



**HAL**  
open science

# Caractérisation et biocompatibilité de dépôts de phosphates de calcium sur Ti-6Al-4V obtenus par chimie douce

van Quang Le

► **To cite this version:**

van Quang Le. Caractérisation et biocompatibilité de dépôts de phosphates de calcium sur Ti-6Al-4V obtenus par chimie douce. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT: 2014STRAE017. tel-01126860

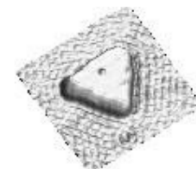
**HAL Id: tel-01126860**

**<https://theses.hal.science/tel-01126860>**

Submitted on 6 Mar 2015

**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.



**ÉCOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE ET CHIMIE PHYSIQUE**

**Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg**

# THÈSE

présentée par

**Van Quang LE**

soutenue le 17 septembre 2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : Physique- Chimie Physique

**Caractérisation et biocompatibilité de dépôts  
de phosphates de calcium sur Ti-6Al-4V  
obtenus par chimie douce**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme CARRADÒ Adele**  
**Mme POURROY Geneviève**

Maître de Conférences HDR, université de Strasbourg  
Directrice de recherches, université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**M BERTHOD Patrice**  
**M DROUET Christophe**

Maître de Conférences HDR, université de Lorraine  
Chargé de recherche HDR, université de Toulouse

---

**EXAMINATEURS :**

**M PALKOWSKI Heinz**  
**Mme VIART Nathalie**

Professeur, Technische Universität Clausthal  
Professeur, université de Strasbourg



## Remerciements

*Ce travail de thèse a été réalisé en collaboration entre le Département Surfaces-Interfaces (DSI) de l'Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg (IPCMS), dirigé par M Wolfgang WEBER et M Fabrice SCHEURER, le Département de Chimie des Matériaux Inorganiques (DCMI) de l'IPCMS, dirigé par Mme Geneviève POURROY, au sein desquels j'ai effectué mes recherches, le Département de Mécanique de l'INSA de Strasbourg et le Département des Sciences de la Santé du Laboratoire de matériaux biomédicaux et dentaires, Italie.*

*Tout d'abord, j'aimerais remercier la directrice et la co-directrice de cette thèse, Mme Adele CARRADO, Maître de conférences-HDR au DSI et Mme Geneviève POURROY, Directrice de recherches au DCMI, pour avoir accepté de m'accueillir dans leurs laboratoires, pour m'avoir guidé, encouragé, conseillé, corrigé, relu et fait confiance pendant trois ans de thèse en me laissant une grande liberté. Chacune avec ses propres manières, avec ses dynamiques et ses compétences scientifiques m'a permis de mener à bien et de faire aboutir ce travail. Je les remercie de tout mon cœur.*

*Je tiens à remercier M Jacques Faerber, DSI-IPCMS pour la formation en microscopie optique, le cours théorique sur la microscopie électronique à balayage et surtout pour ses conseils et ses travaux d'analyse en microscopie électronique à balayage.*

*Je tiens à remercier également M Dris IHIWAKRIM, DSI-IPCMS pour son aide dès mon arrivée au laboratoire, pour ses travaux d'analyse en microscopie électronique en transmission et pour son travail de correction du français (allègement de mes phrases).*

*J'aimerais remercier Mme Céline KIEFER, DCMI-IPCMS pour son aide dans les analyses chimiques utilisant le spectromètre UV-Visible et les analyses de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.*

*J'aimerais remercier M Guy SCHMERBER, IPCMS pour ses conseils au cours de la réalisation de l'analyse structurale par DRX et pour son travail de correction (allègement de mes phrases).*

*Je remercie M Thierry ROLAND, Maître de Conférences, Département Mécanique, INSA de Strasbourg pour son travail de test de nanorayure et son travail de correction de la partie de propriété mécanique de dépôt.*

*Je souhaite remercier Mme Lia RIMONDINI et M Andrea COCHIS, Department of Health Sciences, Laboratory of Biomedical and Dental Materials, Italy pour leurs tests de viabilité cellulaire des dépôts et leur travail de correction de la rédaction.*

*J'aimerais remercier M Guy LADAM, Laboratoire de Biophysique et Biomatériaux (La2B), Université de Rouen - Centre Universitaire d'Evreux, France pour son travail d'analyse en spectroscopie Raman et pour son travail de correction de la partie de spectroscopie Raman.*

*Je souhaite également remercier M Stéphane MATHIEU, de l'équipe Surface et Interface : Réactivité Chimique des Matériaux, de l'Institut Jean Lamour, Vandoeuvre-lès-Nancy, Nancy, pour ses travaux de préparation des échantillons de cross-polisseuse.*

*Je tiens à remercier M Didier BURGER, IPCMS pour son travail d'analyse thermique et M Jeannot STOLL, IPCMS pour les coupes de substrat.*

*Je tiens à remercier Mme Hadeer I. Mohammed, thésarde à l'IPCMS pour son aide dans la préparation de SBF.*

*J'aimerais remercier tous mes collègues, les postdoctorants, les thésards et mes amis à l'IPCMS dont les conseils et l'aide m'ont permis de mener à bien ce travail.*

*Je tiens à remercier les stagiaires pour leurs travaux de stage: M TILLY Alexis, Mlle Ioana-Cristina BĂNICĂ, M Martin NICTERWITZ et M Mich VONG.*

*Je remercie également tous les membres du jury : Dr. Patrice BERTHOD, Institut Jean Lamour, Université de Lorraine, France ; Dr. Christophe DROUET, Institut Carnot CIRIMAT, Université de Toulouse France ; Prof. Dr. Heinz PALKOWSKI, Technische Universität Clausthal, Allemagne ; Prof. Dr. Nathalie VIART, Directrice de recherche, IPCMS, Université de Strasbourg, France; Dr. Fabienne PERRIN-SCHMITT, INSERM, Université de Strasbourg, France et Dr. Guy LADAM, Université de Rouen - Centre Universitaire d'Evreux, France.*

*Je n'oublierai pas les aides permanentes reçues de la part du personnel technique et administratif de l'IPCMS : Mme Céline GUILLET, Mme Sylvie MAINGE, Mme Virginie SPEISSER et M Michelangelo ROMEO.*

*Je tiens à remercier mes collègues du Département des Matériaux de Silicate, Institut Polytechnique de Hanoi, Vietnam pour leur soutien et leurs encouragements : M Ngoc Dung TA, M Xuan Phai DAO, M Hong Quan DO, Mme Thu Ha BUI et M Vu Tung HOANG.*

*Je voudrais remercier encore le Gouvernement Vietnamien pour son soutien financier.*

*Enfin, je remercie ma famille, mes parents, mes beaux-parents, ma femme, mon fils, ma fille, ma sœur et mes frères pour leur aide et surtout leurs encouragements pendant mon séjour en France.*

## Liste des abréviations

Abréviation	Signification
Ti-6Al-4V	Un alliage de titane qui contient une composition nominale de 6 % en poids d'aluminium, 4 % en poids de vanadium
Kroll	Solution acide mixte de 2 mL HF 40 % et de 4 mL HNO <sub>3</sub> 65 % dans 1000 mL d'eau distillée
TT	Traitement thermique
TT630	Traitement thermique à 630°C pendant 1 h, avec une montée de 5 °C/min
Ca-P	Phosphate de calcium (en anglais <i>calcium phosphate</i> )
S	Substrat ( <i>substrate</i> )
HA	Hydroxyapatite (Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> OH)
ACM	Bain autocatalytique acide modifié
AC	Bain acide ( <i>Acidic bath</i> )
ALK	Bain alcalin ( <i>Alkaline bath</i> )
OXY	Bain oxydant ( <i>Oxidant bath</i> )
SBF	Solution simulant le plasma sanguin ( <i>simulated body fluid</i> )
MEB	Microscopie électronique à balayage ( <i>Scanning electron microscope, SEM</i> )
EDS-X	Analyse dispersive en énergie ( <i>Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i> )
MET	Microscopie électronique en transmission ( <i>Transmission electron microscopy, TEM</i> )
SAED	Diffraction des électrons par sélection d'aire ( <i>selected area electron diffraction</i> )
DRX	Diffraction des rayons X ( <i>X-ray Diffraction, XRD</i> )
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ( <i>Fourier Transform InfraRed spectroscopy</i> )
ATD	Analyse thermique différentielle ( <i>Differential Thermal Analysis</i> )
ATG	Analyse thermogravimétrique ( <i>ThermoGravimetric Analysis</i> )
PCNA	Proliferative Cell Nuclear Antigen
IF	Immunofluorescence staining
MTT	Colorimetric metabolic 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay
PBS	Phosphate buffered saline
NGS	Normal Goat Serum
SPSS	Statistical Package for Social Sciences



# Caractérisation et biocompatibilité de dépôts de phosphates de calcium sur Ti-6Al-4V obtenus par chimie douce

## Résumé

Les biomatériaux en titane sont de plus en plus utilisés dans les implants dentaires et les prothèses de hanche. Toutefois, la surface des implants de titane doit être modifiée pour devenir davantage bioactive. Dans cette étude, les substrats de Ti-6Al-4V ont été d'abord modifiés par un traitement mécanique, puis par un traitement acide. Dans un deuxième temps, les échantillons ont subi un traitement alcalin dans une solution de NaOH puis un traitement thermique, ce qui a provoqué la formation d'une couche de titanate de sodium sur leur surface. Enfin, du phosphate de calcium a été déposé soit par voie sol-gel, soit par voie autocatalytique, sur la couche de titanate de sodium pour obtenir un revêtement bioactif de titanate de sodium/ phosphate de calcium.

Après le dépôt, la morphologie et la structure de la couche de phosphate de calcium ont été analysées par diverses méthodes comme FTIR, Raman, DRX, MEB, MET, EDS-X et SAED. De plus, la coupe transversale du revêtement de titanate de sodium/ phosphate de calcium a été analysée par MEB/ EDS-X. Et l'adhésion du dépôt de phosphate de calcium au substrat a été qualitativement estimée par nano-indenteur. La bioactivité *in vitro* du dépôt a été vérifiée par la méthode de Kokubo utilisant la solution simulant le plasma sanguin (SBF). Et la cytotoxicité *in vitro* du dépôt a été vérifiée par le test de viabilité cellulaire utilisant les ostéoblastes MG63.

Les résultats ont indiqué que le dépôt de phosphate de calcium est cytocompatible et bien lié au substrat. De plus, le dépôt de phosphate de calcium est stable en milieu physiologique (SBF) pour des durées d'immersion de 2 à 28 jours. La croissance d'apatite sur la surface des dépôts a été observée après 2 jours d'immersion dans SBF.

*Mots-clés : Ti-6Al-4V, hydroxyapatite, sol-gel, couche mince, titanate de sodium*

## Characterization and biocompatibility of calcium phosphate coatings obtained by soft chemistry onto the Ti-6Al-4V alloy

### Abstract

Titanium and its alloys based biomaterials are more and more used for medical implants in reconstructing of failed tissue. However to respond to the demand of orthopaedic and dental application, their surfaces have to be modified to increase the osteointegration rate. In this study, the Ti-6Al-4V alloy surface was firstly mirror polished and treated by an acid solution. Then, a thin film of sodium titanate was formed on its surface via an alkaline-heat treatment. Finally, a calcium phosphate was coated on the sodium titanate layer by using the sol-gel technique or the autocatalytic route. By this process, a bi-phase bioactive sodium titanate/calcium phosphate layer was created on the titanium substrate.

After coating, the morphology and the structure of calcium phosphate layer were analyzed by various methods such as FTIR, Raman, XRD, SEM, TEM, EDS-X and SAED. Additionally, a cross-section view of sodium titanate/ calcium phosphate layer was also realized by SEM/ EDS-X. And the adhesion of calcium phosphate layer onto the substrate was verified qualitatively by nano-indenter. The *in vitro* bioactivity of calcium phosphate coated samples was tested by Kokubo's method using the simulated body fluid (SBF). The *in vitro* cytotoxicity of calcium phosphate coated samples was estimated by cell viability assay using the osteoblasts MG63.

The results showed that the calcium phosphate coating is cytocompatible and strongly bonds to the substrate. In addition, the calcium phosphate coating was stable in SBF for different soaking periods from 2 to 28 days. And the growth of apatite on the calcium phosphate coated sample surface was identified after 2 days of immersion in SBF.

*Key words: Ti-6Al-4V implant, hydroxyapatite, sol-gel, thin film, sodium titanate*





# Table des matières

Introduction.....	1
Chapitre 1. État de l'art .....	8
1.1. Le titane et l'alliage Ti-6Al-4V : généralités.....	10
1.2. Traitement de surface du titane .....	13
1.3. Les phases de phosphate de calcium .....	20
1.4. Méthodes de dépôt du phosphate de calcium .....	20
1.4.1. Voie sol-gel pour déposer du phosphate de calcium sur du titane .....	22
1.4.2. Dépôt de phosphate de calcium sur un polymère par voie « autocatalytique ».....	29
1.4.3. Dépôt de phosphate de calcium sur métal par la méthode « Reis modifiée ».....	31
1.4.4. Dépôt de phosphate de calcium par une méthode biomimétique .....	31
Conclusions .....	33
Références .....	33
Chapitre 2. Méthodologies expérimentales .....	41
2.1. Préparation des échantillons .....	42
2.1.1. Tronçonnage et polissage .....	42
2.1.2. Traitement acide (traitement Kroll).....	43
2.1.3. Traitement alcalin utilisant la solution NaOH .....	43
2.1.4. Traitement thermique .....	43
2.1.5. Dépôt de Ca-P par la voie sol-gel .....	44
2.1.6. Dépôt de Ca-P par la méthode Reis et al. ....	45
2.2. Schéma des études et nom des échantillons .....	47
2.3. Les méthodes d'analyse .....	50
2.3.1. Microscopie électronique à balayage (MEB) .....	50
2.3.2. Mesure d'énergie dispersive des rayons X (EDS-X).....	50
2.3.3. Microscopie électronique à transmission (MET) et diffraction d'aire sélectionnée des électrons (SAED) .....	50
2.3.4. Diffraction des rayons X (DRX) .....	51
2.3.5. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) .....	52
2.3.6. Analyse thermique différentielle et thermogravimétrique (ATD/ATG) .....	53
2.3.7. Microspectroscopie Raman .....	54

2.3.8. Étude de l'interface couche mince- substrat .....	54
2.3.9. Nano-indentation.....	55
2.3.10. Test de bioactivité in vitro utilisant un fluide corporel simulé (SBF) .....	57
2.3.11. Dosage du phosphore par la méthode de BRIGGS .....	58
2.3.12. Dosage du calcium par colorimétrie .....	59
2.3.13. In vitro cytocompatibility tests .....	60
2.3.14. Évaluation qualitative de la porosité de la couche de titanate de sodium.....	62
Références .....	63
<b>Chapitre 3. Élaboration et caractérisation de l'inter-couche sur Ti-6Al-4V .....</b>	<b>65</b>
3.1. Caractérisation du substrat Ti-6Al-4V après le traitement acide (Kroll) .....	66
3.1.1. Analyse structurale du substrat Ti-6Al-4V par diffraction de rayons X (DRX) .....	66
3.1.2. Observation de la surface du substrat au MEB après le traitement Kroll .....	67
3.2. Traitement alcalin-thermique pour Ti-6Al-4V .....	70
3.2.1. Formation d'une couche d'hydrogel de titanate de sodium sur la surface du Ti-6Al-4V par un traitement alcalin .....	70
3.2.2. Structure et morphologie de la couche de titanate de sodium après le traitement thermique .....	74
3.2.3. Étude de l'interface titanate de sodium-substrat.....	80
3.3. Étude de la formation de titanate de sodium par traitement alcalin-thermique pour l'échantillon en poudre de titane.....	80
Conclusions .....	85
Références .....	86
<b>Chapter 4. New Ca-P deposition process on sodium titanate .....</b>	<b>88</b>
4.1. Calcium phosphate (Ca-P) coating .....	89
4.1.1. Thermal behaviour of the Ca-P after drying of the sol-gel solution .....	89
4.1.2. Structure and chemical composition of the Ca-P coating.....	91
4.2 Morphology and structure of the Ti-6Al-4V/sodium titanate/Ca-P multilayer system .....	100
4.2.1. Observation of the surface .....	100
4.2.2. Structure of the interfaces.....	102
4.3. Mechanical properties of Ca-P coatings scratch test .....	106
4.4. Stability and <i>in vitro</i> bioactivity of HA coatings in physiological environment tested by using simulated body fluid .....	111
4.5. Cell viability assay of calcium phosphate coatings.....	116

4.5.1. In vitro cytocompatibility.....	116
4.5.2. Cells number and proliferative ratio.....	120
Conclusions .....	122
References .....	123
<b>Chapitre 5. Dépôt de phosphate de calcium obtenu par la voie autocatalytique</b>	<b>125</b>
5.1. Dépôt de Ca-P en utilisant la méthode de Reis et al.....	126
5.1.1. Préparation et caractérisation du dépôt .....	126
5.1.2. Test de bioactivité des substrats immergés dans les bains autocatalytiques .....	132
5.1.3. Bains « autocatalytiques » appliqués sur le sandwich 316L/Polypropylène-Polyéthylène (16).....	134
5.2. Modification des bains de Reis et al. pour le dépôt de Ca-P bioactif sur Ti-6Al-4V .....	142
5.2.1. Présentation de l'article.....	142
5.2.2. Publication .....	143
Conclusions .....	150
Références .....	151
<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>152</b>
<b>Annexe. Porosité de la couche de titanate de sodium sur Ti-6Al-4V après un traitement alcalin-thermique .....</b>	<b>160</b>



## Liste des figures

Figure 0.1. Schéma d'illustration du processus de dépôt de Ca-P sur Ti-6Al-4V .....	3
Figure 0.2. Scheme of Ca-P deposition process onto Ti-6Al-4V .....	5
Figure 1.1.1. Schéma d'illustration des substituts osseux : implant dentaire (à gauche), et prothèse de hanche (à droite).....	9
Figure 1.1.2. Schéma des mailles cristallographiques des phases $\alpha$ (hcp) et $\beta$ (bcc) (14) .....	10
Figure 1.1.3. Diagramme de phase à trois dimensions présentant les domaines de stabilité des alliages de Ti contenant Al et V (15) .....	12
Figure 1.1.4. Observation au microscope électronique à balayage (MEB) de la surface de Ti-6Al-4V poli miroir avec une suspension de SiO <sub>2</sub> (0,06 $\mu$ m), et immergé ensuite dans la solution HF-HNO <sub>3</sub> pendant 10 min dans un bain d'ultrasons (19) .....	12
Figure 1.2.1. Morphologie du titanate de sodium obtenu sur titane par traitement NaOH 5 M à 60°C pendant 24 h, recuits à 550 et 600°C pendant 1 h. Après le traitement NaOH, un revêtement de titanate de sodium de porosité 10 à 100 nm est bien formé. Le réseau poreux se détériore à 600°C (40).....	15
Figure 1.2.2. Profil de concentration de Ti, O et Na en fonction de la profondeur (36) .....	17
Figure 1.4.1. Schéma des processus sol-gel et ses divers produits (63) .....	22
Figure 1.4.2. Schéma des deux techniques de dépôt d'une couche mince sur un substrat à partir d'une solution sol-gel .....	23
Figure 1.4.3. Influence du temps de conservation sur les impuretés observées dans l'HA (60).....	26
Figure 1.4.4. Influence du traitement thermique sur la force d'adhérence du dépôt HA au substrat .....	28
Figure 1.4.5. Schéma du processus de dépôt du Ca-P sur des polymères par autocatalyse (12) .....	30
Figure 2.1.1. Barres de Ti-6Al-4V ELI commercial (à gauche) et disques de 20 mm de diamètre et 1,5 mm d'épaisseur (à droite) .....	42
Figure 2.1.2. Matériels de polissage : papiers abrasifs, feutre et suspension de silice colloïdale (à gauche), machine de polissage (à droite) .....	42

Figure 2.1.3. Microscope optique Olympus IX70 équipé un objectif X50 (à gauche), échantillons polis à la silice colloïdale et appareil ultrasonique utilisé pour le nettoyage des substrats (à droite).....	43
Figure 2.1.4. Courbe de température du traitement thermique .....	44
Figure 2.1.5. Délaminage du dépôt de Ca-P à cause de traitement thermique à 700 (à gauche) et 800°C (à droite).....	45
Figure 2.1.6. Schéma d'illustration du dépôt de Ca-P par les bains autocatalytiques .....	46
Figure 2.2.1. Schéma des travaux réalisés dans cette thèse .....	47
Figure 2.3.1. Illustration de l'image au MET (a) et de l'image de diffraction d'électrons (b) .....	51
Figure 2.3.2. Principe de la diffraction des rayons X : d est la distance interréticulaire, $\theta$ est l'angle de diffraction, $\lambda$ est la longueur d'onde des rayons X et $n = 1, 2, 3, \text{etc.}$ ... l'ordre de la diffraction....	52
Figure 2.3.3. Matériels (moule, broyeur et presse) utilisés pour préparer une pastille de KBr pour l'analyse FTIR.....	52
Figure 2.3.4. Schéma d'illustration d'un Microspectroscope Raman (8) .....	54
Figure 2.3.5. Illustration de la protection du dépôt et de l'observation au MEB dans l'étude de l'interface dépôt-substrat.....	55
Figure 2.3.6. Schématisation du test de nanorayure .....	56
Figure 2.3.7. Schéma représentatif de la charge des étapes de palpé initial, de rayure et de palpé final.....	56
Figure 2.3.8. Morphologie de surface de l'échantillon TS-HA2 après une semaine dans la solution SBF aux différentes échelles. Une couche homogène et uniforme de Ca-P est observée .....	58
Figure 2.3.9. Schéma d'illustration de l'équation linéaire d'étalonnage du phosphore. La concentration de l'échantillon d'analyse est déterminée à partir de l'absorbance de cet échantillon en utilisant l'équation d'étalonnage .....	59
Figure 2.3.10. Image d'illustration de la pixellisation de la porosité du titanate de sodium .....	63
Figure 3.1.1. Diagrammes de diffraction des Rayons X (DRX) sur les substrats Ti-6Al-4V « poli miroir » (a) et après un traitement Kroll de 3 min (b). Pics de diffraction des phases $\text{Ti}_{0,862}\text{V}_{0,036}\text{Al}_{0,102}$ (JCPDS 02-8708) isomorphe de la phase $\alpha$ de titane (JCPDS 01-8963), phase $\beta$ de titane (JCPDS 88-2321) et $\text{Ti}_{0,8}\text{V}_{0,2}$ (JCPDS 03-2228).....	67
Figure 3.1.2. Observation au microscope électronique à balayage (MEB) de la surface du substrat Ti-6Al-4V après une immersion dans la solution Kroll à température ambiante pendant 1, 2, 3, 5 et 10 min .....	68

Figure 3.1.3. Spectre d'analyse dispersive en énergie (EDS-X) de la surface du Ti-6Al-4V après un traitement Kroll de 5 min. Les positions de l'analyse (S1 et S2) sont indiquées dans la Figure 3.1.2	69
Figure 3.2.1. DRX des échantillons : Ti-6Al-4V traité dans la solution Kroll (Kroll), et dans la solution NaOH 5 M 24 h à 60°C (M56024), 24 h à 80°C (M58024), 72 h à 60°C (M56072) et 72 h à 80°C (M58072) (voir nomenclature dans le Tableau 2.2). Pics de diffraction du titanate de sodium Na <sub>2</sub> Ti <sub>6</sub> O <sub>13</sub> (JCPDS 77-9461) et du rutile TiO <sub>2</sub> (JCPDS 21-1276). Les pics du substrat sont notés « S »	70
Figure 3.2.2. DRX des échantillons : Kroll, M106024, M108024, M106072 et M108072 (voir Tableau 2.2). Pics de diffraction du titanate de sodium Na <sub>2</sub> Ti <sub>6</sub> O <sub>13</sub> (JCPDS 77-9461), Na <sub>2</sub> Ti <sub>9</sub> O <sub>19</sub> (JCPDS12-6163) et du rutile TiO <sub>2</sub> (JCPDS 21-1276). Les pics du substrat sont notés « S »	71
Figure 3.2.3. Morphologie de la surface des substrats (voir Tableau 2.2) après un traitement alcalin dans une solution NaOH 5 M (échelle 1 µm)	72
Figure 3.2.4. Morphologie de la surface des substrats (voir Tableau 2.2) après un traitement alcalin dans une solution NaOH 10M (échelle 1 µm)	73
Figure 3.2.5. Couche obtenue sur un substrat Ti-6Al-4V poli à #400 dans une solution NaOH 5 M à 80°C pendant 72 h : (a) selon Wei et al. (9), et (b) pour l'échantillon M58072 (échelle 1 µm)	73
Figure 3.2.6. DRX des échantillons : Kroll, M56024-TT630, M58024-TT630, M56072-TT630 et M58072-TT630 (voir Tableau 2.2). Pics de diffraction du titanate de sodium Na <sub>2</sub> Ti <sub>6</sub> O <sub>13</sub> (JCPDS 77-9461) et du rutile TiO <sub>2</sub> (JCPDS 21-1276). Les pics du substrat sont notés « S »	74
Figure 3.2.7. DRX des échantillons : Kroll, M106024-TT630, M108024-TT630, M106072-TT630 et M10807-TT630 (voir Tableau 2.2). Pics de diffraction du titanate de sodium Na <sub>2</sub> Ti <sub>6</sub> O <sub>13</sub> (JCPDS 77-9461), Na <sub>2</sub> Ti <sub>9</sub> O <sub>19</sub> (JCPDS12-6163) et du rutile TiO <sub>2</sub> (JCPDS 21-1276). Les pics du substrat sont notés « S »	75
Figure 3.2.8. Micrographies MET et clichés de diffraction en aire sélectionnée (SAED) du titanate de sodium sur les échantillons traités dans une solution NaOH à la concentration de 5 ou 10 M, à la température de 60 ou 80°C pendant 24 ou 72 h, suivi du traitement thermique à 630°C (voir Tableau 2.2). Les distances interréticulaires mesurées par SAED sont présentées dans le Tableau 3.1	76
Figure 3.2.9. Morphologie du titanate de sodium sur Ti-6Al-4V après un traitement alcalin (NaOH 5 M), et après recuit à 630°C (voir Tableau 2.2)	78
Figure 3.2.10. Morphologie du titanate de sodium sur Ti-6Al-4V après un traitement alcalin (NaOH 10 M), suivi d'un traitement thermique à 630°C (voir Tableau 2.2)	79
Figure 3.2.11. Coupe transversale de la couche de titanate de sodium de l'échantillon M106024-TT630(a) et analyse EDS-X (b)	80



Figure 3.3.1. Observation au MEB et analyse EDS-X des échantillons en poudre de titane (a), et après le traitement NaOH 10 M et le traitement thermique à 630°C (b) (voir Tableau 2.2).....	81
Figure 3.3.2. Analyse structurale DRX d'un échantillon en poudre de titane, ayant subi un traitement Kroll puis traité dans la solution NaOH 10 M, et recuit à 630°C pendant 1 h (voir Tableau 2.2) ....	82
Figure 3.3.3. Analyse ATD/ATG de l'échantillon TPA (voir Tableau 2.2).....	83
Figure 3.3.4. Analyse ATD/ATG de l'échantillon TP (voir Tableau 2.2) .....	83
Figure 3.3.5. Schéma d'illustration du processus de traitement alcalin-thermique des particules de titane .....	84
Figure 3.3.6. Potentiel zêta d'une poudre de titane, et des échantillons traités en milieu alcalin (voir Tableau 2.2).....	85
Figure 4.1.1. TG/DTA curves of dried Ca-P gel sample heated in flowing air .....	89
Figure 4.1.2. XRD patterns of dried Ca-P gel annealed (a) at 400 and 500, and (b) at 600, 700 and 800°C. Diffraction peaks from the JCPDS data base of HA (JCPDS 09-432), CaO (JCPDS 02-1088), CaCO <sub>3</sub> (JCPDS 12-8783), Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (JCPDS 06-5679) and H <sub>4</sub> Ca(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O (JCPDS 11-5377) .....	90
Figure 4.1.3. DRX of TT, TS-HA1, TS-HA2, TS-HA3, TD-HA1 and TD-HA2 samples. Phases diagrams from the JCPDS data base of HA (JCPDS 09-432), CaCO <sub>3</sub> (JCPDS 12-8783) and Ca <sub>4</sub> Ti <sub>3</sub> O <sub>10</sub> (JCPDS 89-1385) .....	91
Figure 4.1.4. TEM observations and SAED image and EDS-X spectra of coatings on the samples: TS-HA1, TS-HA2, TS-HA3, TD-HA1 and TD-HA2.....	93
Figure 4.1.5. FTIR analysis for the samples: TT, TD-HA1, TD-HA2, TS-HA1, TS-HA2, and TS-HA3 .....	96
Figure 4.1.6. Typical Raman spectra of the surface of (a) a pre-treated titanium sample, and samples enriched with Ca-P by (b, c and d) spin-coating, and (e, f) dip-coating .....	98
Figure 4.1.7. Compositional mappings of the samples described in Figure 4.1.6 obtained by confocal Raman microspectroscopy. Optical micrograph of the analyzed area (left), Raman intensity of the Ca-P peak at 960-965 cm <sup>-1</sup> (middle), Raman intensity in the 115-325 cm <sup>-1</sup> range corresponding to the titanate phases (right). The bright area in the bottom right hand corner of the micrograph of TD-HA1 corresponds to a scratch performed on the surface .....	99
Figure 4.2.1. SEM observations of the TS-HA1, TS-HA2, TS-HA3, TD-HA1 and TD-HA2 samples .....	101
Figure 4.2.2. EDS-X analysis of the spin- and dip- coated samples compared to the Kroll and TT ones, recorded on few mm <sup>2</sup> area .....	102
Figure 4.2.3. Cross-section observation of the sample TS-HA1.....	103
Figure 4.2.4. Cross-section of the sample TS-HA2.....	103

Figure 4.2.5. Cross-section of the sample TS-HA3.....	103
Figure 4.2.6. Cross-section of the sample TD-HA2 .....	104
Figure 4.2.7. EDS-X analyses recorded (a) at S1, S2 and S3 points of Figure 4.2.3, (b) at S4, S5 and S6 points of Figure 4.2.4, (c) at S7 and S8 points of Figure 4.2.5 and (d) at S9, S10 and S11 point of Figure 4.2.6.....	104
Figure 4.3.1. Experimental scratch curves obtained on the samples (a) TT, (b) TS-HA1, (c)TS-HA2, (d) TS-HA3, (e) TD-HA1 and (f) TD-HA2 using a spherical indenter (R = 5 $\mu$ m) for a normal applied load varying from 10 to 100 mN .....	107
Figure 4.3.2. SEM observations of the residual groove on Ca-P coatings of samples (a) TT, (b) TS-HA1, (c) TS-HA2, (d) TS-HA3, (e) TD-HA1 and (f) TD-HA2 after scratch experiments with a spherical indenter (R=5 $\mu$ m) for a normal applied load varying from 10 to 100 mN .....	108
Figure 4.3.3. Cross profile for a load of 50mN of TS-HA2 and TD-HA2 .....	109
Figure 4.3.4. The friction coefficient as a function of the normal applied load determined on samples (a) TT, (b) TS-HA1, (c) TS-HA2, (d) TS-HA3, (e) TD-HA1 and (f) TD-HA2.....	110
Figure 4.4.1. (a) SEM observations, (b) EDS-X analysis, (c) TEM observation and SAED analysis of the sample TD-HA2 after immersion for 1 to 4 weeks in SBF. The same observations were obtained for the other samples immersed for periods from 1 to 4 week(s).....	111
Figure 4.4.2. Ca concentration measured in SBF after soaking the TT, TD-HA1, TD-HA2, TS-HA1, TS-HA2, and TS-HA3 samples for 0, 2, 4, 7, 14 and 28 days.....	112
Figure 4.4.3. Phosphorus concentration measured in SBF after soaking the TT, TD-HA1, TD-HA2, TS-HA1, TS-HA2, and TS-HA3 samples for 0, 2, 4, 7, 14 and 28 days.....	112
Figure 4.4.4. SEM surface morphology of samples after one week in SBF.....	113
Figure 4.4.5. SEM surface morphology of samples after 2 weeks in SBF .....	114
Figure 4.4.6. Surface morphology of samples after 4 weeks in SBF .....	114
Figure 4.4.7. XRD patterns of (a)TS-HA1, (b) TS-HA2, (c) TS-HA3, (d) TD-HA1 and (e) TD-HA2 samples after soaking in SBF solution for 1 and 2 week(s) .....	115
Figure 4.5.1. Not direct cytotoxicity evaluation after 24 h. Bars represent means and standard deviations. MTT assay reported very similar results between spin coated samples and controls (a) and also between dip coated samples and controls (b). For spin coated series, cells viability ranged from 97 to 99% compared with controls, while for dip coated series, the values were between 99 and 101%. No statistical significant differences were noticed between test samples	

and controls ( $p>0.05$ ); furthermore, morphological observations (c) confirmed MTT data as cells presented similar morphology, spread and density. Bar scale = 100  $\mu\text{m}$  (magnification 20x) .....116

Figure 4.5.2. Not direct cytotoxicity evaluation after 72 h. Bars represent means and standard deviations. MTT assays showed comparable results between spin coated samples and controls (a) and also between dip coated samples and controls (b). For spin coated series, cells viability (TS-HA1, TS-HA2 and TS-HA3) was calculated as 97 to 99% reported to controls, while dip coated series values (TD-HA1 and TD-HA2) were between 99 and 101%. No statistical significant differences were noticed between test samples and controls ( $p>0.05$ ). Moreover, morphology analysis (c) supported viability data as cells showed comparable morphology, spread and density with controls. Bar scale = 100  $\mu\text{m}$  (magnification 20x) ..... 117

Figure 4.5.3. Direct cytocompatibility evaluation after 24 h. MTT assay showed no statistical differences between control and spin coated series samples (a) and dip coated series (b) in term of cells viability. Bars represent means and standard deviations. SEM observations (c) confirmed that cells were able to adhere to coated surfaces as well as to the control (Ti-6Al-4V) one. Thus, deposited Ca-P did not interfere with cells adhesion even in multilayer (TS-HA2, TS-HA3 and TD-HA2); bar scale = 20  $\mu\text{m}$ . Finally, IF staining (d) confirmed that cells successfully spread as cytoskeletons (in red, stained by phalloidin) were comparable between control and test samples. Bar scale = 100  $\mu\text{m}$  ..... 118

Figure 4.5.4. Direct cytocompatibility evaluation after 7 days. MTT assay showed a statistical significant difference between TT samples values compared to control (indicated by \*) and to TS-HA3 and TD-HA2 samples (indicated by §). This could be related to the ability of a Ca-P multilayer to protect cells from direct contact with sodium titanate. Bars represent means and standard deviations. SEM observations (c) confirmed that cells were still attached to samples surface but that Ca-P coating layers were metabolized by cells. Thus, deposited Ca-P protected cells from the direct contact to the sodium titanate layer; bar scale = 20  $\mu\text{m}$ . Finally, IF staining (d) confirmed that cells still attached to the surface presented cytoskeletons (in red, stained by phalloidin) comparable with controls. Bar scale = 50  $\mu\text{m}$  ..... 119

Figure 4.5.5. Number of floating cells into the medium; general comparison (a), spin coated samples detail (b) and dip coated series detail (c). In (d) are reported the percentage of lost cells vs day 0 number. In general cells spontaneously detached from all the samples. Control (Ti-6Al-4V) resulted the material with the lowest cells detachment percentage. On the opposite, TT series reported the highest number of lost cells. Regarding coated samples, the increase of Ca-P layer decreased the number of detached cells. Graphics represent means and standard deviations ..120

Figure 4.5.6 a-c. PCNA staining of proliferative cells. Bars represent means and standard deviations. After the first 24 h, no statistical significant differences were noticed between the number of proliferating cells in control (pure titanium) and the other groups that showed values between 95 and 97% for spin coated series (a, upper panel) and between 95 and 96% for dip coated series (b,

upper panel). Also TT specimens did not result as statistically different compared to control. Also IF staining images (c, upper panel) showed that after 24 h the number of proliferative cells (co-stained in red) was superior to the non proliferative ones (in blue, indicated by the arrow) after 24 h. Conversely, after 7 days of culture statistical significant differences ( $p < 0.05$ ) were noticed between TT samples and controls (indicated by \*) and between TT and TS-HA3 (a, lower panel, indicated by §) and between TT and TD-HA2 specimens (b, lower panel, indicated by §). Moreover, the presence of more non-proliferating cells was visually detected by IF (c, lower panel, indicated by the arrow). Bar scale = 50  $\mu\text{m}$ .....121

Figure 5.1.1. DRX des échantillons : TT, AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd. Pics de diffraction du titanate de sodium  $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$  (JPDCS 77-9461) et du rutile  $\text{TiO}_2$  (JPDCS 21-1276). Les pic du substrat sont notés « S ».....127

Figure 5.1.2. Observation au MEB et analyse EDS de la surface des échantillons AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd .....128

Figure 5.1.3. Analyse au MET avec SAED et EDS-X des échantillons AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd. Le phosphore et le calcium sont toujours présents dans les échantillons. Le palladium est détecté sur l'échantillon OXY-Pd. Les distances interréticulaires mesurées sur le SAED sont présentées dans le Tableau 5.1 .....129

Figure 5.1.4. Variation du Ca (à gauche) et du P (à droite) dans le SBF après une immersion de 2, 4 et 7 jours pour les échantillons AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd .....132

Figure 5.1.5. DRX des échantillons : TT, AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd après une semaine dans SBF. Pics de diffraction du titanate de sodium  $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$  (JPDCS 77-9461) et du rutile  $\text{TiO}_2$  (JPDCS 21-1276). Les pic du substrat sont notés « S » .....132

Figure 5.1.6. Observation au MEB et analyse EDS des échantillons AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd après une semaine dans SBF .....133



## **Introduction**



## Introduction

Du fait du vieillissement de la population, les prothèses ou les implants connaissent un développement croissant. Ils permettent de restaurer des fonctions biologiques et/ou d'améliorer la qualité de vie de personnes âgées, de patients gravement atteints lors d'accidents, ou encore de patients souffrant d'arthrite ou de malformations (1). Implantés dans le corps, ils doivent remplir un certain nombre de critères selon l'application visée, bioinertes quand il s'agit de valves cardiaques ou bioactifs et ostéointégrables pour les prothèses de hanche ou les implants dentaires. Les matériaux qui les constituent sont appelés « biomatériaux », définis par la Société Européenne des Biomatériaux, comme « matériau conçu pour interagir avec les systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle ».

Ainsi, les implants peuvent être en polymère, en céramique ou en métal (1–3). Toutefois, pour répondre aux exigences de fabrication, de caractéristiques mécaniques et de biocompatibilité, la plupart des implants sont métalliques. Parmi les métaux, le titane et ses alliages comme le Ti-6Al-4V sont largement utilisés car ils présentent d'excellentes propriétés par rapport aux aciers inoxydables classiques ou aux alliages nickel-chrome et cobalt-chrome : un module d'élasticité plus faible, une meilleure biocompatibilité et une meilleure résistance à la corrosion (2). De plus, le titane et ses alliages sont inertes *in vivo* et ont une bonne résistance à la corrosion grâce à la couche mince de dioxyde de titane présente à leur surface. Néanmoins, une fois implantés, ils sont séparés de l'os par une couche mince non minérale et le lien de l'implant de titane à l'os est réalisé par un verrouillage (interlocking) mécanique simple (4).

Ainsi, de nombreux travaux portent sur la modification de la surface des implants de titane pour obtenir une adhésion forte à l'os et combiner les propriétés mécaniques du métal à la bioactivité de la surface. Des traitements électrochimiques ont été utilisés pour créer une couche mince d'oxyde de titane (5), ou des dépôts par méthode physique ou chimique pour obtenir une couche de phosphate de calcium (Ca-P) ou un mélange de Ca-P et d'oxyde de titane (6). Ces dépôts ont de plus l'avantage de créer une barrière contre l'éventuelle libération d'ions présents dans le substrat métallique, par exemple du vanadium (V), chrome (Cr), nickel (Ni), aluminium (Al), etc. ...

Vers la fin des années 80, *de Groot* (7) a revêtu des prothèses métalliques avec de l'hydroxyapatite (HA) en utilisant une torche à plasma. Ensuite, plusieurs techniques comme l'ablation laser, la pulvérisation cathodique, l'électrophorèse, le trempage (dip-coating), la tournette (spin-coating), la voie biomimétique, etc. ... ont été utilisées. Les trois dernières méthodes sont des procédés de chimie douce que nous avons utilisés dans cette thèse. Alors que dans les deux premières, le Ca-P est obtenu à partir de précurseurs, la méthode biomimétique est un procédé physico-chimique inspiré du



vivant. Le substrat métallique est trempé dans une solution qui simule le plasma sanguin, appelée Simulated Body Fluid ou SBF, pendant une période de temps suffisante pour former une couche de Ca-P (8–11).

C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux réalisés au cours de cette thèse. Notre démarche, schématisée dans la Figure 0.1, a été la suivante :

- modifier la surface de l'alliage Ti-6Al-4V par un traitement chimique en milieu alcalin (NaOH) et un traitement thermique afin de créer une couche de titanate de sodium liée au substrat métallique (8,9,12)

- déposer ensuite une couche de Ca-P semblable à celle composant l'os, soit par voie sol-gel (13–15), soit en utilisant la voie appelée « voie autocatalytique », proposée par Reis et al. (16,17) pour des implants en polymère. La première solution (voie sol-gel) a été la plus largement étudiée, tandis que la deuxième a été réalisée sur la fin de la thèse et les résultats présentés sont préliminaires.

Ces deux étapes de traitement ont été utilisées par le passé, mais jamais simultanément. L'originalité de la thèse est de les combiner et d'obtenir comme nous le montrerons, une couche de phosphate de calcium qui ne se délamine pas sous une contrainte mécanique.

Cette thèse est organisée en cinq chapitres.

Elle débute par une étude bibliographique permettant de comprendre la démarche de ce travail. Les propriétés structurales et physiques du titane et de ses alliages sont décrites. Ensuite, plusieurs méthodes de modification de surface et de dépôt permettant d'améliorer l'utilisation à long terme des implants métalliques *in vitro* et *in vivo* sont présentées. Et enfin, les procédés sol-gel et « autocatalytiques » permettant d'obtenir un revêtement de phosphate de calcium sur le substrat en alliage Ti-6Al-4V sont décrits.

Le deuxième chapitre présente les techniques expérimentales utilisées pour l'élaboration et la caractérisation des échantillons.

Le troisième chapitre montre comment nous obtenons une couche de titanate de sodium à la surface du substrat après polissage et traitements alcalin et thermique. La structure et la morphologie du titanate de sodium sont aussi décrites.

Les dépôts de Ca-P obtenus par voie sol-gel, soit par trempage (dip-coating), soit en utilisant une tournette (spin-coating) font l'objet du quatrième chapitre. Le phosphite de triéthyle ( $P(C_2H_5O)_3$ ) et le nitrate de calcium tétrahydraté ( $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ) sont utilisés comme précurseurs. Les comportements biologique et mécanique du Ca-P y sont présentés.

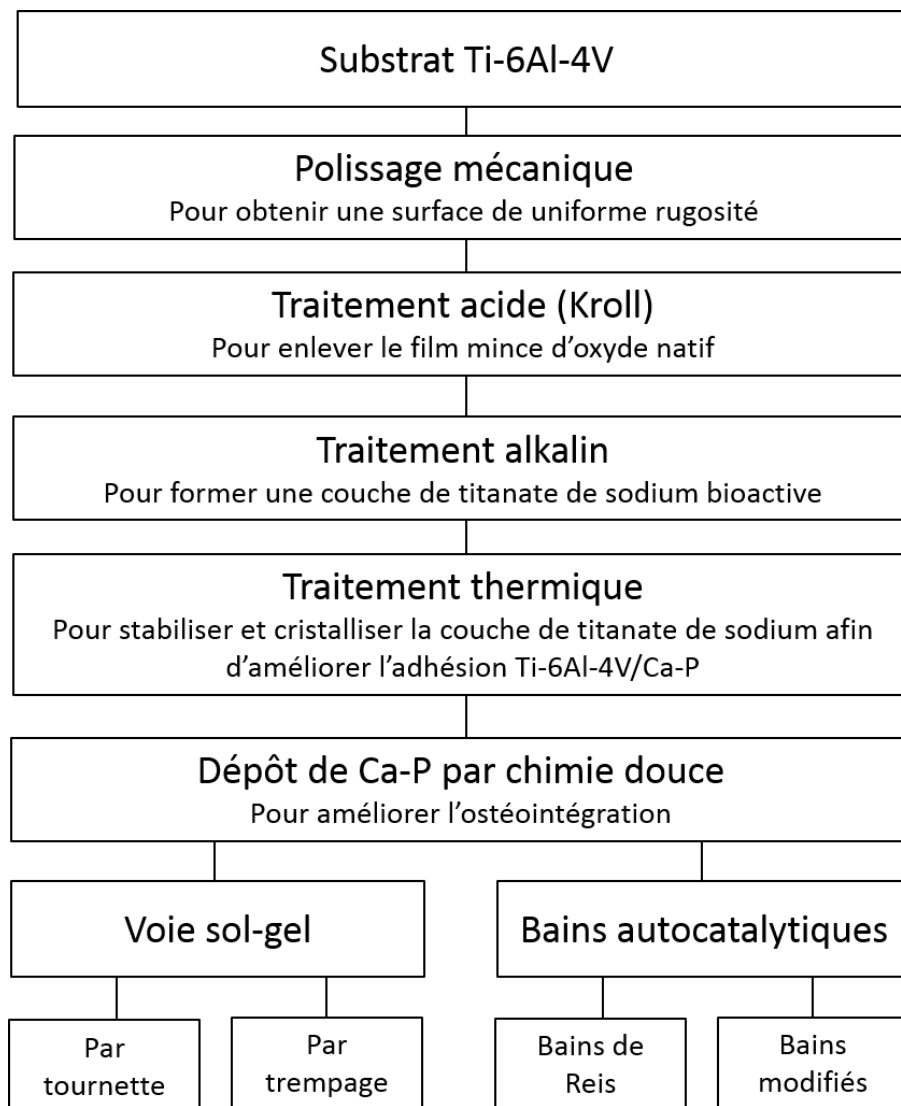


Figure 0.1. Schéma d'illustration du processus de dépôt de Ca-P sur Ti-6Al-4V

Le chapitre 5 décrit les résultats obtenus en utilisant la méthode appelée « autocatalytique » et proposée par Reis et al. (16,17). Trois bains différents ont été portés à une température comprise entre 60 et 80°C, un bain oxydant à pH 7, un bain acide à pH 5,3 ou un bain alcalin à pH 9,2. Ces trois bains contiennent du chlorure de palladium ( $\text{PdCl}_2$ ). Nous avons aussi utilisé du chlorure d'argent ( $\text{AgCl}$ ) à cause de ses propriétés antibactériennes (18). Nous avons pour la première fois aussi testé ces bains « autocatalytiques » pour le développement de surface bioactive sur des composants du sandwich 316L/Polypropylène-Polyéthylène (19).

Enfin, une conclusion générale reprend les discussions et les conclusions de ce travail.

## Introduction

Nowadays, prosthesis and implants are more and more developed due to the ageing of the population. They are used for body assistance to compensate the functions of the offended structures and/or to improve the quality of life of aged people, of injured seriously patients by accident, or the patients suffering from arthritis or deformations (1). They have to fulfil criteria according to the targeted function. Heart valves have to be bioinert, while hip prosthesis or dental implants have to be bioactive for a good biointegration. The material itself is called “biomaterial”. A biomaterial, as defined by the European Society of Biomaterials, is any matter, surface, or construct that interacts with biological systems, often used and/or adapted for a medical application, and thus comprises whole or part of a living structure or biomedical device which performs, augments, or replaces a natural function.

Biomaterials can be fabricated utilizing polymers, ceramics or metals (1–3). However, most of the implants are metallic in order to answer the requirements of mechanical characteristics and biocompatibility. Among metals, titanium and its alloys such as Ti-6Al-4V are widely used because they possess excellent properties compared with classic stainless steels or nickel-chromium and cobalt-chromium alloys: a lower elastic modulus, a better biocompatibility and corrosion resistance (2).

In addition, titanium and its alloys are bioinert *in vivo* and with a good corrosion resistance assigned to the thin titanium oxide layer on their surface. Nevertheless, once implanted, a non-mineral layer separates the titanium implant from the bone and the implant-bone bond occurs by a simple mechanical interlocking (4).

Therefore, a lot of works concerns titanium implants surface treatments in order to obtain a strong adhesion with the bone and to combine the mechanical properties of metal with the surface bioactivity. Several methods were developed, such as electrochemical treatment, to create a titanium oxide thin film (5), or by physical or chemical method to coat calcium phosphate (Ca-P) or a mixture of Ca-P and titanium oxide (6). These coatings create a barrier against a potential release of toxic ions from the metallic substrate (e.g. V, Cr, Ni, Al, etc.)

In the late 80's, de Groot (7) developed osteoconductive hydroxyapatite (HA) plasma spray coatings on metallic hip total replacements. Then, several techniques such as pulsed laser ablation, magnetron sputtering, electrophoresis, dip and spin coatings, biomimetic route, etc. were used. These last three methods are “chimie douce” processes used in this thesis. Ca-P is obtained from precursors by using dip and spin coating methods; while the biomimetic method is a physical-chemical process inspired by the physiological conditions. Indeed the substrate is dipped into a Simulated Body Fluid (SBF) solution for a period of time, long enough to form a Ca-P layer (8–11).

In this context this thesis was carried out on according to the approach schematized in Figure 0.2 and as follows:

- modify the Ti-6Al-4V alloy surface by a chemical treatment using a NaOH solution and followed by a heat treatment to create a sodium titanate layer bonded to the metallic substrate (8,9,12).

- coat a film of Ca-P similar to the bone composition by the sol-gel route (13–15), or by the so-called “autocatalytic” route proposed by Reis et al. to treat polymer implants (16,17). The sol-gel method is widely studied, whereas only preliminary results obtained with the autocatalytic one are presented. The scheme describing new applied methodologies to coat the Ca-P layer is presented in Figure 0.2.

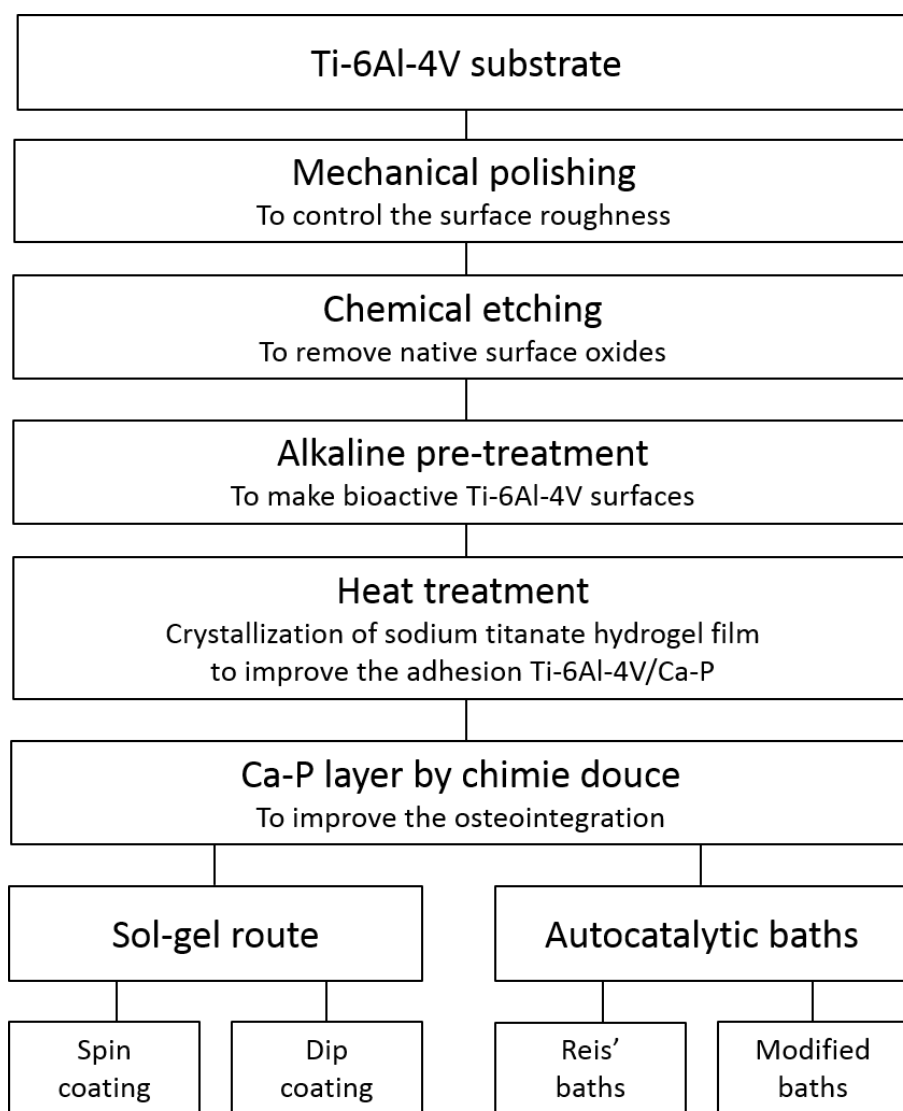


Figure 0.2. Scheme of Ca-P deposition process onto Ti-6Al-4V

These two stages of treatments were reported in many papers and used by other authors, but never simultaneously. The originality of the work is to combine these methods and to obtain a Ca-P layer which does not delaminate under mechanical load.

This thesis is organised in five chapters.

It begins with a bibliographical study allowing understanding our approach to develop a new methodology. The structural and physical properties of titanium and its alloys are described. Then, several methods of surface treatments and coating to enhance the long-term usage of metallic implant *in vitro* and *in vivo* are presented. And finally, the sol-gel and "autocatalytic" processes, allowing obtaining a Ca-P coating on Ti-6Al-4V alloy substrates, are described.

The second chapter presents the experimental methods used for sample elaboration and characterization.

The third chapter shows the experimental procedure to obtain a sodium titanate layer onto the substrate surface after mechanical polishing and alkaline-heat treatment. The structure and the morphology are also described.

Ca-P layers obtained by sol-gel route, by either dip or spin coatings are presented in the fourth chapter. The triethyl phosphite and the calcium nitrate tetra hydrate were used as precursors. The cell viability and the mechanical behaviour are also presented.

The chapter 5 describes results obtained by using the method called "autocatalytic" and proposed by Reis and al. (16,17). Three different baths were carried out and baths' temperatures were between 60 and 80°C, with a pH 5.3 for the acidic, 7 for the oxidant and 9.2 for the alkaline baths. The baths contain palladium chloride (PdCl<sub>2</sub>) and we also used silver chloride (AgCl) because of its antibacterial properties (18). We applied for the first time these "autocatalytic" baths for developing a bioactive surface on components of 316L / Polypropylene-Polyethylene sandwich structures (19).

Finally, a general conclusion resumes the discussions and the conclusions of this work.

## Références

1. Narayan R, editor. Biomedical Materials. 1st ed. USA: Springer; 2009. 590 p.
2. Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. *Biomaterials*. 1998;19(18):1621–39.
3. Katti KS. Biomaterials in total joint replacement. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2004 Dec 10;39(3):133–42.
4. Thomsen P, Larsson C, Ericson LE, Sennerby L, Lausmaa J, Kasemo B. Structure of the interface between rabbit cortical bone and implants of gold, zirconium and titanium. *J Mater Sci Mater Med*. 1997;8(11):653–65.
5. Yang B, Uchida M, Kim H-M, Zhang X, Kokubo T. Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment. *Biomaterials*. 2004 Mar;25(6):1003–10.
6. Xu W, Hu W, Li M, Wen C. Sol–gel derived hydroxyapatite/titania biocoatings on titanium substrate. *Mater Lett*. 2006 Jun;60(13-14):1575–8.
7. De Groot K, Geesink R, Klein CP a. T, Serekian P. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. *J Biomed Mater Res*. 1987;21(12):1375–81.

8. Wei M, Kim HM, Kokubo T, Evans JH. Optimising the bioactivity of alkaline-treated titanium alloy. *Mater Sci Eng C*. 2002;20(1):125–34.
9. Kim H-M, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Apatite-forming ability of alkali-treated Ti metal in body environment. *J Ceram Soc Jpn*. 1997 Sep 11;105(2):111–6.
10. Kokubo T. Formation of biologically active bone-like apatite on metals and polymers by a biomimetic process. *Thermochim Acta*. 1996 juillet;280–281(0):479–90.
11. Kokubo T, Kim H-M, Miyaji F, Takadama H, Miyazaki T. Ceramic–metal and ceramic–polymer composites prepared by a biomimetic process. *Compos Part Appl Sci Manuf*. 1999 Apr;30(4):405–9.
12. Nishiguchi S, Nakamura T, Kobayashi M, Kim HM, Miyaji F, Kokubo T. The effect of heat treatment on bone-bonding ability of alkali-treated titanium. *Biomaterials*. 1999 Mar;20(5):491–500.
13. Mavis B, Taş AC. Dip Coating of Calcium Hydroxyapatite on Ti-6Al-4V Substrates. *J Am Ceram Soc*. 2000;83(4):989–91.
14. Beganskienė A, Dudko O, Sirutkaitis R, Giraitis R. Water based sol-gel synthesis of hydroxyapatite. *Mater Sci MEDŽIAGOTYRA*. 2003;9:383–6.
15. Haddow DB, James PF, Van Noort R. Sol-gel derived calcium phosphate coatings for biomedical applications. *J Sol-Gel Sci Technol*. 1998;13(1):261–5.
16. Leonor IB, Reis RL. An innovative auto-catalytic deposition route to produce calcium–phosphate coatings on polymeric biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 2003;14(5):435–41.
17. Oliveira JM, Leonor IB, Reis RL. Preparation of bioactive coatings on the surface of bioinert polymers through an innovative auto-catalytic electroless route. *Key Eng Mater*. 2005;284:203–6.
18. Le VQ, Pourroy G, Cochis A, Rimondini L, Abdel-Fattah WI, Mohammed HI, et al. Alternative technique for calcium phosphate coating on titanium alloy implants. *Biomatter*. 2014 Mar 19;4(1):e28534.
19. Le VQ, Cochis A, Rimondini L, Pourroy G, Stanic V, Palkowski H, et al. Biomimetic calcium–phosphates produced by an auto-catalytic route on stainless steel 316L and bio-inert polyolefin. *RSC Adv*. 2013 Jun 24;3(28):11255–62.



**Chapitre 1.**  
**État de l'art**





# Chapitre 1.

## État de l'art

1.1. Le titane et l'alliage Ti-6Al-4V : généralités.....	10
1.2. Traitement de surface du titane .....	13
1.3. Les phases de phosphate de calcium .....	20
1.4. Méthodes de dépôt du phosphate de calcium .....	20
1.4.1. Voie sol-gel pour déposer du phosphate de calcium sur du titane .....	22
1.4.2. Dépôt de phosphate de calcium sur un polymère par voie « autocatalytique ».....	29
1.4.3. Dépôt de phosphate de calcium sur métal par la méthode « Reis modifiée ».....	31
1.4.4. Dépôt de phosphate de calcium par une méthode biomimétique .....	31
Conclusions .....	33
Références .....	33

Les biomatériaux sont principalement utilisés pour restaurer des fonctions physiologiques ou encore en vue d'améliorer la qualité de vie des personnes âgées, des patients gravement blessés lors d'accidents, ou souffrant d'arthrite, de malformation... (1). La Figure 1.1.1 illustre deux applications, des implants en titane pour remplacer les dents et une prothèse de hanche.

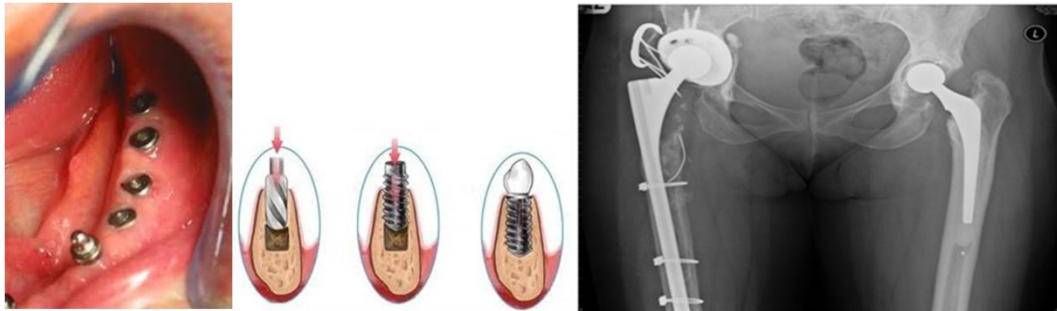


Figure 1.1.1. Schéma d'illustration des substituts osseux : implant dentaire (à gauche)<sup>1</sup>, et prothèse de hanche (à droite)<sup>2</sup>

Les matériaux utilisés sont classés en quatre groupes, les métaux et alliages métalliques, les polymères, les céramiques et les composites tels que les « métal-céramique », « polymère-céramique », etc. (2).

En orthopédie, quelques polymères comme le polyéthylène de masse molaire très élevée (UHMWPE) et le polypropylène (PP) sont présents, malgré leur mauvaise résistance à l'usure (3).

Les céramiques, comme le triphosphate de calcium (TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), l'hydroxyapatite (HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) ou les bio-verres du système  $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O}$  sont plus utilisées car elles présentent une excellente résistance à la compression, une bonne biocompatibilité et une bonne ostéointégration (3). Toutefois, à cause d'une faible résistance à la rupture, l'utilisation des matériaux céramiques dans les applications de prothèses de hanche est limitée. Aujourd'hui, ils sont surtout utilisés en couches minces sur la surface métallique des prothèses de hanche.

Les aciers inoxydables, les alliages cobalt-chrome (Co-Cr), le titane (Ti) ou les alliages de titane (Ti-6Al-4V) sont largement utilisés car ils ont de bonnes propriétés mécaniques en particulier une bonne résistance à la rupture, à la corrosion, et une bonne biocompatibilité (4). Néanmoins, pour améliorer l'ostéointégration, mais également pour empêcher les ions métalliques de diffuser dans le corps, la surface doit être modifiée, par exemple par un dépôt de phosphate de calcium (Ca-P) (5–9).

<sup>1</sup> <http://www.dents-beaute-sourire.com/implants-dentaires.php>

<sup>2</sup> [http://www.chirurgie-orthopedique-nice.com/reprise\\_prothese\\_hanche.html](http://www.chirurgie-orthopedique-nice.com/reprise_prothese_hanche.html)

Nous présentons dans ce chapitre, les caractéristiques structurales et les propriétés physiques générales du titane (Ti) et de ses alliages. Nous décrivons ensuite les travaux relatant les modifications de composition et de structure de la surface après des traitements alcalin et thermique. Nous décrivons enfin les différents composés de Ca-P et les méthodes de dépôt en couche mince, en particulier le dépôt par tournette (spin-coating) ou par trempage (dip-coating) d'une solution sol-gel, et le dépôt en bain aqueux appelé « auto-catalytique » par Reis et al. (10–12).

### 1.1. Le titane et l'alliage Ti-6Al-4V : généralités

Le titane présente deux types de structures : une structure hexagonale pseudo-compacte (hcp) appelée phase  $\alpha$ , dont les paramètres cristallins sont  $a = b = 0,295$  nm et  $c = 0,468$  nm ; et une structure cubique centrée (bcc) de paramètre cristallin  $a = b = c = 0,332$  nm appelée phase  $\beta$  (Figure 1.1.2) (13,14).

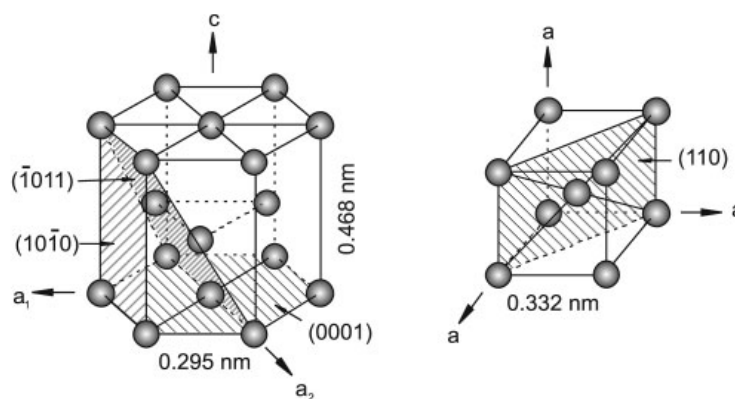


Figure 1.1.2. Schéma des mailles cristallographiques des phases  $\alpha$  (hcp) et  $\beta$  (bcc) (14)

La phase  $\alpha$  se transforme en phase  $\beta$  par chauffage au-dessus de  $882^\circ\text{C}$ . Cette transition est réversible. La température de transformation de  $\alpha$  en  $\beta$  est appelée la transition  $\beta$  ( $T_\beta$ ). Pour le titane,  $T_\beta$  est égale à  $882 \pm 2^\circ\text{C}$  (14,15). A cette température, les plans les plus denses  $\{0001\}$  de la phase  $\alpha$  se transforment dans les plans de base  $\{110\}$  de la phase  $\beta$  (13).

La température de transition,  $T_\beta$ , du Ti est sensiblement modifiée en présence d'impuretés. Les différentes qualités de titane sont répertoriées selon un grade de 1 à 4 (Tableau 1.1).  $T_\beta$  varie de  $890^\circ\text{C}$  pour le titane commercial de grade 1, à  $950^\circ\text{C}$  pour le Ti du grade 4. L'ajout d'aluminium (Al) et/ ou d'étain (Sn) stabilise la phase  $\alpha$  par une augmentation de la température  $T_\beta$ , alors que le vanadium (V) et molybdène (Mo) stabilisent la phase  $\beta$ , en diminuant  $T_\beta$ , ce qui conduit pour Ti-6Al-4V à un alliage biphasé  $\alpha$  et  $\beta$ . La température  $T_\beta$  est augmentée jusqu'à  $995^\circ\text{C}$  en ajoutant Al et V (13).

Tableau 1.1. Compositions chimiques des différents grades (Gr.) de Ti (ASTM, F67, 1992)

Éléments	Compositions chimiques (% en masse)			
	Ti Gr. 1	Ti Gr. 2	Ti Gr. 3	Ti Gr. 4
N	0,05	0,05	0,03	0,05
C	0,10	0,10	0,10	0,10
H	0,015	0,015	0,015	0,015
Fe	0,50	0,30	0,30	0,50
O	0,40	0,35	0,25	0,40
Ti	Balance	Balance	Balance	Balance

D'autres alliages de titane existent (Tableau 1.2):

- isomorphes de la phase  $\alpha$  comme Ti-5Al-2,5Sn, ou proche de  $\alpha$  comme Ti-8Al-1Mo-1V

- isomorphe de la phase  $\beta$  comme Ti-13V-11Cr-3Al, ou proche de  $\beta$  comme Ti-3Al-10V-2Fe (13,14).

L'alliage Ti-6Al-4V est un alliage de titane qui cristallise dans les deux phases  $\alpha$  (hcp) et  $\beta$  (bcc). La Figure 1.1.3 présente le diagramme de phase du système Ti-Al-V en fonction de la température. A la température ambiante, sa structure est majoritairement celle de la phase  $\alpha$  (hcp) avec un peu de phase  $\beta$  (bcc) (14).

Tableau 1.2. Alliages de titane utilisés dans les applications biomédicales (16)

Alliage	Micro structure	Alliage	Micro structure
Titane; Gr. 1, 2, 3, 4 (ASTM F67)	( $\alpha$ )	Ti- 13Nb- 13Zr	proche ( $\beta$ )
Ti-6Al-4V ELI (ASTM F136 et ASTM F620)	( $\alpha + \beta$ )	Ti- 12Mo- 6Zr - 2Fe	( $\beta$ )
Ti-6Al-4V (ASTM F1108)	( $\alpha + \beta$ )	Ti- 15Mo	( $\beta$ )
Ti-6Al-7Nb (ASTM F1295)	( $\alpha + \beta$ )	Ti- 16Nb- 10Hf	( $\beta$ )
Ti-5Al-2.5Fe (ISO:DIS 5832 - 10)	( $\alpha + \beta$ ) riche ( $\beta$ )	Ti- 15Mo- 5Zr - 3Al	( $\beta$ )
Ti-5Al-3Mo-4Zr	( $\alpha + \beta$ )	Ti- 15Mo- 3Nb	( $\beta$ )
Ti-15Sn-4Nb-2Ta-0.2Pd	( $\alpha + \beta$ )	Ti- 35.3Nb- 5.1Ta - 7.1Zr	( $\beta$ )
Ti-15Zr-4Nb-2Ta-0.2Pd	( $\alpha + \beta$ )	Ti- 29Nb- 13Ta - 4.6Zr	( $\beta$ )

L'alliage Ti-6Al-4V existe dans le grade ELI (extra-low interstitial). Celle-ci est plus pure que l'alliage Ti-6Al-4V commercial (Tableau 1.3). Ti-6Al-4V ELI contient au maximum 1300 ppm d'oxygène (O) alors que Ti-6Al-4V en contient 1500 à 2000 ppm (17). La diminution du taux d'oxygène a pour but d'améliorer la ductilité et la ténacité de l'alliage. De plus, la résistance à la compression de l'alliage ELI est aussi réduite. L'alliage Ti-6Al-4V ELI est le premier alliage de titane utilisé comme matériau d'implant dans le système de standard ASTM (18). Le Tableau 1.3 présente la composition en masse des deux grades de Ti-6Al-4V commercial et ELI (18).

Tableau 1.3. Composition des alliages Ti-6Al-4V (Gr. 5) et Ti-6Al-4V ELI (Gr. 23)

Alliage Ti-6Al-4V	Impureté limite (% en masse, max.)					Composition nominale (% en masse)	
	N	C	H	Fe	O	Al	V
(Gr. 5)	0,05	0,10	0,0125	0,30	0,20	6,0	4,0
ELI (Gr. 23)	0,05	0,08	0,0125	0,25	0,13	6,0	4,0

Les deux phases  $\alpha$ - et  $\beta$ - de l'alliage Ti-6Al-4V peuvent être observées en microscopie électronique à balayage (MEB) après un traitement de la surface par une solution acide HF-HNO<sub>3</sub>. En effet, Sittig et al. (19) et Lee et al. (20) ont observé une phase majoritaire riche en Al (phase  $\alpha$ ), et une phase minoritaire riche en V (phase  $\beta$ ) formant des ilots sur la surface (Figure 1.1.4).

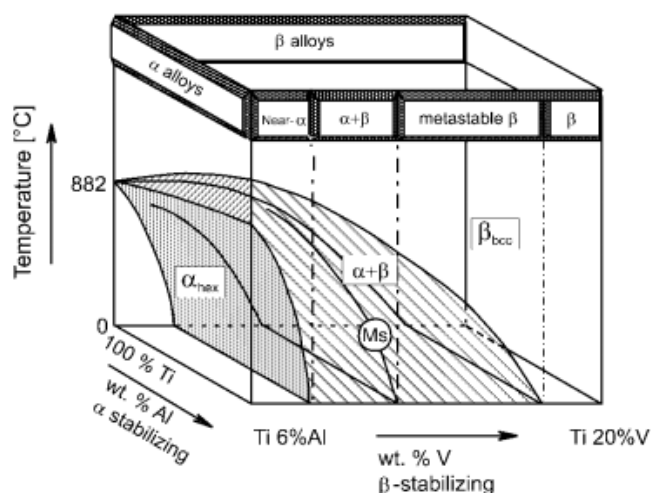


Figure 1.1.3. Diagramme de phase à trois dimensions présentant les domaines de stabilité des alliages de Ti contenant Al et V (15)

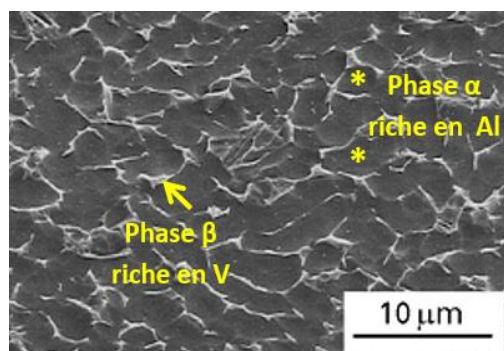


Figure 1.1.4. Observation au microscope électronique à balayage (MEB) de la surface de Ti-6Al-4V poli miroir avec une suspension de SiO<sub>2</sub> (0,06  $\mu$ m), et immergé ensuite dans la solution HF-HNO<sub>3</sub> pendant 10 min dans un bain d'ultrasons (19)

Dans le Tableau 1.4, nous présentons quelques caractéristiques mécaniques des titanes de structure  $\alpha$  (Ti $_{\alpha}$ ) ou  $\beta$  (Ti $_{\beta}$ ), ou présentant les deux structures. Nous observons que les caractéristiques du module élastique (E), de la limite d'élasticité (Yield Strength, YS) et de la résistance à la traction

(Tensile Strength, TS) du Ti-6Al-4V sont toujours plus élevées que celles du Ti commercial. Mais l'élongation (EI) de cet alliage est plus faible que celle du Ti commercial. Les alliages isomorphes de  $Ti_{\beta}$  ont le module élastique le plus bas.

