres à 550°C pendant 10 heures sous air, confirme l'absence de carbonate de calcium et de chaux dans les échantillons.



**Figure 79** : Diffractogrammes des poudres  $C_{0,8}\text{-HA}$  et  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  après calcination à 1000°C pendant 1 h sous  $\text{CO}_2$ .

La pureté des poudres  $C_{0,8}\text{-HA}$  et  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$ , ainsi que l'incorporation des groupements silicates et carbonates dans la maille apatitique est confirmée par la spectrométrie infrarouge des poudres calcinées à 1000°C sous  $\text{CO}_2$  pendant 1 heure (Figure 80 p. 145). Les bandes d'absorption, spécifiques aux groupements carbonates et

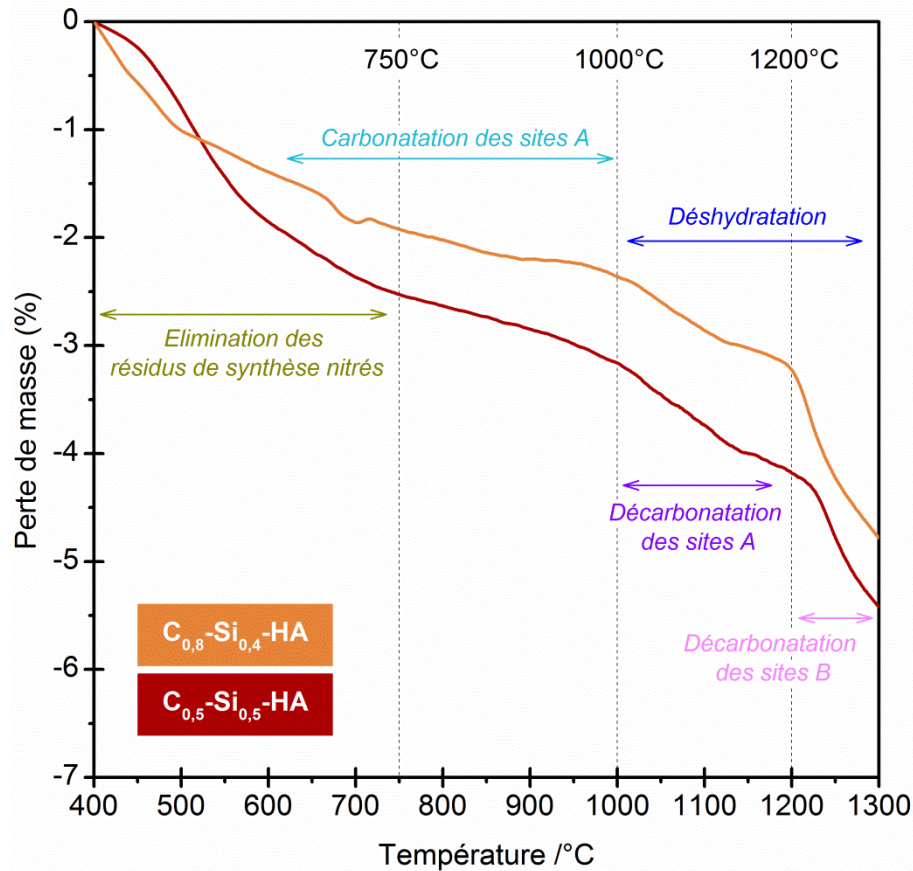
silicates, coïncident avec celles des poudres de référence C-HA et C-Si-HA (chapitre II). Ainsi, le spectre infrarouge de la poudre  $C_{0,8}\text{-HA}$  traitée sous  $\text{CO}_2$  présente l'allure caractéristique d'une  $C_{A/B}\text{-HA}$  (II.2.2 p. 45). De même, le spectre infrarouge de la poudre  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  est spécifique d'un composé  $C_{A/B}\text{-Si-HA}$  (II.3.2 p. 67). Aucune phase secondaire n'est détectée.



**Figure 80** : Spectres IR des poudres  $C_{0,8}\text{-HA}$  et  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  après calcination à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 1 h sous  $\text{CO}_2$ .

### IV.3.2. Comportement thermique : analyse thermogravimétrique

Les résultats de l'analyse thermogravimétrique de la poudre  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  sont présentés sur la Figure 81 (p. 146). Ceux de la poudre  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  sont ajoutés en référence. D'un point de vue global, la poudre  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  montre une perte de masse continue lors de la montée en température sous  $\text{CO}_2$  (le décrochement aux alentours de  $700^\circ\text{C}$  étant un artéfact d'acquisition). Le comportement thermique global du composé  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  est identique à celui du composé  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  étudié au chapitre précédent (III.2.3 p. 105), l'interprétation des pertes de masse est donc la même.



**Figure 81** : Courbes thermogravimétriques des poudres  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  et  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  réalisées sous  $\text{CO}_2$ .

Ainsi, jusqu'à  $750^\circ\text{C}$  environ, la perte de masse est attribuée à l'élimination des résidus de synthèse nitrés. Entre  $750^\circ\text{C}$  et  $1000^\circ\text{C}$ , la vitesse de perte de masse diminue ( $-1,75 \times 10^{-3} \text{ \%} \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$ ) du fait de la carbonatation de l'hydroxyapatite en site A sous  $\text{CO}_2$ . Entre  $1000^\circ\text{C}$  et  $1200^\circ\text{C}$  environ, une importante perte de masse attribuée à la déshydratation et à la décarbonatation des carbonates de type A est observée

( $-4,16 \times 10^{-3} \text{ \%} \cdot \text{°C}^{-1}$ ). A partir de 1200°C environ, l'hydroxyapatite se décompose avec la perte des carbonates de type B ( $-14,3 \times 10^{-3} \text{ \%} \cdot \text{°C}^{-1}$ ).

En résumé, le comportement thermique de la poudre C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA est similaire à celui de la poudre C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA. Sachant que le traitement thermique sous CO<sub>2</sub> affecte la composition, une formule chimique de la pastille utilisée pour l'étude biologique ne sera proposée qu'après le frittage.

## IV.4. Elaboration et caractérisation des céramiques

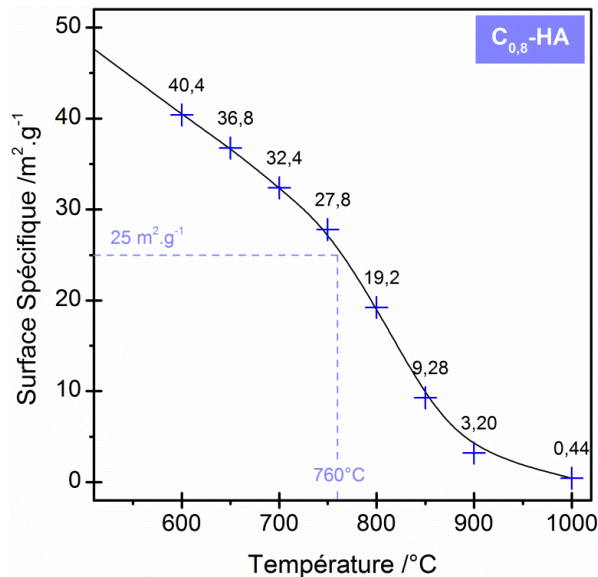
Pour l'étude de la compatibilité biologique, l'objectif est l'obtention de céramiques denses et monophasiques. Cette partie s'attache à l'élaboration et à la caractérisation de céramiques à partir de poudres d'HA, de  $C_{0,8}\text{-HA}$  et de  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$ . L'idée principale est de définir la température optimale de frittage où la densification de la céramique monophasique est maximale.

### IV.4.1. Compression des poudres avant frittage

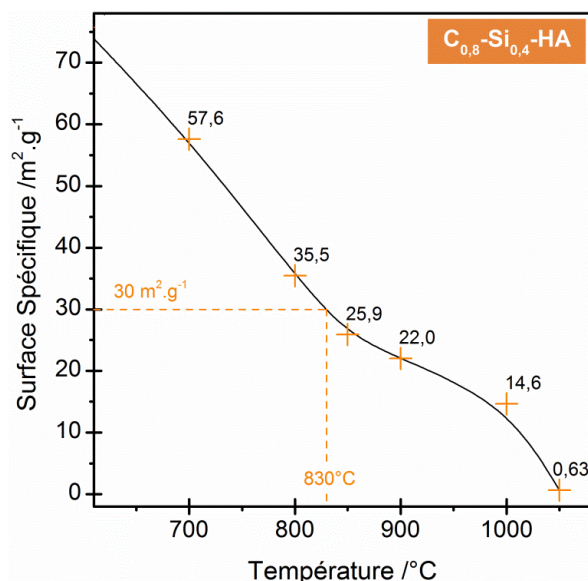
Pour l'élaboration des préformes par pressage, les poudres sont préalablement calcinées afin d'abaisser leur surface spécifique à des valeurs fixées à  $25 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  pour  $C_{0,8}\text{-HA}$  et  $30 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  pour  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$ . L'évolution de la surface spécifique des poudres calcinées sous  $\text{CO}_2$  est présentée sur la Figure 82 (p. 148) pour  $C_{0,8}\text{-HA}$  et sur la Figure 83 (p. 149) pour  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$ . Les valeurs des paramètres de précalcination associées à chacune des compositions sont récapitulées dans le Tableau 27 (p. 148).

**Tableau 27** : Valeurs des paramètres de calcination avant la mise en forme par pressage des poudres HA,  $C_{0,8}\text{-HA}$  et  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$ .

Composition	Surface spécifique désirée	Atmosphère de calcination	Température et durée de calcination
HA	$25 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$	Air	$750^\circ\text{C}$ - 2h
$C_{0,8}\text{-HA}$	$25 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$	$\text{CO}_2$	$760^\circ\text{C}$ - 1h
$C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$	$30 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$	$\text{CO}_2$	$830^\circ\text{C}$ - 1h



**Figure 82** : Evolution de la surface spécifique de la poudre  $C_{0,8}\text{-HA}$  calcinée pendant 1 h sous  $\text{CO}_2$  en fonction de la température.



**Figure 83** : Evolution de la surface spécifique de la poudre  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  calcinée pendant 1 h sous  $\text{CO}_2$  en fonction de la température.

#### IV.4.2. Caractérisations des céramiques d'HA

Dans le cadre de notre étude biologique, des céramiques élaborées à partir de poudre d'HA sont utilisées comme référence. Même si le frittage d'une HA est largement connu [Champion, 2013], il est important de vérifier la bonne densification et la pureté des échantillons.

Les comprimés de poudre d'HA sont frittés à  $1200^\circ\text{C}$  pendant 2 heures sous air. La densité des pastilles d'HA, mesurée par la méthode basée sur la poussée d'Archimède, est égale à 3,11 (Tableau 28 p. 150). Cette valeur est proche de la densité théorique de l'HA basée sur la fiche PDF 9-432 (*i.e.* 3,155) et celle calculée à partir de nos données structurales et chimiques (*i.e.* 3,09). Le pourcentage de densification calculé par rapport à cette dernière (Eq. III.2 p. 93) est donc légèrement supérieur à 100%. Comme vu précédemment (III.3.2.3.2 p. 124), cette aberration est principalement due aux erreurs de mesure (*e.g.* dosage élémentaire, mesure par poussée d'Archimède). Les images MEB (Figure 84 p. 150) confirment le fort taux de densification des pastilles d'HA.

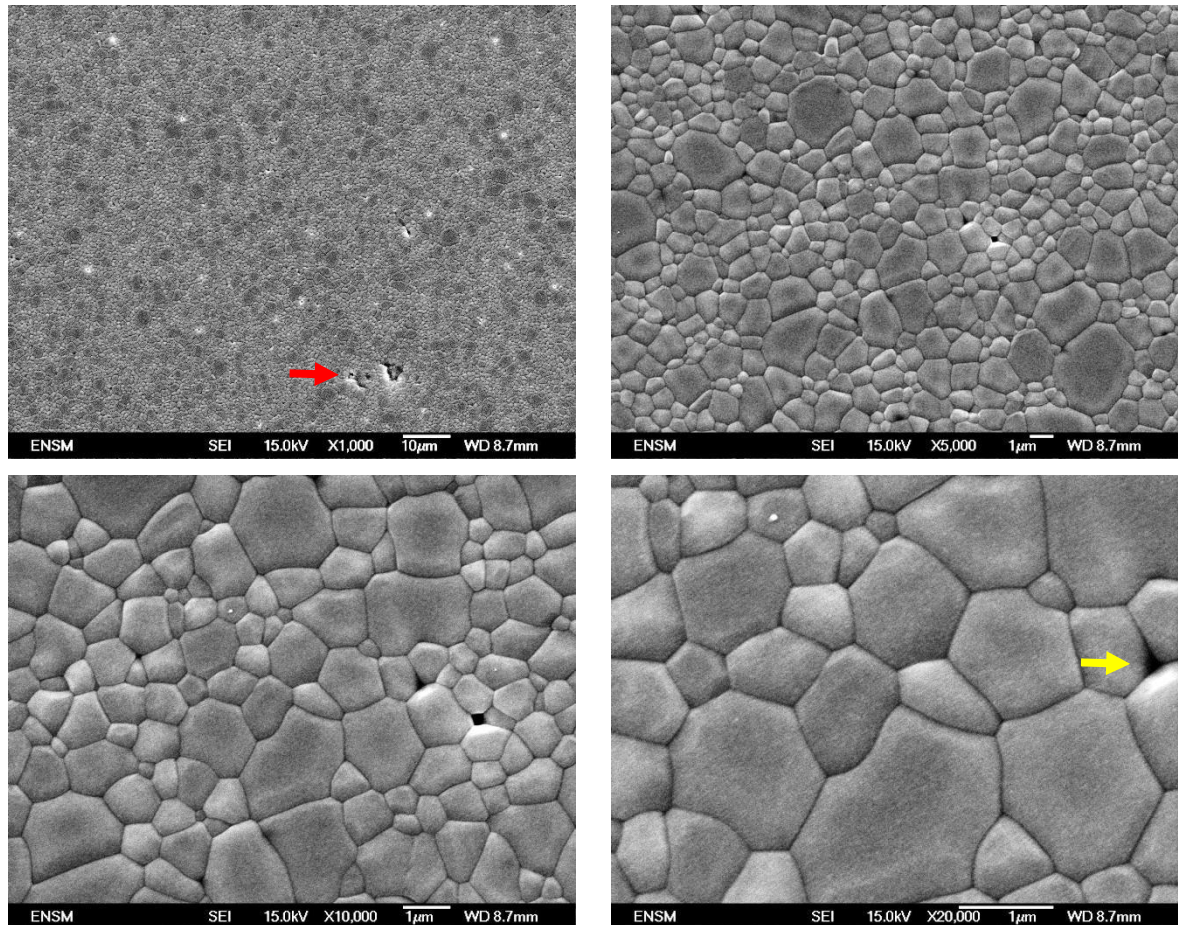
L'absence de phase secondaire dans les échantillons frittés d'HA est confirmée par DRX, analyse IR, et test à la phénolphtaléine.

**Tableau 28** : Densité et pourcentage de densification des comprimés de poudre HA frittés sous air pendant 2 h.

Composition	Température de frittage	Densité théorique	Densité Archimède	% Densification
HA	1200°C	3,09* / 3,15**	3,11 ± 0,02	~ 100 %

\* obtenue grâce aux paramètres de mailles (DRX) et à la masse molaire (dosages élémentaires)

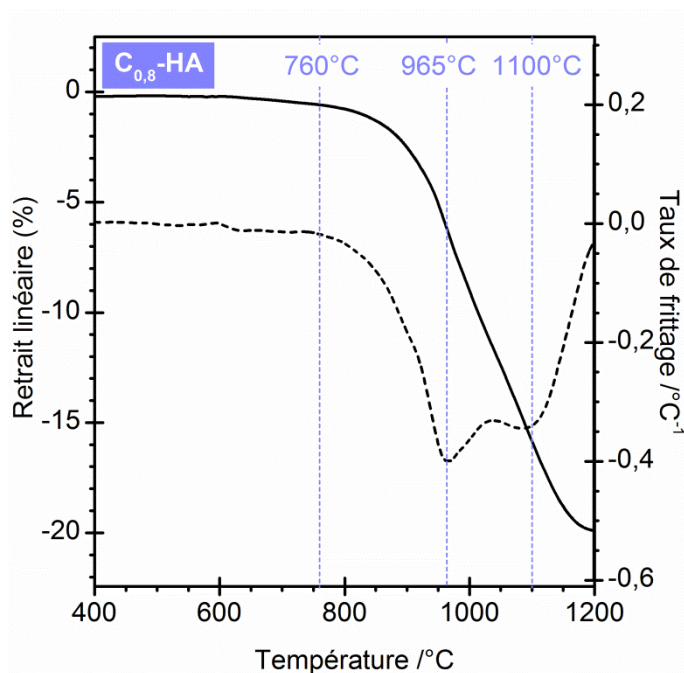
\*\* donnée de la fiche PDF 9-432



**Figure 84** : Images MEB des comprimés HA frittés à 1200°C pendant 2 h sous air. Flèches rouges : microporosités. Flèches jaunes : nanoporosité.

#### IV.4.3. Détermination de la température optimale de frittage de $C_{0,8}$ -HA

Afin d'élaborer des comprimés denses, une étude dilatométrique est réalisée pour la composition  $C_{0,8}$ -HA. La Figure 85 (p. 151) présente ainsi la courbe du retrait linéaire (et sa première dérivée) d'un comprimé de poudre  $C_{0,8}$ -HA lors d'une montée en température sous  $CO_2$ .



**Figure 85 :** Courbe de retrait linéaire (ligne continue) et dérivée première de la courbe de retrait (tirets) d'un comprimé de poudre  $C_{0,8}$ -HA calciné sous  $CO_2$  en fonction de la température.

Pour le composé  $C_{0,8}$ -HA, un changement de pente est observé sur la courbe de retrait à partir de  $760^\circ C$ . Deux maxima apparaissent sur la dérivée première à environ  $965^\circ C$  et  $1100^\circ C$ , correspondant à deux inflexions sur la courbe dilatométrique. Ainsi, comme observé dans la littérature pour les C-HA [Lafon, 2004; Lafon, 2008], le frittage de  $C_{0,8}$ -HA s'opère en deux étapes. La première (centrée sur  $965^\circ C$ ) correspond au frittage de la phase pure  $C_{0,8}$ -HA. La deuxième étape (centrée sur  $1100^\circ C$ ) coïncide avec la perte de carbonate et ainsi au changement du mécanisme de frittage. Basées sur ces résultats, trois températures de frittage de la composition  $C_{0,8}$ -HA sont choisies :  $1025^\circ C$ ,  $1050^\circ C$  et  $1100^\circ C$ . Les deux premières (*i.e.*  $1025^\circ C$  et  $1050^\circ C$ ) correspondent au domaine (entre les deux maxima) où la vitesse de densification de la céramique est maximale. La troisième ( $1100^\circ C$ ) est quant à elle volontairement surestimée afin d'avoir une température limite où la décomposition de la céramique a de forte chance de se produire.

Les comprimés de poudre de  $C_{0,8}$ -HA sont ainsi frittés à ces différentes températures pendant 1 heure sous  $CO_2$ . La première observation est macroscopique. En effet, le comprimé fritté à la température de  $1100^\circ C$  est légèrement bombé. Ce phénomène de gonflement allant jusqu'à la fissuration de la céramique est forcément en lien avec un dégagement gazeux. Bien qu'aucune phase secondaire ne soit détectée par DRX (Figure 86 p. 153) et par spectrométrie infrarouge (Figure 87 p. 153), le test à la phénolphthaléine (réalisé sur une pastille broyée et recuite à  $550^\circ C$  pendant 10 heures sous air) témoigne de la présence de  $CaCO_3$  dans l'échantillon après frittage à  $1100^\circ C$ .



Le gonflement de la céramique est donc lié au CO<sub>2</sub> libéré lors de la décomposition de la C-HA (Eq. III.9 p. 96) [Lafon, 2004].

Pour les comprimés de poudre de C<sub>0,8</sub>-HA frittés à 1025°C et 1050°C aucune phase secondaire n'est détectée que ce soit par DRX (Figure 86 p. 153), par spectrométrie infrarouge (Figure 87 p. 153), ou lors du test à la phénolphtaléine. Enfin, les pastilles C<sub>0,8</sub>-HA frittées à 1025°C s'avèrent légèrement plus denses que celles frittées à 1050°C (*i.e.* 3,02 vs 2,94) (Tableau 29 p. 152). Dans les deux cas, la densité mesurée est proche de la valeur théorique de 3,00, ce qui explique un taux de densification calculé proche de 100%. Les observations de la surface des céramiques C<sub>0,8</sub>-HA frittées à 1025°C faites au MEB confirment le fort taux de densification (Figure 88 p. 154). La présence de quelques pores micrométriques (flèches rouges) et nanométriques (flèche jaunes) est toutefois à noter.

Ainsi, les comprimés de poudre C<sub>0,8</sub>-HA, nécessaires à l'étude biologique, seront frittés sous CO<sub>2</sub> (1 bar) à une température de 1025°C pendant une durée d'une heure.

**Tableau 29** : Densité et pourcentage de densification des comprimés de poudre C<sub>0,8</sub>-HA frittés sous CO<sub>2</sub> à différentes températures pendant 1 h.

Composition	Température de frittage	Densité théorique*	Densité Archimède	% Densification
C <sub>0,8</sub> -HA	1025°C	3,00	3,02 ± 0,01	> 100 %
	1050°C	3,00	2,94 ± 0,01	~ 98 %
	1100°C	3,00	Bombé	Bombé

\* obtenue grâce aux paramètres de mailles (DRX) et à la masse molaire (dosages élémentaires)

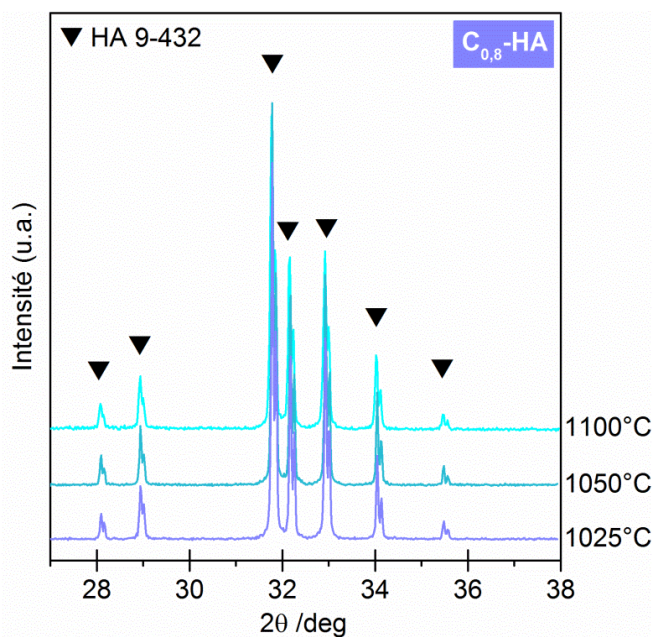


Figure 86 : Diffractogrammes des comprimés  $C_{0,8}$ -HA frittés sous  $CO_2$  à différentes températures pendant 1 h.

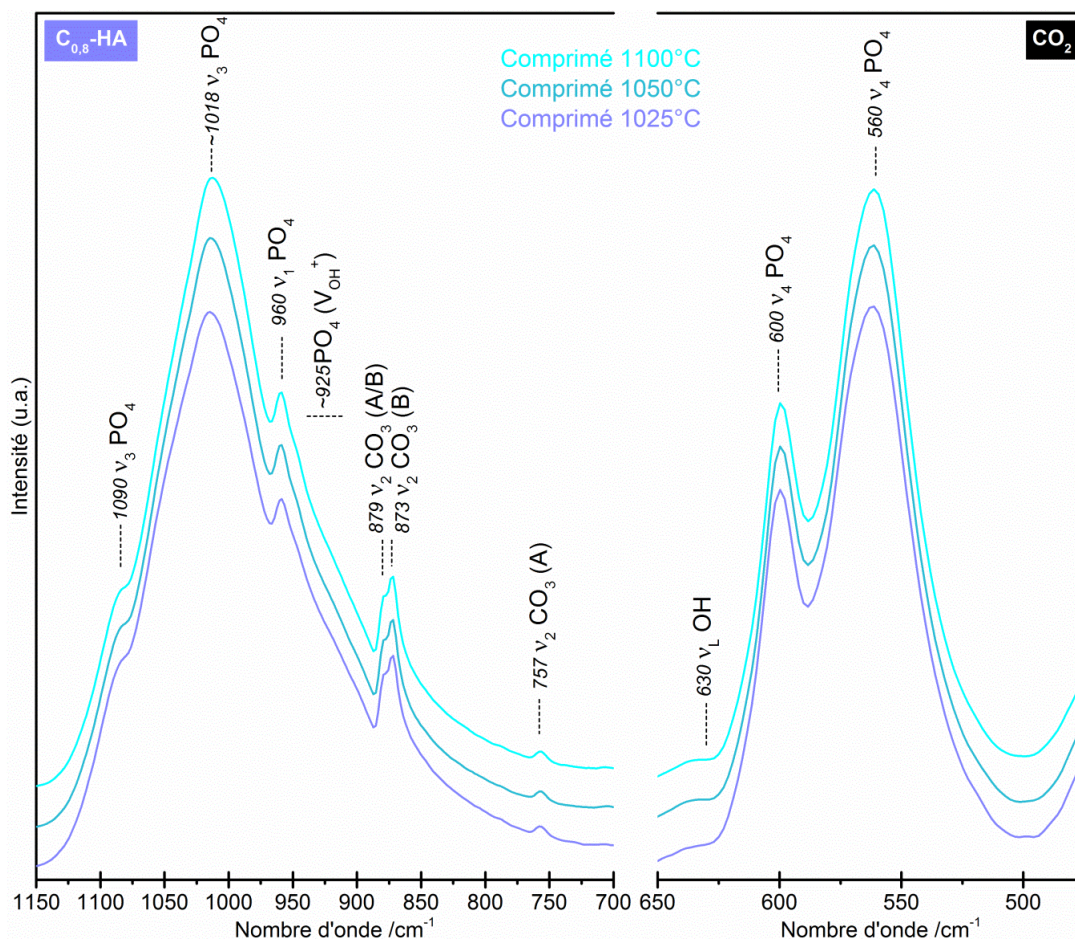
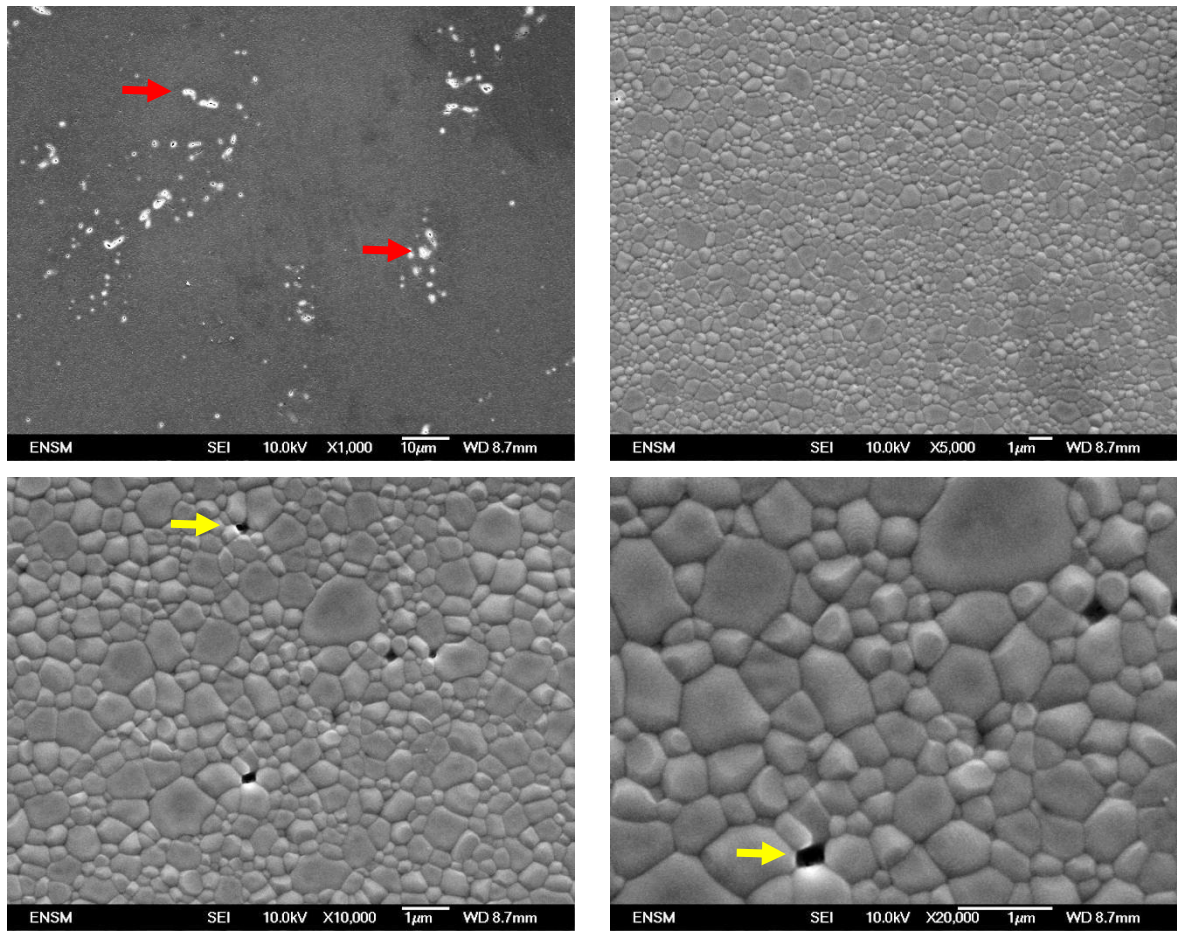


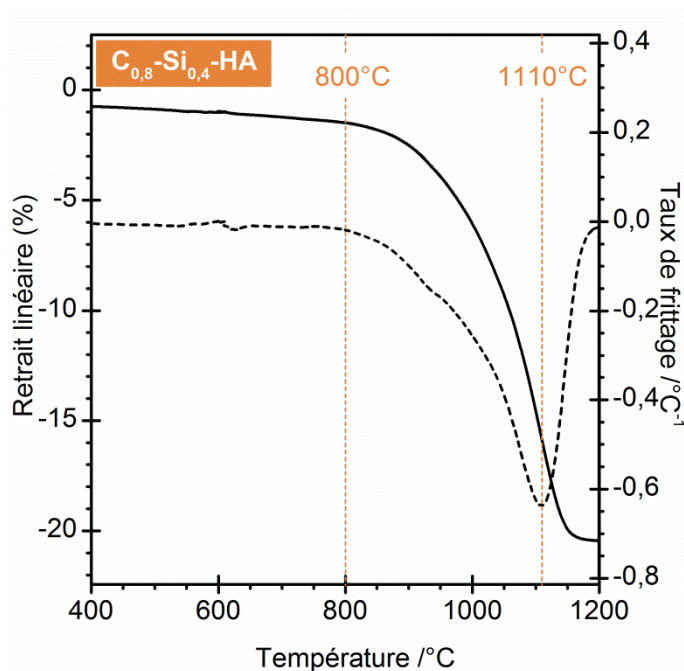
Figure 87 : Spectre IR des comprimés  $C_{0,8}$ -HA frittés sous  $CO_2$  à différentes températures pendant 1 h.



**Figure 88 :** Images MEB des comprimés de poudre  $C_{0,8}\text{-HA}$  frittés à  $1025^{\circ}\text{C}$  pendant 1 h sous  $\text{CO}_2$ . Flèches rouges : microporosités. Flèches jaunes : nanoporosité.

#### IV.4.4. Détermination de la température optimale de frittage de $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$

Afin d'élaborer des comprimés denses, une étude dilatométrique sous  $\text{CO}_2$  est réalisée (Figure 89 p. 155). La dérivée première de la courbe de retrait indique que le début du frittage intervient à partir de  $800^{\circ}\text{C}$  et que la vitesse maximale de retrait est atteinte vers  $1110^{\circ}\text{C}$ . Pour rappel, les résultats de l'analyse thermogravimétrique du composé  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  ont montré que l'apatite éliminait ses carbonates de type B (synonyme de décomposition) à partir de  $1200^{\circ}\text{C}$  (Figure 81 p. 146). Fort de ces résultats, trois températures sont testées pour les essais de frittage des comprimés  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  :  $1100^{\circ}\text{C}$ ,  $1125^{\circ}\text{C}$  et  $1150^{\circ}\text{C}$ .



**Figure 89 :** Courbe de retrait linéaire (ligne continue) et dérivée première de la courbe de retrait (tirets) d'un comprimé de poudre  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  calciné sous  $\text{CO}_2$  en fonction de la température.

Les comprimés de poudre de  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  sont ainsi frittés à ces différentes températures pendant 1 heure sous  $\text{CO}_2$ . Malgré des valeurs légèrement supérieures à la densité théorique de 3,01 (Tableau 30 p. 155), il apparaît que la densité est stable pour les températures de frittage de  $1100^\circ\text{C}$  et  $1125^\circ\text{C}$  ( $d = 3,04$  et  $3,05$  respectivement), puis qu'elle diminue pour la température plus élevée de  $1150^\circ\text{C}$  ( $d = 2,99$ ). La diminution de la densité au-delà de  $1125^\circ\text{C}$  peut être expliquée, par analogie aux phénomènes observés pour la composition  $C_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  (III.3.2.3.2 p. 124), par la déshydratation et la décarbonatation des sites A de l'apatite. La température optimale de densification des pastilles  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  semble donc se situer entre  $1100^\circ\text{C}$  et  $1125^\circ\text{C}$ .

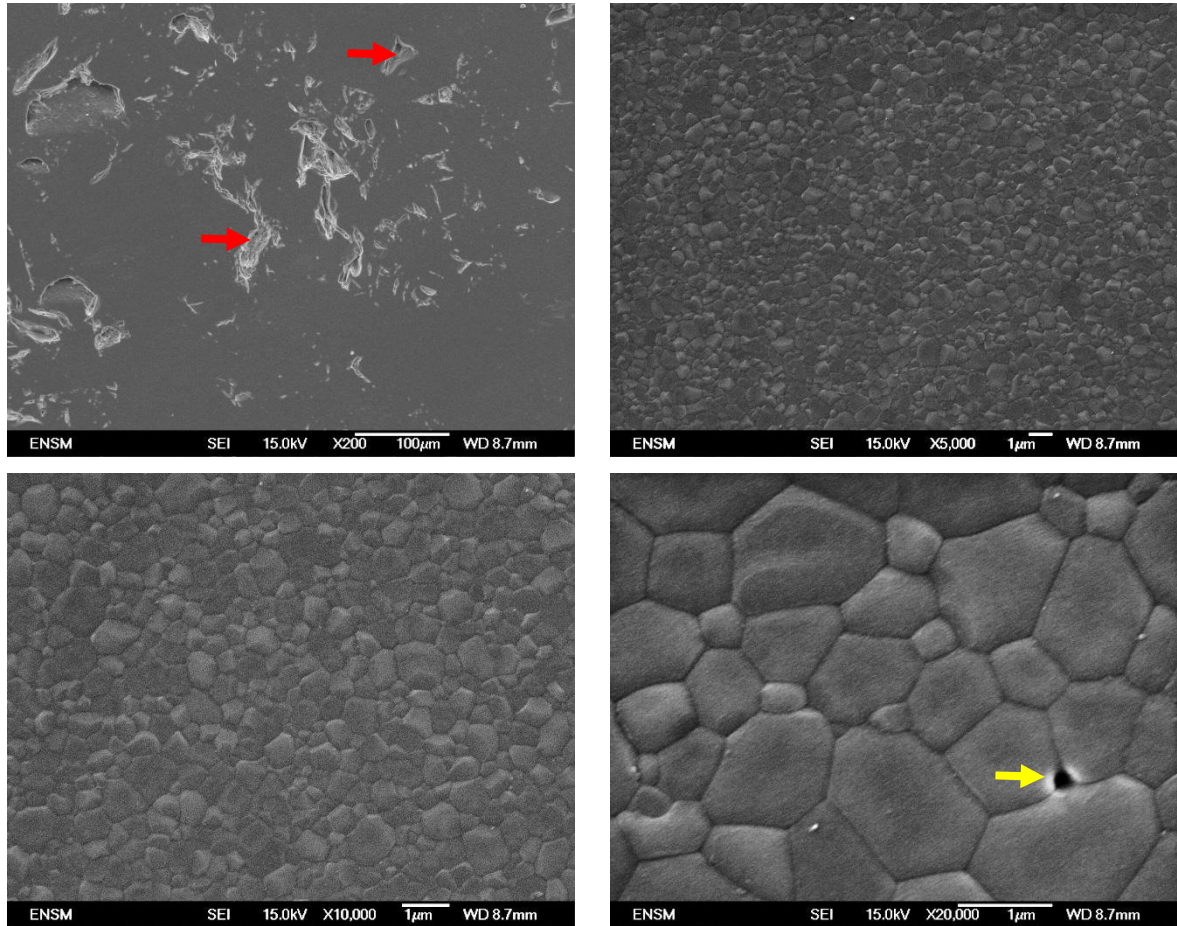
**Tableau 30 :** Densité et pourcentage de densification des comprimés de poudre  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  frittés sous  $\text{CO}_2$  à différentes températures pendant 1 h.