Tableau 1.4. Quelques caractéristiques mécaniques pour divers alliages de titane (16)

Caractéristique	Ti commercial	Ti-6Al-4V	Ti-6Al-4V ELI	Ti-6Al-7Nb	Ti-15Mo	Ti-13Nb-13Zr
	( $\alpha$ )	( $\alpha + \beta$ )	( $\alpha + \beta$ )	( $\alpha + \beta$ )	( $\beta$ )	( $\beta$ )
Module élastique ou de Young, E [GPa]	102,7 (Gr. 1) 104,1 (Gr. 4)	110-114	101-110	114	78	79-84
Limite d'élasticité, YS [MPa]	170 (Gr. 1) 485 (Gr. 4)	825-869	795-875	880-950	544	836-908
Résistance à la traction, UTS [MPa]	240 (Gr. 1) 550 (Gr. 4)	895-930	860-965	900-1050	874	973-1037
Elongation, EI [%]	24 (Gr. 1) 15 (Gr. 4)	6-10	10-15	8,1-15	21	10-16

## 1.2. Traitement de surface du titane

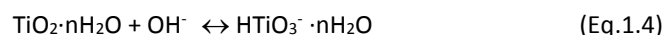
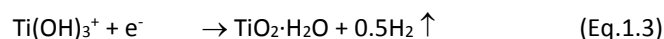
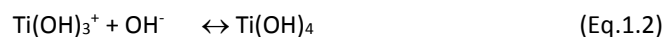
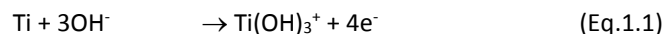
La surface des implants est généralement traitée pour améliorer la bioactivité, c'est-à-dire la capacité de l'implant à favoriser la croissance cellulaire. Un traitement mécanique est souvent utilisé pour modifier la topographie de la surface des implants (21,22). Par exemple, Anselme et al. (22) ont indiqué qu'une surface polie miroir de rugosité  $0,16 \mu\text{m}$  conduit à une prolifération cellulaire plus élevée qu'une surface de rugosité  $0,3 \mu\text{m}$ . La topographie de la surface des implants peut aussi être modifiée par un traitement acide (23). En pratique, celui-ci est souvent utilisé pour éliminer de l'oxyde et de la contamination sur la surface du substrat, afin d'obtenir une surface finie propre, uniforme et rugueuse (24,25).

Les méthodes chimiques et physiques sont utilisées pour former une couche bioactive d'oxyde de titane, de titanate de sodium ou de phosphate de calcium. Par exemple, une couche d'hydroxyapatite a été déposée sur la surface par voie sol-gel (26–28), par procédé électrochimique (microarc oxidized) (29) ou par voie physique comme la torche à plasma (plasma spray method) ou l'ablation laser (pulsed laser deposition) (30–32).

Les matériaux peuvent être traités en surface par une solution oxydante de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) puis chauffés à la température de 200 à 600°C (33), ou par un procédé électrochimique (34) pour former une couche d'oxyde de titane bioactive ( $\text{TiO}_2$ ) sur la surface des implants. Le traitement alcalin-thermique est une des méthodes les plus récentes pour traiter la surface des implants de titane afin d'obtenir une couche bioactive pouvant se lier directement à l'os. Un traitement alcalin utilisant la solution NaOH suivi d'un recuit à des températures de 400 à 800°C permet

une meilleure ostéointégration. Une couche de titanate de sodium ( $\text{Na}_x\text{Ti}_y\text{O}_z$ ) se forme sur la surface des implants de titane (35,36). Nishiguchi et al. (37,38) ont utilisé un traitement thermique à 600°C pour former la couche de titanate de sodium et ont montré que cette couche peut se lier directement à l'os du chien après une implantation de 4 semaines et du lapin après une implantation de 8 semaines.

Les réactions entre NaOH et le titane sont décrites par les équations suivantes :



La couche d'hydrogel de titanate de sodium est sous forme amorphe ou microcristalline (39,40). Elle favorise la croissance d'apatite en milieu de fluide corporel simulé (ou Simulated Body Fluid, SBF). En effet, Kim et al. (39) ont indiqué que, après un traitement dans des solutions de NaOH de concentration 5 ou 10 M à des températures de 40 à 60°C, pour des durées de 24 à 96 h, de l'apatite se forme sur la couche d'hydrogel de titanate de sodium après seulement 24 h dans le SBF. Toutefois, si les échantillons n'ont pas subi de traitement alcalin ou ont subi un traitement dans des solutions alcalines de concentration plus faible (pour des durées et des températures identiques), aucune croissance d'HA n'est observée dans une solution SBF (39).

Jonášová et al. (41) ont développé une surface bioactive sur du Ti par un traitement en deux étapes : 1) prétraitement de la surface de Ti par une solution HCl sous atmosphère inerte de  $\text{CO}_2$ ; et 2) traitement alcalin par une solution NaOH 10 M à 60°C pendant 24 h, suivi d'un séchage à 100°C. Le résultat a indiqué qu'une couche poreuse d'hydrogel de titanate de sodium est bien formée. La bioactivité de cette couche est vérifiée après immersion dans la solution SBF.

Wen et al. (25) ont utilisé un mélange de HCl et de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pour l'étape de prétraitement (étape 1), et une solution NaOH 0,2 M à 140°C pendant 5 h pour l'étape de traitement alcalin (étape 2). Une couche microporeuse d'hydrogel de titanate de sodium est aussi créée, mais la croissance d'apatite dans le SBF est plus rapide. Des échantillons en Ti-6Al-4V ont été traités par une solution NaOH de concentration de 0,001 à 0,01 M pour les échantillons poli miroir, de 0,2 à 0,4 M pour des échantillons non polis, et à la température de 140°C pendant 5 h sous une pression de 3 bar (42). La couche d'hydrogel de titanate de sodium présente une bioactivité dans la solution de Hank (HBSS, Hank's Buffered Salt Solution).

Cependant, les ions  $\text{Na}^+$  présents dans l'hydrogel de titanate de sodium peuvent être éliminés facilement par lavage. Jonášová et al. ont cherché à diminuer la concentration de sodium de la couche d'hydrogel de titanate de sodium par plusieurs nettoyages à l'eau distillée. Ils ont observé des vitesses de formation d'apatite semblables, pour des échantillons ayant des concentrations de sodium



différentes (43). Uchida et al. ont indiqué qu'un traitement supplémentaire par l'eau distillée à la température de 40 à 80°C pendant 24 à 48 h enlève les ions de sodium de la couche d'hydrogel de titanate (44). Pattanayak et al. ont nettoyé l'hydrogel de titanate de sodium par une solution d'HCl diluée (45). L'hydrogel de titanate de sodium ( $\text{Na}_x\text{H}_{2-x}\text{Ti}_3\text{O}_7$ ;  $0 < x < 2$ ) s'est alors transformé en  $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ .

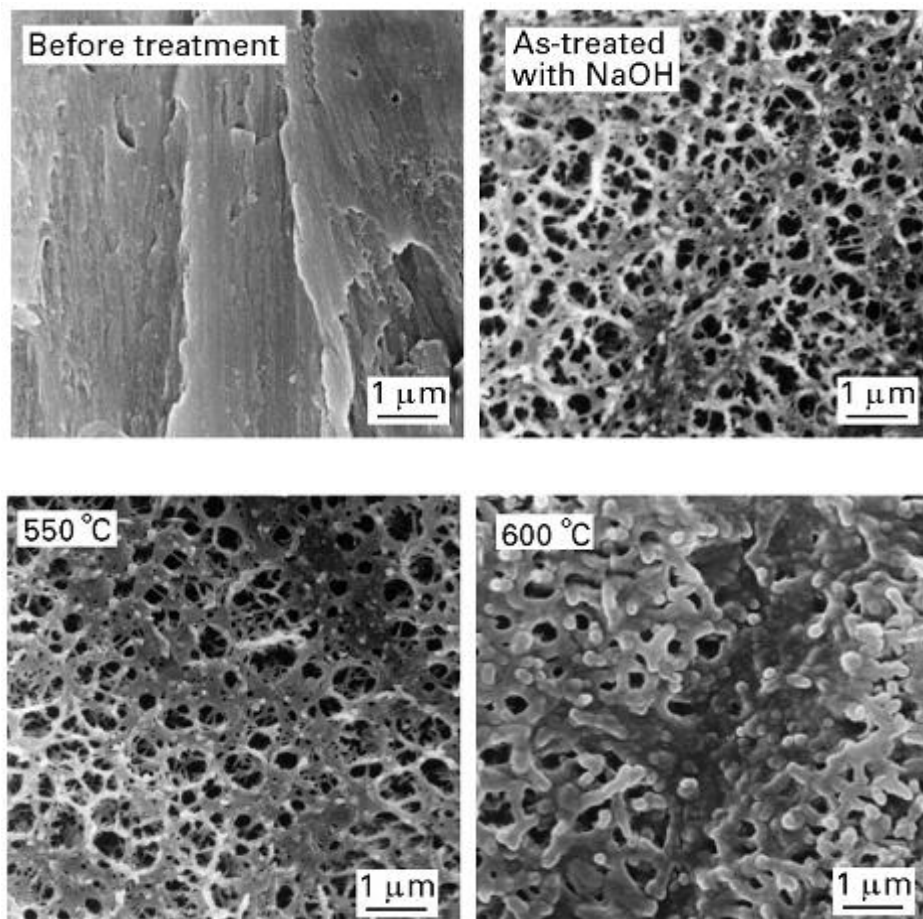


Figure 1.2.1. Morphologie du titanate de sodium obtenu sur titane par traitement NaOH 5 M à 60°C pendant 24 h, recuits à 550 et 600°C pendant 1 h. Après le traitement NaOH, un revêtement de titanate de sodium de porosité 10 à 100 nm est bien formé. Le réseau poreux se détériore à 600°C (40)

Un traitement thermique après le traitement alcalin permet la stabilisation de la couche de titanate de sodium et augmente l'adhésion au substrat. Kim et al. (40) ont traité le titane par une solution NaOH de concentration 5 M à 60°C pendant 24 h, et un recuit à des températures entre 400 et 800°C avec une montée de 5°C/min. Ils ont obtenu un titanate de sodium amorphe entre 400 et 500°C, peu cristallin à 600°C et du titanate de sodium cristallin ( $\text{Na}_2\text{Ti}_5\text{O}_{11}$ ) avec du rutile ( $\text{TiO}_2$ ) au-dessus de 700°C. La Figure 1.2.1 présente la morphologie de la surface du titane après un traitement alcalin, sans/et suivi d'un traitement thermique. Takadama et al. (46) ont utilisé l'analyse par Microscopie Electronique à Transmission équipé d'un spectromètre d'analyse dispersive en énergie (MET-EDS) pour étudier la formation du titanate de sodium et du rutile. Yamaguchi et al. (47) ont indiqué que l'hydrogel

de titanate de sodium de composition  $\text{Na}_x\text{H}_{2-x}\text{Ti}_3\text{O}_7$ , formé après un traitement alcalin dans une solution NaOH 5 M à 60°C pendant 24 h se transforme en  $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$ , anatase et rutile après un traitement thermique à 600°C pendant 1 h. Wei et al. (48) ont observé par Diffraction de Rayons X (DRX) la formation de  $\text{Na}_2\text{Ti}_5\text{O}_{11}$  sur la surface de Ti-6Al-4V après un traitement NaOH de 3 à 10 M entre 60 et 80°C pendant 1 à 7 jour(s).

Néanmoins, selon Ravelingiene et al. (49), lorsque la couche d'hydrogel de titanate de sodium est traitée thermiquement, la bioactivité du titanate de sodium diminue. La décomposition thermique est décrite par la réaction (Eq.1.5) suivante :



La croissance d'apatite dans la solution SBF sur ces échantillons est retardée par le traitement thermique. Dans le cas d'un échantillon non traité thermiquement, l'HA se forme après 24 h dans le SBF. Pour des échantillons de titane recuits entre 400 et 600°C, l'apatite se forme après 72 h dans le SBF. Avec un traitement thermique à 700°C et plus, il faut 7 jours dans le SBF pour observer cette croissance de l'apatite (40).

Wei et al. (48) ont utilisé différentes conditions, une concentration de NaOH de 3 à 15 M avec une température de 60 à 80°C pour une durée de 24 à 72 h et un traitement thermique de 500 à 700°C. La croissance de l'apatite est la plus rapide sur l'échantillon traité par la solution NaOH 5 M à 80°C pendant 72 h et le traitement thermique à 600°C, alors qu'aucune croissance d'apatite n'est observée après 72 h dans le SBF sur les échantillons ayant subi un traitement thermique à 700°C.

D'un autre côté, Kim et al. (36) ont mesuré la pénétration de l'oxygène et du sodium dans la couche de titanate de sodium sur des substrats immergés dans une solution NaOH 5 M à 60°C pendant 24 h, et soumis à un traitement thermique de 400 à 800°C pendant 1 h avec une montée de 5°C/min (Figure 1.2.2). La profondeur de pénétration de l'oxygène et du sodium est environ de 1  $\mu\text{m}$  pour l'échantillon de traitement NaOH, et plus de 1,5  $\mu\text{m}$  pour l'échantillon de traitement NaOH suivi d'un traitement thermique à partir de 600°C. Le titanate de sodium sous forme  $\text{Na}_2\text{Ti}_5\text{O}_{11}$  et rutile sont aussi observés par DRX.

Pour étudier l'adhésion de la couche de titanate de sodium, Wei et al. (48) ont utilisé un ruban adhésif et montré que l'échantillon traité à 600°C est plus résistant au décollement que celui ayant subi un traitement à 500°C. De plus, Krupa et al. (50) ont montré que la résistance à la corrosion est plus élevée après un traitement thermique à 700°C.

Yan et al. (51) ont fabriqué des implants en deux étapes : 1) les implants ont tout d'abord été traités dans une solution NaOH 10 M à 60°C pendant 24 h et recuits à 600°C ; ensuite ils ont été immergés dans une solution SBF pendant 4 semaines pour obtenir une couche d'apatite à la surface avant de les implanter dans des tibias de lapin. Une augmentation significative de la couche d'apatite a été observée.

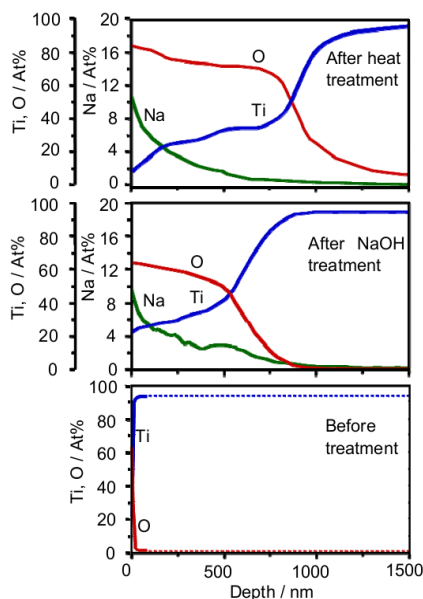


Figure 1.2.2. Profil de concentration de Ti, O et Na en fonction de la profondeur (36)

Le lien implant-os a été évalué *in-vivo*. Des implants de titane, de Ti-6Al-4V et d'autres alliages de titane ont été insérés dans les fémurs canins. Nishiguchi et al. (38) ont indiqué que les échantillons qui ont subi le traitement NaOH à la concentration de 5 M pour le titane et 10 M pour l'alliage, à 60°C pendant 24 h, suivi par un traitement thermique à 600°C se lient directement, plus vite et plus fortement à l'os sans l'intervention de tissu fibreux, ce qui n'est pas le cas des implants n'ayant pas subi de traitement alcalin-thermique.

Ils ont aussi montré que les échantillons ayant subi un traitement alcalin sans traitement thermique ne se lient pas à l'os à cause de la surface réactive instable (37).

Dans le Tableau 1.5, nous avons récapitulé les études récentes sur le traitement alcalin-thermique des implants de titane. Dans la plupart des travaux, un traitement alcalin dans une solution NaOH à la concentration de 5 ou 10 M, chauffée 60°C a été utilisé sur des substrats de titane ou de Ti-6Al-4V. Ces substrats peuvent être polis au papier abrasif de grade de rugosité #400 ou non polis. Les échantillons sont en général traités thermiquement à 600°C pendant 1 h.

Tableau 1.5. Application du traitement alcalin-thermique au développement de la surface bioactive du Ti et du Ti-6Al-4V  
(TT=traitement thermique)

Citation	Substrat	Méthodes de traitement				Résultats principaux
		Polissage (1)	Trait. acide (2)	Trait. alcalin (3)	Trait. thermique (4)	
Kim et al., (36)	Ti	Papier abrasif #400	Non	5 M NaOH, 60°C, 24 h	600 / 800°C, 1 h, 5°C/min	Couche poreuse de titanate de sodium pour l'échantillon sans TT ; couche dense pour les échantillons de TT à 600/800°C L'épaisseur de la couche de titanate de sodium est environ 1 à 1,5 µm et proportionnellement à la température de TT
Nishiguchi et al., (37)	Ti	Papier abrasif #400	Non	5 M NaOH, 60°C, 24 h	600°C, 1 h, 5°C/min	Plaques implantées dans les tibias des lapins mâles adultes ; après le traitement alcalin et le TT, le Ti se lie directement à l'os Traitements essentiels pour la capacité de liaison osseuse
Kim et al., (40)	Ti	Papier abrasif #400	Non	5 M NaOH, 60°C, 24 h	400 à 800°C, 1 h, 5°C/min	Pas de fissure dans la couche de titanate de sodium (MEB) ; couche poreuse de titanate de sodium pour les TT ≤ 550°C; couche dense pour les TT > 600°C (au MEB) Présence de rutil, Na <sub>2</sub> Ti <sub>5</sub> O <sub>11</sub> pour les TT > 400°C (DRX) Croissance de Ca-P dans SBF pour les TT ≤ 600°C pendant 3 jours ; pour les TT > 600°C pendant 7 jours (SBF)
Wen et al., (25)	Ti	Coupé d'une grande plaque, non polis	(100 mL HCl 18% +100 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 48 %), 30 min	0,2 M NaOH, 140°C, 5 h	Non	Couche poreuse de titanate de sodium Surfaces des échantillons ayant subi un traitement acide, suivi d'un traitement alcalin plus bioactives que celles traitées soit en milieu acide, soit en milieu alcalin
Yan et al., (51)	Ti	Papier abrasif #400	Non	10 M NaOH, 60°C, 24 h	600°C, 1 h, 5°C/min	Plaques en Ti implantées en bilatéral dans les tibias des lapins mâles adultes
Wen et al., (52)	Ti	Coupé d'une grande plaque	2 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> en masse dans dimethyl- formamide (DMF), à 150°C	0,1 N NaOH, 140°C, 5 h	Non	Croissance de Ca-P dans la solution sursaturée de calcification (SCS) à 37°C
Jonásova et al., (41)	Ti	-	Non ou HCl	10 M NaOH, 60°C, 24 h	100°C	Croissance de Ca-P dans SBF pendant 5 jours

Citation	Substrat	Méthodes de traitement				Résultats principaux
		Polissage (1)	Trait. acide (2)	Trait. alcalin (3)	Trait. thermique (4)	
Fukuda et al., (53)	Ti	Papier abrasif #400		1/ 5 M NaOH, 60°C, 24 h et puis solution CaCl <sub>2</sub> 100 mM, 40°C, 24 h	600/ 700°C, 1 h, 5°C/min	Couche poreuse de titanate de calcium (le sodium est remplacé complètement par le calcium) après TT à 600/700°C ; croissance de Ca-P dans SBF après 1 jour Tous les Ti traités se lient directement à l'os dans les tibias des lapins mâles adultes après 4 semaines sauf le Ti sans traitement alcalin-thermique
Nishiguchi et al., (38)	Ti et Ti-6Al-4V	Papier abrasif #400	Non	NaOH 60°C, 24 h, 5 M pour Ti et 10 M pour Ti6Al4V	600°C, 1 h, 5°C/min	Les implants sont implantés dans un fémur canin
Kim et al., (54)	Ti et Ti-6Al-4V	Papier abrasif #400	Non	10 M NaOH, 60°C, 24 h	600°C, 1 h, 5°C/min	Traitement alcalin-thermique améliore la capacité de liaison osseuse du Ti et de l'alliage de titane
Adawy et al., (55)	Ti-6Al-4V	Papier abrasif #1000	Non	5 M KOH, 60°C, 24 h	600°C, 1 h, 3°C/min, Et puis solution NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ou solution Ca(OH) <sub>2</sub> super-saturée	Dans 1,5 SBF: HA uniforme est déposé sur les échantillons traités dans la Ca(OH) <sub>2</sub> surpersaturée, mais HA non uniforme sur les échantillons traités dans NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Perez Teixeira et al., (56)	Ti-6Al-4V	Papier abrasif #1000	Non	5 M NaOH, 60°C, 24 h ou 20 M NaOH, 90°C, 30 min	600°C, 3 h, 5°C/min	Croissance de Ca-P dans 1,5 SBF après 3 jours
Wei et al., (48)	Ti-6Al-4V	papier abrasif #400	Non	3 à 15 M NaOH, 1 à 7 jour(s), 60-80°C	500 à 700°C, 1 h, 5°C/min	Ti-6Al-4V traité en NaOH 5 M 72 h, 80°C suivi d'un TT à 600°C, 1 h «est le plus bioactif» dans SBF
Wen et al., [10]	Ti-6Al-4V	Pâte diamantée 6 µm	Non	0,001 à 0.4 N NaOH, 140°C, 5 h, 3 bar	Non	Croissance de Ca-P dans la solution sursaturée de calcification (SCS) à 37°C

### 1.3. Les phases de phosphate de calcium

Le terme « phosphates de calcium » est un terme générique regroupant les composés des cations  $\text{Ca}^{2+}$ , et des anions  $\text{PO}_4^{3-}$  (ortho-),  $\text{PO}_3^-$  (meta-),  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$  (pyro-) ou  $(\text{PO}_3)_n^{n-}$  (poly-), en présence ou non du groupe  $\text{OH}^-$ . Nous présentons dans le Tableau 1.6 les composés d'orthophosphate de calcium qui se forment dans le système  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$  ou  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-H}_2\text{O}$  (58). Du pyrophosphate de calcium ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) peut se former à partir de la transformation de la brushite ( $\text{CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ou du  $\text{CaHPO}_4$  par un traitement thermique à une température inférieure à  $800^\circ\text{C}$  (59) ou par la voie sol-gel (60). Cette phase est l'un des produits de Ca-P intermédiaire dans le processus de bio-minéralisation de l'os (59). La phase  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  est aussi formée dans les biomatériaux vitrocéramiques pour améliorer l'usinabilité (61). Une bibliographie complète sur les Ca-P est disponible dans la référence (58).

Tableau 1.6. Composés d'orthophosphate de calcium et leurs propriétés (58)

Ca/P	Composé	Formule chimique	Solubilité à $25^\circ\text{C}$ , (g/L)	Stable au pH
0,5	Phosphate monocalcique hydraté (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$	$\approx 18$	0,0 à 2,0
0,5	Phosphate monocalcique anhydre (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$\approx 17$	[a]
1,0	Phosphate bicalcique hydraté (DCPD, brushite)	$\text{CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\approx 0,088$	2,0 à 6,0
1,0	Phosphate dicalcique anhydre (DCPA)	$\text{CaHPO}_4$	$\approx 0,048$	[a]
1,33	Octaphosphate de calcium (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$\approx 0,0081$	5,5 à 7,0
1,5	Phosphate tricalcique- $\alpha$ ( $\alpha$ -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\approx 0,0025$	[b]
1,5	Phosphate tricalcique- $\beta$ ( $\beta$ -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\approx 0,0005$	[b]
1,2 à 2,2	Phosphate de calcium amorphe (ACP)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z\cdot n\text{H}_2\text{O}$ $n = 3 \text{ à } 4,5;$		$\approx 5 \text{ à } 12$ [c]
1,5 à 1,67	Hydroxyapatite de calcium-déficient (CDHA) [d]	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ( $0 < x < 1$ )	$\approx 0,0094$	6,5 à 9,5
1,67	Hydroxyapatite (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	$\approx 0,0003$	9,5 à 12
1,67	Fluorapatite (FA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	$\approx 0,0002$	7 à 12
2,0	Phosphate tétracalcique (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	$\approx 0,0007$	[b]

<sup>a</sup> le composé est stable à une température supérieure à  $100^\circ\text{C}$ .

<sup>b</sup> les composés ne peuvent pas se former par précipitation dans une solution aqueuse.

<sup>c</sup> le composé est métastable.

<sup>d</sup> le composé peut être nommé «hydroxyapatite précipitée (precipitated HA)».

### 1.4. Méthodes de dépôt du phosphate de calcium

Parmi les méthodes de modification de la surface des implants de titane, le dépôt de Ca-P, en particulier d'HA, permet de développer une surface bioactive et biocompatible, de composition

chimique proche de celle de l'os. Le Tableau 1.7 présente les méthodes qu'on peut utiliser pour le dépôt de Ca-P sur les implants (62).

Tableau 1.7. Techniques de dépôt de phosphate de calcium

Technique	Épaisseur ( $\mu\text{m}$ )	Avantages	Désavantages
Torche à plasma	30 à 200	Vitesse de dépôt élevée ; bas coût	Décomposition de Ca-P à cause de la haute température ; Production d'un dépôt amorphe par refroidissement rapide
Pulvérisation cathodique	0,5 à 3	Épaisseur uniforme ; couche dense	Coût élevé; durée de dépôt élevée ; couche amorphe
Ablation laser pulsé	0,05 à 5	Couche en phase cristalline et amorphe ; couche dense et poreuse	Haute température
Dépôt par trempage	50 à 500	Économique ; procédé rapide ; application pour les substrats de forme complexe	Haute température ; coefficient d'expansion thermique différent entre la couche et le substrat
Dépôt par voie sol-gel	< 1	Application pour les substrats de forme complexe ; température basse; capacité à former une couche très mince	Nécessité d'un traitement thermique dans un environnement spécial : argon, azote, ou air
Dépôt par électrophorèse	100 à 2000	Couche uniforme ; dépôt rapide ; application pour les substrats de forme complexe	Haute température
Dépôt par biomimétisme (SBF)	< 30	Température basse ; possibilité de former de l'HA ; application pour les substrats de forme complexe	Dépôt lent ; nécessité d'un pH constant du SBF
Pression isostatique à chaud	0,2 à 2,0	Couche dense	Non applicable aux substrats complexes ; coefficient d'expansion thermique différent ; coût élevé
Dépôt par électrochimie	50 à 500	Couche uniforme ; application pour les substrats de forme complexe ; dépôt rapide ; faible coût	Pas très bonne adhérence
Méthode autocatalytique	Publiée dans la littérature pour les polymères. C'est une méthode utilisée pour les implants de titane par notre groupe de recherche		

Dans les paragraphes suivants, nous présentons plus en détail la voie sol-gel et la méthode «autocatalytique» que nous utiliserons dans cette thèse pour le dépôt de Ca-P sur les substrats de Ti-6Al-4V.

### 1.4.1. Voie sol-gel pour déposer du phosphate de calcium sur du titane

La méthode «Sol-gel» est une méthode permettant de produire des matériaux amorphes ou cristallins à partir d'un état liquide à température ambiante. Cette méthode est connue depuis le début du 19<sup>ème</sup> siècle pour fabriquer des matériaux céramiques et des matériaux en verre (63).

En principe, le processus sol-gel implique la transition d'un système à l'état liquide «sol» (pour la plupart un colloïde) à la phase solide «gel» (63,64). Le schéma du procédé sol-gel est présenté dans la Figure 1.4.1 pour la fabrication de couches de Ca-P.

En règle générale, la solution sol-gel est fabriquée par une dissolution des composés métallo-organiques dans une solution d'alcool. Ces composés sont des alcoxydes de métal  $M(OR)_n$  où M représente les éléments métalliques comme Si, Ti, etc. et R est une chaîne hydrocarbonée ( $CH_3^+$ ,  $C_2H_5^+$ ,  $C_nH_{2n+1}^+$ , etc.). Une petite quantité d'eau est ajoutée à la solution sol-gel pour réaliser les réactions d'hydrolyse des composés métallo-organiques et les réactions de condensation (63,65).

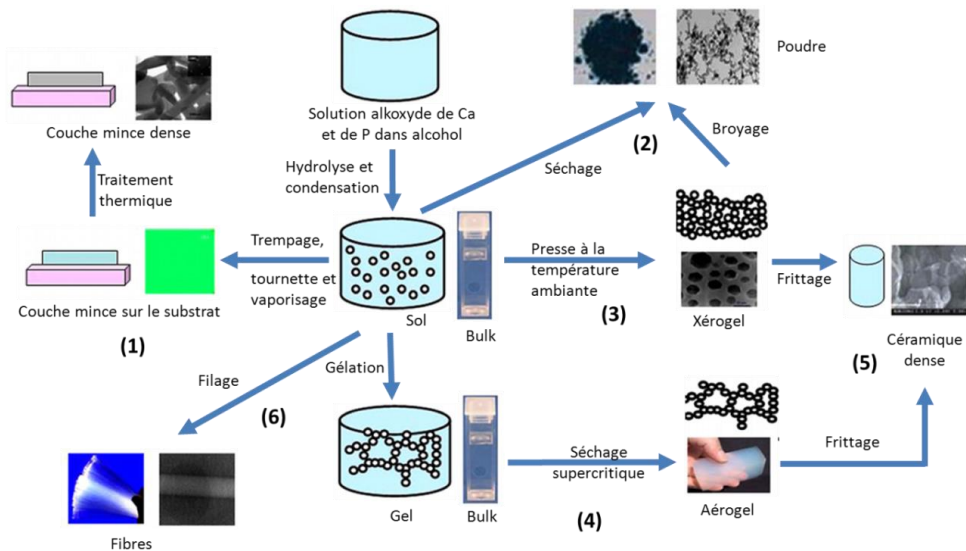
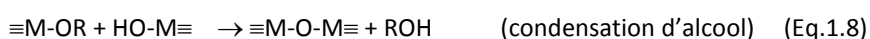


Figure 1.4.1. Schéma des processus sol-gel et ses divers produits (63)

Les réactions d'hydrolyse peuvent être réalisées en milieu acide, alcalin ou neutre, en présence d'eau ou d'alcool (63,65).



Actuellement, la voie sol-gel est largement utilisée pour synthétiser l'HA. La réaction est facilitée par les structures cristallines identiques entre  $[PO_4]^{3-}$  et  $[MO_4]^{4-}$ .



Dans cette thèse, nous avons utilisé la voie sol-gel pour déposer une couche mince de Ca-P sur la couche de titanate de sodium à la surface du substrat Ti-6Al-4V. Nous avons également étudié la formation d'HA en poudre par un séchage et un traitement thermique de la solution sol-gel (flèches 1 et 2 de la Figure 1.4.1).

#### a) Formation d'une couche mince sur le substrat par voie sol-gel

Pour déposer une solution sol-gel sur la surface des implants et former ainsi une couche de Ca-P, nous pouvons procéder de deux manières : par trempage (dip-coating) ou par tournette (spin-coating). La Figure 1.4.2 présente le schéma d'illustration des deux techniques de dépôt par le procédé sol-gel sur le substrat.

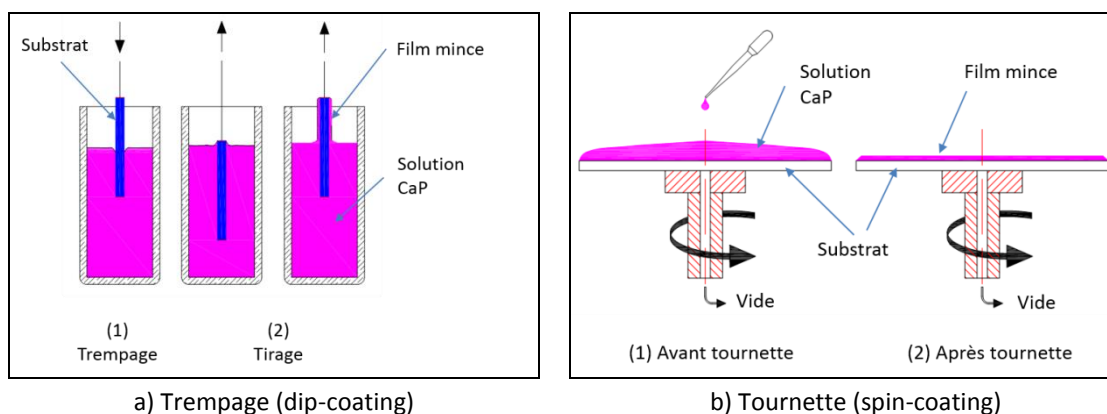


Figure 1.4.2. Schéma des deux techniques de dépôt d'une couche mince sur un substrat à partir d'une solution sol-gel

Dans la technique de trempage, le substrat est immergé dans la solution sol-gel et retiré verticalement de cette solution à une vitesse constante (66). Le liquide sol-gel est concentré sur la surface du substrat par le drainage de la gravitation avec l'évaporation et les réactions de condensation (65). Donc, l'épaisseur de la couche est dépendante de : 1) la traînée visqueuse vers le haut du liquide sol-gel en raison de déplacement du substrat, 2) la force de gravité du liquide, 3) la force résultant de la tension superficielle dans la forme de ménisque concave, 4) la force inertielle à la frontière substrat-liquide, 5) le gradient de tension superficielle et 6) la pression de disjonction (67).

Landau et Levich ont proposé une équation pour calculer l'épaisseur de la couche mince (H) en fonction de la vitesse du retrait de l'échantillon et des caractéristiques du liquide sol-gel comme la viscosité et la densité (65) :

$$H_{\text{dip}} = 0,94(\eta U_0)^{2/3} / \gamma_{\text{LV}}^{1/6} (\rho g)^{1/2} \quad (\text{Eq.1.9})$$

où :  $\eta$  est la viscosité du liquide,  $U_0$  la vitesse de retrait,  $\gamma_{\text{LV}}$  le rapport de la traînée visqueuse sur la tension superficielle liquide-air,  $\rho$  la densité du liquide,  $g$  est égal à  $9,81 \text{ m/s}^2$ . Ainsi, l'épaisseur de la couche dans un système varie en fonction de la vitesse de retrait du substrat.

En ce qui concerne la tournette, le dépôt se forme en quatre étapes : 1) le dépôt de la solution sol-gel sur la surface du substrat par la force centrifuge. Suite à cette opération, une mince couche d'épaisseur initiale  $H_0$  est obtenue; 2) la rotation à haute vitesse, le substrat tourne à une vitesse croissante jusqu'à atteindre la vitesse maximale ; 3) la rotation à vitesse constante et 4) l'évaporation du solvant (68,69).

Avec cette technique, l'épaisseur de la couche est décrite par l'équation suivante (68,69):

$$H_{\text{spin}}(t) = H_0 / (1 + 4\rho\omega^2 H_0^2 t / 3\eta)^{1/2} \quad (\text{Eq.1.10})$$

où :  $H_0$  est l'épaisseur initiale,  $t$  est la durée de la tournette,  $\omega$  est la vitesse angulaire,  $\rho$  et  $\eta$  sont respectivement la densité et la viscosité du liquide.

Dans le cas de la tournette, l'épaisseur de la couche sol-gel est fonction de la vitesse de rotation de la tournette. De plus, dans plusieurs applications, le dépôt est contrôlé par un processus des variables couplées (coupled process variables) (68).

Un des avantages de la technique de la tournette est d'obtenir une couche uniforme. Et si le dépôt n'est pas complet, le processus peut être répété plusieurs fois. De plus, l'opération est rapide et peu coûteuse (68).

### ***b) Produits et préparation de la solution sol-gel de phosphate de calcium***

La solution sol-gel de Ca-P (hydroxyapatite) est un mélange de deux solutions: 1) une solution de calcium contenant des ions de calcium dans l'alcool, et 2) une solution de phosphate fabriquée à partir des composés de phosphore dans l'alcool avec une petite quantité d'eau jouant le rôle d'agent de la réaction d'hydrolyse. De plus, le rapport molaire Ca/P dans la solution sol-gel est toujours approximativement égal à 1,67 (70–72).

Précédemment, deux produits chimiques ont été utilisés comme précurseurs dans la préparation de la solution sol-gel ; ce sont le phosphate ester  $\text{PO}(\text{OR})_3$  et l'acide phosphorique  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Toutefois, leur applicabilité est limitée car, pour le phosphate ester, l'hydrolyse est très lente et pour l'acide phosphorique, une précipitation se produit au lieu de la gélification (73).

Actuellement, plusieurs précurseurs ont été utilisés pour la préparation de la solution sol-gel. Weng et Baptista (74) ont utilisé l'acétate de calcium  $((\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca})$  pour fabriquer la solution de calcium dans l'éthylène glycol et le pentoxyde de phosphore ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) pour préparer la solution de phosphate dans le n-butanol. Toutefois, la solution sol-gel mixte obtenue de cette manière n'est pas stable et il faut utiliser le nitrate d'ammonium pour la stabiliser. Au final, une solution contenant du  $\beta$ -Ca-P, du carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) et de l'oxyde de calcium ( $\text{CaO}$ ) est obtenue. Dans d'autres travaux, Weng et Baptista ont utilisé une solution de glycoxyde de calcium ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2\text{Ca}$ ) dans l'éthylène glycol ( $\text{C}_2\text{H}_4(\text{OH})_2$ ) et une solution de  $\text{P}_2\text{O}_5$  dans l'éthanol pour fabriquer une solution sol-gel mixte. Dans ce cas, de l'acétate de calcium est ajouté pour éviter la précipitation du liquide sol-gel (75). Les résultats

ont montré qu'une poudre plus homogène d'hydroxyapatite est obtenue après un traitement thermique à 500°C.

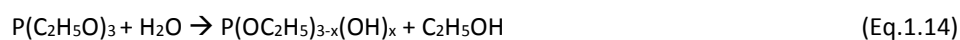
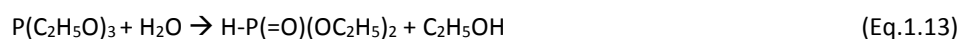
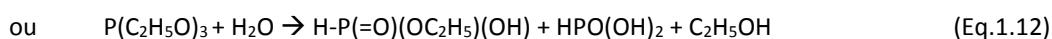
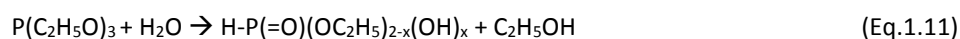
En ce qui concerne la préparation des solutions de calcium et de phosphate, le CaO ou l'hydroxyde de calcium ((Ca(OH)<sub>2</sub>) dans l'éthanol (76,77) et l'acide phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) dans l'éthanol (78) ou dans le méthanol (79,80) ou le sel de phosphate de diammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dans le méthylcellulose (81) sont étudiés. De plus, quelques composés de phosphore comme POCl<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-PCl<sub>2</sub> (73,82) sont aussi utilisés pour synthétiser la solution sol-gel.

Parmi les précurseurs de phosphore, le phosphate ester (PO(OR)<sub>3</sub>), le pentoxyde de phosphore et l'acide phosphorique sont moins utilisés car le phosphate ester (PO(OR)<sub>3</sub>) et le pentoxyde de phosphore sont difficilement hydrolysés, tandis que la réaction de formation d'HA est trop rapide, et un précipité se forme.

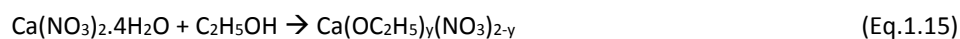
La solution sol-gel peut aussi être fabriquée à partir de l'HA commercial dans l'éthanol (83–85). Toutefois, ces dernières années, le nitrate de calcium (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O) dans l'éthanol et le phosphite de triéthyle dans l'éthanol sont les plus largement utilisés (8,28,60,86–91). Le phosphite de triéthyle est hydrolysé très rapidement (73,92) et le nitrate de calcium est facilement dissous dans l'alcool (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH).

Dans le cas de la formation de la solution sol-gel d'HA à partir du phosphite de triéthyle et du nitrate de calcium, Liu et al. (60,90,93) ont proposé le processus suivant pour les étapes d'hydrolyse et de condensation:

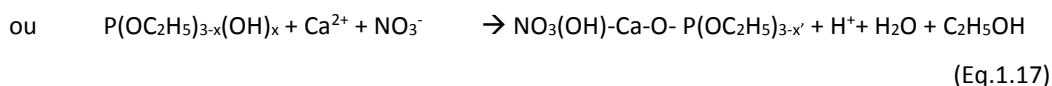
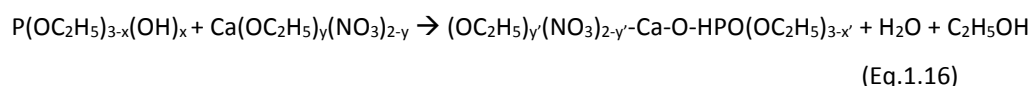
Au cours de la réaction d'hydrolyse du phosphite de triéthyle, le groupe alkyle (C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>O) est remplacé par le groupe d'hydroxyle (OH) :

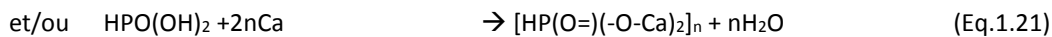
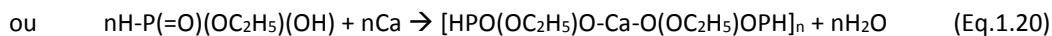
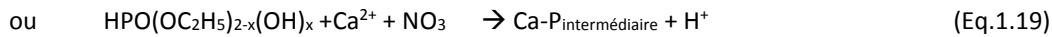
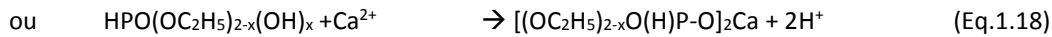


La réaction de dissolution de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O dans l'éthanol se réalise selon la réaction :



Dans le mélange contenant la solution de calcium et la solution de phosphate, les réactions de condensation de Ca-P peuvent être les suivantes :





Le séchage et/ou le traitement thermique augmente la polymérisation/condensation. Les liaisons/réseaux de (-Ca-O-P-) se forment (73,94).

Un autre paramètre est le temps de vieillissement du liquide sol-gel entre le moment de mélange des deux solutions de phosphate et de calcium et le moment d'application de cette solution sol-gel sur la couche mince. En principe, le vieillissement augmente l'homogénéité du mélange. Le temps de vieillissement est de quelques h à quelques jours, selon la température. En théorie, plus la température est élevée, plus le temps de vieillissement est court (95). Liu et al. (60,96) ont indiqué que, selon les conditions de conservation de la solution sol-gel, des phases comme CaO, Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub> peuvent être présentes en majorité dans le matériau final. La Figure 1.4.3 illustre l'influence du temps et de la température sur les phases observées après un procédé sol-gel.

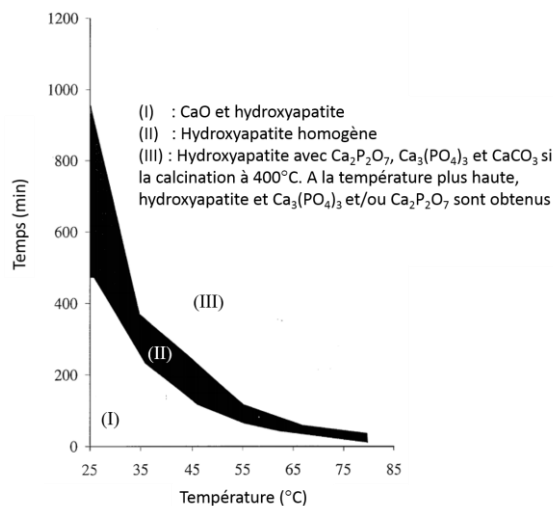


Figure 1.4.3. Influence du temps de conservation sur les impuretés observées dans l'HA (60)

La Figure 1.4.3 nous montre que, à la température ambiante, le temps de conservation de la solution sol-gel pour obtenir le produit d'HA homogène est de 8 à 16 h. Toutefois, plusieurs travaux ont montré que la solution sol-gel doit être conservée pendant au moins 24 h et jusqu'à quelques jours.

Par exemple, en utilisant les mêmes produits de départ Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O et P(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)<sub>3</sub> pour la synthèse de la solution sol-gel, Cameron et al. (97) ont indiqué que le temps de conservation de la solution sol-gel doit être d'au moins 24 h à la température ambiante pour obtenir une couche mince d'hydroxyapatite monophasique. Avec une durée plus courte, l'HA est polluée par l'oxyde de calcium (CaO). Cependant, Wen et al. (86) ont indiqué que le temps de conservation pour obtenir une solution

sol-gel stable et homogène est au moins 48 h. Li et al. (89) ont conservé la solution sol-gel pendant 5 jours à la température ambiante avant de réaliser le dépôt d'HA sur le substrat.

### c) Conditions expérimentales du dépôt de phosphate de calcium par voie sol-gel

Pour former une couche mince d'HA sur les implants, la solution sol-gel est déposée soit par trempage, soit avec une tournette (Figure 1.4.2). Puis, les échantillons sont recuits à la température de 400 à 900°C. Ces étapes sont répétées 1 à 10 fois pour augmenter l'épaisseur de la couche d'HA. Évidemment, l'épaisseur du dépôt dépend de la concentration du Ca-P dans la solution sol-gel (98).

Les paramètres de la réaction sol-gel utilisée pour obtenir une couche mince sur un substrat métallique sont indiqués dans le Tableau 1.8 suivant (99–104).

Tableau 1.8. Paramètres du processus sol-gel pour une couche mince

Paramètres	Par une tournette	Par un trempage
Concentration de HA, [mol/L]	1,5 à 4	
Rapport molaire de H <sub>2</sub> O/ P	3 à 12	
Rapport molaire de Ca/ P	1,67	
Paramètres de dépôt		
Vitesse de rotation (tr/min) /le temps (s)	1500 à 4000/ 10 à 40	-
Vitesse de tirage (mm/min)	-	5 à 300
Température du traitement thermique (°C)	400 à 900, atmosphère inerte/d'air	
Répétition (Reproductibilité)	1 à 10	

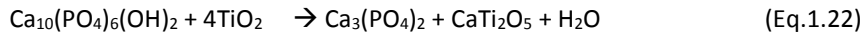
Le traitement thermique favorise la réaction entre le titane du substrat ou l'oxyde TiO<sub>2</sub> de la surface du substrat et le dépôt de Ca-P (70,105,106). L'adhésion entre le dépôt et le substrat est augmentée. Par exemple, Weng et Lopes Baptista (107) ont mesuré la *force d'adhérence* (adhesive strength) du dépôt en HA sur le substrat en Ti-6Al-4V poli par une pâte diamantée de 1 µm et après un traitement thermique à 500°C. Ils ont indiqué que la *force d'adhérence*<sup>3</sup> est de 14 MPa. Dans d'autres travaux, Hsieh et al. (105) ont montré que l'adhérence entre un substrat de Ti-6Al-4V sablé et un dépôt de Ca-P obtenu par tournette est de 60 MPa (90 MPa) après un recuit à 600°C (400°C).

Les études d'adhérence entre le dépôt d'apatite (HA) et le substrat en Ti ou en Ti-6Al-4V ne sont pas nombreuses. L'adhésion entre un métal (substrat) et une couche céramique (HA) dépend du traitement thermique. En effet, la différence de dilatation thermique (ou expansion thermique) entre les deux composants peut diminuer l'adhérence entre les deux matériaux. Pour améliorer l'adhésion entre un dépôt céramique (Ca-P) obtenu par la voie sol-gel et un substrat en titane, il faut produire une couche de TiO<sub>2</sub> à la surface du substrat de titane. Pour cela, il existe deux méthodes : 1) une première couche de TiO<sub>2</sub> est déposée sur le substrat, puis une couche d'HA; et 2) un mélange de TiO<sub>2</sub> et

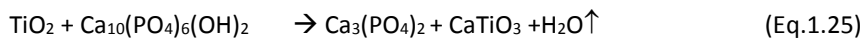
<sup>3</sup> Force d'adhérence : normalisée par rapport à une surface unitaire (N/mm<sup>2</sup> ou MPa)

d'hydroxyapatite est déposé sur le substrat. Dans le deuxième cas, la solution sol-gel TiO<sub>2</sub>/HA est produite à partir d'une solution sol-gel de TiO<sub>2</sub> et d'une solution sol-gel d'HA (85,88).

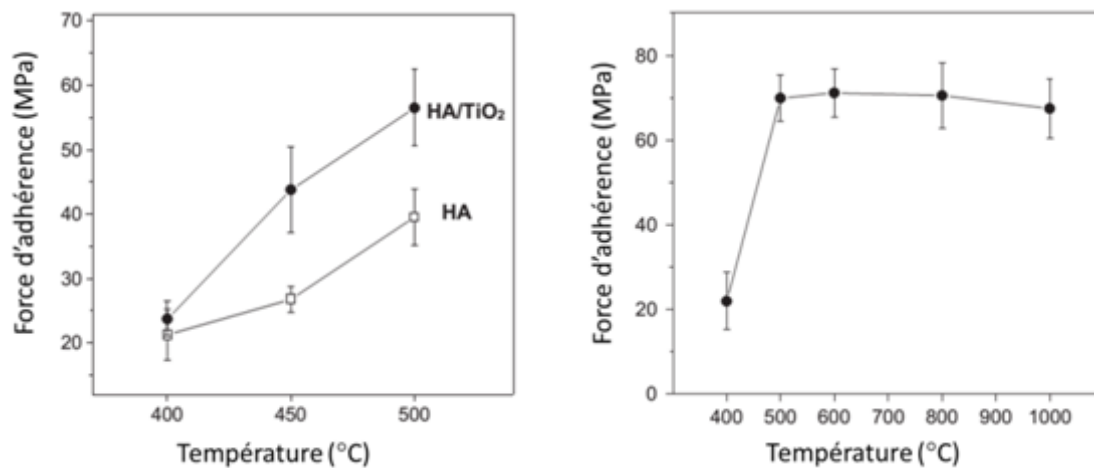
Selon Gan et Pilliar (70) et Huaxia et al. (108), la réaction entre les ions Ca<sup>2+</sup> et TiO<sub>2</sub> a lieu à 500°C dans une atmosphère d'air ou sous traitement plasma.



Ergun et al. (109) ont indiqué que, à l'interface Ti-HA, le titane est oxydé par l'oxygène pour former l'oxyde de titane, ensuite l'oxyde de titane réagit avec l'HA pour former le titanate de calcium.



Dans plusieurs études, les échantillons sont chauffés à l'air (70,78,79,110,111), mais quelquefois, dans une atmosphère inerte d'azote ou d'argon (26,81,86,112). De plus, la montée en température est aussi variable, les échantillons sont mis soit directement dans le four à haute température (113), soit dans le four à la température ambiante, chauffés avec une montée lente de 2 à 10°C/min jusqu'à la température prévue (26,93,110,114)



(a) La force d'adhérence des dépôts HA et HA+TiO<sub>2</sub> au substrat Ti (88)

(b) La force d'adhérence est influencée par la température (115)

Figure 1.4.4. Influence du traitement thermique sur la force d'adhérence du dépôt HA au substrat

Kim et al. (88) ont indiqué que grâce à l'interaction chimique entre TiO<sub>2</sub> et l'HA, l'adhérence du dépôt au substrat est augmentée de 35 MPa pour le dépôt HA à 55 MPa pour le dépôt composite TiO<sub>2</sub> +HA (Figure 1.4.4 a). Cependant, Kim et al. (115) ont montré que la force d'adhérence du dépôt au substrat est influencée par la température du traitement thermique. L'adhésion est meilleure quand l'échantillon est traité à une température supérieure à 500°C (Figure 1.4.4 b).

Dans cette thèse, nous avons fait un dépôt de Ca-P sur la couche tampon de titanate de sodium. Plus précisément, une couche poreuse de titanate de sodium est formée sur la surface de l'alliage Ti-

6Al-4V par un traitement alcalin-thermique. Les étapes de la préparation de la couche de titanate de sodium seront présentées dans le Chapitre 3. Le dépôt de la couche de Ca-P sera présenté dans le Chapitre 4.

#### 1.4.2. Dépôt de phosphate de calcium sur un polymère par voie « autocatalytique »

Leonor et Reis (10) ont proposé en 2003, des bains autocatalytiques permettant de produire une couche mince bioactive de Ca-P sur quelques polymères bioinertes. Les bains utilisent un activateur/catalyseur et/ou une réaction redox en solution. Dans leurs travaux, un dépôt de Ca-P est obtenu sur trois types de polymères bioinertes :

- un polyéthylène à haut module (high molecular weight polyethylene -HMWPE);
- un mélange d'amidon et d'éthylène-alcool vinylique (*starch/ethylene vinyl alcohol blend- SEVA-C*);
- un mélange d'acétate d'amidon et de cellulose (*starch/cellulose acetate blend-SCA*).

Dans les bains acide ou alcalin, définis par Reis (Tableau 1.9), le chlorure de palladium ( $\text{PdCl}_2$ ) est utilisé comme activateur (catalyseur selon Reis et al.) pour créer une différence de charge entre le substrat et la solution, tandis que l'hypophosphite de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ ) joue le rôle d'un réducteur dans une réaction redox. De plus,  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  est utilisé uniquement comme précurseur de phosphate dans le bain acide. Dans le bain alcalin, les ions  $\text{PO}_4^{3-}$  sont donnés par le pyrophosphate de sodium ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ). Dans les deux bains, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont donnés par le chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ). De cette manière, le dépôt de Ca-P est induit sur la surface de ces polymères. La composition et les conditions d'opération de ces bains sont montrées dans le Tableau 1.9 (*bains acide I et alcalin I*).

Deux ans plus tard, Oliveira et al. (11), d'une part, ont modifié la composition des bains acide et alcalin, appelés *bain acide II* et *bain alcalin II* (Tableau 1.9). D'autre part, ils ont proposé un nouveau bain, appelé *bain oxydant* (Tableau 1.9). En principe, il y a toujours, dans ces bains, un réducteur ( $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ , pour les bains acide I, II et les bains alcalin I, II) ou un oxydant ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , pour le bain oxydant) pour une réaction redox et du  $\text{PdCl}_2$  qui agit comme un activateur.

Nous observons (Tableau 1.9) que la quantité de  $\text{CaCl}_2$  a beaucoup diminué (de 21 ou 25 g/L respectivement dans les *bains acides I* et *alcalin I*, à 5,6 g/L dans les *bains acides II* et *alcalins II*), la concentration du  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  est réduite, de 50 g/L dans l'ancien bain alcalin (*bain alcalin I*) à 6,7 g/L dans le nouveau bain alcalin (*bain alcalin II*). De plus, l'acide succinique ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$ ) est remplacé par l'acide ortho-phosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) dans le *bain acide II*. Pourtant, ils n'ont pas expliqué l'avantage des nouveaux bains par rapport aux premiers bains.

Tableau 1.9. Résumé des compositions des bains de Reis et al.

Produits chimiques	Composition du bain (g/L) (10–12,116)					
	Acide I	Alcalin I	Acide II	Alcalin II	Oxydant	Acide III
Chlorure de calcium, CaCl <sub>2</sub>	21	25	5,6	5,6	5,6	5,6
Fluorure de sodium, NaF	5		5			
Pyrophosphate de sodium, Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O		50		6,7	6,7	
Hypophosphite de sodium, NaH <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	24	21	24	21		
Acide succinique, C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	7					
Acide ortho-phosphorique, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>			3,4			3,4
Chlorure de palladium, PdCl <sub>2</sub>	0,885	0,885	0,9	0,9	0,9	0,9
Peroxyde oxygène, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					34	
pH	5,3	9,2	5,3/6	9,2	7,0	6,0
Température (±2°C)	80	60	80	60	60	-
Rapport molaire de Ca/P	0,84	0,53	0,19	0,22	1,68	1,45

En même temps, dans d'autres travaux, Oliveira et al. ont utilisé le bain acide II et le bain oxydant pour la synthèse d'un composé hybride de carboxyméthylchitosane (CMC) et de Ca-P (12).

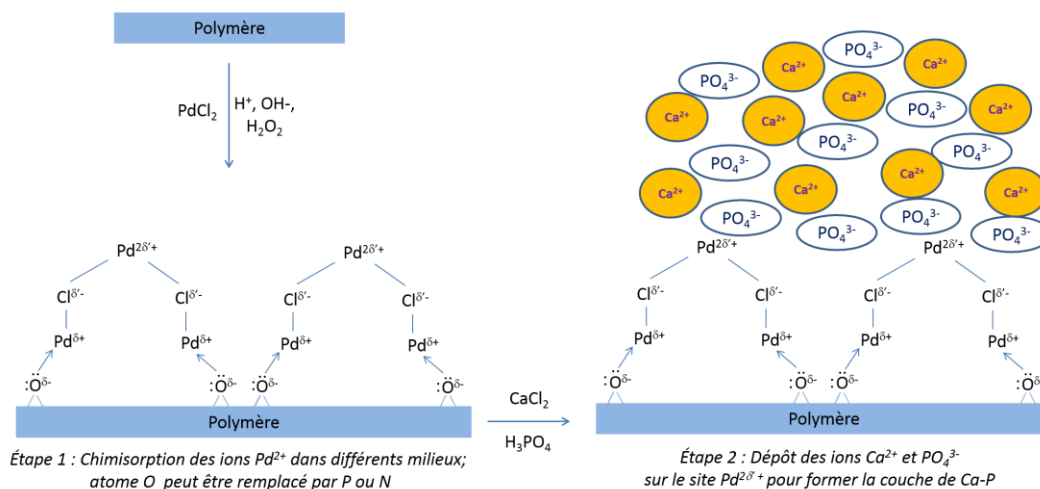


Figure 1.4.5. Schéma du processus de dépôt du Ca-P sur des polymères par autocatalyse (12)

Concernant la voie autocatalytique, Oliveira et al. (12) ont proposé un bain acide simple (nommé *bain acide III*, dans le Tableau 1.8) pour synthétiser le composite hydroxyapatite-carboxyméthyl chitosane. De plus, ils ont schématisé le mécanisme du dépôt de Ca-P sur les polymères dans les bains autocatalytiques comme le montre la Figure 1.4.5.

Le dépôt de Ca-P se produit en deux étapes : 1) la chimisorption des ions Pd<sup>2+</sup> sur la surface des polymères aux points riches en électrons, et 2) les ions PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> et Ca<sup>2+</sup> se déposent sur le «site» du palladium grâce à l'interaction électrostatique entre la surface du substrat et la solution de Ca-P.



### **1.4.3. Dépôt de phosphate de calcium sur métal par la méthode « Reis modifiée »**

Les travaux présentés ci-dessus concernent le dépôt « autocatalytique » réalisé sur des polymères, et non pas dans le cas d'alliages métalliques ou de métaux<sup>4</sup>. L'idée d'utiliser cette méthode pour des métaux a été proposée dans la thèse de Hadeer I. Mohammed<sup>5</sup> pour les métaux et alliages Ti et Ti-6Al-4V.

Au cours de ces travaux, nous avons proposé que l'Ag puisse être substitué au Pd comme agent d'activation de ces bains, c'est-à-dire de remplacer le PdCl<sub>2</sub> par le AgCl. Cette idée est basée sur les propriétés anti-bactériologiques de l'Ag et de ses composés (composés d'argent avec F, Cl, Br ou I) (117–119). Ils sont utilisés en tant qu'agent anti-bactériologique dans les couches minces bioactives telles que Ag-HA, Ag-HA/TiO<sub>2</sub> déposées sur des implants (118,120,121).

### **1.4.4. Dépôt de phosphate de calcium par une méthode biomimétique**

Une dernière méthode largement utilisée est la croissance de Ca-P dans un milieu aqueux à 37°C, simulant le milieu corporel. Ces milieux sont couramment appelés SBF pour Simulated Body Fluid. Les compositions de plusieurs de ces solutions sont présentées dans le Tableau 1.10.

Des échantillons sont immergés dans une solution SBF à la température de 37°C. Le Ca-P se dépose sur la surface des implants après une durée de quelques jours à quelques semaines.

Dans cette thèse, nous avons utilisé la composition c-SBF donnée par Kokubo et Takadama (122) et largement utilisée pour déterminer la bioactivité des implants. Nous avons ainsi évalué la stabilité *in vitro* des dépôts de Ca-P que nous avons préparés.

---

<sup>4</sup> A. Carradò, G. Pourroy, W. I. Abdel-Fattah. Matériaux métalliques présentant une couche superficielle de phosphate de calcium, et procédés pour le préparer, Pub. No. : WO/2013/068591 ; International Application No. : PCT/EP2012/072407, 2013

<sup>5</sup> Hadeer I. Mohammed. "Compound coatings of Ca-phosphates and/titanate on metallic implants for medical applications", Université de Strasbourg et Ain Shams University (Egypte) 10 septembre 2013. dirigée par A. Carradò et M. El-Sayed.

Tableau 1.10. Composition du plasma sanguin et de quelques types de fluide corporel simulé

Solution	Concentrations (mM)								pH	Ca/P
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>		
Human blood plasma (Gamble, 1967, donné par (123))	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5	7,4	2,5
EBSS (Earle, 1943, donné par (123))	143,5	5,37	0,8	1,8	123,5	26,2	1,0	0,8	--	1,8
HBSS (Hanks and Wallace, 1949; Hanks, 1975) (124,125)	142,1	5,33	0,9	1,26	146,8	4,2	0,78	0,41	--	1,6
Ringer (Ringer, 1883, donné par (123))	130	4,0	--	1,4	109,0	--	--	--	--	--
Original SBF (Kokubo et al., 1990) (126)	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0	7,4/TRIS	2,5
c-SBF (Kokubo, 1991) (127,128)	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5	7,4/TRIS	2,5
Tas-SBF (Tas, 2000) (129)	142,0	5,0	1,5	2,5	125,0	27,0	1,0	0,5	7,4/TRIS	2,5
Bigi-SBF (Bigi et al., 2000) (130)	141,5	5,0	1,5	2,5	124,5	27,0	1,0	0,5	7,4/HEPES	2,5
r-SBF (Oyane et al., 2003) (131)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5	7,4/HEPES	2,5
m-SBF (Oyane et al., 2003) (131)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	10,0	1,0	0,5	7,4/HEPES	2,5
i-SBF (Oyane et al., 2003) (131)	142,0	5,0	1,0	1,6	103,0	27,0	1,0	0,5	7,4/HEPES	1,6
n-SBF (Takadama et al., 2004) (132)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	4,2	1,0	0,5	7,4/TRIS	2,5
SBFx5 (Barrère et al., 2000) (133)	714,8	--	7,5	12,5	723,8	21,0	5,0	--	--	2,5
SBFx5 (Habibovic et al., 2002) (134)	704,2	--	1,5	12,5	711,8	10,5	5,0	--	--	2,5

HEPES : 2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanesulfonic acid;

TRIS : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

EBSS : Earle's Balanced Salt Solution

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

SBF : Simulated body fluid

## Conclusions

Le traitement alcalin-thermique est une technique connue pour former une couche de titanate de sodium sur la surface des implants de titane. Ce traitement améliore la biocompatibilité. Le traitement thermique qui suit le traitement alcalin a pour but de stabiliser la couche de titanate de sodium et d'augmenter l'adhésion de cette couche au substrat. Toutefois, le traitement thermique diminue la bioactivité de la couche de titanate de sodium.

Le dépôt de Ca-P formé par voie sol-gel (tournette et trempage) est une méthode connue pour déposer une couche mince d'HA sur les implants de Ti et de Ti-6Al-4V. Toutefois, l'adhésion entre la couche d'HA (céramique) et le substrat (métal) est faible. C'est pourquoi plusieurs chercheurs ont utilisé une couche tampon de dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) pour augmenter l'adhésion entre la couche céramique d'apatite et le substrat.

Le dépôt de Ca-P avec les bains autocatalytiques de Reis et al. est une nouvelle méthode, et n'a jamais été appliquée pour une surface de céramique telle que le titanate de sodium. Cette technique est simple, elle n'utilise pas de traitement thermique après le dépôt et est applicable pour des formes complexes comme celles des implants.

Dans cette thèse, nous avons associé les différentes techniques que nous venons de décrire. Les substrats de Ti-6Al-4V sont traités en milieu alcalin puis recuits pour stabiliser la couche de titanate de sodium. Le Ca-P est déposé sur la couche de titanate de sodium soit par la voie sol-gel, soit en utilisant les bains dit « autocatalytiques », et stabilisé ensuite par traitement thermique. Ces dépôts sont ensuite recuits. Nous montrerons l'intérêt de cette nouvelle méthode pour réaliser des implants avec une ostéointégration améliorée.

## Références

1. Narayan R, editor. *Biomedical Materials*. 1st ed. Springer; 2009. 590 p.
2. Ehrlich H. *Biological Materials of Marine Origin: Invertebrates*. 1st Edition. Springer; 2010. 594 p.
3. Katti KS. Biomaterials in total joint replacement. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2004 Dec 10;39(3):133–42.
4. Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. *Biomaterials*. 1998;19(18):1621–39.
5. Okazaki Y, Gotoh E. Metal release from stainless steel, Co–Cr–Mo–Ni–Fe and Ni–Ti alloys in vascular implants. *Corros Sci*. 2008 Dec;50(12):3429–38.
6. Sousa SR, Barbosa MA. Effect of hydroxyapatite thickness on metal ion release from Ti6Al4V substrates. *Biomaterials*. 1996;17(4):397–404.
7. Dieudonné S., van den Dolder J, de Ruijter J., Paldan H, Peltola T, van 't Hof M., et al. Osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells cultured on silica gel and sol-gel-derived titania. *Biomaterials*. 2002 Jul;23(14):3041–51.

8. Xu W, Hu W, Li M, Wen C. Sol-gel derived hydroxyapatite/titania biocoatings on titanium substrate. *Mater Lett.* 2006 Jun;60(13-14):1575–8.
9. Weng J, Liu Q, Wolke JGC, Zhang X, De Groot K. Formation and characteristics of the apatite layer on plasma-sprayed hydroxyapatite coatings in simulated body fluid. *Biomaterials.* 1997;18(15):1027–35.
10. Leonor IB, Reis RL. An innovative auto-catalytic deposition route to produce calcium–phosphate coatings on polymeric biomaterials. *J Mater Sci Mater Med.* 2003;14(5):435–41.
11. Oliveira JM, Leonor IB, Reis RL. Preparation of bioactive coatings on the surface of bioinert polymers through an innovative auto-catalytic electroless route. *Key Eng Mater.* 2005;284:203–6.
12. Oliveira JM, Costa SA, Leonor IB, Malafaya PB, Mano JF, Reis RL. Novel hydroxyapatite/carboxymethylchitosan composite scaffolds prepared through an innovative “autocatalytic” electroless coprecipitation route. *J Biomed Mater Res A.* 2009 Feb;88A(2):470–80.
13. Leyens C, Peters M. *Titanium and Titanium Alloys.* Germany: WILEY-VCH; 2003. 544 p.
14. Pederson R. *Microstructure and phase transformation of Ti-6Al-4V* [Internet] [Licentiate thesis]. [Sweden]: Luleå University of Technology; 2002 [cited 2012 Aug 11]. Available from: <http://epubl.ltu.se/1402-1757/2002/30/>
15. Combres Y, Champin B. *Traitements Thermiques des Alliges de Titane.* Ed. Techniques Ingénieur; 1991.
16. Niinomi M. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Mater Sci Eng A.* 1998;243(1):231–6.
17. Seshacharyulu T, Medeiros SC, Morgan JT, Malas JC, Frazier WG, Prasad Y. Hot deformation and microstructural damage mechanisms in extra-low interstitial (ELI) grade Ti–6Al–4V. *Mater Sci Eng A.* 2000;279(1):289–99.
18. Akahori T, Niinomi M. Fracture characteristics of fatigued Ti–6Al–4V ELI as an implant material. *Mater Sci Eng A.* 1998;243(1):237–43.
19. Sittig C, Textor M, Spencer ND, Wieland M, Vallotton PH. Surface characterization. *J Mater Sci Mater Med.* 1999;10(1):35–46.
20. Lee DB, Pohrelyuk I, Yaskiv O, Lee JC. Gas nitriding and subsequent oxidation of Ti-6Al-4V alloys. *Nanoscale Res Lett.* 2012;7(1):1–5.
21. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res.* 1995;29(3):389–401.
22. Anselme K, Linez P, Bigerelle M, Le Maguer D, Le Maguer A, Hardouin P, et al. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials.* 2000;21(15):1567–77.
23. Nishimura N, Kawai T. Effect of microstructure of titanium surface on the behaviour of osteogenic cell line MC3T3-E1. *J Mater Sci Mater Med.* 1998 Feb 1;9(2):99–102.
24. Wen HB, Wolke JG, de Wijn JR, Liu Q, Cui FZ, de Groot K. Fast precipitation of calcium phosphate layers on titanium induced by simple chemical treatments. *Biomaterials.* 1997 Nov;18(22):1471–8.
25. Wen HB, Liu Q, De Wijn JR, De Groot K, Cui FZ. Preparation of bioactive microporous titanium surface by a new two-step chemical treatment. *J Mater Sci Mater Med.* 1998;9(3):121–8.

26. Guo L, Li H. Fabrication and characterization of thin nano-hydroxyapatite coatings on titanium. *Surf Coat Technol.* 2004 Jul;185(2-3):268–74.
27. Hijón N, Cabañas MV, Izquierdo-Barba I, Vallet-Regí M. Bioactive Carbonate–Hydroxyapatite Coatings Deposited onto Ti6Al4V Substrate. *Chem Mater.* 2004 Apr;16(8):1451–5.
28. Liu D-M, Yang Q, Troczynski T. Sol–gel hydroxyapatite coatings on stainless steel substrates. *Biomaterials.* 2002 février;23(3):691–8.
29. Kim M-S, Ryu J-J, Sung Y-M. One-step approach for nano-crystalline hydroxyapatite coating on titanium via micro-arc oxidation. *Electrochem Commun.* 2007 août;9(8):1886–91.
30. Garcia-Sanz FJ, Mayor MB, Arias JL, Pou J, Leon B, Perez-Amor M. Hydroxyapatite coatings: a comparative study between plasma-spray and pulsed laser deposition techniques. *J Mater Sci Mater Med.* 1997 Dec 1;8(12):861–5.
31. Mohseni E, Zalnezhad E, Bushroa AR. Comparative investigation on the adhesion of hydroxyapatite coating on Ti–6Al–4V implant: A review paper. *Int J Adhes Adhes.* 2014 Jan;48:238–57.
32. Wang CK, Lin JHC, Ju CP, Ong HC, Chang RPH. Structural characterization of pulsed laser-deposited hydroxyapatite film on titanium substrate. *Biomaterials.* 1997 Oct;18(20):1331–8.
33. Wang X-X, Hayakawa S, Tsuru K, Osaka A. Improvement of bioactivity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TaCl<sub>5</sub>-treated titanium after subsequent heat treatments. *J Biomed Mater Res.* 2000;52(1):171–6.
34. Wei D, Zhou Y, Jia D, Wang Y. Characteristic and in vitro bioactivity of a microarc-oxidized TiO<sub>2</sub>-based coating after chemical treatment. *Acta Biomater.* 2007 Sep;3(5):817–27.
35. Nishio K, Neo M, Akiyama H, Nishiguchi S, Kim H-M, Kokubo T, et al. The effect of alkali- and heat-treated titanium and apatite-formed titanium on osteoblastic differentiation of bone marrow cells. *J Biomed Mater Res.* 2000;52(4):652–61.
36. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nishiguchi S, Nakamura T. Graded surface structure of bioactive titanium prepared by chemical treatment. *J Biomed Mater Res.* 1999 May;45(2):100–7.
37. Nishiguchi S, Nakamura T, Kobayashi M, Kim HM, Miyaji F, Kokubo T. The effect of heat treatment on bone-bonding ability of alkali-treated titanium. *Biomaterials.* 1999 Mar;20(5):491–500.
38. Nishiguchi S, Kato H, Fujita H, Oka M, Kim HM, Kokubo T, et al. Titanium metals form direct bonding to bone after alkali and heat treatments. *Biomaterials.* 2001;22(18):2525–33.
39. Kim H-M, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Apatite-forming ability of alkali-treated Ti metal in body environment. *J Ceram Soc Jpn.* 1997 Sep 11;105(2):111–6.
40. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment. *J Mater Sci Mater Med.* 1997;8(6):341–7.
41. Jonášová L, Müller FA, Helebrant A, Strnad J, Greil P. Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium. *Biomaterials.* 2004 Mar;25(7-8):1187–94.
42. Wen HB, De Wijn JR, Cui FZ, De Groot K. Preparation of bioactive Ti6Al4V surfaces by a simple method. *Biomaterials.* 1998;19(1-3):215–21.
43. Jonasova L, Müller FA, Helebrant A, Strnad J, Greil P. Hydroxyapatite formation on alkali-treated titanium with different content of Na<sup>+</sup> in the surface layer. *Biomaterials.* 2002;23(15):3095–101.
44. Uchida M, Kim H-M, Kokubo T, Fujibayashi S, Nakamura T. Effect of water treatment on the apatite-forming ability of NaOH-treated titanium metal. *J Biomed Mater Res.* 2002;63(5):522–30.