Composition	Température de frittage	Densité théorique*	Densité Archimède	% Densification
$C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$	$1100^\circ\text{C}$	3,01	$3,04 \pm 0,01$	> 100 %
	$1125^\circ\text{C}$	3,01	$3,05 \pm 0,01$	> 100 %
	$1150^\circ\text{C}$	3,01	$2,99 \pm 0,03$	~ 99 %

\* obtenue grâce aux paramètres de mailles (DRX) et à la masse molaire (dosages élémentaires)

Dans le cas des céramiques frittées à  $1100^\circ\text{C}$  et  $1125^\circ\text{C}$ , le pourcentage de densification calculé (Eq. III.2 p. 93), est, ici encore, légèrement supérieur à 100%.

Comme vu précédemment, cette aberration est due principalement aux approximations faites lors de la détermination de la densité théorique (III.3.2.3.2 p. 124) et aux erreurs de mesures. Pour preuve, la présence de microporosité à la surface des comprimés polis montre l'existence de pores fermés à l'intérieur de la céramique frittée à 1100°C (Figure 90 p. 156), confirmant que le taux de densification réel est inférieur à 100%.



**Figure 90** : Images MEB des comprimés de poudre  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  frittés sous  $\text{CO}_2$  à 1100°C pendant 1 h. Flèches rouges : microporosités. Flèches jaunes : nanoporosité.

Pour les comprimés de poudre de  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  frittés entre 1100°C et 1150°C aucune phase secondaire n'est détectée par DRX (Figure 91 p. 157). Les tests à la phénolphtaléine des pastilles (broyées puis recuites sous air à 550°C) sont aussi négatifs pour les trois températures de frittage. Seuls les spectres infrarouges (Figure 92 p. 157) laissent entrevoir un début de décomposition à 1150°C de la phase  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  avec l'apparition d'épaulements spécifiques aux vibrations des groupements  $\text{PO}_4$  de la phase TCP (*e.g.* 499  $\text{cm}^{-1}$ , 1011  $\text{cm}^{-1}$ ). En revanche, les pastilles  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  ne présentent pas de phase secondaire amorphe silicatée (*e.g.* silice).

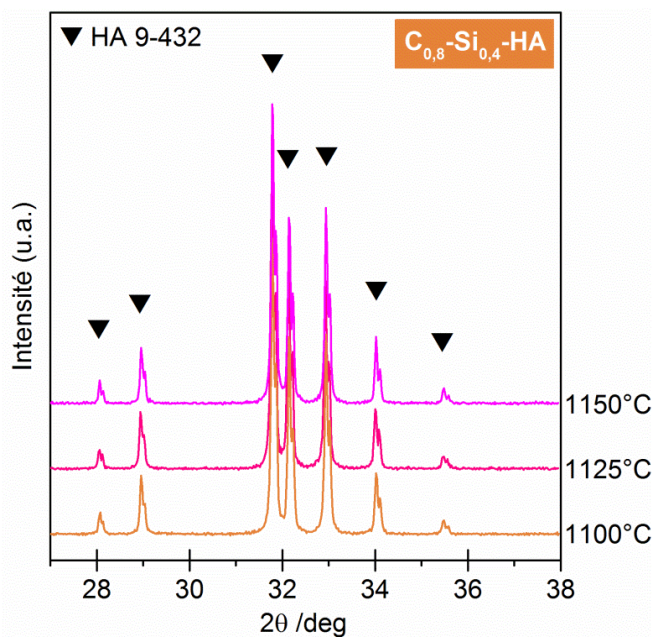


Figure 91 : Diffractogrammes des comprimés  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  frittés sous  $\text{CO}_2$  à différentes températures pendant 1 h.

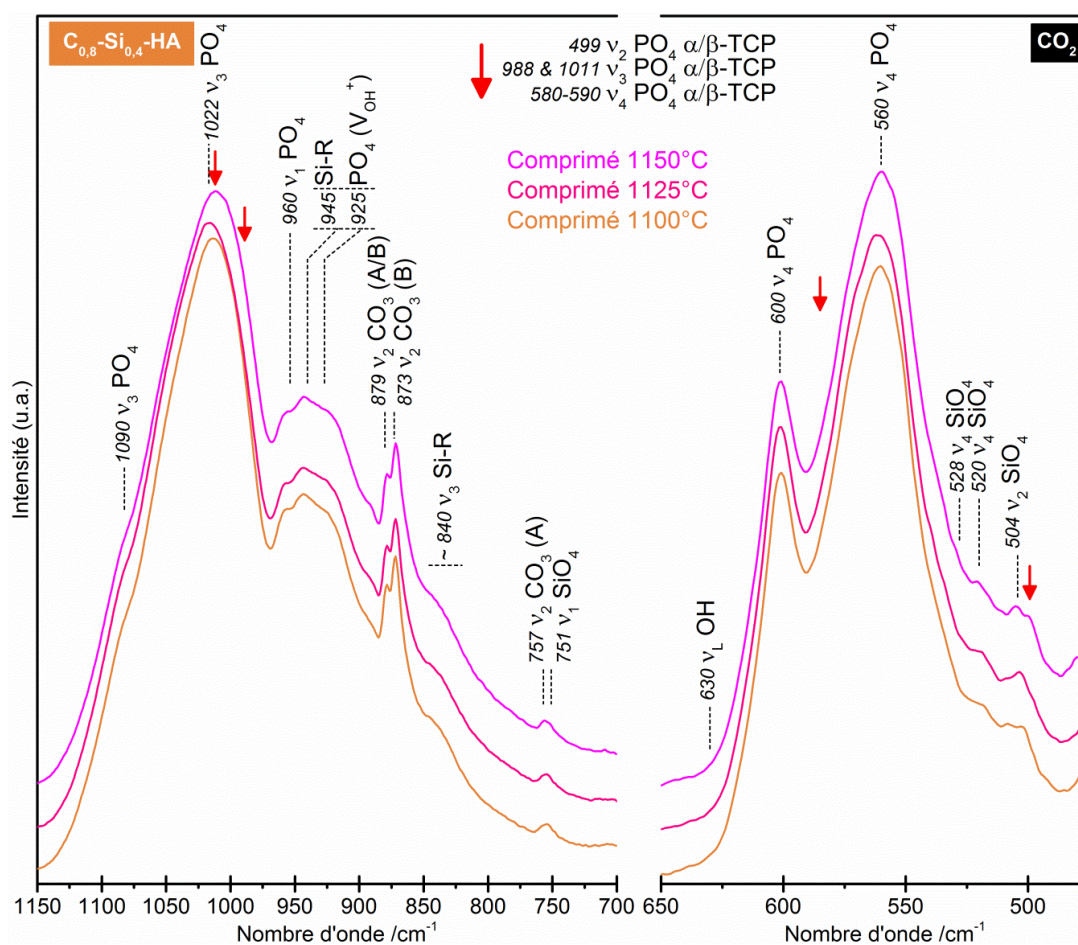
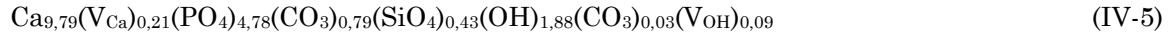


Figure 92 : Spectre IR des comprimés  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  frittés sous  $\text{CO}_2$  à différentes températures pendant 1 h.

Afin de limiter au maximum le risque de décomposition des échantillons frittés, et compte tenu des différences non significatives observées sur le taux de densification, la température la plus basse parmi les trois (*i.e.* 1100°C) sera retenue pour fritter les pastilles utilisées pour les tests biologiques.

Enfin, une formule hypothétique du comprimé C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA fritté à 1100°C pendant une heure sous CO<sub>2</sub> est proposée au regard des résultats des dosages élémentaires obtenus (Tableau 31 p. 158). La formule proposée est la suivante (Eq. IV-5 p. 158) :



La masse molaire associée de l'échantillon est alors de 967 g.mol<sup>-1</sup>.

**Tableau 31** : Résultats des dosages élémentaires des comprimés frittés C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA sous CO<sub>2</sub> à 1100°C pendant 1 h - en mmol.g<sup>-1</sup>.

Echantillons	Ca	P	Si	C	Ca/(P+Si+C)	Si/P
C <sub>0,8</sub> -Si <sub>0,4</sub> -HA 1100°C-1h CO <sub>2</sub>	10,556 ±0,268	5,156 ±0,081	0,461 ±0,008	0,888 ±0,017	1,623	0,089

En résumé, le Tableau 32 p. 158 récapitule les paramètres de frittage utilisés pour l'élaboration des comprimés d'HA, de C<sub>0,8</sub>-HA et de C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA évalués biologiquement.

**Tableau 32** : Paramètres de frittage des comprimés de poudres HA, C<sub>0,8</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA utilisés pour l'étude biologique 2D.

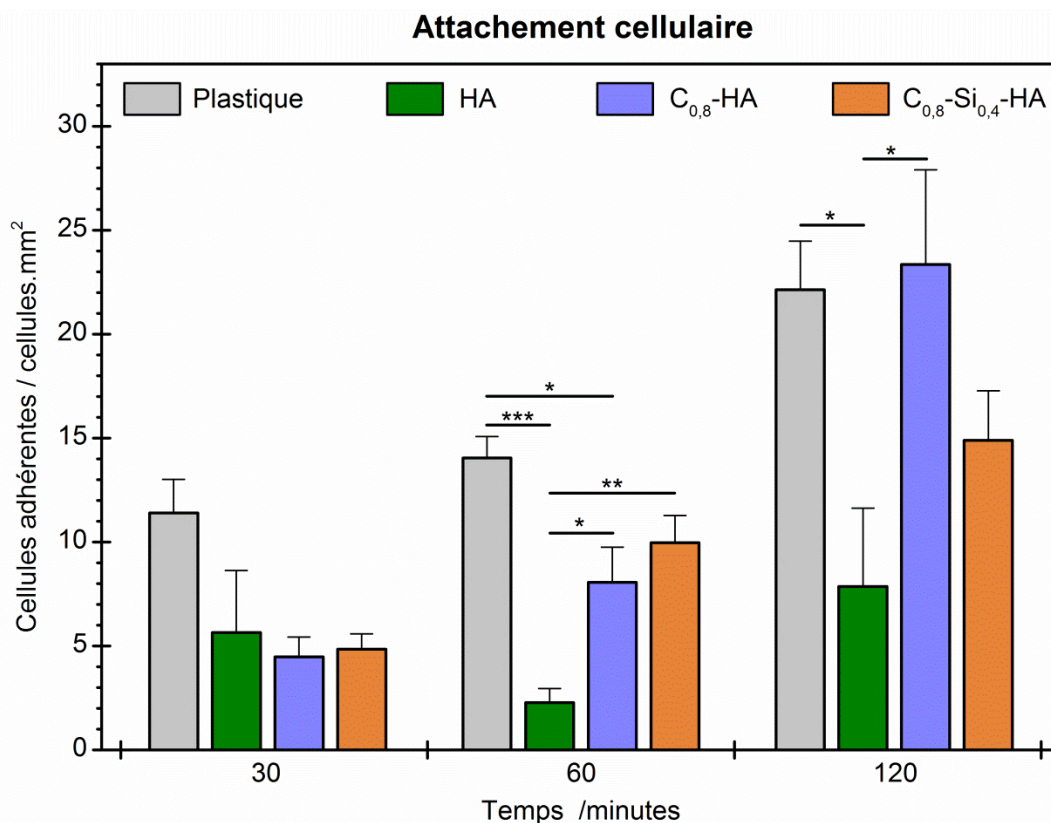
Composition	Atmosphère de frittage	Température et durée de frittage
HA	Air	1200°C - 2h
C <sub>0,8</sub> -HA	CO <sub>2</sub>	1025°C - 1h
C <sub>0,8</sub> -Si <sub>0,4</sub> -HA	CO <sub>2</sub>	1100°C - 1h

## IV.5. Comportement des cellules souches mésenchymateuses en culture 2D *in vitro* sur des céramiques denses HA, C<sub>0,8</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA

L'évaluation biologique *in vitro* 2D, réalisée à l'aide de cellules souches mésenchymateuses C3H10T1/2, proposée dans ce chapitre a pour but de valider la non-toxicité de la phase C-Si-HA et de comparer les réponses cellulaires (attachement, activité, prolifération) à des matériaux de références du type phosphate de calcium (HA et C-HA) ou plastique de culture.

### IV.5.1. Attachement cellulaire

Les résultats des tests d'attachement cellulaire, réalisés dans les premières heures après l'ensemencement sur les différents supports, sont présentés sur la Figure 93 (p. 159). La surface plastique (PS) des fonds de puits de culture sans comprimé céramique est utilisée comme contrôle positif.



**Figure 93** : Evolution de l'attachement cellulaire sur les différents substrats après 30 min, 1 h et 2 h de culture. Etude statistique : différences significatives non dues au hasard (\* = 95% ; \*\* = 99% ; \*\*\* = 99,9%).



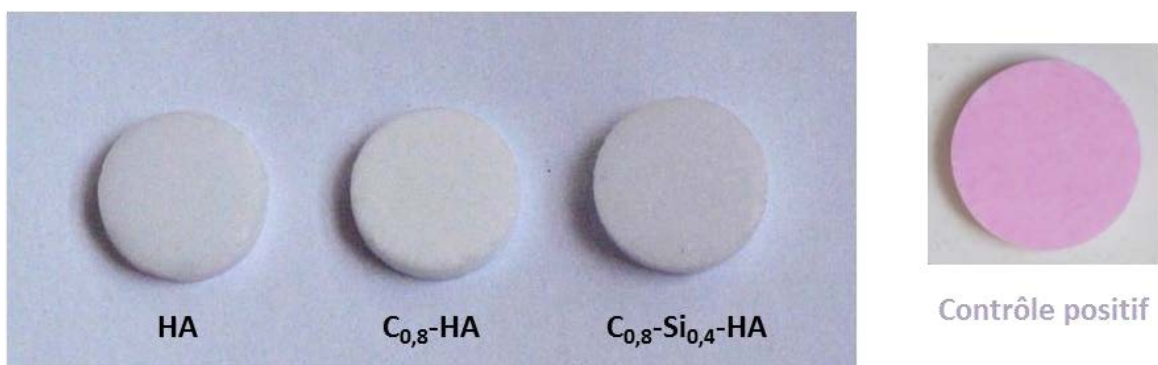
Pour toutes les compositions, le nombre de cellules attachées sur les céramiques augmente avec le temps de culture, allant jusqu'à quadrupler dans le cas des C<sub>0,8</sub>-HA en passant de moins de 5 cellules à environ 23 cellules.mm<sup>-2</sup>. La quantité de cellules attachées sur le plastique a tendance à être plus élevée que sur les pastilles d'apatite après 30 minutes d'attachement mais les différences restent non-significatives. Après 1 heure, le nombre de cellules attachées augmente très significativement pour C<sub>0,8</sub>-HA, C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA et le plastique, comparativement à l'HA. Finalement, après 2 heures, le nombre de cellules fixées croît sur toutes les surfaces. Il est maximum pour les pastilles C<sub>0,8</sub>-HA en étant significativement plus élevé que sur HA, et a tendance à être meilleur que sur la surface plastique (non-significatif). Enfin, après 2 heures, les échantillons C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA ne présentent pas de différence significative avec les autres surfaces comme celle du plastique spécialement traitée pour la culture des cellules. Ceci est donc la conclusion d'un bon attachement cellulaire sur la surface de C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA (environ 15 cellules.mm<sup>-2</sup>).

## IV.5.2. Comportement et activité cellulaire

### Test d'apoptose

Après trois jours de culture, les cellules mortes apparaissent en rose par coloration du kit APOPercentage. Les images des céramiques après la coloration sont présentées sur la Figure 94 p. 160. La figure présente également le contrôle positif qui confirme la validité du test (coloration rose).

Après trois jours de culture, les cellulesensemencées à la surface des céramiques sont vivantes. Ainsi, les résultats indiquent clairement que, contrairement à une hydroxyapatite silicatée pure [Marchat, 2013a], les phases HA, C<sub>0,8</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA ne sont pas toxiques pour les cellules osseuses C3H10T1/2.

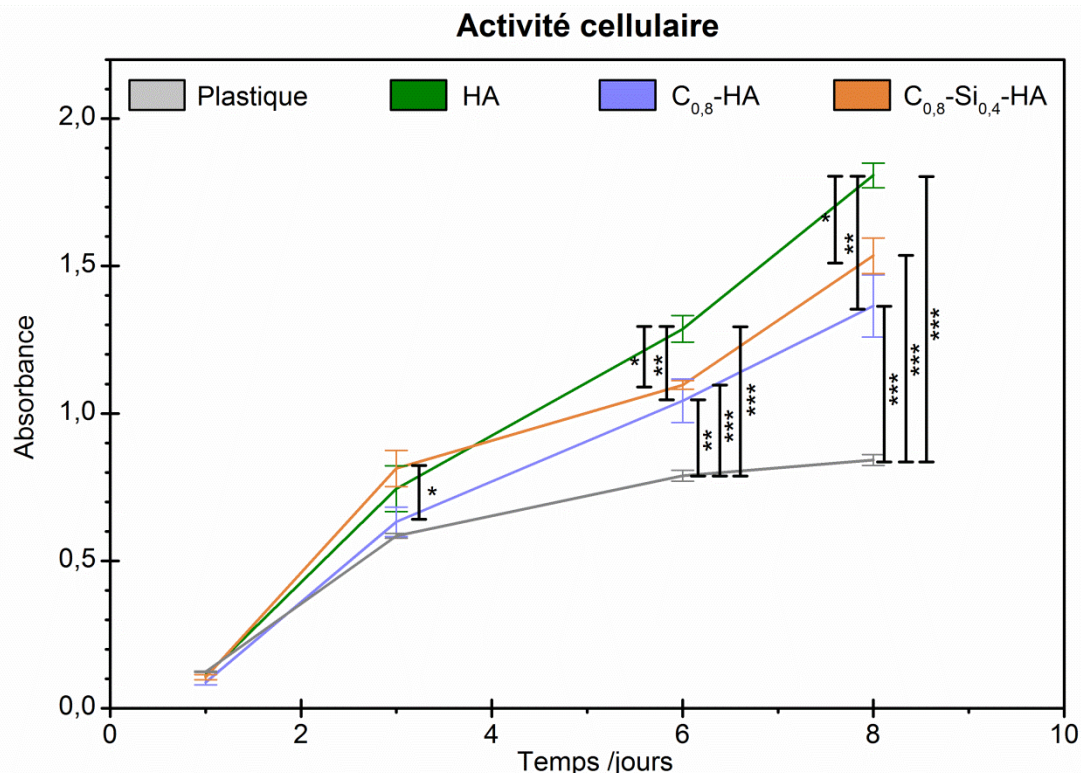


**Figure 94** : Résultats des tests d'apoptose réalisés après 3 jours de culture sur les surfaces des céramiques HA, C<sub>0,8</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA, et du contrôle positif témoin.

### Activité cellulaire

L'activité cellulaire pour chaque composition est présentée sur la Figure 95 (p. 161). L'activité des cellules augmente avec le temps quel que soit le substrat. En première approximation, il est possible de dire que le nombre de cellules augmente sur toutes les surfaces même si le test MTT représente réellement une activité mitochondriale qui n'est pas directement équivalente à un nombre de cellule. En effet, une courbe de calibration de l'activité en fonction du nombre de cellules est nécessaire mais n'a pas été réalisée dans le cadre de ces essais.

Après un jour d'ensemencement, l'activité cellulaire est équivalente pour tous les composés. A 3 jours, l'activité cellulaire à la surface des céramiques a tendance à être plus importante que sur la référence plastique (PS), différence devenant fortement significative à partir du 6<sup>ème</sup> jour. De plus, toujours au 6<sup>ème</sup> jour, la croissance cellulaire apparaît significativement plus forte sur HA que sur  $C_{0,8}$ -HA et  $C_{0,8}$ - $Si_{0,4}$ -HA. Finalement, au 8<sup>ème</sup> jour, l'activité des cellules sur les deux surfaces des céramiques carbonatées ( $C_{0,8}$ -HA et  $C_{0,8}$ - $Si_{0,4}$ -HA) n'est pas significativement différente et a tendance à rester inférieure à celle observée sur l'HA. L'activité cellulaire mesurée à la surface des céramiques est toutefois significativement plus importante que celle mesurée à la surface du plastique : environ 1,6 fois plus importante pour  $C_{0,8}$ -HA et 1,8 fois plus importante pour  $C_{0,8}$ - $Si_{0,4}$ -HA.



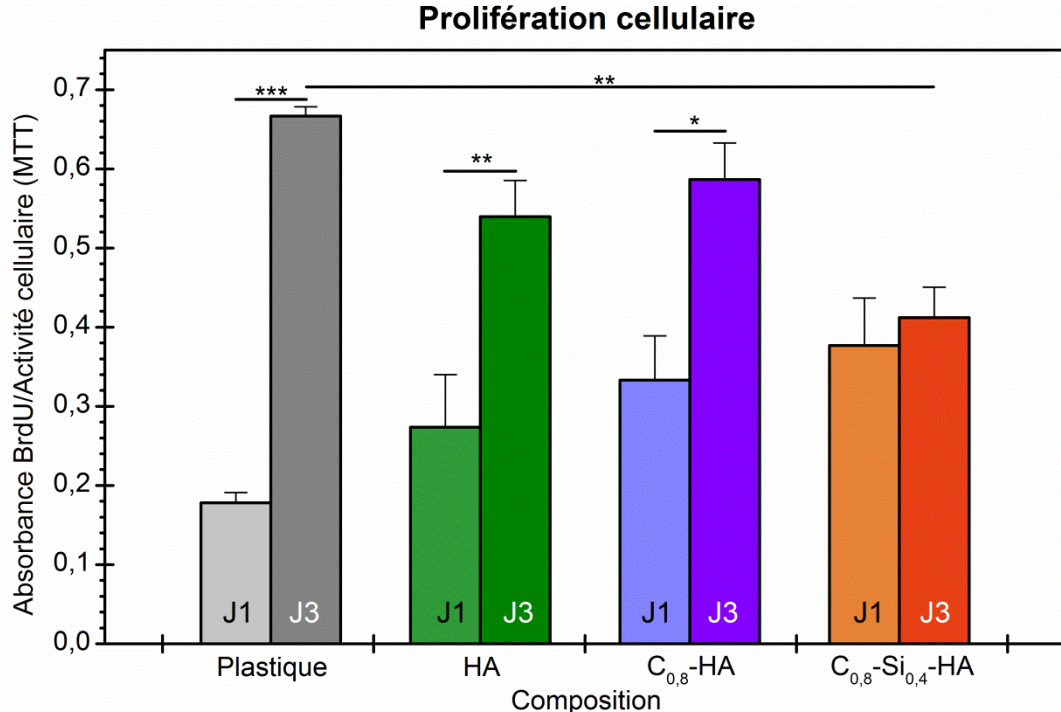
**Figure 95** : Evolution de l'activité cellulaire sur les différents substrats après 1, 3, 6 et 8 jours de culture. Etude statistique : différences significatives non dues au hasard (\* = 95% ; \*\* = 99% ; \*\*\* = 99,9%).

### Prolifération cellulaire

Les résultats du test de prolifération, mesurant le nombre de cellules en phase de duplication, sont présentés sur la Figure 96 (p. 162). Les données de prolifération cellulaire sont normalisées par rapport aux résultats de l'activité cellulaire déterminée précédemment qui peut être approximée au nombre de cellules vivantes (résultats du test de viabilité MTT, Figure 95 p. 161). Ce test est réalisé sur des temps précoces de culture (jours 1 et 3), comme conseillé par le fournisseur du kit BrdU (Roche).

La prolifération augmente avec le temps quel que soit le substrat. Après un jour de culture, la prolifération a tendance à être plus importante à la surface des céramiques que sur le plastique, pourtant traité chimiquement pour améliorer l'adhérence et la prolifération cellulaire. Aucune différence significative n'est cependant observée entre les céramiques d'HA, de C<sub>0,8</sub>-HA et de C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA. Ainsi, les céramiques favorisent la prolifération des cellules C3H10T1/2 et présentent une bonne biocompatibilité pendant le premier jour de culture.

Après trois jours, les cellules continuent de proliférer sur les quatre surfaces. Toutefois, en comparaison au premier jour, la prolifération augmente de façon significative pour le plastique, l'HA et le C<sub>0,8</sub>-HA (respectivement, les valeurs d'absorbance normalisées augmentent d'environ 275 %, 97 % et 72 %). La prolifération des cellules sur les pastilles de C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA reste stable entre le premier et le troisième jour (+ 9 %).



**Figure 96** : Evolution de la prolifération cellulaire sur les différents substrats après 1 et 3 jours de culture. Etude statistique : différences significatives non dues au hasard (\* = 95% ; \*\* = 99% ; \*\*\* = 99,9%).

Ainsi, deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer conjointement l'augmentation de l'activité cellulaire (Figure 95 p. 161) et la stabilité de la prolifération (Figure 96 p. 162) pour  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  entre les jours 1 et 3 :

(i) soit la viabilité des cellules sur  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  est plus forte que sur les autres surfaces. Autrement dit, les cellules meurent moins (par un mécanisme différent de celui de l'apoptose) sur  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  que sur les autres surfaces. Ainsi même si la prolifération est plus faible sur  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  que sur les autres surfaces apatitiques, le nombre de cellules (représenté par l'activité en première approximation) reste équivalent sur les trois surfaces

(ii) soit une activité intracellulaire et un métabolisme plus élevé dans ces cellules se produit. Les ostéoblastes sont connus pour synthétiser une grande quantité de collagène de type I dans la matrice extracellulaire, permettant l'attachement des minéraux et la formation de l'os [Anselme, 2000]. Cette forte synthèse protéique nécessite un apport d'énergie considérable qui pourrait expliquer l'activité mitochondriale observée (Figure 95 p. 161), produisant l'énergie cellulaire, et indiquant que les cellules entrent en différenciation ostéoblastique plutôt qu'en division. Pour confirmer cette hypothèse il faudrait toutefois réaliser des tests de différenciation par un dosage du collagène (protéine précocement induite en cas de différenciation ostéoblastique), ou encore par un dosage de la phosphatase alcaline (enzyme impliquée dans la minéralisation de la matrice).

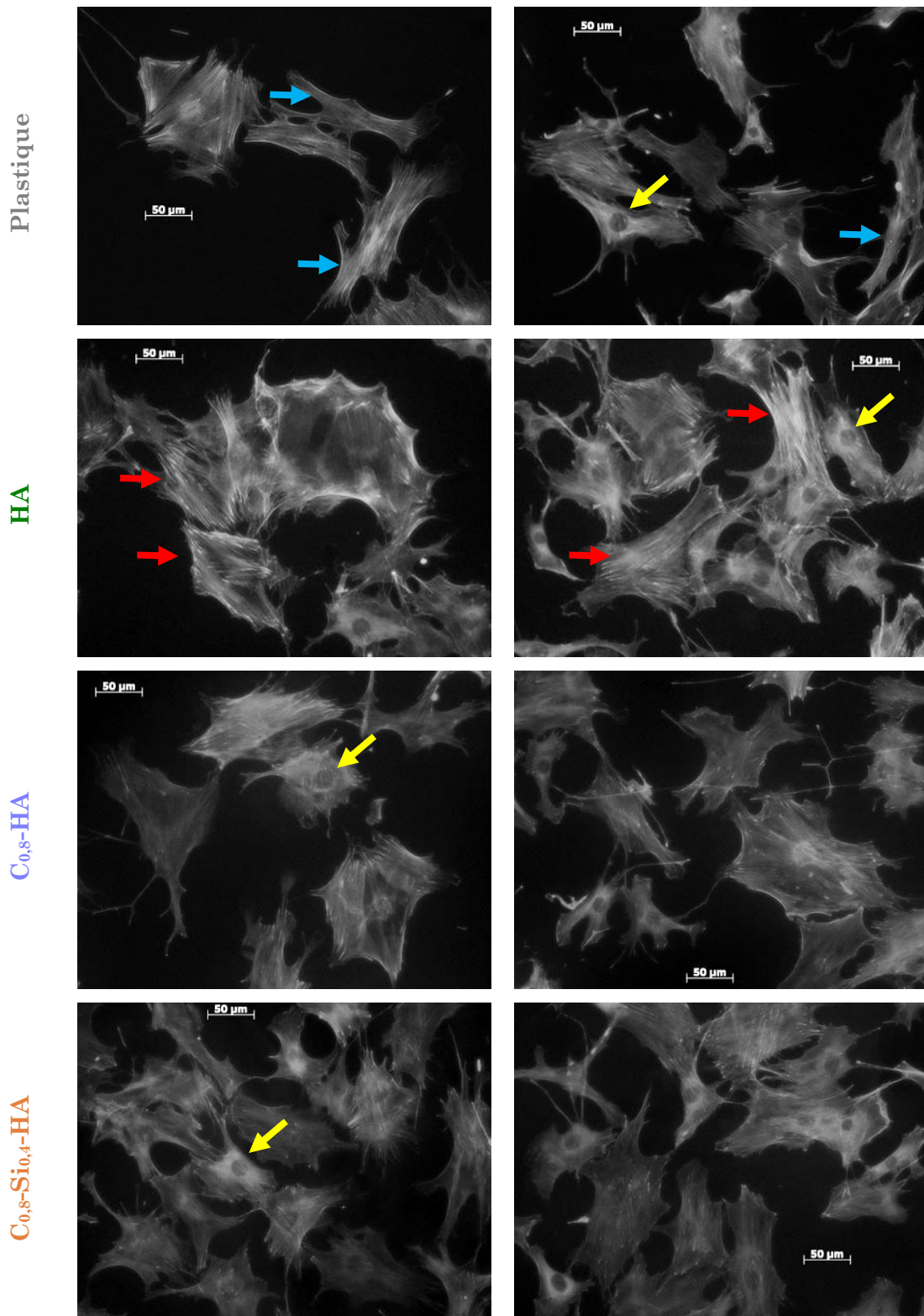
Les comprimés de  $C_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  semblent présenter une plus forte biocompatibilité. La présence de silicate dans la composition de la céramique, ainsi que leur hypothétique relargage dans le milieu de culture, ont peut-être joué un rôle sur ces premiers résultats de biocompatibilité et notamment une différenciation ostéoblastique plus précoce que sur les autres hydroxyapatites évaluées (HA et  $C_{0,8}\text{-HA}$ ) [Hing, 2006; Reffitt, 2003; Thian, 2006a].

### IV.5.3. Morphologie cellulaire

#### Cytosquelette d'actine

L'interaction entre la cellule et le substrat est observée après 24 h de culture par immunofluorescence des filaments d'actine, un des composés du cytosquelette.

Le marquage des cytosquelettes d'actine ne présente pas de différence appréciable entre les quatre substrats testés (Figure 97 p. 164). D'une manière générale, la taille des cellules et le cytosquelette d'actine sont quasi identiques quelle que soit la composition du matériau. Après un jour de culture, les fibres de stress (Figure 77 p. 136) sont parfaitement visibles au centre des cellules, synonymes d'une stabilisation du noyau (flèches jaunes). A noter que les fibres de stress sont particulièrement denses et fortement marquées sur les cellulesensemencées sur HA (flèches rouges). Un grand nombre de fibres de stress est caractéristique d'une cellule en tension, qui cherche à



**Figure 97 :** Marquage des fibres d'actine sur les différents substrats après 1 jour de culture. Flèches jaunes : stabilisation du noyau par les fibres de stress. Flèches rouges : fibres de stress particulièrement denses et marquées pour HA. Flèches bleues : cellules fines (caractéristique des cellules en migration).

adhérer fortement au substrat [Vallenius, 2013]. Or, d'après les mesures d'attachement réalisées après 2 heures d'ensemencement (Figure 93 p. 159), peu de cellules ont réussi à se fixer sur HA, en comparaison aux autres compositions de substrat. Ce faible nombre de cellules attachées dans les toutes premières heures de culture est à associer avec l'important réseau de fibres de stress observé qui est créé par les cellules pour pouvoir se maintenir sur le substrat d'HA.

Des filaments d'actine sont également observés aux extrémités cellulaires (pseudopodes). Dans l'ensemble, les cellules ont tendance à être plus étalées sur les céramiques, synonyme d'une bonne affinité avec le substrat. Inversement, la surface plastique présente des cellules plus fines (flèches bleues), caractéristiques de cellules en migration.

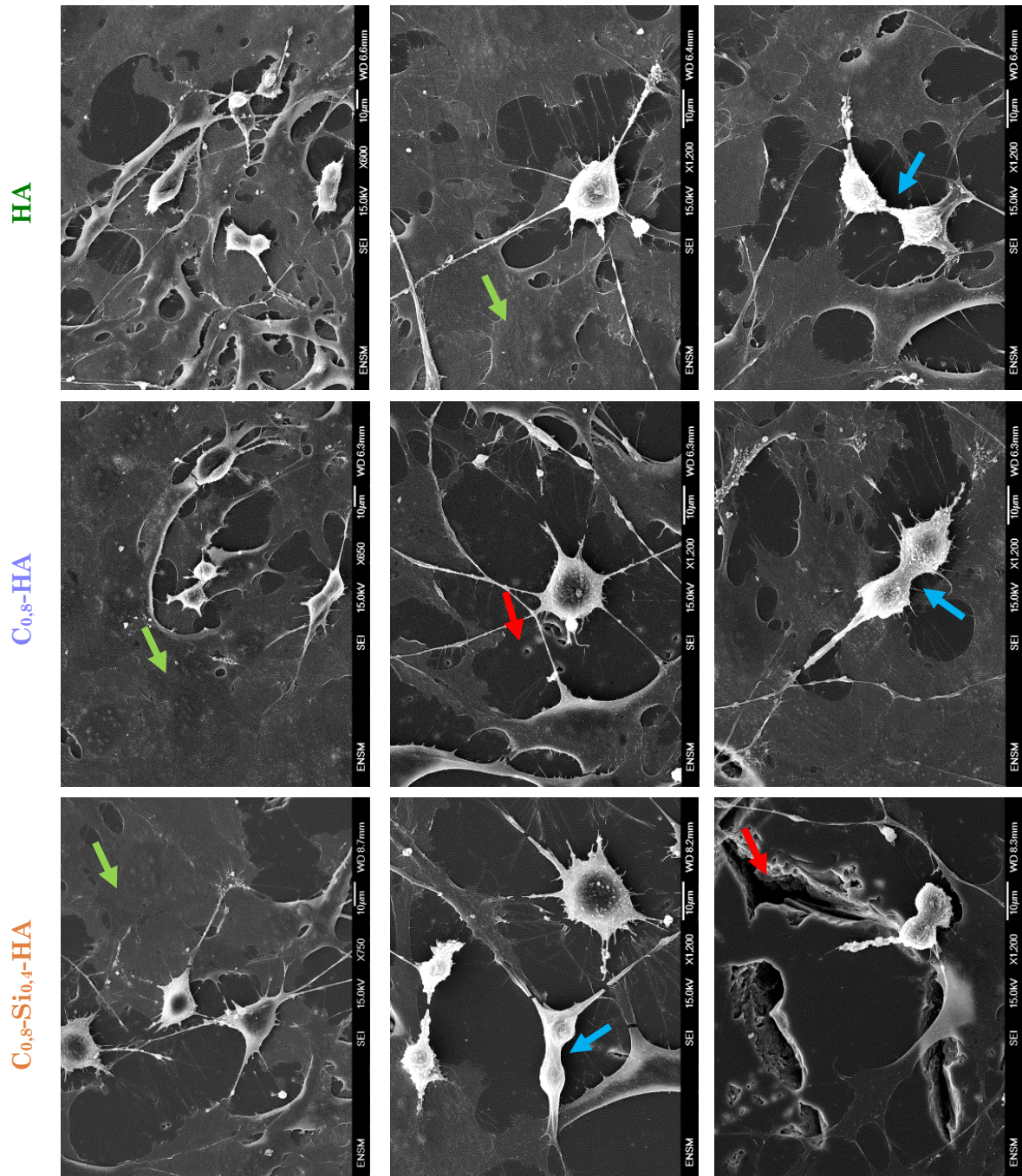
### **Morphologie cellulaire**

Les images MEB sont prises après 1 et 3 jours de culture des cellules à la surface des céramiques (HA, C<sub>0,8</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA).