45. Pattanayak DK, Yamaguchi S, Matsushita T, Kokubo T. Effect of heat treatments on apatite-forming ability of NaOH- and HCl-treated titanium metal. *J Mater Sci Mater Med*. 2010 Dec 29;22(2):273–8.
46. Takadama H, Kim H-M, Kokubo T, Nakamura T. TEM-EDX study of mechanism of bonelike apatite formation on bioactive titanium metal in simulated body fluid. *J Biomed Mater Res*. 2013 Jan 24;57(3):441–8.
47. Yamaguchi S, Takadama H, Matsushita T, Nakamura T, Kokubo T. Cross-sectional analysis of the surface ceramic layer developed on Ti metal by NaOH-heat treatment and soaking in SBF. *J Ceram Soc Jpn*. 2009 Jun 16;117(1370):1126–30.
48. Wei M, Kim HM, Kokubo T, Evans JH. Optimising the bioactivity of alkaline-treated titanium alloy. *Mater Sci Eng C*. 2002;20(1):125–34.
49. Ravelingien M, Mullens S, Luyten J, Meynen V, Vinck E, Vervaeck C, et al. Thermal decomposition of bioactive sodium titanate surfaces. *Appl Surf Sci*. 2009;255(23):9539–42.
50. Krupa D, Baszkiewicz J, Mizera J, Borowski T, Barcz A, Sobczak JW, et al. Effect of the heating temperature on the corrosion resistance of alkali-treated titanium. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Mar 1;88A(3):589–98.
51. Yan WQ, Nakamura T, Kawanabe K, Nishigochi S, Oka M, Kokubo T. Apatite layer-coated titanium for use as bone bonding implants. *Biomaterials*. 1997;18(17):1185–90.
52. Wen HB, Van Den Brink J, De Wijn JR, Cui FZ, De Groot K. Crystal growth of calcium phosphate on chemically treated titanium. *J Cryst Growth*. 1998;186(4):616–23.
53. Fukuda A, Takemoto M, Saito T, Fujibayashi S, Neo M, Yamaguchi S, et al. Bone bonding bioactivity of Ti metal and Ti–Zr–Nb–Ta alloys with Ca ions incorporated on their surfaces by simple chemical and heat treatments. *Acta Biomater*. 2011 Mar;7(3):1379–86.
54. Kim H-M, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *J Biomed Mater Res*. 1996;32(3):409–17.
55. Adawy A, WI AEF, El-Sayed ESM, Talaat MS. Biomimetic coating of precalcified Ti-6Al-4V alloy. *Open Med Devices J*. 2009;1:19–28.
56. Teixeira RLP, Godoy GCD, Pereira MM. Calcium phosphate formation on alkali-treated titanium alloy and stainless steel. *Mater Res*. 2004;7(2):299–303.
57. Wen HB, de Wijn JR, Cui FZ, de Groot K. Preparation of bioactive Ti6Al4V surfaces by a simple method. *Biomaterials*. 1998 Jan;19(1–3):215–21.
58. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates. *J Mater Sci*. 2007 Jan 23;42(4):1061–95.
59. El Kady AM, Mohamed KR, El-Bassyouni GT. Fabrication, characterization and bioactivity evaluation of calcium pyrophosphate/polymeric biocomposites. *Ceram Int*. 2009 Sep;35(7):2933–42.
60. Liu DM, Troczynski T, Tseng WJ. Aging effect on the phase evolution of water-based sol-gel hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2002;23(4):1227–36.
61. Kasuga T. Bioactive calcium pyrophosphate glasses and glass-ceramics. *Acta Biomater*. 2005 Jan;1(1):55–64.
62. Dorozhkin S. Medical Application of Calcium Orthophosphate Bioceramics. *BIO*. 2011 Feb 21;1(1):1–51.
63. Gupta R, Kumar A. Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology. *Biomed Mater*. 2008 Sep;3(3):034005.

64. Sailer RA, Soucek MD. Oxidizing alkyd ceramers. *Prog Org Coat.* 1998;33(1):36–43.
65. Brinker CJ, Frye GC, Hurd AJ, Ashley CS. Fundamentals of sol-gel dip coating. *Thin Solid Films.* 1991;201(1):97–108.
66. Brinker CJ, Scherer GW. *Sol-gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-gel Processing.* Gulf Professional Publishing; 1990. 928 p.
67. Scriven LE. Physics and Applications of DIP Coating and Spin Coating. *MRS Online Proc Libr.* 1988;121:null–null.
68. Sahu N, Parija B, Panigrahi S. Fundamental understanding and modeling of spin coating process: A review. *Indian J Phys.* 2009;83(4):493–502.
69. Bornside DE, Macosko CW, Scriven LE. Spin coating: One-dimensional model. *J Appl Phys.* 1989;66(11):5185.
70. Gan L, Pilliar R. Calcium phosphate sol-gel-derived thin films on porous-surfaced implants for enhanced osteoconductivity. Part I: Synthesis and characterization. *Biomaterials.* 2004 Oct;25(22):5303–12.
71. Gubicza J, Juhász A, Lendvai J. A new method for hardness determination from depth sensing indentation tests. *J Mater Res.* 1996;11(12):2964–7.
72. Haddow DB, James PF, Noort R. Characterization of sol-gel surfaces for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med.* 1996;7(5):255–60.
73. Livage J, Barboux P, Vandenborre MT, Schmutz C, Taulelle F. Sol-gel synthesis of phosphates. *J Non-Cryst Solids.* 1992;147–148:18–23.
74. Weng W, Baptista JL. A New synthesis of hydroxyapatite. *J Eur Ceram Soc.* 1997;17(9):1151–6.
75. Weng W, Baptista JL. Alkoxide route for preparing hydroxyapatite and its coatings. *Biomaterials.* 1998;19(1-3):125–31.
76. Breme J, Zhou Y, Groh L. Development of a titanium alloy suitable for an optimized coating with hydroxyapatite. *Biomaterials.* 1995;16(3):239–44.
77. Metikoš-Huković M, Tkalčec E, Kwokal A, Piljac J. An in vitro study of Ti and Ti-alloys coated with sol-gel derived hydroxyapatite coatings. *Surf Coat Technol.* 2003;165(1):40–50.
78. Piveteau LD, Gasser B, Schlapbach L. Evaluating mechanical adhesion of sol-gel titanium dioxide coatings containing calcium phosphate for metal implant application. *Biomaterials.* 2000;21(21):2193–201.
79. Hwang K, Lim Y. Chemical and structural changes of hydroxyapatite films by using a sol-gel method. *Surf Coat Technol.* 1999 Jul 18;115(2–3):172–5.
80. Hwang K, Song J, Kang B, Park Y. Sol-gel derived hydroxyapatite films on alumina substrates. *Surf Coat Technol.* 2000 Jan 24;123(2–3):252–5.
81. Mavis B, Taş AC. Dip Coating of Calcium Hydroxyapatite on Ti-6Al-4V Substrates. *J Am Ceram Soc.* 2000;83(4):989–91.
82. Brendel T, Engel A, Rüssel C. Hydroxyapatite coatings by a polymeric route. *J Mater Sci Mater Med.* 1992;3(3):175–9.
83. Li P, Groot K, Kokubo T. Bioactive Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> composite coating prepared by sol-gel process. *J Sol-Gel Sci Technol.* 1996;7(1):27–34.
84. Ramires PA, Romito A, Cosentino F, Milella E. The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour. *Biomaterials.* 2001;22(12):1467–74.

85. Milella E, Cosentino F, Licciulli A, Massaro C. Preparation and characterisation of titania/hydroxyapatite composite coatings obtained by sol-gel process. *Biomaterials*. 2001;22(11):1425–31.
86. Wen C, Xu W, Hu W, Hodgson P. Hydroxyapatite/titania sol-gel coatings on titanium-zirconium alloy for biomedical applications☆ *Acta Biomater*. 2007 May;3(3):403–10.
87. Kim H-W, Kim H-E, Knowles JC. Fluor-hydroxyapatite sol-gel coating on titanium substrate for hard tissue implants. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(17):3351–8.
88. Kim H-W, Koh Y-H, Li L-H, Lee S, Kim H-E. Hydroxyapatite coating on titanium substrate with titania buffer layer processed by sol-gel method. *Biomaterials*. 2004 Jun;25(13):2533–8.
89. Li L-H, Kim H-W, Lee S-H, Kong Y-M, Kim H-E. Biocompatibility of titanium implants modified by microarc oxidation and hydroxyapatite coating. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Apr 1;73A(1):48–54.
90. Liu D-M, Troczynski T, Tseng WJ. Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: process development. *Biomaterials*. 2001 Jul;22(13):1721–30.
91. Liu D-M, Yang Q, Troczynski T, Tseng WJ. Structural evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2002;23(7):1679–87.
92. Westheimer FH, Huang S, Covitz F. Rates and mechanisms of hydrolysis of esters of phosphorous acid. *J Am Chem Soc*. 1988;110(1):181–5.
93. Liu DM, Yang Q, Troczynski T, Tseng WJ. Structural evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2002;23(7):1679–87.
94. Masuda Y, Matubara K, Sakka S. Synthesis of Hydroxyapatite from Metal Alkoxides through Sol-Gel Technique. *J Ceram Soc Jpn*. 1990;98(1143):1255–66.
95. Liu DM, Troczynski T, Tseng WJ. Aging effect on the phase evolution of water-based sol-gel hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2002;23(4):1227–36.
96. Hsieh M-F, Perng L-H, Chin T-S, Perng H-G. Phase purity of sol-gel-derived hydroxyapatite ceramic. *Biomaterials*. 2001 Oct 1;22(19):2601–7.
97. Chai CS, Gross KA, Ben-Nissan B. Critical ageing of hydroxyapatite sol-gel solutions. *Biomaterials*. 1998;19(24):2291–6.
98. Haddow DB, James PF, Noort R. Characterization of sol-gel surfaces for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med*. 1996;7(5):255–60.
99. Liu DM, Troczynski T, Tseng WJ. Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: process development. *Biomaterials*. 2001;22(13):1721–30.
100. Li L-H, Kim H-W, Lee S-H, Kong Y-M, Kim H-E. Biocompatibility of titanium implants modified by microarc oxidation and hydroxyapatite coating. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Apr 1;73A(1):48–54.
101. Wen C, Xu W, Hu W, Hodgson P. Hydroxyapatite/titania sol-gel coatings on titanium-zirconium alloy for biomedical applications☆ *Acta Biomater*. 2007 May;3(3):403–10.
102. Piveteau LD, Girona MI, Schlapbach L, Barboux P, Boilot JP, Gasser B. Thin films of calcium phosphate and titanium dioxide by a sol-gel route: a new method for coating medical implants. *J Mater Sci Mater Med*. 1999;10(3):161–7.
103. Li P, Groot K, Kokubo T. Bioactive Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> composite coating prepared by sol-gel process. *J Sol-Gel Sci Technol*. 1996;7(1):27–34.



104. Milella E, Cosentino F, Licciulli A, Massaro C. Preparation and characterisation of titania/hydroxyapatite composite coatings obtained by sol-gel process. *Biomaterials*. 2001;22(11):1425–31.
105. Hsieh MF, Perng LH, Chin TS. Hydroxyapatite coating on Ti6Al4V alloy using a sol-gel derived precursor. *Mater Chem Phys*. 2002;74(3):245–50.
106. Ji H, Ponton CB, Marquis PM. Microstructural characterization of hydroxyapatite coating on titanium. *J Mater Sci Mater Med*. 1992;3(4):283–7.
107. Weng W, Baptista JL. Preparation and Characterization of Hydroxyapatite Coatings on Ti6Al4V Alloy by a Sol-Gel Method. *J Am Ceram Soc*. 1999;82(1):27–32.
108. Ji H, Ponton CB, Marquis PM. Microstructural characterization of hydroxyapatite coating on titanium. *J Mater Sci Mater Med*. 1992;3(4):283–7.
109. Ergun C, Doremus R, Lanford W. Hydroxylapatite and titanium: Interfacial reactions. *J Biomed Mater Res A*. 2003;65(3):336–43.
110. Weng W, Baptista JL. Preparation and Characterization of Hydroxyapatite Coatings on Ti6Al4V Alloy by a Sol-Gel Method. *J Am Ceram Soc*. 1999;82(1):27–32.
111. Gan L, Wang J, Pilliar RM. Evaluating interface strength of calcium phosphate sol-gel-derived thin films to Ti6Al4V substrate. *Biomaterials*. 2005 Jan;26(2):189–96.
112. Stoch A, Jastrzebski W, Długoń E, Lejda W, Trybalska B, Stoch GJ, et al. Sol-gel derived hydroxyapatite coatings on titanium and its alloy Ti6Al4V. *J Mol Struct*. 2005 Jun;744-747:633–40.
113. Hwang K, Lim Y. Chemical and structural changes of hydroxyapatite films by using a sol-gel method. *Surf Coat Technol*. 1999 Jul 18;115(2–3):172–5.
114. Chai CS, Ben-Nissan B. Bioactive nanocrystalline sol-gel hydroxyapatite coatings. *J Mater Sci Mater Med*. 1999;10(8):465–9.
115. Kim H-W, Kong Y-M, Bae C-J, Noh Y-J, Kim H-E. Sol-gel derived fluor-hydroxyapatite biocoatings on zirconia substrate. *Biomaterials*. 2004 Jul;25(15):2919–26.
116. Costa SA, Oliveira JM, Leonor IB, Reis RL. Carboxymethylchitosan/Calcium Phosphate Hybrid Materials Prepared by an Innovative Auto-Catalytic Co-Precipitation Method. *Key Eng Mater*. 2005;284-286:701–4.
117. Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev*. 2003 Jun;27(2-3):341–53.
118. Trujillo NA, Oldinski RA, Ma H, Bryers JD, Williams JD, Popat KC. Antibacterial Effects of Silver-Doped Hydroxyapatite Thin Films Sputter Deposited on Titanium. *Mater Sci Eng C [Internet]*. 2012 May [cited 2012 Jun 18]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493112002184>
119. Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN, Dibo SA. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns J Int Soc Burn Inj*. 2007 Mar;33(2):139–48.
120. Mo A, Liao J, Xu W, Xian S, Li Y, Bai S. Preparation and antibacterial effect of silver-hydroxyapatite/titania nanocomposite thin film on titanium. *Appl Surf Sci*. 2008 Nov;255(2):435–8.
121. Chen W, Liu Y, Courtney H., Bettenga M, Agrawal CM, Bumgardner JD, et al. In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. *Biomaterials*. 2006 Nov;27(32):5512–7.

122. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006 mai;27(15):2907–15.
123. Zhao CY, Fan HS, Zhang XD. Advances in Biomimetic Apatite Coating on Metal Implants. In: George A, editor. *Advances in Biomimetics* [Internet]. InTech; 2011 [cited 2012 Aug 24]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-biomimetics/advances-in-biomimetic-apatite-coating-on-metal-implants>
124. Hanks JH, Wallace RE. Relation of Oxygen and Temperature in the Preservation of Tissues by Refrigeration. *Exp Biol Med*. 1949 Jun 1;71(2):196–200.
125. Hanks JH. Hanks' balanced salt solution and pH control. *TCA Man Tissue Cult Assoc*. 1975 Mar 1;1(1):3–4.
126. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *J Biomed Mater Res*. 1990 Jun 1;24(6):721–34.
127. Kokubo T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials*. 1991 Mar;12(2):155–63.
128. Ohtsuki C, Kushitani H, Kokubo T, Kotani S, Yamamuro T. Apatite formation on the surface of Ceravital-type glass-ceramic in the body. *J Biomed Mater Res*. 1991 Nov;25(11):1363–70.
129. Cüneyt Tas A. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids. *Biomaterials*. 2000 Jul;21(14):1429–38.
130. Bigi A, Boanini E, Panzavolta S, Roveri N. Biomimetic Growth of Hydroxyapatite on Gelatin Films Doped with Sodium Polyacrylate. *Biomacromolecules*. 2000 Dec 1;1(4):752–6.
131. Oyane A, Onuma K, Ito A, Kim H-M, Kokubo T, Nakamura T. Formation and growth of clusters in conventional and new kinds of simulated body fluids. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Feb 1;64(2):339–48.
132. Takadama H, Hashimoto M, Mizuno M, Kokubo T. Round-robin test of SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials. *Phosphorus Res Bull*. 2004;17:119–25.
133. Barrère F, Layrolle P, van Blitterswijk CA, de Groot K. Fast Formation of Biomimetic Ca-P Coatings on Ti6Al4V. *MRS Online Proc Libr*. 1999;599:null–null.
134. Habibovic P, Barrere F, Blitterswijk CA, Groot K, Layrolle P. Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants. *J Am Ceram Soc*. 2002;85(3):517–22.



**Chapitre 2.**  
**Méthodologies expérimentales**



## Chapitre 2.

# Méthodologies expérimentales

2.1. Préparation des échantillons .....	42
2.1.1. Tronçonnage et polissage .....	42
2.1.2. Traitement acide (traitement Kroll) .....	43
2.1.3. Traitement alcalin utilisant la solution NaOH .....	43
2.1.4. Traitement thermique .....	43
2.1.5. Dépôt de Ca-P par la voie sol-gel .....	44
2.1.6. Dépôt de Ca-P par la méthode Reis et al. ....	45
2.2. Schéma des études et nom des échantillons .....	47
2.3. Les méthodes d'analyse .....	50
2.3.1. Microscopie électronique à balayage (MEB) .....	50
2.3.2. Mesure d'énergie dispersive des rayons X (EDS-X).....	50
2.3.3. Microscopie électronique à transmission (MET) et diffraction d'aire sélectionnée des électrons (SAED) .....	50
2.3.4. Diffraction des rayons X (DRX) .....	51
2.3.5. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) .....	52
2.3.6. Analyse thermique différentielle et thermogravimétrie (ATD/ATG) .....	53
2.3.7. Microspectroscopie Raman .....	54
2.3.8. Étude de l'interface couche mince- substrat .....	54
2.3.9. Nano-indentation.....	55
2.3.10. Test de bioactivité in vitro utilisant un fluide corporel simulé (SBF) .....	57
2.3.11. Dosage du phosphore par la méthode de BRIGGS .....	58
2.3.12. Dosage du calcium par colorimétrie .....	59
2.3.13. In vitro cytocompatibility tests .....	60
2.3.14. Évaluation qualitative de la porosité de la couche de titanate de sodium.....	62
Références .....	63

## 2.1. Préparation des échantillons

### 2.1.1. Tronçonnage et polissage

Des substrats de 20 mm de diamètre et de 1,5 mm d'épaisseur sont coupés dans des barres de Ti - 6Al-4V ELI (Figure 2.1.1). Ils sont tout d'abord fixés sur un support utilisant la colle Super Glue-3 et polis au papier abrasif, initialement avec une graduation #120 (taille de grain 125  $\mu\text{m}$ ), puis #240, #1000, #2500 et #4000 (taille de grain 2,5  $\mu\text{m}$ ). Puis, ils sont polis avec un feutre imprégné d'une suspension de silice colloïdale (taille de grain : 0,05  $\mu\text{m}$ ) (Figure 2.1.2). Après le polissage, la surface des échantillons est observée avec un microscope optique Olympus IX70. La surface est lisse comme un miroir, sans rayure visible au grandissement 50. Cet état de polissage est appelé "poli miroir". Les échantillons sont nettoyés pendant 30 min avec de l'acétone, puis 30 min avec de l'éthanol et enfin 30 min avec de l'eau distillée sous ultrasons (Figure 2.1.3).

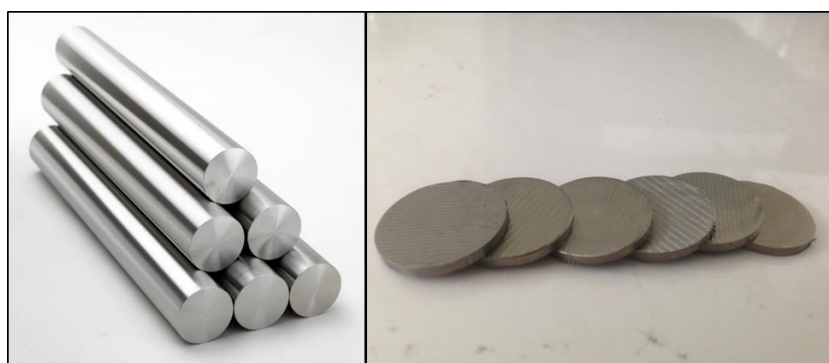


Figure 2.1.1. Barres de Ti-6Al-4V ELI commercial (à gauche) et disques de 20 mm de diamètre et 1,5 mm d'épaisseur (à droite)

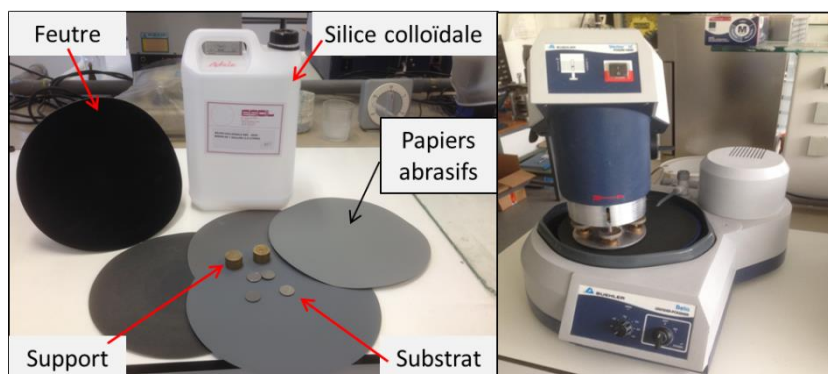


Figure 2.1.2. Matériels de polissage : papiers abrasifs, feutre et suspension de silice colloïdale (à gauche), machine de polissage (à droite)

Après les étapes ci-dessus, les substrats sont traités successivement en milieu acide (appelé traitement Kroll), et dans une solution NaOH de concentration 5 ou 10 M (traitement alcalin), puis soumis à un traitement thermique à 630°C. Ensuite un dépôt de Ca-P est réalisé par « chimie douce ».



Figure 2.1.3. Microscope optique Olympus IX70 équipé un objectif X50 (à gauche), échantillons polis à la silice colloïdale et appareil ultrasonique utilisé pour le nettoyage des substrats (à droite)

### 2.1.2. Traitement acide (traitement Kroll)

Une solution acide contenant 2 mL d'acide fluorhydrique HF 40 % (équivalent à 0,046 mol) et 4mL d'acide nitrique  $\text{HNO}_3$  65 % (équivalent à 0,058 mol) dilués dans un litre d'eau distillée est utilisée pour le traitement Kroll. Ce mélange est appelé « solution Kroll ». Ce traitement Kroll est réalisé à la température ambiante.

Les échantillons « polis miroir » sont tout d'abord plongés dans la solution Kroll pendant 1 à 10 min. Puis, les échantillons sont lavés à l'eau distillée pendant 30 s et séchés à l'air à température ambiante. Dans le Chapitre 3, nous montrerons que le traitement Kroll de 3 min est optimisé et donc utilisé pour les études suivantes.

### 2.1.3. Traitement alcalin utilisant la solution NaOH

Pour le traitement alcalin, les échantillons qui ont été traités dans la solution Kroll sont plongés dans une solution NaOH à la concentration de 5 ou 10 M, à la température de 60 ou 80°C pendant 24 ou 72 h. Ensuite, les échantillons sont lavés à l'eau distillée pendant 30 s et séchés à l'air à température ambiante.

### 2.1.4. Traitement thermique

Le traitement thermique permet de stabiliser la couche de titanate de sodium. Pour cela, les échantillons de traitement alcalin sont mis horizontalement dans le four. Ils sont ensuite chauffés sous air avec une montée de 5°C/min jusqu'à 630°C. Les échantillons sont gardés à cette température pendant 1 h avant d'être refroidis dans le four (Figure 2.1.4).



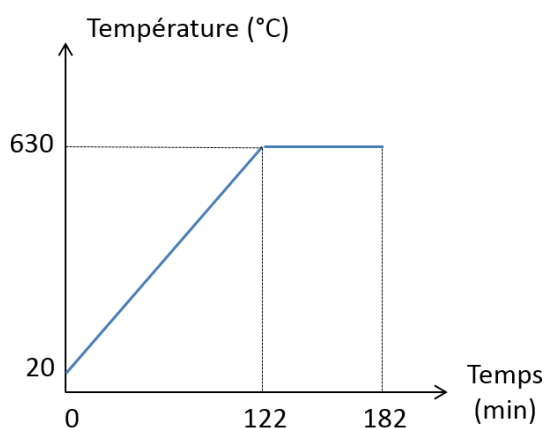


Figure 2.1.4. Courbe de température du traitement thermique

### 2.1.5. Dépôt de Ca-P par la voie sol-gel

#### a) Préparation de la solution sol-gel de Ca-P

Nous avons tout d'abord préparé deux solutions : (1) 0,09 mole phosphite de triéthyle ( $P(C_2H_5O)_3$ , Aldrich) est dissous dans l'éthanol, de l'eau distillée (rapport molaire  $H_2O/P = 4$ ) y est ajoutée pour hydrolyser le phosphite (environ 50 mL de solution); et (2) 0,15 mole de nitrate de calcium tétrahydraté ( $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ , Aldrich) est aussi dissous dans l'éthanol (environ 50 mL de solution). Ensuite, la solution de calcium est versée peu à peu dans la solution de phosphite sous une agitation magnétique. Enfin, le volume de la solution sol-gel est ajustée jusqu'à 100 mL et agité en continu pendant 10 min. La solution sol-gel est conservée sans agitation sous température ambiante pendant 1 semaine avant d'être utilisée.

#### b) Méthode de dépôt

Les échantillons sont recouverts d'une couche de Ca-P soit avec une tournette (spin coating), soit par un trempage (dip coating) (voir la Figure 1.4.2, Chapitre 1).

Pour le spin coating, l'échantillon est d'abord fixé sur la tournette. Ensuite, une quantité de 200  $\mu L$  de la solution sol-gel est déposée au centre de l'échantillon. Puis, la tournette est soumise à une rotation à la vitesse de 3000 tr/min pendant 30 s. Une couche mince de gel de Ca-P est alors déposée sur la couche de titanate de sodium.

Pour le dip coating, l'échantillon est plongé dans la solution sol-gel pendant 15 s. Ensuite, il est retiré verticalement de la solution avec une vitesse de 40 mm/min. Une couche mince de gel de Ca-P recouvre alors la couche de titanate de sodium.

### c) Traitement thermique après le dépôt

Après le dépôt, les échantillons sont mis horizontalement sur un support en alumine et chauffés à 400, 500, 600, 700 et 800°C pendant 20 min dans un four électrique, sous air. Quand le dépôt de Ca-P est traité à 700 et 800°C, il n'adhère pas sur le substrat à cause de la dilatation thermique (26) comme illustré par la Figure 2.1.5. Nous avons donc choisi la température de 600°C afin d'obtenir une couche de Ca-P parfaitement cristalline avec une bonne adhésion au substrat.



Figure 2.1.5. Délaminage du dépôt de Ca-P à cause de traitement thermique à 700 (à gauche) et 800°C (à droite)

Après le traitement thermique, les échantillons sont nettoyés 30 s dans l'acétone, 30 s dans l'éthanol, et 30 s dans l'eau distillée sous ultrasons. Le processus dépôt-traitement thermique est répété de 1 à 3 fois pour augmenter l'épaisseur de la couche.

### 2.1.6. Dépôt de Ca-P par la méthode Reis et al.

#### a) Préparation de la solution autocatalytique

Dans cette méthode que nous appelons comme Reis et al. (1,2) la voie « autocatalytique ». La composition et les paramètres d'opération des bains « autocatalytiques » sont présentés dans le Tableau 2.1. Les bains AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd sont proposés par Reis et al. Les bains AC1-Ag, ALK1-Ag et OXY-Ag sont les nouveaux bains dans lesquels le PdCl<sub>2</sub> est remplacé par AgCl. Et les bains ACM1 et ACM2 sont les nouveaux bains proposés par notre équipe et obtenus par une légère modification des bains de Reis.

Pour préparer les solutions « autocatalytiques », les produits chimiques sont d'abord pesés et mis un à un dans un bécher en téflon contenant de l'eau distillée sous agitation magnétique à 500 tr/min et à la température prévue du bain. Le pH des solutions est ajusté par l'ajout de NaOH 0,1 à 1 M jusqu'à la valeur prévue. La solution est toujours agitée par un barreau magnétique enrobé par du téflon. La température de la solution est fixée à  $80 \pm 2^\circ\text{C}$  pour le bain acide (AC) et  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  pour les bains alcalins (ALK) et oxydants (OXY).

### b) Réalisation du dépôt par les bains autocatalytiques

Après le traitement alcalin utilisant la solution NaOH 10 M à 60°C pendant 24 h, puis le traitement thermique à 630°C pendant 1 h comme décrit dans le Chapitre 3, §3.2, les échantillons ont été immergés verticalement pendant 3 h dans des bains comme l'illustre la Figure 2.1.6. Les échantillons sont nommés comme le bain dans lequel ils sont plongés.

Après l'immersion, les échantillons sont ensuite lavés à la pissette d'eau distillée pendant 30 s et séchés à la température ambiante.

Tableau 2.1. Composition des bains, pH et température d'utilisation

Réactifs	Composition des bains (g/L)							
	AC1-Pd	ALK1-Pd	OXY-Pd	AC1-Ag	ALK1-Ag	OXY-Ag	ACM1	ACM2
Chlorure de calcium, CaCl <sub>2</sub>	21	25	5,6	21	25	5,6	5,6	5,6
Fluorure de sodium, NaF	5			5				
Pyrophosphate de sodium, Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O		50	6,7		50	6,7		
Hypophosphite de sodium, NaH <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	24	21		24	21			
Acide succinique, C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	7			7				
Acide ortho-phosphorique, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>							2,94	2,94
Chlorure de palladium, PdCl <sub>2</sub>	0,9	0,9	0,9				0,9	
Chlorure d'argent, AgCl				0,9	0,9	0,9		1,45
Peroxyde d'oxygène, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			34			34		
pH	5,3	9,2	7,0	5,3	9,2	7,0	5,3	5,3
Température (±2°C)	80	60	60	80	60	60	80	80
Rapport molaire de Ca/P	0,84	0,53	1,68	0,84	0,53	1,68	1,67	1,67

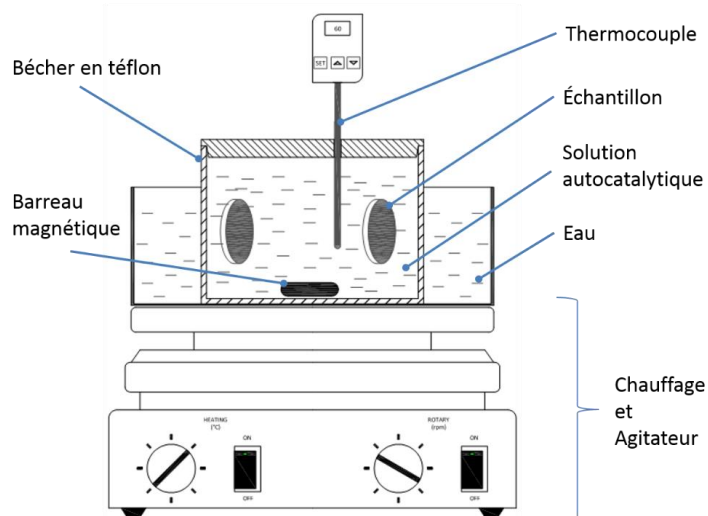


Figure 2.1.6. Schéma d'illustration du dépôt de Ca-P par les bains autocatalytiques

## 2.2. Schéma des études et nom des échantillons

La figure 2.2.1 décrit la méthodologie suivie dans cette thèse. Les méthodes d'analyse utilisées sont décrites dans la suite de ce chapitre. Les noms des échantillons et les traitements réalisés pour chaque échantillon sont récapitulés dans les Tableaux 2.2 et 2.3.

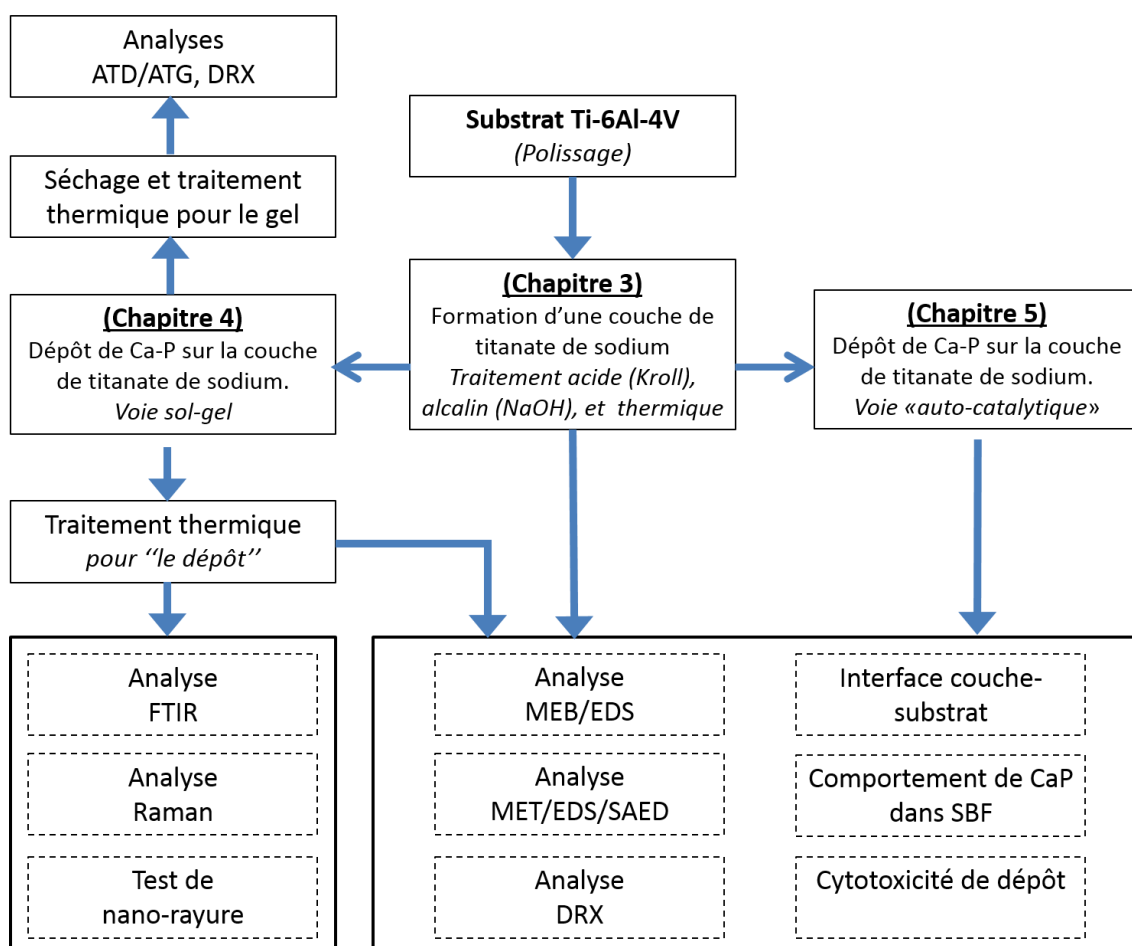


Figure 2.2.1. Schéma des travaux réalisés dans cette thèse

Tableau 2.2. Nom des échantillons de traitement alcalin-thermique

Nom	Matériau	Kroll (HF+HNO <sub>3</sub> )	Traitement alcalin (solution NaOH)						Traitement thermique (630°C, 1 h)	Présenté
			Concentration (M)		Température (°C)		Durée (h)			
			5	10	60	80	24	72		
Kroll	Ti-6Al-4V	x								Chap. 3, 4
M56024	Ti-6Al-4V	x	x		x		x			Chap. 3
M58024	Ti-6Al-4V	x	x			x	x			Chap. 3
M56072	Ti-6Al-4V	x	x		x			x		Chap. 3
M58072	Ti-6Al-4V	x	x			x		x		Chap. 3
M106024	Ti-6Al-4V	x		x	x		x			Chap. 3
M108024	Ti-6Al-4V	x		x		x	x			Chap. 3
M106072	Ti-6Al-4V	x		x	x			x		Chap. 3
M108072	Ti-6Al-4V	x		x		x		x		Chap. 3
M56024-TT630	Ti-6Al-4V	x	x		x		x		x	Chap. 3
M58024-TT630	Ti-6Al-4V	x	x			x	x		x	Chap. 3
M56072-TT630	Ti-6Al-4V	x	x		x			x	x	Chap. 3
M58072-TT630	Ti-6Al-4V	x	x			x		x	x	Chap. 3
M106024-TT630	Ti-6Al-4V	x		x	x		x		x	Chap. 3
M108024-TT630	Ti-6Al-4V	x		x		x	x		x	Chap. 3
M106072-TT630	Ti-6Al-4V	x		x	x			x	x	Chap. 3
M108072-TT630	Ti-6Al-4V	x		x		x		x	x	Chap. 3
TP	Ti poudre									Chap. 3
TPA	Ti poudre	x		x	x		x			Chap. 3
TPAT	Ti poudre	x		x	x		x		x	Chap. 3

Tableau 2.3. Nom des échantillons du dépôt de Ca-P

Nom	Kroll	NaOH 10 M, 60°C, 24 h	TT 630°C, 1 h	Dépôt de Ca-P par bains autocatalytiques							Dépôt de Ca-P par voie sol-gel					Présenté
				Bains de Reis et al.			Bains modifiés				Tournette			Trempage		
				AC1- Pd	ALK1- Pd	OXY-Pd	AC1- Ag	ALK1- Ag	OXY-Ag	ACM1	ACM2	1 fois	2 fois	3 fois	1 fois	
TT	x	x	x													Chap. 4, 5
TS-HA1	x	x	x								x					Chap. 4
TS-HA2	x	x	x									x				Chap. 4
TS-HA3	x	x	x										x			Chap. 4
TD-HA1	x	x	x											x		Chap. 4
TD-HA2	x	x	x												x	Chap. 4
AC1-Pd	x	x	x	x												Chap. 5
ALK1-Pd	x	x	x		x											Chap. 5
OXY-Pd	x	x	x			x										Chap. 5
AC1-Ag	x	x	x				x									Chap. 5
ALK1-Ag	x	x	x					x								Chap. 5
OXY-Ag	x	x	x						x							Chap. 5
ACM1	x	x	x							x						Chap. 5
ACM2	x	x	x								x					Chap. 5

## **2.3. Les méthodes d'analyse**

### **2.3.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)**

Théoriquement, quand un faisceau de sonde électronique balaie la surface de l'échantillon, divers phénomènes ont lieu comme : la diffusion et la diffraction d'électrons, l'émission d'électrons secondaires et d'électrons Auger, l'émission de photons X et de photons lumineux, l'absorption d'électrons, la création de défauts et de phonons, la formation de champs électriques ou de champs magnétiques, etc. Chacun de ces effets peut former une « image ». On a besoin de disposer d'un détecteur correspondant pour transformer l'effet « objet » en signal électrique.

Dans la méthode de microscopie électronique à balayage (MEB), un détecteur à scintillation est utilisé pour transformer l'effet de l'émission d'électrons secondaires en signal électrique. Ce signal est ensuite utilisé pour former l'image MEB.

Dans la thèse, un microscope électronique à balayage environnemental de type JEOL6700F équipé d'un spectromètre d'analyse dispersive en énergie (EDS-X) a été employé pour l'acquisition des images de morphologie de surface des échantillons après chaque étape de traitement. Ces images de grandissement variant de X350 à X25000 sont obtenues avec les électrons secondaires à 3 kV et les spectres EDS-X sont réalisés à 10 kV. La morphologie de surface de l'échantillon est observée en plusieurs endroits de la surface avec des grossissements de X350 à X25000. Par cela, les changements morphologiques de la surface grâce aux traitements acides, alcalins et thermiques, ainsi que le dépôt de Ca-P sont visibles.

### **2.3.2. Mesure d'énergie dispersive des rayons X (EDS-X)**

Cette technique est généralement associée à la microscopie électronique à balayage. En principe, c'est une méthode d'analyse utilisant l'effet de l'émission de photons X pour déterminer la nature des éléments chimiques présents. Dans la thèse, cette technique est appliquée pour analyser qualitativement des éléments de la surface des échantillons. Une tension de 10 kV a été employée pour réaliser les mesures.

### **2.3.3. Microscopie électronique à transmission (MET) et diffraction d'aire sélectionnée des électrons (SAED)**

L'observation des revêtements et la détermination qualitative de leur composition chimique ont été réalisés à l'aide d'un microscope électronique à transmission TOPCON 002B opérant à 200kV, équipé d'une caméra CCD et d'un spectromètre EDS-X.

Pour l'analyse au MET, une poudre (de titanate de sodium ou de Ca-P) est grattée à la surface de l'échantillon par un stylo diamanté et récupérée sur une grille en cuivre de diamètre environ 3 mm. L'image formée est une image stigmatique formée simultanément en tous les points par focalisation,

selon les lois de l'optique classique. En pratique, deux modes de formation de l'image peuvent être distingués :

1) l'image en champ clair est une image formée seulement par les rayons transmis sans diffraction. Pour cela, un diaphragme d'un objectif est placé dans le plan focal de manière à sélectionner uniquement le faisceau transmis en ligne droite par l'échantillon;

2) l'image en champ sombre est formée avec un faisceau diffracté  $hkl$  et la position du diaphragme objectif situé dans le même plan que le diagramme de diffraction. Ce diaphragme ne permet qu'aux rayons qui correspondent à la réflexion sélective  $hkl$  du cristal de contribuer à la formation de l'image. Le cristal apparaît donc clair sur un fond sombre.

La présence des éléments chimiques de l'échantillon est identifiée par analyse EDS-X.

La cristallinité d'un matériau est vérifiée par la diffraction d'électrons d'une région sélectionnée (SAED). Les distances de diffraction en rayon mesurées sur l'image SAED (Figure 2.3.1 b) sont liées aux distances interréticulaires  $d_{hkl}$  par la relation  $d_m = K/R_m$  (où  $K$  est la constante de diffraction,  $R_m$  est le rayon mesuré sur le SAED,  $d_m$  est la distance réticulaire correspondant au  $R_m$ ) (3). Ces valeurs sont comparées aux valeurs données par la base standard (JPDCS) pour déterminer les phases en présence.

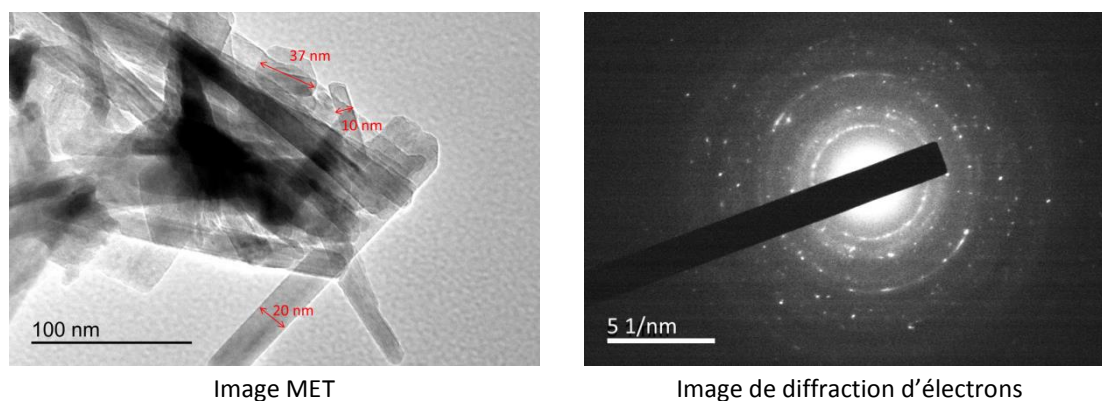


Figure 2.3.1. Illustration de l'image au MET (a) et de l'image de diffraction d'électrons (b)

#### 2.3.4. Diffraction des rayons X (DRX)

La structure des matériaux est évaluée par la technique de diffraction des rayons X à l'aide d'un appareil D5000 SIEMENS Brücker (radiation  $\text{Cu K}\alpha$ ,  $\lambda = 0,15406 \text{ nm}$ ).

Le principe de la diffraction des rayons X est basé sur la réflexion d'un faisceau monochromatique de rayons X par le réseau cristallin d'un échantillon. La diffraction des rayons X par un matériau cristallisé suit la loi de Bragg (Figure 2.3.2). Dans le cas des matériaux cristallisés, cette méthode permet de déterminer les distances entre les plans réticulaires du cristal par la mesure des positions des pics de diffraction sur le diagramme (3).



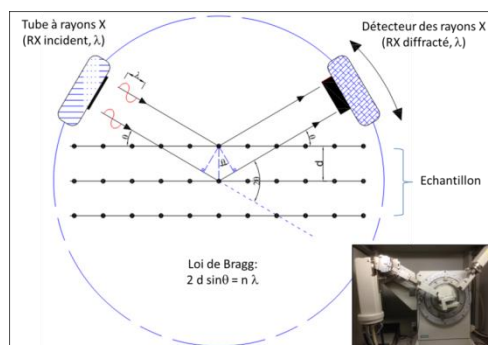


Figure 2.3.2. Principe de la diffraction des rayons X :  $d$  est la distance interréticulaire,  $\theta$  est l'angle de diffraction,  $\lambda$  est la longueur d'onde des rayons X et  $n = 1, 2, 3, \dots$  l'ordre de la diffraction

Pour les études du revêtement sur les substrats, les balayages ont été réalisés sur une plage angulaire variant de  $10$  à  $60^\circ$  par pas de  $0,03^\circ$  avec un temps de comptage de  $20$  s.

### 2.3.5. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge, nombre d'onde moyen de  $4000$  à  $400\text{ cm}^{-1}$ , est appliquée pour déterminer les groupes fonctionnels comme  $\text{PO}_4^{3-}$  du dépôt de Ca-P. Du dépôt de Ca-P ( $\sim 1$  mg) obtenu sur la surface des échantillons est récupéré et dispersé dans du KBr sec ( $\sim 100$  mg) et broyé (Figure 2.3.3). Ensuite, des pastilles d'environ  $0,5$  mm en épaisseur sont produites sous une pression de  $800$  MPa et introduites dans le spectrophotomètre IR Digilab FTS 3000. Les spectres ont été enregistrés en absorbance et d'une manière quantitative.

Les spectres obtenus sont comparés avec le spectre infrarouge standard de l'HA. Dans le Tableau 2.4, nous présentons les modes vibrationnels plus importants de l'HA qui sont rapportés précédemment par différents travaux.



Figure 2.3.3. Matériels (moule, broyeur et presse) utilisés pour préparer une pastille de KBr pour l'analyse FTIR

Tableau 2.4. Les modes vibrationnels importants de l'apatite (4–7)

Pic (cm <sup>-1</sup> )	Mode
1087	v <sub>3a</sub> (triplely degenerated asymmetric stretching mode) de la liaison P-O du groupe fonctionnel PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> de l'HA
1046	v <sub>3b</sub> (triplely degenerated asymmetric stretching mode) de la liaison P-O du groupe fonctionnel PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> de l'HA
1032	v <sub>3c</sub> (triplely degenerated asymmetric stretching mode) de la liaison P-O du groupe fonctionnel PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> de l'HA
962	v <sub>1</sub> (nondegenerated symmetric stretching mode) de la liaison P-O du groupe fonctionnel PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> de l'HA
875	v <sub>2</sub> (bending mode) du groupe fonctionnel CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> du Ca-P
631	v <sub>L</sub> (librational mode) du groupe fonctionnel OH <sup>-</sup> de l'HA
602	v <sub>4a</sub> (triplely degenerated bending mode) de la liaison O-P-O du groupe fonctionnel PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> de l'HA
574	v <sub>4b</sub> (triplely degenerated bending mode) de la liaison O-P-O du groupe fonctionnel PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> de l'HA
561	v <sub>4c</sub> (triplely degenerated bending mode) de la liaison O-P-O du groupe fonctionnel PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> de l'HA
472	v <sub>2a</sub> (double degenerated bending mode) de la liaison O-P-O du groupe fonctionnel PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> de l'HA
462	v <sub>2b</sub> (double degenerated bending mode) de la liaison O-P-O du groupe fonctionnel PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> de l'HA

### 2.3.6. Analyse thermique différentielle et thermogravimétrie (ATD/ATG)

L'analyse thermique différentielle (ATD) et l'analyse thermogravimétrie (ATG) sont utilisées pour étudier la transformation du titanate de sodium (Chapitre 3) ainsi que du gel de Ca-P (Chapitre 4) en fonction de la température.

L'ATD est une technique expérimentale qui permet la caractérisation d'un matériau par mesure en continu de la différence de température entre l'échantillon et une référence, en fonction de la température. Par ATD, les processus de la transformation de phase comme la cristallisation, l'oxydation du métal ou la combustion des composés organique si sont identifiés. La mesure de la température est réalisée à l'aide d'un thermocouple ou d'une sonde de platine.

L'ATG est une technique qui permet la caractérisation d'un matériau par mesure en continu de la variation de sa masse lorsque celui-ci est soumis à un changement de température. La déshydratation, la décomposition ou la combustion des matériaux sont détectés. La mesure de la masse est effectuée à l'aide d'une balance spécialement conçue pour ce type d'analyse.

L'analyse ATD/ATG est réalisée sur un appareil SDT Q600, avec des creusets en platine ; la sensibilité de la balance est de 0,1 µg et la sensibilité en température de 0,001°C.

### 2.3.7. Microspectroscopie Raman

Après d'avoir déposé du phosphate de calcium par voie sol-gel, les échantillons sont analysés en micro spectroscopie Raman. Ces analyses ont été effectuées par M Guy Ladam du Laboratoire de Biophysique et Biomatériaux (La2B), Université de Rouen - Centre Universitaire d'Evreux.

Théoriquement, le spectre Raman de l'HA monocristal est dominé par un pic à  $960\text{ cm}^{-1}$  qui correspond au mode étirement symétrique ( $\nu_1$ , stretching mode) du groupe  $\text{PO}_4^{3-}$  et trois pics faibles et larges à  $1070\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_1$ , mode stretching de  $\text{PO}_4^{3-}$ ),  $590\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ , mode bending de  $\text{PO}_4^{3-}$ ) et  $430\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_2$ , mode stretching de  $\text{PO}_4^{3-}$ ). La surface de l'échantillon est observée simultanément par un microscope dans le domaine de longueur d'onde  $900\text{ à }1000\text{ cm}^{-1}$ . La présence de Ca-P à la surface des échantillons est mise en évidence par des pixels de luminosité plus au moins intense. Par cette technique, la densité de Ca-P sur la surface peut être évaluée qualitativement. La Figure 2.3.4 présente le schéma d'un microspectroscopie Raman.

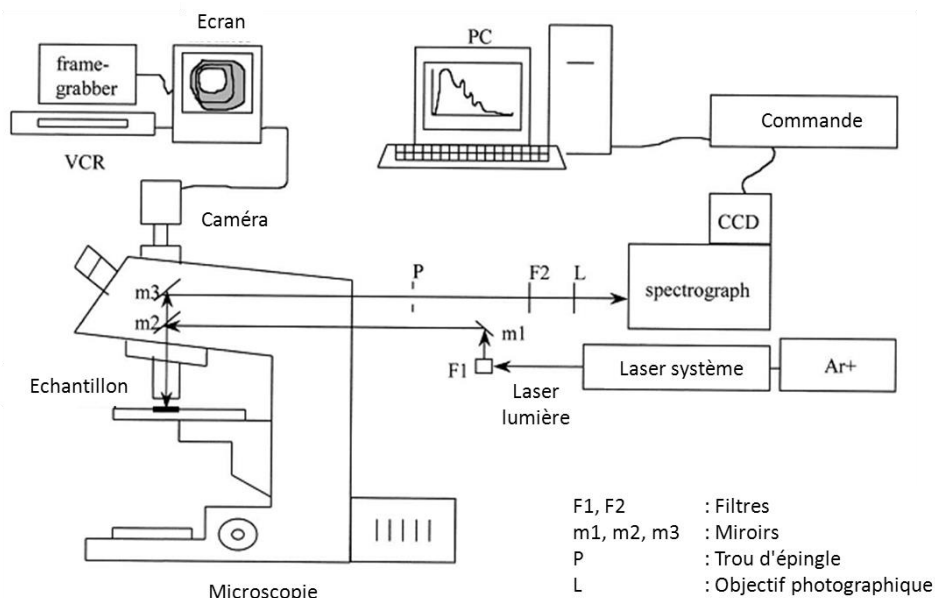


Figure 2.3.4. Schéma d'illustration d'un Microspectroscopie Raman (8)

### 2.3.8. Étude de l'interface couche mince- substrat

Des coupes des échantillons ont été réalisées par la technique du « cross-polisher » pour étudier l'interface de la couche mince avec le substrat. La surface de l'échantillon est d'abord protégée par un morceau de wafer de silice d'environ  $200\text{ }\mu\text{m}$  collé avec une colle époxyde (Garan G2). Ensuite, un couteau en acier délimite la zone bombardée par un faisceau d'ion  $\text{Ar}^+$ . Ces coupes ont été réalisées par M Stéphane Mathieu, Surface et Interface : Réactivité Chimique des Matériaux, Institut Jean Lamour Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy avec un polisseur ionique JEOL IB-9010 CP.

La coupe transversale ainsi préparée peut alors être observée au MEB et analysée par EDS-X. La figure 2.3.5 illustre la protection du dépôt par un morceau de silice et l'interface de la couche mince-substrat observée au MEB avec un grandissement de X5000.

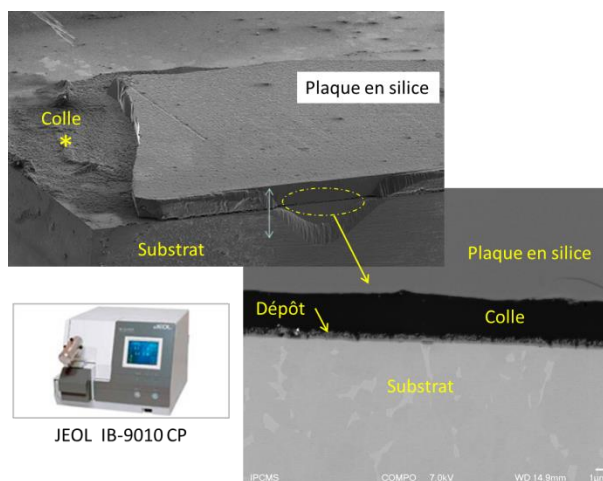


Figure 2.3.5. Illustration de la protection du dépôt et de l'observation au MEB dans l'étude de l'interface dépôt-substrat

### 2.3.9. Nano-indentation

Le test de nanorayure est utilisé pour évaluer la capacité de la résistance à l'abrasion sans fracture de la couche mince de Ca-P. Ce test est réalisé par M Thierry Roland, Institut Charles Sadron de Strasbourg. Dans ce test, un nano-indenteur sphérique de 5  $\mu\text{m}$  de rayon est utilisé. La charge appliquée est augmentée de 10 à 100 mN. Le profil initial de la surface, le profil de la rayure durant le test et le profil résiduel après le test sont enregistrés automatiquement. De plus, le coefficient de frottement ( $\mu = F_T/F_n$ ) est également enregistré (9,10).

Après la rayure, l'observation au MEB de la microrayure est effectuée pour vérifier qualitativement la stabilité de la couche de phosphate de calcium.

Le Tableau 2.5 présente les paramètres du test. La Figure 2.3.6 présente le schéma d'illustration d'un nano-indenteur. La Figure 2.3.7 montre le schéma de charge appliqué pour les étapes de palpement initial, de rayure et de palpement final.

Tableau 2.5. Paramètres expérimentaux appliqués pour le test de nanorayure

Longueur de la rayure ( $\mu\text{m}$ )	Charge min. (mN)	Charge max. (mN)	Position du profil transversal	
			( $\mu\text{m}$ )	(mN)
500	10	100	350	50

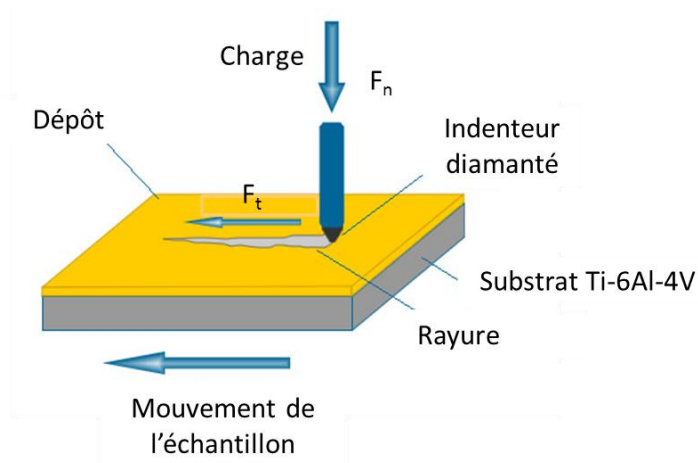


Figure 2.3.6. Schématisation du test de nanorayure

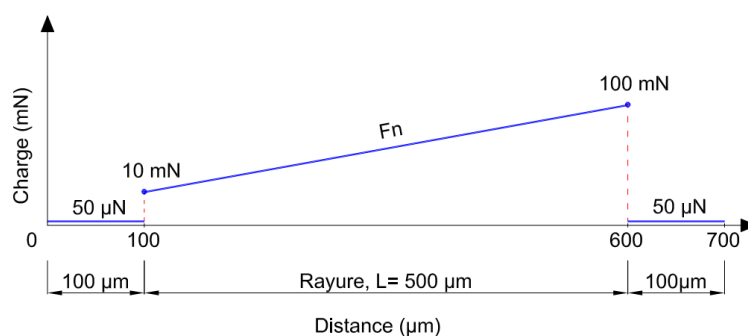


Figure 2.3.7. Schéma représentatif de la charge des étapes de palpation initial, de rayure et de palpation final

Le test comprend les 4 étapes suivantes:

*Étape 1* : Palpation initial. Il donne la topographie de surface. Le profil initial de la surface est vérifié par un rayage à une charge très faible (environ 50  $\mu\text{N}$ ). Pour cela, une topographie de 700  $\mu\text{m}$  en longueur du profil de la surface est enregistrée.

*Étape 2* : Exécution de la rayure. D'abord, le profil de la surface est déterminé sur une longueur de 100  $\mu\text{m}$  avec une charge de 0,05 mN. Ensuite, une rayure est réalisée par le nano-indenteur à partir de la position de 100  $\mu\text{m}$  jusqu'à la position de 600  $\mu\text{m}$  du profil de la surface (qui est déterminé à l'étape 1). La charge est augmentée de 10 à 100 mN. En terminant, le profil de la surface est aussi vérifié à la charge de 0,05 mN sur une distance de 100  $\mu\text{m}$  (Figure 2.3.7).

*Étape 3* : Vérification du profil résiduel de la rayure par le palpation final. Après le rayage, en raison de l'élasticité du matériau, la rayure peut être rétablie. Cette étape est réalisée pour déterminer le profil résiduel de la rayure après le test. Pour cela, une charge très faible (environ 50  $\mu\text{N}$ ) est appliquée.

Étape 4 : Vérification du profil transversal. La charge est de 50 % de la charge finale appliquée, i.e. 50 mN. Elle est positionnée à 350  $\mu\text{m}$  du début de la rayure.

### 2.3.10. Test de bioactivité *in vitro* utilisant un fluide corporel simulé (SBF)

Le fluide corporel simulé (SBF, § 1.4.4 Chapitre 1) est une solution contenant des ions comme ceux qui existent dans le corps humain. Il est utilisé largement pour déterminer la bioactivité osseuse des implants (11–13).

Dans la thèse, nous avons utilisé cette méthode (11,14) pour vérifier la bioactivité du dépôt de Ca-P obtenu par la voie sol-gel et par les bains « autocatalytiques ». La composition du SBF est présentée dans le Tableau 2.6 et les produits chimiques avec les quantités utilisées pour préparer un litre de la solution SBF sont donnés dans le Tableau 2.7.

Dans cette expérience, les échantillons sont immergés dans la solution SBF à 37°C (11,14), pendant 1, 2 ou 4 semaine (s). La solution SBF est renouvelée tous les 7 jours.

Tableau 2.6. Concentration des ions du plasma de corps humain et dans la solution de SBF dite de type c (c-SBF) (11)

	Concentration des ions (mM)								pH
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	
Plasma du corps humain	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5	7,2-7,4
SBF (type c)	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5	7,4

Tableau 2.7. Produits et quantités utilisées pour préparer 1L de solution SBF

Ordre	Produit chimique	Pureté (%)	Quantité (g/L)
#1	Chlorure de sodium, NaCl	99,5	8,035
#2	Bicarbonate de sodium, NaHCO <sub>3</sub>	100	0,353
#3	Chlorure de potassium, KCl	99	0,226
#4	Phosphate de potassium, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	99	0,231
#5	Chlorure de magnésium, MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	99	0,308
#6	Chlorure d'hydrogène, HCl 1M	100	39 mL
#7	Chlorure de calcium, CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	99	0,371
#8	Sulfate de sodium, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	99,99	0,071
#9	Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane, (CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	tampon	6,057
#10	HCl 1M	ajustant pH	1 mL

Les concentrations de calcium et de phosphore dans la solution SBF sont analysées aux différentes périodes comme 2, 4, 7, 14, et 28 jours. Ces analyses ont été faites par colorimétrie et ont

été réalisées par Mme Céline Kiefer, technicienne chimiste à l'IPCMS, avec un spectromètre UV-Visible Lambda 950 UV/VIS (Perkin Elmer).

La morphologie de la surface des échantillons après 1, 2 et 4 semaine(s) dans la solution SBF est observée au MEB/EDS-X. De plus, l'analyse structurale est réalisée par DRX et MET. A titre d'exemple en Figure 2.3.8, nous présentons la croissance d'HA après 1 semaine dans la solution SBF sur la surface de l'échantillon TS-HA2.

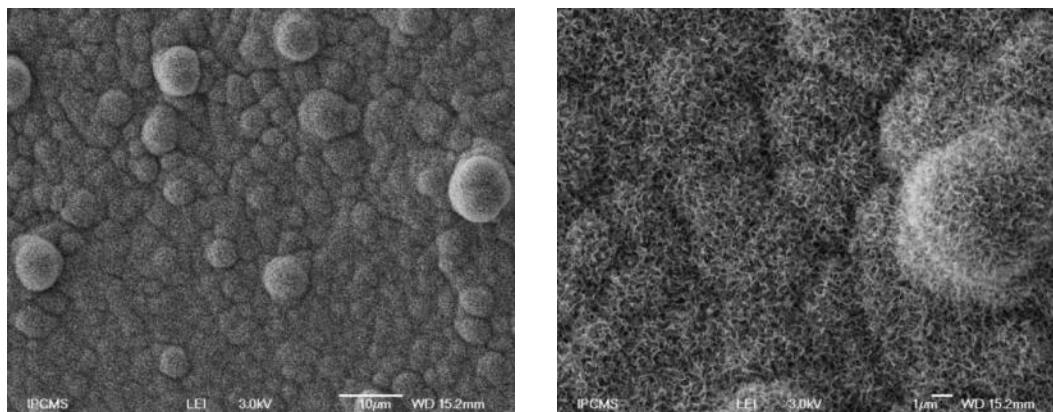


Figure 2.3.8. Morphologie de surface de l'échantillon TS-HA2 après une semaine dans la solution SBF aux différentes échelles. Une couche homogène et uniforme de Ca-P est observée

### 2.3.11. Dosage du phosphore par la méthode de BRIGGS

La méthode de BRIGGS est un dosage colorimétrique qui permet de déterminer la concentration du phosphore dans une solution (15). Cette analyse est utilisée pour vérifier la concentration du phosphore dans la solution SBF aux différentes périodes d'immersion de l'échantillon.

En principe, en milieu acide les ions phosphates libres comme  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  forment avec les ions molybdates un complexe phosphomolybdique jaune instable. Ce complexe est réduit pour former un complexe phosphomolybdique-molybdeux stable qui a une couleur bleu. Ce complexe absorbe le rayonnement ultraviolet à 700 nm.

Après construction d'une équation linéaire de la concentration de phosphore en fonction de l'absorbance UV à 700 nm à partir des solutions de concentration connue, on peut faire une interpolation pour calculer la concentration du phosphore dans la solution d'analyse. Les étapes d'analyse sont réalisées comme suit.

Préparation de la gamme d'étalonnage :

Étape 1 : Étalonnage

A partir d'une solution étalon à 1 mM de phosphate, on réalise une gamme de 6 tubes numérotés de 0 à 5 comme décrit dans le Tableau 2.8.

Tableau 2.8. Préparation des solutions d'étalonnage

Tube	0	1	2	3	4	5	Échantillon d'analyse
Volume (mL) de solution étalon à 1 mM de phosphate	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	0
Volume (mL) d'eau distillée	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0	0
Volume (mL) de solution d'analyse	0	0	0	0	0	0	1,0
Réactif molybdique (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Hydroquinone à 10 g/L (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Sulfite de sodium à 200 g/L (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Absorbance UV à 700 nm	A0	A1	A2	A3	A4	A5	A <sub>analyse</sub>

Étape 2 : Détermination de l'équation linéaire de la concentration de phosphore en fonction de l'absorbance UV à 700 nm. La Figure 2.3.9 illustre l'équation linéaire de la concentration en phosphore en fonction de l'absorbance UV,  $y = ax + b$  où  $x$  est la concentration en phosphore en mM,  $y$  est l'absorbance UV et  $a$  et  $b$  sont des constantes.

Par remplacement de la valeur d'absorbance mesurée sur l'échantillon d'analyse ( $A_{\text{analyse}}$ ) dans l'équation étalon, on peut calculer la concentration du phosphore de l'échantillon d'analyse.

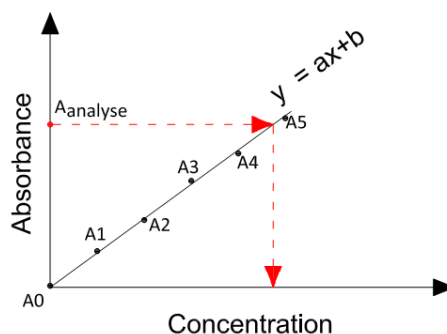


Figure 2.3.9. Schéma d'illustration de l'équation linéaire d'étalonnage du phosphore. La concentration de l'échantillon d'analyse est déterminée à partir de l'absorbance de cet échantillon en utilisant l'équation d'étalonnage

### 2.3.12. Dosage du calcium par colorimétrie

Cette méthode d'analyse est appliquée pour déterminer la concentration du calcium dans la solution SBF aux différentes périodes d'immersion de l'échantillon.

En milieu acide, le calcium forme avec le bleu de méthylthymol un complexe bleu dont l'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration en calcium. Ce complexe absorbe le rayonnement ultraviolet à 610 nm. En présence d'hydroxy-8-quinoléine l'interférence due au magnésium est éliminée. Des solutions étalons sont préparées :

Étape 1 : Préparation des solutions



Les solutions de calcium sont préparées à partir d'une solution de  $\text{CaCO}_3$  dans l'eau distillée à la concentration de 250 mg/L en  $\text{CaCO}_3$ , correspondant à 2,5 mM en Ca, comme décrit dans le Tableau 2.9.

Tableau 2.9. Préparation des solutions de calcium pour la droite d'étalonnage

Solution de calcium	0	1	2	3	4	5	6
Volume (mL) à prélever de la solution mère [ $\text{Ca}^{2+}$ ] = 2,5 mM	0	0,8	2	4	6	8	10
Volume (mL) d'eau distillée	20	19,2	18	16	14	12	10
Concentration en calcium pour les solutions étalons (mM)	0	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0	1,25

Solution tampon : 1,55 mg NaOH et 12,02 mg KCl dans 1000 mL d'eau distillée, pH=12,6.

Réactif colorimétrique : 0,104 mg bleu de méthylthymol et 1,5 mg hydroxy-8-quinoléine dans 1000 mL d'eau distillée.

Étape 2. Détermination de l'équation linéaire de la concentration en calcium en fonction de l'absorbance UV à 610 nm. Le Tableau 2.10 présente les solutions étalons pour le dosage du calcium.

Tableau 2.10. Préparation des solutions étalons

Tube	0	1	2	3	4	5	6	Échantillon à analyser
Volume de solution de calcium ( $\mu\text{L}$ )	50	50	50	50	50	50	50	0
Volume ( $\mu\text{L}$ ) de solution à analyser	0	0	0	0	0	0	0	50
Volume (mL) de solution tampon	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Volume (mL) de réactif	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Absorbance UV à 610 nm	A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	$A_{\text{analyse}}$

Étape 3. La détermination de la concentration du Ca est réalisée comme pour l'analyse de la concentration du phosphore.

### 2.3.13. *In vitro* cytocompatibility tests

After depositing the Ca-P layer, some specimens were sent at Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Department of Health Sciences, Laboratory of Biomedical and Dental Materials, Italy) to test the *in vitro* cytocompatibility of the coating as well as the cell viability.

Human osteoblasts-like osteosarcoma cells were used for experiments (MG63, ATCC CRL-1427). Cells were cultivated in Dulbecco Modification Eagles Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented with 10 % foetal bovine serum (FBS, Sigma) and 1 % antibiotics (penicillin-streptomycin) at 37°C, 5 %  $\text{CO}_2$ . Cells were cultivated until 80-90 % confluence, detached with trypsin-EDTA solution (0.05 % in phosphate buffered saline (PBS), Sigma), collected, and used for assays.

Cylinders of 15 mm diameter and 2 mm thickness were used for *in vitro* cytocompatibility assays. All specimens were sterilized by ethanol (70 % in PBS) immersion overnight (o.n.) and washed 3 times with PBS (10 min each) prior to use with cells.

#### **a) Indirect cytocompatibility evaluation**

All specimens were separately placed into the wells of a 12 multiwell plate (CellStar, VWR-PBI International, Milan, Italy) and submerged 1 week with 3 mL of fresh serum-free medium (DMEM) at 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Afterwards, surnatants were collected, supplemented with FBS (10 %) and used to cultivate cells. Osteoblasts were seeded at a final density of 1x10<sup>4</sup> cells/well and cultivated with specimen surnatants (1 mL each); cells cultivated with fresh medium were used as control.

After 24 and 72 h, cells viability was evaluated by the colorimetric metabolic 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (MTT, Sigma). Briefly, 100 µL of MTT solution (3 mg/mL in PBS) were added to each well and plate was incubated 4 h at 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> in the dark; afterwards, liquid was removed from each well and the formazan crystals were dissolved with 100 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma).

Solutions were collected into 1.5 mL tubes and centrifuged in order to remove eventually debris; then 50 µL were collected from each tube and spotted into a 96 wells plate. Samples optical density (o.d.) was measured at 570 nm with a spectrophotometer (Spectra Count, Packard Bell, Chicago, USA). Controls optical density was considered as 100 % viability and test samples as function of it. Experiments were performed in triplicate.

As further control of cells state, the morphology was daily visually checked with a light microscope (Leica AF 6500, Leica Microsystems, Basel, Switzerland).

#### **b) Direct cytocompatibility evaluation**

Specimens were placed into the wells of 12 multiwell plate and cells were seeded in a defined number (1x10<sup>4</sup> cells/ sample) directly onto specimen surface (1 mL each). Cells were cultivated in DMEM 10 % FBS 1% antibiotics at 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>; the viability was checked after 1 and 7 day(s) after seeding by the MTT assay as described for the not direct assay. The o.d. of cells cultivated onto not-treated titanium was considered as control.

After each medium-change (days 1-3-7), surnatants were collected and the presence of detached necrotic cells was evaluated by the trypan blue staining; briefly, a defined volume (200 µL) of each surnatant was mixed with an equal volume of trypan blue and dead cells number was evaluated by counting with a Burker-Turk camera. Experiments were performed in triplicate.

### c) Cells morphological analysis

The morphology of cells cultivated directly onto specimen surface was evaluated by immunofluorescence staining (IF) and scanning electron microscopy (SEM).

For IF staining, cells were fixed with formaldehyde (3.7 % in PBS supplemented with 3% (w/v) sucrose) 20 min at 4°C and then washed carefully with PBS; cells were stained with phalloidin (AbCam, 1:500 in PBS, 45 min) to visualize cytoskeleton F-actins filaments and then co-stained with DAPI (Sigma, 1:200 in PBS, 20 min) in order to visualize nuclei. Samples were visualized with a fluorescence microscope (Leica AF 6500, Leica).

For SEM analysis, samples were fixed with glutaraldehyde (Sigma, 2.5 % in PBS) 20 min at room temperature, dehydrated with alcohols scale (70-90-100 %, 10 min each) and finally treated with hexamethyldisilazane (Sigma). Samples were then mounted onto SEM aluminium stubs, using a conductive carbon tape, coated with a thin carbon layer (10 nm) and observed using a StereoScan 360 SEM (Cambridge) at 10 kV with various magnifications, using secondary electrons.

### d) Cells proliferation

The proliferative state of cells seeded directly onto specimens was evaluated by the Proliferative Cell Nuclear Antigen (PCNA, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) staining following manufacturer's instructions. Briefly, after fixing samples with formaldehyde (2.5 % in PBS, 20 min at 4°C), DNA was denaturated by incubation with 2N HCl 1 h at 37°C; then, samples were neutralized with sodium borate (0.1 M, 20 min, room temperature) and cells permeabilised with Triton x100 (0.2 % in PBS, 20 min at 4°C). The primary anti-PCNA antibody (1:150 in PBS 1 % Normal Goat Serum (NGS) 0.05 % Tween 20) was added for 1 h at room temperature to each samples and, after carefully washing with PBS, the appropriate secondary antibody (anti-rabbit TxRed, 1:250 in PBS 1 % NGS) was used in order to stain the proliferating cells. Specimens were visually analyzed by fluorescent microscope (Leica AF 6500).

### e) Statistical analysis of data

Statistical analysis was performed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS v20.0, IBM Co., Armonk, NY, USA). Analysis was done using Levene's test and ANOVA one-way followed by Sheffè post-hoc. Significance level was considered to be  $p < 0.05$ .

#### **2.3.14. Évaluation qualitative de la porosité de la couche de titanate de sodium**

Dans le Chapitre 3, nous présenterons la morphologie poreuse du titanate de sodium obtenu par un traitement alcalin et un traitement thermique. De façon expérimentale, nous avons évalué qualitativement le taux de porosité de la surface de titanate de sodium (Chapitre 3) en utilisant le logiciel de traitement d'images, ImageJ. Nous avons mesuré la taille moyenne de tous les pores de la

couche de titanate de sodium visibles sur les images MEB de grossissement X12000 et X25000. Pour cela, nous avons d'abord choisi deux régions de  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  sur chaque échantillon (Figure 2.3.10). Ensuite, nous avons mesuré la taille de tous les trous dans ces régions. Le nombre de trous par région a été compté. Enfin, la porosité a été calculée comme le pourcentage de la superficie des trous par unité de surface.