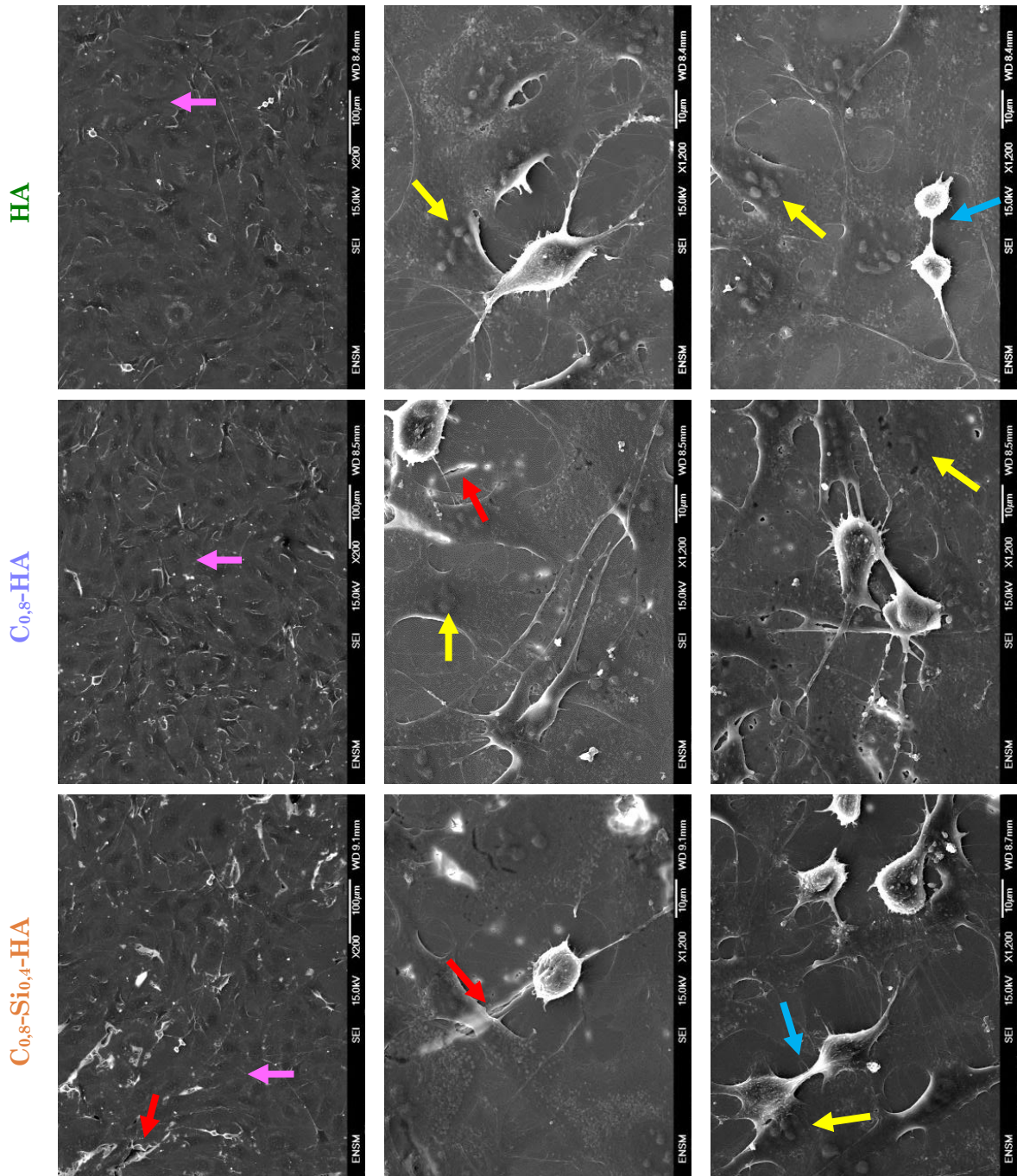
Après un jour de culture, peu de différences significatives sont détectables à la surface des différents substrats (Figure 98 p. 166). Quelle que soit la composition de la céramique, les cellules recouvrent en grande partie leur surface. Dans le cas des compositions C<sub>0,8</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA, la microporosité qui était visible avant l'ensemencement cellulaire (Figure 88 p. 154 et Figure 90 p. 156) l'est encore après 24 heures de culture (flèches rouges sur la Figure 98 p. 166). D'une manière générale, les cellules semblent bien étalées à la surface des céramiques (flèches vertes) et quelques-unes d'entre elles sont aux moments de la capture d'image, en phase de division (mitose, flèches bleues). Ces images indiquent que les cellules C3H10T1/2 adhèrent, croissent et prolifèrent sur les céramiques apatitiques.

Au troisième jour de culture, les cellules se sont largement étalées à la surface des céramiques, formant un tapis cellulaire (Figure 99 p. 167). Les microporosités observées à la surface des comprimés avant l'ensemencement sont peu visibles et semblent totalement recouvertes par les cellules ou la matrice extracellulaire (flèche rouge). Ceci confirme la bonne colonisation par les cellules de la surface des céramiques et ce quelle que soit leur composition. Ici encore, des cellules en division cellulaire sont observables (flèches bleues). A noter que les « grains » plus clairs d'environ 5 µm, observés aux cœurs des cellules, pourraient être des nucléoles (flèches jaunes). Les nucléoles sont des sous-compartiments cellulaires du noyau qui peuvent être observés, après la mitose et avant leur fusionnement, par groupe de 4 à 7. Ces « grains » semblent plus présents à la surface de l'HA et de la C<sub>0,8</sub>-HA que de la C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA. Cette observation corrobore les résultats de prolifération des cellules à 3 jours de culture sur les surfaces de l'HA et de la C<sub>0,8</sub>-HA présentés précédemment (Figure 96 p. 162).

D'une manière générale, les trois compositions présentent des cellules bien étalées et confluentes (flèches roses), créant un attachement solide avec le substrat. Ce dernier est recouvert d'une couche organique (matrice extracellulaire) qui provient de l'activité des cellules témoignant de leur affinité avec les substrats apatitiques étudiés (HA,  $C_{0,8}$ -HA et  $C_{0,8}$ - $Si_{0,4}$ -HA).



**Figure 98** : Images MEB de la surface de différents substrats après 24 h de culture. Flèches rouges : microporosités. Flèches bleues : cellules en division. Flèches vertes : cellules étalées et/ou matrice extracellulaire.



**Figure 99 :** Images MEB de la surface de différents substrats après 3 jours de culture. Flèches rouges : microporosités. Flèches bleues : cellules en division. Flèches roses : cellules étalées et confluentes. Flèches jaunes : nucléoles.



## IV.6. Conclusion

Dans cette dernière partie, nous avons voulu évaluer la biocompatibilité de la nouvelle hydroxyapatite co-substituée développée dans le cadre de cette thèse. Ainsi, nous avons tout d'abord défini puis synthétisé une hydroxyapatite silico-carbonatée avec des taux de substitution en CO<sub>3</sub> et en SiO<sub>4</sub> que nous pensons pertinents vis-à-vis des objectifs finaux d'amélioration de la bioactivité de l'HA. La pureté de la poudre C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA a été vérifiée et des pastilles denses ont été élaborées en vue de caractériser biologiquement cette phase par culture cellulaire 2D *in vitro* de cellules souches mésenchymateuses. Afin d'avoir des éléments de comparaison pour cette nouvelle phase apatitique, des pastilles denses d'HA et de C<sub>0,8</sub>-HA ont également été fabriquées et soumises aux mêmes tests biologiques.

Une fois les paramètres de frittage définis pour chacune des compositions étudiées, l'évaluation biologique 2D des céramiques a permis de démontrer que la phase C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA est biocompatible au même titre que l'HA et la C<sub>0,8</sub>-HA.

Par leur aspect étalé, les cellules souches mésenchymateuses C3H10T1/2 présentent une meilleure affinité avec les céramiques, et tout particulièrement avec les phases carbonatées (*i.e.* C<sub>0,8</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA), plutôt qu'avec le plastique. Les cellulesensemencées sur C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA prolifèrent et ont une activité mitochondriale analogue à celles présentes sur HA et C<sub>0,8</sub>-HA. Contrairement à une phase Si-HA pure [Marchat, 2013a], la phase C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA ne conduit à aucune mortalité accrue des cellules. A la surface des pastilles C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA, un début de différenciation des cellules est même envisageable du fait de la forte activité cellulaire par rapport au taux constant de prolifération. L'hypothétique présence de silicium soluble dans le milieu de culture issue de la céramique « résorbable » C-Si-HA est peut-être à l'origine de ces premières observations [Hing, 2006; Reffitt, 2003; Thian, 2006a]. Ainsi, pour confirmer cette hypothèse, des tests permettant de caractériser de la différenciation (dosage du collagène et de la phosphatase alcaline), mais également des analyses de solubilité de la phase C-Si-HA dans le milieu de culture doivent être mis en place.

Pour conclure, la biocompatibilité de la phase C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA, prouvée via des essais 2D *in vitro*, laisse entrevoir des perspectives d'utilisation de cette nouvelle phase en tant que substitut osseux.

## Conclusions & Perspectives

Actuellement, l'hydroxyapatite phosphocalcique (HA) et le phosphate tricalcique  $\beta$  ( $\beta$ -TCP) sont les phosphates de calcium les plus couramment utilisés en tant que substituts osseux. Malgré leur biocompatibilité avérée, aucun des deux ne présente une biorésorption (solubilité chimique et activité ostéoclastique) adaptée au milieu physiologique : respectivement trop faible et trop élevée pour l'HA et le  $\beta$ -TCP. Une des possibilités pour améliorer la bioactivité de l'HA est l'incorporation d'ions spécifiques dans sa structure. L'incorporation simultanée d'ions carbonates et silicates dans la maille apatitique pourrait permettre de coupler les propriétés de dissolution et de résorption des apatites carbonatées avec le rôle métabolique important du silicium dans le tissu osseux.

Ainsi, cette étude s'est intéressée à l'incorporation simultanée de groupements carbonates et silicates dans la structure de l'HA depuis la synthèse des poudres jusqu'au frittage de céramiques monophasiques. Une première évaluation biologique de cette phase C-Si-HA a été réalisée via la culture de cellules mésenchymateuses orientées en lignée ostéoblastique (C3H10T1/2) afin de mettre en évidence son éventuelle biocompatibilité et bioactivité.

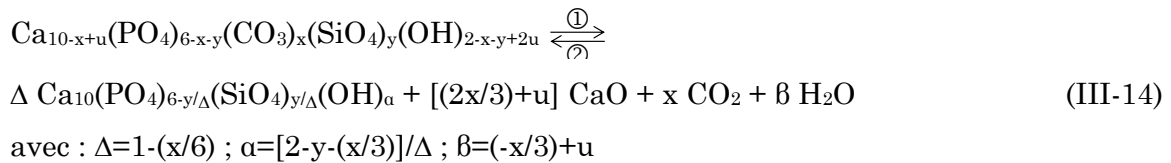
L'originalité et la difficulté de ce travail ont consisté à incorporer les ions silicates et carbonates en substitution des ions phosphates (site B) au cours de la précipitation en phase aqueuse de la poudre C-Si-HA. Pour cela, quatre précurseurs parfaitement solubles et miscibles ont été utilisés. La spécificité de ce protocole de synthèse réside dans la préparation d'une solution d'ions silicates via une réaction sol-gel. Les poudres C-Si-HA ont été élaborées en se basant sur la formule hypothétique générale suivante:



avec  $0 \leq y \leq x \leq 2$  et  $(x+y) \leq 2$ , où  $V_{Ca}$  et  $V_{OH}$  représentent les lacunes respectivement en site calcium et site hydroxyde (site A), et où  $x$  et  $y$  sont les coefficients respectivement en carbonate et en silicate.

Les poudres obtenues sont cristallisées, de structures apatitiques et monophasiques. Il a été prouvé par des études physico-chimiques (spectrométrie infrarouge et diffraction des rayons X) que l'incorporation des groupements carbonates et silicates en substitution des groupements phosphates se produit dès la précipitation. Leurs teneurs sont conformes aux valeurs théoriques attendues. Le procédé de synthèse mis en place permet d'obtenir des poudres de structure et de composition chimique parfaitement reproductibles.

En vue de l'élaboration par frittage de pièces denses et monophasiques en C-Si-HA, la stabilité thermique sous différentes atmosphères de cette nouvelle phase a été étudiée. Aussi, il a été constaté que la décomposition de l'apatite survient par sa décarbonatation lors de la calcination du composé. L'étude expérimentale a prouvé l'importance du maintien des carbonates de type B dans la structure apatitique pour la stabilité thermique du composé C-Si-HA. La réaction de décomposition constitue un équilibre hétérogène solide / gaz entre une solution solide apatitique (C-Si-HA / Si-HA), de la chaux (CaO) et du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) comme suit :



De ce fait, l'utilisation du CO<sub>2</sub> comme atmosphère de traitement thermique permet le frittage de céramiques C-Si-HA à de plus hautes températures que sous air. Sous CO<sub>2</sub> et selon les taux initiaux de substitutions en carbonate et en silicate, les composés C-Si-HA (*i.e.* poudre et céramique dense) se décomposent aux alentours de 1150-1200°C avec la formation de CaO, puis de produits de décomposition spécifiques des apatites silicatées (*i.e.* TCP, TTCP et silicocarnotite).

L'usage de CO<sub>2</sub> est également responsable de l'enrichissement de l'apatite en carbonate de type A. Entre 550°C et 1200°C, la phase apatitique est le siège d'échanges d'espèces ioniques au niveau de ses sites A impliquant la fixation de CO<sub>2</sub> (carbonatation) et l'élimination simultanée d'eau (déshydratation). Ainsi, par exemple, bien que parfaitement denses et monophasiques, les comprimés de poudre C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA et C<sub>0,8</sub>-Si<sub>0,4</sub>-HA frittés sous CO<sub>2</sub> à 1100°C pendant 1 heure présentent une légère carbonatation en site A. Deux possibilités peuvent être entrevues pour s'affranchir de ce phénomène. La première consiste en un traitement thermique de ces céramiques sous une atmosphère riche en eau afin de renverser l'équilibre de carbonatation et de réhydrater les sites OH. La deuxième possibilité serait un frittage des comprimés de

poudre de C-Si-HA sous un mélange gazeux  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ . La température de frittage serait alors probablement inférieure à celle d'un frittage réalisé sous une atmosphère exclusivement constituée de  $\text{CO}_2$ . En effet, lors de précédentes études, il a été constaté que  $\text{P}_{\text{H}_2\text{O}}$  catalyse la réaction de décomposition par décarbonatation des sites B.

Les caractérisations physico-chimiques (spectrométrie IR et DRX) des poudres traitées sous  $\text{CO}_2$  ont mis en évidence l'existence d'interactions entre les carbonates (en site A et B) et les silicates au sein de la structure apatitique. Celles-ci se matérialisent par l'extinction de bandes d'absorption infrarouge spécifiques des silicates pour les composés C-Si-HA.

Aussi, dans le cas particulier d'un composé  $\text{C}_A\text{-Si-HA}$  (*i.e.* C-Si-HA carbonatée exclusivement en site A), la présence simultanée de carbonates en site A et de silicates en site B, situés dans un même plan dans la structure apatitique, engendre la démixtion du composé avec l'apparition d'une phase silicatée amorphe. L'absence de ce phénomène dans le cas d'une  $\text{C}_{A/B}\text{-Si-HA}$  établit l'importance de la présence de carbonate en site B dans les phénomènes de stabilité structurale des apatites silicatées traitées thermiquement sous  $\text{CO}_2$ . Ainsi, dans le cadre d'une prochaine étude, il serait intéressant de déterminer les valeurs limites d'incorporation en carbonate (A et/ou B) et en silicate dans la structure apatitique sans démixtion de cette dernière.

L'étude de la bioactivité de la phase C-Si-HA a été réalisée via la culture de cellules souches mésenchymateuses C3H10T1/2 à la surface de céramiques denses de composition  $\text{C}_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$ . Il est important de noter que la phase étudiée ici a été caractérisée et apparaît monophasique. C'est essentiel car il est connu qu'une infime présence d'une phase secondaire (*e.g.* phase amorphe silicatée, présence d'ions alcalins indésirables introduit lors de la précipitation) peut changer la réponse biologique de la céramique apatitique.

Les premiers résultats obtenus ont permis de prouver la biocompatibilité de l'hydroxyapatite carbo-silicatée. Dans l'ensemble, ses propriétés biologiques semblent comparables à celles des autres céramiques HA et  $\text{C}_{0,8}\text{-HA}$ . Les cellulesensemencées à la surface des pastilles  $\text{C}_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  se fixent, et prolifèrent. Contrairement à une phase Si-HA pure, la phase C-Si-HA ici étudiée ne conduit à aucune mortalité accrue des cellules. Après 3 jours de culture, la forte activité mitochondriale associée au taux constant de prolifération des cellules (phénomènes non observés pour HA et  $\text{C}_{0,8}\text{-HA}$ ) permet l'hypothèse d'un début précoce de différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes à la surface des pastilles  $\text{C}_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$ . La présence de silicium dans le milieu de culture issu de la céramique en serait peut-être la cause.

Lors de prochaines évaluations biologiques, le dosage du collagène et de la phosphatase alcaline produits par les cellules à la surface des comprimés permettra

d'étudier de manière approfondie la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes. En parallèle, la détermination des produits de solubilité en milieu physiologique de C-Si-HA présentant différentes teneurs en silicate et en carbonate permettra de quantifier la libération de silicium de ces céramiques. Le but étant, à terme, de relier la bioactivité des C-Si-HA aux taux d'incorporation des carbonates et des silicates dans la structure apatitique. Il s'agira dans un second temps d'étudier biologiquement cette nouvelle phase *in vivo* sous forme d'architectures poreuses variées : évaluation de l'ostéoconductivité, de l'ostéoinductivité, de la biorésorption. La connaissance précise de la réponse biologique vis-à-vis d'une composition C-Si-HA donnée permettra d'envisager la réalisation de substituts osseux aux propriétés biologiques modulables et adaptées aux sites d'implantation.

## Références Bibliographiques

- Anselme, K. (2000) Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 21(7), 667–681.
- Antonakos, A., Liarokapis, E., Leventouri, T. (2007) Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials*. 28(19), 3043–3054.
- Arcos, D., Rodriguez-Carvajal, J., Vallet-Regí, M. (2004a) Silicon incorporation in hydroxylapatite obtained by controlled crystallization. *Chemistry of materials*. 16(11), 2300–2308.
- Arcos, D., Rodriguez-Carvajal, J., Vallet-Regí, M. (2004b) The effect of the silicon incorporation on the hydroxylapatite structure. A neutron diffraction study. *Solid State Sciences*. 6(9), 987–994.
- Balas, F., Perez-Pariente, J., Vallet-Regí, M. (2003) *In vitro* bioactivity of silicon-substituted hydroxyapatites. *Journal of Biomedical Materials Research*. 66A(2), 364 – 375.
- Barnes, D.M., Hanlon, P.R., Kircher, E.A. (2003) Effects of Inorganic HgCl<sub>2</sub> on Adipogenesis. *Toxicological Sciences*. 75(2), 368–377.
- Barralet, J., Akao, M., Aoki, H., Aoki, H. (2000a) Dissolution of dense carbonate apatite subcutaneously implanted in Wistar rats. *Journal of biomedical materials research*. 49(2), 176–182.
- Barralet, J., Best, S., Bonfield, W. (2000b) Effect of sintering parameters on the density and microstructure of carbonate hydroxyapatite. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. 11(11), 719–724.
- Barralet, J., Knowles, J., Best, S., Bonfield, W. (2002) Thermal decomposition of synthesised carbonate hydroxyapatite. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. 13(6), 529–533.

- Bernache-Assollant, D. (1993) *Chimie-physique du frittage*. Paris: Hermes.
- Best, S.M., Porter, A.E., Thian, E.S., Huang, J. (2008a) Bioceramics: Past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society*. 28(7), 1319–1327.
- Best, S.M., Zou, S., Brooks, R.A., Huang, J., Rushton, N., Bonfield, W. (2008b) The Osteogenic Behaviour of Silicon Substituted Hydroxyapatite. *Key Engineering Materials*. 361-363, 985–988.
- Bianco, A., Cacciotti, I., Lombardi, M., Montanaro, L. (2009) Si-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sinterability. *Materials Research Bulletin*. 44(2), 345–354.
- Blitterswijk, C.A. van, Thomsen, Peter (2008) *Tissue engineering*. Elsevier, Acad. Press.
- Boanini, E., Gazzano, M., Bigi, A. (2010) Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomaterialia*. 6(6), 1882–1894.
- Bohner, M. (2009) Silicon-substituted calcium phosphates – A critical view. *Biomaterials*. 30(32), 6403–6406.
- Bonel, G. (1970) *Contribution a l'étude de la carbonatation des apatites*. Toulouse, France.
- Bose, S., Fielding, G., Tarafder, S., Bandyopadhyay, A. (2013) Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends in Biotechnology*. 31(10), 594–605.
- Bose, S., Tarafder, S. (2012) Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. *Acta biomaterialia*. 8(4), 1401–1421.
- Botelho, C.M., Brooks, R.A., Best, S.M., Lopes, M.A., Santos, J.D., Rushton, N., Bonfield, W. (2006) Human osteoblast response to silicon-substituted hydroxyapatite. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 79(3), 723–730.
- Boyer, A., Marchat, D., Bernache-Assollant, D. (2012) Synthesis and Characterization of Cx-Siy-HA for Bone Tissue Engineering Application. *Key Engineering Materials*. 529-530, 100–104.
- Bradley, M. Curve Fitting in Raman and IR Spectroscopy: Basic Theory of Line Shapes and Applications. *Thermo Fisher Scientific*. (Application Note 50733).
- Cao, W., Hench, L.L. (1996) Bioactive Materials. *Ceramics International*. (22), 493–507.
- Carlisle, E.M. (1970) Silicon: A Possible Factor in Bone Calcification. *Science*. 167(3916), 279–280.
- Champion, E. (2013) Sintering of calcium phosphate bioceramics. *Acta Biomaterialia*. 9(4), 5855–5875.

Clarke, B. (2008) Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 3 Suppl 3, S131–139.

CNEDiMTS (2013) *Substituts osseux*. Haute Autorité de Santé.

Damen, J., Ten Cate, J. (1992) Silica-induced precipitation of calcium-phosphate in the presence of inhibitors of hydroxyapatite formation. *Journal of Dental Research*. 71(3), 453–457.

Detsch, R., Hagemeyer, D., Neumann, M., Schaefer, S., Vortkamp, A., Wuelling, M., Ziegler, G., Epple, M. (2010) The resorption of nanocrystalline calcium phosphates by osteoclast-like cells. *Acta Biomaterialia*. 6(8), 3223–3233.

Detsch, R., Mayr, H., Ziegler, G. (2008) Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. *Acta Biomaterialia*. 4(1), 139–148.

Doi, Y., Shibutani, T., Moriwaki, Y., Kajimoto, T., Iwayama, Y. (1998) Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes. *Journal of biomedical materials research*. 39(4), 603–610.

Dorozhkin, S.V. (2010) Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*. 31(7), 1465–1485.

Douard, N. (2010) *Élaboration et fonctionnalisation de biocéramiques phosphocalciques*. thesis. Université de Limoges.

Driessens, F., Schaecken, H., Verbeeck, R. (1983) On the mechanism of substitution in carbonated apatites. *Journal of Dental Research*. 62(4), 455.

Ducheyne, P., Radin, S., King, L. (1993) The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on *in vitro* behavior. I. Dissolution. *Journal of biomedical materials research*. 27(1), 25–34.

Dunfield, D., Sayer, M., Shurvell, H.F. (2005) Total attenuated reflection infrared analysis of silicon-stabilized tri-calcium phosphate. *The journal of physical chemistry. B*. 109(42), 19579–19583.

El Feki, H., Khattech, I., Jemal, M., Rey, C. (1994) Decomposition thermique d'hydroxyapatites carbonatées sodées. *Thermochimica acta*. 237(1), 99–110.

Elliott, J.C. (1980) Space group and lattice constants of  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$ . *Journal of Applied Crystallography*. 13(6), 618–621.

Elliott, J.C. (1994) Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. *Studies in organic chemistry*.

Figueiredo, M.M., Gamelas, J.A.F., Martins, A.G. (2012) Characterization of Bone and Bone-Based Graft Materials Using FTIR Spectroscopy. In T. Theophile, ed. *Infrared Spectroscopy - Life and Biomedical Sciences*. InTech.



- Fleet, M.E. (2009) Infrared spectra of carbonate apatites: n2-Region bands. *Biomaterials*. 30(8), 1473–1481.
- Van Gerven, T., Van Baelen, D., Dutré, V., Vandecasteele, C. (2004) Influence of carbonation and carbonation methods on leaching of metals from mortars. *Cement and Concrete Research*. 34(1), 149–156.
- Gibson, I., Best, S., Bonfield, W. (2002a) Effect of silicon substitution on the sintering and microstructure of hydroxyapatite. *Journal of the American Ceramic Society*. 85(11), 2771–2777.
- Gibson, I., Bonfield, W. (2002b) Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research*. 59(4), 697–708.
- Gibson, I.R., Best, S.M., Bonfield, W. (1999) Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research*. 44(4), 422–428.
- Guan, X., Dong, H., Ma, J., Jiang, L. (2009) Removal of arsenic from water: Effects of competing anions on As(III) removal in KMnO<sub>4</sub>–Fe(II) process. *Water Research*. 43(15), 3891–3899.
- Habibovic, P., Yuan, H., van den Doel, M., Sees, T.M., van Blitterswijk, C.A., de Groot, K. (2006) Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthotopic defect. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 24(5), 867–876.
- Heljak, M.K., Świążkowski, W., Lam, C.X.F., Hutmacher, D.W., Kurzydłowski, K.J. (2012) Evolutionary design of bone scaffolds with reference to material selection. *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering*. 28(6-7), 789–800.
- Hench, L.L. (1988) Bioactive Ceramics. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 523(1), 54–71.
- Hench, L.L., Wilson (1993) *An Introduction to bioceramics, Advanced Series in Ceramics*. Singapore; River Edge, N.J.: World Scientific.
- Heughebaert, J.-C. (1977a) *Contribution à l'étude de l'évolution des orthophosphates de calcium précipités amorphes en orthophosphates apatitiques*. Thèse. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Heughebaert, J.C., Montel, G. (1977b) Étude de l'évolution de l'orthophosphate tricalcique non cristallin en phosphate apatitique à la faveur d'une réaction chimique, à température ordinaire. *Revue de Physique Appliquée*. 12(5), 691–694.
- Hing, K.A., Revell, P.A., Smith, N., Buckland, T. (2006) Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*. 27(29), 5014–5026.

- Hing, K.A., Wilson, L.F., Buckland, T. (2007) Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *The spine journal: official journal of the North American Spine Society*. 7(4), 475–490.
- Holzwarth, J.M., Ma, P.X. (2011) Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 32(36), 9622–9629.
- Hristov, V., Radev, L., Samuneva, B., Apostolov, G. (2009) Organic / inorganic bioactive materials Part I: Synthesis, structure and *in vitro* assessment of collagen/silicocarnotite biocoatings. *Central European Journal of Chemistry*. 7(4), 702–710.
- Huang, T., Xiao, Y., Wang, S., Huang, Y., Liu, X., Wu, F., Gu, Z. (2011) Nanostructured Si, Mg, CO(3) (2-) Substituted Hydroxyapatite Coatings Deposited by Liquid Precursor Plasma Spraying: Synthesis and Characterization. *Journal of Thermal Spray Technology*. 20(4), 829–836.
- Ibrahim, D.M., Mostafa, A.A., Korowash, S.I. (2011) Chemical characterization of some substituted hydroxyapatites. *Chemistry Central Journal*. 5, 74.
- Jillavenkatesa, A., Condrate, R.A. (1997) The Infrared and Raman Spectra of Tetracalcium Phosphate (Ca<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>9</sub>). *Spectroscopy Letters*. 30, 1561–1570.
- Jillavenkatesa, A., Condrate, R.A. (1998) The Infrared and Raman Spectra of β- and α-Tricalcium Phosphate (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>). *Spectroscopy Letters*. 31, 1619–1634.
- Jugdaohsingh, R. (2007) Silicon and bone health. *The journal of nutrition, health & aging*. 11(2), 99–110.
- Kaandorp, R.J.G., Wesselingh, F.P., Vonhof, H.B. (2006) Ecological implications from geochemical records of Miocene Western Amazonian bivalves. *Journal of South American Earth Sciences*. 21(1–2), 54–74.
- Kannan, S., Rebelo, A., Lemos, A.F., Barba, A., Ferreira, J.M.F. (2007) Synthesis and mechanical behaviour of chlorapatite and chlorapatite/β-TCP composites. *Journal of the European Ceramic Society*. 27(5), 2287–2294.
- Kim, S., Lee, J., Kim, Y., Riu, D., Jung, S., Lee, Y., Chung, S., Kim, Y. (2003) Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors. *Biomaterials*. 24(8), 1389–1398.
- Kramer, I. *Fibres de tension*. [online]. Available from: Université Bordeaux 1 - France.
- Labarthe, J.-C., Bonel, G., Montel, G. (1973) Sur la structure et les propriétés des apatites carbonatées de type B phospho-calciques. *Ann. Chim.* 8, 289–301.
- Lafon, J. (2004) *Synthèse, stabilité thermique et frittage d'hydroxyapatites carbonatées*. Thèse. Université de Limoges.

- Lafon, J., Champion, E., Bernache-Assollant, D. (2008) Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6-x(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x-2y}(\text{CO}_3)_y$  ceramics with controlled composition. *Journal of the European Ceramic Society*. 28(1), 139–147.
- Lafon, J., Champion, E., Bernache-Assollant, D., Gibert, R., Danna, A. (2003) Thermal decomposition of carbonated calcium phosphate apatites. *Journal of thermal analysis and calorimetry*. 72(3), 1127–1134.
- Landi, E., Celotti, G., Logroscino, G., Tampieri, A. (2003) Carbonated hydroxyapatite as bone substitute. *Journal of the European Ceramic Society*. 23(15), 2931–2937.
- Landi, E., Uggeri, J., Sprio, S., Tampieri, A., Guizzardi, S. (2010) Human osteoblast behavior on as-synthesized  $\text{SiO}_4$  and B- $\text{CO}_3$  co-substituted apatite. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 94A(1), 59–70.
- Langer, R., Vacanti, J.P. (1993) Tissue engineering. *Science*. 260(5110), 920–926.
- Lavalley, J.C. (1996) Infrared spectrometric studies of the surface basicity of metal oxides and zeolites using adsorbed probe molecules. *Catalysis Today*. 27(3–4), 377–401.
- Legeros, R., Trautz, O., Klein, E., Legeros, J. (1969) Two Types of Carbonate Substitution in Apatite Structure. *Experientia*. 25(1), 5–7.
- LeGeros, R.Z. (2008) Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. *Chemical Reviews*. 108(11), 4742–4753.
- Leventouri, T., Bunaciu, C.E., Perdikatsis, V. (2003) Neutron powder diffraction studies of silicon-substituted hydroxyapatite. *Biomaterials*. 24(23), 4205–4211.
- Liao, C.-J., Lin, F.-H., Chen, K.-S., Sun, J.-S. (1999) Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere. *Biomaterials*. 20(19), 1807–1813.
- Mainard, D. (2007) Substituts osseux. *Revue De Chirurgie Orthopédique Et Réparatrice De L'Appareil Moteur*. 93(7), 22–23.
- Marchat, D., Bouët, G., Lueckgen, A., Zymelka, M., Malaval, L., Szenknect, S., Dacheux, N., Bernache-Assollant, D., Chevalier, J. (2013a) Physico-chemical characterization and *in vitro* biological evaluation of pure SiHA for bone tissue engineering application. *Key Engineering Materials*. 529-530, 351–356.
- Marchat, D., Szenknect, S., Bouët, G., Dacheux, N., Bernache-Assollant, D. (article soumis) Silicon-substituted hydroxyapatite: solubility product and 2D *in vitro* biological evaluation. *Acta Biomaterialia*.
- Marchat, D., Zymelka, M., Coelho, C., Gremillard, L., Joly-Pottuz, L., Babonneau, F., Esnouf, C., Chevalier, J., Bernache-Assollant, D. (2013b) Accurate characterization of pure silicon-substituted hydroxyapatite powders synthesized by a new precipitation route. *Acta Biomaterialia*. 9(6), 6992–7004.

- Martínez, I.M., Velásquez, P.A. (2010) Synthesis and stability of  $\alpha$ -tricalcium phosphate doped with dicalcium silicate in the system  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$ . *Materials Characterization*. (7), 761–767.
- Mastrogiacomo, M., Scaglione, S., Martinetti, R., Dolcini, L., Beltrame, F., Cancedda, R., Quarto, R. (2006) Role of scaffold internal structure on *in vivo* bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*. 27(17), 3230–3237.
- Melville, A.J., Harrison, J., Gross, K.A., Forsythe, J.S., Trounson, A.O., Mollard, R. (2006) Mouse embryonic stem cell colonisation of carbonated apatite surfaces. *Biomaterials*. 27(4), 615–622.
- Miyawaki, J., Kamei, S., Sakayama, K., Yamamoto, H., Masuno, H. (2008) 4-tert-octylphenol regulates the differentiation of C3H10T1/2 cells into osteoblast and adipocyte lineages. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 102(1), 82–88.
- Montel, G., Bonel, G., Heughebaert, J.C., Trombe, J.C., Rey, C. (1981) New concepts in the composition, crystallization and growth of the mineral component of calcified tissues. *Journal of Crystal Growth*. 53(1), 74–99.
- Moreno, E.C., Gregory, T.M., Brown, W.E. (1968) *Preparation and solubility of hydroxyapatite*. National Bureau of Standards.
- Mostafa, N.Y., Hassan, H.M., Abd Elkader, O.H. (2011) Preparation and characterization of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{SiO}_4^{4-}$ , and  $\text{CO}_3^{2-}$  co-substituted hydroxyapatite. *Journal of the American Ceramic Society*. 94(5), 1584–1590.
- Mostafa, N.Y., Hassan, H.M., Mohamed, F.H. (2009) Sintering behavior and thermal stability of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{SiO}_4^{4-}$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  co-substituted hydroxyapatites. *Journal of Alloys and Compounds*. 479(1-2), 692–698.
- Nelson, D.G. (1981) The influence of carbonate on the atomic structure and reactivity of hydroxyapatite. *Journal of dental research*. 60 Spec No C, 1621–1629.
- Nielsen, F.H., Poellot, R. (2004) Dietary silicon affects bone turnover differently in ovariectomized and sham-operated growing rats. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*. 17(3), 137–149.
- Oh, S., Oh, N., Appleford, M., Ong, J.L. (2006) Bioceramics for Tissue Engineering Applications - A Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2(2), 49–56.
- Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Wilming, L., Tassinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B., Stein, G.S. (1990) Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal of cellular physiology*. 143(3), 420–430.
- Palard, M. (2007) *Synthèse et frittage d'hydroxyapatites phosphocalciques silicatées*. Thèse. Université de Limoges.