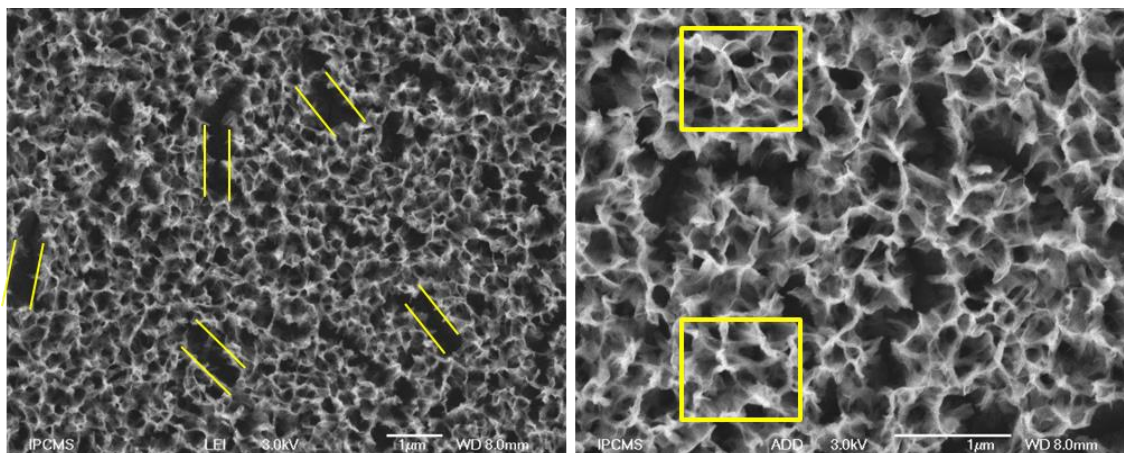


Figure 2.3.10. Image d'illustration de la pixellisation de la porosité du titanate de sodium

## Références

1. Leonor IB, Reis RL. An innovative auto-catalytic deposition route to produce calcium–phosphate coatings on polymeric biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 2003;14(5):435–41.
2. Oliveira JM, Leonor IB, Reis RL. Preparation of bioactive coatings on the surface of bioinert polymers through an innovative auto-catalytic electroless route. *Key Eng Mater*. 2005;284:203–6.
3. Eberhart J-P. Analyse structurale et chimique des matériaux. Édition : Nouvelle. Paris: Dunod; 1997. 611 p.
4. Stutman JM, Termine JD, Posner AS. Vibrational Spectra and Structure of the Phosphate Ion in Some Calcium Phosphates. *Trans N Y Acad Sci*. 1965;27(6 Series II):669–75.
5. Fowler BO. Infrared studies of apatites. I. Vibrational assignments for calcium, strontium, and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitution. *Inorg Chem*. 1974;13(1):194–207.
6. Dg N, Jd F. Preparation, analysis, and characterization of carbonated apatites. *Calcif Tissue Int*. 1981 Dec;34 Suppl 2:S69–81.
7. Koutsopoulos S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. *J Biomed Mater Res*. 2002;62(4):600–12.
8. Buschman HP, Deinum G, Motz JT, Fitzmaurice M, Kramer JR, van der Laarse A, et al. Raman microspectroscopy of human coronary atherosclerosis: biochemical assessment of cellular and extracellular morphologic structures in situ. *Cardiovasc Pathol*. 2001;10(2):69–82.
9. Fischer-Cripps AC. Nanoindentation. Springer; 2004. 290 p.

10. Pelletier H, Carradò A, Faerber J, Mihailescu IN. Microstructure and mechanical characteristics of hydroxyapatite coatings on Ti/TiN/Si substrates synthesized by pulsed laser deposition. *Appl Phys A*. 2011 Mar 1;102(3):629–40.
11. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006 mai;27(15):2907–15.
12. Li P, Groot K, Kokubo T. Bioactive Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> composite coating prepared by sol-gel process. *J Sol-Gel Sci Technol*. 1996;7(1):27–34.
13. Kokubo T. Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. *Acta Mater*. 1998;46(7):2519–27.
14. Oyane A, Kim HM, Furuya T, Kokubo T, Miyazaki T, Nakamura T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *J Biomed Mater Res A*. 2003;65(2):188–95.
15. Perrier R, Kemp TAV der, Zonszain F. *Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques*. Wolters Kluwer France; 1997. 492 p.

**Chapitre 3.**  
**Élaboration et caractérisation**  
**de l'inter-couche sur Ti-6Al-4V**



## **Chapitre 3.**

# **Élaboration et caractérisation de l'inter-couche sur Ti-6Al-4V**

3.1. Caractérisation du substrat Ti-6Al-4V après le traitement acide (Kroll) .....	66
3.1.1. Analyse structurale du substrat Ti-6Al-4V par diffraction de rayons X (DRX) .....	66
3.1.2. Observation de la surface du substrat au MEB après le traitement Kroll .....	67
3.2. Traitement alcalin-thermique pour Ti-6Al-4V .....	70
3.2.1. Formation d'une couche d'hydrogel de titanate de sodium sur la surface du Ti-6Al-4V par un traitement alcalin .....	70
3.2.2. Structure et morphologie de la couche de titanate de sodium après le traitement thermique .....	74
3.2.3. Étude de l'interface titanate de sodium-substrat.....	80
3.3. Étude de la formation de titanate de sodium par traitement alcalin-thermique pour l'échantillon en poudre de titane.....	80
Conclusions .....	85
Références .....	86



Ce chapitre a pour but de caractériser la morphologie de la surface de Ti-6Al-4V ELI après le traitement acide, et après le traitement alcalin-thermique (Chapitre 1, §1.2). Celui-ci permet la formation d'une couche de titanate de sodium sur la surface du substrat. Pour mieux comprendre les réactions impliquées dans la formation de la couche de titanate de sodium, un traitement alcalin-thermique identique a été effectué sur une poudre de titane métal.

Dans la première partie du chapitre, nous caractérisons la structure de l'alliage Ti-6Al-4V que nous utilisons dans cette thèse et présentons l'influence du traitement acide (appelé Kroll) sur la morphologie de la surface du substrat.

Dans une deuxième partie, nous caractérisons la couche formée après l'immersion dans la soude (traitement alcalin, NaOH) et sa transformation après le traitement thermique. Plusieurs paramètres, comme la concentration de la soude, sa température, la durée d'immersion sont étudiés.

Dans une troisième partie, nous comparons ces résultats aux phases observées dans les mêmes conditions à partir de poudre de titane.

### **3.1. Caractérisation du substrat Ti-6Al-4V après le traitement acide (Kroll)**

Les échantillons de 20 mm de diamètre et de 1,5 mm d'épaisseur sont d'abord coupés et polis comme décrit dans le Chapitre 2, §2.1.1. Puis ils sont traités dans la solution Kroll pendant 1, 2, 3, 5 et 10 min (voir Chapitre 2, §2.1.2). Dans cette partie, nous avons étudié la structure cristalline du substrat avant et après le traitement Kroll, ainsi que sa morphologie.

#### **3.1.1. Analyse structurale du substrat Ti-6Al-4V par diffraction de rayons X (DRX)**

Les diffractogrammes sont enregistrés pour les substrats avec un diffractomètre dans la plage angulaire en  $2\theta$  de 5 à 80° par pas de 0,03° et avec un temps de comptage de 4 s. Les diagrammes observés avant et après traitement Kroll sont identiques (Figure 3.1.1). En les comparant aux diagrammes donnés dans la base JCPDS, nous pouvons conclure que la phase isomorphe de la phase  $\alpha$  ( $Ti_\alpha$ ) est majoritaire mais texturée. En effet, les intensités des pics 100 et 101 sont inversées. Cette phase majoritaire correspond à la phase  $Ti_{0,862}V_{0,036}Al_{0,102}$  c'est-à-dire à l'alliage Ti-6Al-4V de composition massique Ti : 90% Al : 6 % V : 4 %. Le pic le plus intense de la phase  $\beta$  ( $Ti_\beta$ ) est aussi présent (1,2). Le pic ( $2\theta$ ) à 39,4° correspond au pic le plus intense de la phase  $Ti_{0,8}V_{0,2}$ .

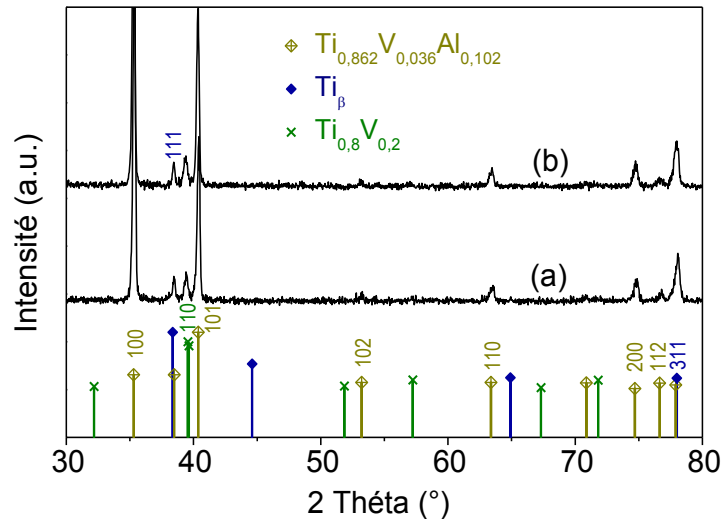


Figure 3.1.1. Diagrammes de diffraction des Rayons X (DRX) sur les substrats Ti-6Al-4V « poli miroir » (a) et après un traitement Kroll de 3 min (b). Pics de diffraction des phases  $Ti_{0,862}V_{0,036}Al_{0,102}$  (JCPDS 02-8708) isomorphe de la phase  $\alpha$  de titane (JCPDS 01-8963), phase  $\beta$  de titane (JCPDS 88-2321) et  $Ti_{0,8}V_{0,2}$  (JCPDS 03-2228)

### 3.1.2. Observation de la surface du substrat au MEB après le traitement Kroll

La Figure 3.1.2 présente des images observées au microscope électronique à balayage (MEB) et les spectres d'analyse dispersive en énergie (EDS-X) de la surface du Ti-6Al-4V avant le traitement Kroll (Figure 3.1.2 a) et après 1, 2, 3, 5 et 10 min d'immersion dans la solution Kroll (Figure 3.1.2 b à f). Nous avons constaté qu'une couche mince est retirée de la surface du substrat, et qu'une nouvelle morphologie de la surface apparaît après le traitement acide.

Après 1 min d'immersion dans la solution Kroll (Figure 3.1.2 b), nous avons remarqué que le substrat Ti-6Al-4V a été attaqué (noté région attaquée), et a fait apparaître de petites zones visibles à la surface (« îlots »). Ces zones sont de plus en plus visibles quand la durée d'immersion augmente (Figure 3.1.2 c à f). La surface de l'échantillon traité dans la solution Kroll pendant 3 min (Figure 3.1.2 d) présente deux morphologies différentes :

- 1) une surface comportant des petits trous et ressemblant à des « nids d'abeille » (région S1) ;
- 2) des reliefs isolés de quelques centaines de nanomètres à quelques micromètres (région S2).

Pour les échantillons traités dans la solution Kroll pendant 5 et 10 min (Figure 3.1.2 e et f), les trous de type « nids d'abeille » ont disparu (région S1).

Sur la Figure 3.1.3, nous présentons les spectres d'analyse dispersive en énergie (spectre EDS-X) enregistrés sur la surface de l'échantillon Kroll pendant 5 min, sur les « îlots » (région S2) et sur le « fond » (région S1). Nous avons constaté que le vanadium n'est pas détecté sur le fond (région S1) parce que la concentration est trop faible. Les « îlots » (région S2) sont plus riches en vanadium que la

région S1. Le pic de l'aluminium est plus faible que pour la région S1, mais peut provenir de la zone qui se trouve au-dessous de l'îlot.

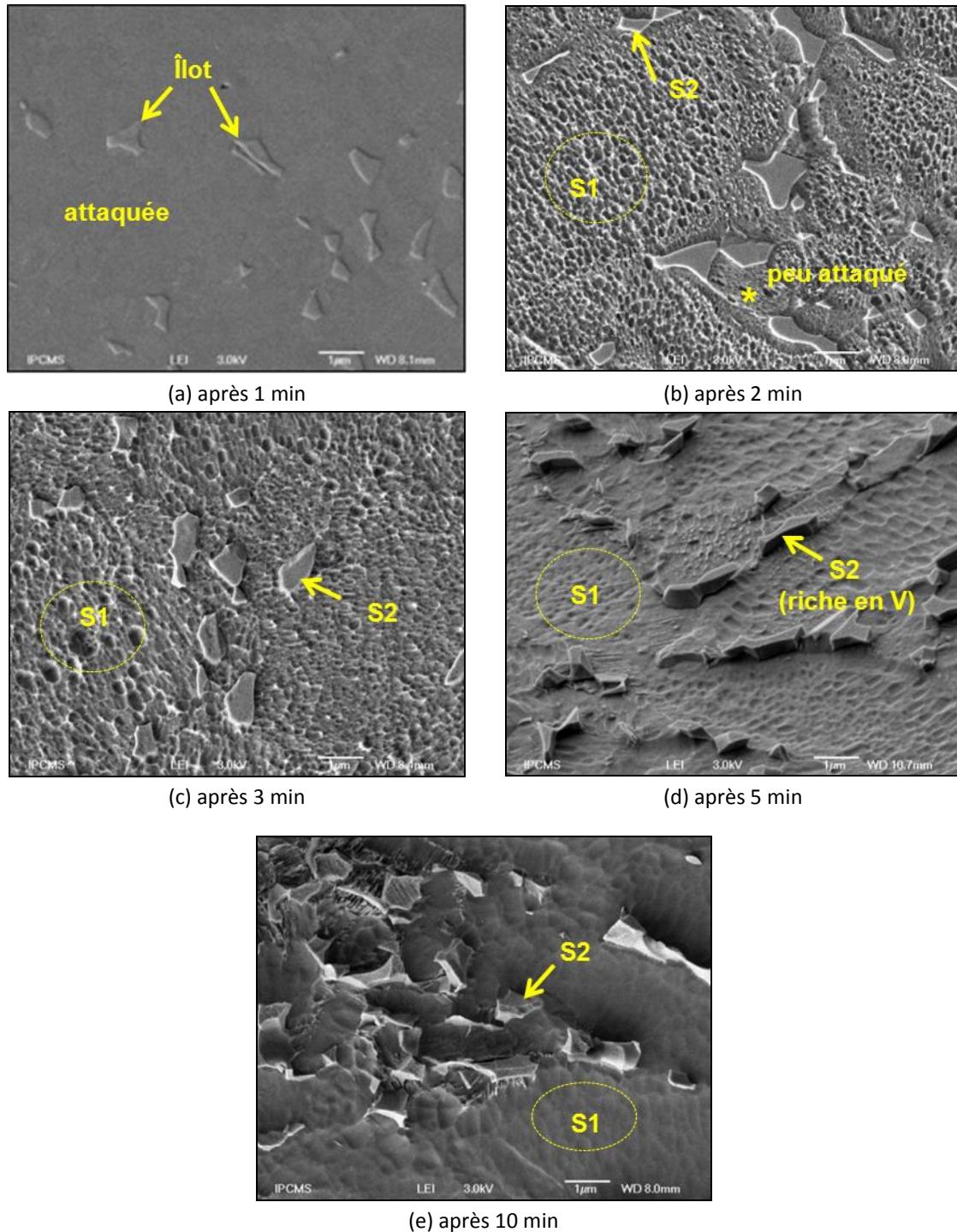


Figure 3.1.2. Observation au microscope électronique à balayage (MEB) de la surface du substrat Ti-6Al-4V après une immersion dans la solution Kroll à température ambiante pendant 1, 2, 3, 5 et 10 min

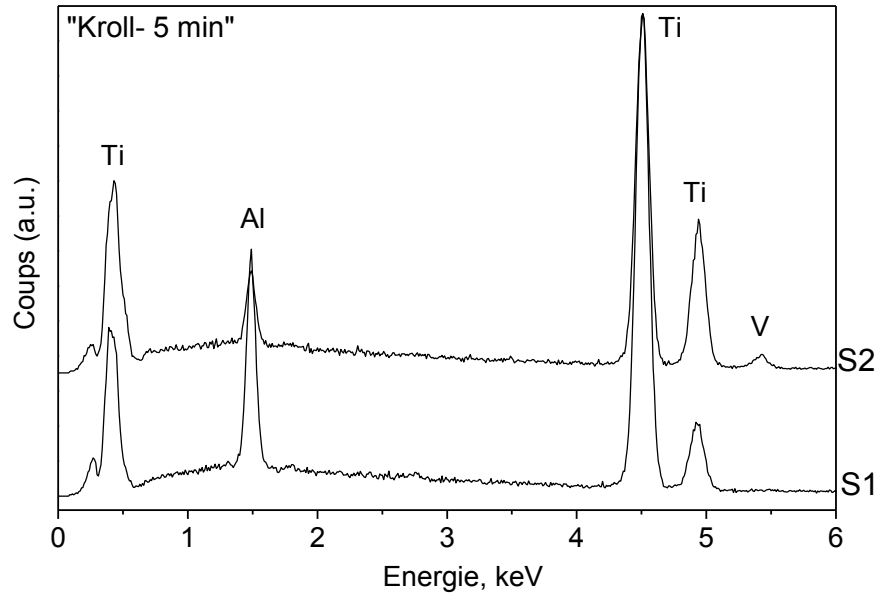
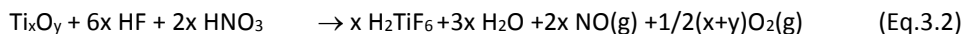
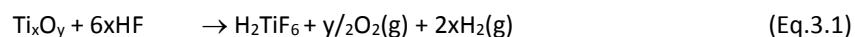
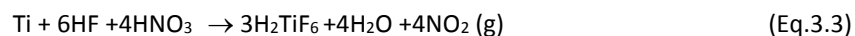


Figure 3.1.3. Spectre d'analyse dispersive en énergie (EDS-X) de la surface du Ti-6Al-4V après un traitement Kroll de 5 min. Les positions de l'analyse (S1 et S2) sont indiquées dans la Figure 3.1.2 d

Les diagrammes DRX et les observations MEB permettent de conclure que le substrat de Ti-6Al-4V est formé de trois phases, une phase majoritaire isomorphe de la phase  $\alpha$  et texturée, et deux phases minoritaires, l'une isomorphe de la phase  $\beta$  et l'autre de composition  $Ti_{0,8}V_{0,2}$ . Cette dernière forme les îlots qui apparaissent après l'attaque Kroll (1). Les réactions chimiques entre le substrat de titane et la solution Kroll ont été décrites par Say and Tsai (3). La couche passive  $Ti_xO_y$  qui recouvre le substrat réagit avec HF et  $HNO_3$ . Cette couche épaisse d'environ 3 à 7 nm (4) comporte des imperfections structurales, des lacunes et des interstices. Plusieurs réactions se produisent et conduisent à la formation de  $H_2TiF_6$  qui se détache de la surface à cause du dégagement gazeux.



Ensuite, le Ti du substrat est attaqué par les acides:



Au lavage de l'échantillon, les produits de réaction quittent la surface. Une surface propre est donc obtenue. Le traitement Kroll a ôté la couche mince passive d'oxyde de titane et les contaminations sur la surface du substrat. Nous utiliserons dans la suite un traitement Kroll de 3 min qui permet de nettoyer la surface sans que les « îlots » soient trop marqués.

### 3.2. Traitement alcalin-thermique pour Ti-6Al-4V

Après le traitement Kroll de 3 min, les échantillons sont ensuite traités dans une solution NaOH comme décrit dans le Chapitre 2, §2.1.3 pour former à la surface une couche de titanate de sodium. Pour stabiliser la couche de titanate de sodium, les échantillons sont traités thermiquement à 630°C pendant 1 h avec une montée de 5°C/min. Les noms des échantillons et les traitements réalisés sont donnés dans le Chapitre 2, Tableau 2.2.

#### 3.2.1. Formation d'une couche d'hydrogel de titanate de sodium sur la surface du Ti-6Al-4V par un traitement alcalin

Comme observé par plusieurs auteurs (5–8) après un traitement alcalin, une couche de titanate de sodium ( $\text{Na}_x\text{Ti}_y\text{O}_z$ ) se forme sur la surface des implants de titane. La structure du revêtement de titanate de sodium a été analysée par DRX. Les balayages ont été réalisés sur une plage angulaire variant de 10 à 60° par pas de 0,03° avec un temps de comptage de 20 s. Deux régions de 34,6 à 35,7° et de 39,9 à 40,8° qui correspondaient aux pics les plus intenses de la phase de  $\text{Ti}_\alpha$ , ont été coupées pour ne pas endommager le détecteur.

Les Figures 3.2.1 et 3.2.2 présentent les DRX des échantillons traités dans une solution NaOH 5 et 10 M respectivement avant recuit à 630°C pendant 1 h.

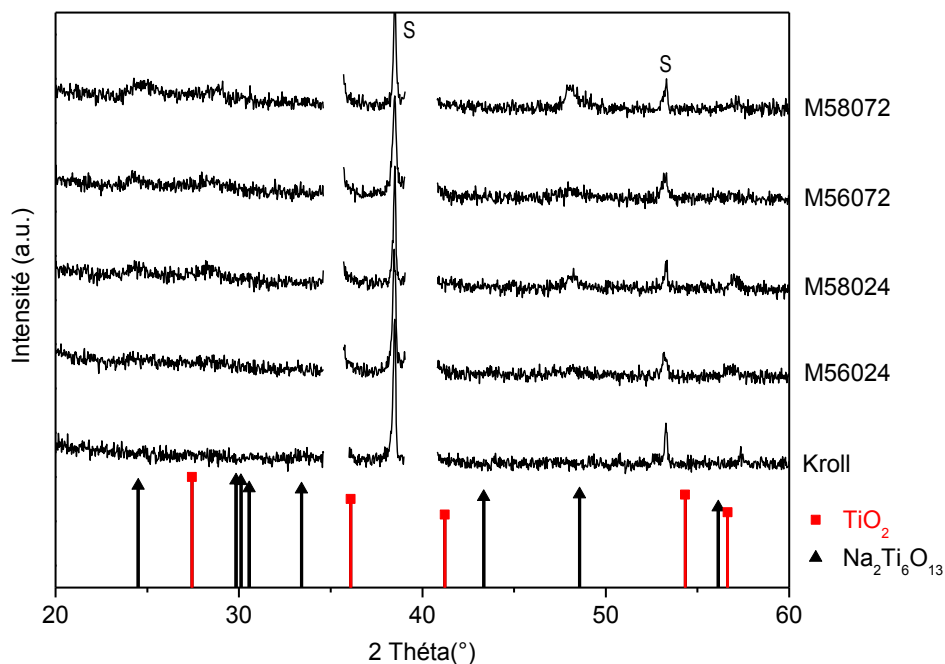


Figure 3.2.1. DRX des échantillons : Ti-6Al-4V traité dans la solution Kroll (Kroll), et dans la solution NaOH 5 M 24 h à 60°C (M56024), 24 h à 80°C (M58024), 72 h à 60°C (M56072) et 72 h à 80°C (M58072) (voir nomenclature dans le Tableau 2.2). Pics de diffraction du titanate de sodium  $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$  (JCPDS 77-9461) et du rutile  $\text{TiO}_2$  (JCPDS 21-1276). Les pics du substrat sont notés « S »

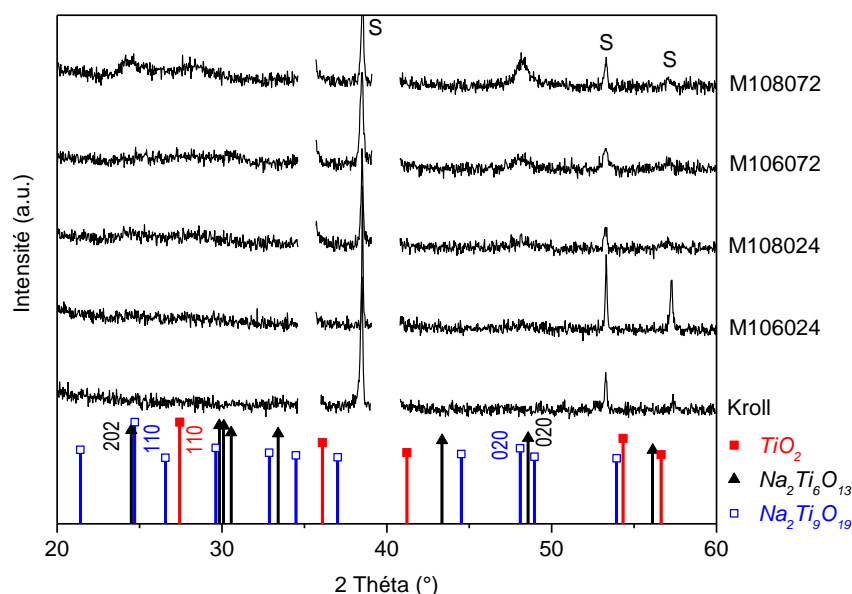


Figure 3.2.2. DRX des échantillons : Kroll, M106024, M108024, M106072 et M108072 (voir Tableau 2.2). Pics de diffraction du titanate de sodium  $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$  (JCPDS 77-9461),  $\text{Na}_2\text{Ti}_9\text{O}_{19}$  (JCPDS12-6163) et du rutile  $\text{TiO}_2$  (JCPDS 21-1276). Les pics du substrat sont notés « S »

Après le traitement alcalin, la couche est amorphe ou formée de grains nanométriques (9). Des pics de titanate de sodium sont visibles sur les diagrammes des échantillons traités 72 h et/ou à 80°C (Figures 3.2.1 et 3.2.2).

Les analyses EDS-X ont indiqué que la couche poreuse obtenue sur la surface du substrat après un traitement alcalin est composée des éléments Ti, Na et O. Ces résultats sont conformes aux travaux antérieurs qui montrent que les réactions entre Ti et NaOH produisent une couche de gel de  $\text{Ti}(\text{OH})_4$  et  $\text{HTiO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  (10), ou de  $\text{Na}_x\text{H}_{2-x}\text{Ti}_3\text{O}_7$  (11). Ces gels forment un réseau poreux avec des trous de quelques centaines de nanomètres.

Sur la Figure 3.2.3, nous présentons la morphologie de la surface des échantillons traités avec la solution NaOH 5 M à différentes températures, pendant une durée de 24 et 72 h. Pour l'échantillon M56024, nous avons observé sur sa surface quelques trous de 420 à 550 nm de largeur et 2 à 3  $\mu\text{m}$  de longueur. Cependant, aucun trou n'est visible sur les autres échantillons. Cela s'explique peut-être par le fait que la couche d'hydrogel de titanate de sodium sur l'échantillon M56024 est très mince, des trous sont donc visibles car cette couche d'hydrogel de titanate de sodium n'a pas encore enrobé toute la surface du substrat. Toutefois, à température plus élevée (80°C), les réactions entre Ti et NaOH se produisent plus rapidement. Avec une durée plus longue (72 h), la couche d'hydrogel de titanate de sodium devient plus épaisse et recouvre alors toute la surface du substrat.

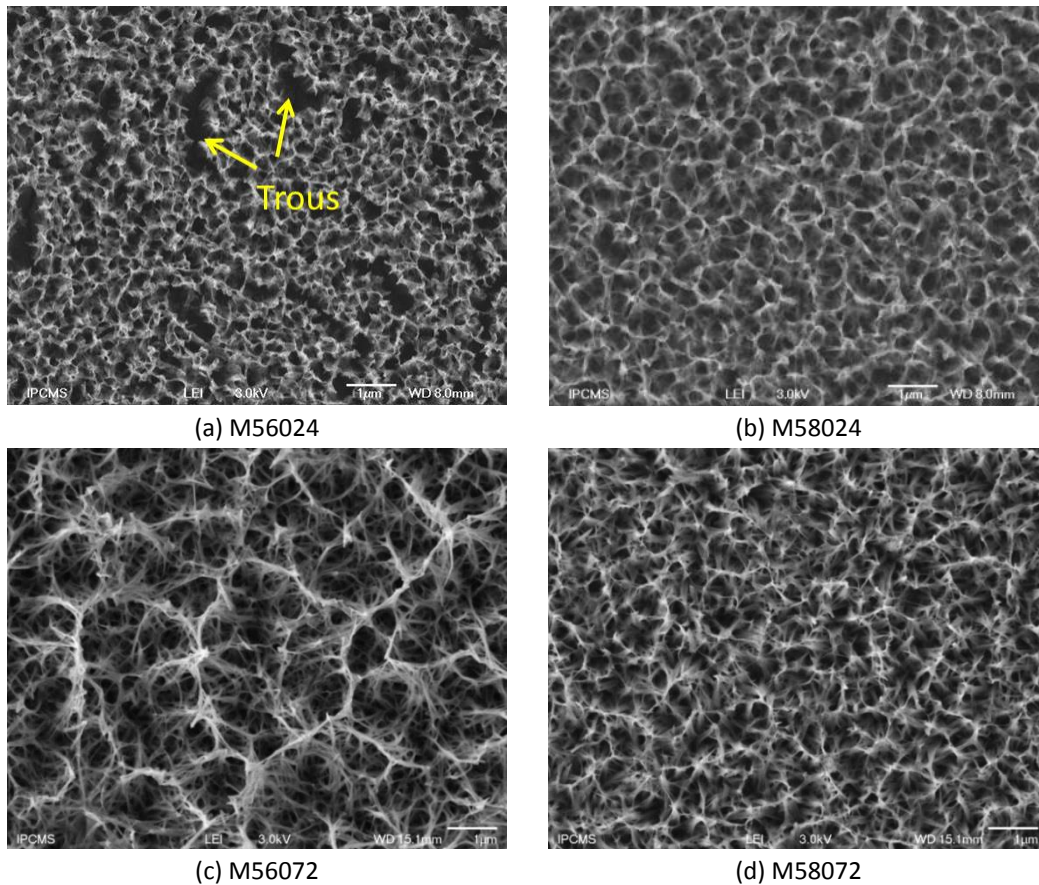


Figure 3.2.3. Morphologie de la surface des substrats (voir Tableau 2.2) après un traitement alcalin dans une solution NaOH 5 M (échelle 1  $\mu\text{m}$ )

Sur la Figure 3.2.4, nous montrons la morphologie de la surface des échantillons traités par une solution NaOH 10 M pendant une durée de 24 ou 72 h, à 60 ou 80°C. Pour les échantillons M106024 et M108024, on observe un réseau de longues fissures. La taille des fissures est de 320 à 380 nm de largeur pour l'échantillon M106024, et de 240 à 340 nm de largeur pour l'échantillon M108024. Cela peut s'expliquer par le fait que dans la solution NaOH 10 M, les réactions entre Ti et NaOH se sont produites plus vite que dans la solution NaOH 5 M. La couche de gel est alors plus épaisse. Lorsque les échantillons sont conservés en milieu ambiant ou mis sous vide dans le MEB, la couche d'hydrogel de titanate de sodium se contracte, ce qui provoque des fissures à la surface. Toutefois, pour les échantillons ayant subi un traitement alcalin de 72 h (Figure 3.2.4 c et d), le réseau de fissures n'apparaît pas clairement. Lorsque la couche d'hydrogel de titanate de sodium est plus épaisse, l'évaporation de l'eau est plus lente et la contraction est donc plus faible. C'est la raison pour laquelle la fissure sur l'échantillon M106024 est plus grande que sur les autres.

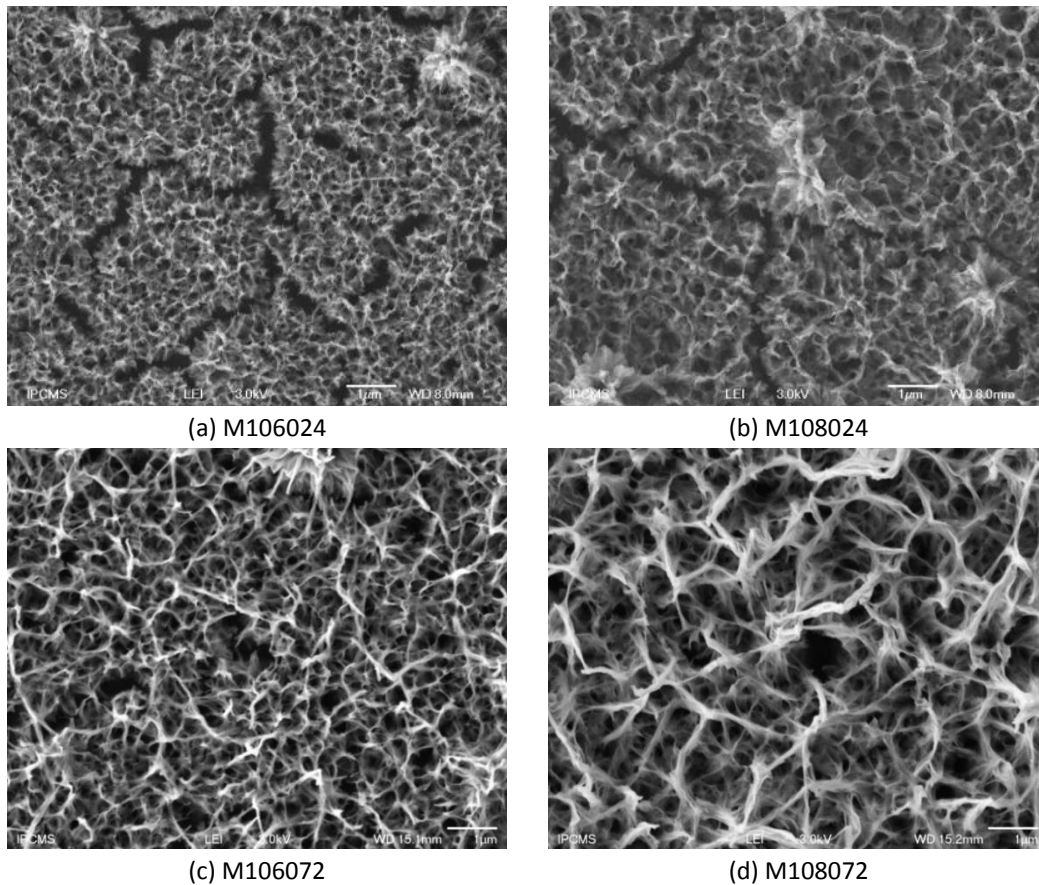


Figure 3.2.4. Morphologie de la surface des substrats (voir Tableau 2.2) après un traitement alcalin dans une solution NaOH 10M (échelle 1  $\mu\text{m}$ )

Les morphologies observées sont différentes de celles obtenues par Wei et al. (9) (Figure 3.2.5). Toutefois, ils ont utilisé un substrat Ti-6Al-4V poli à #400 (la surface est très rugueuse), alors que nous avons utilisé du Ti-6Al-4V ELI poli à la silice colloïdale (la surface est « polie miroir »). Nous obtenons une couche avec des tailles de pores plus faibles.

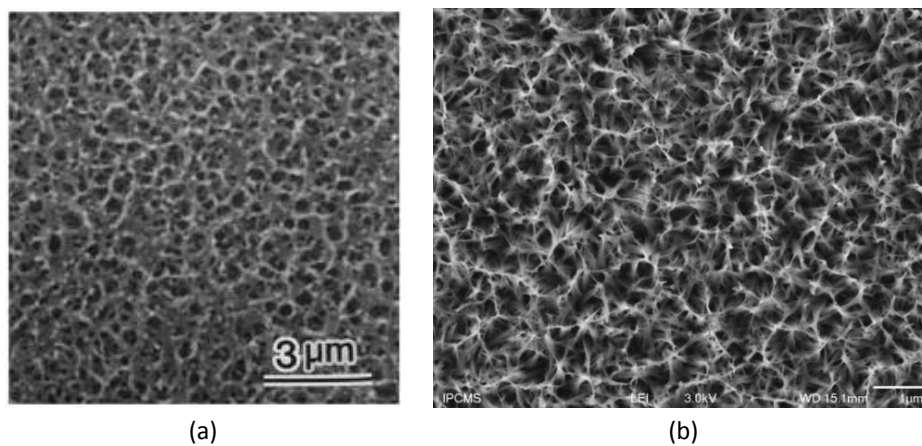


Figure 3.2.5. Couche obtenue sur un substrat Ti-6Al-4V poli à #400 dans une solution NaOH 5 M à 80°C pendant 72 h : (a) selon Wei et al. (9), et (b) pour l'échantillon M58072 (échelle 1  $\mu\text{m}$ )



### 3.2.2. Structure et morphologie de la couche de titanate de sodium après le traitement thermique

L'analyse DRX est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites dans la partie 3.2.1. Les figures 3.2.6 et 3.2.7 présentent les DRX des échantillons traités dans une solution NaOH 5 et 10 M après recuit à 630°C pendant 1 h.

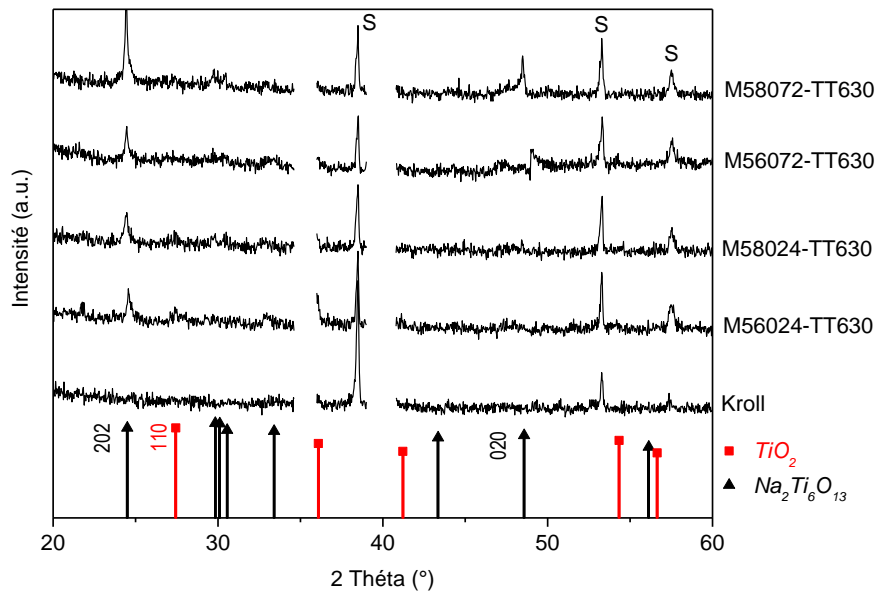


Figure 3.2.6. DRX des échantillons : Kröll, M56024-TT630, M58024-TT630, M56072-TT630 et M58072-TT630 (voir Tableau 2.2). Pics de diffraction du titanate de sodium  $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$  (JCPDS 77-9461) et du rutile  $\text{TiO}_2$  (JCPDS 21-1276). Les pics du substrat sont notés « S »

Après le traitement alcalin, la couche est amorphe ou formée de grains nanométriques (9). Suite au traitement thermique à 630°C, la couche est cristallisée (Figures 3.2.6 et 3.2.7) et des pics de diffraction apparaissent surtout dans le cas du traitement NaOH 10 M. Les pics de titanate de sodium sont plus intenses, en particulier le pic (202) de  $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$  (11). Les pics (110) et (101) du  $\text{TiO}_2$  sont visibles pour les échantillons ayant subi un traitement NaOH 10 M pendant 24 h. De plus, la phase  $\text{Na}_2\text{Ti}_9\text{O}_{19}$  est détectée sur les échantillons traités dans la solution NaOH 10 M et recuits, comme le montre la Figure 3.2.7.

Il faut noter que la DRX est faite sur la surface. Si la couche de titanate de sodium est épaisse, les phases présentes sous cette couche sont moins visibles aux rayons X à cause de l'effet de l'absorption. Les pics de la phase  $\text{TiO}_2$  apparaissent faiblement ou pas du tout pour une attaque de 72 h, alors qu'ils sont visibles pour une attaque de 24 h.

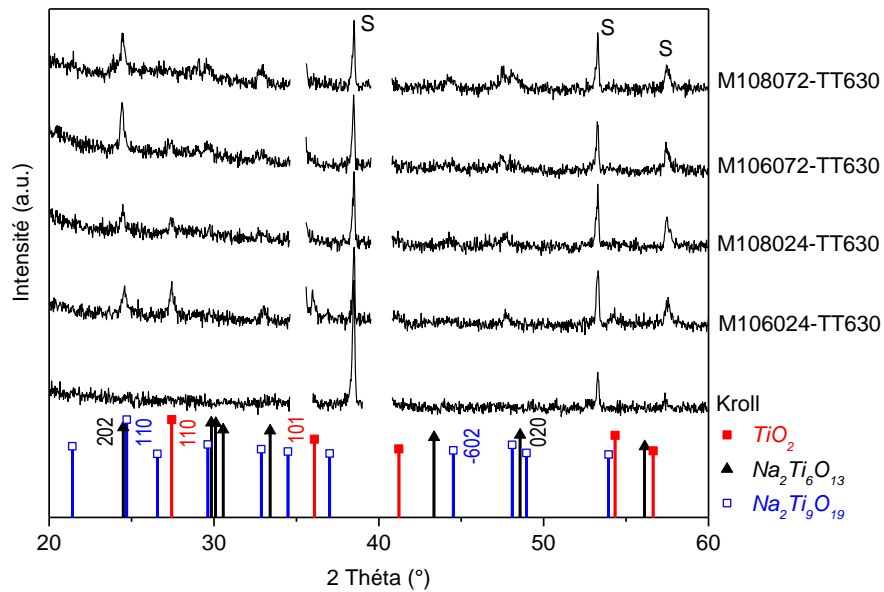


Figure 3.2.7. DRX des échantillons : Kroll, M106024-TT630, M108024-TT630, M106072-TT630 et M10807-TT630 (voir Tableau 2.2). Pics de diffraction du titanate de sodium  $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$  (JCPDS 77-9461),  $\text{Na}_2\text{Ti}_9\text{O}_{19}$  (JCPDS12-6163) et du rutile  $\text{TiO}_2$  (JCPDS 21-1276). Les pics du substrat sont notés « S »

Pour confirmer la présence de phases cristallisées dans la couche de titanate de sodium, nous avons réalisé une analyse au microscope électronique à transmission (MET) et une diffraction des électrons en aire sélectionnée (selected area electron diffraction ou SAED) pour tous les échantillons après le traitement alcalin-thermique (Chapitre 2, §2.2.3).

Les Figures 3.2.8 a à h présentent les images et la diffraction des électrons au MET sur tous les échantillons ayant subi le traitement alcalin-thermique décrit dans la partie ci-dessus.

L'analyse structurale montre que le titanate de sodium sous forme de cristal  $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$  se trouve dans tous les échantillons, comme l'avait montré l'analyse par DRX.

La Figure 3.2.8 a indique que le titanate de sodium sur l'échantillon M56024-TT630 se présente sous forme majoritaire en particules et minoritaire en bâtonnets. Ces derniers mesurent jusqu'à 500 nm de longueur et quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur.

La Figure 3.2.8 b montre que les bâtonnets de titanate de sodium sont bien formés sur l'échantillon M58024-TT630 et que leur épaisseur moyenne est de 20 à 25 nm.

Les Figures 3.2.8 c (M56072-TT630) et 3.2.8 d (M58072-TT630) présentent des cristaux de titanate de sodium sous forme de bâtonnets de 20 à 40 nm d'épaisseur et de quelques dizaines de nanomètres jusqu'à 1  $\mu\text{m}$  de longueur. Toutefois, il semble que les longs cristaux ont été cassés lorsque nous avons gratté pour les récupérer sur la grille et les analyser au MET. La mesure de la longueur des cristaux n'est donc pas précise.

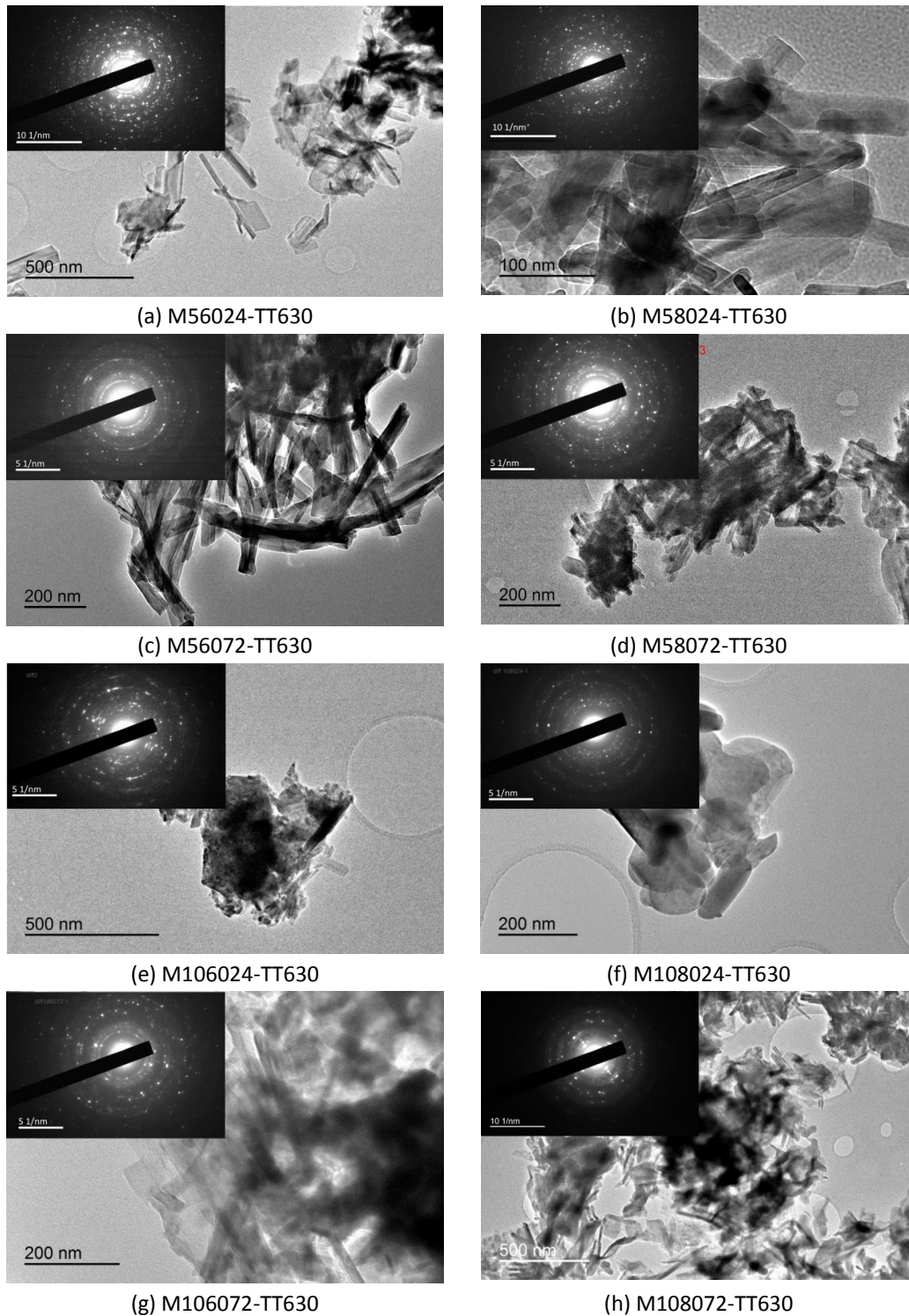


Figure 3.2.8. Micrographies MET et clichés de diffraction en aire sélectionnée (SAED) du titanate de sodium sur les échantillons traités dans une solution NaOH à la concentration de 5 ou 10 M, à la température de 60 ou 80°C pendant 24 ou 72 h, suivi du traitement thermique à 630°C (voir Tableau 2.2). Les distances interréticulaires mesurées par SAED sont présentées dans le Tableau 3.1

Tableau 3.1. Distances interréticulaires mesurées par diffraction en aire sélectionnée (SAED)

Na <sub>2</sub> Ti <sub>6</sub> O <sub>13</sub> (ICDD 77-9461)			TiO <sub>2</sub> (ICDD 21-1276)			Distances interréticulaires, d <sub>exp</sub> (± 0,005 nm)							
d <sub>theo</sub> (nm)	l	(hkl)	d <sub>theo</sub> (nm)	l	(hkl)	M56024 -TT630	M58024 -TT630	M56072 -TT630	M58072 -TT630	M106024 -TT630	M108024 -TT630	M106072 -TT630	M108072 -TT630
0,745	100	200											
0,626	50	-201											
0,373	4	400							0,373	0,379		0,375	0,374
0,363	40	202/110				0,365	0,365			0,368/0,362	0,360		0,360
0,327	1	401	0,325	100	110				0,326				0,320
0,313	3	-402										0,314/0,308	
0,299	46	310				0,300	0,297		0,305		0,302	0,299	0,303
0,297	45	-203											
0,292	37	-311								0,290	0,287		
0,278	11	112				0,276			0,281			0,277	0,282
0,276	9	311									0,273		
0,268	36	402					0,267			0,267	0,264		
0,249	12	-601	0,249	50	101								0,246
0,237	4	-113	0,230	8	200					0,238			
0,219	2	-512	0,219	25	111								
0,209	28	-603/-404				0,208	0,208	0,207	0,208			0,209	
0,205	21	602	0,205	10	210								
0,197	3	-513							0,195	0,194	0,192	0,195	0,191
0,187	30	020				0,193	0,187	0,188					
0,173	13	-514						0,169	0,172				
0,170	2	205	0,169	60	211								
0,163	16	802/712	0,162	20	220				0,161				0,166
0,149	3	803	0,148	10	002			0,148					
0,146	2	911/-622	0,145	10	310								
0,139	10	-715/-424	0,136	20	301			0,140					

Sur les Figures 3.2.8 e (M106024-TT630) et 3.2.8 f (M108024-TT630) les cristaux sont en forme de particule tandis que sur les Figures 3.2.8 g (M106072-TT630) et 3.2.8 h (M108072-TT630) des bâtonnets et des particules sont également visibles.

Après le traitement thermique, la couche d'hydrogel de titanate de sodium est déshydratée. Les phases obtenues d'après la littérature sont des cristaux de titanate de sodium (comme  $\text{Na}_2\text{Ti}_5\text{O}_{11}$  ou  $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$ ) et de dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$  rutile ou anatase) (6,9,12).

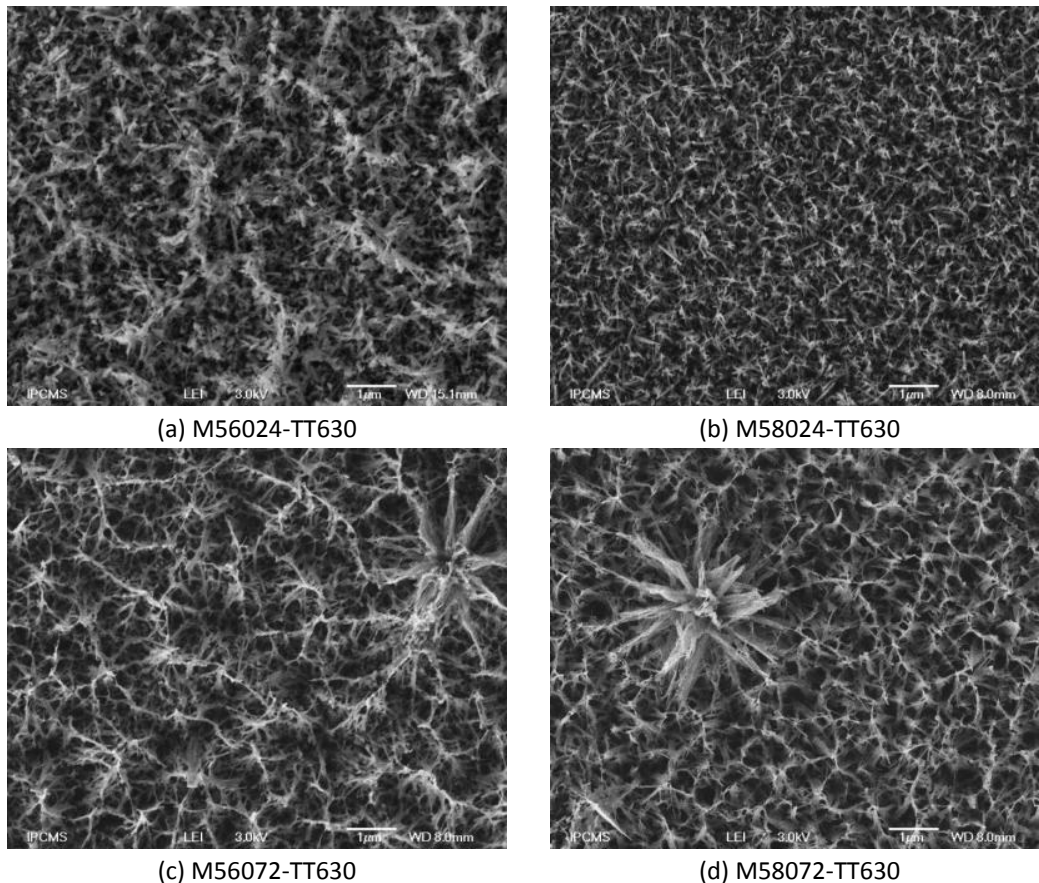


Figure 3.2.9. Morphologie du titanate de sodium sur Ti-6Al-4V après un traitement alcalin (NaOH 5 M), et après recuit à 630°C (voir Tableau 2.2)

Sur la Figure 3.2.9, nous montrons la morphologie du titanate de sodium obtenu en utilisant la solution NaOH à la concentration 5 M, suivi d'un traitement thermique à 630°C pendant 1 h. Aucune fissure n'est observée dans la couche de titanate de sodium. Pour les échantillons M56024-TT630 et M58024-TT630, la couche de titanate de sodium est cristallisée (voir Figure 3.2.9). Les cristaux se présentent sous forme de fils ou de dendrites (Figures 3.2.9 a et b). Sur les échantillons M56072-TT630 et M58072-TT630, les fils et dendrites forment un réseau dont les mailles ont des tailles entre 100 nm et 1 µm.

Des fissures sont visibles sur tous les échantillons traités dans une solution NaOH 10 M (Figure 3.2.10). Pour les échantillons M106024-TT630 et M108024-TT630 (Figures 3.2.10 a et b), le réseau décrit

précédemment n'est pas observé. La couche est formée de particules allongées d'environ 100 nm ; elle semble plus dense. Des fils et des dendrites sont visibles sur les échantillons M106072-TT630 et M108072-TT630 (Figures 3.2.10 c et d).

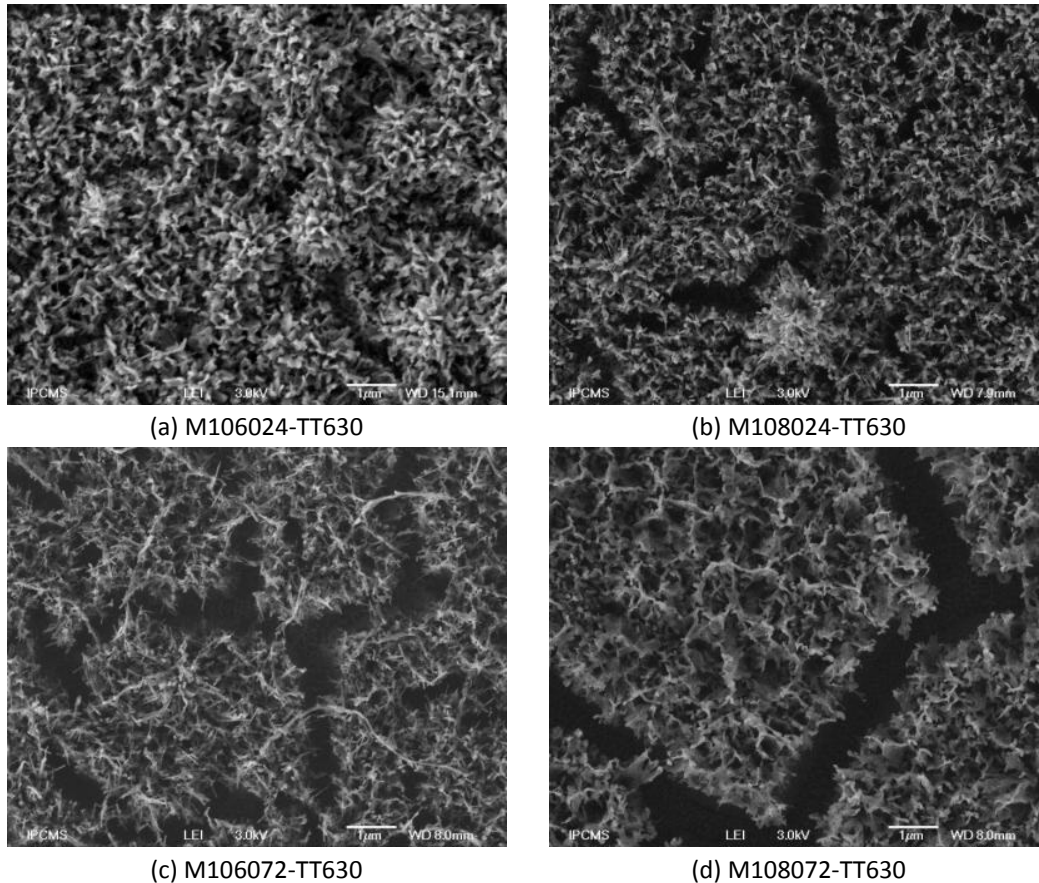
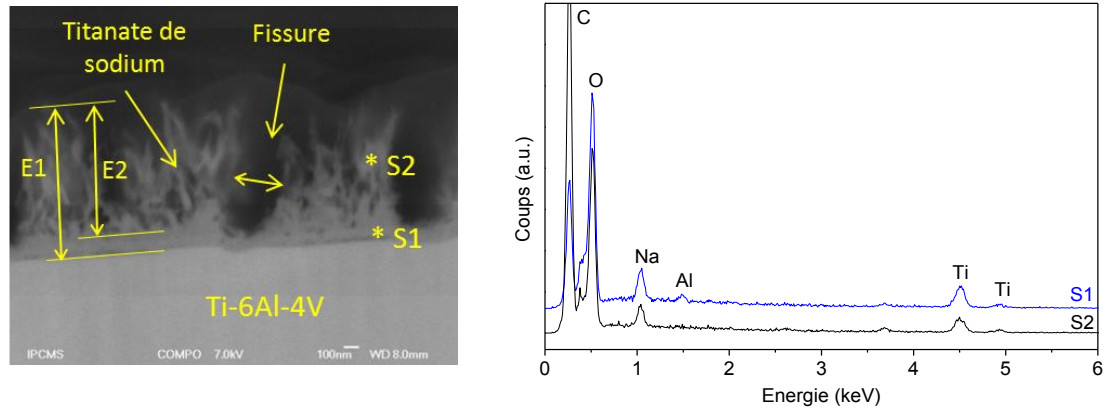


Figure 3.2.10. Morphologie du titanate de sodium sur Ti-6Al-4V après un traitement alcalin (NaOH 10 M), suivi d'un traitement thermique à 630°C (voir Tableau 2.2)

En comparant les deux types d'échantillons (Figures 3.2.9 et 3.2.10), nous avons constaté que des fissures sont apparues après le traitement thermique sur tous les échantillons préparés dans la solution NaOH 10 M, contrairement aux échantillons préparés dans la solution NaOH 5 M. Nous avons mesuré la taille en largeur des fissures, et les résultats ont indiqué qu'elle augmentait en fonction de la température ou de la durée du traitement alcalin. La largeur des fissures est de 300 à 400 nm pour l'échantillon M106024-TT630, de 500 à 650 nm pour l'échantillon M108024-TT630, de 500 à 850 nm pour l'échantillon M106072-TT630 et de 800 à 1000 nm pour l'échantillon M108072-TT630. La contraction thermique est donc plus forte pour l'échantillon M108072-TT630, puis viennent les échantillons M106072-TT630 et M108024-TT630, et enfin M106024-TT630. Lorsque la couche d'hydrogel de titanate de sodium est plus épaisse, l'effet de la contraction thermique est plus fort. C'est pourquoi les fissures sur l'échantillon M108072-TT630 sont les plus grandes.

### 3.2.3. Étude de l'interface titanate de sodium-substrat

La coupe transversale est préparée comme décrit dans le Chapitre 2, §2.2.8. L'observation au MEB et l'analyse EDS-X de la couche de titanate de sodium sont présentées dans la figure 3.2.11.



(a) Coupe transversale  
 $E_1 = 900$  à  $1000$  nm ;  
 $E_2 = 800$  à  $850$  nm  
 Fissure :  $300$  à  $350$  nm

(b) Analyse EDS-X aux positions S1 et S2  
 de la coupe transversale

Figure 3.2.11. Coupe transversale de la couche de titanate de sodium  
 de l'échantillon M106024-TT630(a) et analyse EDS-X (b)

Nous constatons que la couche de titanate de sodium adhère au substrat Ti-6Al-4V. L'analyse EDS-X (Figure 3.2.11 b) montre la présence des éléments Ti, Na et O sur la couche de titanate de sodium ; le pic de carbone (C) provient de la colle utilisée pour fixer la plaque de silice qui protège la surface.

La couche de titanate de sodium est composée de deux parties : la première est compacte, sans fissure, d'une épaisseur de  $100$  à  $150$  nm, elle se lie directement au substrat ; la deuxième, d'une épaisseur de  $800$  à  $850$  nm, est poreuse et présente des fissures de  $300$  à  $350$  nm. La couche mince de titanate de sodium adhère directement au substrat et les fissures observées sur la Figure 3.2.10 ne provoquent pas de décollement de la surface.

### 3.3. Étude de la formation de titanate de sodium par traitement alcalin-thermique pour l'échantillon en poudre de titane

Dans la partie 3.2, nous avons indiqué qu'une couche poreuse et homogène de titanate de sodium s'était formée sur la surface du substrat Ti-6Al-4V. Dans cette partie, nous présentons l'influence du traitement thermique sur le changement de structure du titanate de sodium. Pour cela, le procédé utilisé précédemment, à savoir la succession des traitements Kroll, alcalin et thermique a été appliqué à une poudre de titane de structure  $\alpha$ .

Deux grammes de poudre de titane (Ti, Prolabo) est ajoutée à 100 mL de solution Kroll dans un bécher en téflon. Après 30 s, la poudre est filtrée et nettoyée 5 fois avec de l'eau distillée dans un centrifugeur. Puis cette poudre est séchée à la température de 40°C.

La poudre obtenue est ensuite mise en suspension dans 100 mL de NaOH 10 M à 60°C par une agitation magnétique pendant 10 min. La suspension est conservée à 60°C pendant 24 h. Puis, la poudre est filtrée, nettoyée et séchée comme pendant l'étape du traitement Kroll. Enfin, la poudre est recuite à 630°C pendant 1 h avec une montée en température de 5°C/min. Tous les processus de traitement et les noms des échantillons (TP, TPA et TPAT) sont indiqués dans le Chapitre 2, Tableau 2.2.

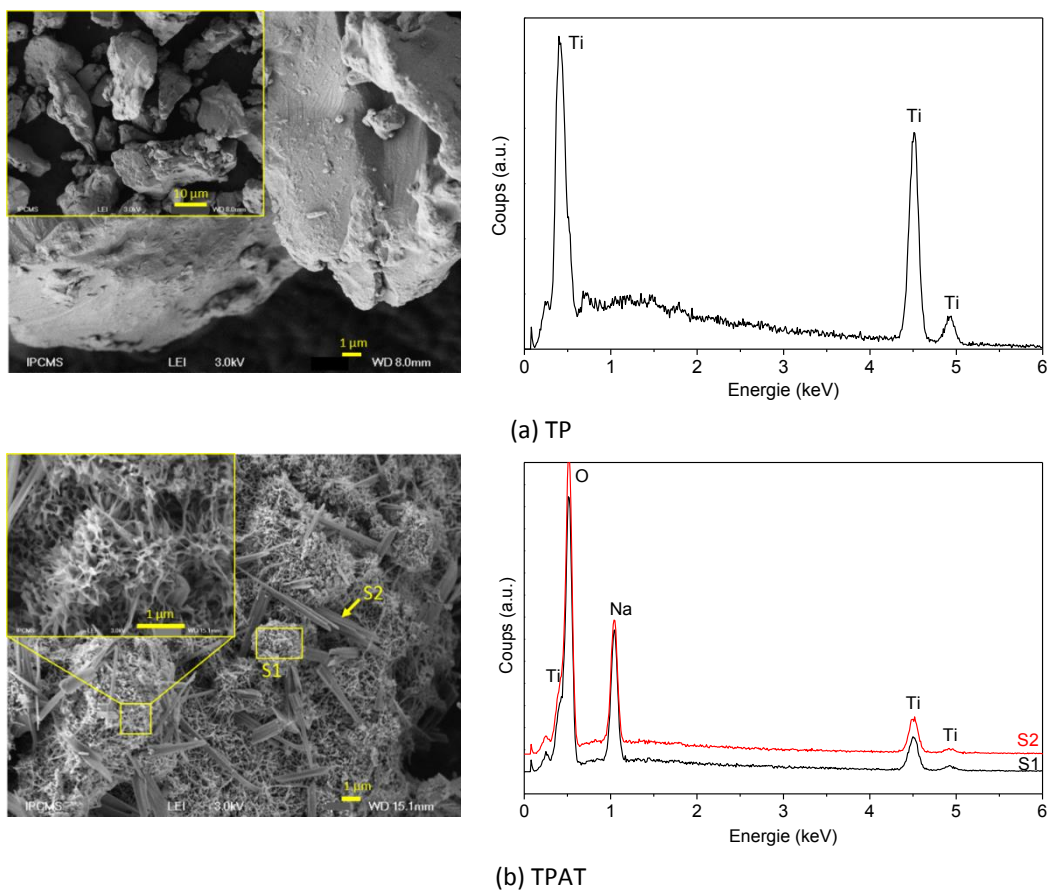


Figure 3.3.1. Observation au MEB et analyse EDS-X des échantillons en poudre de titane (a), et après le traitement NaOH 10 M et le traitement thermique à 630°C (b) (voir Tableau 2.2)

Nous avons constaté que les particules de titane mesurant quelques micromètres (Figure 3.3.1 a) ont réagi avec la solution NaOH pour former sur leur surface une couche de titanate de sodium (Figure 3.3.1 b). Le spectre EDS-X de l'échantillon TPAT indique que les pics de Na, O et Ti ont été détectés simultanément, alors que sur le spectre EDS-X du titane, seuls des pics de Ti apparaissent.

Le titanate de sodium se forme sous deux morphologies (Figure 3.3.1 b): des feuillets submicroniques de titanate de sodium qui enrobent la surface des particules de titane ; des plaquettes longues et minces mesurant quelques micromètres de largeur et quelques micromètres de longueur.



L'analyse EDS-X réalisée sur les deux types de particules montre que les deux phases contiennent Na, O et Ti.

Pour comprendre quelle phase de titanate de sodium est obtenue, nous avons réalisé une analyse structurale par DRX sur les échantillons TP, TPA et TPAT. La Figure 3.3.2 présente les diffractogrammes de ces échantillons. Nous observons des pics de titanate de sodium correspondant à ceux de la phase  $\text{Na}_4\text{Ti}_5\text{O}_{12}$  (ICDD 52-1814) et des pics de rutile  $\text{TiO}_2$  (ICDD 21-1276) sur l'échantillon traité thermiquement à  $630^\circ\text{C}$ . Pour l'échantillon non-traité thermiquement, aucun pic de titanate de sodium ou de dioxyde de titane n'est détecté. Sur les trois échantillons, des pics de  $\text{Ti}_\alpha$  sont visibles.

Dans le cas du substrat Ti-6Al-4V, ce même traitement alcalin-thermique conduit à la formation de rutile en plus du titanate de sodium. Toutefois, la composition du titanate de sodium est différente :  $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$  pour le substrat Ti-6Al-4V c'est-à-dire un rapport Na/Ti égal à 0,33, et  $\text{Na}_4\text{Ti}_5\text{O}_{12}$  pour la poudre de titane correspondant à un rapport Na/Ti égal à 0,80. Nous pouvons expliquer cette différence par un rapport surface/volume plus élevée pour la poudre de titane. Celle-ci est composée de particules microniques ayant une bonne capacité d'absorption des ions  $\text{Na}^+$  en surface. De plus, ces particules s'agrègent, favorisant la rétention d'un excès de soude. En revanche, il est plus facile de retirer la solution de soude par un lavage à l'eau sur le substrat de Ti-6Al-4V. Nous obtenons donc un rapport Na/Ti plus faible sur le Ti-6Al-4V. De plus, le substrat contient 6% d'Al et 4% de V. L'Al réagit avec NaOH pour former  $\text{NaAl}(\text{OH})_4$  (13,14). Ce composé se dissout bien dans la solution. Le vanadium a une bonne résistance à la corrosion dans un milieu alcalin (15). Il est donc peu probable que la composition et la morphologie du titanate de sodium soient modifiées par la présence d'Al et de V.

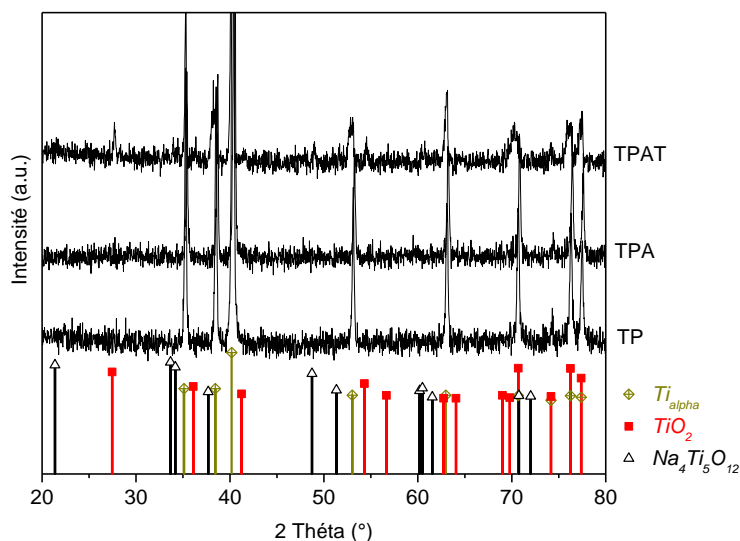


Figure 3.3.2. Analyse structurale DRX d'un échantillon en poudre de titane, ayant subi un traitement Kroll puis traité dans la solution NaOH 10 M, et recuit à  $630^\circ\text{C}$  pendant 1 h (voir Tableau 2.2)

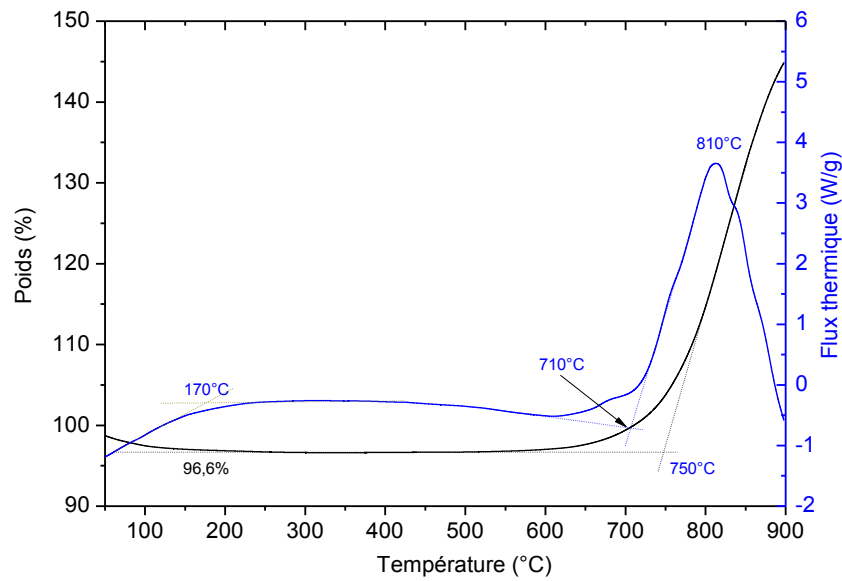


Figure 3.3.3. Analyse ATD/ATG de l'échantillon TPA (voir Tableau 2.2)

Une analyse thermique ATD/ATG a été réalisée sous air jusqu'à 900°C, avec une montée de 5°C/min pour l'échantillon TPA (Figure 3.3.3) et la poudre de titane (Figure 3.3.4). Pour le premier, une perte de poids de 3,4 % due à la déshydratation de l'échantillon, est observée entre 100 et 300°C et une augmentation de 145 % au-dessus de 600°C. Le titane qui n'a pas réagi avec NaOH s'oxyde en  $\text{TiO}_2$ . La réaction est exothermique comme le montre le pic observé à 810°C sur la courbe d'analyse thermique différentielle (ATD) (16,17).

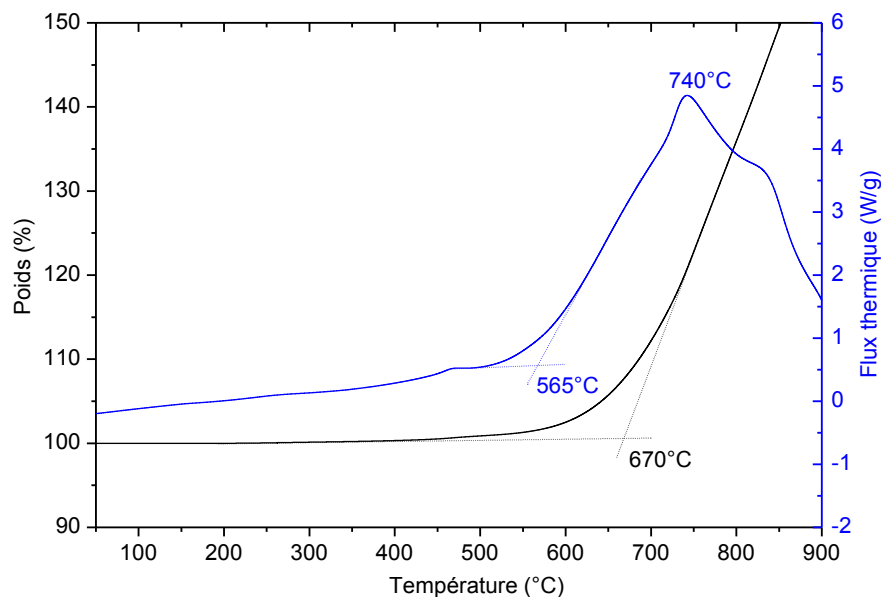


Figure 3.3.4. Analyse ATD/ATG de l'échantillon TP (voir Tableau 2.2)

Par contre, aucune perte de poids n'est observée pour la poudre de titane non traitée car le titane est sec (Figure 3.3.4). Comme précédemment, le titane s'oxyde au-dessus de 500°C, donnant lieu à un pic exothermique à 740°C sur la courbe ATD. L'oxydation du titane se produit sur l'échantillon de titane plus tôt que sur l'échantillon de titanate de sodium. Ce phénomène peut être expliqué par le rôle de « protection » joué par la couche de titanate de sodium à la surface des particules de titane. Ce processus est schématisé dans la figure 3.3.5 pour l'échantillon TPA. Après le traitement alcalin, une couche de titanate de sodium se forme sur la surface des particules de titane. Quand l'échantillon est chauffé, l'oxygène de l'air pénètre via la couche de titanate de sodium pour réagir avec le titane.