- Palard, M., Champion, E., Foucaud, S. (2008) Synthesis of silicated hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6-x(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ . *Journal of Solid State Chemistry*. 181(8), 1950–1960.
- Palard, M., Combes, J., Champion, E., Foucaud, S., Rattner, A., Bernache-Assollant, D. (2009) Effect of silicon content on the sintering and biological behaviour of  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6-x(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$  ceramics. *Acta biomaterialia*. 5(4), 1223–1232.
- Patel, N., Best, S.M., Bonfield, W., Gibson, I.R., Hing, K.A., Damien, E., Revell, P.A. (2002a) A comparative study on the *in vivo* behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 13(12), 1199–1206.
- Patel, N., Gibson, I.R., Hing, K.A., Best, S.M., Damien, E., Revell, P.A., Bonfield, W. (2002b) The *in vivo* response of phase pure hydroxyapatite and carbonate substituted hydroxyapatite granules of varying size ranges. *Key Engineering Materials*. 218-220, 383–386.
- Pavankumar, K., Venkateswarlu, K., Rameshbabu, N., Muthupandi, V. (2011) X-Ray Peak Broadening and *In Vitro* Dissolution Studies of Thermally Stabilized Nanocrystalline Carbonated Hydroxyapatite. *Key Engineering Materials*. 493-494, 739–745.
- Pinney, D.F., Emerson, C.P. (1989) 10T1/2 cells: an *in vitro* model for molecular genetic analysis of mesodermal determination and differentiation. *Environmental Health Perspectives*. 80, 221–227.
- Porter, A., Patel, N., Brooks, R., Best, S., Rushton, N., Bonfield, W. (2005) Effect of carbonate substitution on the ultrastructural characteristics of hydroxyapatite implants. *Journal of materials science. Materials in medicine*. 16(10), 899–907.
- Posset, U., Löcklin, E., Thull, R., Kiefer, W. (1998) Vibrational spectroscopic study of tetracalcium phosphate in pure polycrystalline form and as a constituent of a self-setting bone cement. *Journal of biomedical materials research*. 40(4), 640–645.
- Raisz, L.G. (2005) Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *Journal of Clinical Investigation*. 115(12), 3318–3325.
- Raynaud, S. (1999) *Synthèse, frittage et propriétés mécaniques de phosphates de calcium dans le système hydroxyapatite - phosphate tricalcique*. Thèse. Université de Limoges.
- Raynaud, S., Champion, E., Bernache-Assollant, D., Laval, J.-P. (2001) Determination of Calcium/Phosphorus Atomic Ratio of Calcium Phosphate Apatites Using X-ray Diffractometry. *Journal of the American Ceramic Society*. 84(2), 359–66.
- Raynaud, S., Champion, E., Bernache-Assollant, D., Thomas, P. (2002) Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials*. 23(4), 1065–1072.
- Reffitt, D.M., Ogston, N., Jugdaohsingh, R., Cheung, H.F.J., Evans, B.A.J., Thompson, R.P.H., Powell, J.J., Hampson, G.N. (2003) Orthosilicic acid stimulates collagen type 1

synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells *in vitro*. *Bone*. 32(2), 127–135.

Reid, J.W., Pietak, A., Sayer, M., Dunfield, D., Smith, T.J.N. (2005) Phase formation and evolution in the silicon substituted tricalcium phosphate/apatite system. *Biomaterials*. 26(16), 2887–2897.

Rey, C., Collins, B., Goehl, T., Dickson, I.R., Glimcher, M.J. (1989) The carbonate environment in bone mineral: A resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study. *Calcified Tissue International*. 45, 157–164.

Rey, C., Renugopalakrishnan, V., Shimizu, M., Collins, B., Glimcher, M.J. (1991) A resolution-enhanced Fourier Transform Infrared spectroscopic study of the environment of the CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> ion in the mineral phase of enamel during its formation and maturation. *Calcified Tissue International*. 49(4), 259–268.

Reznikoff, C.A., Brankow, D.W., Heidelberger, C. (1973) Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer research*. 33(12), 3231–3238.

Ripamonti, U. (1991) Bone induction in nonhuman primates. An experimental study on the baboon. *Clinical orthopaedics and related research*. (269), 284–294.

Ruhé, P.Q., Wolke, J., Spauwen, P., Jansen, J. (2006) Calcium Phosphate Ceramics for Bone Tissue Engineering. In J. Bronzino, ed. *Tissue Engineering and Artificial Organs*. CRC Press, pp. 38–1–38–18.

Rumpler, M., Woesz, A., Dunlop, J.W., van Dongen, J.T., Fratzl, P. (2008) The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. *Journal of the Royal Society Interface*. 5(27), 1173–1180.

Ruys, A. (1993) Silicon-doped hydroxyapatite. *Journal of the Australian ceramic society*. (29), 71–80.

Samavedi, S., Whittington, A.R., Goldstein, A.S. (2013) Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta biomaterialia*. 9(9), 8037–8045.

Schwarz, K., Milne, D.B. (1972) Growth-promoting Effects of Silicon in Rats. *Nature*. 239(5371), 333–334.

Šefčík, J., McCormick, A.V. (1997) Thermochemistry of aqueous silicate solution precursors to ceramics. *AIChE Journal*. 43(S11), 2773–2784.

Servier Medical Art (2005) *Représentation schématique du cycle du remodelage osseux*.

Shepherd, J.H., Best, S.M. (2011) Calcium Phosphate Scaffolds for Bone Repair. *Jom*. 63(4), 83–92.

Shepherd, J.H., Shepherd, D.V., Best, S.M. (2012) Substituted hydroxyapatites for bone repair. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. 23(10), 2335–2347.

- Song, G., Habibovic, P., Bao, C., Hu, J., van Blitterswijk, C.A., Yuan, H., Chen, W., Xu, H.H.K. (2013) The homing of bone marrow MSCs to non-osseous sites for ectopic bone formation induced by osteoinductive calcium phosphate. *Biomaterials*. 34(9), 2167–2176.
- Spence, G., Patel, N., Brooks, R., Bonfield, W., Rushton, N. (2010) Osteoclastogenesis on hydroxyapatite ceramics: the effect of carbonate substitution. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 92(4), 1292–1300.
- Spence, G., Patel, N., Brooks, R., Rushton, N. (2009) Carbonate substituted hydroxyapatite: resorption by osteoclasts modifies the osteoblastic response. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 90(1), 217–224.
- Sprio, S., Tampieri, A., Landi, E., Sandri, M., Martorana, S., Celotti, G., Logroscino, G. (2008) Physico-chemical properties and solubility behaviour of multi-substituted hydroxyapatite powders containing silicon. *Materials Science and Engineering: C*. 28(1), 179–187.
- Srivastava, S., Kumar, N., Thakur, R.S., Roy, P. (2013) Role of Vanadium (V) in the Differentiation of C3H10T1/2 Cells Towards Osteoblast Lineage: A Comparative Analysis with Other Trace Elements. *Biological Trace Element Research*. 152(1), 135–142.
- Tang, Q.-Q., Otto, T.C., Lane, M.D. (2004) Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(26), 9607–9611.
- Tang, X.L., Xiao, X.F., Liu, R.F. (2005) Structural characterization of silicon-substituted hydroxyapatite synthesized by a hydrothermal method. *Materials Letters*. 59(29-30), 3841–3846.
- Taton, T.A. (2001) Nanotechnology : Boning up on biology. *Nature*. 412(6846), 491–492.
- Teixeira, S., Fernandes, H., Leusink, A., van Blitterswijk, C., Ferraz, M.P., Monteiro, F.J., de Boer, J. (2010) *In vivo* evaluation of highly macroporous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 93(2), 567–575.
- Temenoff, J.S., Mikos, A.G. (2000) Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials*. 21(23), 2405–2412.
- Tétard, F., Bernache-Assollant, D., Champion, E. (1999) Pre-Eutectic Densification of Calcium Carbonate Doped with Lithium Carbonate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 56(3), 1461–1473.
- Thian, E.S., Huang, J., Best, S.M., Barber, Z.H., Brooks, R.A., Rushton, N., Bonfield, W. (2006a) The response of osteoblasts to nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite thin films. *Biomaterials*. 27(13), 2692–2698.

- Thian, E.S., Huang, J., Vickers, M.E., Best, S.M., Barber, Z.H., Bonfield, W. (2006b) Silicon-substituted hydroxyapatite (SiHA): A novel calcium phosphate coating for biomedical applications. *Journal of Materials Science*. 41(3), 709–717.
- Tõnsuaadu, K., Gross, K.A., Pluduma, L., Veiderma, M. (2012) A review on the thermal stability of calcium apatites. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 110(2), 647–659.
- Tõnsuaadu, K., Peld, M., Bender, V. (2003) Thermal analysis of apatite structure. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 72(1), 363–371.
- Vallenius, T. (2013) Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells. *Open Biology*. 3(6), 130001.
- De Vernejoul, M.-C., Marie, P. (2008) *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. Médecine Sciences Publications.
- Vignoles, M., Bonel, G., Holcomb, D., Young, R. (1988) Influence of Preparation Conditions on the Composition of Type-B Carbonated Hydroxyapatite and on the Localization of the Carbonate Ions. *Calcified Tissue International*. 43(1), 33–40.
- Vignoles, M., Bonel, G., Young, R.A. (1987) Occurrence of nitrogenous species in precipitated B-type carbonated hydroxyapatites. *Calcified Tissue International*. 40, 64–70.
- Woodard, J.R., Hilldore, A.J., Lan, S.K., Park, C.J., Morgan, A.W., Eurell, J.A.C., Clark, S.G., Wheeler, M.B., Jamison, R.D., Wagoner Johnson, A.J. (2007) The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials*. 28(1), 45–54.
- Yu, H., Deng, D., Li, Y., Xu, S., Li, Y., Yu, C., Ding, Y., Lu, H., Yin, H., Nie, Q. (2013) Electronic structure and luminescent properties of  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2(\text{SiO}_4):\text{Eu}^{2+}$  green-emitting phosphor for white light emitting diodes. *Optics Communications*. 289, 103–108.
- Yuan, H., Bruijn, J.D.D., Li, Y., Feng, J., Yang, Z., Groot, K.D., Zhang, X. (2001) Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous  $\alpha$ -TCP and  $\beta$ -TCP. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 12(1), 7–13.
- Yuan, H., Kurashina, K., de Bruijn, J.D., Li, Y., de Groot, K., Zhang, X. (1999) A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*. 20(19), 1799–1806.
- Zapanta-Legeros, R. (1965) Effect of Carbonate on the Lattice Parameters of Apatite. *Nature*. 206(4982), 403–404.
- Zhang, Z., Kurita, H., Kobayashi, H., Kurashina, K. (2005) Osteoinduction with HA/TCP Ceramics of Different Composition and Porous Structure in Rabbits. *Oral Science International*. 2(2), 85–95.




Zyman, Z.Z., Rokhmistrov, D.V., Glushko, V.I., Ivanov, I.G. (2009) Thermal impurity reactions and structural changes in slightly carbonated hydroxyapatite. *Journal of materials science. Materials in medicine*. 20(7), 1389–1399.


# Annexes





## A.1. Fiches de données de sécurité des réactifs

Les extraits des fiches de données de sécurité (Material Safety Data Sheet -MSDS), acquises auprès des fournisseurs et présentées ci-après, s'intéressent essentiellement à l'hydrosolubilité des réactifs employés.

FICHE DE DONNÉES DE SÉCURITÉ		conformément au Règlement (CE) No. 1907/2006		
Code produit	102121			
Nom du produit	Nitrate de calcium tétrahydraté pour analyse			
<hr/>				
<b>SECTION 3. Composition/informations sur les composants</b>				
Formule	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	CaN <sub>2</sub> O <sub>6</sub> * 4 H <sub>2</sub> O (Hill)		
No.-CAS	13477-34-4			
No.-CE	233-332-1			
M	236,15 g/mol			
<hr/>				
Hydrosolubilité	1.470 g/l			
	à 0 °C			
	2.710 g/l			
	à 40 °C			
<hr/>				
Date de révision 01.02.2012		Version 7.11		

FICHE DE DONNÉES DE SÉCURITÉ		conformément au Règlement (CE) No. 1907/2006		
Code produit	101131			
Nom du produit	Hydrogénocarbonate d'ammonium			
<hr/>				
<b>SECTION 3. Composition/informations sur les composants</b>				
Formule	(NH <sub>4</sub> )HCO <sub>3</sub>	CH <sub>5</sub> NO <sub>3</sub> (Hill)		
No.-CAS	1066-33-7			
No.-CE	213-911-5			
M	79,06 g/mol			
<hr/>				
Hydrosolubilité	220 g/l			
	à 20 °C			
<hr/>				
Date de révision 30.08.2012		Version 9.0		

FICHE DE DONNÉES DE SÉCURITÉ		 <small>MERCK MILLIPORE</small>
conformément au Règlement (CE) No. 1907/2006		
Code produit	101207	
Nom du produit	di-Ammonium hydrogénophosphate	
<hr/>		
<b>SECTION 3. Composition/informations sur les composants</b>		
Formule	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> P (Hill)
No.-CAS	7783-28-0	
No.-CE	231-987-8	
M	132,05 g/mol	
<hr/>		
Hydrosolubilité	690 g/l	
	à 20 °C	
<hr/>		
Date de révision	29.06.2011	Version 5.4

FICHE DE DONNÉES DE SÉCURITÉ		 <small>MERCK MILLIPORE</small>
conformément au Règlement (CE) No. 1907/2006		
Code produit	843974	
Nom du produit	Tétraacétate de silicium	
<hr/>		
<b>SECTION 3. Composition/informations sur les composants</b>		
Formule	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub> Si (Hill)	
No.-CAS	562-90-3	
No.-CE	209-239-7	
M	264,26 g/mol	
<hr/>		
Hydrosolubilité	s'hydrolyse, (décomposition violente)	
<hr/>		
Date d'établissement:	07.12.2011	Version 1.0

<b>FICHE DE DONNÉES DE SÉCURITÉ</b>	
conformément au Règlement (CE) No. 1907/2006 Version 5.2 Date de révision 21.05.2013	
<b>SIGMA-ALDRICH®</b>	
Nom du produit	: <b>Tétraéthoxysilane</b>
Code Produit	: 86578
<b>SECTION 3: Composition/informations sur les composants</b>	
<b>3.1 Substances</b>	
Synonymes	: Tetraethoxysilane Orthosilicic acid tetraethyl ester
Formule	: $C_8H_{20}O_4Si$
Poids moléculaire	: 208,33 g/mol
No.-CAS	: 78-10-4
No.-CE	: 201-083-8
No.-Index	: 014-005-00-0
Hydrosolubilité	donnée non disponible

<b>ACROS ORGANICS</b>		<b>FICHE DE DONNÉES DE SÉCURITÉ</b>	
Date de préparation	27-mai-2010	Date de révision	17-avr.-2012
		Numéro de Révision 4	
<b>SECTION 1. IDENTIFICATION DE LA SUBSTANCE/DU MÉLANGE ET DE LA SOCIÉTÉ/L'ENTREPRISE</b>			
Identificateur de produit			
Nom du produit	Tetraethyl orthosilicate		
Numéro d'Enregistrement REACH	01-2119496195-28		
Cat No.	420360000; 420360010; 420361000		
Synonymes	Ethyl silicate; TEOS; Tetraethoxysilane		
<b>SECTION 9. PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES</b>			
Hydrosolubilité		Hydrolysis	
Densité		0.940	
Formule moléculaire		$C_8H_{20}O_4Si$	
Poids moléculaire		208.33	

## A.2. Courbes de spéciation

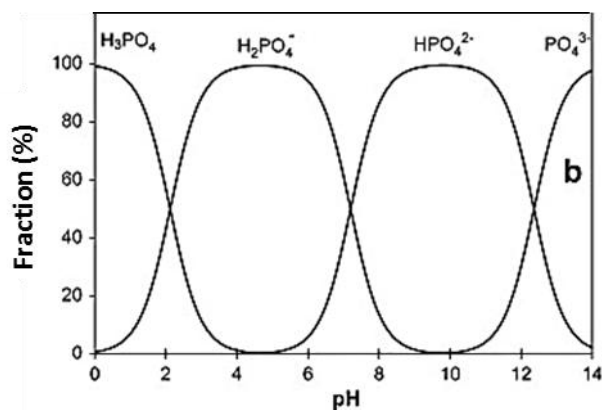


Figure 100 : Courbes de spéciation des ions phosphates en fonction du pH [Guan, 2009].

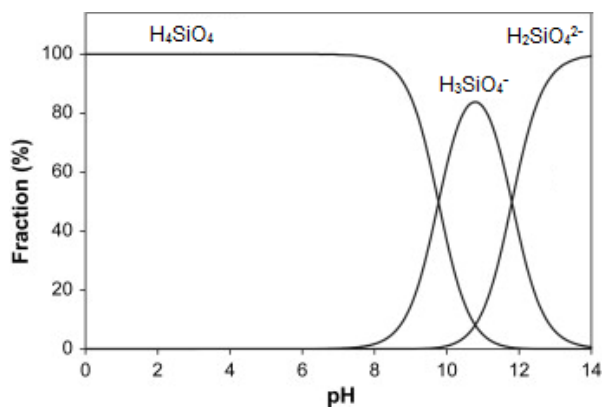


Figure 101 : Courbes de spéciation des ions silicates en fonction du pH [Guan, 2009].