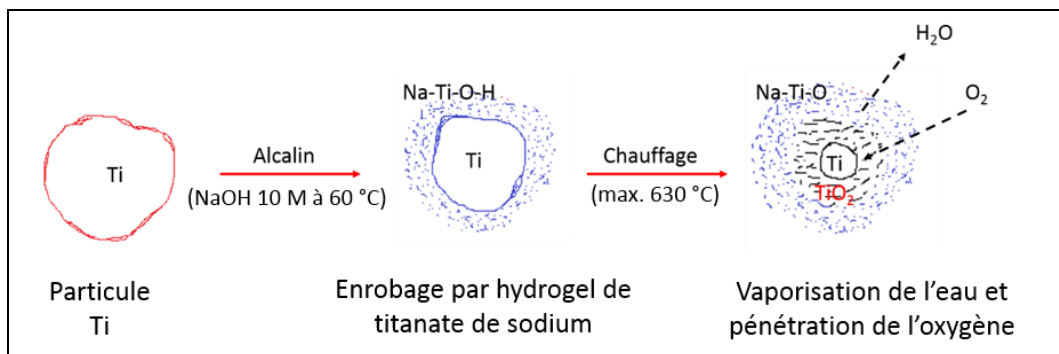


Figure 3.3.5. Schéma d'illustration du processus de traitement alcalin-thermique des particules de titane

La charge de surface est un bon indicateur pour estimer l'interaction entre particules en solution. Cette expérience est réalisée pour vérifier la charge de surface du titanate de sodium. Cette étude permettra d'expliquer des mécanismes du dépôt de Ca-P en milieu aqueux, par exemple dans les bains autocatalytique (étudié dans le Chapitre 5) où des ions de phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) et de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sont présents.

Pour cela, un peu de poudre de titane (Ti) ou poudre de titanate de sodium ayant subi un traitement alcalin (échantillon TPA) suivi du traitement thermique à 630°C (échantillon TPAT) est dilué dans de l'eau distillée. Ensuite, la charge de surface de la poudre est mesurée pour différents pH, d'abord avec un pH de 1,5, ensuite le pH est augmenté jusqu'à un pH de 10. Les solutions HCl et NaOH sont utilisées pour ajuster le pH.

La Figure 3.3.6 montre la courbe de potentiel Zêta en fonction du pH de solution de titane (a), après le traitement alcalin (b), et après le traitement thermique à 630°C (c). Nous constatons que la valeur du point isoélectrique est très légèrement diminuée lorsque l'échantillon est traité thermiquement. Sur la Figure 3.3.6, le point isoélectrique de l'échantillon sans traitement thermique est de 5,6, alors qu'après le traitement thermique à 630°C, cette valeur est de 5,0.

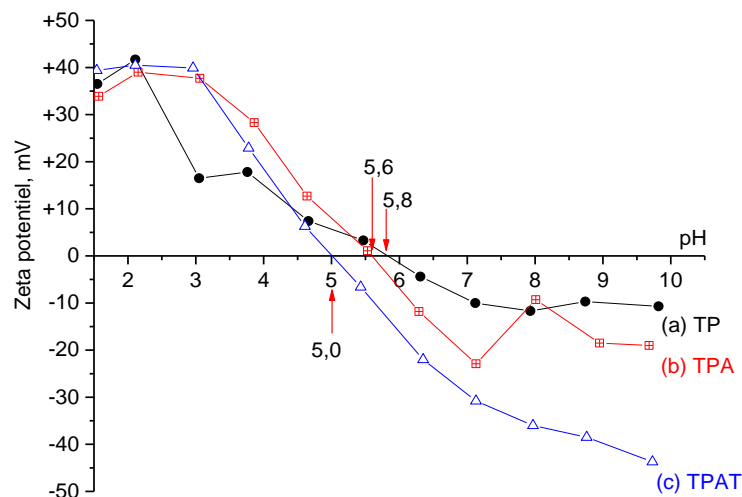


Figure 3.3.6. Potentiel zêta d'une poudre de titane, et des échantillons traités en milieu alcalin (voir Tableau 2.2)

De plus, nous constatons que pour les pH supérieurs à 5,0, le potentiel Zêta de l'échantillon TPAT est toujours plus négatif que celui des autres échantillons. Cela signifie que la stabilité des particules en solution (capacité à ne pas s'agréger) de l'échantillon TPAT est meilleure que celle de l'échantillon sans traitement thermique (TPA).

## Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons présenté les traitements acide, alcalin et thermique réalisés sur le substrat Ti-6Al-4V. Nous avons également vérifié l'influence du traitement alcalin-thermique sur la poudre de titane. Nous pouvons donc tirer les conclusions suivantes :

- La durée optimale du traitement Kroll pour obtenir une surface uniforme et propre est de 3 min.
- Après le traitement Kroll, le substrat est traité avec une solution alcaline NaOH à la concentration de 5 ou 10 M, à la température de 60 ou 80°C, pendant une durée de 24 ou 72 h. Le résultat obtenu est une couche d'hydrogel de titanate de sodium qui se forme sur la surface.
- La couche de titanate de sodium est ensuite stabilisée par un traitement thermique à 630°C pendant 1 h, avec une montée de 5°C/min. La couche de titanate de sodium cristallise. Les phases  $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$  et  $\text{TiO}_2$ -rutile ont été détectées.
- La structure poreuse de la couche de titanate de sodium n'est presque pas modifiée par le traitement thermique quand on utilise la solution NaOH 5 M, à la température de 60 ou 80°C pendant 72 h.
- Sur les échantillons traités par une solution NaOH 10 M, des fissures de la couche de titanate de sodium apparaissent après le traitement thermique. En revanche, pour les échantillons traités dans une solution NaOH 5 M, aucune fissure ne s'est formée après le traitement thermique.

- Néanmoins, nous choisissons pour la suite de ce travail, le traitement alcalin dans la solution NaOH 10 M à 60°C pendant 24 h pour avoir un traitement plus court, à une température plus basse et obtenir une couche d'épaisseur suffisante en vue d'une application industrielle. Cet échantillon sera désormais nommé « TT ».

- Pendant le processus de traitement thermique, la couche de titanate de sodium s'est cristallisée. Par ailleurs, la réaction entre le titane et l'oxygène de l'air se produit grâce à la pénétration de l'oxygène via la couche de titanate de sodium quand l'échantillon est chauffé au-dessus de 750°C.

- Enfin, nous avons mesuré la charge de surface du titanate de sodium dans une gamme de pH de 1,5 à 10. Nous avons alors constaté que le titanate de sodium en solution est chargé négativement pour des pH supérieurs à 5,0.

## Références

1. Lee DB, Pohrelyuk I, Yaskiv O, Lee JC. Gas nitriding and subsequent oxidation of Ti-6Al-4V alloys. *Nanoscale Res Lett.* 2012;7(1):1–5.
2. Sittig C, Textor M, Spencer ND, Wieland M, Vallotton PH. Surface characterization. *J Mater Sci Mater Med.* 1999;10(1):35–46.
3. Say WC, Tsai YY. Surface characterization of cast Ti-6Al-4V in hydrofluoric-nitric pickling solutions. *Surf Coat Technol.* 2004;176(3):337–43.
4. Liu X, Chu P, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng R Rep.* 2004 Dec 24;47(3-4):49–121.
5. Nishio K, Neo M, Akiyama H, Nishiguchi S, Kim H-M, Kokubo T, et al. The effect of alkali- and heat-treated titanium and apatite-formed titanium on osteoblastic differentiation of bone marrow cells. *J Biomed Mater Res.* 2000;52(4):652–61.
6. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nishiguchi S, Nakamura T. Graded surface structure of bioactive titanium prepared by chemical treatment. *J Biomed Mater Res.* 1999 May;45(2):100–7.
7. Nishiguchi S, Nakamura T, Kobayashi M, Kim HM, Miyaji F, Kokubo T. The effect of heat treatment on bone-bonding ability of alkali-treated titanium. *Biomaterials.* 1999 Mar;20(5):491–500.
8. Nishiguchi S, Kato H, Fujita H, Oka M, Kim HM, Kokubo T, et al. Titanium metals form direct bonding to bone after alkali and heat treatments. *Biomaterials.* 2001;22(18):2525–33.
9. Wei M, Kim HM, Kokubo T, Evans JH. Optimising the bioactivity of alkaline-treated titanium alloy. *Mater Sci Eng C.* 2002;20(1):125–34.
10. Kim H-M, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Apatite-forming ability of alkali-treated Ti metal in body environment. *J Ceram Soc Jpn.* 1997 Sep 11;105(2):111–6.
11. Yamaguchi S, Takadama H, Matsushita T, Nakamura T, Kokubo T. Cross-sectional analysis of the surface ceramic layer developed on Ti metal by NaOH-heat treatment and soaking in SBF. *J Ceram Soc Jpn.* 2009 Jun 16;117(1370):1126–30.
12. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment. *J Mater Sci Mater Med.* 1997;8(6):341–7.

13. Dai H-B, Ma G-L, Xia H-J, Wang P. Reaction of aluminium with alkaline sodium stannate solution as a controlled source of hydrogen. *Energy Environ Sci.* 2011;4(6):2206.
14. Pyun S-I, Moon S-M. Corrosion mechanism of pure aluminium in aqueous alkaline solution. *J Solid State Electrochem.* 2000 May 1;4(5):267–72.
15. Lide DR, editor. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 90th Edition. 90th ed. CRC Press; 2009. 2804 p.
16. Wen C, Xu W, Hu W, Hodgson P. Hydroxyapatite/titania sol-gel coatings on titanium-zirconium alloy for biomedical applications☆ *Acta Biomater.* 2007 May;3(3):403–10.
17. Xu W, Hu W, Li M, Wen C. Sol-gel derived hydroxyapatite/titania biocoatings on titanium substrate. *Mater Lett.* 2006 Jun;60(13-14):1575–8.



## **Chapter 4.**

### **New Ca-P deposition process on sodium titanate**





## Chapter 4.

### New Ca-P deposition process on sodium titanate

4.1. Calcium phosphate (Ca-P) coating .....	89
4.1.1. Thermal behaviour of the Ca-P after drying of the sol-gel solution .....	89
4.1.2. Structure and chemical composition of the Ca-P coating.....	91
4.2 Morphology and structure of the Ti-6Al-4V/sodium titanate/Ca-P multilayer system .....	100
4.2.1. Observation of the surface .....	100
4.2.2. Structure of the interfaces.....	102
4.3. Mechanical properties of Ca-P coatings scratch test .....	106
4.4. Stability and <i>in vitro</i> bioactivity of HA coatings in physiological environment tested by using simulated body fluid .....	111
4.5. Cell viability assay of calcium phosphate coatings.....	116
4.5.1. In vitro cytocompatibility.....	116
4.5.2. Cells number and proliferative ratio.....	120
Conclusions .....	122
References .....	123

In this chapter, we study the Ca-P layer deposited by spin - and dip - coating on sodium titanate/Ti-6Al-4V as introduced in Chapter 3. In order to get a better insight on the thermal behaviour of the Ca-P layer, we studied the thermal behaviour of the Ca-P sol-gel solution. Then, the structure and composition of Ca-P layer are described by using X-ray diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared (FT-IR) and Raman spectroscopies, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and selected area electron diffraction (SAED) are presented. The structure of the coating is described after observations of cross sections. The mechanical behaviour of coatings under load using a nano-indenter is studied. Moreover, the stability of coating in SBF is checked by biochemical analyses performed by ultraviolet-optical emission spectrometers. Finally, biological evaluations such as cell morphology and density as well as cell viability are performed.

## 4.1. Calcium phosphate (Ca-P) coating

### 4.1.1. Thermal behaviour of the Ca-P after drying of the sol-gel solution

The preparation of sol-gel solution was described in Chapter 2, §2.1.5. In this part, the thermal behaviour of the Ca-P after drying of the sol-gel solution is evaluated. The Ca-P gel was dried at 110°C to remove the liquid phase (water and ethanol). The thermal behaviour of this powder was studied by thermal gravimetric and differential thermal analyses (TG/DTA) in flowing air. The temperature was increased according to 5°C/min up to 900°C (Figure 4.1.1). A strong weight loss of 58 wt. % is observed below 540°C; it can be assigned to the evaporation of ethanol and adsorbed water, decomposition of organic and inorganic precursors (1). On the DTA curve, the first endothermic peak at 102°C can be attributed to the evaporation of absorbed water and the second endothermic peak at 514°C, to the crystallization of apatite (1,2).

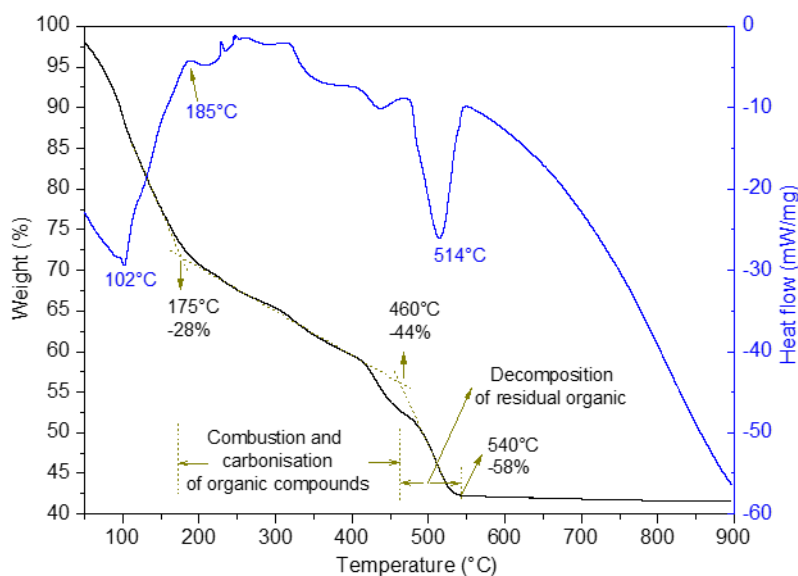


Figure 4.1.1. TG/DTA curves of dried Ca-P gel sample heated in flowing air

To get a better insight of the thermal behaviour, the dried gel was annealed at 400, 500, 600, 700 and 800°C for 20 min. The annealed samples were analyzed by XRD to determine the nature and composition of the crystallized phases. At 400°C, the diffraction peaks are assigned to calcium nitrate and tetra-hydrogen calcium phosphate ( $H_4Ca(PO_4)_2 \cdot H_2O$ ) phases. At 500°C, the (211), (112) and (300) hydroxyapatite (HA) peaks appear in the pattern. The calcium nitrate ( $Ca(NO_3)_2$ ) peaks disappear at 600°C, while the HA peak intensities grow up at 600°C. In addition to HA, calcium carbonate ( $CaCO_3$ ) and calcium oxide (CaO) are observed at 600, 700 and 800°C. CaO is probably protected against the atmosphere, so it could be detected in the XRD pattern after cooling down to room temperature.

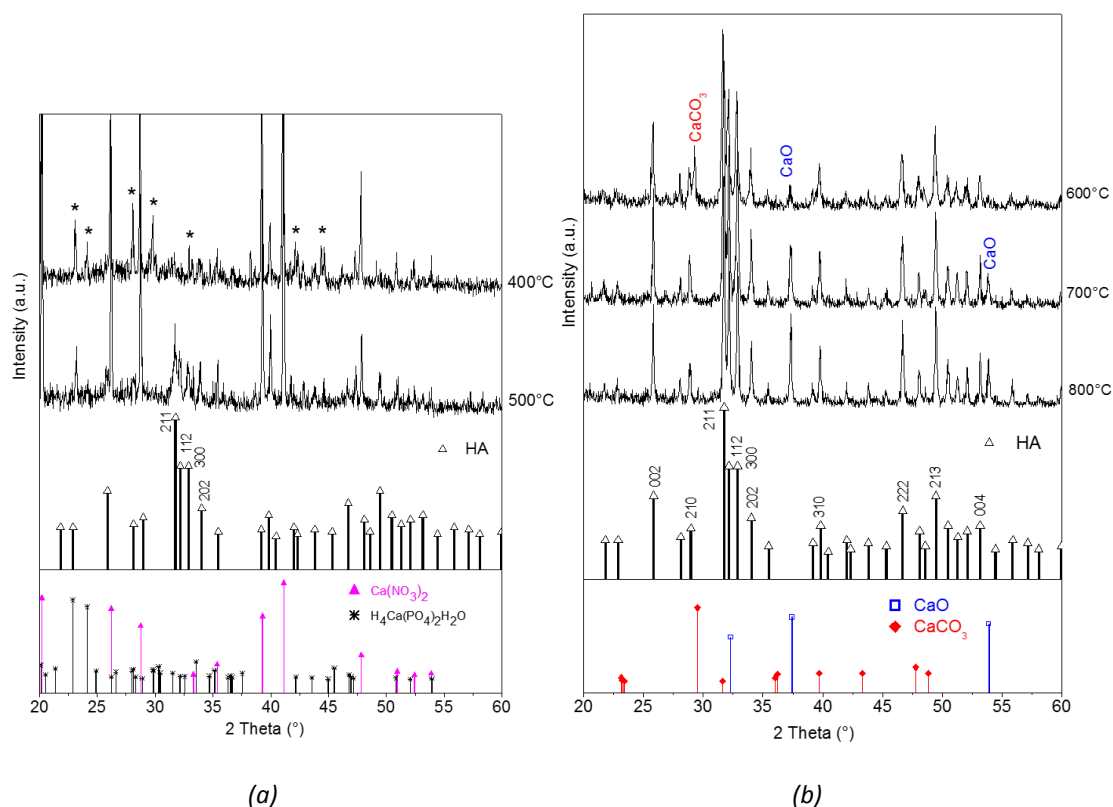


Figure 4.1.2. XRD patterns of dried Ca-P gel annealed (a) at 400 and 500, and (b) at 600, 700 and 800°C. Diffraction peaks from the JCPDS data base of HA (JCPDS 09-432), CaO (JCPDS 02-1088),  $CaCO_3$  (JCPDS 12-8783),  $Ca(NO_3)_2$  (JCPDS 06-5679) and  $H_4Ca(PO_4)_2 \cdot H_2O$  (JCPDS 11-5377)

So, it was found that 600°C is the lowest temperature to crystallize the HA (Figure 4.1.2) and without residual organic compounds (Figure 4.1.1). It is also the best way to get only a little amount of CaO. This low quantity is easily dissolved in physiological media and will not influence the bioactivity.

#### 4.1.2. Structure and chemical composition of the Ca-P coating

The Ca-P layer has been deposited as described in Chapter 2, §2.1.5. The Ca-P sol-gel coated samples (TT, TS-HA1, TS-HA2, TS-HA3, TD-HA1 and TD-HA2) were listed in Table 2.3. The structure of Ca-P coatings are studied below by using the X-ray diffraction, TEM/SAED, FTIR and Raman spectroscopies.

##### X-ray diffraction study

Figure 4.1.3 shows the XRD patterns recorded on the TS-HA1, TS-HA2, TS-HA3, TD-HA1 and TD-HA2 samples in comparison with the one of the TT sample. The peaks can be assigned to either one of the three following phases,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  or hydroxyapatite (HA),  $\text{CaCO}_3$  and  $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$  (Table 4.1).

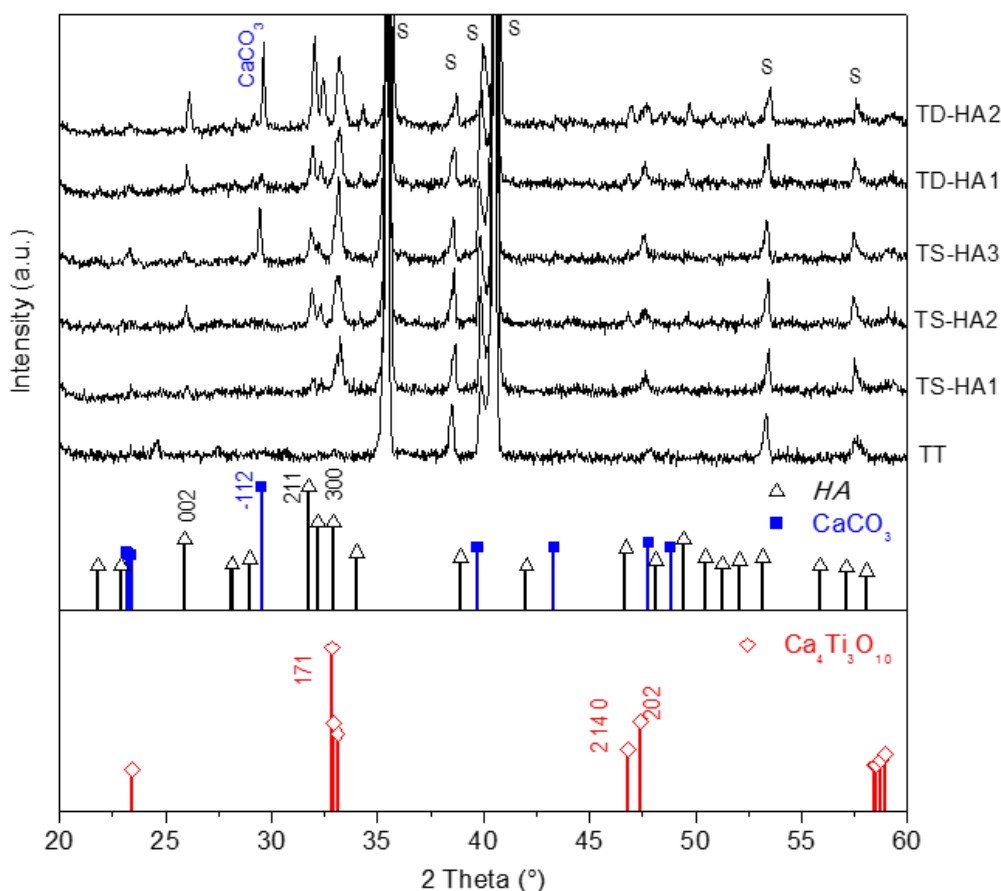


Figure 4.1.3. DRX of TT, TS-HA1, TS-HA2, TS-HA3, TD-HA1 and TD-HA2 samples. Phases diagrams from the JCPDS data base of HA (JCPDS 09-432),  $\text{CaCO}_3$  (JCPDS 12-8783) and  $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$  (JCPDS 89-1385)

For TS-HA1 sample, calcium titanate ( $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ ) peaks are detected as well as weak HA peaks. HA diffraction peaks are clearly visible on XRD patterns recorded on TS-HA2, TD-HA1 and TD-HA2 samples. Their intensities increase for TS-HA2 and TS-HA3. Additionally, the (-112)  $\text{CaCO}_3$  peak at  $29.54^\circ$  is present on TS-HA3 and TD-HA2 patterns. That shows that the reaction between calcium and phosphate is not complete when the Ti-6Al-4V/sodium titanate/Ca-P-coated substrates are heated at  $600^\circ\text{C}$  for 20 min.

Indeed, for the TS-HA1, calcium reacts with sodium titanate to form  $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$  and the peaks of calcium titanate are more important compared to the ones of apatite.

Table 4.1. XRD peaks ( $2\theta$ ) measured on the TS-HA1, TS-HA2, TS-HA3, TD-HA1 and TD-HA2 samples; corresponding (hkl) parameters and intensities for hydroxyapatite, calcium titanate, and calcium carbonate detected in these samples

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (ICDD 09-432)			$\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ (ICDD 89-1385)			$\text{CaCO}_3$ (ICDD 12-8783)		
$2\theta$	(hkl)	I	$2\theta$	(hkl)	I	$2\theta$	(hkl)	I
25.88	(002)	40	23.42	(111)	7	23.14	(110)	7
28.13	(102)	12	32.83	(171)	100	29.54	(-112)	100
28.97	(210)	18	32.94	(0, 10, 0)/(002)	42	47.78	(-204)/(-312)	21
31.77	(211)	100	33.10	(012)/(200)	34	48.67	(-222)	10
32.20	(112)	60	46.82	(0,14,0)	22	48.84	(-114)/(310)	13
32.90	(300)	60	47.40	(202)/2,10,0)	44			
34.05	(202)	25	58.43	(0,14,2)	10			
39.82	(210)	20	58.53	(2,14,0)	10			
46.71	(222)	30	58.75	(173)	14			
49.47	(213)	40	58.95	(371)/(2,10,2)	19			
50.50	(321)	20						
53.15	(004)	20						

### TEM study

Figure 4.1.4 shows the TEM and SAED images with EDS-X spectra of the Ca-P spin- and dip- coatings. The interreticular distances measured on SAED diagrams of TS-HA1, TS-HA2, TS-HA3, TD-HA1 and TD-HA2 samples are reported in Table 4.2. They can be compared to the interreticular distances of calcium titanate ( $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ , JCPDS 89-1385 and  $\text{CaTi}_2\text{O}_5$ , JCPDS 25-1450), HA ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ , JCPDS 09-432), and sodium titanate ( $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$ , JCPDS 77-9461). It can be found that the HA (peak 211 of  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) and the calcium titanate (peak 171 of  $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ ) were detected on all samples. Moreover, the  $\text{CaTi}_2\text{O}_5$  (peak 123) was remarkable on the TS-HA1, TS-HA2 and TS-HA3.

The EDS-X spectra illustrate the presence of titanium peaks coming from sodium or calcium titanate layer. These peaks are particularly high for TS-HA1 in agreement with the formation of calcium titanate as the XRD shows. The peaks of titanium are rather low in the case of TS-HA3 and TD-HA2. One can note that the TEM characterization does not give an overall idea of the coating since only part of the coating is analyzed, contrary to XRD diffraction which is performed on few  $\text{mm}^2$  areas.

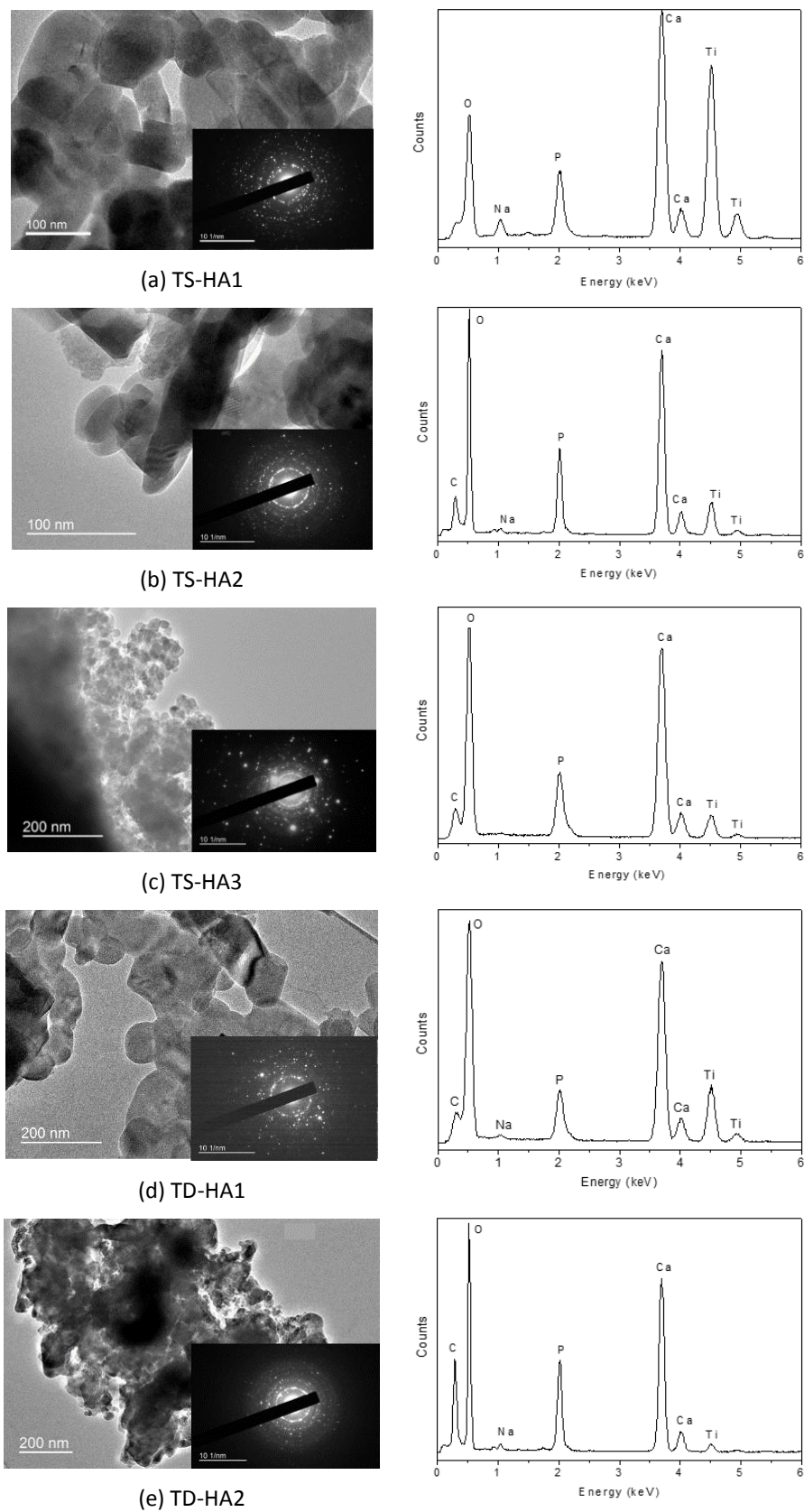


Figure 4.1.4. TEM observations and SAED image and EDS-X spectra of coatings on the samples: TS-HA1, TS-HA2, TS-HA3, TD-HA1 and TD-HA2

Table 4.2. Experimental lattice distances measured on SAED recorded on Ca-P coatings

Lattices distances, $d_{\text{exp}} (\pm 0.005 \text{ nm})$ , measured on the samples					$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ , (ICDD 09-432), $d_{\text{theo.}} \text{ (nm)}$			$\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ (ICDD 89-1385), $d_{\text{theo.}} \text{ (nm)}$			$\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$ (ICDD 77-9461), $d_{\text{theo.}} \text{ (nm)}$			$\text{CaTi}_2\text{O}_5$ (ICDD 25-1450), $d_{\text{theo.}} \text{ (nm)}$		
TS-HA1	TS-HA2	TS-HA3	TD-HA1	TD-HA2	d (nm)	l	hkl	d (nm)	l	hkl	d (nm)	l	hkl	d (nm)	l	hkl
					0.817	12	100									
											0.745	100	200			
											0.626	49	-201			
					0.407	10	200									
					0.388	10	111									
											0.373	4	400			
											0.363	40	202			
														0.357	75	114
0.348	0.350	0.350												0.350	100	123
	0.340	0.341	0.345	0.344	0.344	40	002									
											0.327	1	401			
0.317	0.320				0.317	12	102				0.313	3	-402			
0.309	0.314	0.311		0.312	0.308	18	210									
											0.299	46	310			
											0.297	45	-203	0.292	90	304
0.291	0.292			0.291							0.292	37	-311	0.288	35	231
0.280	0.281	0.281	0.281	0.282	0.281	100	211									
			0.278		0.279	60	112				0.278	11	112			
0.270	0.273	0.271	0.273	0.273	0.272	60	300	0.273	100	171	0.276	9	311			
								0.272	42	0 10 0						
								0.272	42	002						
								0.270	34	012						
0.268	0.268							0.270	34	200	0.268	35	402	0.267	60	421



Lattices distances, $d_{\text{exp}} (\pm 0.005 \text{ nm})$ , measured on the samples					$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ , (ICDD 09-432), $d_{\text{theo.}} (\text{nm})$			$\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ (ICDD 89-1385), $d_{\text{theo.}} (\text{nm})$			$\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$ (ICDD 77-9461), $d_{\text{theo.}} (\text{nm})$			$\text{CaTi}_2\text{O}_5$ (ICDD 25-1450), $d_{\text{theo.}} (\text{nm})$		
TS-HA1	TS-HA2	TS-HA3	TD-HA1	TD-HA2	d (nm)	l	hkl	d (nm)	l	hkl	d (nm)	l	hkl	d (nm)	l	hkl
			0.261		0.263	25	202									
0.252											0.249	12	-601	0.250	75	206
0.236	0.232	0.235		0.233							0.237	4	-113	0.244	15	041
0.231	0.225	0.230	0.224		0.226	20	310									
0.222	0.219										0.219	2	-512	0.219	10	334
		0.208									0.208	27	-603			
0.202			0.205	0.200							0.205	21	602			
0.194	0.194	0.195	0.194	0.193	0.194	30	222	0.194	22	0 14 0	0.197	3	-513	0.195	50	603
					0.189	16	312	0.192	44	202	0.187	30	020	0.187	85	327
0.184	0.187	0.190	0.187	0.187	0.184	40	213							0.185	30	700
0.178	0.178	0.178	0.178	0.177	0.180	20	321									
0.173		0.168	0.173		0.172	20	004				0.173	13	-514			
0.161				0.160	0.164	10	322				0.163	16	802			
0.154	0.156	0.155	0.156	0.155				0.157	19	371						
								0.157	19	2 10 2						
0.152		0.148	0.152	0.150	0.150	10	214				0.149	3	803			
			0.146								0.146	2	911			
0.125		0.121	0.123		0.124	11	513									

### FTIR study

FTIR spectra were recorded on the different layers in order to confirm the presence of phosphate, carbonate, and hydroxyl bands. Figure 4.1.5 shows the FTIR spectra of Ca-P spin- and dip-coated samples in comparison with the TT one.

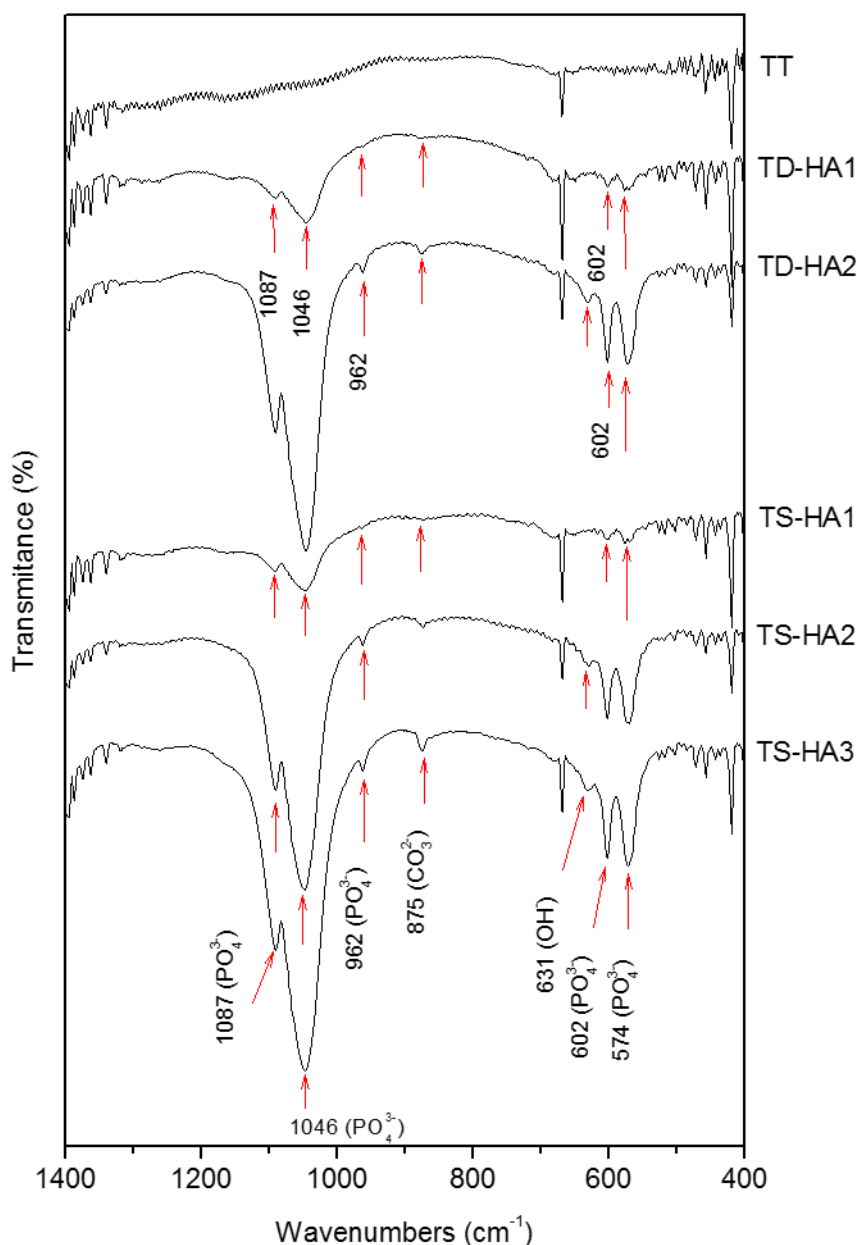


Figure 4.1.5. FTIR analysis for the samples: TT, TD-HA1, TD-HA2, TS-HA1, TS-HA2, and TS-HA3

The TT spectrum exhibits only peaks of CO<sub>2</sub> adsorbed on the metallic substrate. TS-HA1 and TD-HA1 spectra are similar, with weak phosphate peaks. According to previous works (3–5), the peaks at 1087 and 1046 cm<sup>-1</sup> are assigned respectively to triply degenerated asymmetric stretching mode  $\nu_{3a}$  and  $\nu_{3b}$  of the P-O bond of PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> group. The peak at 962 cm<sup>-1</sup> is attributed to the non-degenerated asymmetric stretching mode  $\nu_1$  of the bond P-O of PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> group. The peaks at 602 and 574 cm<sup>-1</sup> correspond respectively to the

triply degenerated bending mode  $\nu_{4a}$  and  $\nu_{4b}$  of the O-P-O bonds of  $\text{PO}_4^{3-}$  group. These peaks were more pronounced in the three other spectra in agreement with the highest amount of phosphate. The peak at  $631\text{ cm}^{-1}$  ascribed to librational mode  $\nu_L$  of the  $\text{OH}^-$  group was visible for the latter. The peak at  $875\text{ cm}^{-1}$  can be assigned to the bending mode  $\nu_2$  of the  $\text{CO}_3^{2-}$  group in  $\text{CaCO}_3$  (6,7).

### Raman study

Beside the FT-IR analysis, the Raman microspectroscopy for the inspection of the treated titanium samples was used. This method allows the direct and non destructive detection of chemical compounds, as well as the compositional mapping of samples surfaces. Figure 4.1.6 shows Raman spectra of the TT, TS-HA1, TS-HA2, TS-HA3, TD-HA1 and TD-HA2 samples in the wavenumber range  $50\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ . Contrary to the Raman signature of the pristine titanium sample, which did not contain any peak (data not shown); all the treated surfaces presented complex spectra, showing heterogeneous chemical composition.

On the one hand, peaks corresponding to various titanate phases are found in the  $50\text{--}900\text{ cm}^{-1}$  domain: the Raman signature of the TT sample was very similar to that reported by Kim et al. (8) attributed to a mixture of hydrogen titanate and sodium titanate phases ( $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$  and  $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$ ), while for all the samples enriched with calcium phosphate, Raman profiles contained the signature of calcium titanate  $\text{CaTiO}_3$  (9,10). It should also be noted that: (i) ubiquitous broad bands at  $440\text{ cm}^{-1}$  and  $615\text{ cm}^{-1}$  might indicate the presence of the rutile phase of  $\text{TiO}_2$  over all the treated substrates (11); (ii) very sparsely distributed anatase phase of  $\text{TiO}_2$  was detected (Figure 4.1.6 c ; intense peak at  $145\text{ cm}^{-1}$ ,  $520\text{ cm}^{-1}$ ,  $640\text{ cm}^{-1}$ ); (iii) we could not find in literature relevant Ti-based phases with a characteristic peak at  $800\text{ cm}^{-1}$  similar to that obtained for the samples treated with calcium phosphate, such that identification of all the phases present on surfaces remains incomplete. The red chemical mapping of surfaces based on Raman intensity in the  $115\text{--}325\text{ cm}^{-1}$  range shows that titanium surfaces are uniformly converted into titanate phases (Figure 4.1.7 a).

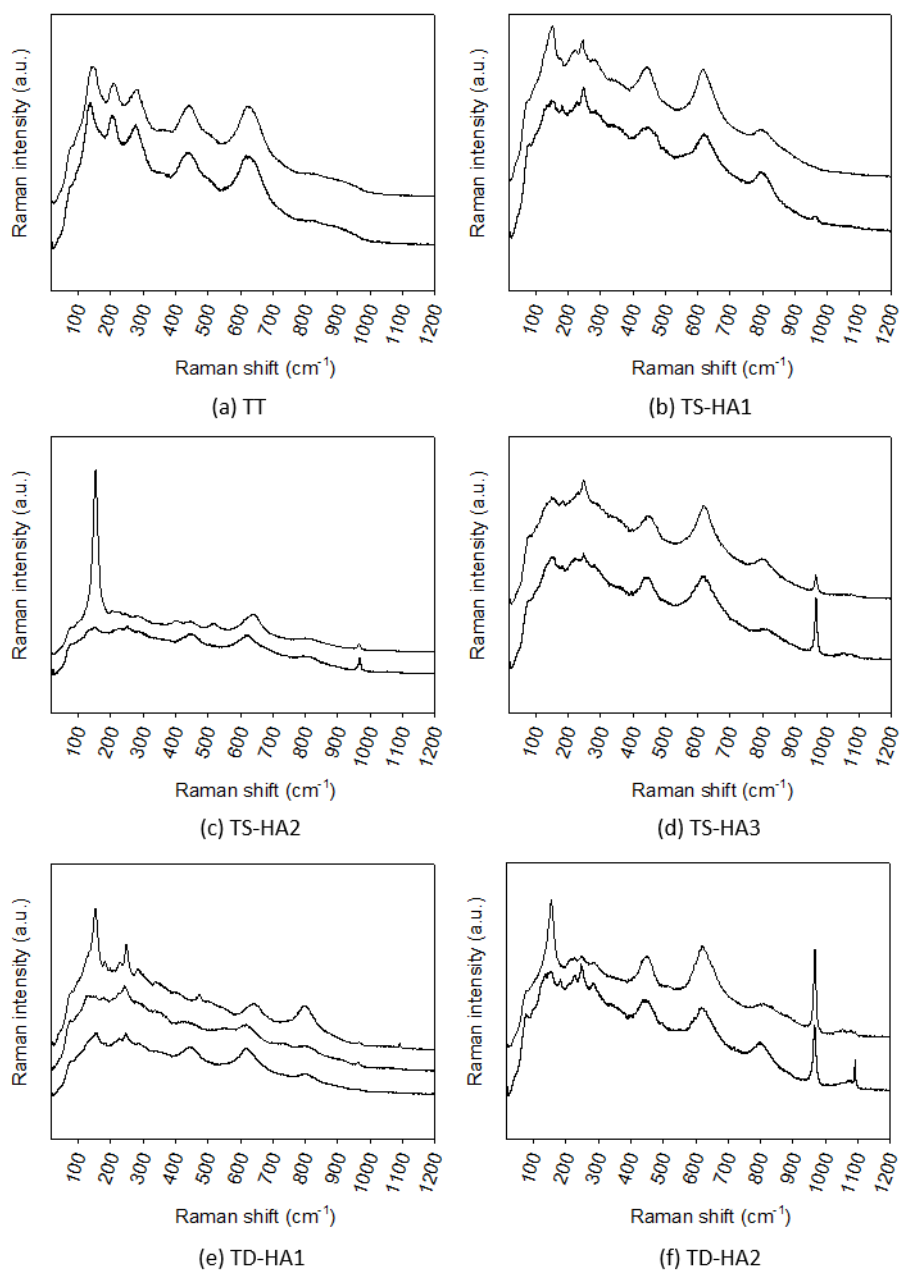


Figure 4.1.6. Typical Raman spectra of the surface of (a) a pre-treated titanium sample, and samples enriched with Ca-P by (b, c and d) spin-coating, and (e, f) dip-coating

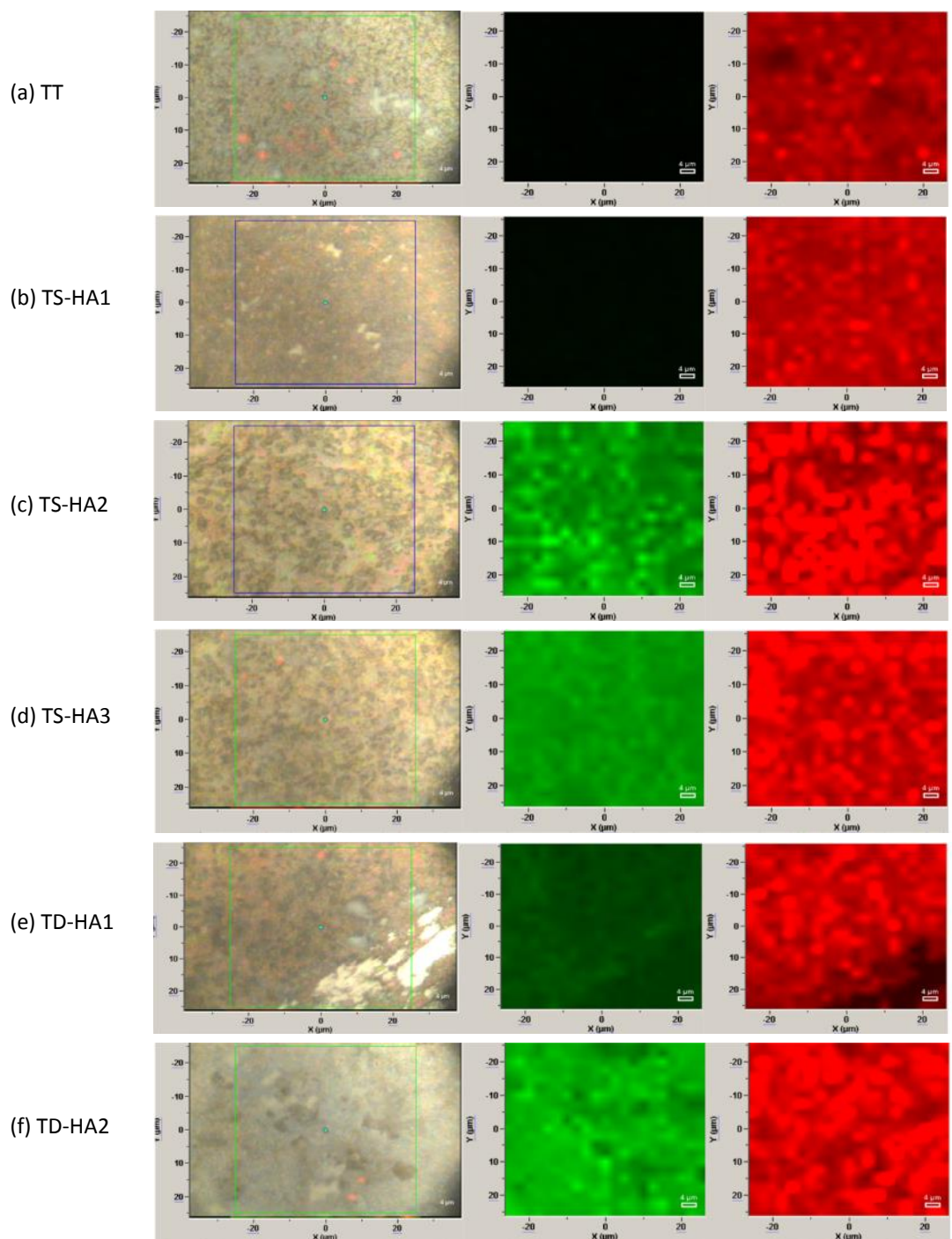


Figure 4.1.7. Compositional mappings of the samples described in Figure 4.1.6 obtained by confocal Raman microscopy. Optical micrograph of the analyzed area (left), Raman intensity of the Ca-P peak at  $960\text{-}965\text{ cm}^{-1}$  (middle), Raman intensity in the  $115\text{-}325\text{ cm}^{-1}$  range corresponding to the titanate phases (right). The bright area in the bottom right hand corner of the micrograph of TD-HA1 corresponds to a scratch performed on the surface

On the other hand, noteworthy, the effective Ca-P deposition was confirmed by the presence over all samples, excepted TS-HA1, of the specific peak of phosphate at 960-965  $\text{cm}^{-1}$ , with an accumulation of Ca-P upon successive treatments. The green chemical mapping (Figure 4.1.7) corresponding to the peak at 965  $\text{cm}^{-1}$  confirms the increasing amount of Ca-P upon successive treatments, and reveals the uniformity of the coatings. The value of 960-965  $\text{cm}^{-1}$  for the Raman shift of phosphate groups is consistent, promisingly, with the presence of the biologically relevant HA phase. In the case of the TD-HA2 sample, the peak of carbonate at 1090  $\text{cm}^{-1}$  might be due to the carbonated apatite phase, which is the major mineral component of bone (12).

As a result we found that, by depositing a Ca-P layer on the sodium titanate one, a double crystalline layer of apatite ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ), which plays an important role in improving the osteointegration of the implant, and of sodium titanate-calcium titanate was obtained. The formation of calcium titanate ( $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ ) by reaction of Ca-P and sodium titanate promises increasing the adhesion between apatite layer and substrate. Additionally, calcium carbonate exist also on the Ca-P coating in case of the TS-HA3 and TD-HA2 samples.

## 4.2 Morphology and structure of the Ti-6Al-4V/sodium titanate/Ca-P multilayer system

The morphology of the coating has been observed by SEM; either top-views or cross sections have been imaged.

### 4.2.1. Observation of the surface

The surface structures are shown in Figure 4.2.1. They are not smooth and regular, made of particles with various size and shape. When the coating is performed, the sol-gel solution spreads out on the sodium titanate. But the wetting is probably not homogeneous on the whole surface, leading to the irregular shapes observed on SEM images.

Figure 4.2.2 shows EDS-X spectra of the Ca-P coatings deposited by spin and dip technique, compared to Kroll and TT samples. Na and Ti peaks recorded on EDS-X analysis performed on the TT sample are still visible on TS-HA1 and TD-HA1 spectra, but weaker. These peaks have disappeared in the three other spectra. The C peak is weak even for the TS-HA3 and TD-HA2 samples. Ca is detected for Ca-P, calcium titanate and calcium carbonate (for TS-HA3 and TD-HA2) of the Ca-P coatings. P was detected on all samples and belongs mainly to HA (see §4.1.2).

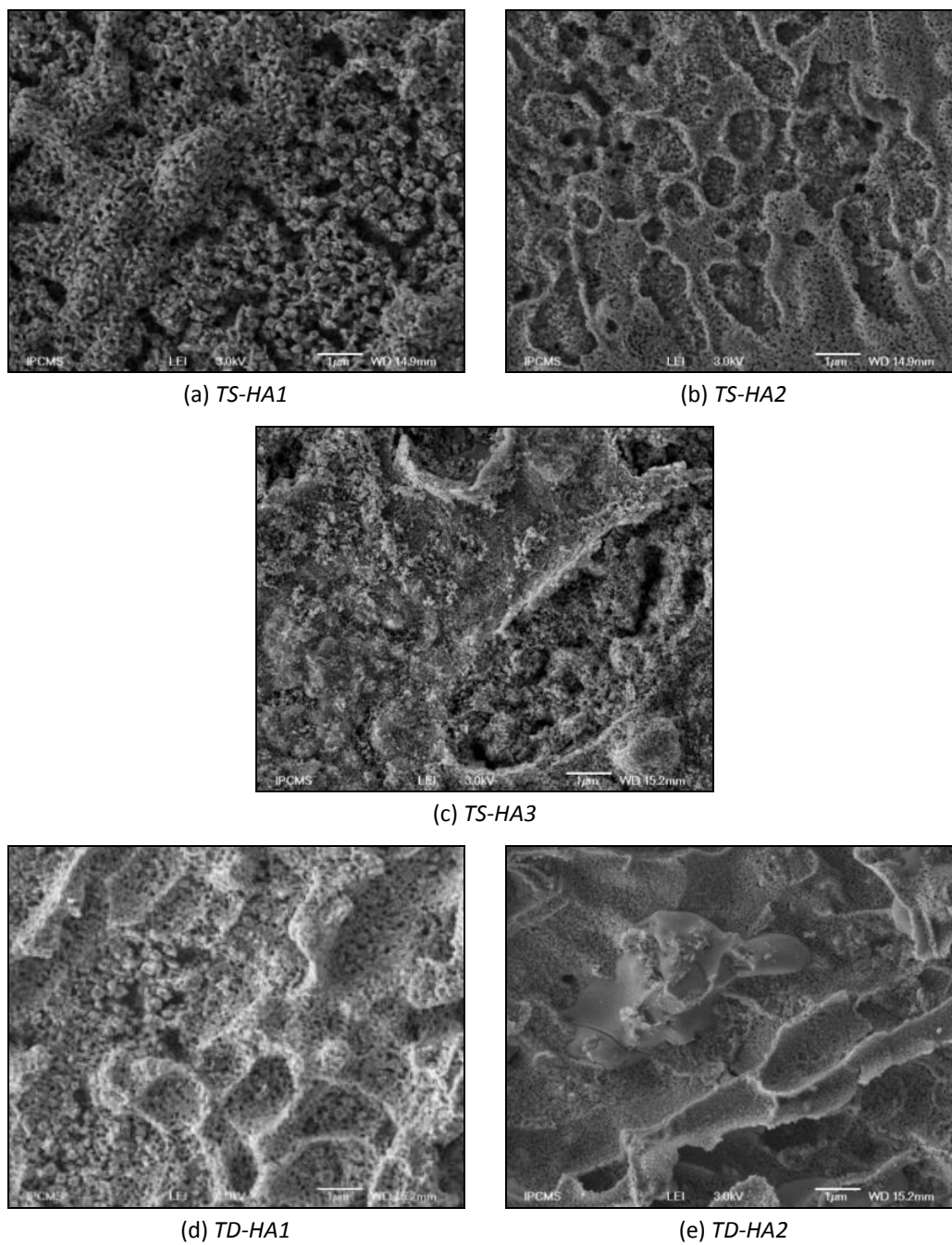


Figure 4.2.1. SEM observations of the *TS-HA1*, *TS-HA2*, *TS-HA3*, *TD-HA1* and *TD-HA2* samples

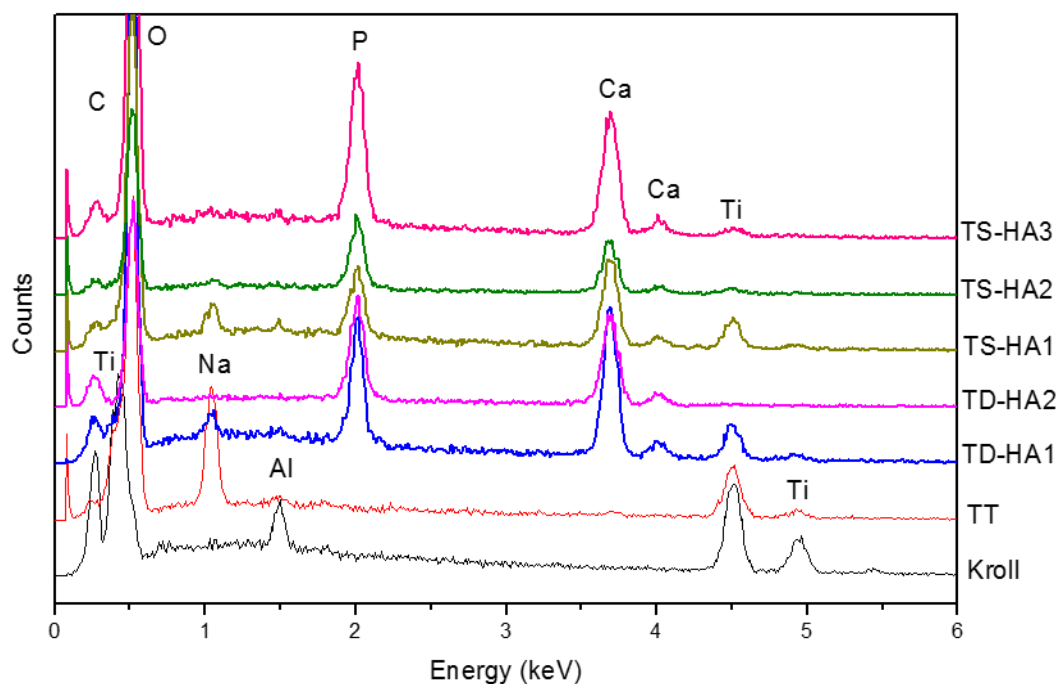


Figure 4.2.2. EDS-X analysis of the spin- and dip-coated samples compared to the Kroll and TT ones, recorded on few mm<sup>2</sup> area

#### 4.2.2. Structure of the interfaces

Cross sections have been prepared with the cross-polisher method described in Chapter 2, §2.3.8. They are presented in Figures 4.2.3, 4.2.4, 4.2.5, and 4.2.6. The cross-sections look similar for all the samples. The layer covering the titanium alloy is porous and of variable thickness, in agreement with the sodium titanate layer observed in Chapter 3 (Figure 3.2.11) and Ca-P layer shown in Figure 4.2.1. The whole coating is about 500 nm thick. One can note that the most homogeneous width is obtained for TS-HA3 (spin-coated 3 times) and TD-HA2 (dip-coated twice), while TS-HA1 and TS-HA2 have irregular surfaces. Three layers are clearly visible:

- The upper layer is porous and made of nanometric crystals. This layer has a constant width in TD-HA2, and does not cover the entire surface in TS-HA1 and TS-HA2.
- The intermediate layer made of submicronic crystals.
- A thin layer of less than 100 nm stuck to the metallic substrate.



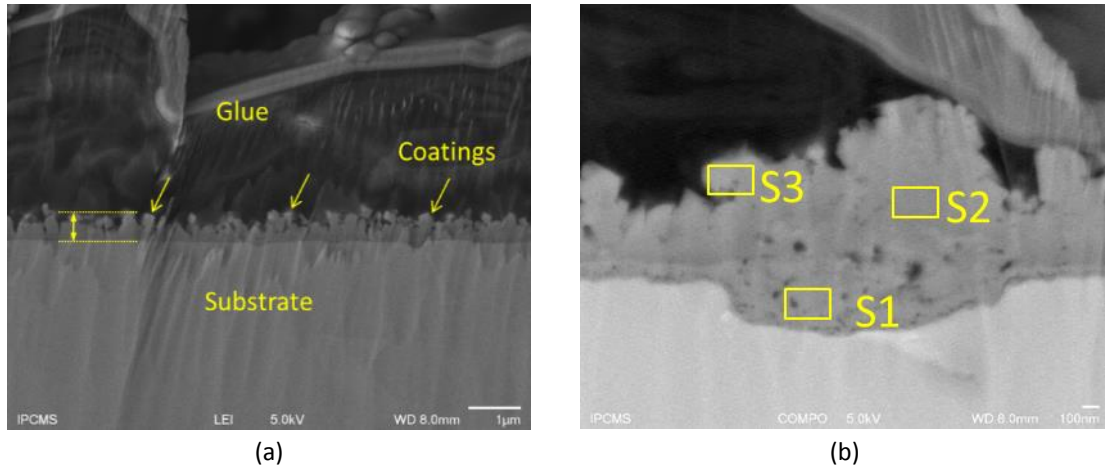


Figure 4.2.3. Cross-section observation of the sample TS-HA1

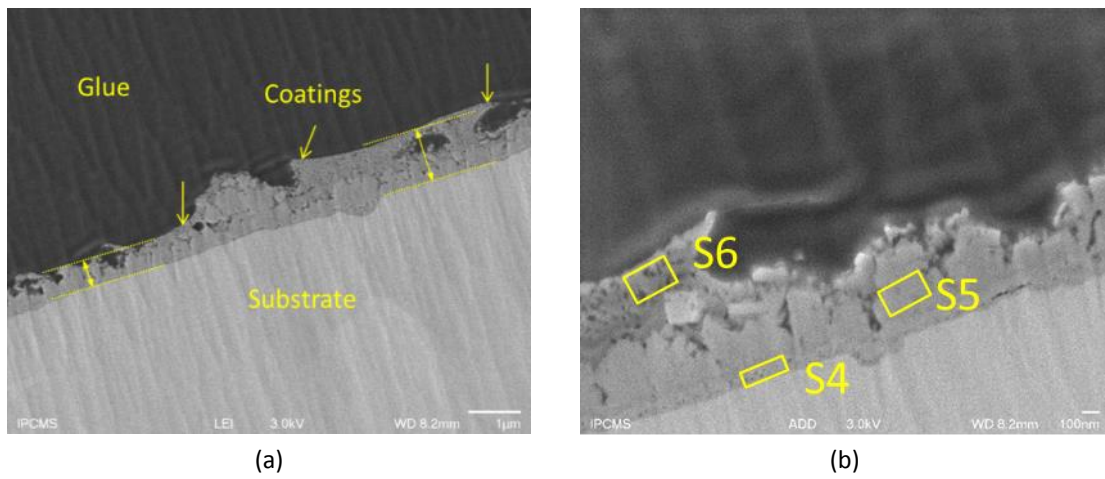


Figure 4.2.4. Cross-section of the sample TS-HA2

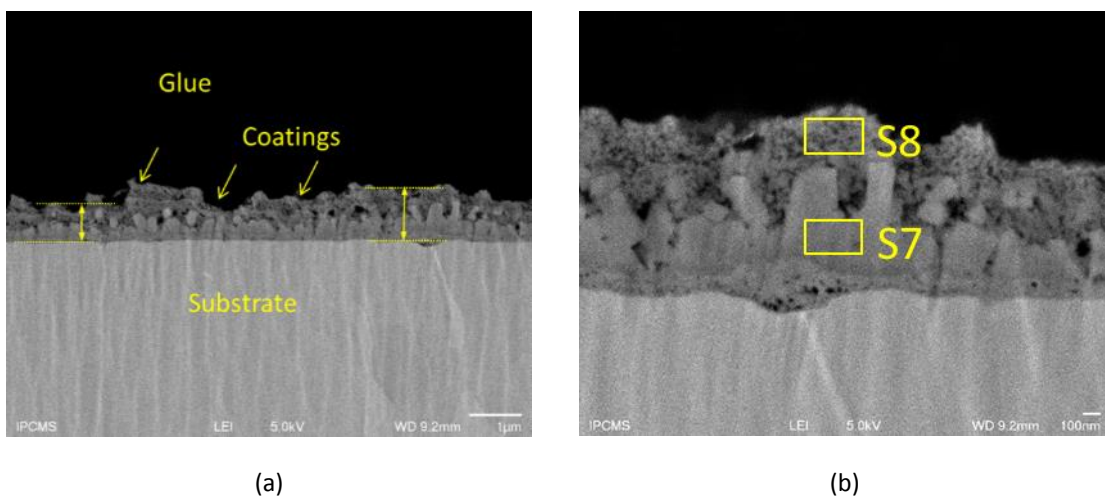


Figure 4.2.5. Cross-section of the sample TS-HA3

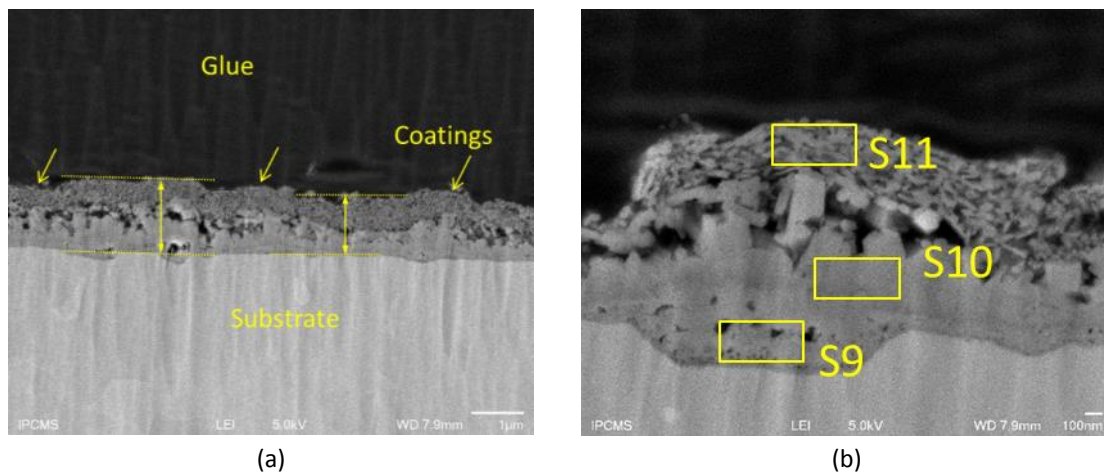


Figure 4.2.6. Cross-section of the sample TD-HA2

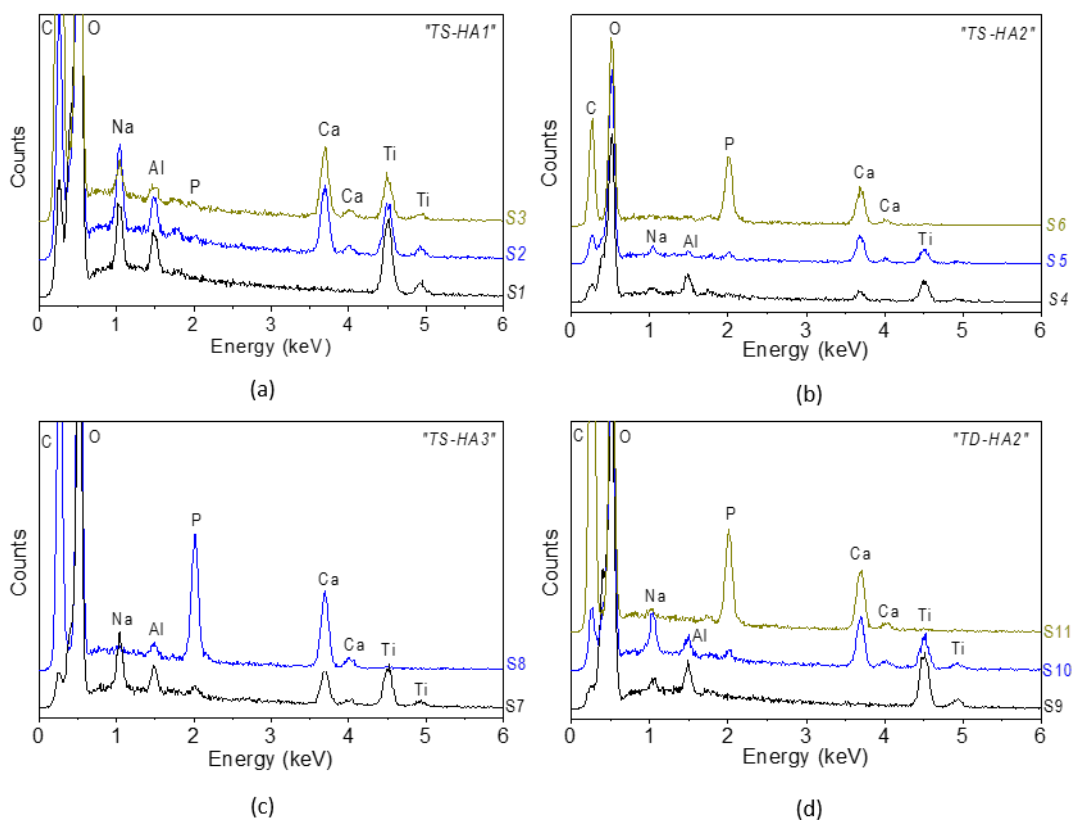


Figure 4.2.7. EDS-X analyses recorded (a) at S1, S2 and S3 points of Figure 4.2.3, (b) at S4, S5 and S6 points of Figure 4.2.4, (c) at S7 and S8 points of Figure 4.2.5 and (d) at S9, S10 and S11 point of Figure 4.2.6

Although EDS-X analyses have been performed at energy of 10 kV so that recorded spectra correspond to  $1 \mu\text{m}^3$  volume, - larger than the spots noted on the image-, one can have an idea of the layer composition.

Figure 4.2.7 a shows the EDS-X analyses of S1 to S3 spots noted on Figure 4.2.3. The Ca-P coating thickness ranges from 500 nm to 600 nm (Figure 4.2.3 a). SEM observation of entire cross-section presents a certain “bump” in size up to 1000 nm (S1 zone, Figure 4.2.3 b). EDS-X analysis in S1 shows O, Al, Na, Ti, elements. No peak of Ca and P are present in S1; while, at S2 and S3, Ca, O and Ti are observed with a tiny P peak in S3 zone. We can assume that the complete structure is built as follows: Ca-P/ calcium titanate/ sodium titanate/ Ti-6Al-4V.

TS-HA2 and TS-HA3 (Figures 4.2.4 and 4.2.5) possess a uniform micro porous Ca-P layer, which was confirmed by EDS-X analyses and no sodium titanate was visible (Figures 4.2.7 b and c). Figure 4.2.4 (cross-section view of the sample TS-HA2) exhibits the thickness of coating size ranges from 550 nm to 1000 nm with no uniform morphology. Particularly, three different layers on the coating (Figure 4.2.4 b) can be distinguished:

- A first layer (named S4) of 80 - 90 nm bonded directly to the substrate. This structure is mainly composed of sodium titanate and TiO<sub>2</sub> (as shown in Chapter 3). Little Ca and no P were detected.

- A second layer (named S5) has a thickness ranging from 350 to 390 nm and appears denser than the first one. Calcium titanate is present and EDS-X analysis proves its presence by O, Ca and Ti peaks.

- A third porous zone (S6) has a thickness in the range of 120 to 380 nm. The existence of Ca, P and O peaks in EDS-X spectra confirms the presence of Ca-P.

For the sample TS-HA3 (Figure 4.2.5), the overall thickness measured on the coating was from 700 to 1000 nm. The coating included three different layers as observed in the sample TS-HA2. The thickness of the layers was measured from 90 to 100 nm for the first layer (Figure 4.2.4, location S4), from 300 to 480 nm for the second one (Figure 4.2.5, location S7) and 350 to 500 nm for the third one (Figure 4.2.5, location S8).

For the sample TD-HA2 (Figure 4.2.6), the coating with an overall thickness from 1150 to 1450 nm was measured. TD-HA2 surface presented in Figure 4.2.1 e was completely covered with a denser layer than TD-HA1. EDS-X analyses clarify that the homogenous layer was Ca-P (Figure 4.2.4). While the TD-HA1 surface (Figure 4.2.1 d) present a higher porosity compared to TD-HA2, the EDS-X analyses suggest the presence of sodium titanate (Na, Al and Ti were detected) simultaneously with a tiny amount of Ca-P layer in and over the pores (Figure 4.2.2).

The formation of calcium titanate (Ca<sub>4</sub>Ti<sub>3</sub>O<sub>10</sub>) can be explained: when the first gel layer was deposited on the sodium titanate, a thin film of Ca-P gel reacted with the sodium titanate to form calcium titanate. On the other hand, part of phosphate remains free and is eliminated by washing. As a result, calcium detected on the TS-HA1 belongs mainly to calcium titanate. Consequently, the Ca/P ratio measured by EDS-X was increased (Figure 4.2.2). However, for TS-HA2, TS-HA3 and TD-HA2 samples, the Ca-P layer was thicker than TS-HA1 and Ca detected by EDS-X belongs to Ca-P and calcium titanate.

### 4.3. Mechanical properties of Ca-P coatings scratch test

In an applicative point of view, the coating has to be resistant enough to mechanical stresses and frictions. The structure of the layer, the cohesion between the phases and the quality of bonding to the metallic substrate are significant key points. In order to evaluate the adhesion between the Ca-P coating and the substrate, we present in this paragraph the mechanical properties tested qualitatively by nano-indenter (scratch test) as described in Chapter 2, § 2.2.9.

Figure 4.3.1 shows the surface topographies obtained through the three previously described steps (named as the scratch curves). Within the scratch distance, it can be observed that there are some ridge points with a roughness height of 500 nm for the TT sample. The surface roughness of Ca-P coating is higher on dip coated samples (TD-HA1 and TD-HA2) than on spin coated ones (TS-HA1 and TS-HA2, see initial profile inside the Figure). Indeed, some ridge points of 3  $\mu\text{m}$  were recorded on the TD-HA2 sample.

When the scratch load is applied, the Ca-P layer is firstly pressed, then, during the indenter movement, the layer is simultaneously pressed and/or crushed.

On the scratch profile (scratch depth, red curve, 2), a depth of 2200 to 2500 nm was achieved on TT, TS-HA1 and TS-HA2 samples for a normal applied load of 100 mN (Figures 4.3.1 a, b and c). This value is 1200 nm for the TS-HA3, 1900 nm for the TD-HA1 and 4600 nm for the TD-HA2.

The scratch depth of TS-HA3 sample is smaller than the one of TT, TS-HA1 and TS-HA2 although its coating is thicker than previous ones and presents rather rough initial profile. In addition, the scratch depth measured (curve 2) on the TS-HA3 is always stable about 1200 nm along the scratch. That is not a clear result and we cannot formally explain it; nevertheless we suppose that this phenomenon could be caused by the initial roughness of Ca-P coating on the TS-HA3 (Figure 4.3.1 d, compared to Figures 4.3.1 b and c).

In principle, the scratch profile (curve 2) depends on the hardness of substrate and of coating. The mechanical behaviour of TT and TS-HA1 sample was not different because the Ca-P film on the TS-HA1 sample was very thin and thus has no real influence. It can be found that some traces of sodium titanate can be observed on the TS-HA1 sample (Figure 4.3.2 a and b). For the TS-HA2, because of twice deposition the coating was thicker than TS-HA1; thus cracks which were previously observed after the first deposition were not clearly observable in this case. We can hypothesize that these cracks have been filled by the second deposition of Ca-P. Therefore, the Ca-P coating of TS-HA2 sample seems more compact than the TS-HA1 one. We can also assume as a hypothesis that TS-HA3 coating was thicker and rougher than TS-HA1 and TS-HA2, the scratch profile (curve 2) was smaller than TS-HA1 and TS-HA2 ones achieving 1.2  $\mu\text{m}$  thickness.

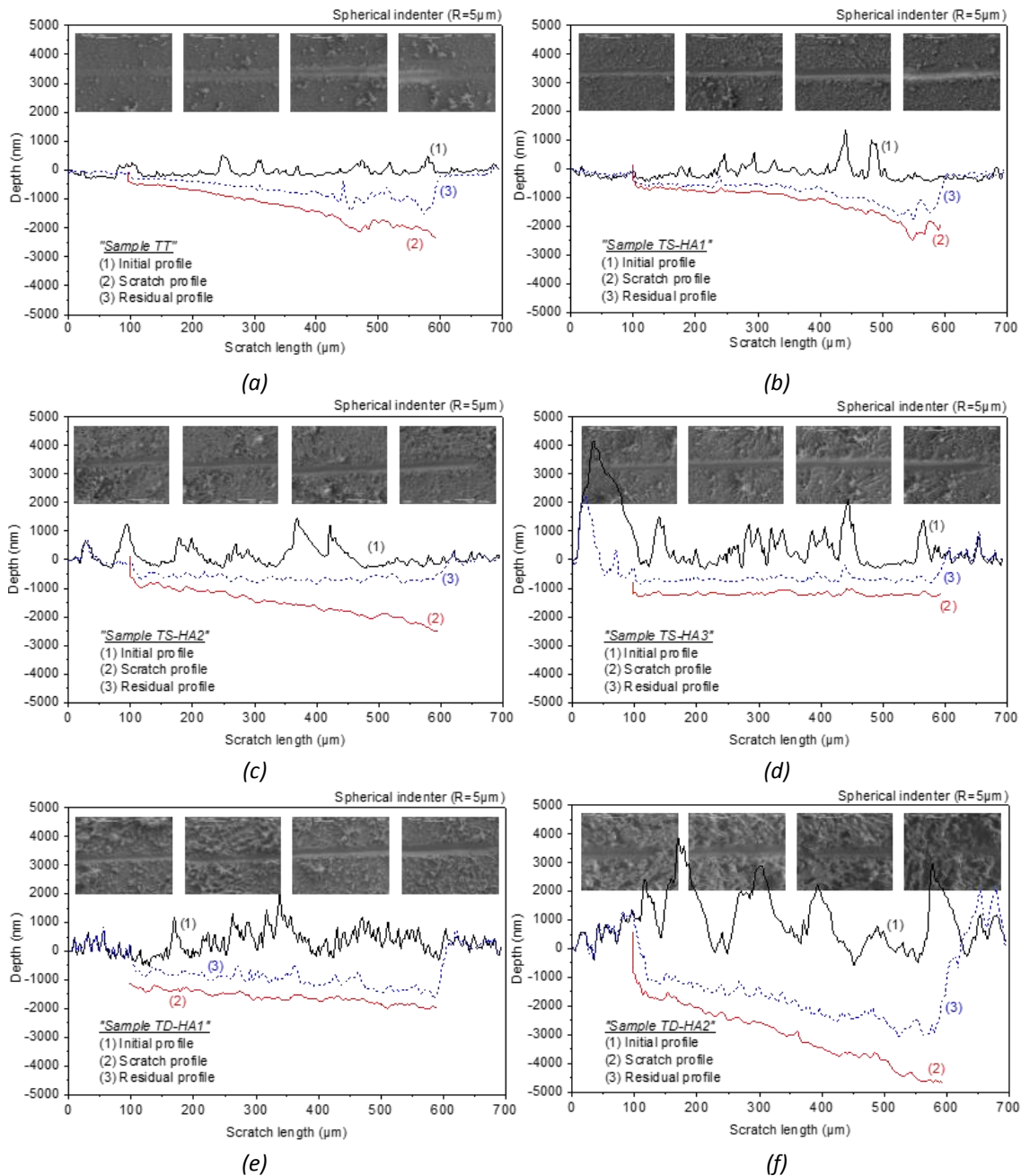


Figure 4.3.1. Experimental scratch curves obtained on the samples (a) TT, (b) TS-HA1, (c) TS-HA2, (d) TS-HA3, (e) TD-HA1 and (f) TD-HA2 using a spherical indenter ( $R = 5 \mu\text{m}$ ) for a normal applied load varying from 10 to 100 mN

The differences between the dip and the spin coated Ca-P coatings in mechanical behaviour can be explained: (i) dip coating is thicker than spin one; and (ii) spin coated Ca-P layer is more compact than the dip coated one (i. e. TS-HA2 and TD-HA2).

Also, it could be observed that the dip-coated layer was rapidly pressed from the beginning of the scratch because of the crushing of the rough coating from the first applied load. When the scratch load was applied, Ca-P layer was pressed and plastically deformed. In the case of the dip coated sample, the Ca-P layer, thicker, less compact and quite rough, was easily removed leaving a deep scratch groove

from the starting applied load. Indeed, on SEM images (Figure 4.3.2), one can see a “rough and quite thick” Ca-P layer on the TD-HA2 sample, while a smoother and thinner Ca-P coating was obtained on the TS-HA1 and TS-HA2 specimens.

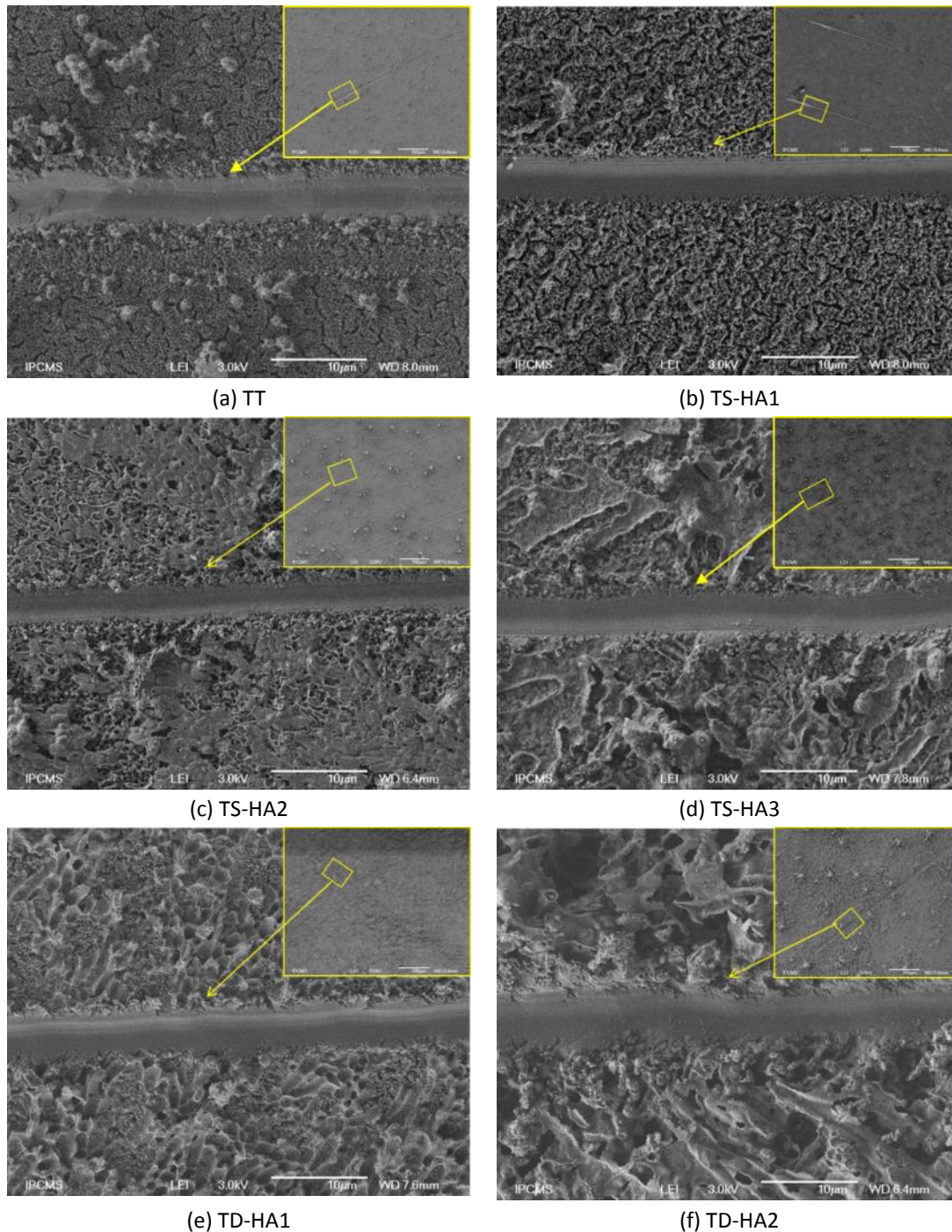


Figure 4.3.2. SEM observations of the residual groove on Ca-P coatings of samples (a) TT, (b) TS-HA1, (c) TS-HA2, (d) TS-HA3, (e) TD-HA1 and (f) TD-HA2 after scratch experiments with a spherical indenter ( $R=5\ \mu\text{m}$ ) for a normal applied load varying from 10 to 100 mN

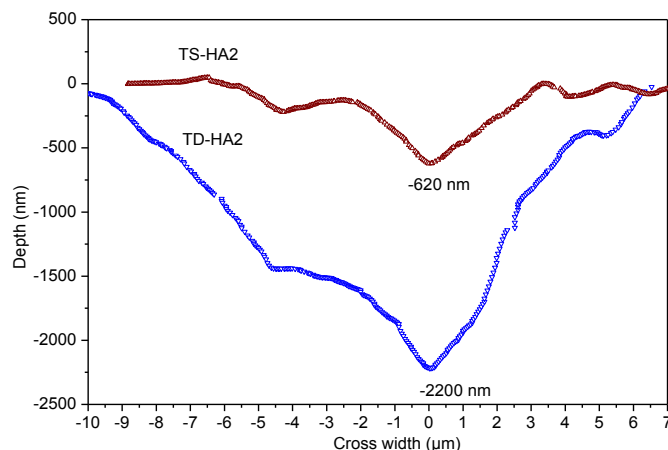


Figure 4.3.3. Cross profile for a load of 50mN of TS-HA2 and TD-HA2

When the load was removed, the scratch recovery was observed due to the elasticity of material and more specifically of the substrate. A higher elastic recovery of material was observed on TS-HA2 compared to TT and TS-HA1 ones. We can also assume as a hypothesis that this recovery was mainly due to the elasticity of the substrate and also due to higher compactness of Ca-P coating. The residual depth is 1200 to 1300 nm for TT, TS-HA1 and TD-HA1, 700 to 790 nm for TS-HA2 and TS-HA3, and 2800 nm for the TD-HA2. It can be found that the scratch recovery on the TS-HA2 seems to be higher than previous samples.

Figure 4.3.2 illustrates SEM observations of residual grooves on Ca-P layers after the scratch left by 5  $\mu\text{m}$  spherical indenter with a normal load from 10 to 100 mN. The good adhesion of all Ca-P coatings onto the substrate is confirmed because no delamination was observed along the scratch line.

Figure 4.3.3 shows the residual cross profile at approximately half of the scratch length on the TS-HA2 and TD-HA2 samples. A depth of 620 nm can be noted for the TS-HA2 sample, while a value of 2200 nm is obtained for the TD-HA2 sample. Additionally, the width of the cross profile for the TS-HA2 sample is rather small in comparison with the TD-HA2 one. It can be observed that the coating on TD-HA2 is thicker than the one of TS-HA2; so it was pressed much more when the load was applied.

Figure 4.3.4 presents the friction coefficient curves for the samples TT, TS-HA1, TS-HA2, TS-HA3, TD-HA1 and TD-HA2. The value of friction coefficient increased quickly when the load was applied. Whilst the coating was crushed, the friction coefficient decreased. Moreover, when the indenter reached a penetration with 30 mN load, the friction coefficient became stable. In this case the stability of friction coefficient can be explained by the fact that coatings are continuously flattened against the substrate because the scratch load was applied. Between 30 and 100 mN, no abrupt decreased peaks of friction coefficient were observed; it means that a good adhesion between the coating and the substrate was obtained (13) (the coating was not removed or unstuck during the removing of indenter). The friction coefficient measured on all samples was more than 0.30.

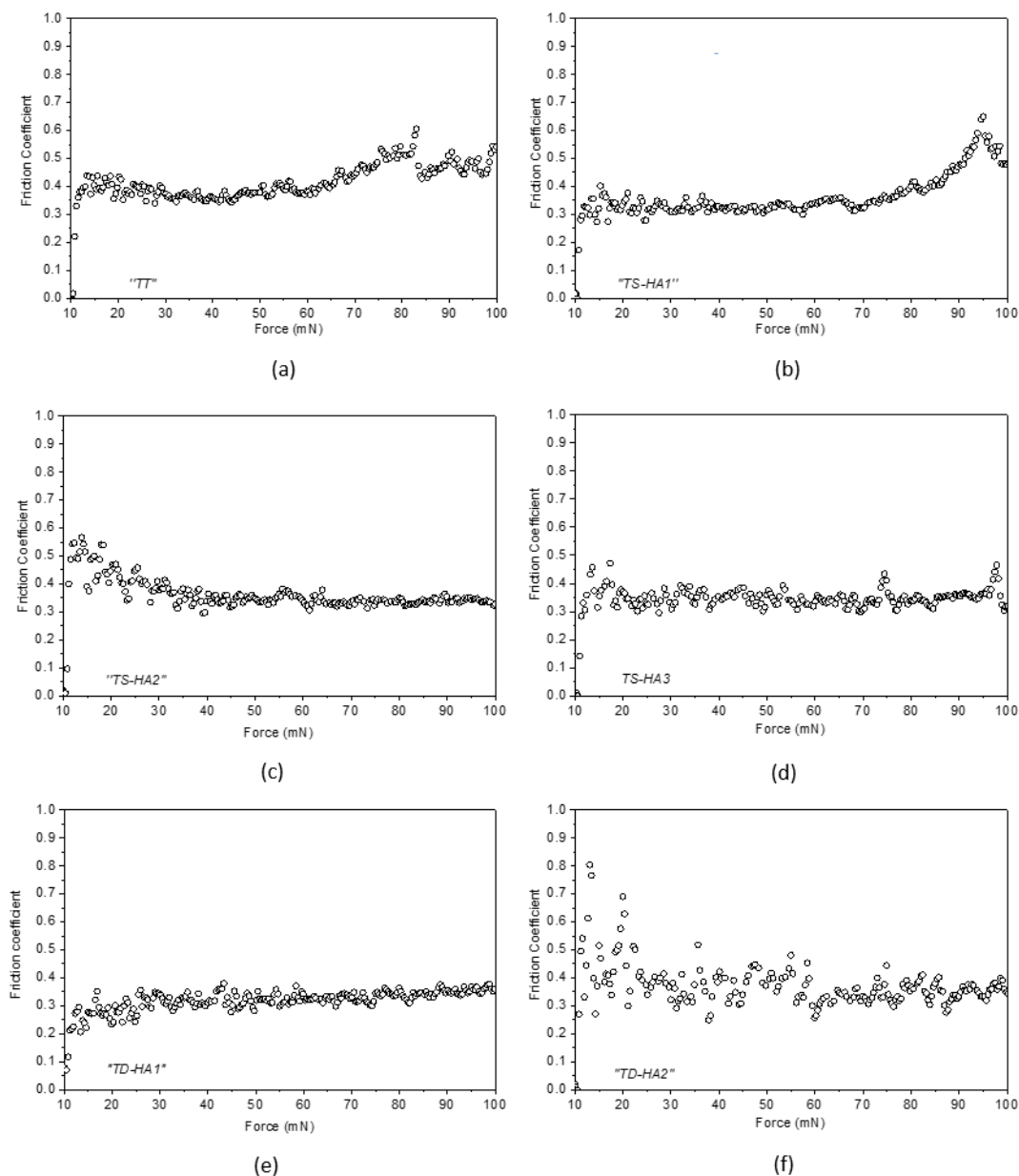


Figure 4.3.4. The friction coefficient as a function of the normal applied load determined on samples (a) TT, (b) TS-HA1, (c) TS-HA2, (d) TS-HA3, (e) TD-HA1 and (f) TD-HA2

The same friction coefficient values measured on all samples mean that the scratch behaviour is quite the same which may reflect the same kind of adhesion. On the other hand, there is no difference high enough on the adherence of coating onto the substrate between the samples (it should be noted that the adhesion of Ca-P coatings onto the substrate is chemical due to the formation of calcium titanate).

The friction coefficient on the TS-HA1 sample increased when the load exceeded 75 mN due to local ridge points on the HA coating (see initial profile on Figure 4.3.1 a). In the case of TD-HA2 sample, (Figure 4.3.1 f) applying low load, the friction coefficient was quite unstable due to large hollows and bumps of the coating before reaching a stable regime.



Finally, the nanoindentation test indicates that the plastic deformation of dip coating was higher than the spin one during the same mechanical stress. This difference can be explained as follows: (i) Ca-P was thicker than the dip coating one; and (ii) the spin coated Ca-P layer was more compact than the dip coated one (i.e. TS-HA2 vs TD-HA2). In addition, there is no unsticking of both spin- and dip- Ca-P coating during the scratch, particularly when the load achieved 100 mN. This is a significant result in view of biomedical applications, especially in case of dental prosthesis.

**4.4. Stability and *in vitro* bioactivity of HA coatings in physiological environment tested by using simulated body fluid**

To evaluate the *in vitro* bioactivity (stability) of Ca-P previously deposited by sol-gel method, the samples were soaked in c-SBF solution at pH 7.4 using a buffer solution consisting of TRIS (tris-hydroxymethyl-aminomethane)-HCl (hydrochloric acid) at 37°C [29]. The ion concentrations of c-SBF solution and human blood plasma are shown in Chapter 2, §2.2.10.

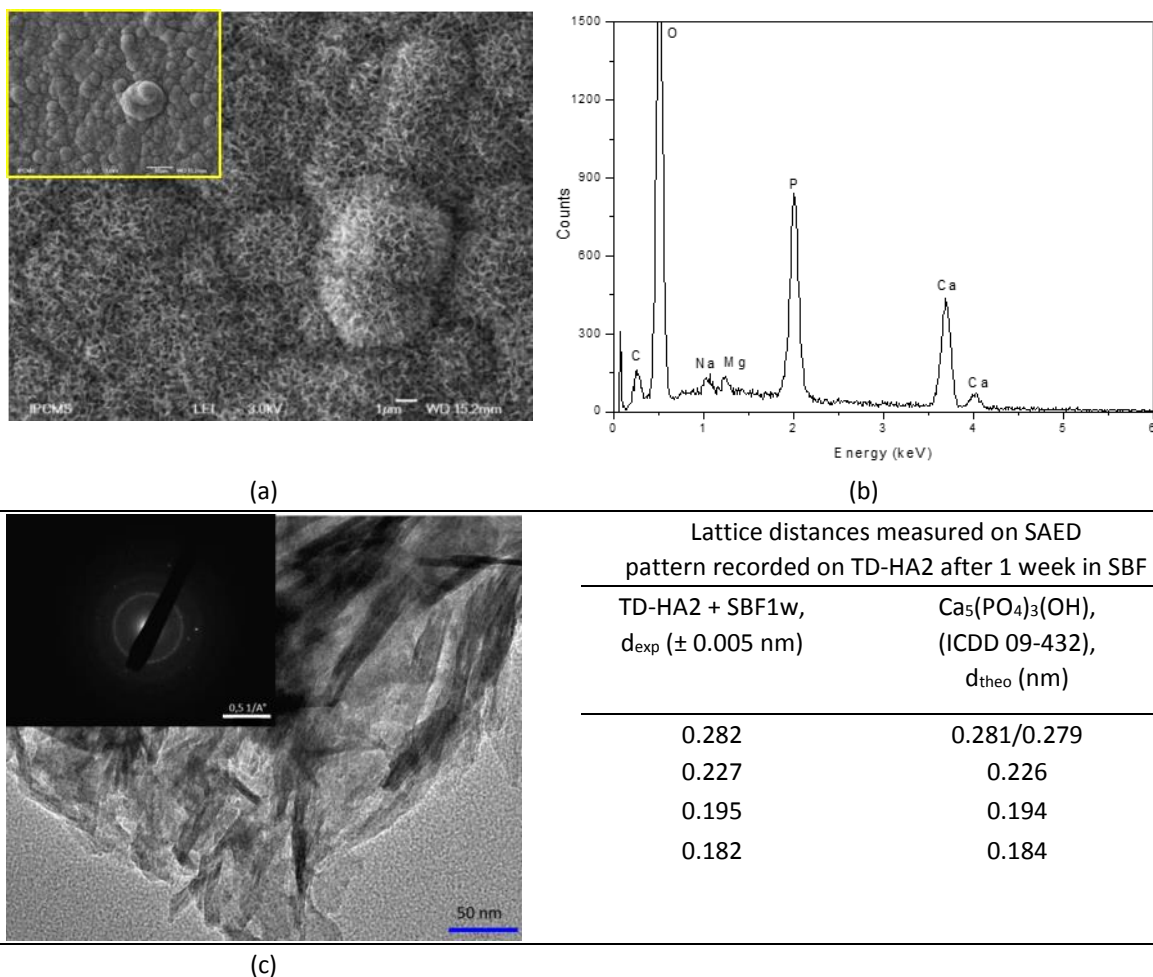


Figure 4.4.1. (a) SEM observations, (b) EDS-X analysis, (c) TEM observation and SAED analysis of the sample TD-HA2 after immersion for 1 to 4 weeks in SBF. The same observations were obtained for the other samples immersed for periods from 1 to 4 week(s)

The SEM observations (Figure 4.4.1 a) and EDS-X analysis (Figure 4.4.1 b) were performed for all samples at all various immersion periods in SBF for 1 to 4 week(s). Figure 4.4.1 a exhibits the surface morphology of TD-HA2 after immersion in SBF for 7 days. Its surface was completely covered with a dense and uniform layer of Ca-P (Figure 4.4.1 b). This Ca-P layer was uniform and dense as proved by the absence of Ti with tiny presence of Mg (from SBF), Na by EDS-X analysis (Figure 4.4.1 b).

TEM observations and SAED analyses were also realized for all samples. Needle- like crystals of 100 nm were observed (Figure 4.4.1 d), mainly composed of Ca and P. This was also confirmed by SAED (Figure 4.4.1 d) since the diffraction rings corresponding to HA (ICDD 09-432) were detected.

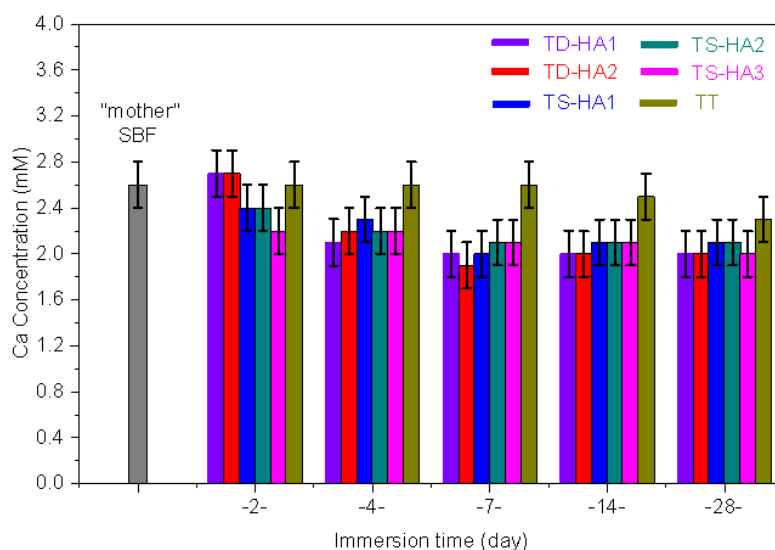


Figure 4.4.2. Ca concentration measured in SBF after soaking the TT, TD-HA1, TD-HA2, TS-HA1, TS-HA2, and TS-HA3 samples for 0, 2, 4, 7, 14 and 28 days

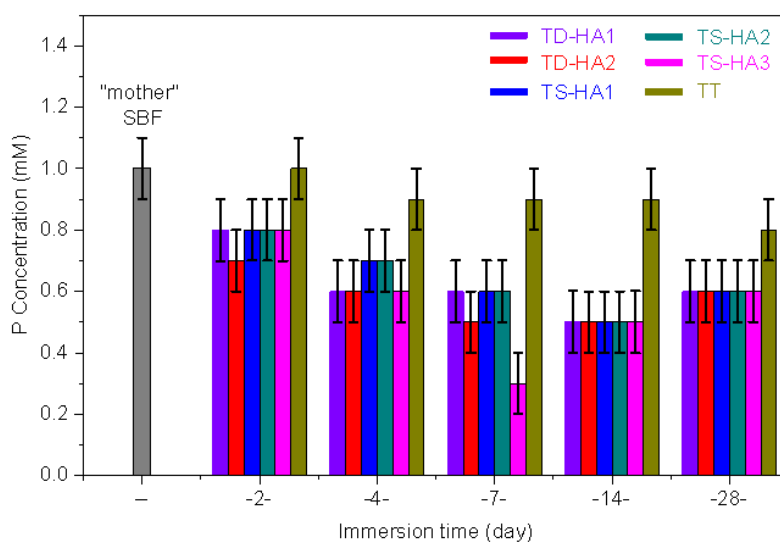


Figure 4.4.3. Phosphorus concentration measured in SBF after soaking the TT, TD-HA1, TD-HA2, TS-HA1, TS-HA2, and TS-HA3 samples for 0, 2, 4, 7, 14 and 28 days

The ionic concentrations of calcium and inorganic phosphorus compared to the mother SBF solution for different soaking periods: 0, 2, 4, 7, 14 and 28 days are presented in figure 4.4.2 and Figure 4.4.3. SBF solution was refreshed each 7 day.

After 2 days, Ca concentration in SBF solution (Figure 4.4.2) was increased while P concentration decreased for TD-HA1 and TD-HA2 (Figure 4.4.3); it means that Ca from samples' coating was released in the SBF solution. On the contrary, both Ca and P decreased in the solution for *TS-HA1*, *TS-HA2*, *TS-HA3* leading to new Ca-P formed layer on the substrate as observed in SEM images. For longer soaking time, Ca and P adsorption goes on and the growing rate of Ca-P layer at the surface seems to be constant for TD-HA1, TD-HA2, *TS-HA1*, *TS-HA2* and *TS-HA3*.

On the other hand, the Ca and P adsorption on TT sample is very tiny. This is confirmed by the SEM observations (Figures 4.4.4 a, 4.4.5 a and 4.4.6 a). A slight decrease of Ca and P concentrations in the SBF solution was observed on the TT sample after 1 to 4 week(s). Moreover, no calcium and phosphate were detected on the TT sample surface by EDS-X. By comparing Figure 4.2.1 and Figures 4.4.4, 4.4.5 and 4.4.6, we can conclude that an additional apatite layer is observed on the coated samples.

Figure 4.4.7 shows the XRD patterns of the samples before and after 1 to 2 week(s) in SBF. We can compare the intensity between peaks (211) of HA and peak (171) of calcium titanate. For all samples except TT, the HA peaks increased versus the immersion time, whereas the intensity of calcium titanate peaks regularly decreased because the sol-gel coatings were covered by new homogeneous Ca-P layer coming from SBF solution.

The HA peaks were more and more increased while the calcium titanate peaks were more and more decreased. A new HA layer was deposited on the old HA coatings, it makes the HA peaks more and more intense as a function of immersion time in SBF. Therefore, we can predict according to Kokubo et al. (14) that the Ca-P coating may link easily to the living bone. This property is one of factors for endorsing the *in vivo* bone bioactivity of the implant.

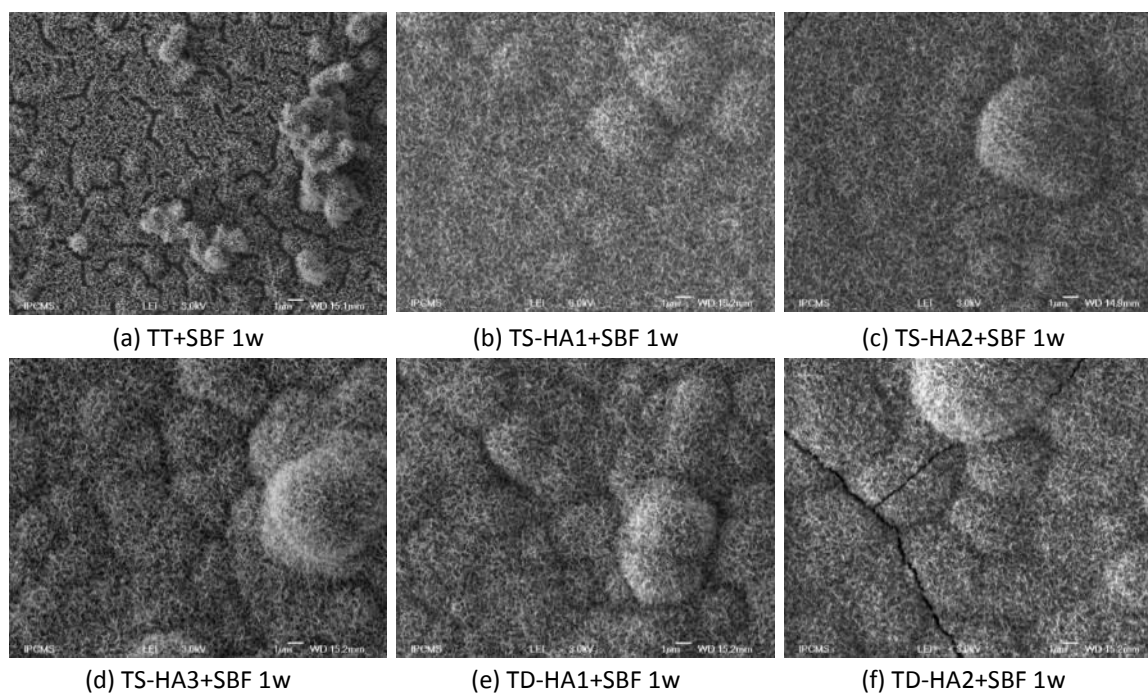


Figure 4.4.4. SEM surface morphology of samples after one week in SBF

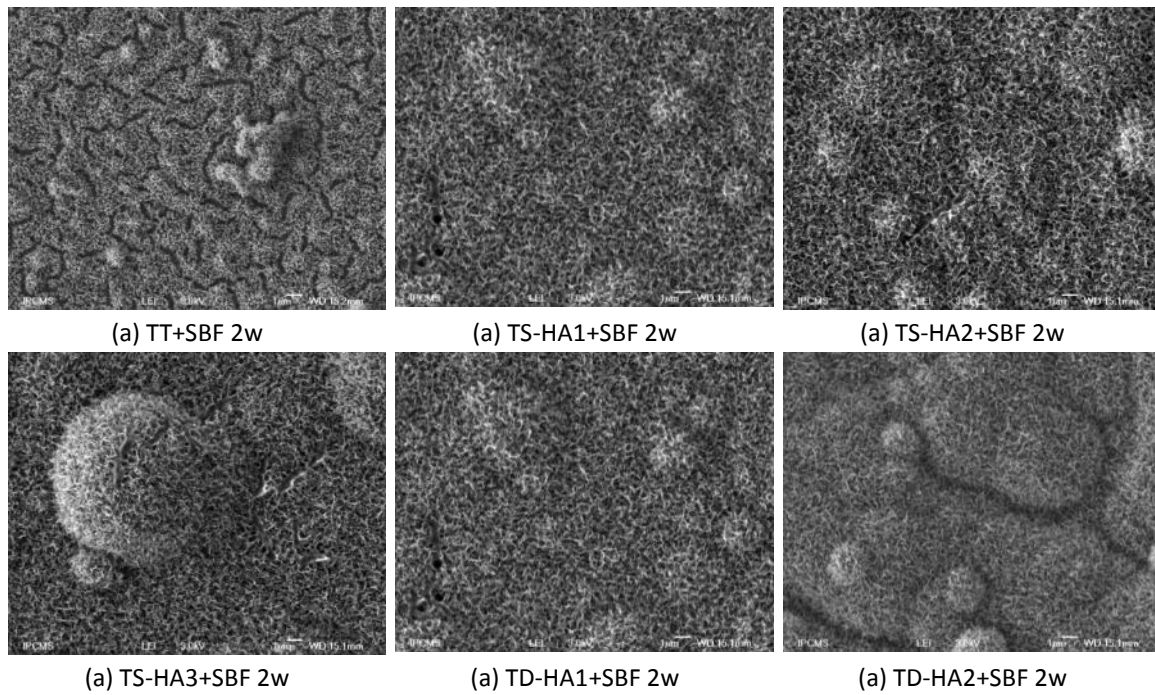


Figure 4.4.5. SEM surface morphology of samples after 2 weeks in SBF

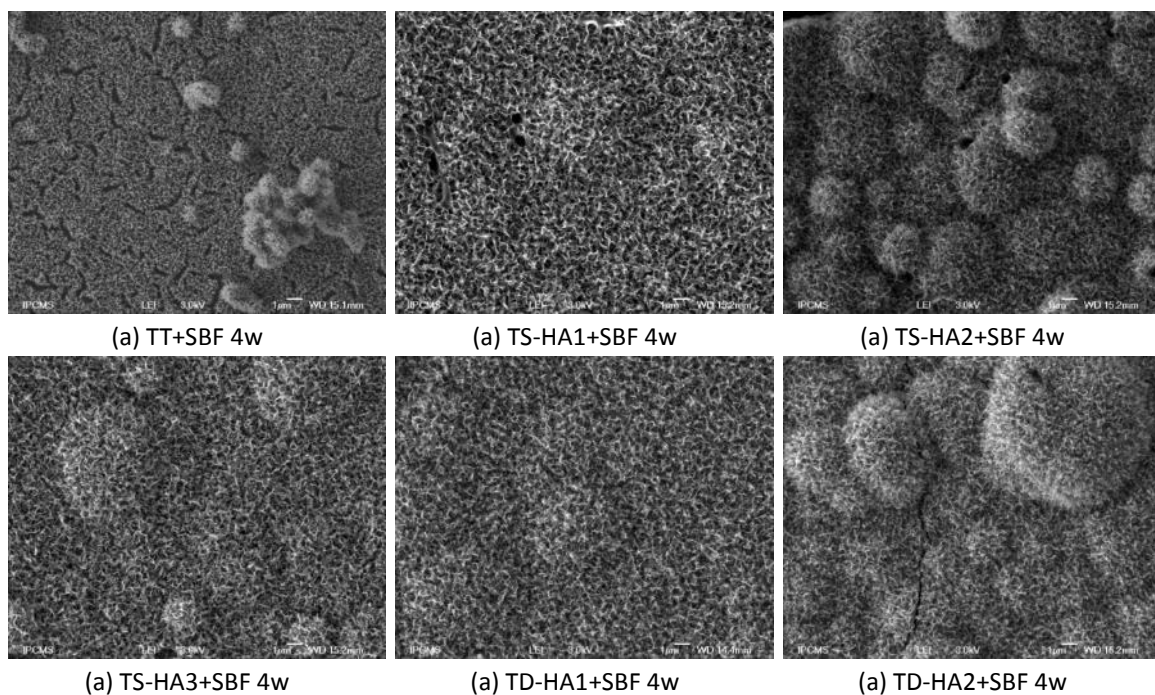


Figure 4.4.6. Surface morphology of samples after 4 weeks in SBF

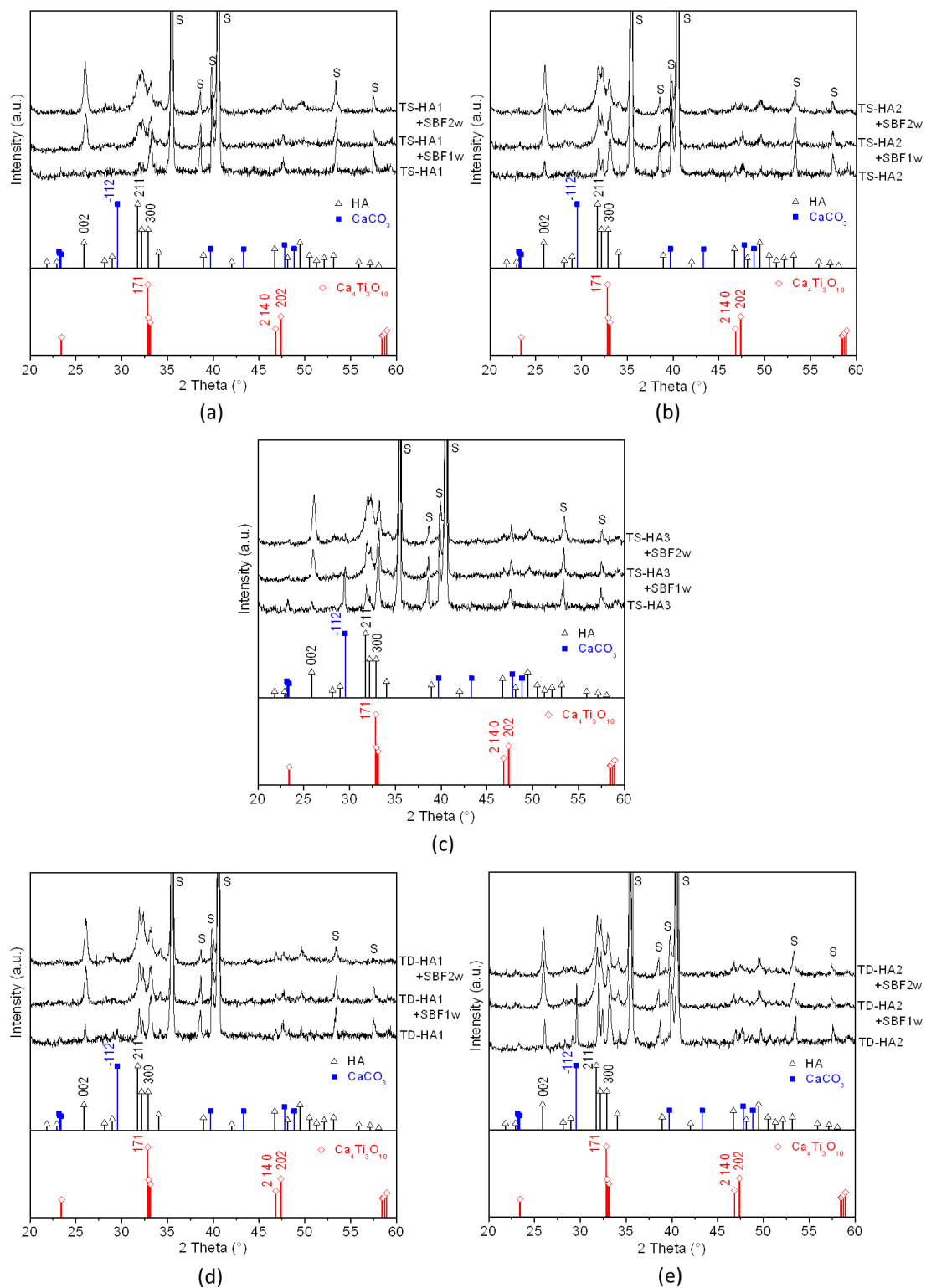


Figure 4.4.7. XRD patterns of (a)TS-HA1, (b) TS-HA2, (c) TS-HA3, (d) TD-HA1 and (e) TD-HA2 samples after soaking in SBF solution for 1 and 2 week(s)

## 4.5. Cell viability assay of calcium phosphate coatings

All the experimental setup of biological evaluation was presented in Chapter 2, §2.3.13.

### 4.5.1. In vitro cytocompatibility

#### a) Not Direct assay

According to the results obtained by the not direct assay, the viability of cells cultivated with medium pre-treated by specimens submersion and evaluated with MTT assay resulted comparable among experimental samples and controls (Ti-6Al-4V substrate) at the both selected time-points (24 and 72 h).

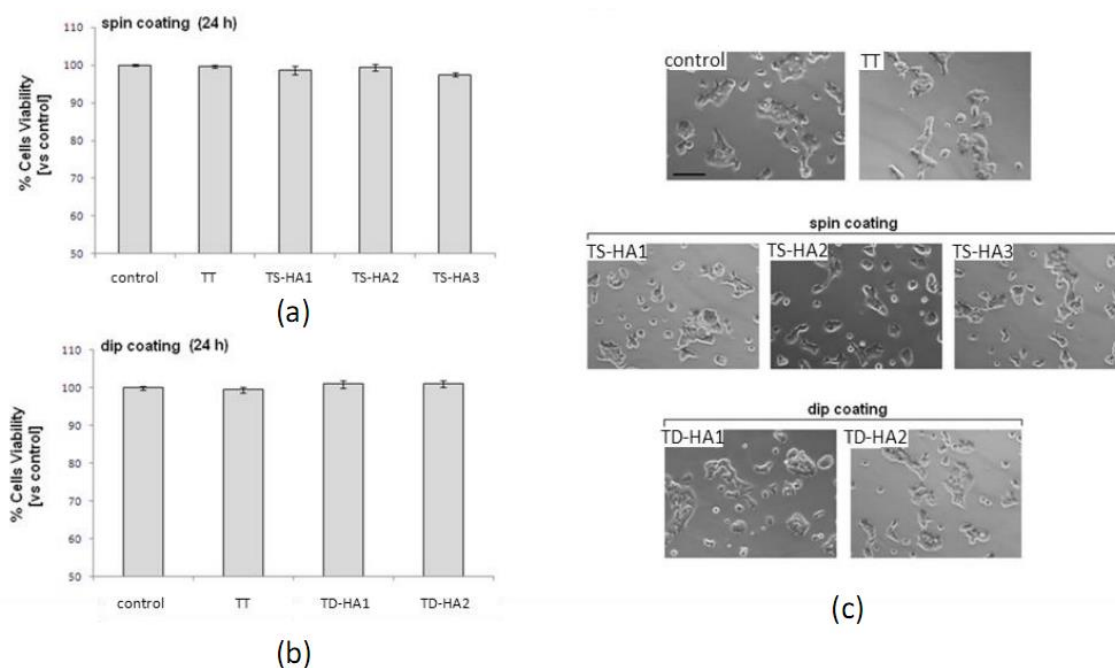


Figure 4.5.1. Not direct cytotoxicity evaluation after 24 h. Bars represent means and standard deviations. MTT assay reported very similar results between spin coated samples and controls (a) and also between dip coated samples and controls (b). For spin coated series, cells viability ranged from 97 to 99% compared with controls, while for dip coated series, the values were between 99 and 101%. No statistical significant differences were noticed between test samples and controls ( $p > 0.05$ ); furthermore, morphological observations (c) confirmed MTT data as cells presented similar morphology, spread and density. Bar scale = 100 μm (magnification 20x)

After 24 h of cultivations (Figure 4.5.1), considering control optical density (o.d.) as 100% viability, the range of obtained data was between 97 and 99% for sodium titanate (TT), spin coated (TS-HA1, TS-HA2 and TS-HA3) series (Figure 4.5.1 a) and between 99 and 101% for dip coated (TD-HA1 and TD-HA2) series specimens (Figure 4.5.1 b).

MTT results were confirmed by the visual observation of cells morphology, spread and density (Figure 4.5.1 c) that resulted as comparable between controls (cells cultivated with fresh medium) and test samples (cells cultivated with pre-treated medium).

Similar results were obtained at longer experimental time-point (after 72 h) (Figure 4.5.2 a-c); in fact, TT and spin coated series reported cells viability values between 97 and 99% (Figure 4.5.2 a) compared to controls (fresh medium) while dip coated specimens showed cells viability results between 100 and 101% towards controls (Figure 4.5.2 b). As noticed after 24 h cultivation, also after 72 h in contact with pre-treated medium, cells morphology, spread and density was similar between controls and test samples (Figure 4.5.2 c).

At both time-point (24 and 72 h), no statistical significant differences were observed between control and experimental samples as far as viability was concerned ( $p > 0.05$ ). These results represents an important finding to exclude toxic compounds release from coated samples within a relative long period of 7 days as well as to confirm samples coating stability.

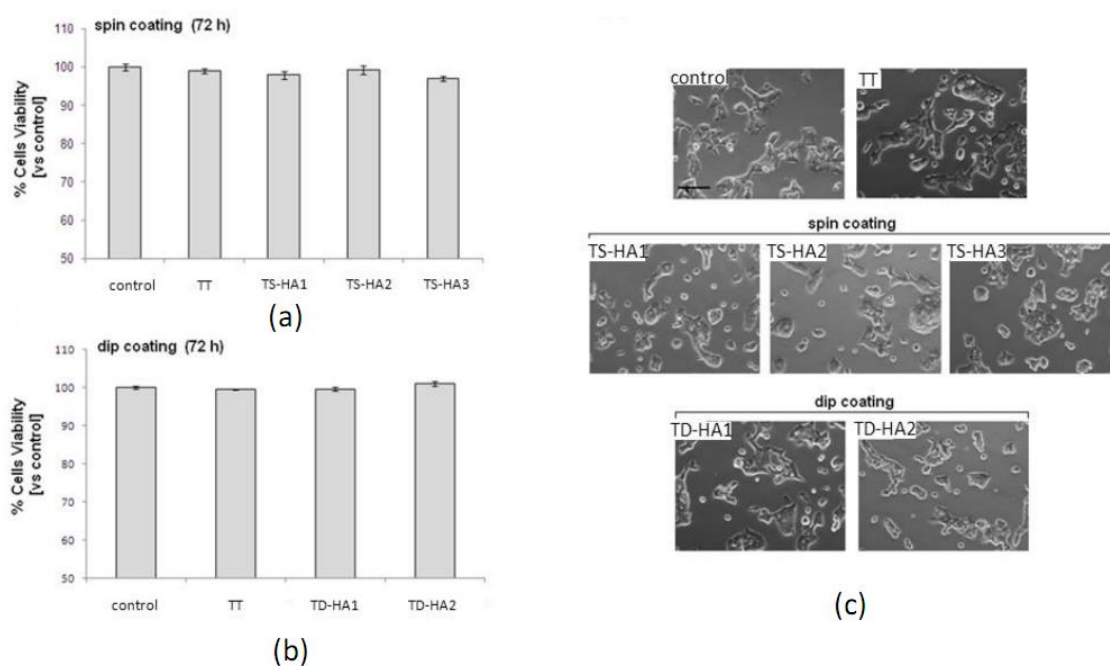


Figure 4.5.2. Not direct cytotoxicity evaluation after 72 h. Bars represent means and standard deviations. MTT assays showed comparable results between spin coated samples and controls (a) and also between dip coated samples and controls (b). For spin coated series, cells viability (TS-HA1, TS-HA2 and TS-HA3) was calculated as 97 to 99% reported to controls, while dip coated series values (TD-HA1 and TD-HA2) were between 99 and 101%. No statistical significant differences were noticed between test samples and controls ( $p > 0.05$ ). Moreover, morphology analysis (c) supported viability data as cells showed comparable morphology, spread and density with controls.

Bar scale = 100  $\mu\text{m}$  (magnification 20x)

### b) Direct Assay

Results of direct assay after 24 h after seeding cells, using MTT assay, are reported in figures 4.5.3 a-d. At this time-point, no statistical significant differences were noticed between spin coated series (Figure 4.5.3 a) and dip coated series (Figure 4.5.3 b) samples and controls ( $p > 0.05$ ).

The cells viability was calculated considering as 100% the optical density obtained for cells cultivated onto not treated Ti-6Al-4V; all spin or dip coated samples reported viability values between 98 and 100%, except TS-HA1 and TD-HA1 in which a slight improvement was remarkable.

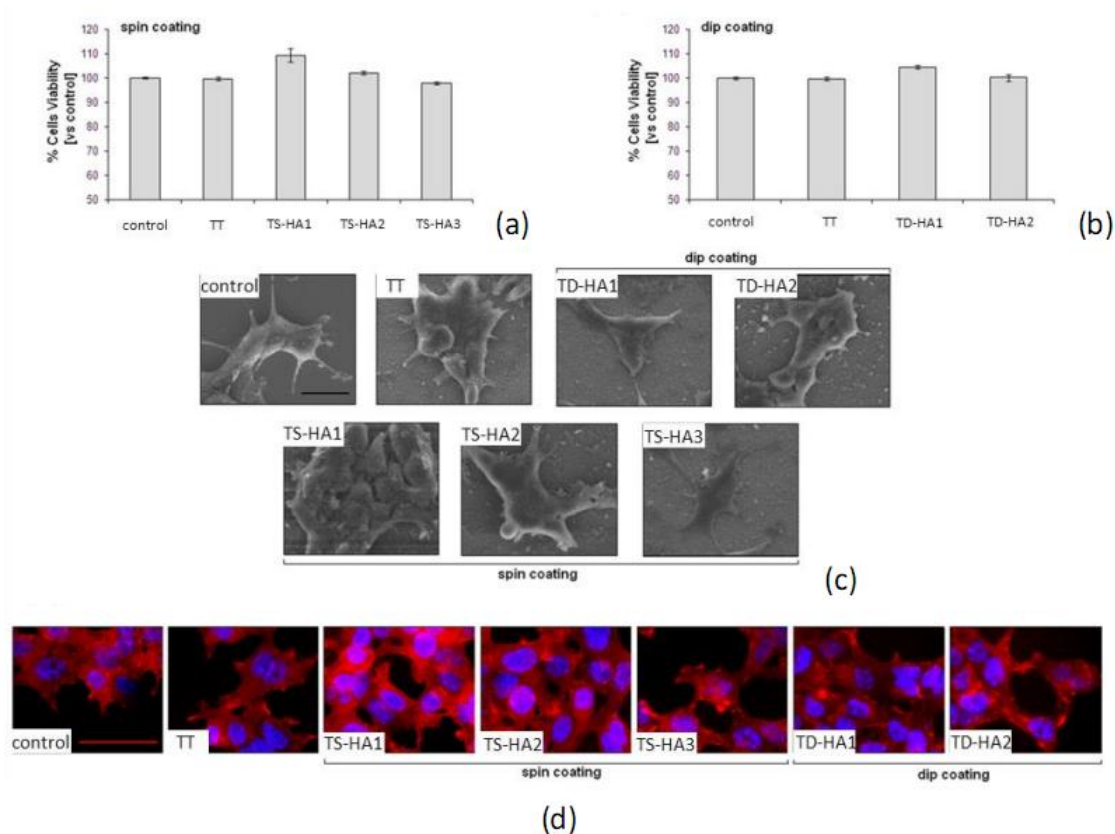


Figure 4.5.3. Direct cytocompatibility evaluation after 24 h. MTT assay showed no statistical differences between control and spin coated series samples (a) and dip coated series (b) in term of cells viability. Bars represent means and standard deviations. SEM observations (c) confirmed that cells were able to adhere to coated surfaces as well as to the control (Ti-6Al-4V) one. Thus, deposited Ca-P did not interfere with cells adhesion even in multilayer (TS-HA2, TS-HA3 and TD-HA2); bar scale = 20  $\mu\text{m}$ . Finally, IF staining (d) confirmed that cells successfully spread as cytoskeletons (in red, stained by phalloidin) were comparable between control and test samples. Bar scale = 100  $\mu\text{m}$

The morphological analysis made by SEM revealed cells successfully adhering to the coated surfaces as well as to the naked Ti-6Al-4V one (Figure 4.5.3 c); these findings suggest that the presence of Ca-P coating did not interfere with cells adhesion and spread, even when organized in multilayer complex (TS-HA2, TS-HA3, TD-HA2). Finally, by Immuno-Fluorescence (IF) staining (Figure 4.5.3 d), it was



possible to confirm that cells cytoskeleton morphology was comparable between cells cultivated onto Ti-6Al-4V surface (control) and the coated ones. Moreover, cells density seems to be comparable confirming that cells were successfully attached within the first 24 h cultivation.

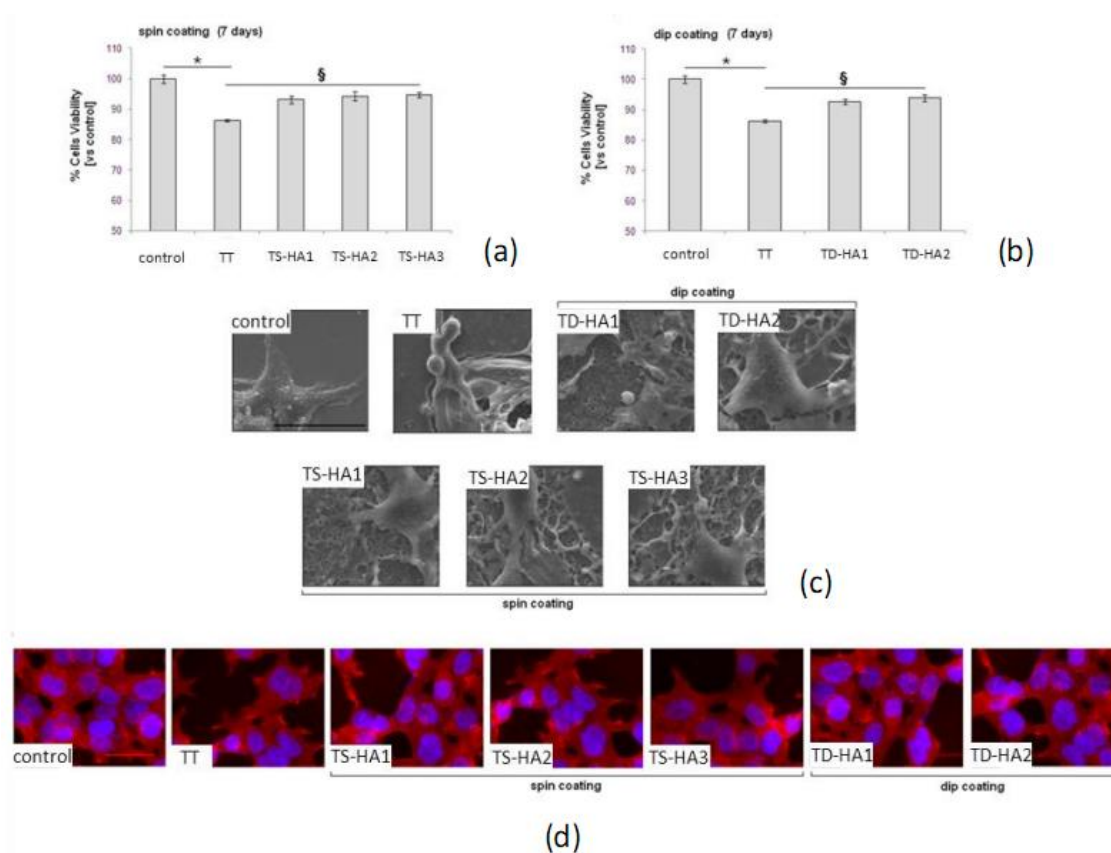


Figure 4.5.4. Direct cytocompatibility evaluation after 7 days. MTT assay showed a statistical significant difference between TT samples values compared to control (indicated by \*) and to TS-HA3 and TD-HA2 samples (indicated by §). This could be related to the ability of a Ca-P multilayer to protect cells from direct contact with sodium titanate. Bars represent means and standard deviations. SEM observations (c) confirmed that cells were still attached to samples surface but that Ca-P coating layers were metabolized by cells. Thus, deposited Ca-P protected cells from the direct contact to the sodium titanate layer; bar scale = 20  $\mu\text{m}$ . Finally, IF staining (d) confirmed that cells still attached to the surface presented cytoskeletons (in red, stained by phalloidin) comparable with controls. Bar scale = 50  $\mu\text{m}$

Interesting results were obtained after 7 days of cultivation and they are showed in Figures 4.5.4 a-d. Indeed, the cells viability resulted as statistically significant different ( $p \leq 0.05$ ) between TT compared to controls (Ti-6Al-4V, indicated by the \*) and TS-HA3 (a, indicated by §) and TD-HA2 (b, indicated by §). These findings could be explained by the presence of the sodium titanate layer; cells were directly exposed on sodium titanate layer (TT series samples) may suffer of  $\text{Na}^+$  presence after 7 days of culture. The coated samples offered a sort of protective layer of Ca-P that could be metabolized by cells and

protected them from the exposure to the sodium titanate layer. This could be pointed out for multilayer coating samples such as TS-HA3 and TD-HA2. This hypothesis can be supported by SEM observations (Figure 4.5.4 c). In fact, the Ca-P coating layer appeared as metabolized by cells that look flat and well attached to the surface. Looking at TT samples, cells seem to be “less flat” in towards metabolized regions. Finally, IF staining revealed that cells cytoskeleton was comparable with controls even after 7 days of culture. Positive results were obtained also for TT series samples suggesting that “not flat” cells, visualized by SEM, are relative to metabolized regions.

**4.5.2. Cells number and proliferative ratio**

In order to evaluate the number of spontaneously detached cells during the 7 days culture, the medium was collected after every change step (day 1-3-7) and the floating necrotic cells counted. Results are reported in Figures 4.5.5 a-d.

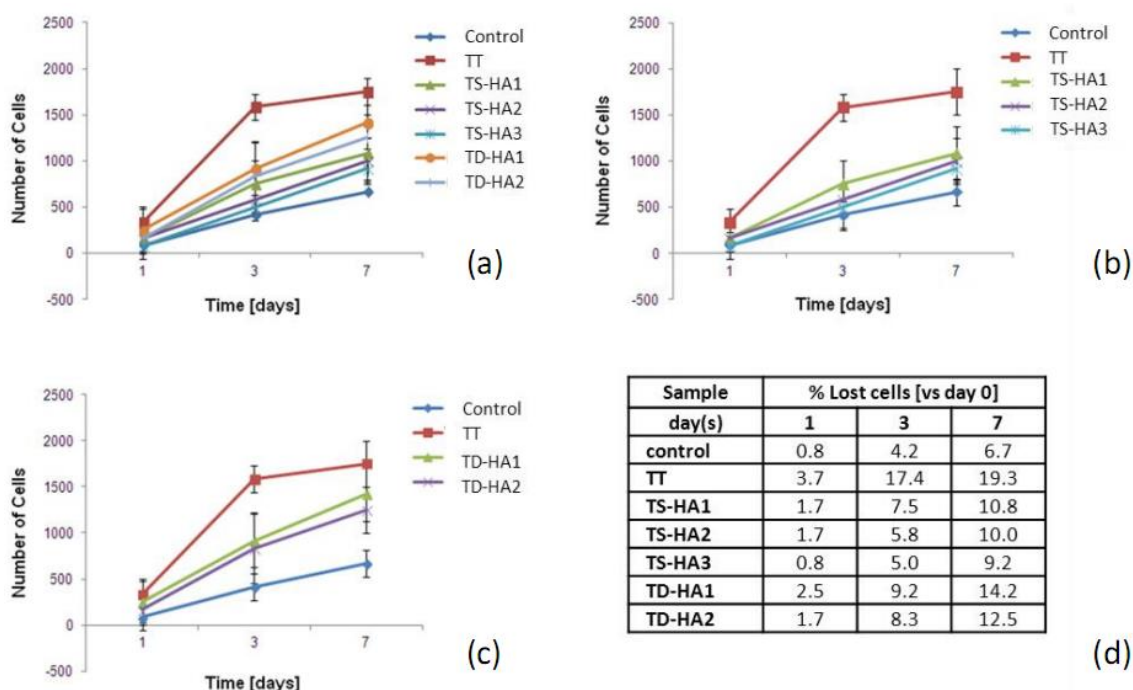


Figure 4.5.5. Number of floating cells into the medium; general comparison (a), spin coated samples detail (b) and dip coated series detail (c). In (d) are reported the percentage of lost cells vs day 0 number. In general cells spontaneously detached from all the samples. Control (Ti-6Al-4V) resulted the material with the lowest cells detachment percentage. On the opposite, TT series reported the highest number of lost cells. Regarding coated samples, the increase of Ca-P layer decreased the number of detached cells.

Graphics represent means and standard deviations

In general, Ti-6Al-4V (control) reported the lowest number of detached cells: the maximum value was calculated after 7 days when only the 6.7% was lost (reported to the initial number of cells). On the opposite, sodium titanate layer (TT) samples series reported the highest number of detached cells, reaching a total of 19.3% compared to day 0. Regarding coated samples, the increase of Ca-P layer

seems to protect cells from detachment. About spin coated series samples, TS-HA1 and TS-HA2 samples reported the loss of 10-11% of initial number of cells. For TS-HA3, the 9% of cells were lost after 7 days. Results of dip coated series showed that TD-HA1 loss the 14.2% and TD-HA2 the 12.5% of starting cells number.

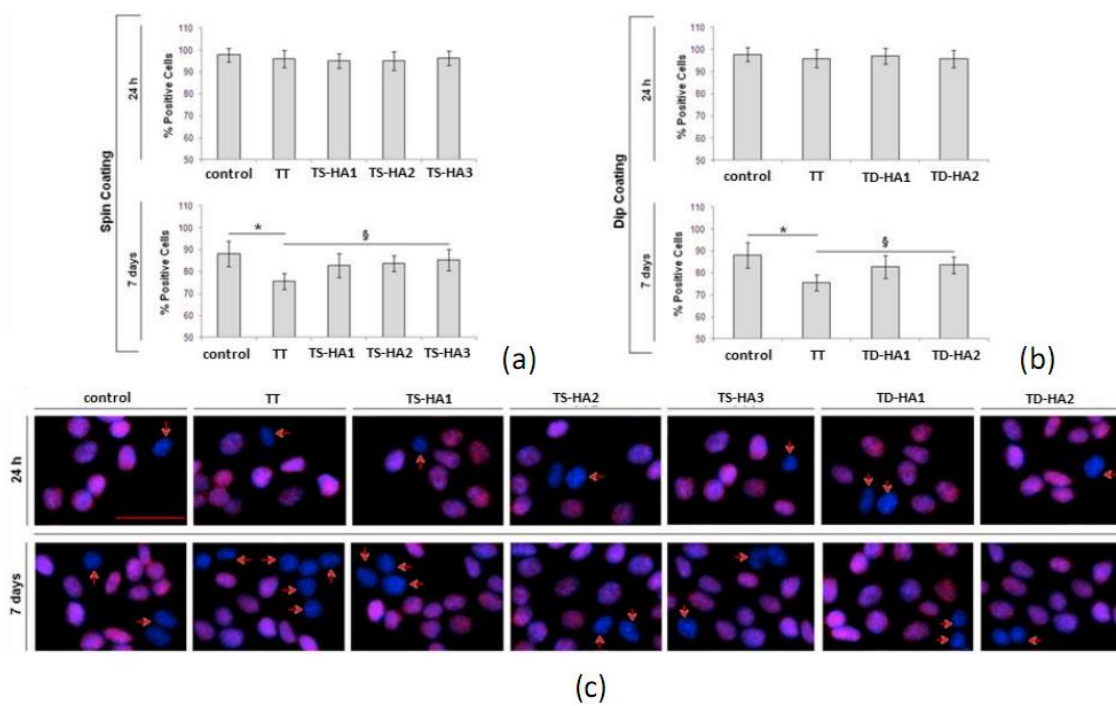


Figure 4.5.6 a-c. PCNA staining of proliferative cells. Bars represent means and standard deviations. After the first 24 h, no statistical significant differences were noticed between the number of proliferating cells in control (pure titanium) and the other groups that showed values between 95 and 97% for spin coated series (a, upper panel) and between 95 and 96% for dip coated series (b, upper panel). Also TT specimens did not result as statistically different compared to control. Also IF staining images (c, upper panel) showed that after 24 h the number of proliferative cells (co-stained in red) was superior to the non proliferative ones (in blue, indicated by the arrow) after 24 h. Conversely, after 7 days of culture statistical significant differences ( $p < 0.05$ ) were noticed between TT samples and controls (indicated by \*) and between TT and TS-HA3 (a, lower panel, indicated by §) and between TT and TD-HA2 specimens (b, lower panel, indicated by §). Moreover, the presence of more non-proliferating cells was visually detected by IF (c, lower panel, indicated by the arrow). Bar scale = 50  $\mu\text{m}$

Looking at the results of PCNA staining of proliferative cells (Figures 4.5.6 a-c), other interesting results were observed after 7 days of culturing. In fact, after 24 h, the number of cells positive to the PCNA staining were not significant ( $p > 0.05$ ) comparing the different groups with the control (Figures 4.5.6 a-b, upper panel). The spin coated series specimens reported values between 95 and 97% of proliferating cells while the dip coated series showed proliferative cells in a ratio of 95 to 96%. Also the TT samples did not presented significant differences compared to control (96%). Conversely, after 7 days of culture, significant differences ( $p < 0.05$ ) were noticed between TT group and TS-HA3 (Figure 4.5.6 b,

lower panel) and Td-HA2 group specimens (Figure 4.5.6 b, lower panel). At this time point, TT specimens reported values of 75% of PCNA positive cells while the means of controls was 88%, TS-HA3 84% and TD-HA2 83%. So, as noticed for the MMT assay, the cells metabolization of the surface coating could have led to the exposure of the sodium titanate layer that has counteracted with cells metabolism in term of viability (MTT assay) and proliferation (PCNA assay).

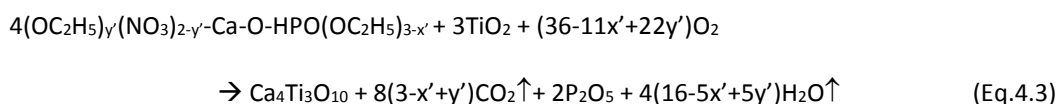
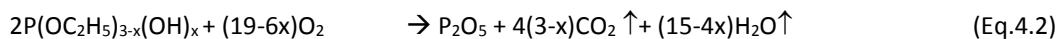
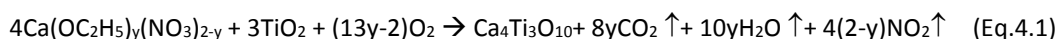
So, it was found that an apatite layer is necessary to improve the cell viability of sodium titanate. By comparing to the control sample we can confirm that the Ca-P coated samples are not toxic. This allows testing the implant in the animal to study its bone bonding ability.

## Conclusions

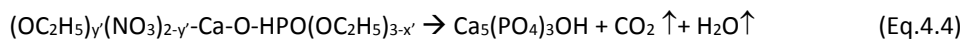
Sol-gel Ca-P coatings were successfully spin- and dip- coated on the sodium titanate layer. The spin Ca-P coatings were performed at a speed of 3000 tr/min for 30 s while the dip coatings were carried out at a withdraw speed of 40 mm/min. Both dip and spin coated samples were followed by a heat treatment.

When the sample is annealed at high temperature (600°C), Ca-P gel and titanium oxide react to form calcium titanate. Indeed, Liu et al. (2,15,16) indicated that compounds such as  $P(OC_2H_5)_{3-x}(OH)_x$ ,  $Ca(OC_2H_5)_y(NO_3)_{2-y}$  and  $(OC_2H_5)_y(NO_3)_{2-y}-Ca-O-HPO(OC_2H_5)_{3-x}$  can form in the Ca-P sol-gel solution when the triethyl phosphite and calcium nitrate dissolved in ethanol are used as calcium and phosphorous precursors. So, the solution when deposited on the sodium titanate layer, infiltrates this layer. If only one very thin film of Ca-P gel was deposited on the titania layer, all of the calcium reacted with the titanium oxide to form calcium titanate and the phosphate which does not react is eliminated by washing.

By the XRD and TEM analysis calcium titanate ( $Ca_4Ti_3O_{10}$ ) was identified on all Ca-P coated samples deposited either by spin or dip coating with a repeat from 1 to 3 time(s). So the reactions between the Ca-P gel and titanium oxide at high temperature can be described by equations as follows.



When the Ca-P gel film deposited on sodium titanate layer is thick enough, a part of Ca-P gel contacts directly and reacts with sodium titanate or titanium oxide to form calcium titanate, the other Ca-P part which has not reacted will be transformed to apatite. Evidently, if there is no  $TiO_2$ , all of Ca-P gel will transform to apatite. The transformation to HA can be described as follows:



Indeed, a calcium titanate-rich and phosphate-poor film was obtained for the sample TS-HA1. However, on the samples TS-HA2, TS-HA3 and TD-HA2, in which the Ca-P depositing was repeated for 2 and 3 times, we can observe a layer of calcium titanate placed between the Ca-P one and the substrate. The formation of calcium titanate may play a role as a bridge between the HA coating and the substrate and can improve the adhesion between the sol-gel HA coating and titanium.

On all samples, no delamination between the HA coating and the substrate is observed, probably due to a good chemical adherence of HA coating onto the substrate.

The highest annealing temperature to obtain a HA coatings was at 600°C. When the annealing temperature was higher (700 or 800°C), the Ca-P coatings onto the substrate was unstuck.

The Ca-P-sodium titanate layer with various thickness, from 0.5 to 1.4 μm, was obtained by Ca-P sol-gel dip and spin depositing with a repeat for 1 to 3 times onto the sodium titanate substrate. In addition, the spin Ca-P layer is smoother and thinner than the dip ones.

Apatite coating was always deposited onto all samples treated by a 5 M or 10 M NaOH solution at 60 or 80°C for 24 or 72 h, followed a heat treatment at 630°C for 1 h (data not shown). Additionally, calcium titanate ( $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ ) was also formed on all samples using the sodium titanate buffer layer.

By using the nano-indenter with spherical tip radius of 5 μm and a normal load ramped up from 10 to 100 mN, the good adhesion of HA coatings onto the substrate was demonstrated.

Ca-P coatings obtained by dipping and spinning techniques were stable in the physiological environment using the simulated body fluid (SBF). The *in vitro* bioactivity (bone bioactivity) of HA coatings was identified because of the growing of HA in SBF onto the HA coating samples at various soaking period (2 to 28 days).

Finally, the cytotoxicity test shows that the implants were not toxic. The cell viability of Ca-P coated series is generally equal or higher than the one of sodium titanate (TT) sample. On the other hand, a Ca-P coating is necessary to improve the cytocompatibility of alkaline-heat treated titanium implant and its bone bioactivity.

## References

1. Wen C, Xu W, Hu W, Hodgson P. Hydroxyapatite/titania sol-gel coatings on titanium-zirconium alloy for biomedical applications☆ *Acta Biomater.* 2007 May;3(3):403-10.
2. Liu DM, Troczynski T, Tseng WJ. Aging effect on the phase evolution of water-based sol-gel hydroxyapatite. *Biomaterials.* 2002;23(4):1227-36.

3. Gadaleta SJ, Mendelsohn R, Paschalis EL, Camacho NP, Betts F, Boskey AL. Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Synthetic and Biological Apatites. In: Zahid Amjad, editor. *Mineral Scale Formation and Inhibition*. New York: Plenum Press; 1995. p. 283–94.
4. Fowler BO. Infrared studies of apatites. I. Vibrational assignments for calcium, strontium, and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitution. *Inorg Chem*. 1974;13(1):194–207.
5. Klee WE, Engel G. Infrared spectra of the phosphate ions in various apatites. *J Inorg Nucl Chem*. 1970 Jun;32(6):1837–43.
6. Antonakos A, Liarakapis E, Leventouri T. Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials*. 2007 Jul;28(19):3043–54.
7. Deptu\la A, \Lada W, Olczak T, Borello A, Alvani C, Di Bartolomeo A. Preparation of spherical powders of hydroxyapatite by sol-gel process. *J Non-Cryst Solids*. 1992;147:537–41.
8. Kim S-J, Yun Y-U, Oh H-J, Hong SH, Roberts CA, Routray K, et al. Characterization of Hydrothermally Prepared Titanate Nanotube Powders by Ambient and In Situ Raman Spectroscopy. *J Phys Chem Lett*. 2010 Jan 7;1(1):130–5.
9. Cavalcante LS, Marques VS, Sczancoski JC, Escote MT, Joya MR, Varela JA, et al. Synthesis, structural refinement and optical behavior of CaTiO<sub>3</sub> powders: A comparative study of processing in different furnaces. *Chem Eng J*. 2008 Sep 15;143(1–3):299–307.
10. Zheng H, Csete de Györgyfalva GDC, Quimby R, Bagshaw H, Ubc R, Reaney IM, et al. Raman spectroscopy of B-site order–disorder in CaTiO<sub>3</sub>-based microwave ceramics. *J Eur Ceram Soc*. 2003;23(14):2653–9.
11. Kizuki T, Takadama H, Matsushita T, Nakamura T, Kokubo T. Preparation of bioactive Ti metal surface enriched with calcium ions by chemical treatment. *Acta Biomater*. 2010 Jul;6(7):2836–42.
12. Ferrand A, Eap S, Richert L, Lemoine S, Kalaskar D, Demoustier-Champagne S, et al. Osteogenetic Properties of Electrospun Nanofibrous PCL Scaffolds Equipped With Chitosan-Based Nanoreservoirs of Growth Factors. *Macromol Biosci*. 2014 Jan 1;14(1):45–55.
13. Fischer-Cripps AC. *Nanoindentation*. Springer; 2004. 290 p.
14. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006 mai;27(15):2907–15.
15. Liu D-M, Troczynski T, Tseng WJ. Water-based sol–gel synthesis of hydroxyapatite: process development. *Biomaterials*. 2001 Jul;22(13):1721–30.
16. Liu DM, Troczynski T, Hakimi D. Effect of hydrolysis on the phase evolution of water-based sol–gel hydroxyapatite and its application to bioactive coatings. *J Mater Sci Mater Med*. 2002;13(7):657–65.