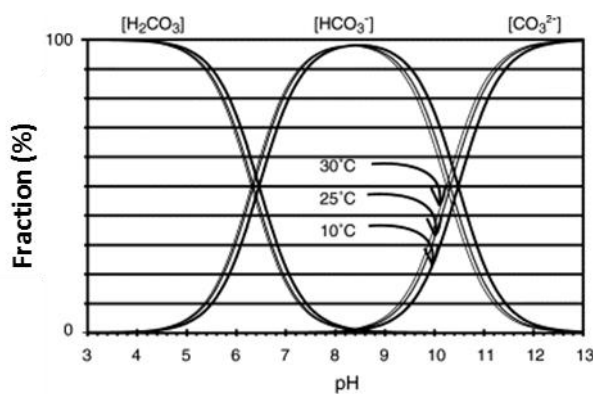


Figure 102 : Courbes de spéciation des ions carbonates en fonction du pH [Kaandorp, 2006].

### A.3. Détermination de la température optimale de calcination pour l'élimination des résidus de synthèse nitrés sans décarbonatation du composé $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$

Dans le cadre de l'analyse élémentaire du composé  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  et de la détermination de sa formule chimique (II.3.3 p. 82), un traitement thermique de la poudre est nécessaire afin d'éliminer un maximum de résidus de synthèse nitrés sans décarbonater l'apatite.

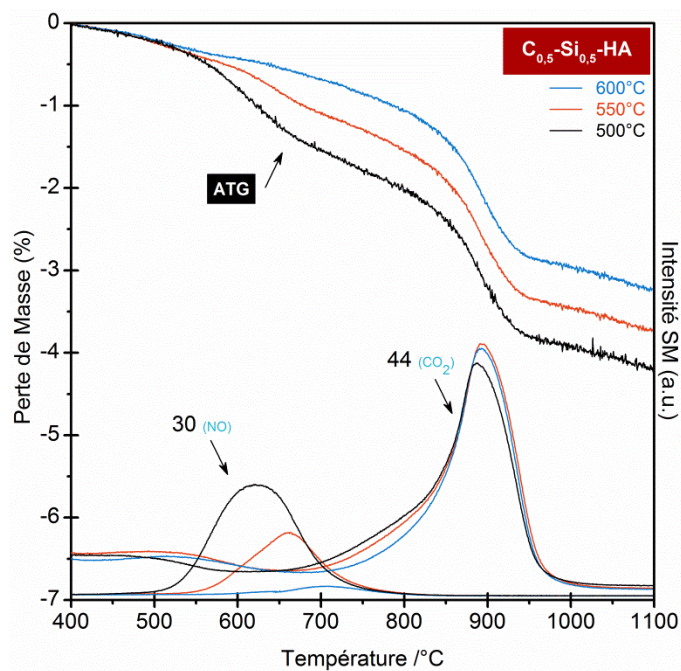
En première approche, l'analyse thermogravimétrique sous hélium du composé  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  montre qu'aux alentours de  $600^{\circ}C$  la poudre commence à se décarbonater (III.2.2.1 p. 96). C'est pourquoi, plusieurs traitements thermiques dans cette gamme de température, avec une durée de calcination longue (10 heures sous air), sont étudiés :  $500^{\circ}C$ ,  $550^{\circ}C$ ,  $600^{\circ}C$ ,  $625^{\circ}C$ .

Ainsi, à l'aide d'un test à la phénolphtaléine, la présence de chaux est constatée dans la poudre chauffée à la température de  $625^{\circ}C$  pendant 10 heures. Les poudres issues des autres traitements thermiques (*i.e.*  $500^{\circ}C$ ,  $550^{\circ}C$ ,  $600^{\circ}C$ ), non décomposées, sont analysées en ATG-SM afin de déterminer le taux de résidus nitrés latents (Figure 103 p. 192).

Pour le traitement thermique de la poudre à  $600^{\circ}C$  pendant 10h sous air, l'élimination des résidus nitrés peut être considérée comme totale. Le dosage du carbone présent dans la poudre (Tableau 33 p. 192) permet de constater que sa teneur est maximale pour une température de calcination de  $550^{\circ}C$  et qu'au-delà, la poudre commence à se décarbonater, et ce sans que le test à la phénolphtaléine ne soit positif.

Par conséquent, le traitement thermique choisi pour déterminer la formule chimique du composé  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  est la calcination à  $550^{\circ}C$  pendant 10 heures sous air car elle permet l'élimination d'un maximum de résidus de synthèse nitrés sans celle des carbonates.





**Figure 103 :** Courbes thermogravimétriques des poudres  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinées à 500°C (noir), 550°C (orange) et 600°C (bleu) pendant 10h, et réalisées sous gaz inerte (He), couplées avec l'étude au spectromètre de masse des gaz d'émission des éléments 30 et 44.

**Tableau 33 :** Résultats des caractérisations des poudres  $C_{0,5}-Si_{0,5}-HA$  calcinées à 500°C, 550°C et 600°C pendant 10h sous air

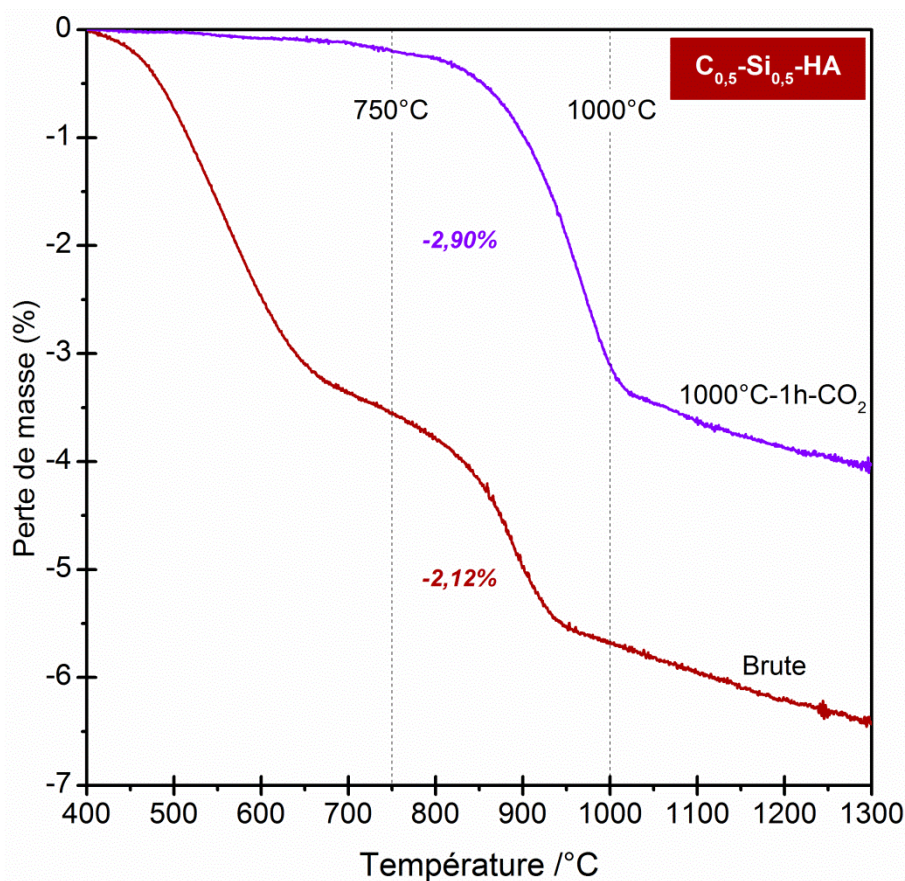
	500°C-10h air	550°C-10h air	600°C-10h air	625°C-10h air
Test phénolphtaléine	négatif	négatif	négatif	positif
Résidus nitrés (ATG-SM)	moyen	faible	nul	/
Dosage C (%masse)	0,738	0,839	0,789	/

## A.4. Détermination du ratio $\text{CO}_3(\text{A})/\text{CO}_3(\text{B})$ à partir des analyses thermogravimétriques

Les analyses thermogravimétriques sont une alternative aux dosages élémentaires pour déterminer le ratio de carbonates de types A et B dans une poudre apatitique.

Ici, l'objet de l'étude sera la poudre  $\text{C}_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  calcinée à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 1 heure sous  $\text{CO}_2$ .

Il a été montré que la perte de masse observée en ATG sous hélium entre  $750^\circ\text{C}$  et  $1000^\circ\text{C}$  est exclusivement associée au dégagement des carbonates (III.2.2 p. 96). La comparaison du profil de l'ATG de la poudre  $\text{C}_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  "brute" avec celui de la même poudre calcinée sous  $\text{CO}_2$  pendant 1 heure à  $1000^\circ\text{C}$ , permet d'observer le degré d'enrichissement en carbonate en site A de la poudre traitée préalablement sous  $\text{CO}_2$  (Figure 104 p. 193).



**Figure 104** : Courbes thermogravimétriques réalisées sous gaz inerte (He) des poudres  $\text{C}_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}$  brute et précalcinée à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 1 heure sous  $\text{CO}_2$ .

Après leur normalisation à 750°C pour s'affranchir des pertes liées aux résidus nitrés de synthèse contenus dans la poudre brute, les taux de perte de masse associés au domaine 750°C-1000°C sont de 2,20 % et 2,91 % respectivement pour la poudre brute et pour la poudre calcinée sous CO<sub>2</sub> (Tableau 34 p. 194).

**Tableau 34 :** Perte de masse de la poudre C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA brute et calcinée à 1000°C pendant 1 heure sous CO<sub>2</sub>, lors de l'analyse thermogravimétrique réalisée sous gaz inerte (He).

Composition	Perte de masse 750°C-1000°C Normalisée à 400°C	Perte de masse 750°C-1000°C Normalisée à 750°C
ATG C <sub>0,5</sub> -Si <sub>0,5</sub> -HA brute	-2,12 %	-2,20 %
ATG C <sub>0,5</sub> -Si <sub>0,5</sub> -HA 1000°C-1h-CO <sub>2</sub>	-2,90 %	-2,91 %

En considérant que :

(i) le composé brute de C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA présente exclusivement des CO<sub>3</sub> de type B (II.3 p. 63). Ainsi, une calcination sous hélium de ce composé libèrera entre 750°C et 1000°C uniquement des CO<sub>3</sub> de type B (Eq. 0-1);

$$[\% \text{ perte}_{750-1000^\circ\text{C}} \text{ poudre brute}] = [\% \text{ CO}_3 \text{ (B)}_{\text{C}_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}}] = 2,20 \% \quad (0-1)$$

où [% perte<sub>750-1000°C</sub> poudre brute] représente le pourcentage de perte de masse de la poudre brute C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA lors d'une calcination sous hélium entre 750°C et 1000°C, et [% CO<sub>3</sub> (B)<sub>C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA</sub>] représente le pourcentage massique de carbonate de type B dans la poudre C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA (brute et calcinée sous CO<sub>2</sub>).

(ii) seul des CO<sub>3</sub> de type A sont fixés lors d'un traitement thermique à haute température sous CO<sub>2</sub> (II.3 p. 63) et qu'aucun CO<sub>3</sub> de type B n'est éliminé au cours de ce traitement thermique sous CO<sub>2</sub> si la température de calcination reste inférieure ou égale à 1000°C. Ainsi, une calcination sous hélium d'une poudre C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA précalcinée sous CO<sub>2</sub> à 1000°C libèrera entre 750°C et 1000°C des CO<sub>3</sub> de type A et B (Eq. 0-2) ;

$$[\% \text{ perte}_{750-1000^\circ\text{C}} \text{ poudre calcinée CO}_2] = [\% \text{ CO}_3 \text{ (B)}_{\text{C}_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}}] + [\% \text{ CO}_3 \text{ (A)}_{\text{C}_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}}] = 2,91 \% \quad (0-2)$$

où [% perte<sub>750-1000°C</sub> poudre calcinée CO<sub>2</sub>] représente le pourcentage de perte de masse de la poudre C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA précalcinée sous CO<sub>2</sub> lors d'une calcination sous hélium entre 750°C et 1000°C,

[% CO<sub>3</sub> (A)<sub>C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA</sub>] représente le pourcentage massique de carbonate de type A dans la poudre C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA précalcinée sous CO<sub>2</sub>.

et [% CO<sub>3</sub> (B)<sub>C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA</sub>] représente le pourcentage massique de carbonate de type B dans la poudre C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA.

L'association des équations Eq. 0-1 et Eq. 0-2 permet de calculer le rapport massique des carbonates de sites A et B CO<sub>3</sub>(A)/CO<sub>3</sub>(B) selon l'équation suivante (Eq. 0-3):

$$\begin{aligned} & [\% \text{ CO}_3 \text{ (A)}_{\text{C}_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}}] / [\% \text{ CO}_3 \text{ (B)}_{\text{C}_{0,5}\text{-Si}_{0,5}\text{-HA}}] = \\ & ([\% \text{ perte}_{750\text{-}1000^\circ\text{C}} \text{ poudre calcinée CO}_2] - [\% \text{ perte}_{750\text{-}1000^\circ\text{C}} \text{ poudre brute}]) / \\ & [\% \text{ perte}_{750\text{-}1000^\circ\text{C}} \text{ poudre brute}] = \\ & (2,91 \% - 2,20 \%) / 2,20 \% = 0,32 \end{aligned} \quad (0-3)$$

Ainsi, le ratio CO<sub>3</sub>(A)/CO<sub>3</sub>(B) de la poudre C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA, calcinée à 1000°C pendant 1 heure sous CO<sub>2</sub>, est évalué à 0,32 par analyse thermogravimétrique. Cette valeur concorde parfaitement avec celle basée sur les dosages élémentaires (Eq. II-25 p. 84) et estimée à 0,31 (Tableau 35 p. 195).

**Tableau 35** : Evaluation de la carbonatation de la poudre C<sub>0,5</sub>-Si<sub>0,5</sub>-HA après calcination à 1000°C pendant 1 heure sous CO<sub>2</sub> par ATG, et comparaison avec les valeurs de la formule hypothétique.

Méthode de calcul	Ratio CO <sub>3</sub> (A)/CO <sub>3</sub> (B)
Formule hypothétique (dosages élémentaires) (Eq. II-25 p. 84)	0,31
-----	
ATG sous hélium	0,32







NNT : 2014 EMSE 0739

Antoine BOYER

## SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL EVALUATION OF SILICATED AND CARBONATED HYDROXYAPATITES

Speciality : Process Engineering

Keywords : Bone substitutes, Silicated and carbonated hydroxyapatites, Synthesis, Thermal stability, Sintering, Biological evaluation

Abstract :

Ionic substitution appears as one possibility to modulate the bioactivity of hydroxyapatite (HA), which is a material commonly used as bone substitute due to its chemical and crystallographic similarities with bone mineral part. The simultaneous incorporation of silicates and carbonate ions in the apatite structure could allow coupling the resorption and dissolution properties of carbonate apatite with the important metabolic role of silicon in the connective tissue.

Co-substituted hydroxyapatite powders, of assumed composition  $\text{Ca}_{10-x+y}(\text{PO}_4)_{6-x-y}(\text{CO}_3)_x(\text{SiO}_4)_y(\text{OH})_{2-x+y}$  (with  $0 \leq y \leq x \leq 2$  et  $x+y \leq 2$ , C-Si-HA), with controlled amount of carbonate (x) and silicate groups (y), were synthesized by means of a wet precipitation method. The innovative character of this synthesis process lies in the use of completely soluble and miscible reagents in water. According to this method we proved that silicates and carbonates substitution for phosphate ions into the apatitic structure occurs from precipitation. The powders obtained are monophasic, crystalline and apatitic.

The physicochemical characterizations of powders revealed the existence of interactions between carbonates (A and B) and silicates within the apatitic structure. C-Si-HA phase decomposes when B-type carbonate are released from the structure. The use of  $\text{CO}_2$  throughout the heat treatment allows to shift the B sites decarbonation to higher temperature than under inert atmosphere. The sintering of dense and monophasic ceramic in C-Si-HA was realized. *In vitro* culture of mesenchymal stem cells C3H10T1/2 on the surface ceramics showed equivalent biocompatibility and osteoconductive properties between HA and C-Si-HA (x=0.8, y=0.4) phases.



NNT : 2014 EMSE 0739

Antoine BOYER

## SYNTHESE, CARACTERISATION ET EVALUATION BIOLOGIQUE D'APATITES PHOSPHOCALCIQUES CARBO-SILICATEES.

Spécialité : Génie des procédés

Mots clefs : Substituts osseux, Hydroxyapatites carbo-silicatées, Synthèse, Stabilité thermique, Frittage, Evaluation biologique.

Résumé :

La substitution ionique apparait comme une des possibilités pour moduler la bioactivité de l'hydroxyapatite (HA), matériau couramment employé comme substitut osseux. L'incorporation simultanée d'ions carbonates et silicates dans la structure apatitique pourrait permettre de coupler les propriétés de résorption et de dissolution des apatites carbonatées avec le rôle métabolique important du silicium dans le tissu conjonctif.

Des poudres d'hydroxyapatites phosphocalciques substituées en carbonates et en silicates de formule  $\text{Ca}_{10-x+y}(\text{PO}_4)_{6-x-y}(\text{CO}_3)_x(\text{SiO}_4)_y(\text{OH})_{2-x+y}$  (avec  $0 \leq y \leq x \leq 2$  et  $x+y \leq 2$ , C-Si-HA), ont été synthétisées par précipitation en milieu aqueux. Le caractère novateur de cette synthèse réside essentiellement dans l'emploi de réactifs parfaitement solubles et miscibles dans l'eau. Ainsi, l'incorporation des groupements carbonates et silicates en substitution des groupements phosphates se produit dès la précipitation. Les poudres obtenues sont monophasiques, cristallines et de structure apatitique.

Les caractérisations physico-chimiques des poudres ont mis en évidence l'existence d'interactions entre les carbonates (A et B) et les silicates au sein de la maille apatitique. La décarbonatation des sites B, synonyme du début de la décomposition de la phase C-Si-HA, a pu être décalée à de plus hautes températures avec l'emploi du  $\text{CO}_2$  comme atmosphère de calcination. Le frittage de céramiques denses et monophasiques en C-Si-HA destinée à une première évaluation biologique a donc été possible. La culture *in vitro* de cellules souches mésenchymateuses C3H10T1/2 à la surface de céramiques de composition  $\text{C}_{0,8}\text{-Si}_{0,4}\text{-HA}$  a mis en évidence leur biocompatibilité et des propriétés ostéoconduites équivalentes à celles de l'HA.