**Chapitre 5.**  
**Dépôt de phosphate de calcium obtenu**  
**par la voie autocatalytique**





## **Chapitre 5.**

### **Dépôt de phosphate de calcium obtenu par la voie autocatalytique**

5.1. Dépôt de Ca-P en utilisant la méthode de Reis et al. ....	126
5.1.1. Préparation et caractérisation du dépôt .....	126
5.1.2. Test de bioactivité des substrats immergés dans les bains autocatalytiques .....	132
5.1.3. Bains « autocatalytiques » appliqués sur le sandwich 316L/Polypropylène- Polyéthylène (16).....	134
5.2. Modification des bains de Reis et al. pour le dépôt de Ca-P bioactif sur Ti-6Al-4V .....	142
5.2.1. Présentation de l'article.....	142
5.2.2. Publication .....	143
Conclusions .....	150
Références .....	151

Reis et al. (1,2) ont développé des bains riches en calcium et en phosphate et contenant du chlorure de palladium pour déposer du phosphate de calcium sur des polymères. Nous avons détaillé sa méthode dans le Chapitre 1, §1.4.2. Nous appellerons cette méthode « méthode autocatalytique » comme Reis et al. Le dépôt est réalisé sur des substrats de Ti-6Al-4V ayant subi un traitement Kroll de 3 min, un traitement alcalin dans NaOH 10 M à 60°C pendant 24 h et un traitement thermique de 1 h à 630°C.

Ce chapitre est divisé en deux parties.

*Dans une première partie*, nous présentons le dépôt de Ca-P obtenu en utilisant la méthode « autocatalytique » de Reis et al. (1,2). Dans ces bains, il y a toujours un réducteur ( $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ ) dans les bains acides et alcalins, ou un oxydant ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dans le bain oxydant et un catalyseur ( $\text{PdCl}_2$ ).

*Dans une deuxième partie*, nous avons modifié légèrement les bains acides de Reis et al. (1–3) en enlevant le réducteur ( $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ ) et ajustant le rapport de Ca/P à 1,67 par ajout d'acide ortho-phosphorique. Nous avons publié les résultats obtenus dans Biomatter (Alternative technique for calcium phosphate coating on titanium alloy implants) (4).

## **5.1. Dépôt de Ca-P en utilisant la méthode de Reis et al.**

### **5.1.1. Préparation et caractérisation du dépôt**

Dans le Chapitre 2, §2.1.6, nous avons donné la composition, le pH et la température d'utilisation des bains « autocatalytiques ». Dans cette partie nous présentons des résultats du dépôt de Ca-P obtenu avec les bains AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd. Les échantillons sont caractérisés par DRX, MEB/EDS-X, MET/EDS-X/SAED, puis le comportement des échantillons dans un milieu physiologique, fluide corporel simulé (SBF) est présenté.

La Figure 5.1.1 présente l'analyse DRX des échantillons ayant subi des bains « autocatalytique ». Sur les diffractogrammes, les pics du substrat (S) sont visibles, mais aucun pic de phosphate de calcium n'est détecté. Cela signifie que le dépôt de Ca-P est encore très mince ou amorphe ou formé de grains nanométriques.

La Figure 5.1.2 montre la morphologie et l'analyse EDS-X de la surface des échantillons ayant subi les bains AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd. Pour l'échantillon AC1-Pd, nous avons observé un dépôt de Ca-P sous forme de particules sphériques sur la couche de titanate de sodium. Ces particules mesurent au maximum une centaine de nanomètres. Le dépôt est composé d'agrégats répartis sur toute la couche de titanate de sodium. L'analyse EDS-X est réalisée sur deux zones notées S1 et S2 (Figure 5.1.2 a) : les pics de P (à 2,02 keV), F (à 0,68 keV) et Ca (à 3,69 keV) sont visibles sur l'échantillon AC1-Pd. Ces éléments viennent de la solution « autocatalytique » déposée sur la surface de l'échantillon, tandis que les pics de Ti, Na viennent de la couche de titanate de sodium.

En revanche, pour les échantillons ALK1-Pd et OXY-Pd (Figures 5.1.2 b et c), la couche de titanate de sodium est bien visible avec des fissures de quelques centaines de nanomètres comme nous l'avons décrit dans le Chapitre 3, §3.2 mais un dépôt de Ca-P n'est pas observé. Toutefois, par analyse EDS-X, un pic de calcium est bien détecté pour ces deux échantillons, et seulement un tout petit pic de phosphore. Cela veut dire qu'une couche très mince de Ca-P peut être déposée quelque part sur la couche de titanate de sodium. En effet, par une observation au MEB avec l'image de grandissement de 25000 (Figure 5.1.2 c), des grains nanométriques de Ca-P se trouvent dans les pores de la couche de titanate de sodium.

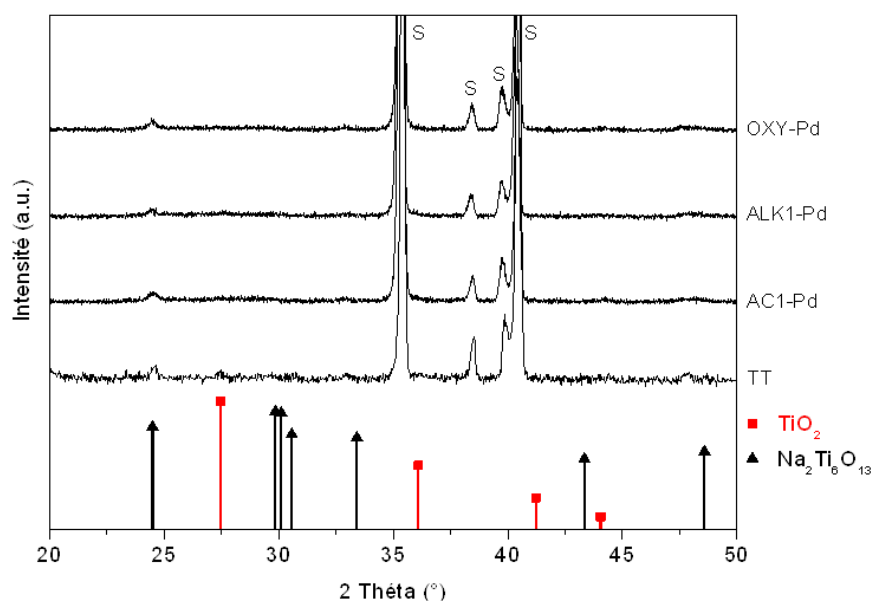


Figure 5.1.1. DRX des échantillons : TT, AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd. Pics de diffraction du titanate de sodium  $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$  (JPDCS 77-9461) et du rutile  $\text{TiO}_2$  (JPDCS 21-1276). Les pics du substrat sont notés « S »

Les échantillons sont ensuite analysés au MET/ EDS-X et en diffraction en aire sélectionnée des électrons. Pour cela, de la poudre est grattée de la surface des échantillons et récupérée sur une grille spéciale en cuivre du MET.

Sur la Figure 5.1.3, nous donnons les images MET et le diagramme de diffraction électronique (SAED) avec le spectre EDS-X des échantillons ayant subi les bains AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd. Nous trouvons que le calcium et le phosphore sont toujours détectés sur ces échantillons. De plus, le titane, le sodium et l'oxygène sont aussi trouvés. Pour l'échantillon OXY-Pd, nous avons aussi observé un pic de palladium. Le Tableau 5.1 présente les distances interréticulaires mesurées sur le diagramme de diffraction électronique (SAED) des échantillons AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd et les données (JPDCS) de l'hydroxyapatite, de la fluorine, du titanate de sodium et du rutile. Nous avons trouvé que l'apatite peut être formée sur les échantillons AC1-Pd et ALK1-Pd (les pics 211 et 112) mais pas sur l'échantillon OXY-

Pd. Pour l'échantillon AC1-Pd, les pics 111, 200 et 311 de la fluorine ( $\text{CaF}_2$ ) et les pics 110 et 101 du rutile sont bien observés ainsi que les pics 200, 202 et -203 de  $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$  sur l'échantillon OXY-Pd.

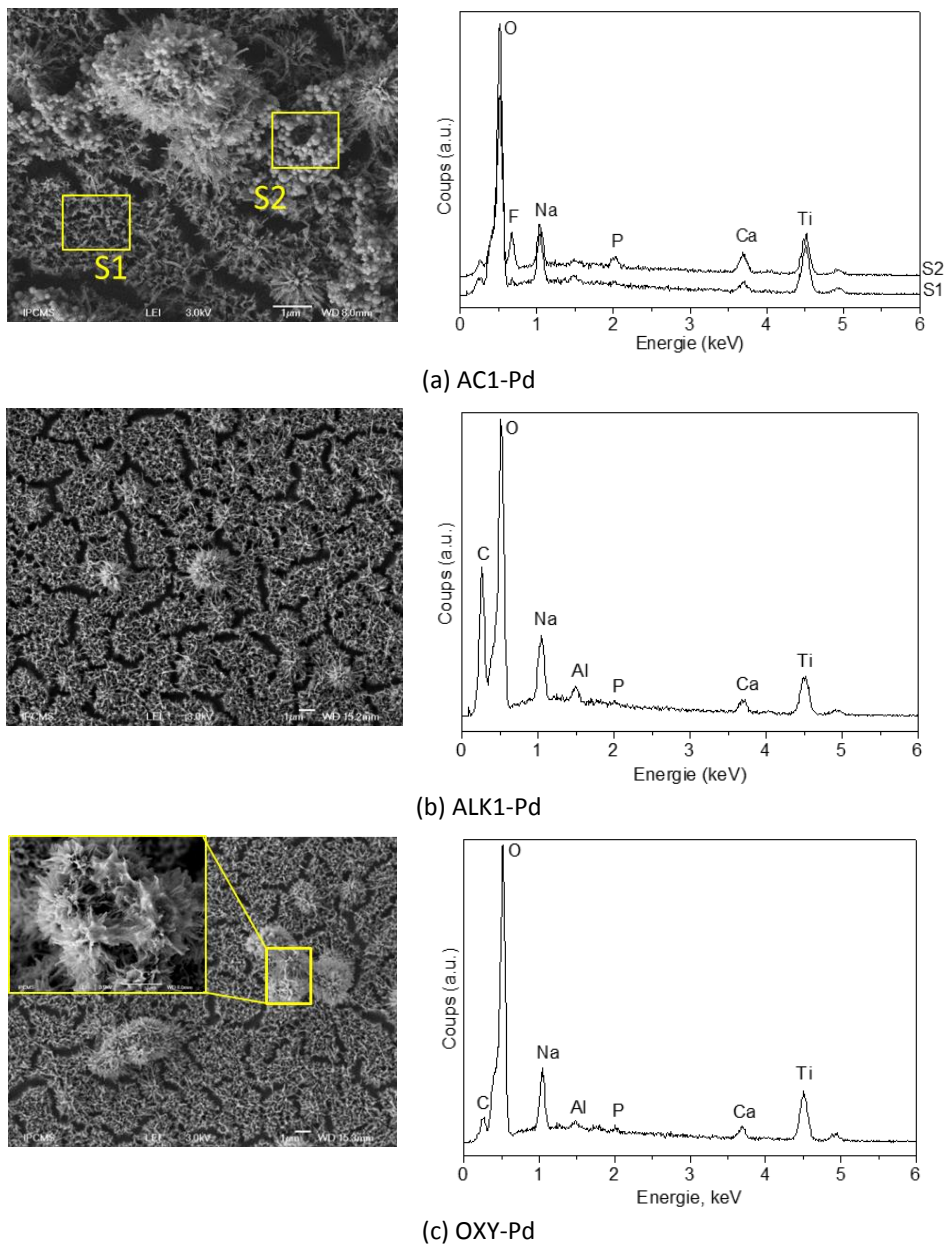


Figure 5.1.2. Observation au MEB et analyse EDS de la surface des échantillons AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd

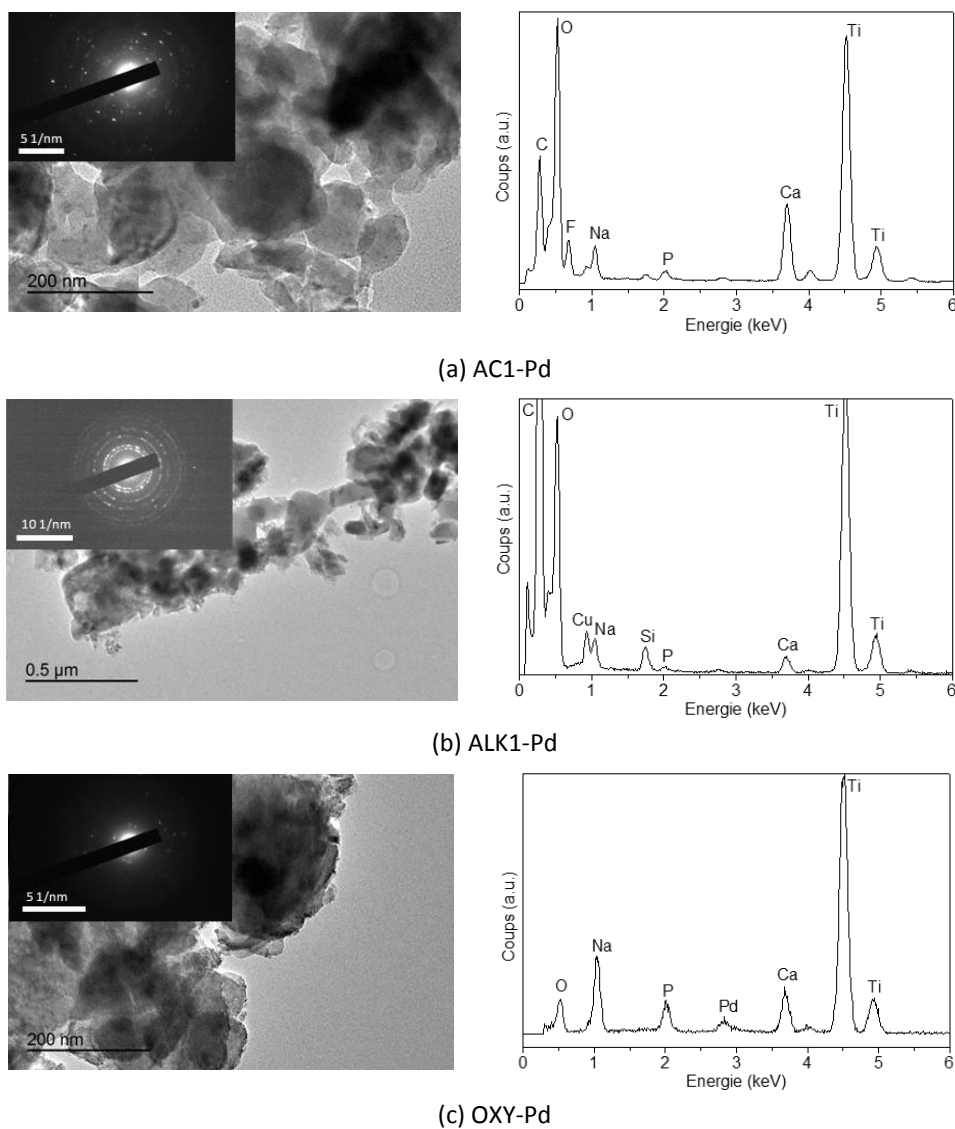


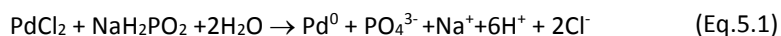
Figure 5.1.3. Analyse au MET avec SAED et EDS-X des échantillons AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd. Le phosphore et le calcium sont toujours présents dans les échantillons. Le palladium est détecté sur l'échantillon OXY-Pd. Les distances interréticulaires mesurées sur le SAED sont présentées dans le Tableau 5.1

Tableau 5.1. Distances interréticulaires mesurées sur diffraction en aire sélectionnée (SAED) des échantillons AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd

Distances interréticulaires, $d_{exp}$ ( $\pm 0,005$ nm)			$Ca_5(PO_4)_3(OH)$ , (ICDD 09-432), $d_{theo.}$ (nm)			$CaF_2$ , (ICDD 02-2191), $d_{theo.}$ (nm)			$Na_2Ti_6O_{13}$ (ICDD 77-9461), $d_{theo.}$ (nm)			$TiO_2$ (ICDD 21-1276), $d_{theo.}$ (nm)		
AC1-Pd	ALK1-Pd	OXY-Pd	d (nm)	l	hkl	d (nm)	l	hkl	d (nm)	l	hkl	d (nm)	l	hkl
			0,817	12	100									
		0,746							0,745	100	200			
									0,626	49	201			
			0,407	10	200									
			0,388	10	111									
									0,373	4	400			
0,363		0,365							0,363	40	202			
			0,344	40	002									
0,327									0,327	1	401	0,325	100	110
0,316			0,317	12	102	0,315	97	111	0,313	3	402			
			0,308	18	210									
									0,299	46	310			
		0,295							0,297	45	203			
									0,292	37	311			
0,281	0,280		0,281	100	211				0,278	11	112			
			0,279	60	112				0,276	9	311			
			0,272	60	300				0,268	35	402			
			0,263	25	202									
0,249	0,243								0,249	12	601	0,249	50	101
									0,237	4	113			
			0,226	20	310							0,230	8	200
									0,219	2	512	0,219	25	111
									0,208	27	603	0,205	10	210
0,199									0,205	21	602			
0,194			0,194	30	222	0,193	100	220	0,197	3	513			
			0,189	16	312				0,187	30	020			
			0,184	40	213									
			0,180	20	321									
0,168	0,172		0,172	20	004	0,165	29	311	0,173	13	514	0,169	60	211
			0,164	10	322				0,163	16	802	0,162	20	220
			0,150	10	214				0,149	3	803	0,148	10	002
	0,140								0,146	2	911	0,145	10	310
	0,122		0,124	11	513									

Les analyses MEB, MET et EDS-X permettent de confirmer que, pour le bain « autocatalytique » acide, un dépôt de phosphate de calcium contenant l'apatite se forme sur la couche de titanate de sodium. Mais, pour les bains alcalin et oxydant, le dépôt est faible. Le mécanisme de dépôt peut être expliqué par les réactions suivantes :

1) formation du groupe fonctionnel  $\text{PO}_4^{3-}$  dans les bains « autocatalytique » par réaction redox entre  $\text{PdCl}_2$  et  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ .



Cette réaction peut se produire car le potentiel standard de  $\text{Pd}^{2+}/\text{Pd}$  est égal à 0,951 V, tandis que celui de  $(\text{PO}_4)^{3-}/(\text{HPO}_3)^{2-}$  est égal à -1,05 V, et celui de  $(\text{HPO}_3)^{2-}/(\text{H}_2\text{PO}_2)^-$  à -1,65 V (5). Nous avons constaté que le pH de la solution est fortement réduit lorsque l'on rajoute  $\text{PdCl}_2$  dans le bain, c'est pourquoi nous le contrôlons en ajoutant  $\text{NaOH}$ .

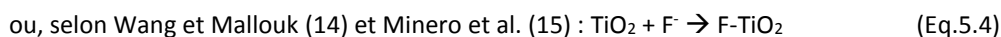
De plus, les ions  $\text{PO}_4^{3-}$  sont formés par l'hydrolyse du pyrophosphate de sodium (6) dans la solution du bain alcalin.



Pour le bain oxydant, les ions  $\text{PO}_4^{3-}$  sont produits par l'équation (Eq.5.2).

2) *l'échange ionique* entre les ions  $\text{Na}^+$  du titanate de sodium et  $\text{H}^+$  de la solution (7–9). Les groupes  $\text{Ti-O-Na}$  sont ainsi remplacés par les groupes  $\text{Ti-O-H}$ . La présence des groupes «  $\text{OH}^-$  » sur la surface des échantillons favorise la précipitation de l'HA par chimisorption des ions  $\text{Ca}^{2+}$  sur les groupes «  $\text{OH}^-$  » et ensuite les ions  $\text{PO}_4^{3-}$  se déposent. Ce mécanisme est présenté par Kokubo (10) pour le dépôt d'apatite sur la surface de titanate de sodium dans le milieu SBF (dont le pH est égal à 7,4). Cet échange ionique est influencé par le pH de la solution, car ce processus se produit plus rapidement en bain acide (pH= 5,3) qu'en milieu alcalin (pH= 9,2).

3) *Pour les bains acides,  $\text{CaF}_2$  précipite probablement.* En effet, le fluorure de sodium n'est utilisé que dans les bains acides. Park et Choi (11) ont montré qu'un complexe  $\text{F-TiO}_2$  se forme en présence d'un mélange de poudre de  $\text{TiO}_2$  et de fluorure de sodium ( $\text{NaF}$ ) en milieu aqueux. La formation du complexe fluorine-oxyde de titane est décrite ainsi :



La formation de  $\text{TiO}_{2-x}\text{F}_x$  peut se produire aux pH de 4 à 10,6 (11). Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont facilement adsorbés sur la surface des échantillons pour former  $\text{CaF}_2$ . Par conséquent, le phosphate de calcium et le fluorure de calcium sont co-précipités sur la couche de titanate de sodium. C'est pourquoi nous avons toujours obtenu le phosphate de calcium avec un peu de fluorine sur les échantillons ayant subi du bain acide.



**5.1.2. Test de bioactivité des substrats immergés dans les bains autocatalytiques**

Pour tester le comportement des échantillons dans le milieu physiologique, les échantillons sont plongés dans la solution SBF pendant une semaine. La concentration du Ca et du P est analysée par la méthode colorimétrique comme présenté dans le Chapitre 2, §2.2.

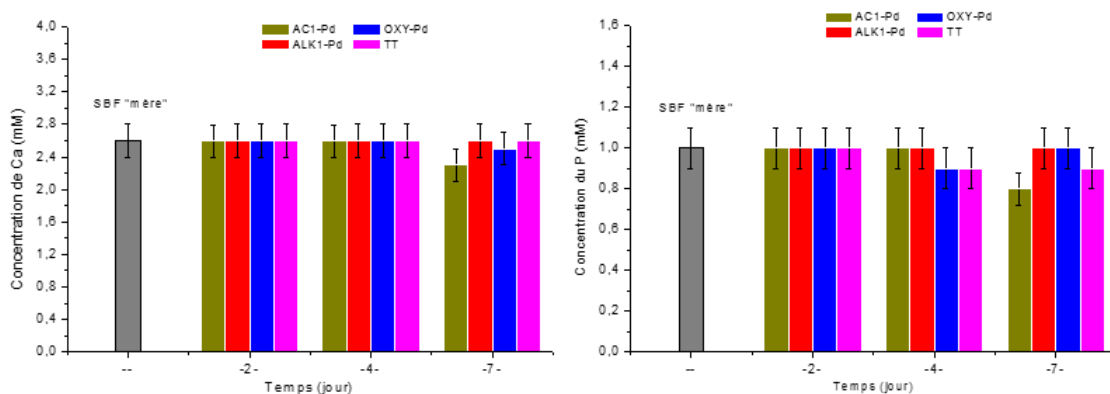


Figure 5.1.4. Variation du Ca (à gauche) et du P (à droite) dans le SBF après une immersion de 2, 4 et 7 jours pour les échantillons AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd

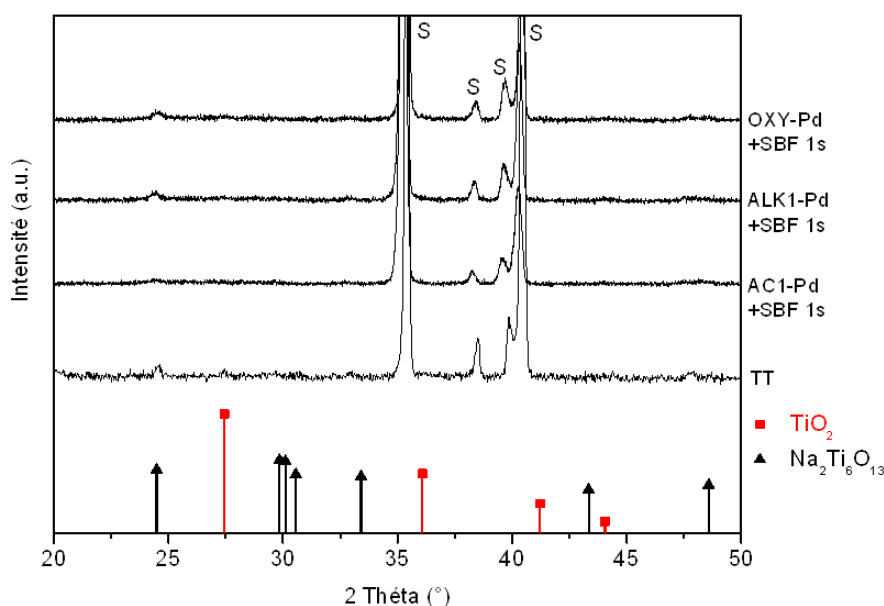


Figure 5.1.5. DRX des échantillons : TT, AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd après une semaine dans SBF. Pics de diffraction du titanate de sodium  $Na_2Ti_6O_{13}$  (JPDCS 77-9461) et du rutile  $TiO_2$  (JPDCS 21-1276). Les pic du substrat sont notés « S »

Sur la Figure 5.1.4, nous donnons la variation de la concentration du Ca et du P dans le SBF pour les échantillons AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd après 2, 4 et 7 jours d’immersion dans SBF. Nous avons observé que la concentration du Ca ne varie pas sauf pour l’échantillon AC1-Pd après 7 jours d’immersion. La concentration de phosphore diminue légèrement tout en restant dans la barre d’erreur de la mesure sauf pour l’échantillon AC1-Pd.

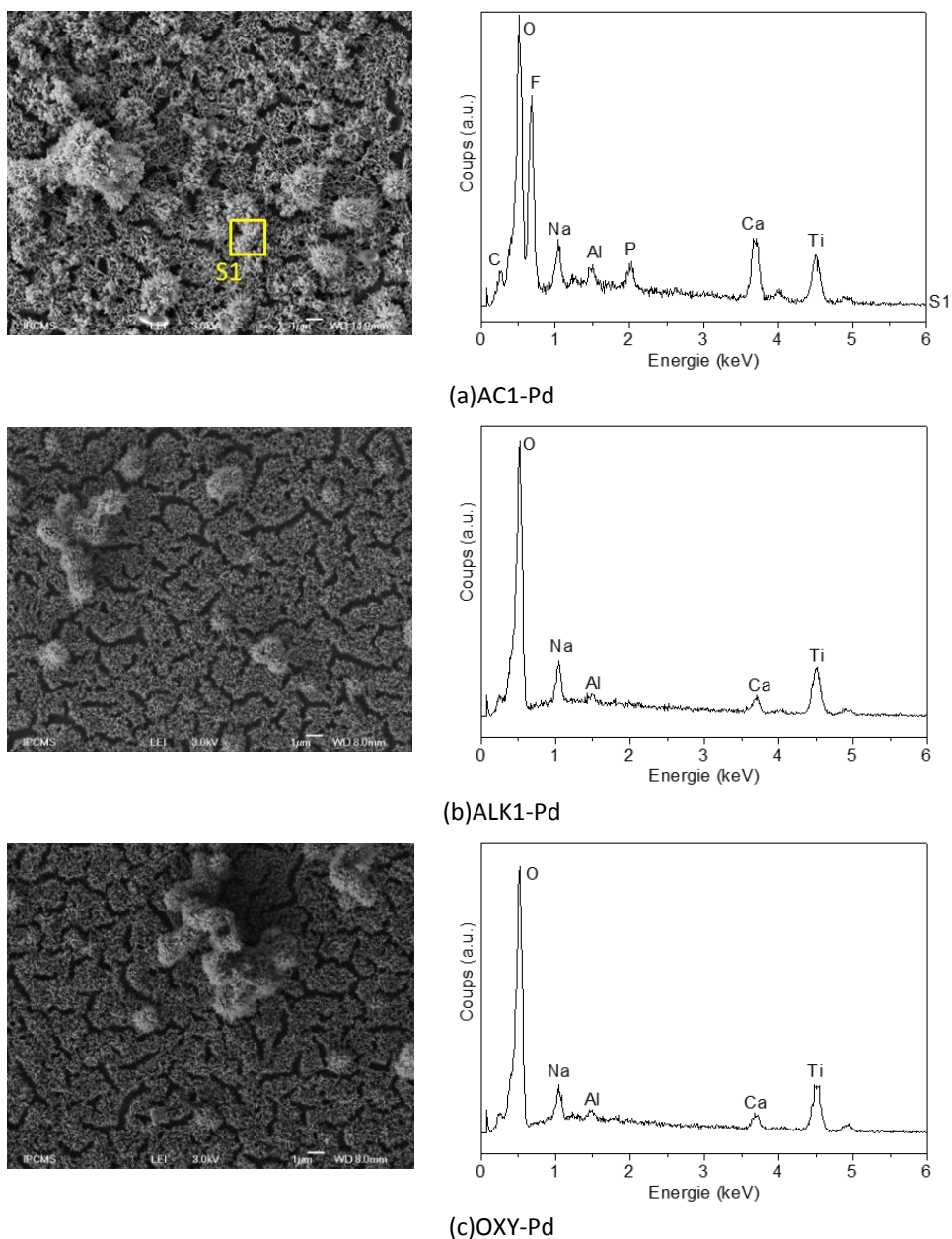


Figure 5.1.6. Observation au MEB et analyse EDS des échantillons AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd après une semaine dans SBF

La diffraction des rayons X des échantillons plongés dans le SBF pendant une semaine est présentée sur la Figure 5.1.5. Les pics du substrat sont toujours visibles mais aucun pic de phosphate de calcium n'est visible.

Les observations MEB et l'analyse EDS-X (Figure 5.1.6) montrent que le phosphate de calcium est réparti sur la surface de l'échantillon AC1-Pd après une semaine dans SBF. L'analyse EDS-X indique la présence du phosphore et du calcium (Figure 5.1.6 a), mais aussi de la fluorine. La morphologie du Ca-P est semblable à celle observée avant l'immersion dans le SBF. Pour les échantillons ALK1-Pd et OXY-Pd (Figure 5.1.6 b et c), nous n'avons pas observé de dépôt de phosphate de calcium après une semaine

dans SBF. Sur le spectre EDS-X, un faible pic de Ca est observé, alors que le pic du phosphore n'est pas détecté.

Ces analyses montrent que le phosphate de calcium peut être déposé sur l'échantillon AC1-Pd par immersion dans le SBF, mais pas sur les échantillons ALK1-Pd et OXY-Pd. Dans le premier cas, la couche de phosphate de calcium formée est très mince, ou amorphe.

Un test de viabilité cellulaire utilisant des ostéoblastes MG63 comme décrit dans le Chapitre 2, §2.3.13, a été effectué pour les échantillons TT (titanate de sodium, échantillon de contrôle), AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd. Les résultats préliminaires ont indiqué que si on considère que la viabilité cellulaire de l'échantillon de titanate de sodium (échantillon de contrôle) est 100 %, la valeur de la viabilité cellulaire des échantillons ayant subi des bains autocatalytiques est respectivement de 94,6% pour l'AC1-Pd, 71,6 % pour l'ALK1-Pd et 79,1 % pour l'échantillon OXY-Pd. Cela veut dire que la viabilité des ostéoblastes sur les substrats traités dans les bains « autocatalytiques » est diminuée par rapport à la viabilité des cellules sur le titanate de sodium.

Dans cette étude, nous avons aussi modifié ces bains en remplaçant PdCl<sub>2</sub> par AgCl. La composition, le pH et la température des bains contenant AgCl sont tout à fait identiques à ceux des bains contenant PdCl<sub>2</sub> (Chapitre 2, § 2.1.6). Les résultats (données non présentées) ont indiqué qu'un dépôt de Ca-P identique au précédent est obtenu avec le bain AC1-Ag, aucun dépôt n'est observé avec le bain ALK-Ag, et des agrégats de Ca-P sont observés par endroit sur la surface de l'échantillon OXY-Ag. Toutefois, le comportement de ces échantillons dans la solution de SBF est presque identique à celui des échantillons immergés dans les bains contenant PdCl<sub>2</sub>. La croissance de Ca-P dans la solution SBF n'est pas détectée sur ces échantillons après une durée d'immersion de 1 à 2 semaine(s).

Ainsi, nous avons montré que les bains autocatalytiques ne permettent pas la croissance de Ca-P sur le titanate de sodium contrairement aux polymères présentés par Reis et al. (1,2).

### **5.1.3. Bains « autocatalytiques » appliqués sur le sandwich 316L/Polypropylène-Polyéthylène (16)**

Les résultats sont aussi contraires à ceux obtenus par notre équipe dans une étude sur l'acier inoxydable 316L et sur le polypropylène-polyéthylène (16). En effet, nous avons pour la première fois testé le bain autocatalytique acide avec PdCl<sub>2</sub> (voir Chapitre 1, §1.4.2) pour développer la surface bioactive de deux composants du sandwich « Acier inoxydable 316L/Polypropylène-Polyéthylène ». En revanche, ce dépôt a significativement augmenté la viabilité cellulaire. La publication parue dans la revue RSC Advanced sous le titre « Biomimetic calcium–phosphates produced by an auto-catalytic route on stainless steel 316L and bio-inert polyolefin » (16) et rassemblant ces résultats est donnée ci-dessous.

## Biomimetic calcium–phosphates produced by an auto-catalytic route on stainless steel 316L and bio-inert polyolefin

Cite this: DOI: 10.1039/c3ra23385e

Van Quang Le,<sup>a</sup> Andrea Cochis,<sup>b</sup> Lia Rimondini,<sup>b</sup> Geneviève Pourroy,<sup>a</sup> Vesna Stanic,<sup>c</sup> Heinz Palkowski<sup>d</sup> and Adele Carradò<sup>\*a</sup>

A melange of hydroxyapatite and calcium phosphate hydrate coatings have been deposited on the surfaces of 316L type stainless steel and polyolefin (PP-PE), both components of 316L/PP-PE/316L sandwich, by an auto-catalytic route using an acidic bath. Coatings on 316L are made of spherules size ranged from 100 nm to 1 µm while those observed on PP-PE are smaller in the 50–600 nm range. Cell viability is much higher in samples with novel auto-catalytic layer of Ca–P than in the uncoated ones. Furthermore, our results show that the Ca–P coating produced by an auto-catalytic route act as promoter for osteoblasts proliferation. Osteoblasts morphology investigated by immunofluorescence proves that they are attached and well spread confirming the cytocompatibility.

Received 18th December 2012,  
Accepted 21st March 2013

DOI: 10.1039/c3ra23385e

www.rsc.org/advances

### 1. Introduction

Many research works in the field of biomaterials are focused on the elaboration of bioactive coatings on metallic and non-metallic substrates implanted into the human body.<sup>1</sup> Indeed, although calcium–phosphates (Ca–P) would be the “best biomaterials” due to their bone-bonding ability in the living body, they must be associated to metallic and polymeric substrates stable under biological conditions because of their low mechanical strength and toughness.<sup>2</sup> Therefore, for the purpose of support/replacing the disadvantages of bio-ceramics, mechanical properties of metallic and/or polymeric substrates and bioactivity of the coatings must be combined. Nowadays, polymeric and metallic biomaterials are widely employed in medical implants and orthopaedic replacements.<sup>3</sup> The metallic implants are usually made of stainless steel in particular 316L type, cobalt-chromium alloys and titanium and its alloys.<sup>4–6</sup> The reports show that the bioactivity of 316L stainless steel is not as good as titanium alloys but it is used widely, even most commonly, because of its low cost, ease of fabrication associated with chemical stability<sup>7,8</sup> and

high mechanical performances. Polymeric biomaterials, in particular polyethylene and related polymers have been widely used<sup>9</sup> for several years. However, their surface<sup>10–12</sup> as well as those of metallic substrates<sup>13,14</sup> should be modified to improve their bioactivity.

Several techniques were developed to produce bio-ceramic layer based on Ca–P layer deposited on the metallic biomaterial surface. Physical methods such as plasma spray method,<sup>15,16</sup> pulsed laser deposition<sup>17,18</sup> or calcium ion implantation techniques,<sup>5</sup> and chemical ones such as electro-chemistry,<sup>13</sup> dipping,<sup>19</sup> electro-codeposition<sup>20</sup> or sol-gel<sup>21,22</sup> are widely used. Beside them, the biomimetic techniques<sup>23–27</sup> appear to be expanding.

Polyolefin (PP-PE), made of polyethylene (PE) and polypropylene (PP), is a widely used commercial polymer family.<sup>28</sup> Because of its good combination of chemical and physical properties<sup>29</sup> along with low cost, superior processability and recyclability, it is one of the most preferred choices among commercial polymers. Moreover, according to Nishida *et al.*,<sup>30</sup> polyolefin has a much better biocompatibility than polypropylene, which is assigned to the dense layer of polyolefin fibres at the surface, therefore in contact with blood.

For improving the properties of the materials and designing multi-functional materials, scientists have combined two or more types of materials. So hybrid materials, here polymer/metal composite materials, have been developed. One of the major problems in oral and orthopaedic implantable prosthesis is to combine biocompatibility and suitable mechanical properties. This was particularly true in non-cemented hip prosthesis and in oral implants, where the mechanical properties required at the collar or in the most apical parts

<sup>a</sup>Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg, UMR 7504 UDS-CNRS, 23 rue du Loess, BP 43, 67034 Strasbourg cedex 2, France.  
E-mail: adele.carrado@ipcms.unistra.fr

<sup>b</sup>Università del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”, Department of Health Sciences, Laboratory of Biomedical and Dental Materials, Via Solaroli, 17, 28100, Novara, Italy

<sup>c</sup>Photon Sciences Directorate, Building 725D, Brookhaven National Laboratory, 11973, Upton NY, USA

<sup>d</sup>Institute of Metallurgy (IMET), Metal Forming and Processing, Clausthal University of Technology (TUC), Robert-Koch-Str. 42, 38678 Clausthal-Zellerfeld, Germany

of the implants have to be different in order to assure an optimal load distribution. In this view, the demonstration of sandwich technology applicability to a metal device in this field may be an actual innovation. Biomechanical impairment between bone and implants under functional loading is still one of the major causes of failure of both orthopaedic and oral implants with enormous consequences in terms of biological and economical costs. Stress distribution between the implant and the surrounded bone is a key factor for limiting or increasing the risk of osteolysis and fracture. It has been demonstrated that a short hip endoprosthesis in poor quality bone have a high risk of failure because of bone fracture at the collar;<sup>31</sup> osteolysis and loosening due to the wear debris has been observed in young and more active patients with knee arthroplasty just because of the higher stresses;<sup>32</sup> oral implants may lose osteointegration under overload. In the last case, the loss of capability in the bone/metal connection with respect to natural dentition is due to the absence of the interposed periodontal ligament acting as shock-absorber. In this view, the development of devices with improved mechanical and biological properties may be interesting just to reduce the risk of implant failure.

We are currently developing sandwich systems based on 316L/PP-PE/316L sandwich or *vice versa* (PP-PE/316L/PP-PE) as described in ref. 33,34. A 0.6 mm thick foil of polyolefin (PP-PE) and a sheet of 0.5 mm thick 316L stainless steel were used as a polymer core and as cover material. They present designable mechanical properties of significant interest for biomedical applications. Indeed, under specific conditions, they show for example good strength combined with high elasticity as presented by Palkowski *et al.*<sup>33</sup> Furthermore, preliminary biomimetic study using simulated body fluid<sup>26,27</sup> have proved that it is possible to induce a limited growth of a Ca-P layer on these sandwich surfaces (metal and polymer sides). Reis *et al.*<sup>10,11</sup> have shown that Ca-P layers can be grown on several polymeric materials by using an auto-catalytic method.

In this study, we extend this method to the growth of Ca-P layer on metal. This deposition route is electroless and based on a redox reaction. It has several advantages such as controlled conditions, applicability to complicated shapes, no adverse effect of heating, and cost effectiveness. The single components (316L and PP-PE) of the sandwich were used for validating the coating method to produce novel auto-catalytic Ca-P layer on metal and polymer. Then, the coated surfaces were analysed by scanning and transmission electron microscopy and energy dispersive spectroscopy (TEM and SEM/EDS-X). The crystalline phases present on the formed layer were identified by selected-area electron diffraction (SAED). Finally, cell viability on the coated materials was tested.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Sample preparation

The polyolefin (PP-PE) polymer is made of a mixture of PP-PE with talc [Mg<sub>3</sub>Si<sub>4</sub>O<sub>10</sub>(OH)<sub>2</sub>], rutile (TiO<sub>2</sub>), and barite (BaSO<sub>4</sub>).

**Table 1** Nominal composition of 316L stainless steel (in wt.%)

	C	Si	Mn	P	S	Ni	Cr	Mo	Cu	Al	Fe
Type 316L	0.015	0.01	0.01	0.029	0.001	15.08	17.35	2.74	—	0.024	Bal.

The nominal composition of 316L stainless steel is given in Table 1. 316L stainless steel and PP-PE small plates (10 mm × 10 mm) were cut from commercially available sheets. The stainless steel was then cleaned under ultra-sounds for 30 min in acetone, then 30 min in ethanol 99% and 30 min in double distilled water, while the PP-PE samples were only cleaned under ultra-sonication for 30 min in ethanol 99% and 30 min in double distilled water.

The 316L specimens were immersed in 10 M NaOH solution for 24 h at 60 °C. Following the NaOH treatment, the specimens were gently washed with distilled water and dried at 40 °C overnight in an electrical oven. After that, the 316L and PP-PE specimens were immersed in an auto-catalytic acidic bath which was magnetically stirred for 3 h. Then, the samples were cleaned with distilled water and dried in environmental conditions. The composition and the operating conditions of auto-catalytic acidic bath are indicated in Table 2.

### 2.2 Sample characterisation methods

**2.2.1 Phase determination of the PP-PE material.** The crystalline structure of the polyolefin foil was studied by wide-angle X-ray scattering (WAXS) performed at the National Synchrotron Light Source Beamline X6B at Brookhaven National Laboratories (BNL) as reported by Palkowski *et al.*<sup>33</sup>

**2.2.2 Scanning electron microscopy (SEM) analysis.** The morphologies of 316L stainless steel and polyolefin samples after submitting to the auto-catalytic acidic bath were examined using a JEOL 6700F equipped with an EDS-X analysis. Images were recorded at 3 kV. EDS-X analysis were performed at 10 kV on 10 μm × 10 μm area and repeated three times at least.

The morphology of cells attached to the samples surfaces was investigated also by SEM. Briefly, samples were removed from the media, gently washed with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) fixed with 2.5% glutaraldehyde for 2 h in 1 mol L<sup>-1</sup> sodium cacodylate buffer, washed with the latter, dehydrated with 70%, 80%, 90%, and 100% ethanol (10 min each), and finally treated with CO<sub>2</sub> at top critical point. Specimens were fixed on aluminum stubs using a conductive

**Table 2** Composition and operating conditions of the auto-catalytic bath<sup>10,11</sup>

Bath	Composition		Operating conditions	
	Chemicals	g L <sup>-1</sup>	Temp. °C	pH
Acidic	Calcium chloride, CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	27.8	80 ± 2	5.3 ± 0.1
	Sodium hypophosphite, NaH <sub>2</sub> PO <sub>2</sub>	19.9		
	Palladium chloride, PdCl <sub>2</sub>	0.9		
	Sodium fluoride, NaF	5		
	Succinic acid, C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	7.0		

carbon tape, covered with a 10 nm gold layer (Coating Unit 5100, Polaroid), and observed with a StereoScan 360 SEM (Cambridge) at 10 kV with various magnifications, using secondary electrons.

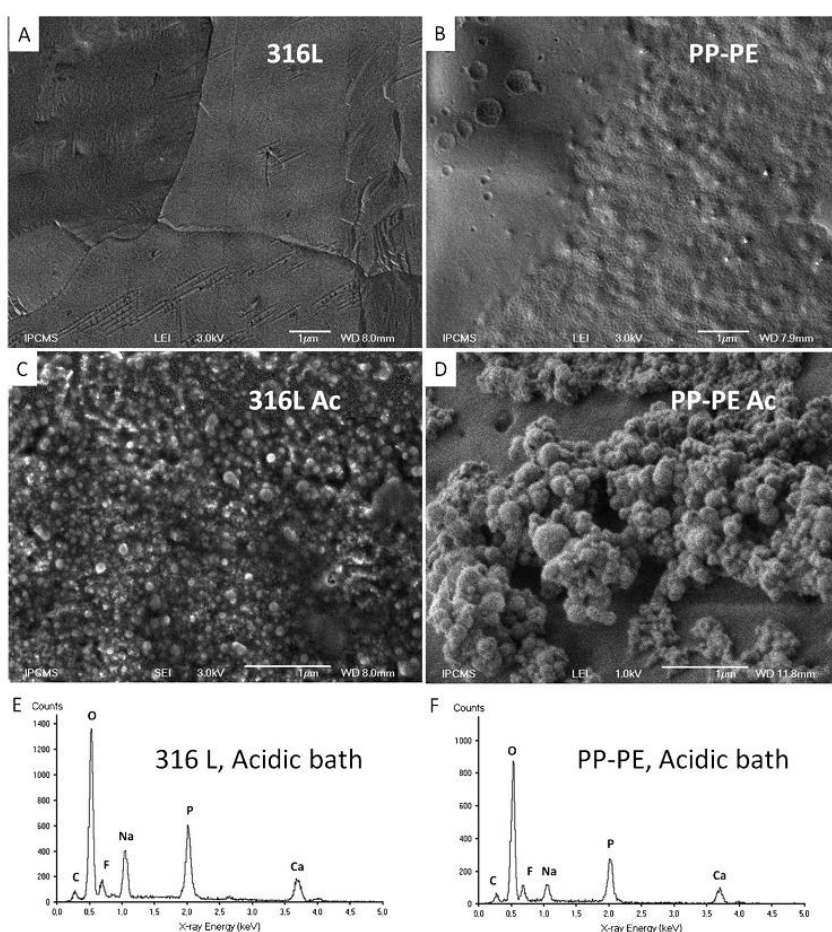
**2.2.3 Transmission electron microscopy (TEM).** Coated layers on 316L stainless steel and polyolefin samples were scratched, collected on a copper grid and then examined by TEM (TOPCON 002B, 200 kV, CCD camera). Images of different areas of the samples and selected area electron diffraction pattern (SAED) were recorded. The lattice distances were measured and compared to the International Centre for Diffraction Data base (ICDD) for phase's determination.

**2.2.4 Cells cultivation.** Human osteosarcoma cells (MG63, ATCC: CRL-1427) were cultivated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modification minimal essential medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with 10% foetal bovine serum (FBS, Lonza, Basel, Switzerland) and 1% penicillin-streptomycin. When the cells reached 85–90% confluence,

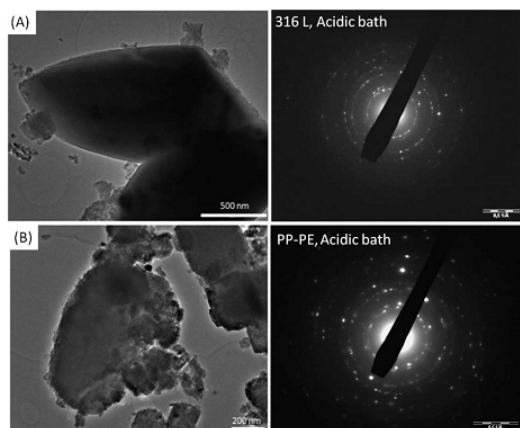
they were detached by trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), collected and used for cytotoxicity evaluation experiments.

**2.2.5 Cytotoxicity evaluation.** Both, 316L and PP-PE with and without Ca-P coating samples were sterilized by immersion in 70% ethanol for 12 h and then dried in a sterile cabinet and irradiated with UV light exposition for 45 min. Specimens were laid down onto each well of a 24 multiwell plate (CellStar, PBI International, Milan, Italy). The cells were seeded directly onto the specimen surface in a defined number (5000 cells/sample) and cultivated for 48 h and 72 h. Cells seeded onto polystyrene were used as a control.

Cells viability was evaluated by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay (MTT, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). Briefly, 20 µL of MTT solution (1 mg mL<sup>-1</sup> in PBS) were added to each sample and plate and incubated for 4 h in the dark. Afterwards, supernatant were aspirated and formazan crystals were dissolved



**Fig. 1** Morphologies by SEM 316L (A) and PP-PE (B) before auto-catalytic acidic bath. Coating deposited on 316L Ac (C) and PP-PE Ac (D) and the corresponding EDS-X analyses (E and F).



**Fig. 2** TEM observations (left) on the scratched coating on 316L (A) and PP-PE (B) substrates and the corresponding SAED pattern (right).

with 100  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich). 50  $\mu$ L were then collected and centrifuged 5 min (12 000 rpm) to remove eventual debris. Optical density was measured at 570 nm with a spectrophotometer (Spectra Count, Packard Bell, USA). The optical density of control samples was considered as 100% viability. Experiments were performed using six replicates. The viabilities recorded for cells onto treated and untreated materials were statistically compared using one-tail Student's *t*-test. Significance was considered for  $p < 0.05$ .

**2.2.6 Cells proliferation evaluation.** The number of cells was assessed by the trypan blue assay after 48 h and 72 h after seeding cells onto the samples' surfaces. Briefly, at "day 0"  $1 \times 10^4$  osteoblasts were seeded and cultivated for 48 h and 72 h with DMEM 10% FBS and 1% antibiotics. Afterwards, the samples were gently washed with PBS and cells detached by trypsin/EDTA solution. The cell number on each specimen was calculated with trypan blue staining using a Bürker-Turk chamber for counting. The percentage of cells number increasing was calculated as a function of the "day 0" starting

number with the following formula:  $[(\text{no. cells specimen} / 1 \times 10^4) \times 100]$ . Experiments were performed in triplicate.

The 5-bromo-2'-deoxyuridine (bromodeoxyuridine (BrdU), B-5002 Sigma) assay was used in order to investigate the cells' proliferation activity. Briefly, after 72 h cultivation cells were incubated 1 h at 37 °C with BrdU (50  $\mu$ M) as thymidine analogue and afterwards fixed 5 min with 4% formaldehyde-3% sucrose (in PBS) solution at room temperature (RT). After DNA denaturation with 2 N HCl (1 h, RT), cells were incubated 1 h at RT with the primary anti-BrdU antibody (Bu-33, Sigma, 1 : 150 in PBS 1% normal goat serum, 0.05% Tween 20) and then 45 min at RT with the proper secondary antibody. Finally, cells were co-stained with phalloidin (Molecular Probes Inc., 45 min at RT) in order to visualize cytoskeletons.

**2.2.7 Cells morphology.** Osteoblasts morphology was investigated by immunofluorescence (IF) staining. Briefly, after 72 h after seeding, cells were gently washed with PBS and fixed for 5 min with 4% formaldehyde-3% sucrose solution (in PBS) at RT. Afterwards, samples were washed three times with PBS and stained to visualize F-actins and nucleic acids by phalloidin (Molecular Probes Inc.) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes Inc.). Fluorescence images were collected with a fluorescent microscope (Leica AF 1500, Leica Instruments). In addition the specimens were observed using SEM. Methods for preparation were described in 2.2.2

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Structural and morphological composition of acidic coatings on 316L and PP-PE substrates

In this section, the structure and morphological characteristics of the Ca-P deposited on the PP-PE and 316L substrates are described and discussed. First, detailed X-ray studies of the PP-PE substrate have been performed according to our previously published paper.<sup>33</sup> It has been found that the polypropylene pattern is predominant, showing a typical  $\alpha$ -form of the PP. It has also been observed an unusual orientation of the PP matrix crystallites due to talc particles. These results were also reported by ref. 35–37.

**Table 3** Experimental lattice distances measured on SAED (Fig. 2) recorded on PP-PE Ac and 316L Ac

PP-PE $d_{\text{exp}}$ (nm)	316L $d_{\text{exp}}$ (nm)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ Hydroxyapatite (ICDD 9-432) $d_{\text{theo}}$ (nm)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Calcium phosphate hydrate (ICDD 9-77) $d_{\text{theo}}$ (nm)
0.304(2)	0.303(2) 0.286(2)		0.304
0.279(2)	0.263(2)	0.279	
0.188(2)	0.188(2) 0.182(2)	0.184	0.187
0.158(2)	0.158(2)		0.155
0.133(2)			0.137
0.131(2)		0.131	
0.120(2)		0.124	
0.109(2)	0.109(2) 0.102(2) 0.071(2)	0.111	

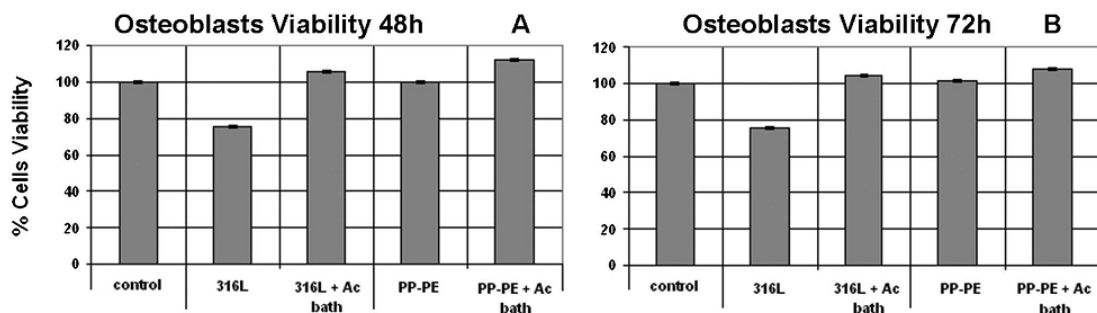


Fig. 3 Osteoblasts viability onto untreated and treated stainless steel (316L and 316L Ac respectively) and untreated and treated polyolefin (PP-PE and PP-PE Ac respectively) after 48 h (A) and 72 h (B) of cell-biomaterials direct contact.

Fig. 1 shows the 316L and PP-PE substrates before (A and B) and after (C and D) auto-catalytic acidic bath, respectively. A coating is clearly visible on Fig. 1-C and Fig. 1-D when compared with Fig. 1-A and Fig. 1-B. The coating composition was determined by SEM/EDS-X analyses on  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  repeated three times at least. Characteristic spectra are shown in Fig. 1-E and Fig. 1-F for 316L and PP-PE substrate, respectively. On 316L substrates, SEM micrographs exhibit a dense coating made of spherical agglomerates without pores (Fig. 1-C). The chemical analysis proves the coating is basically composed of C, Ca, P, Na, F and O ions (Fig. 1-E). C arises from  $\text{CO}_2$  contamination in air, while Ca, P, Na, F and O come from the bath. Nevertheless, the surface roughness prevents the precise determination of element ratio.

The morphology of the PP-PE sample 3 h immersed in acidic bath appears completely different compared to the 316L samples (Fig. 1-B). The coating exhibits typical particle shapes without sharp face angles. They seem to be less compact with spherules size ranged from 50 to 600 nm, compared to the 316L one (Fig. 1-C). According to EDS-X analyses, these spherules are also composed of Ca, P, Na, F and O ions as shown in Fig. 1-F.

Typical TEM examinations of the scratch coatings are presented in Fig. 2-A and Fig. 2-B for 316L and PP-PE, respectively. Collected particles on 316L (Fig. 2-A) appear to be of about micron sizes (100 nm to 1  $\mu\text{m}$ ), while those observed on PP-PE are smaller in the 50–600 nm range (Fig. 2-B). SAED patterns, recorded on each sample and presented in Fig. 2, are characteristic of polycrystalline samples. The experimental lattice distances are given in Table 3 and interpreted in terms of a mixture of hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , ICDD 9-432) and calcium phosphate hydrate ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , ICDD 9-77) on both samples (316L Ac and PP-PE Ac).

### 3.2 Cytotoxicity evaluation

Stainless steel surfaces were observed to well support the cell viability. Actually, the latter did not differ significantly with those observed on polystyrene used as control after both 48 h and 72 h of cell material contact. This result was not surprising. Stainless steel 316L has been widely studied and applied for invasive and implantable medical devices manu-

facturing including orthopaedic implant<sup>38</sup> and coronary stents.<sup>39–41</sup> Its side effects, if any, are potentially related to the medium and long term corrosion and in particular to nickel release.<sup>40</sup> For this reason, surface passivating technologies<sup>42</sup> or other coatings able to increase corrosion resistance seems to be a reasonable approach to improve biocompatibility.<sup>38,43</sup> In the present study, the acidic bath treatment provided to coat the stainless steel 316L with Ca-P layer appears to increase the cytocompatibility properties of the material. Actually, the viability of the osteoblasts cells cultured either for 48 h and 72 h were higher than those ones on the untreated metal with significance near to the cut-off level ( $p = 0.07$ ) (Fig. 3-A and Fig. 3-B). Polyolefin showed a good ability to promote osteoblasts viability and proliferation like in polystyrene control surfaces.

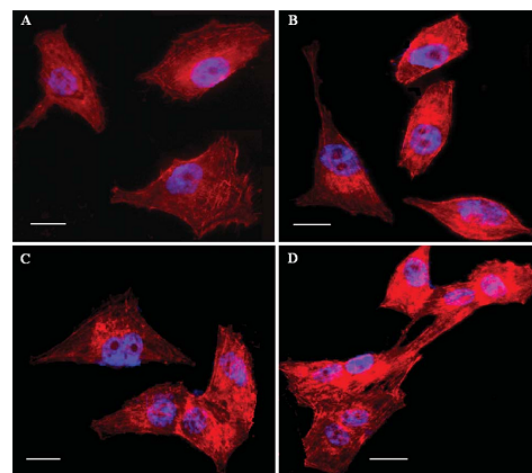
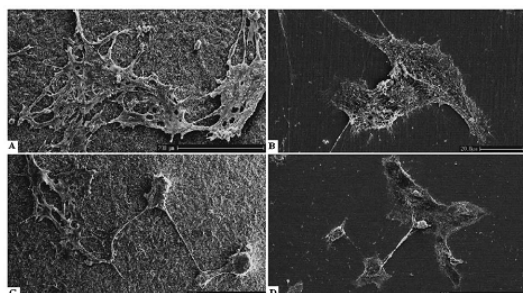
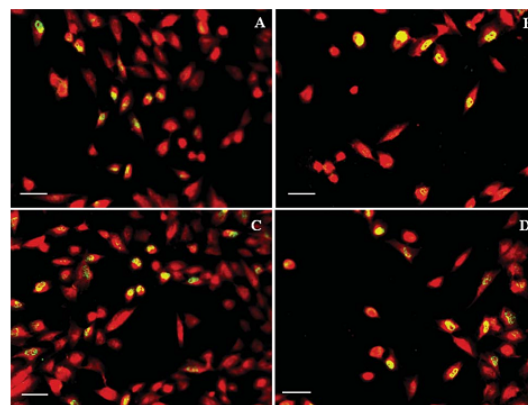


Fig. 4 IF staining with DAPI (blue) and phalloidin (red) of cells seeded for 72 h onto the samples' surfaces. The morphologies were generally correct for all the samples, but for 316L Ac (D) and PP-PE Ac (C) more dividing cells were observed compared to uncoated 316L (B) and PP-PE (A), confirming the efficiency of the Ca-P coating to promote osteoblasts proliferation. Magnification:  $40\times$ , bar scale = 10  $\mu\text{m}$ .





**Fig. 5** SEM images of 72 h seeded osteoblasts onto the samples' surfaces. On the left, coated samples 316L Ac (A) and PP-PE Ac (C) are shown, while on the right uncoated samples 316L (B) and PP-PE (D) are presented. The Ca-P coating was still very well attached and homogeneously distributed (grey layer A-C) and the cells observed showed a proliferative state. On the uncoated surfaces (B-D), cells presented a good morphology and spread but not a proliferation comparable with the coated ones.



**Fig. 6** BrdU (yellow/green) and phalloidin (red) staining of osteoblasts after 72 h seeding. Cells density and BrdU positive cells are higher in the coated samples PP-PE Ac (A) and 316L Ac (C) compared to the uncoated PP-PE (B) and 316L (D) ones. Magnification: 10 x, bar scale = 50 μm.

The acidic bath treatment did not provoke any detrimental effect on polymer surfaces. In fact, after 48 h of direct contact, cell viability resulted in 112% for treated PP-PE (Fig. 3-A) and 104% after 72 h (Fig. 3-B) with respect to polystyrene used as comparison.

### 3.3 Cells morphology

Osteoblasts morphology after 72 h seeding observed by IF is reported in Fig. 4, while morphological observation with SEM are reported in Fig. 5.

By IF staining, it was possible to observe that osteoblasts cultivated directly onto 316L and PP-PE samples, both coated or not, were attached and well spread, so confirming the cytocompatibility of the tested specimens. In addition, pictures of coated 316L (Fig. 4-D) and PP-PE (Fig. 4-C) show a significant number of dividing cells compared to uncoated ones of 316L (Fig. 4-B) and PP-PE (Fig. 4-A); these observations hypothesises that the Ca-P coating improves the osteoblasts proliferation.

### 3.4 Cells proliferation

The cells' counted after 48 h and 72 h after seeding obtained by trypan blue staining are reported in Table 4. Both sample types (316L and PP-PE) coated or uncoated resulted as not toxic as in all cases it was possible to detect an increase in the cells' number. In particular, at both the time-points, the cells' number resulted higher for Ca-P coated samples (316L Ac and PP-PE Ac) compared to the uncoated ones. These findings

confirm those observed using MTT assay that better viability for coated samples was shown when compared to untreated ones.

As further proof of osteoblasts normal ongoing, also BrdU staining confirmed the cells' proliferative state as shown in Fig. 6. In fact, proliferative cells (in yellow/green) are present in both samples, coated and uncoated. However, the density and the percentage of proliferative cells are higher in Ca-P coated samples PP-PE Ac (A) and 316L Ac (C) compared to the uncoated PP-PE (B) and 316L (D) ones.

## 4. Conclusion

Out of this study it can be stated that:

- 1) The auto-catalytic coating route, previously proposed by Reis *et al.* (2003) for polymers, was successful for metallic 316L surfaces.
- 2) SAED measurements proved that hydroxyapatite and calcium phosphate hydrate coating could grow on 316L and on PP-PE.
- 3) A Ca-P coating increased the cytocompatibility of 316L surfaces and did not negatively affect those of the polyolefin suggesting it to be a promising treatment to improve biocompatibility of devices fashioned as sandwich sheets.

**Table 4** Percentage of cells' number increasing at 48 h and 72 h after seeding. At both the time-points, the cells' number is higher on coated samples (316L Ac and PP-PE Ac), confirming the ability of the coating to promote the cells' proliferation and validating MTT observations

Sample	Number of cells 48 h	% Cells increasing from day0	Number of cells 72 h	% Cells increasing from day0
316L Ac	16 667 ± 1443	167	20 833 ± 1400	208
316L	12 833 ± 2021	128	18 333 ± 1398	183
PP-PE Ac	15 833 ± 1442	158	20 000 ± 2489	200
PP-PE	15 000 ± 2500	150	19 167 ± 1432	192

4) Ca-P coated surfaces improve the osteoblasts proliferation as well as their density respect to the uncoated surfaces of PP-PE and 316L.

### Acknowledgements

The authors are grateful for the support of the German Research Foundation DFG, DAAD (D/0707603), EGIDE (PHC PROCOPE No. 17895XK), and APIC-DEU-PICS (No. 5245) for funding this research. Moreover, we thank ThyssenKrupp Nirosta for supporting us with the steel material. Use of the National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Laboratory, was supported by the US Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences, under Contract No. DE-AC02-98CH10886. The authors take pleasure in acknowledging M. Dris Ihiwakrim, M. Jacques Faerber and Dr Enrico Catalano for TEM, SEM and immunofluorescent observations respectively.

### References

- 1 P. Habibovic, F. Barrère, C. A. van Blitterswijk, K. de Groot and P. Layrolle, Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants, *J. Am. Ceram. Soc.*, 2002, **85**, 517–522.
- 2 T. Kokubo, Formation of biologically active bone-like apatite on metals and polymers by a biomimetic process, *Thermochim. Acta*, 1996, **280–281**, 479–490.
- 3 J. Yamazoe, M. Nakagawa, Y. Matono and A. Takeuki, The development of Ti alloys for dental implant with high corrosion resistance and mechanical strength, *Dent. Mater. J.*, 2007, **26**, 260–267.
- 4 R. Van Noort, Titanium: The implant material of today, *J. Mater. Sci.*, 1987, **22**, 3801–3811.
- 5 M. Niinomi, Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 2003, **4**, 445–454.
- 6 H. J. Rack and J. I. Qazi, Titanium alloys for biomedical applications, *Mat. Sci. Eng.*, 2006, **C26**, 1269–1277.
- 7 R. Müller, J. Abke, E. Schnell, F. Macionczyk, U. Gbureck, R. Mehrl, Z. Ruszczak, R. Kujat, C. Englert, M. Nerlich and P. Angele, Surface engineering of stainless steel materials by covalent collagen immobilization to improve implant biocompatibility, *Biomaterials*, 2005, **26**, 6962–6972.
- 8 G. Rondelli, P. Torricelli, M. Fini and R. Giardino, *In vitro* corrosion study by EIS of a nickel-free stainless steel for orthopaedic applications, *Biomaterials*, 2005, **26**, 739–744.
- 9 R. Narayan, Inert Polymers in, *Biomedical Materials*. ed. R. Narayan, Springer, 2009, p. 87–90 (ISBN 978-0-387-84871-6).
- 10 I. B. Leonor and R. L. Reis, An innovative auto-catalytic deposition route to produce calcium-phosphate coatings on polymeric biomaterials, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2003, **14**, 435–441.
- 11 J. M. Oliveira, I. B. Leonor and R. L. Reis, Preparation of Bioactive Coatings on the Surface of Bioinert Polymers through an Innovative Auto-Catalytic Electroless Route, *Key Eng. Mater.*, 2005, **284–286**, 203–207.
- 12 J. M. Oliveira, S. A. Costa, I. B. Leonor, P. B. Malafaya, J. F. Mano and R. L. Reis, Novel hydroxyapatite/ carboxymethylchitosan composite scaffolds prepared through an innovative “auto-catalytic” electroless coprecipitation route, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2009, **88A**, 470–480.
- 13 Y. C. Tang, S. Katsuma, S. Fujimoto and S. Hiromoto, Electrochemical study of Type 304 and 316L stainless steels in simulated body fluids and cell cultures, *Acta Biomater.*, 2006, **2**, 709–715.
- 14 F. Zhang, E. T. Kang, K. G. Neoh, P. Wang and K. L. Tan, Surface modification of stainless steel by grafting of poly(ethylene glycol) for reduction in protein adsorption, *Biomaterials*, 2001, **22**, 1541–1548.
- 15 C. Y. Yang, B. C. Wang, E. Chang and J. D. Wu, The influences of plasma spraying parameters on the characteristics of hydroxyapatite coatings, a quantitative study, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 1995, **6**, 249–257.
- 16 Y. Yang, K.-H. Kim and J. L. Ong, A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process—an alternative to plasma spraying, *Biomaterials*, 2005, **26**, 327–337.
- 17 G. P. Dinda, J. Shin and J. Mazumder, Pulsed laser deposition of hydroxyapatite thin films on Ti-6Al-4V: Effect of heat treatment on structure and properties, *Acta Biomater.*, 2009, **5**, 1821–1830.
- 18 C. M. Cotell, Pulsed laser deposition of biocompatible thin films in: *Pulsed Laser Deposition of Thin Films*, ed. D. B. Chrisey and G. K. Hubler, Wiley, New York, 1994.
- 19 T. T. Li, J. H. Lee, T. Kobayasi and H. Aoki, Hydroxyapatite coating by dipping method, and bone bonding strength, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 1996, **7**, 355–357.
- 20 Y. Han, T. Fu, J. Lu and K. W. Xu, Characterization and stability of hydroxyapatite coatings prepared by electrodeposition and alkaline-treatment process, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001, **54**, 96–101.
- 21 C. Wu, Y. Ramaswamy, D. Gale, W. Yang, K. Xiao, L. Zhang, Y. Yin and H. Zreiqat, Novel sphen coatings on Ti-6Al-4V for orthopedic implants using sol-gel method, *Acta Biomater.*, 2008, **4**, 569–576.
- 22 D.-M. Liu, Q. Yang and T. Troczynski, Sol-gel hydroxyapatite coatings on stainless steel substrates, *Biomaterials*, 2002, **23**, 691–698.
- 23 W.-Q. Yan, T. Nakamura, K. Kawanabe, S. Nishigochi, M. Oka and T. Kokubo, Apatite layer-coated titanium for use as bone bonding implants, *Biomaterials*, 1997, **18**, 1185–1190.
- 24 S. Nishiguchi, H. Kato, H. Fujita, M. Oka, H.-M. Kim, T. Kokubo and T. Nakamura, Titanium metals form direct bonding to bone after alkali and heat treatments, *Biomaterials*, 2001, **22**, 2525–2533.
- 25 T. Kokubo, H.-M. Kim, F. Miyaji, H. Takadama and T. Miyazak, Ceramic-metal and ceramic-polymer composites prepared by a biomimetic process, *Composites, Part A*, 1999, **30**, 405–409.
- 26 T. Kokubo and H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity, *Biomaterials*, 2006, **27**, 2907–2915.
- 27 T. Kokubo, Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment, *Acta Mater.*, 1998, **46**, 2519–2527.

- 28 T. C. Chung, Synthesis of functional polyolefin copolymers with graft and block structures, *Prog. Polym. Sci.*, 2002, **27**, 39–85.
- 29 C. Vasile and R. B. Seymour, *Handbook of polyolefins*. Marcel Dekker, New York, 1993, ISBN 0-8274-8978-4.
- 30 H. Nishida, M. Shibuya, M. Endo and H. Koyanagi, *Artif. Organs*, 1996, **20**, 1292–1294.
- 31 N. E. Bishop, A. Burton, M. Maheson and M. M. Morlock, Biomechanics of short hipendoprotheses the risk of bone failure increases with decreasing implant size, *Clin. Biomech.*, 2010, **25**, 666–74.
- 32 A. A. Hofmann, S. M. Heithoff and M. Camargo, Cementless total knee arthroplasty in patients 50 years or younger, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2002, **404**, 102–107.
- 33 H. Palkowski, V. Stanic and A. Carradò, Multilayer Roll-Bonded Sandwich: Processing, Mechanical Performance, and Bioactive Behavior, *JOM*, 2012, **64**, 514–519.
- 34 A. Carradò, J. Faerber, S. Niemeyer, G. Ziegmann and H. Palkowski, Metal/polymer/metal hybrid systems: Towards potential formability applications, *Compos. Struct.*, 2011, **93**, 715–721.
- 35 M. Xanthos, *Functional Fillers for Plastics*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2005, ISBN 3-527-31054-1.
- 36 G. Wypych, *Handbook of Fillers*, ChemTec Publishing, Toronto, 2009, ISBN 189519841.
- 37 H. G. Karian, *Handbook of Polypropylene and Polypropylene Composites*, Marcel Dekker Inc., New York, 2003, ISBN 0-8247-1949-2.
- 38 A. Oron, G. Agar, U. Oron and A. Stein, Correlation between rate of bony ingrowth to stainless steel, pure titanium, and titanium alloy implants in vivo and formation of hydroxyapatite on their surfaces *in vitro*, *J. Biomed. Mater. Res.: A*, 2009, **91**, 1006–1009.
- 39 C. Bayram, A. K. Mizrak, S. Aktürk, H. Kurşaklıoğlu, A. Iyiso, A. Ifran and E. B. Denkbaş, *In vitro* biocompatibility of plasma-aided surface-modified 316L stainless steel for intracoronary stents, *Biomed. Mater.*, 2010, **5**, 055007.
- 40 S. Weiss, A. Meissner and A. Fischer, Microstructural changes within similar coronary stents produced from two different austenitic steels, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2009, **2**, 210–6.
- 41 A. Waterhouse, Y. Yin, S. G. Wise, D. V. Bax, D. R. McKenzie, M. M. Bilek, A. S. Weiss and M. K. Ng, The immobilization of recombinant human tropoelastin on metals using a plasma-activated coating to improve the biocompatibility of coronary stents, *Biomaterials*, 2010, **31**, 8332–8340.
- 42 Y. R. Yoo, S. G. Jang, K. T. Oh, J. G. Kim and Y. S. Kim, Influences of passivating elements on the corrosion and biocompatibility of super stainless steels, *J. Biomed. Mater. Res.: B Appl. Biomater.*, 2008, **86**, 310–320.
- 43 M. Martinesi, S. Bruni, M. Stio, C. Treves, T. Bacci and F. Borgioli, Biocompatibility evaluation of surface-treated AISI 316L austenitic stainless steel in human cell cultures, *J. Biomed. Mater. Res.: A*, 2007, **80**, 131–145.

## 5.2. Modification des bains de Reis et al. pour le dépôt de Ca-P bioactif sur Ti-6Al-4V

### 5.2.1. Présentation de l'article

Les résultats dans la partie 5.1 ont indiqué que le dépôt de Ca-P peut être obtenu sur la couche de titanate de sodium dans un bain acide. En revanche, pour les bains alcalins et oxydants, le dépôt n'est pas observé clairement. De plus, dans tous les cas, les échantillons ayant subi des bains « autocatalytiques » n'ont pas de croissance de phosphate de calcium dans le milieu physiologique SBF. Et la viabilité cellulaire sur les échantillons ayant subi des bains « autocatalytiques » est diminué par rapport au titanate de sodium.

Nous avons donc proposé dans cette partie de nouveaux bains acides et montré qu'un dépôt de Ca-P se dépose sur la couche de titanate de sodium. Ces bains acides sont produits par une légère modification de la composition des bains acide de Reis et al. et l'utilisation d'AgCl. Le dépôt obtenu par les bains modifiés est stable dans le milieu physiologique. De plus, après une semaine dans SBF, une croissance de l'HA homogène sur les échantillons ayant de nouveau bain acide est vérifiée. La composition, le pH et la température des bains chimiques sont donnés dans le Chapitre 2, §2.1.6 (bains ACM1 et ACM2). Les résultats ont été publiés dans Biomatter "Alternative technique for calcium phosphate coating on titanium alloy implants", et donnés dans la partie suivante.

## 5.2.2. Publication

REPORT

Biomatter 4, e28534; March 2014; © 2014 Landes Bioscience

## Alternative technique for calcium phosphate coating on titanium alloy implants

Van Quang Le<sup>1</sup>, Geneviève Pourroy<sup>1</sup>, Andrea Cochis<sup>2</sup>, Lia Rimondini<sup>2,3</sup>, Wafa I Abdel-Fattah<sup>4</sup>, Hadeer I Mohammed<sup>5</sup>, and Adele Carradò<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg CNRS-UMR 7504; Strasbourg, France; <sup>2</sup>Department of Health Sciences; Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro"; Novara, Italy; <sup>3</sup>Consorzio Interuniversitario Nazionale per la Scienza e Tecnologia dei Materiali; Firenze, Italy; <sup>4</sup>Biomaterials Department; National Research Centre; Cairo, Egypt; <sup>5</sup>Biophysics Department; Ain Shams University; Cairo, Egypt

**Keywords:** hydroxyapatite, titanium alloy, chemical route, calcium-phosphate, physico-chemical characterization

As an alternative technique for calcium phosphate coating on titanium alloys, we propose to functionalize the metal surface with anionic bath containing chlorides of palladium or silver as activators. This new deposition route has several advantages such as controlled conditions, applicability to complex shapes, no adverse effect of heating, and cost effectiveness. A mixture of hydroxyapatite and calcium phosphate hydrate is deposited on the surface of Ti-6Al-4V. Calcium phosphate coating is built faster compared with the one by Simulated Body Fluid. Cell morphology and density are comparable to the control one; and the results prove no toxic compound is released into the medium during the previous seven days of immersion. Moreover, the cell viability is comparable with cells cultivated with the virgin medium. These experimental treatments allowed producing cytocompatible materials potentially applicable to manufacture implantable devices for orthopedic and oral surgeries.

### Introduction

Metallic artificial implants are widely used as medical devices to replace, support or enhance an existing biological structure. Most of the orthopedic or dental implants are made of titanium alloys due to their advanced mechanical properties and excellent biocompatibility.<sup>1</sup> Per-Ingvar Brånemark<sup>2</sup> first discovered the principles of osteointegration in the 1950s. Pure titanium (Ti) was placed in a rabbit fibula, connected directly to the bone and did not induce any severe inflammatory or other reactions in skin or bone tissues. This unique property of titanium, allowing direct contact and connection to be developed between living bone and metal surface without soft tissue interface, has now multiple applications such as dental implants, craniofacial prosthesis, hip replacements, etc.

Besides titanium itself, Ti-6Al-4V is one of the most commonly used materials for medical implants because of its suitable mechanical properties, its corrosion resistance and relative inertia toward living tissues. Despite that, there are some uncertainties concerning the release of Al and V ions under certain conditions.<sup>3</sup> Nevertheless, the essential requirements for any artificial implanted material, especially metallic ones, are demonstrated to possess not only biocompatibility, but also bioactivity with the host. Indeed, several months are required to get a sufficient osteointegration, and in numerous cases, the osteointegration is incomplete. Thus, considerable work has been done to

investigate various surface modification methods to increase the osteointegration rate such as surface-roughening (e.g., sandblasting and/or acid etching) and coating with hydroxyapatite (HA)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Several physical and chemical methods were reported in the literature to modify titanium implants surfaces such as the plasma spray, magnetron sputtering, dip- and spin-coating sol-gel suspensions, soaking, electrophoresis, pulsed laser deposition, and biomimetic routes.

Since the 1960s, calcium phosphates (Ca-P) and mainly hydroxyapatite (HA) have been widely used in bone surgeries as they easily bond with bone once they are implanted, in spite of their poor mechanical characteristics.<sup>4</sup> The elaboration of bioactive ceramic coatings on metallic and non-metallic substrates implanted into the human body is, therefore, a way to combine the mechanical properties of the substrate and the bioactivity of the ceramic layer. To achieve fast and long-term bioactive surfaces, implant surfaces should be coated with a developed Ca-P for its superior biocompatibility and bioactive acting as a barrier against ion release.<sup>5</sup>

In the late 80s, the development of osteoconductive HA plasma spray coatings<sup>6</sup> on metallic prostheses allowed to improve the biological behavior of the metallic surface. Although plasma spray technique is currently employed to produce clinically-used coatings, the long-term stability of the coating/implant is questionable. The poor coating, substrate adherence and the lack of uniformity of the coating affect the implant long-term lifetime.

\*Correspondence to: Adele Carradò; Email: carrado@unistra.fr  
Submitted: 01/09/2014; Revised: 03/10/2014; Accepted: 03/14/2014; Published Online: 03/19/2014  
<http://dx.doi.org/10.4161/biom.28534>

These drawbacks have been shown<sup>7</sup> to arise from the important residual internal stress induced in thermally sprayed coating during deposition. Indeed, a network of micro-crack developed in the ceramic coating volume in interface failures was induced.

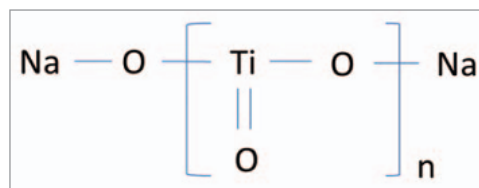
Many Ca-P coatings on titanium have been done by immersing chemically-treated metal and polymer implants<sup>8,9</sup> in an aqueous solution containing calcium and phosphate ions at pH and physiological temperatures in order to simulate the biological process. Among chemical routes, the alkali-heat treatment of Ti followed by the biomimetic process seemed to be one of the most popular and effective methods.<sup>10</sup> Dipping in alkali solution produces a Na-containing titanate layer,<sup>11</sup> able to induce the deposition of Ca-P ceramics in vitro as well as in vivo. Other reports indicated that acid-alkali treatment on Ti implants<sup>12-14</sup> might be more effective for the deposition of a homogeneous bone-like apatite layer on the surface of Ti when immersed in simulated body fluid (SBF).<sup>15</sup> This biomimetic process imitates the growth of in situ-formed bone-like HA crystals.<sup>16</sup> Thus, the HA coating is more readily degraded by osteopath<sup>17</sup> overcoming many of the drawbacks associated with other deposition techniques, such as the processes utilizing high temperature treatment. It has also been proven that the chemical pre-treatment in alkali solution can improve the bonding between titanium substrate and calcium phosphate coatings fabricated by the subsequent biomimetic deposition in SBF.<sup>18,19</sup>

As an alternative technique for Ca-P coating, Oliviera, Leonor and Reis proposed to treat the surface of non-conducting materials such as polymers in an autocatalytic bath.<sup>20-22</sup> This method is based on redox reactions with electroless plating using palladium chloride (PdCl<sub>2</sub>) as a catalyst. In this process, the PdCl<sub>2</sub> works as an arm of ionic change between the substrate and the solution.<sup>20</sup>

In the present study, we slightly modify this method and extend it to the growth of Ca-P layer on the metal substrate. After a mechanical polishing and a chemical treatment (e.g., using Kroll reagent) on the titanium substrate, a ceramic interlayer (sodium titanate, HT) is chemically generated by the action of an alkaline bath (NaOH), covalently linked to the metal substrate and ceramic coating. The alkaline pre-treatment on the Ti substrate and the further thermal treatments are performed in order to obtain a micrometric network layer (HT). Indeed, the Ca-P layer is produced using palladium chloride (PdCl<sub>2</sub>, ACM1) or silver chloride (AgCl, ACM2) to activate the surface, according to Reis's method. This new deposition route has several advantages over plasma spray, pulsed laser deposition, as well as magnetron sputtering offering: an easy way to control the experimental conditions, the applicability to complex shapes, and especially no adverse effect of heating. Furthermore, this method is cost effective.

### Results and Discussion

After the alkaline-heat treatment, a layer of titanium oxide (TiO<sub>2</sub>) and sodium titanate (Na<sub>2</sub>Ti<sub>n</sub>O<sub>2n+1</sub>, n = 3, 5, 6) was created on the surface of the metal according to previous works.<sup>23,24</sup> The structure of sodium titanate can be schematized in Scheme 1.



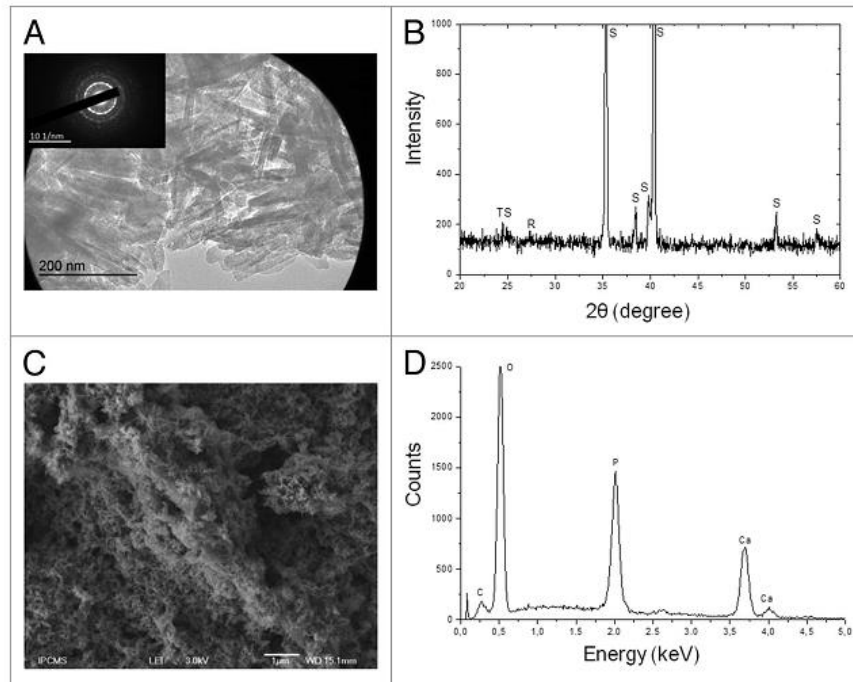
Scheme 1. Structure of Na<sub>2</sub>Ti<sub>n</sub>O<sub>2n+1</sub>.

Table 1. Experimental lattice distances measured on SAED (Figs. 1A and 2A) recorded on ACM1 and ACM2 samples

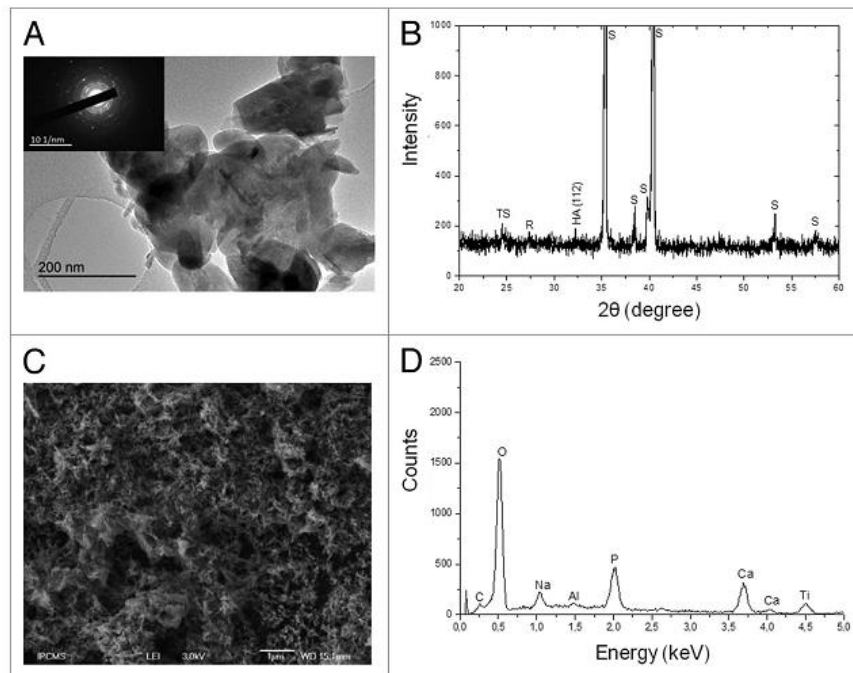
ACM1 d <sub>exp</sub> (± 0.005 nm)	ACM2 d <sub>exp</sub> (± 0.005 nm)	Hydroxyapatite, (Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (OH), ICDD 09-432), d <sub>theo</sub> (nm)	Calcium hydrogen phosphate hydrate, (Ca <sub>4</sub> H[PO <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> ·3H <sub>2</sub> O, ICDD 11-184) d <sub>theo</sub> (nm)
	0.370		0.374
0.350	0.352		0.348
0.342		0.344	0.343
0.336			0.338
0.310	0.311	0.308/0.317	0.305
0.278	0.275	0.281/0.279/0.272	0.283/0.277/0.275
	0.207	0.207	0.208
0.194	0.197	0.194	0.195
	0.189	0.188	0.186
0.182		0.184	
0.175		0.175	

The Ca-P layer was then deposited by dipping the substrates into the baths ACM1 and ACM2. Their compositions are given in the experimental part. The layers were analyzed by XRD and the morphologies were observed by TEM and SEM techniques. No difference between both XRD patterns was observed; the patterns exhibit only the diffraction peaks of α-Ti and β-Ti structures showing that the sodium titanate and Ca-P layers are either too thin or made of so small crystallites that the peaks are too broad. The surface morphologies were examined by SEM (Figs. 1C and 2C). A dense coating made of nanoparticles is clearly observed on ACM1 (Fig. 21). The analysis shows that the layer is composed mainly of Ca and P. No sodium titanate network is detected. On the contrary, the ACM2 coating is less dense than the previous one as proved by EDS-X analyses. Indeed, Ca and P are detected as well as Na and Ti.

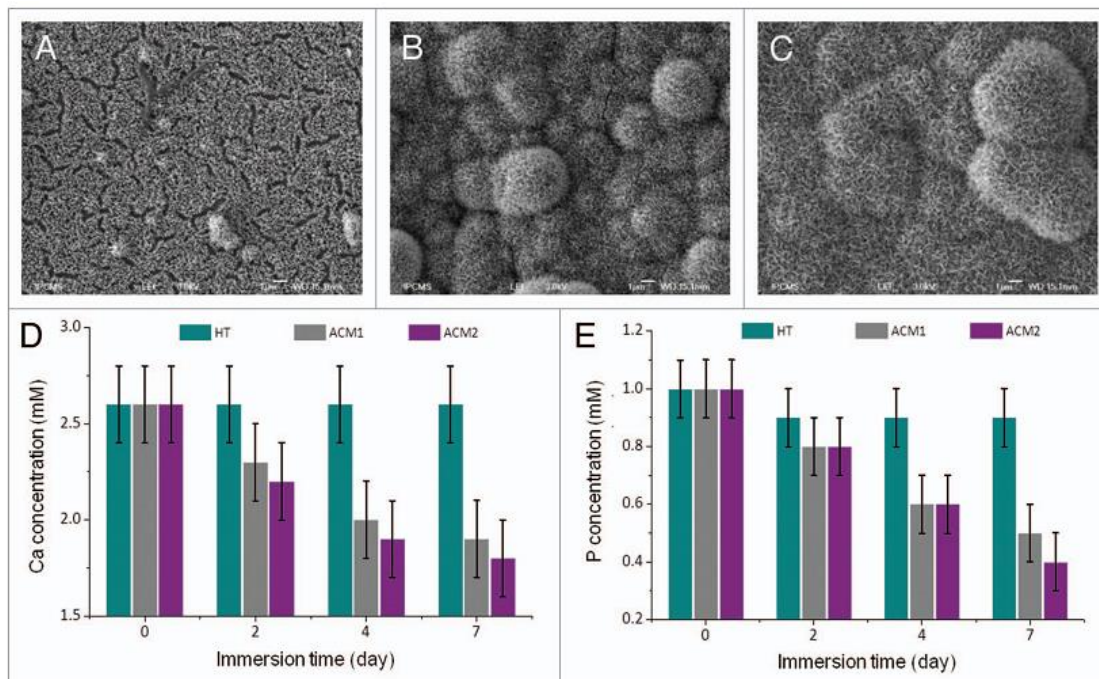
Typical TEM examinations of the scratched coatings are presented in Figures 1A and 2A for ACM1 and ACM2, respectively. The ACM1 collected particles appear to be in shape of rods of about 100–200 nm long while the ACM2 ones present more isotropic shapes in the 200–300 nm size range. Selected area electron diffraction (SAED) patterns, recorded on each sample (inserts in Figs. 1A and 2A), are characteristic for polycrystalline samples. The experimental lattice distances are given in Table 1 and interpreted in terms of a mixture of hydroxyapatite (Ca<sub>5</sub>[PO<sub>4</sub>]<sub>3</sub>[OH]),



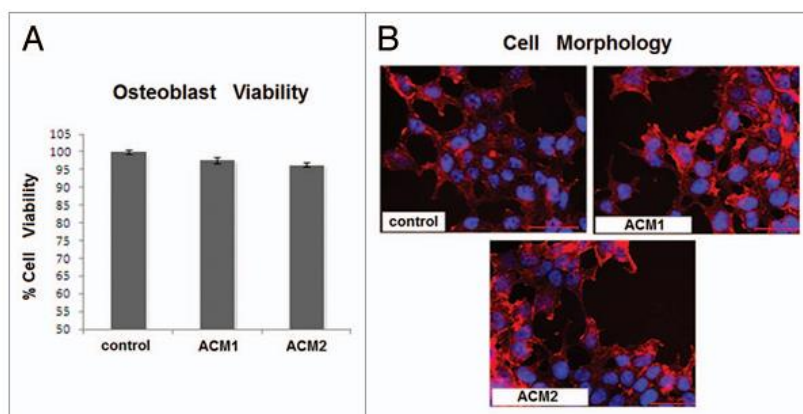
**Figure 1.** ACM1: (A) TEM observations on the scratched coating and the corresponding SAED pattern (insert). (B) XRD pattern, where TS is sodium titanate, R rutile, and S substrate. (C) Morphology by SEM and (D) corresponding EDS-X analyses.



**Figure 2.** ACM2: (A) TEM observations on the scratched coating and the corresponding SAED pattern (insert). (B) XRD pattern. (C) Morphology by SEM and (D) the corresponding EDS-X analyses.



**Figure 3.** Morphology by SEM after one week in SBF (A) alkaline-heat treated titanium alloy (HT), HT treated after (B) ACM1 and (C) ACM2 baths. Concentrations of (D) Ca and (E) P ions in SBF1 after for 2, 4 and 7 d of the samples HT, ACM1 and ACM2.



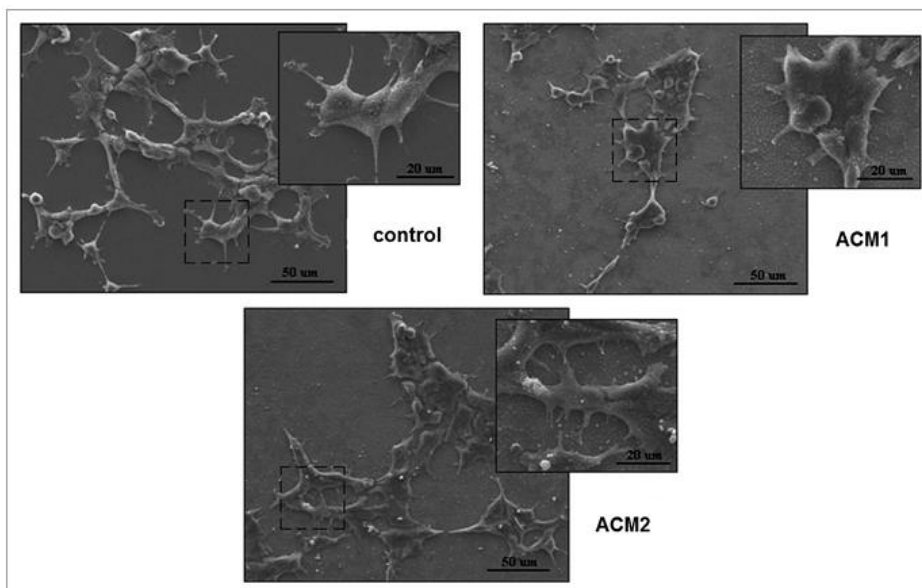
**Figure 4.** Direct cytocompatibility assay. Osteoblasts cultivated directly onto specimens' surfaces; the viability values are comparable to the control ones (A) and no statistical differences were calculated ( $P > 0.05$ ). Bars represent mean and standard deviations. Moreover, the test and control cell morphology (phalloidin in red and DAPI in blue) is comparable as shown in (B). Bar scale = 50  $\mu$ m.

ICDD 9–432) and calcium phosphate hydrate (calcium hydrogen phosphate hydrate,  $\text{Ca}_4\text{H}[\text{PO}_4]_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , ICDD 11–184) on both ACM1 and ACM2.

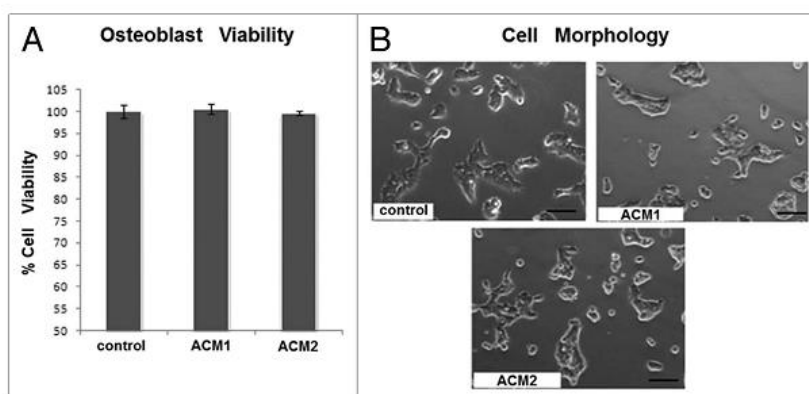
Figure 3 shows the morphology of HT (Fig. 3A), ACM1 (Fig. 3B) and ACM2 (Fig. 3C) samples after immersion in SBF for 7 d. Ca and P concentrations after immersing the samples in SBF1 for 2, 4 and 7 d are given in Figure 3D and E. It was

assumed that any change by decrease/increase in Ca or P concentrations, compared with the SBF reference solution, would represent a deposition/release on/from the sample surfaces respectively.

Ca or P ions release from SBF is observed after 2, 4 and 7 d for ACM1 and ACM2, (Fig. 3D and E). A sharp decrease in the ionic concentration of both Ca and P ions is recorded giving as result a dense Ca-P layer during all soaking periods (Fig. 3B and C).



**Figure 5.** SEM images of osteoblasts seeded directly onto specimen surfaces after 24 h Control (upper panel, left) and treated (ACM1 and ACM2) samples. The control samples morphology can be stated to be comparable.



**Figure 6.** Non-direct cytocompatibility assay. Osteoblasts cultivated with medium stored one week in direct contact with treated samples; viability values are comparable with controls (A) and no statistical differences were noticed ( $P > 0.05$ ). Bars represent means and standard deviations. Moreover, cells morphology and density investigated by light microscopy were comparable between test and control samples as shown in (B). Bar scale = 50 µm.

Differently, Ca ions for HT sample (Fig. 3A) are not modified, while P ions are slightly absorbed onto the surface.

Both tested specimens (ACM1 and ACM2) were not toxic for human osteoblasts. In fact, as reported in Figure 4A, the cell viability did not differ ( $P > 0.05$ ) between control and test groups. Viability was observed onto experimental materials always higher than 95% with respect to control.

The viability assay results were confirmed by the morphological analysis; in fact, by immunofluorescence staining it is possible to appreciate the correct spread and density of cells cultivated onto experimental specimens surface that are comparable with

the control (Fig. 4B). Also, SEM images confirmed the absence of morphological differences between cells cultivated onto treated samples and those onto the control material (Fig. 5).

Cells cultivated with the medium previously kept in direct contact for one week with treated samples showed a viability comparable with cells cultivated with the virgin medium (Fig. 6A). In fact, no statistical significant differences were observed between control and test samples. The cell viability was always registered higher than 98% of the control.

Visual investigation using light microscopy confirmed the viability assay results. As shown in Figure 6B, the cell morphology



and density are similar between control and test samples, suggesting that no toxic compounds were released into the medium by the treated specimens during the previous seven days of immersion.

These analyses show that Ca-P nanostructured layers made of hydroxyapatite  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  and calcium phosphate hydrate  $(\text{Ca}_4\text{H}[\text{PO}_4]_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$  cover the titanium substrate well. The layer is thicker and denser when Pd is involved. The hypothesis made previously by Reis et al.<sup>22</sup> to explain the mechanism leading to the Ca-P deposition on polymers is schematized in Figure 7. First, palladium ions link onto the surface through the hydroxyde groups (Fig. 7A, step 1). Then, the negatively charged phosphate ions and the positively charged Ca ions are successively attracted so that this stacking results

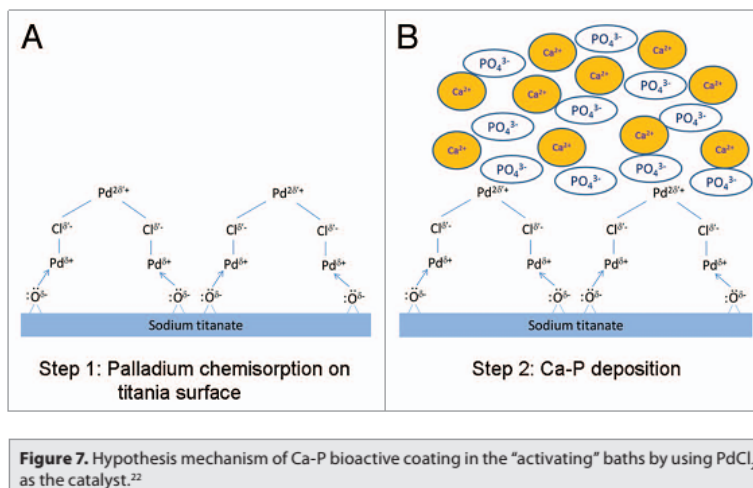
in the formation of calcium phosphate compounds (Fig. 7B, step 2). When silver is involved, a similar mechanism can be proposed. However, according to Reis et al., Pd ions are not eliminated. In case of Ag, the bath has the advantage to introduce ions known to have efficient antimicrobial properties<sup>25</sup>; moreover, as recently demonstrated by Alan BG Lansdown,<sup>26</sup> the pharmaceutical and toxicological profile of Ag in biomaterials shows that health risks associated with systemic absorption of silver as Ag are low.

To create an osteoconductive titanium alloy, a new process route was applied. It consists of an immersion of Ti-6Al-4V in alkaline solution and a further heat treatment, followed by the immersion in a  $\text{PdCl}_2$  or  $\text{AgCl}$ -containing baths. The obtained surface morphologies were optimized by the growth of porous sodium titanate layer. It was observed that the formation of HA and calcium phosphate hydrate was induced after 3 h immersion in ACM1 and ACM2 baths. The structure and morphology of the so-formed layers were characterized using several techniques.

These experimental treatments allowed producing cytocompatible materials potentially applicable to manufacture implantable devices for orthopedic and oral surgeries.

### Materials and Methods

The samples were cut from a bar of commercially available Ti-6Al-4V ELI titanium alloy (chemical composition in wt.%: C, 0.013; Fe, 0.16; N, 0.014;  $\text{H}_2$ , 0.006; O, 0.11; Al, 6.05; V, 4.0; Ti, bal.). The specimens of 20 mm diameter and 1.5 mm thickness were abraded with SiC abrasive papers 240, 400, 1000, 2500, 4000 and polished to mirror with non-crystallizing colloidal silica suspension; then cleaned by successive ultrasonic treatments in acetone, ethanol and distilled water for 30 min. After mechanical polishing, the substrates were etched for 10 min in Kroll solution's reagent, a mixture of 0.045 M HF and



0.058 M  $\text{HNO}_3$ , at room temperature. The specimens were rinsed with distilled water and dried at 40 °C in an electric oven.

To form the sodium titanate hydrogel layer on the Ti-6Al-4V surface, the samples were dipped into a NaOH 10 M solution at 60 °C for 24 h and then thermally treated at 630 °C for 1 h with a heating rate of 5 °C/min.

To produce Ca-P coatings, the pre-treated specimens were soaked in two baths containing calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) and phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) and either palladium chloride ( $\text{PdCl}_2$ , ACM1) or silver chloride ( $\text{AgCl}$ , ACM2) under magnetic stirring for 3 h at  $(80 \pm 2)$  °C and pH  $5.3 \pm 0.1$ .  $\text{CaCl}_2$  acted as the source of calcium, while  $\text{H}_3\text{PO}_4$  served as a source of phosphate. The molar Ca/P ratio was 1.67. Then, the samples were cleaned in distilled water and dried in environmental conditions.

To evaluate the in vitro formation of Ca-P, the samples were soaked in simulated body fluid (SBF) solution at pH 7.4 using a buffer solution consisting of Tris hydroxymethylaminomethane and HCl, at body temperature (37 °C).<sup>27</sup> Ion concentrations of SBF solution and human blood plasma are shown in Table 2.

The change in Ca and P concentrations after 2, 4, 7 d soaking periods of samples was analyzed using the UV-Visible spectroscopy and Lambda 950 UV/VIS spectrometer (Perkin Elmer). After soaking, the specimens were washed with distilled water and dried at room temperature.

The Ca-P coatings were analyzed by X-ray diffraction (XRD) using a Bruker D5000 diffractometer equipped with a quartz monochromator and Cu  $\text{K}\alpha$  radiation ( $\lambda = 0.15406$  nm). Diffraction scans were recorded in the 20–60° angular range with a 0.03° 2 $\theta$ -step and a counting time of 4 s.

Scanning electron microscopy (SEM) observations of the coating morphologies were performed using a JEOL6700F equipped with an Energy Dispersive X-ray spectrometer (EDS-X). Images were recorded at 3 kV and EDS-X analysis at 10 kV on  $10 \times 10$  mm<sup>2</sup> area and repeated three times at least.

The coated layers of samples ACM1 and ACM2 were scratched and collected on a microscope copper grid. Transmission electron

**Table 2.** Ion concentrations of SBF

	Concentrations of ions, mM								
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	pH
Plasma body human	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5	7.2-7.4
SBF (type c)	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5	7.4

microscope images (TEM) were recorded using a TOPCON 002B transmission electron microscope operating at 200 kV and equipped with a CCD camera and an EDS-X to analyze the chemical composition.

Human osteosarcoma cells (MG63, ATCC: CRL-1427) were cultivated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modification Minimal Essential Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Lonza) and 1% penicillin-streptomycin. When the cells reached 85–90% confluence, they were detached by trypsin/EDTA (EDTA, Sigma-Aldrich), harvested and used for experiments.

Round specimens (15 mm diameter) were placed into 12 multi well plates (CellStar, PBI International); 2 × 10<sup>4</sup> cells/sample were seeded directly onto the surfaces of each specimen in a low volume of medium (200 µl) and allowed to adhere for 4 h prior to adding 2 ml of fresh medium to each well; plates were then incubated for 24 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Afterwards, the cell viability was evaluated with the (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric assay (MTT, Sigma-Aldrich). Briefly, 100 µl of MTT solution (3 mg/ml in phosphate buffered saline [PBS]) were added to each sample and incubated 4 h in the dark at 37 °C; afterwards, formazan crystals were solved with 100 µl of dimethyl sulphonyde (DMSO, Sigma) and 50 µl were collected and centrifuged to remove eventually debris. Surnatants optical density (o.d.) was evaluated at 570 nm with a spectrophotometer (Spectra Count, Packard Bell). Uncoated titanium o.d. was used as a control and considered as 100% cell viability while coated samples (named ACM1 and ACM2) viability was calculated as follows: (sample o.d. / titanium control o.d.) × 100. Experiments were performed 6 times for controls and each different coating.

Furthermore, the immunofluorescence staining was performed in order to investigate the cells morphology after 24 h of adhesion onto the biomaterials surface. Cells were fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde at room temperature (RT) and then washed 3 times with PBS. Phalloidin (rhodamine B tetramethylisothiocyanate, 1/2000 in PBS, AbCam) solution was added for 45 min (RT) in order to investigate cells cytoskeleton. Afterwards, the samples were washed 3 times with PBS and

co-stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich). The cells morphology was optically evaluated using a fluorescence microscope (Leica AF 6500, Leica Microsystems).

Serum free DMEM was incubated without cells for 1 wk at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in direct contact with controls or coated samples in a ratio of 2 ml/specimens for a total of 10 ml/specimen. Afterwards, eluates were collected, supplemented with 10% FBS and used to cultivate MG63. Cells were seeded in a defined number (2 × 10<sup>4</sup> /well) into 24 wells plates (Cell Star, PBI International) and cultivated for 24 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Afterwards, the cell viability was evaluated by the 3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide colorimetric assay (MTT, Sigma) as described for the direct cytocompatibility assay.

SEM was used to investigate the morphology of cells seeded directly onto the specimens' surface. Briefly, after fixing, dehydration with the ascendant ethanol scale (70%, 80%, 90%, 100%), and hexamethyldisilazane, the specimens were mounted on aluminum stubs, using a conductive carbon tape, coated with a thin carbon layer (10 nm) and observed with a StereoScan 360 SEM (AbCam) at 10 kV with various magnifications, using secondary electrons.

Furthermore, the cells morphology was visually investigated after one week of cultivation by light microscopy (Leica AF 6500, Leica Microsystems).

Statistical analysis was done using Levene's test and ANOVA one-ways followed by Sheffè's post-hoc test using IBM® SPSS® Statistics 20 (IBM).

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

#### Acknowledgments

This work was supported by CAMPUS FRANCE-Centre français pour l'accueillir les échanges internationaux in the frame PHC IMHOTEP No. 25639NH and 20729TH. The authors take pleasure in acknowledging Guy Schmerber, Dris Ihiawakrim, Jacques Faerber for XRD, TEM, and SEM characterization respectively.

#### References

- Liu X, Chu PK, Ding C. *Mater Sci Eng Rep* 2004; 47:49-121; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mser.2004.11.001>
- Brånemark P-I. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent* 1983; 50:399-410; PMID:6352924; [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3913\(83\)80101-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3913(83)80101-2)
- Surowska B, Bienias J. *J Achiev. Mater.Manuf. Eng* 2010; 43:162-9
- Dorozhkin SV. *J Mater Sci* 2007; 42:1061-95; <http://dx.doi.org/10.1007/s10853-006-1467-8>
- Rosu RA, Serban VA, Bucur AL, Dragos U. Deposition of titanium nitride and hydroxyapatite-based biocompatible composite by reactive plasma spraying. *Applied Surface Science* 2012; 258:3871-6; <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.12.049>
- De Groot K, Geesink R, Klein CP, Serekian P. Plasma sprayed coatings of hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 1987; 21:375-81; <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.820211203>
- Carradó A. Structural, microstructural, and residual stress investigations of plasma-sprayed hydroxyapatite on Ti-6Al-4 V. *ACS Appl Mater Interfaces* 2010; 2:561-5; PMID:20356205; <http://dx.doi.org/10.1021/am900763j>
- Kokubo T. Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. *Acta Mater* 1998; 46:2519-27; [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6454\(98\)80036-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6454(98)80036-0)
- Barrère F, Layrolle P, van Blitterswijk CA, de Groot K. Biomimetic calcium phosphate coatings on Ti6Al4V: a crystal growth study of octacalcium phosphate and inhibition by Mg<sup>2+</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. *Bone* 1999; 25(Suppl):107S-11S; PMID:10458288; [http://dx.doi.org/10.1016/S8756-3282\(99\)00145-3](http://dx.doi.org/10.1016/S8756-3282(99)00145-3)
- Wen HB, de Wijn JR, Cui FZ, de Groot K. Preparation of bioactive Ti6Al4V surfaces by a simple method. *Biomaterials* 1998; 19:215-21; PMID:9678870; [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00232-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00232-9)

11. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *J Biomed Mater Res* 1996; 32:409-17; PMID:8897146; [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199611\)32:3<409::AID-JBM14>3.0.CO;2-B](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199611)32:3<409::AID-JBM14>3.0.CO;2-B)
12. Takeuchi M, Abe Y, Yoshida Y, Nakayama Y, Okazaki M, Akagawa Y. Acid pretreatment of titanium implants. *Biomaterials* 2003; 24:1821-7; PMID:12593964; [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00576-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00576-8)
13. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment. *J Mater Sci Mater Med* 1997; 8:341-7; PMID:15348733; <http://dx.doi.org/10.1023/A:1018524731409>
14. Nishiguchi S, Kato H, Fujita H, Oka M, Kim H-M, Kokubo T, Nakamura T. Titanium metals form direct bonding to bone after alkali and heat treatments. *Biomaterials* 2001; 22:2525-33; PMID:11516085; [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00443-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00443-9)
15. Kokubo T, Miyaji F, Kim HM, Nakamura T. Spontaneous Formation of Bonelike Apatite Layer on Chemically Treated Titanium Metals. *J Am Ceram Soc* 1996; 79:1127-9; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1151-2916.1996.tb08561.x>
16. Kokubo T. Formation of biologically active bonelike apatite on metals and polymers by a biomimetic process. *Thermochim Acta* 1996; 280-281:479-90; [http://dx.doi.org/10.1016/0040-6031\(95\)02784-X](http://dx.doi.org/10.1016/0040-6031(95)02784-X)
17. Liu Y, Hunziker EB, Randall NX, de Groot K, Layrolle P. Proteins incorporated into biomimetically prepared calcium phosphate coatings modulate their mechanical strength and dissolution rate. *Biomaterials* 2003; 24:65-70; PMID:12417179; [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00252-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00252-1)
18. Wang CX, Zhou X, Wang M. Mechanism of apatite formation on pure titanium treated with alkaline solution. *Biomed Mater Eng* 2004; 14:5-11; PMID:14757948
19. Tanahashi M, Matsuda T. Surface functional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid. *J Biomed Mater Res* 1997; 34:305-15; PMID:9086400; [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19970305\)34:3<305::AID-JBM5>3.0.CO;2-O](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19970305)34:3<305::AID-JBM5>3.0.CO;2-O)
20. Leonor IB, Reis RL. An innovative auto-catalytic deposition route to produce calcium-phosphate coatings on polymeric biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 2003; 14:435-41; PMID:15348447; <http://dx.doi.org/10.1023/A:1023214918592>
21. Oliveira JM, Leonor IB, Reis RL. Carboxymethylchitosan/calcium phosphate, hybrid materials prepared by an innovative "auto-catalytic" co-precipitation method. *Key Eng Mater* 2005; 284:203-6; <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.284-286.203>
22. Oliveira JM, Costa SA, Leonor IB, Malafaya PB, Mano JF, Reis RL. Novel hydroxyapatite/carboxymethylchitosan composite scaffolds prepared through an innovative "autocatalytic" electroless coprecipitation route. *J Biomed Mater Res A* 2009; 88:470-80; PMID:18306322; <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.31817>
23. Yamaguchi S, Takadama H, Matsushita T, Nakamura T, Kokubo T. *J Ceram Soc Jpn* 2009; 117:1126-30; <http://dx.doi.org/10.2109/jcersj2.117.1126>
24. Wei M, Kim HM, Kokubo T, Evans JH. *Mater Sci Eng C* 2002; 20:125-34; [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00022-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00022-X)
25. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol* 2010; 28:580-8; PMID:20724010; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.006>
26. Lansdown AB. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. *Adv Pharmacol Sci* 2010; 2010:910686; PMID:21188244; <http://dx.doi.org/10.1155/2010/910686>
27. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 2006; 27:2907-15; PMID:16448693; <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>

e28534-8

Biomatter

Volume 4

## Conclusions

Dans ce chapitre, les bains aqueux dont les compositions ont été donnés par Reis et al., ont été utilisés pour déposer du phosphate de calcium sur la surface de titanate de sodium. Les résultats ont indiqué que :

- dans le bain acide, un dépôt de phosphate de calcium contenant de l'apatite est formé sur la couche de titanate de sodium. Toutefois, ce dépôt contient de la fluorine et a montré une faible bioactivité dans le SBF.

- dans le bain alcalin, le dépôt de Ca-P est faible, et la bioactivité dans le SBF est identique à celle du bain acide.

- dans le bain oxydant, seul le bain utilisant l'AgCl peut donner du dépôt de Ca-P mais ce dépôt n'est pas stable après 1 à 2 semaine(s) dans SBF. Aucune croissance de phosphate de calcium n'est observée ensuite.

La viabilité cellulaire des échantillons ayant subi le traitement par les bains « autocatalytiques » de Reis et al. est plus faible que celle du titanate de sodium. Cela signifie que ces bains autocatalytiques ne fonctionnent pas.

Toutefois, par une légère modification de la composition du bain acide dans lequel le fluorure de sodium et le réducteur sont enlevés, un dépôt de Ca-P stable dans le SBF a été obtenu. Une croissance d'apatite homogène dans SBF est observée après 2 à 7 jours. La non cytotoxicité du dépôt est confirmée par le test de viabilité cellulaire utilisant des ostéoblasts MG63. Dans ce bain modifié, l'AgCl a été aussi utilisé pour remplacer PdCl<sub>2</sub> afin d'obtenir des propriétés antibactériennes.

## Références

1. Leonor IB, Reis RL. An innovative auto-catalytic deposition route to produce calcium–phosphate coatings on polymeric biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 2003;14(5):435–41.
2. Oliveira JM, Leonor IB, Reis RL. Preparation of bioactive coatings on the surface of bioinert polymers through an innovative auto-catalytic electroless route. *Key Eng Mater*. 2005;284:203–6.
3. Oliveira JM, Costa SA, Leonor IB, Malafaya PB, Mano JF, Reis RL. Novel hydroxyapatite/carboxymethylchitosan composite scaffolds prepared through an innovative “autocatalytic” electroless coprecipitation route. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Feb;88A(2):470–80.
4. Le VQ, Pourroy G, Cochis A, Rimondini L, Abdel-Fattah WI, Mohammed HI, et al. Alternative technique for calcium phosphate coating on titanium alloy implants. *Biomatter*. 2014 Mar 19;4(1):e28534.
5. Lide DR, editor. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 90th Edition. 90th ed. CRC Press; 2009. 2804 p.
6. Bloch-Frankenthal L. The role of magnesium in the hydrolysis of sodium pyrophosphate by inorganic pyrophosphatase. *Biochem J*. 1954 May;57(1):87–92.
7. Kokubo T, Kim H-M, Miyaji F, Takadama H, Miyazaki T. Ceramic–metal and ceramic–polymer composites prepared by a biomimetic process. *Compos Part Appl Sci Manuf*. 1999 Apr;30(4):405–9.
8. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nishiguchi S, Nakamura T. Graded surface structure of bioactive titanium prepared by chemical treatment. *J Biomed Mater Res*. 1999 May;45(2):100–7.
9. Kim H-M, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Apatite-forming ability of alkali-treated Ti metal in body environment. *J Ceram Soc Jpn*. 1997 Sep 11;105(2):111–6.
10. Kokubo T. Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. *Acta Mater*. 1998;46(7):2519–27.
11. Park H, Choi W. Effects of TiO<sub>2</sub> Surface Fluorination on Photocatalytic Reactions and Photoelectrochemical Behaviors. *J Phys Chem B*. 2004 Apr;108(13):4086–93.
12. Subbarao SN, Yun YH, Kershaw R, Dwight K, Wold A. Electrical and optical properties of the system TiO<sub>2</sub>-xFx. *Inorg Chem*. 1979;18(2):488–92.
13. Yu JC, Yu, Ho, Jiang, Zhang. Effects of F- Doping on the Photocatalytic Activity and Microstructures of Nanocrystalline TiO<sub>2</sub> Powders. *Chem Mater*. 2002 Sep;14(9):3808–16.
14. Wang CM, Mallouk TE. Wide-range tuning of the titanium dioxide flat-band potential by adsorption of fluoride and hydrofluoric acid. *J Phys Chem*. 1990;94(10):4276–80.
15. Minero C, Mariella G, Maurino V, Pelizzetti E. Photocatalytic Transformation of Organic Compounds in the Presence of Inorganic Anions. 1. Hydroxyl-Mediated and Direct Electron-Transfer Reactions of Phenol on a Titanium Dioxide–Fluoride System. *Langmuir*. 2000 Mar;16(6):2632–41.
16. Le VQ, Cochis A, Rimondini L, Pourroy G, Stanic V, Palkowski H, et al. Biomimetic calcium–phosphates produced by an auto-catalytic route on stainless steel 316L and bio-inert polyolefin. *RSC Adv*. 2013 Jun 24;3(28):11255–62.



## **Conclusions et perspectives**



## Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse est basé sur une problématique scientifique, sociétale et industrielle, portant sur l'amélioration de la méthode de production des revêtements d'apatites des prothèses dentaires pour améliorer l'ostéointégration de l'implant. La méthodologie que nous avons développée a pour but de remplacer des techniques telles que le sablage, ou les méthodes de projection plasma d'apatites sur substrats métalliques. Notre objectif était, d'une part, d'explorer une nouvelle méthodologie – qui a donné lieu à un brevet – ainsi que d'optimiser les paramètres physico-chimiques pour obtenir des dépôts avec les meilleures propriétés biologiques et mécaniques.

Nous avons obtenu des dispositifs Ti-6Al-4V/titanate de sodium/Ca-P avec de bonnes propriétés de croissance cellulaire et de cohésion mécanique entre les couches. Ces Ca-P ont été élaborés par voie de « chimie douce » à faible température.

Dans un premier temps, la surface des implants d'alliage Ti-6Al-4V a été modifiée par des traitements mécaniques, chimiques et thermiques. Dans un deuxième temps, le Ca-P a été déposé sur cette surface par la voie sol-gel en utilisant deux techniques, le trempage (dip-coating) et la tournette (spin-coating), et par la voie « autocatalytique », en utilisant les bains de Reis modifiés.

### Traitement mécanique-chimique-thermique

Les substrats en Ti-6Al-4V ont tout d'abord été polis avec des papiers abrasifs de graduation #120 à #4000, puis en utilisant de la silice colloïdale, pour obtenir une surface dite « polie miroir ». Ils ont ensuite été traités avec une solution acide HF-HNO<sub>3</sub> (solution Kroll) pour obtenir une surface parfaitement lisse et propre. Le temps optimal pour le traitement Kroll est de 3 min, à température ambiante.

Puis, les substrats ont été soumis à un traitement alcalin dans une solution de NaOH de concentrations 5 ou 10 M, à des températures de 60 ou 80°C pendant 24 ou 72 h. Ils ont ensuite été traités thermiquement à une température de 630°C pendant 1 h avec une montée de 5°C/min. Une couche poreuse a été obtenue. Ces pores forment des alvéoles avec des parois relativement fines et plates, s'apparentant à la structure naturelle d'un os spongieux. Une couche poreuse, uniforme et sans fissure s'est formée dans le cas de la solution NaOH 5 M. Cependant, lorsque les échantillons ont été traités avec la solution NaOH 10 M, des fissures sont apparues. À cause du traitement thermique, la morphologie du titanate de sodium s'est légèrement modifiée par rapport à sa morphologie avant le traitement thermique. La couche de titanate de sodium est cristallisée grâce au traitement thermique.

La DRX et les microscopies électroniques ont montré que la couche contient du titanate de sodium Na<sub>2</sub>Ti<sub>6</sub>O<sub>13</sub> et du rutile TiO<sub>2</sub>. La couche la plus poreuse et la plus uniforme est obtenue par un



traitement de 72 h dans une solution NaOH de concentration 5 M à 60 ou à 80°C. Cependant, nous avons choisi par la suite une solution NaOH 10 M pendant 24 h pour avoir un traitement plus court avec une couche d'épaisseur suffisante, en vue d'une application industrielle.

#### **Dépôt de Ca-P sur le titanate de sodium obtenu par la voie sol-gel**

La solution sol-gel de Ca-P a été préparée avec un mélange de phosphite de triéthyle et de nitrate de calcium tétrahydraté dans l'éthanol. Dans le cas du trempage, l'échantillon a été plongé dans la solution sol-gel de Ca-P et retiré verticalement à la vitesse de 40 mm/min ; dans le cas de la tournette, des gouttes de solution sol-gel ont été déposées sur la surface de l'échantillon, qui a été ensuite soumis à une rotation, à la vitesse de 3000 tr/min pendant 30 s. L'échantillon a été ensuite chauffé à 600°C pendant 20 min. Une répétition d'une à trois fois de ce procédé a été réalisée pour augmenter l'épaisseur du dépôt de Ca-P.

Par MET, spectroscopie Raman et DRX, la présence d'apatite ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) ainsi que de titanate de calcium ( $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ ), formé par réaction entre le titanate de sodium et le Ca-P, ont été identifiés. Le titanate de calcium montre que l'adhésion chimique du dépôt au substrat est bien établie.

Le test de nanorayure avec un nano-indenteur sphérique de diamètre 10  $\mu\text{m}$  et une charge appliquée de 10 à 100 mN sur les différents dépôts a été réalisé pour les dépôts de Ca-P obtenus par la voie sol-gel. Ce test indique que ces dépôts adhèrent bien sur la couche de titanate de sodium. En effet, le revêtement ne se décolle pas suite au rayage par le nano-indenteur avec une charge de 100 mN.

Les comportements mécaniques des échantillons TT (Ti-6Al-4V/titanate de sodium) et de TS-HA1 (Ti-6Al-4V/titanate de sodium/Ca-P tournette 1 fois) ne sont pas très différents parce que le film d'HA sur l'échantillon TS-HA1 est très mince. Le test de nano indentation a encore montré que la couche du TS-HA2 (Ti-6Al-4V/titanate de sodium/Ca-P tournette 2 fois) était compacte après le passage de l'indenteur et la dureté du film sur TS-HA2 était plus importante que celle de TT et TS-HA1. La couche de Ca-P de l'échantillon TD-HA2 (Ti-6Al-4V/titanate de sodium/Ca-P trempage 2 fois) est rugueuse et assez épaisse, tandis que les couches de Ca-P des échantillons TS-HA1 et TS-HA2 sont plus lisses et plus minces.

Quand la charge est appliquée, la couche de Ca-P est écrasée et déformée plastiquement. Dans le cas de l'échantillon de trempage, le dépôt de Ca-P est moins compact, plus épais et rugueux, et s'enlève facilement en laissant un profil résiduel de la rayure après le test.

Le test de viabilité cellulaire utilisant des ostéoblastes MG-63 nous a permis de montrer que le dépôt de Ca-P par voie sol-gel est approprié pour la viabilité des ostéoblastes. La valeur de la viabilité cellulaire sur le dépôt de Ca-P pour tous les échantillons est plus élevée que celle de l'échantillon de titanate de sodium simple. Par exemple, les tests d'évaluation de cyto compatibilité directe (MTT) après 7 jours ont montré une différence statistique significative entre des valeurs d'échantillons TT comparées

au contrôle (Ti-6V-4Al) et les TD-HA2 et TS-HA3. Ceci pourrait être lié à la capacité de plusieurs couches de Ca-P à protéger des cellules du contact direct avec le titanate de sodium.

Pour la bioactivité *in vitro* des dépôts de Ca-P, nous avons observé une croissance de Ca-P dans une solution simulant le fluide corporel (SBF) après une durée de 1 à 4 semaine(s). De plus, l'analyse de la variation du calcium et du phosphore dans le bain montre que la croissance de Ca-P sur ces implants se produit au bout de 2 jours. Cela veut dire que les ions  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  de la solution SBF se déposent sur la surface des implants pour former une couche homogène de Ca-P de plus en plus épaisse, comme dans le cas d'une croissance osseuse.

#### **Dépôt de Ca-P sur le titanate de sodium obtenu par les bains autocatalytiques**

Parallèlement, un dépôt de Ca-P sur la couche de titanate de sodium a été réalisé dans trois bains différents portés à une température comprise entre 60 et 80°C : un bain oxydant à pH 7, un bain acide à pH 5,3 ou un bain alcalin à pH 9,2. Ces trois bains contiennent du chlorure de palladium ( $\text{PdCl}_2$ ) et ont été appelés « autocatalytique » par Reis. Nous avons pris une nouvelle direction en remplaçant le catalyseur  $\text{PdCl}_2$  par l'AgCl dans tous les bains « autocatalytiques », avons modifié la composition et réalisé une comparaison entre les dépôts formés. Nous avons utilisé l'AgCl en raison de ses propriétés antibactériennes.

Les bains acides ont la capacité de déposer du Ca-P sur le titanate de sodium mais ce dépôt contient de la fluorine ( $\text{CaF}_2$ ). Cependant, le dépôt de Ca-P obtenu par les bains alcalins et oxydants est très faible.

La bioactivité *in vitro* des échantillons ayant subi des bains de Reis et al. (AC1-Pd, ALK1-Pd et OXY-Pd) ainsi que ceux-ci utilisant AgCl (AC1-Ag, ALK1-Ag et OXY-Ag) est faible. Même si le dépôt de Ca-P en bains acides est stable, aucune croissance de Ca-P n'est détectée après 1 à 2 semaine(s) d'immersion dans SBF. De plus, la cytotoxicité des échantillons de titanate de sodium est diminuée après le traitement par les bains de Reis et al.

En revanche, pour les bains acides modifiés (ACM1 et ACM2) sans NaF ni  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ , une distribution homogène de Ca-P a été établie par des observations au MEB/EDS-X. Toutefois, les pics de phosphate de calcium ne sont pas détectés par analyse en DRX. Le dépôt de Ca-P a stimulé la formation d'une couche homogène de HA après l'immersion dans le SBF pendant 1 semaine. Ce dépôt a complètement recouvert le substrat Ti-6Al-4V. Le test de viabilité cellulaire a indiqué que ces deux bains modifiés peuvent donner un dépôt de Ca-P non-toxique pour des ostéoblastes humains. La viabilité cellulaire de ces échantillons est toujours supérieure de 95 à 98 % par rapport à la celle de l'échantillon de contrôle. Ceci a donné lieu à une publication sur Biomatter (Chapitre 5, §5.2).

Par ailleurs, nous avons pour la première fois testé les bains « autocatalytiques » de Reis et al. pour le développement de surface bioactive sur des composants du sandwich 316L/Polypropylène-Polyéthylène. Dans ce cas, un dépôt de phosphate de calcium est obtenu sur la surface de ces deux

composants. La viabilité cellulaire des échantillons ayant subi un bain « autocatalytique » est toujours plus élevée que celle de l'échantillon de même matériel sans dépôt. Le nombre de cellules est toujours supérieur après 48 et 72 h de culture cellulaire. Alors, nous pouvons confirmer que les bains « autocatalytiques » de Reis et al. fonctionnent bien pour les substrats en polymère et en acier inoxydable (manuscrit RSC Advances, Chapitre 5, §5.1.3), mais ils ne sont pas très efficaces sur le titanate de sodium, sauf si on les modifie pour les bains ACM1 et ACM2.

### Perspectives

Les méthodes proposées sont une solution peu coûteuse, fiable, et utilisable à l'échelle industrielle. La couche de phosphate de calcium ainsi que le titanate de sodium obtenus dans cette étude peuvent être imprégnés par des agents actifs comme un ou plusieurs agent(s) antibactérien(s) (par exemple les ions  $Ag^+$ , le Furanone contre le *Staphylococcus epidermidis* et le *Staphylococcus aureus* et/ou une ou plusieurs hormones de croissance (TGF- $\beta$ 1) et l'hormone parathyroïde (PTH) et la prostaglandine E2 (PGE2)).

Ce travail de thèse devrait se poursuivre par les études suivantes :

- pour les implants obtenus par voie sol-gel, il faudrait envisager de réaliser des expériences de tribologie classique, type pion sur disque en milieu liquide, pour évaluer la résistance à l'usure et identifier l'endommagement causé par un chargement cyclique de fatigue en vue d'une application future en implantologie.

- pour les implants obtenus par les nouveaux bains chimiques (ACM1 et ACM2), il faudrait vérifier l'adhésion du dépôt sur le substrat par un test mécanique et bien démontrer les mécanismes mis en jeu.

De plus, d'un point de vue des applications industrielles du dépôt, des travaux de la stabilité du dépôt de phosphate de calcium en milieu physiologique avec la présence d'enzyme comme le corps vivant devra également être vérifié.

Enfin, ce travail de thèse a participé au développement des techniques de dépôt pour obtenir un revêtement de phosphate de calcium bioactif sur les implants de titane.

## Conclusions and perspectives

This thesis is based on scientific, social and industrial issues, concerning the improvement of apatite coating production methods for dental implant to improve their osteointegration.

Our objective was to explore a new methodology aiming to replace the techniques such as sandblasting or apatite thermal spraying methods on metallic substrates and to optimize the physical-chemical parameters to obtain coatings with better biological and mechanical properties.

We obtained Ca-P /sodium titanate/ Ti-6Al-4V devices with good cell viability properties as well as good cohesion between the substrate and coating. Ca-P coatings were elaborated by chemical route called "chimie douce" at low temperature. The implant surface based on Ti-6Al-4V alloy was modified by mechanical, chemical and heat treatments; then, a Ca-P layer was deposited onto metal surface by two ways by (i) sol-gel route using two techniques, dip and spin coating, and (ii) "autocatalytic" route using modified baths of Reis.

### Mechanical-chemical-heat treatment

Ti-6Al-4V substrates were firstly polished with SiC abrasive papers from #120 to #4000, and then mirror polished with non-crystallizing colloidal silica suspension. Afterwards, the substrates were etched in Kroll solution's reagent. The optimal time for Kroll treatment is about 3 min at room temperature. To form the sodium titanate hydrogel layer on the Ti-6Al-4V surface, the samples were dipped into a NaOH 5 or 10 M solution at 60 or 80 °C for 24 or 72 h and then thermally treated at 630 °C for 1 h with a heating rate of 5 °C/min. A crystallized sodium titanate layer was obtained made of alveolus with fine and flat walls, similar to the natural spongy structure of a bone. A uniform layer without crack was built for 5 M NaOH solution; while using 10 M NaOH solution, some cracks appeared. No delamination was detected using cross section observations.

XRD and electron diffraction showed that the layer contains sodium titanate ( $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$ ) and rutile ( $\text{TiO}_2$ ). The most porous and uniform layer was obtained by a 72 h treatment in a solution NaOH 5 M NaOH at 60 or 80 °C. However, to treat Ti-6Al-4V substrates, we chose 10 M NaOH solution at 60°C during 24 h in the next studies, to have a shorter processing time with a layer thick enough in view of an industrial application

### Ca-P coating obtained by sol-gel route

To produce Ca-P coatings on the pre-treated specimens a Ca-P sol-gel solution was prepared with a mixture of triethyl phosphite and calcium nitrate tetrahydrate in ethanol. Concerning the dip coating, the sample was plunged into the sol-gel solution and withdrawn at a speed of 40 mm/min; regarding the

spin coating, some drops of sol-gel solution were deposited onto the pre-treated surface and submitted to a rotation of 3000 tr/m during 30 s. The samples were then heated at 600°C during 20 min. A repetition from 1 to 3 times was carried out in order to increase the thickness of Ca-P coating. By TEM, Raman spectroscopy and XRD analyses, apatite ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) as well as calcium titanate ( $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ ) were detected. The latter was formed by reactions between the sodium titanate and Ca-P and improves the chemical adhesion between coating and substrate.

Nanoindentation tests were carried out using a spherical nano-indenter with a 10  $\mu\text{m}$  diameter tip and an applied load from 10 to 100 mN onto different coatings. SEM observations of residual grooves on Ca-P layers after the scratch with a maximal load of 100 mN showed the good adhesion of all Ca-P coatings onto the substrate which was confirmed because no delamination was observed along the scratch line.

The mechanical behaviour of TT sample (Ti-6Al-4V/sodium titanate) and TS-HA1 samples (Ti-6Al-4V/sodium titanate/Ca-P spin coating once) was not different because the Ca-P was so thin. Regarding TS-HA2 sample (Ti-6Al-4V/sodium titanate/Ca-P spin coating twice) Ca-P layer was thicker and more compact than TS-HA1 layer after the indentation. We can hypothesize that the grooves have been filled by the second deposition of Ca-P. Therefore, the Ca-P coating of TS-HA2 sample seems more compact than the TS-HA1 one. We can also assume as a hypothesis that Ca-P coating of TD-HA2 sample (Ti-6Al-4V/titanate de sodium/Ca-P dip coating twice) was rougher and thicker compared to Ca-P coating of TS-HA1 and TS-HA2 samples.

The cell viability assay using osteoblasts MG63 showed that the Ca-P coating by sol-gel route is appropriated for osteoblasts viability. The value of cell viability onto the Ca-P coating of all samples is higher than one with sodium titanate (TT sample). For example, the direct cytocompatibility test (MTT) after 7 days showed a significant statistic difference between the value of TT sample compared with the control one (Ti-6Al-4V) and the TD-HA2 and TS-HA3. This could be due to the protection ability of several Ca-P layers from the direct contact with sodium titanate.

As to the *in vitro* bioactivity of Ca-P coatings, we observed Ca-P growth in a simulated body fluid (SBF) solution after 1 to 4 week(s). In addition, calcium and phosphorus concentration in SBF solution showed that the Ca-P growth was carried out after two days. It means that  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  ions in SBF solution were deposited onto the pretreated surface to form a thick Ca-P layer, like in the case of bone growth.

#### **Ca-P coating by autocatalytic baths**

At the same time, Ca-P was coated onto the sodium titanate layer by three different baths at temperatures between 60 and 80 °C, an oxidant bath at pH 7, an acidic bath at pH 5.3 or an alkaline bath at pH 9.2. These three baths contain palladium chloride ( $\text{PdCl}_2$ ) and were called “autocatalytic” by Reis

et al. We replaced PdCl<sub>2</sub> by AgCl in all autocatalytic baths and modified their composition and effectuated a comparison between the formed coatings.

The acidic baths had the ability to form a Ca-P coating onto the sodium titanate layer; however, calcium fluoride was always present on the Ca-P coating. For alkaline and oxidant baths, the Ca-P layer was so thin.

The amount of Ca-P produced *in vitro* bioactivity (SBF) on samples treated by Reis's baths (AC1-Pd, ALK1-Pd and OXY-Pd) as well as the ones using AgCl (AC1-Ag, ALK1-Ag and OXY-Ag) was weak. The Ca-P coating obtained by acid baths is stable but no growth of Ca-P was detected after 1 to 2 week(s) in SBF. Nevertheless, the cytotoxicity of sodium titanate decreased after a treatment by Reis's autocatalytic baths.

On the contrary, regarding modified baths (without NaF and NaH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>), a homogeneous Ca-P layer was detected onto sodium titanate by SEM/EDS-X analyses. However, Ca-P peaks were not detected by XRD. These Ca-P layers produced by the modified bath, – after one week in SBF-, stimulated the formation of a homogeneous Ca-P. This coating was uniformly deposited onto Ti-6Al-4V substrates. It was stable and its bioactivity was identified after 48 h in SBF. The cell viability tests showed that both alkaline and acid baths gave a biocompatible Ca-P layer for osteoblasts. Their cell viability was higher than 95 to 98% compared to the control. We published these results in the review Biomatter (Chapter 5, §5.2).

In this study, we have also applied for the first time Reis' autocatalytic baths test to develop the bioactive surface of two components of sandwich structure: stainless steel (316L) and polymer (Polypropylene -Polyethylene). Ca-P coating was obtained onto the surface of these structures. The cell viability of the samples treated with acid autocatalytic bath is equal or higher than the one of control sample. The number of cell always increased after 48 and 72 h of cultivation. So we can say that the Reis's autocatalytic baths succeeded for polymers and stainless steel (the results were published on RSC Advanced, chapter 5, §5.1.3).

### Perspectives

The methods proposed in this thesis are less expensive, reliable and usable in industrial applications. The Ca-P layer, as well as sodium titanate allow to be soaked with active silver as antibacterial system (for example Ag<sup>+</sup> ion) or Furanone against *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* and/or one or several growth hormone (TGF-β1) and parathyroid hormone (PTH) and prostaglandin E2 (PGE2)).

This work should be continued with the following studies:

- Classical pin on disk wear experiments with steel or ceramic spherical tips could be conducted in liquid environment (SBF) at constant temperature (37°C) in order to evaluate first the wear resistance as a function of the contact pressure and the sliding velocity, and also to identify damage (cracks or delamination) caused by cyclic loading and superficial fatigue. For the implants, it is important to verify

the adhesion studies of Ca-P coating (obtained by new chemical baths) onto the substrate by an adhesion test

Additionally, from the point of view of the industrial applications, the study of stability of Ca-P coating in the physiological environment with the presence of the enzyme as the living body will be also verified.

Finally, this thesis participated in the development of the coating technique to obtain a bioactive Ca-P revetment onto titanium alloy implants.

## **Annexe**





## Annexe. Porosité de la couche de titanate de sodium sur Ti-6Al-4V après un traitement alcalin-thermique

Nous avons évalué le taux de porosité de la surface des échantillons préparés dans le Chapitre 3, §3.2 en utilisant le logiciel de traitement d'images, ImageJ. La méthode de mesure est présentée dans le Chapitre 2, §2.3.14. Nous avons mesuré la taille moyenne de tous les trous de la couche de titanate de sodium visibles sur les images MEB de grossissement x12000. Pour cela, nous avons d'abord choisi deux régions de  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  sur chaque échantillon. Ensuite, nous avons mesuré la taille de tous les trous dans ces régions. Le nombre de trous par région a été compté. Enfin, la porosité a été calculée comme le pourcentage de la superficie des trous par unité de surface.

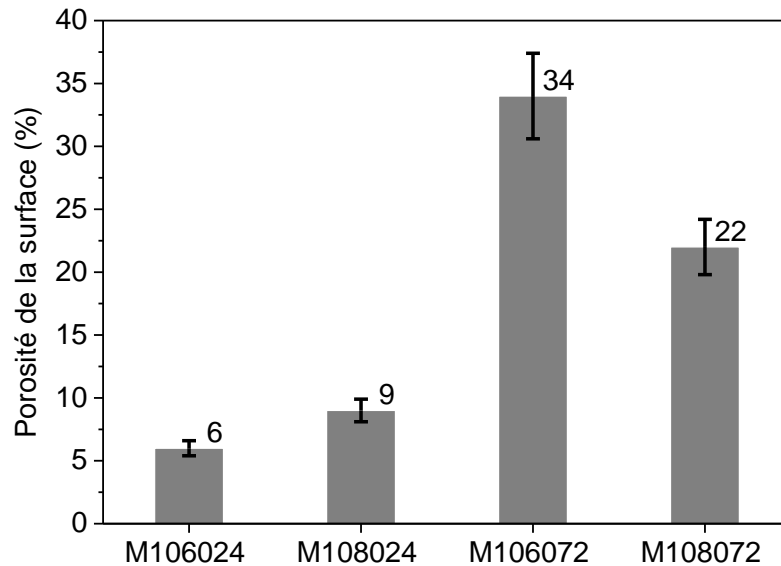


Figure A.1. Porosité de la couche d'hydrogel de titanate de sodium après un traitement alcalin dans une solution NaOH 10 M.

Les résultats ont indiqué que la porosité mesurée sur les échantillons ayant subi un traitement alcalin pendant 72 h est plus marquée que sur les échantillons traités pendant 24 h. La Figure A.1 montre la porosité mesurée sur les échantillons traités dans une solution NaOH 10 M. Pour les échantillons M106024 et M108024, cette valeur est respectivement de 6 et 9 %, alors que pour les échantillons M106072 et M108072, cette valeur est de 34 et 22 %.

Sur la Figure A.2, nous présentons la porosité de la couche de titanate de sodium des échantillons après le traitement thermique calculés par traitement d'images. La couche obtenue après un traitement alcalin de 72 h, est toujours plus poreuse que celle des échantillons obtenus après un traitement alcalin de 24

h. La porosité mesurée est de 30 à 34 % pour les échantillons après 72 h de traitement alcalin. Cependant, pour 24 h de traitement alcalin, la porosité est toujours inférieure à 23 %.

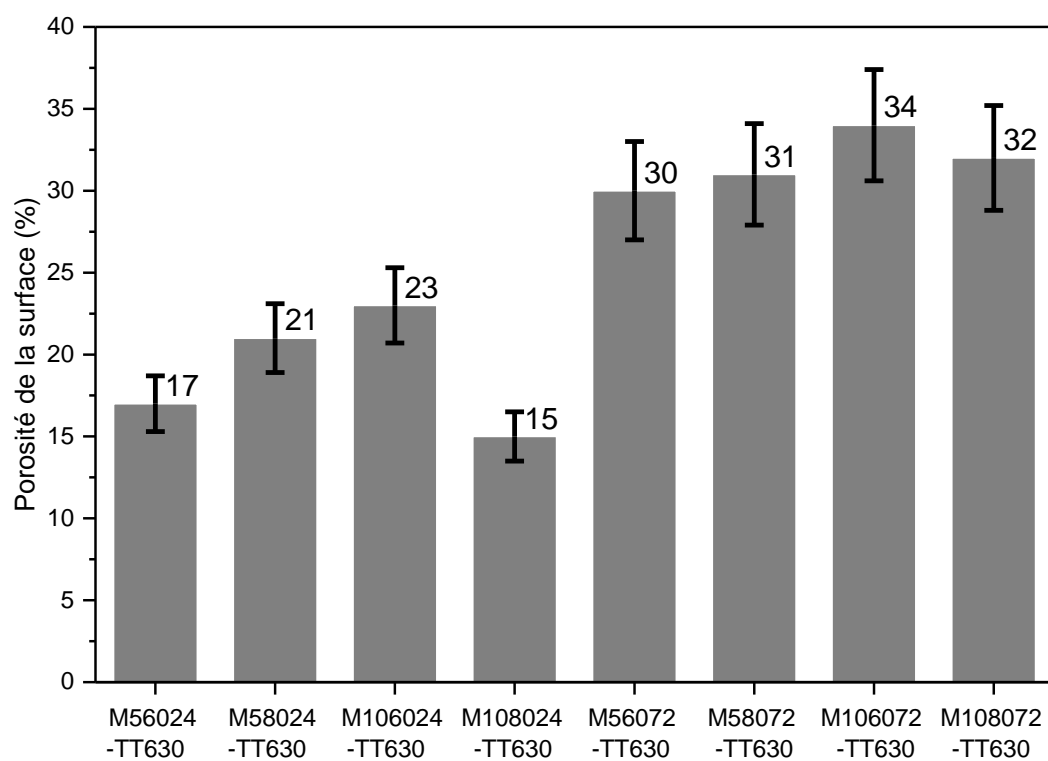


Figure A.2. Porosité de la surface des échantillons après le traitement alcalin-thermique.



## Caractérisation et biocompatibilité de dépôts de phosphates de calcium sur Ti-6Al-4V obtenus par chimie douce

### Résumé

Les biomatériaux en titane sont de plus en plus utilisés dans les implants dentaires et les prothèses de hanche. Toutefois, la surface des implants de titane doit être modifiée pour devenir davantage bioactive. Dans cette étude, les substrats de Ti-6Al-4V ont été d'abord modifiés par un traitement mécanique, puis par un traitement acide. Dans un deuxième temps, les échantillons ont subi un traitement alcalin dans une solution de NaOH puis un traitement thermique, ce qui a provoqué la formation d'une couche de titanate de sodium sur leur surface. Enfin, du phosphate de calcium a été déposé soit par voie sol-gel, soit par voie autocatalytique, sur la couche de titanate de sodium pour obtenir un revêtement bioactif de titanate de sodium/ phosphate de calcium.

Après le dépôt, la morphologie et la structure de la couche de phosphate de calcium ont été analysées par diverses méthodes comme FTIR, Raman, DRX, MEB, MET, EDS-X et SAED. De plus, la coupe transversale du revêtement de titanate de sodium/ phosphate de calcium a été analysée par MEB/ EDS-X. Et l'adhésion du dépôt de phosphate de calcium au substrat a été qualitativement estimée par nano-indenteur. La bioactivité *in vitro* du dépôt a été vérifiée par la méthode de Kokubo utilisant la solution simulant le plasma sanguin (SBF). Et la cytotoxicité *in vitro* du dépôt a été vérifiée par le test de viabilité cellulaire utilisant les ostéoblastes MG63.

Les résultats ont indiqué que le dépôt de phosphate de calcium est cytocompatible et bien lié au substrat. De plus, le dépôt de phosphate de calcium est stable en milieu physiologique (SBF) pour des durées d'immersion de 2 à 28 jours. La croissance d'apatite sur la surface des dépôts a été observée après 2 jours d'immersion dans SBF.

*Mots-clés : Ti-6Al-4V, hydroxyapatite, sol-gel, couche mince, titanate de sodium*

### Résumé en anglais

Titanium and its alloys based biomaterials are more and more used for medical implants in reconstructing of failed tissue. However to respond to the demand of orthopaedic and dental application, their surfaces have to be modified to increase the osteointegration rate. In this study, the Ti-6Al-4V alloy surface was firstly mirror polished and treated by an acid solution. Then, a thin film of sodium titanate was formed on its surface via an alkaline-heat treatment. Finally, a calcium phosphate was coated on the sodium titanate layer by using the sol-gel technique or the autocatalytic route. By this process, a bi-phase bioactive sodium titanate/calcium phosphate layer was created on the titanium substrate.

After coating, the morphology and the structure of calcium phosphate layer were analyzed by various methods such as FTIR, Raman, XRD, SEM, TEM, EDS-X and SAED. Additionally, a cross-section view of sodium titanate/ calcium phosphate layer was also realized by SEM/ EDS-X. And the adhesion of calcium phosphate layer onto the substrate was verified qualitatively by nano-indenter. The *in vitro* bioactivity of calcium phosphate coated samples was tested by Kokubo's method using the simulated body fluid (SBF). The *in vitro* cytotoxicity of calcium phosphate coated samples was estimated by cell viability assay using the osteoblasts MG63.

The results showed that the calcium phosphate coating is cytocompatible and strongly bonds to the substrate. In addition, the calcium phosphate coating was stable in SBF for different soaking periods from 2 to 28 days. And the growth of apatite on the calcium phosphate coated sample surface was identified after 2 days of immersion in SBF.

*Key words: Ti-6Al-4V implant, hydroxyapatite, sol-gel, thin film, sodium titanate*